



HAL
open science

Induction de l'expression génique par des petits ARN dans des cellules de mammifère

Feifei Liang

► **To cite this version:**

Feifei Liang. Induction de l'expression génique par des petits ARN dans des cellules de mammifère. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T100 . tel-00684393

HAL Id: tel-00684393

<https://theses.hal.science/tel-00684393>

Submitted on 2 Apr 2012

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.

Université Paris-sud XI
Faculté de Médecine

THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD XI

Ecole doctorale 418 (Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé)
Formation doctorale : Biologie cellulaire et moléculaire

Présenté et soutenu par

Feifei LIANG

Le 15 Décembre 2011

Induction de l'expression génique par des petits ARN dans des cellules de mammifère

JURY

Dr. Claude Boucheix
Dr. Stéfan Vagner
Dr. Hervé Vaucheret
Pr. Yannick Andéol
Dr. François dautry

Président de jury
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse

Remerciement

J'exprime ma sincère reconnaissance à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail. J'adresse en particulier tous mes remerciements au Dr Hervé Vaucheret et au Pr Yannick Andéol d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mon manuscrit de thèse et pour leurs commentaires pertinents.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à François DAUTRY, le directeur de ma thèse. En m'accordant sa confiance, il m'a offert la possibilité de m'épanouir dans mon travail de recherche. Ses nombreux conseils, son soutien, sa patience, son ingéniosité, sa perspicacité et son optimisme m'ont guidée tout au long de mes années de thèse. Je le remercie du plus profond de mon cœur pour son aide précieuse lors de la rédaction de mon manuscrit.

J'adresse également mes remerciements à Maryline Havard, Ilham Ladid, deux techniciennes dans le laboratoire, ainsi que Lue Huang, le thésard le plus zen dans le labo, qui m'ont beaucoup aidé et qui n'ont pas hésité à consacrer du temps à certaines de mes expériences. Votre gentillesse et votre chaleur humaine m'ont beaucoup motivée pendant ma thèse.

Je souhaite remercier les Dr Dominique Weil, Michel Kress et Thierry Tchenio pour leurs conseils sur certaines expériences.

Je voudrais également remercier Mme Sylvie Pillet, qui est la secrétaire la plus aimable que j'ai croisée dans ma vie. Avec Maryline Havard, je les considère comme mes deuxièmes mamans car elles m'ont apporté le soutien moral nécessaire pendant les années de ma thèse en France.

Un grand remerciement également au Dr Gérard Pierron, qui dispose d'un grand sens de l'humour, au Dr Sylvie Souquere, Dr Christelle Maric-Antoinat, Dr Marianne Benard, et Badia Adjero pour leur aide et la bonne humeur qu'ils m'ont apportées en plus de leur amitié.

Je n'oublierai jamais tous ces moments passés avec toute l'équipe sur le site de Villejuif et je remercie les membres des autres laboratoires du site pour leur aide et leur accueil.

Enfin, ce travail et la rédaction du manuscrit se sont terminés au LBPA à l'ENS Cachan. Je souhaite tout particulièrement remercier le Dr Michael Tovey de m'avoir proposé un stage post-doctoral avant même la soutenance de ma thèse et par voie de conséquence le Dr Christophe Lallemand et Brigitte Blanchard, pour leur compréhension lors de mon manque de disponibilité pendant la rédaction de ce manuscrit.

Abstract

In the majority of the eucaryote, the presence of double-strands RNA induce the inhibition of gene expression base on the complementary of sequence. The best known example is the case of RNA interference in *C. elegans* which is the first model described, in which the double-strands RNA generate an specific endonuclease who degrade all RNA complementary perfectly to the small RNA guide included in the complex RISC. In addition to this post-transcriptional activity, it has been observed in many eukaryotes the existence of mechanisms related to RNA interference and it inhibit transcription by acting at the chromatin. If these mechanisms have been clearly demonstrated in plants, fungi, there are only several examples of this type of regulation in mammals. Unexpectedly, the targeting the promoter of a gene with small double-stranded RNA can lead to increased expression. This paradoxical response has not been observed so far in mammalian cells, but it raises interest particularly to stimulate the expression of tumor suppressor genes, unfortunately the mechanism is still unknown.

My work has focused on studying the induction of expression by small RNAs. They are based first on the development of an experimental approach that allows to monitor the promoter activity of the targeted gene. To do this I used indicator constructions organized around a bidirectional promoter that controls the expression of two fluorescent proteins. When targeting the messenger of one of these proteins, the expression of the other is increased and I was able to show that this increase correlates with the amount of RNA messenger polymerase II presented on the bidirectional promoter. Thus, the use of a bidirectional promoter can effectively monitor the level of transcription of the gene targeted by the small RNA. This induction of expression detected in a "contralateral" is not due to an off-target effect of siRNA because it requires the presence of the target sequence on one of the transcripts of the construction indicator. The induction can be observed with many different small RNAs, including the interact as micro RNA. Thus the construction indicator that I developed are biased in an induction response transcriptionally in response to a silencing. The use of a bidirectional promoter is probably the origin of this bias through the possibility of inducing a convergent transcription when the plasmids are circular. In fact, the linearization of the construction indicator removes the induction, at least for the simplest constructions. If the heart of the complex RISC is the protein Ago2, is necessary for the silencing and the induction, I was able to show that in the second case Ago2 was in fact to guide the RISC complex on the transcripts but not to cut it. Indeed, the silencing of proteins TNRC6A and B reduces induction significantly without affecting the silencing if it processe in the siRNA model. Also anchoring the transcript EGFP induces a response similar to the small RNA (silencing and induction). This anchor approach allowed me to identify domaines necessary for silencing and induction and show that they are distinct. This work makes it possible to demonstrate that the transcriptional induction observed in our constructions indicator is due to a activity partner of Argonaute proteins, the GW182/TNRC6 family. This observation open the way for characterization of the mechanism of this induction by showing that it belongs to a specific activity of the RISC complex.

Keywords :

siRNA, miRNA, RISC, GW182/TNRC6, Ago2, double-stranded RNA

Résumé

Chez la plupart des eucaryotes, la présence d'ARN double brin induit la mise en place de mécanismes qui peuvent inhiber l'expression de gènes sur la base d'une complémentarité de séquence. L'exemple le mieux connu est le cas de l'interférence par l'ARN telle qu'elle a été décrite initialement chez *C. elegans*, où les ARN double brin génèrent une endonucléase spécifique de séquence qui dégrade tout ARN parfaitement complémentaire du petit ARN guide contenu dans le complexe RISC. En plus de cette activité post-transcriptionnelle, il a été observé chez de nombreux eucaryotes l'existence de mécanismes apparentés à l'interférence par l'ARN et qui inhibent la transcription en agissant au niveau de la chromatine. Si ces mécanismes ont été clairement mis en évidence chez les plantes et les champignons il n'existe que quelques exemples de ce type de régulation chez les mammifères. De manière inattendue, le fait de cibler le promoteur d'un gène avec de petits ARN double brin peut conduire à une augmentation de son expression. Cette réponse paradoxale n'a été observée jusqu'à présent que dans des cellules de mammifère, et si elle suscite un intérêt en particulier pour stimuler l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, son mécanisme est encore inconnu.

Mes travaux ont porté sur l'étude de l'induction de l'expression par des petits ARN. Ils reposent tout d'abord sur le développement d'une approche expérimentale qui permet de suivre l'activité du promoteur du gène ciblé. Pour cela, j'ai utilisé des constructions indicatrices organisées autour d'un promoteur bidirectionnel qui contrôle l'expression de deux protéines fluorescentes. Lorsque l'on cible le messager de l'une de ces protéines, l'expression de l'autre est augmentée et j'ai pu montrer que ceci corrèle avec la quantité d'ARN messager et de polymérase II présente sur le promoteur bidirectionnel. Ainsi, l'utilisation d'un promoteur bidirectionnel permet effectivement de suivre le niveau de transcription du gène ciblé par le petit ARN.

Cette induction de l'expression détectée de manière « controlatérale » n'est pas due à un effet hors cible des petits ARN car elle nécessite la présence de la séquence cible sur l'un des transcrits de la construction indicatrice. L'induction peut être observée avec de nombreux petits ARN différents, y compris s'ils interagissent comme des micro ARN. Les constructions indicatrices que j'ai développées sont donc biaisées en faveur d'une réponse de type induction transcriptionnelle en réponse à un silencing. L'utilisation d'un promoteur bidirectionnel est probablement à l'origine de ce biais à travers la possibilité d'induire une transcription convergente sur les plasmides lorsqu'ils sont circulaires. De fait, la linéarisation de la construction indicatrice supprime l'induction, du moins pour les constructions les plus simples.

Si le cœur du complexe RISC, la protéine Ago2, est nécessaire au silencing et à l'induction, j'ai pu montrer que dans le deuxième cas c'était en fait pour guider le complexe RISC sur les transcrits et non pas pour les couper. En effet, le silencing des protéines TNRC6A et B diminue fortement l'induction sans toucher au silencing s'il procède en mode siRNA. De plus l'ancrage sur le transcrit EGFP induit une réponse de même type que le petit ARN (silencing et induction). Cette approche d'ancrage m'a permis d'identifier les domaines nécessaires au silencing et à l'induction et de montrer qu'ils sont distincts.

Ce travail permet donc de mettre en évidence que l'induction transcriptionnelle observée sur nos constructions indicatrices est due à une activité des partenaires des protéines Argonaute, la famille GW182/TNRC6. Cette observation ouvre la voie à une caractérisation du mécanisme de cette induction en montrant qu'elle relève d'une activité spécifique du complexe RISC.

Mots clés :

siARN, miARN, RISC, GW182/TNRC6, Ago2, ARN double-brins

Abréviations :

ARNi : RNA interference

PTGS : post-transcriptionnal gene silencing

TGS : transcriptional gene silencing

ARNdb : ARN double brins

RISC : RNA-induced silencing complex

PABP : poly-A binding protein

HdGS : Homology-dependent Gene Silencing

RdRp: RNA dépendant RNA polymérase

RITS : RNA-induced Transcriptional silencing

INTRODUCTION	5
1^{ERE} PARTIE : L'INTERFERENCE PAR L'ARN : MISE EN EVIDENCE ET DESCRIPTION DU MECANISME	5
1.1 INTRODUCTION.....	5
1.2 PREMIERE DESCRIPTION DU MECANISME DE L'INTERFERENCE.....	9
1.2.1 <i>Les petits ARN produits par Dicer</i>	11
1.2.2 <i>Le complexe RISC</i>	11
1.2.2.1 Les protéines Argonaute.....	12
1.2.2.2 Ago2 est une trancheuse.....	14
1.2.2.3 Les autres protéines du complexe RISC.....	16
2^{EME} PARTIE : LES MICRO ARN, ORIGINE ET MODE D'ACTION	20
2.1 INTRODUCTION : L'ORIGINE DES PETITS ARN ET LES MICRO ARN.....	20
2.1.1 <i>Description initiale des micro ARN</i>	20
2.2 LES GENES DE MICRO ARN ET LEUR EXPRESSION.....	22
2.3 L'INTERACTION ENTRE MICRO ARN ET LES GENES CIBLES.....	24
2.4 LE MECANISME DU SILENCING PAR LES MICRO ARN.....	27
2.4.1 <i>Introduction</i>	27
2.4.2 <i>La nature du silencing</i>	29
2.4.2.1 Les données globales sur la régulation de l'expression.....	29
2.4.2.2 Etudes de lysat cellulaires in vitro.....	32
2.4.3 <i>Les protéines GW182</i>	33
2.4.3.1 Introduction : Identification des protéines GW182.....	33
2.4.3.2 Les corps GW, P-bodies et l'implication de la famille GW182 dans les régulations par les micro ARN.....	34
2.4.3.3 Domaines fonctionnels des protéines GW182.....	36
2.4.3.4 Analyse fonctionnelle.....	38
a - Interaction avec les protéines Argonaute.....	39
b - Le domaine responsable du silencing par micro ARN.....	41
c - La localisation dans les P-bodies / corps GW.....	42
d - Les effecteurs du silencing.....	43
3^{EME} PARTIE : L'INTERFERENCE TRANSCRIPTIONNELLE	49
3.1 INTRODUCTION.....	49
3.1.1 <i>Activités nucléaires du complexe RISC : silencing post-transcriptionnel</i>	49
3.2 LE SILENCING TRANSCRIPTIONNEL.....	51
3.2.1 <i>Chez les plantes</i>	51
3.2.2 <i>Chez C. elegans</i>	52
3.2.3 <i>Chez S. pombe</i>	52
3.2.4 <i>Le silencing transcriptionnel chez les mammifères</i>	56
3.3 ACTIVATION DE L'EXPRESSION PAR LES PETITS ARN.....	60
3.3.1 <i>Observation de « l'activation par l'ARN »</i>	60
3.3.2 <i>Mécanisme de l'activation</i>	63
4^{EME} PARTIE : OBSERVATIONS INITIALES DU LABORATOIRE	67

Index

4.1 MESURE DE LA CINETIQUE DE COUPURE PAR RISC	67
4.2 ETUDE L'ACTIVITE DE COUPURE PAR RISC DANS LE NOYAU	68
MATERIELS ET METHODES	72
1^{ERE} PARTIE: CELLULES	72
1.1 LES LIGNEES CELLULAIRES	72
1.2 CULTURE CELLULAIRE	73
1.3 TRANSFECTIONS	73
1.3.1 Principe de la transfection au phosphate de calcium	73
1.3.2 Protocoles de transfection au phosphate de calcium	73
1.3.3 Transfection par la Lipofectamine 2000	74
1.4 DETECTION LES PROTEINES FLUORESCENTES PAR CYTOMETRIE EN FLUX	75
1.4.1 Préparation des échantillons	75
1.4.2 Protocole d'analyse utilisé	75
1.4.2.1 Analyse en deux couleurs : EGFP et DsRed	75
1.4.2.2 Analyse en trois couleurs : EGFP, DsRed et marquage par un anticorps couplé APC	77
2^{EME} PARTIE: BIOLOGIE MOLECULAIRE	78
2.1 siARN	78
2.2 VECTEURS ET SONDAS	80
2.2.1 Construction indicatrice pBiFluo et dérivés	80
2.2.1.1 Constructions pBiFluo-BoxBxn	81
2.2.1.2 Constructions pBiFluo-3miLet7 ; pBiFluo-2CXCR4	83
2.2.2 Plasmides pCIneo- λ N-HA TNRC6A, B, et C et dérivés	83
2.2.2.1 Préparation des amorces	85
2.2.2.2 Obtention des délétions par PCR	85
2.2.3 Sonde pour Northern Blot	87
2.2.3.1 sonde pour détecter l'ARNm de la DsRed	87
2.2.3.2 sonde pour détecter l'ARNm de l'EGFP ou le transcrit antisens de la région EGFP	88
2.2.3.3 sonde pour détecter l'ARNm de β -globine et le transcrit antisens de la région β -globine	88
2.2.3.4 sonde 28S	88
2.3 EXTRACTION D'ARN	89
2.3.1 Lyse au thiocyanate de guanidine et ultra-centrifugation	89
2.3.2 Utilisation du "kit SV total RNA isolation system" de Promega	89
2.3.3 Isolement des petits ARN par un protocole au phénol-chloroforme	90
2.4 ANALYSE DES ARN	92
2.4.1 Par Northern blot	92
2.4.2 Analyse par RT-PCR quantitative	93
2.4.3 Marquage des sondes	94
2.4.3.1 Marquage par transcription avec les polymérase ARN T7 ou T3	94
2.4.3.2 Marquage du phosphate 5' avec la T4 polynucléotide kinase	94
2.5 CHROMATINE IMMUNOPRECIPITATION (CHIP)	95
RESULTATS	97
1^{ERE} PARTIE : ETUDE DE L'INDUCTION PAR LES PETITS ARN DANS UN	

TRANSFECTANT STABLE, α1A	97
1.1 MESURE DE L'EXPRESSION DE L'EGFP ET DE LA DSRED	97
1.2 CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DE L'EGFP ET DE LA DSRED DANS LES CELLULES α 1A	99
1.3 ANALYSE DE LA REPONSE AU siARN siGLOE1	100
1.3.1 Mise en évidence d'un silencing de l'EGFP et d'une induction de la DsRed	101
1.3.2 Cinétique du silencing et de l'induction	103
1.4 ETUDE DE LA REPONSE A D'AUTRES siARN	104
1.4.1 Etude de différents siARN ciblant le messager de l'EGFP ou de la DsRed.....	104
1.4.2 Transformation de siGloE1 en un « micro ARN »	105
1.5 IDENTIFICATION DU PETIT ARN GUIDE	106
1.6 ROLE DES PROTEINES ARGONAUTES DANS L'INHIBITION ET L'INDUCTION	107
BILAN.....	110
2^{EME} PARTIE: ETUDE DE L'INDUCTION EN TRANSITOIRE	111
2.1 PROPRIETES GENERALES DU MODELE	111
2.1.1 Premières observations : réponse de pBiFluo-Glo aux ARN interférant β -globine	111
2.1.2 Spécificité de l'induction par les petits ARN	113
2.1.3 Constructions avec le site en orientation inverse	115
2.2 MISE EN EVIDENCE D'UNE REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE	116
2.2.1 Etude des niveaux d'ARN messagers.....	116
2.3 EFFET DE LA LINEARISATION DU PLASMIDE.....	119
2.4 EFFETS EN TRANS	122
3^{EME} PARTIE : RECHERCHE DE TRANSCRITS ANTISENS	126
3.1 APPROCHE PAR RT-PCR QUANTITATIVE SPECIFIQUE DE BRIN	126
3.1.1 Exemple d'analyse par RT-PCR.....	127
3.1.2 Analyse de la région EGFP-Glo de pBiFluo-Glo.....	130
3.1.3 Résultats sur l'ARN messager EGFP de pBiFluo	132
3.1.4 Résultats sur l'ARN messager DsRed de pBiFluo	132
3.1.5 Différence de signal entre les plasmides circulaires et linéaires	133
3.2 RECHERCHE D'ARN ANTISENS PAR NORTHERN	135
4^{EME} PARTIE: LES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE SILENCING ET L'INDUCTION	138
4.1 ROLE DES PROTEINES ARGONAUTE DANS LE SILENCING ET L'INDUCTION	138
4.2 ROLE DES PROTEINES TNRC6 DANS LE SILENCING ET L'INDUCTION	140
4.2.1 Etude du rôle des protéines TNRC6 par silencing	140
4.2.1.1 pBiFluo en présence du siEGFPA.....	140
4.2.1.2 pBiFluo-glo en présence du siGloE1.....	141
4.2.1.3 pBiFluo-2CXCR4 en présence de siCXCR4.....	142
4.2.2 Etude du rôle de TNRC6B par surexpression	143
4.2.3 Etude du rôle de TNRC6B par ancrage.....	147
4.2.3.1 Introduction.....	147
4.2.3.2 Etude de la réponse de pBiFluo-BoxBx4 à l'ancrage des protéines TNRC6	149
4.2.3.3 Analyse des domaines de TNRC6B par ancrage.....	151

Index

4.2.3.4 Etude de la réponse par l'ancrage en fonction du niveau d'expression de la construction	
TNRC6B : analyse en trois couleurs	158
4.2.3.4.1 Exemple d'analyse en trois couleurs	158
4.2.3.4.2 Analyse des constructions de délétion par marquage trois couleurs	159
DISCUSSION	162
1ERE PARTIE : BILAN DES RESULTATS ET DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE.....	162
MISE EN EVIDENCE D'UNE INDUCTION DE LA DSRED	162
1.1 REALITE DU PHENOMENE	162
1.1.1 <i>L'analyse en cytométrie</i>	162
1.1.2 <i>Compétition pour l'expression entre l'EGFP et la DsRed</i>	163
1.1.2.1 Spécificité du phénomène.....	164
1.1.2.2 L'induction de la transcription	165
1.1.2.3 Compétition entre le silencing et l'induction	165
1.1.2.4 Méthode de transfection.....	166
1.1.3 <i>Clone stable et transfections transitoires</i>	167
2^{EME} PARTIE: MECANISME DE L'INDUCTION.....	168
2.1 INDUCTION EST UNE INHIBITION D'UNE INHIBITION.....	168
2.2 ROLE D'UNE TRANSCRIPTION ANTISENS.....	170
2.3 LE MODELE DE K. MORRIS : LA COUPURE DES TRANSCRITS ANTISENS	170
2.4 LES EFFETS EN TRANS	173
3^{EME} PARTIE: PERSPECTIVES	173
3.1 LE MECANISME DE L'INDUCTION	173
3.1.1 <i>Le rôle de TNRC6</i>	173
3.1.2 <i>Modifications de la chromatine liées à l'induction</i>	175
3.1.3 <i>Rôle de la transcription antisens</i>	176
3.2 LE MODELE EXPERIMENTAL.....	177
3.2.1 <i>Utilisation des constructions indicatrices</i>	177
3.2.2 <i>Le cas des gènes cellulaires</i>	179
BIBLIOGRAPHIE.....	180

INTRODUCTION

1^{ère} **Partie** : L'interférence par l'ARN : mise en évidence et description du mécanisme

1.1 Introduction

Formellement, la première description de l'interférence par l'ARN (et l'introduction du terme « RNA interference ») a été faite dans l'article de Fire et col. de 1998 (Fire et al, 1998). Cet article décrit l'observation chez *C. elegans* d'un mécanisme de régulation de l'expression génétique complètement inattendu. En effet les auteurs montrent que l'introduction par micro-injection dans des cellules de *C. elegans* d'ARN double brin induit une inhibition de l'expression de tout gène dont les séquences transcrites contiennent des régions identiques à celle de l'ARN double brin (ARNdb) introduit. Les auteurs montrent de plus qu'il s'agit d'un mécanisme post-transcriptionnel qui affecte l'accumulation des ARN messagers correspondants. Chez *C. elegans* cette nouvelle régulation a de nombreuses caractéristiques remarquables. Ainsi, la micro-injection dans quelques cellules est suffisante pour induire un "silencing", aussi appelé PTGS, se réfère à un groupe d'effets d'inhibition génique par lequel l'expression d'un ou de plusieurs gènes est régulée négativement ou entièrement supprimée par l'introduction d'une molécule d'ARN antisens» dans l'ensemble de l'organisme (silencing systémique) qui est observable non seulement chez l'animal injecté mais aussi dans sa descendance. Toutefois, après une ou deux générations, le phénotype redevient sauvage, confirmant qu'il s'agit d'un mécanisme épigénétique. Enfin, rapidement après cette première description il a été montré que d'autres modes d'administration de l'ARN double brin étaient possibles : trempage du ver dans une solution d'ARNdb, ou par voie alimentaire en nourrissant les vers avec une souche de *E. coli* exprimant de l'ARN double brin. L'ensemble de ces observations indiquait, qu'en plus des régulations décrites jusqu'alors, il existait un mécanisme passé inaperçu qui était efficace, facile à mettre en œuvre et capable de se maintenir à long terme, en tout cas bien au-delà de l'existence possible des molécules d'ARNdb initialement introduites. Enfin, le facteur déclenchant de ce mécanisme était

Introduction

l'ARNdb une molécule qui jusque là avait été considérée comme ne jouant pas de rôle particulier dans l'expression génétique, de fait considérée comme probablement absente de la plupart des cellules, mis à part dans le cas d'une infection par un virus à génome ARN.

Même si cette observation constitue clairement une rupture dans notre perception de la régulation de l'expression génétique et a valu à ses auteurs le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006, elle avait été précédée de nombreuses descriptions de phénomènes non Mendéliens qui suggéraient l'existence de mécanismes non encore identifiés. En particulier chez les plantes le phénomène de co-suppression avait été décrit une dizaine d'années auparavant. En 1990, Jorgensen et ses collaborateurs tentaient de renforcer la couleur pourpre de pétunias en introduisant des copies du gène codant l'enzyme clé de la synthèse de ce pigment (la chalcone synthase) (Napoli et al, 1990). De façon surprenante, les fleurs de certains pétunias transgéniques devenaient partiellement ou totalement blanches, l'introduction de copies supplémentaires du gène conduisant à l'extinction de l'expression du gène naturel. En 1994, Wassenecker montra que la réplication d'un viroïde dans des cellules d'*Arabidopsis thaliana* déclenche une méthylation de l'ADN correspondant (Wassenecker et al, 1994). Bien que tous les aspects du mécanisme n'aient pas pu être étudiés dans ce modèle, cette observation a conduit les auteurs à proposer que l'ARN qui s'accumule dans le noyau, tout particulièrement s'il est double brin, puisse servir de guide à une méthylase de l'ADN et ainsi induire un silencing transcriptionnel (TGS pour Transcriptional Gene Silencing). Ainsi il était proposé un cadre conceptuel dans lequel le phénomène de spécificité de séquence dans la co-suppression est interprété ainsi: « *In higher plants there are two phenomena that can be explained by RNA-directed methylation: the frequently observed methylation of multiple copy integrates of foreign DNA in plant transformation experiments with petunia (Linn et al., 1990) and with Arabidopsis thaliana (Scheid et al., 1991) and the co-suppression phenomenon by which the introduction of genes into petunia plants leads to inactivation of both the transferred genes and the endogenous sequences by methylation (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990).*

Introduction

Rapidement après la description initiale chez *C. elegans*, il a été mis en évidence que l'ARN double brin pouvait induire un silencing chez d'autres espèces, comme la drosophile (Kennerdell & Carthew, 1998) montrant qu'il ne s'agissait pas d'une spécificité de *C. elegans*. De plus, la pertinence de l'hypothèse de Wassenegger et col. a pu être établie par la mise en évidence d'ARN double brin dans des situations de co-suppression chez les plantes. De fait, l'interférence par l'ARN est un mécanisme conservé chez la très grande majorité des eucaryotes ; l'exception la mieux caractérisée étant celle de *Saccharomyces cerevisiae*. La présence de mécanismes au moins partiellement apparentés chez les bactéries (à travers les mécanismes de défense contre les phages et le rôle de la RNase III) ou chez les archaebactéries (avec l'existence de protéines Argonaute) suggère une origine très ancienne de ce type de mécanisme dans le monde vivant. En ce qui concerne les mammifères, l'importance de ce type de mécanisme a initialement été mise en doute du fait de l'existence d'une autre réponse aux ARNdb, la réponse de type interféron. Ainsi, dans la plupart des types cellulaires la présence d'ARN double brin conduit à une activation de la kinase PKR, protéine kinase R, induite par l'interféron, aussi connue comme une protéine kinase activée par ARNdb, ou comme un facteur d'initiation eucaryote de la traduction alpha-2 kinase 2 (EIF2AK2), elle est une enzyme chez l'homme codée par le gène EIF2AK2 » et à une diminution de la traduction du fait de la phosphorylation du facteur eIF2 (Levin & London, 1978; O'Farrell, 1977) En parallèle, l'activation de la 2'-5' oligo adénylase synthétase et de la RNase L, une ribonucléase induite par l'interféron qui détruit tous les ARN dans la cellule, induit une dégradation des ARN messagers (Hassel et al, 1993). C'est pourquoi dans un premier temps l'existence de l'interférence par l'ARN a été recherchée dans des cellules connues pour ne pas avoir de réponse de type interféron : oeuf fécondé, cellules souches embryonnaires (ES) (Wianny & Zernicka-Goetz, 2000; Yang et al, 2001). Ce n'est qu'après une première compréhension du mécanisme de l'interférence et la description des petits ARN interférant que des études plus approfondies ont pu être menées dans tous les types cellulaires (voir partie suivante 2.2).

L'expérience initiale de A. Fire est un artéfact de laboratoire puisque l'on introduit

Introduction

des ARNdb dont on pense qu'ils n'existent normalement pas dans la cellule. La nature de cet élément inducteur a immédiatement attiré l'attention sur le cas des virus à génome ARN puisque, même pour un génome simple brin, le cycle répliatif comprend nécessairement un intermédiaire double brin. Chez les plantes un grand nombre de virus a un génome ARN et l'inactivation de gènes impliqués dans le mécanisme de l'interférence d'ARN conduit à des infections beaucoup plus sévères (Vaucheret et al, 2001). Une autre observation qui confirme l'importance de ce mécanisme dans les défenses contre les infections virales est la présence dans le génome de nombreux virus des plantes de gènes capables « d'interférer » avec le mécanisme de l'interférence (Ding & Voinnet, 2007). Comme mentionné plus haut, l'existence de la réponse interféron chez les mammifères suggère que d'autres moyens de défense antivirale ont été sélectionnés au cours de l'évolution et ont pu se substituer au moins en partie à l'interférence par l'ARN. La conservation du mécanisme suggère donc qu'il doit intervenir dans d'autres régulations biologiques. Les différents types de séquences répétitives constituent de bons candidats pour être régulés par l'interférence si l'on considère qu'il est probable que l'expression de ces séquences va aboutir à la présence d'ARN sens et antisens et ainsi à la formation d'ARNdb. Mais, les études menées par de nombreux laboratoires ont montré que si les séquences répétitives, par exemple péricentromériques chez *S. pombe*, ou les transposons chez la drosophile, sont des sources d'ARN double brin. La source principale vient en fait des régions structurées sur des ARN simple brin comme les ARN messagers. Cette observation a permis de faire le lien avec une autre observation déjà effectuée chez *C. elegans*, l'existence de gènes régulateurs du développement dont le seul produit d'expression est un petit ARN.

Ainsi il est progressivement apparu que si le mécanisme de l'interférence par l'ARN était conservé chez la plupart des eucaryotes, il existait en fait de nombreuses versions de ce mécanisme tant en ce qui concerne les activités biologiques mises en œuvre que la source du facteur déclenchant l'ARNdb. Très rapidement après sa première description, l'interférence par l'ARN est devenue un des outils les plus puissants pour étudier la fonction des gènes, en particulier chez les organismes où la génétique est

difficile à mettre en œuvre comme les mammifères.

1.2 Première description du mécanisme de l'interférence

L'utilisation de données obtenues chez l'ensemble des organismes modèles de la biologie a permis de rapidement progresser dans la compréhension du mécanisme de l'interférence. En 1999, Hamilton et Baulcombe ont mis en évidence la présence de petits ARN d'une vingtaine de nucléotides chez des plantes où était observée une co-suppression (Hamilton & Baulcombe, 1999). En parallèle, le groupe de G. Hannon a montré la présence dans des extraits de drosophile d'une activité nucléase spécifique de séquence qui était induite par l'introduction d'ARNdb (Hammond et al, 2000). De plus ils ont détecté la présence dans cette nucléase d'un petit ARN, ce qui les a conduit à proposer qu'il servait de guide pour la reconnaissance de l'ARN messenger ciblé. Peu de temps après, le même groupe a décrit le rôle d'une enzyme de la famille de la RNase III dans le processus de fractionnement des ARNdb en molécules d'une vingtaine de nucléotides qui ont été appelés petits ARN interférant. Cette enzyme a été appelée dicer (l'éminceuse) (Bernstein et al, 2001). Chez les mammifères, elle est exprimée à partir d'un gène unique qui est essentiel pour le développement.

Ces différents éléments ont permis de proposer un schéma général pour le mécanisme de l'interférence par l'ARN (Figure 1, page suivante). L'idée centrale est qu'un ARN double brin de grande taille (ou un transcrit fortement structuré dans le cas des micro ARN) est hydrolysé en fragments d'une vingtaine de nucléotides par Dicer. L'un ou l'autre brin du petit ARN interférant est alors incorporé dans le complexe RISC (en fait c'est probablement l'ARN double brin qui est incorporé dans la protéine Argonaute tandis que le brin « passager » est éliminé soit par hydrolyse soit par dissociation (Matranga et al, 2005). Le complexe RISC est alors fonctionnel et peut interagir avec un ARN cible. Les conséquences de cette interaction peuvent être multiples : une coupure endonucléolytique dans le cas de l'interférence « canonique », des régulations post-transcriptionnelles si la cible est imparfaite (voir la deuxième partie) ou encore des effets transcriptionnels (voir la troisième partie).

Introduction

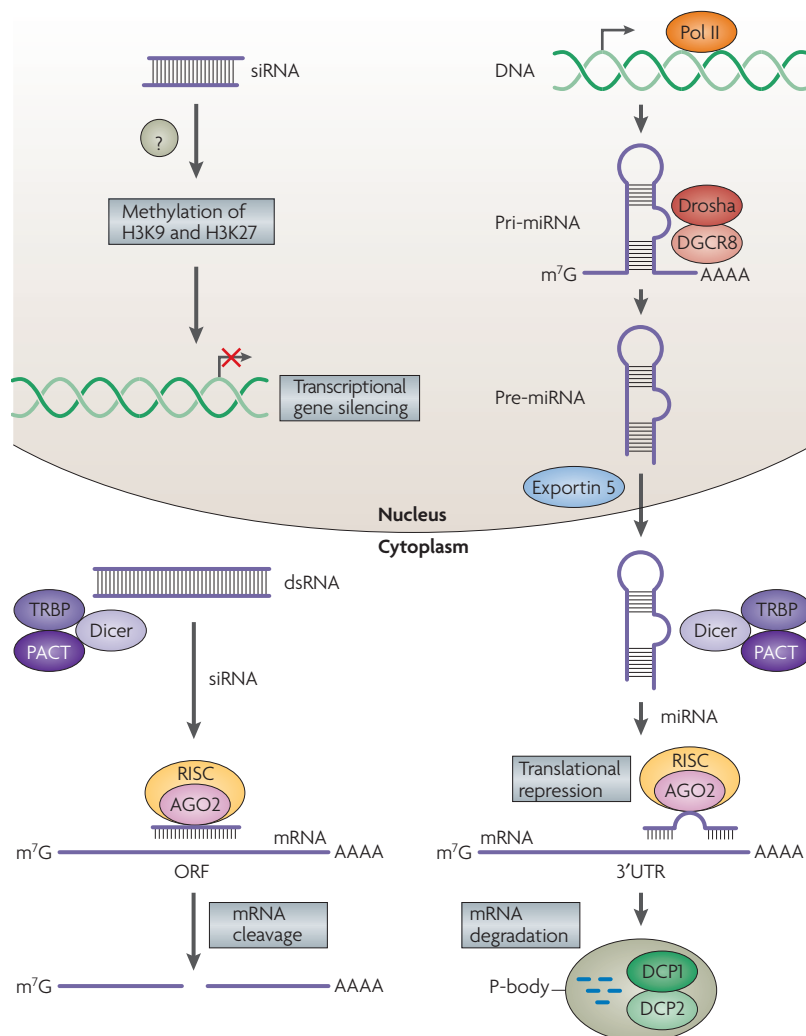


Figure 1 : Schéma général de l'interférence par l'ARN chez les mammifères (Kim, 2007) En bas à gauche, des ARNdb cytoplasmiques sont traités, par un complexe composé de Dicer, TAR RNA-binding protein (TRBP) et l'activateur protéine de la protéine kinase PKR (PACT), dans des petits ARN interférants (siARN), qui sont ensuite chargés dans l'Argonaute 2 (Ago2) et le complexe RISC « RNA-induced silencing complex ». Chez les plantes, le brin guide de siARN reconnaît des sites ciblés et dirige l'hydrolyse d'ARNm, qui est effectuée par le domaine catalytique d'AGO2. Les siRNA complémentaires au promoteur du gène inhibe la transcription dans le noyau par des changements de la chromatine comme la méthylation des histones (en haut à gauche) ; les détails moléculaires précis de cette voie dans les cellules de mammifères ne sont actuellement pas clairs. Comme le voie indiqué à droite, endogène microARN primaires (pri-miARN) sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) et initialement traités par Droscha-DGCR8 « DiGeorge syndrome critical region gene 8 » pour générer des précurseurs miARN (pré-miARN). Ces précurseurs sont exportés vers le cytoplasme par l'exportin 5 et ensuite interagit avec le complexe Dicer-TRBP-PACT, qui traite le pré-chargement des micro ARN (miARN) dans AGO2 et RISC. Les miARN matures reconnaît les sites cibles dans la région 3' non traduite (3' UTR) des ARNm dirigent l'inhibition de la traduction et la dégradation de l'ARNm dans les P-bodies qui contiennent des enzymes du décoiffage « DCP1 et DCP2 ». H3K9 « histone 3 lysine 9 »; H3K27 « histone 3 lysine 27 »; m₇G, « 7-methylguanylate »; ORF « open reading frame ».

Introduction

1.2.1 Les petits ARN produits par Dicer

Chez les mammifères, il n'existe qu'un seul gène Dicer et donc tous les petits ARN issus de la voie canonique (ARNdb > Dicer > petits ARN) sont le produit de l'activité de ce gène. Dicer est une enzyme de la famille des RNase III qui prend en charge des ARNdb pour substrat et qui coupe ceux-ci en laissant une extrémité 3' protubérante de 2 nucléotides. La taille de la région double brin est en général de 19 nucléotides pour l'enzyme de mammifère mais peut varier légèrement. La caractérisation des produits de Dicer a conduit à la définition d'un ARN interférant prototypique qui est décrit dans la figure 2. Chez d'autres organismes la taille des petits ARN produits par les homologues de Dicer peut être différente. Par exemple chez les plantes, où il existe quatre paralogues, chacun produit des petits ARN d'une taille caractéristique. Le mécanisme endonucléolytique de Dicer génère une extrémité 5'-phosphate et une extrémité 3'-OH.

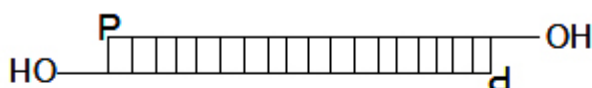


Figure 2 : Schéma représentant une molécule de siARN : un cœur duplexe d'ARN d'environ 19 paires de base (bps) qui est suivi par 2 nucléotides à l'extrémité 3' protubérante de chaque brin. OH : 3' hydroxyl ; P : 5' phosphate.

Cette description des petits ARN interférant a joué un rôle critique pour l'application de l'interférence par l'ARN aux mammifères. En effet, il était connu que l'activation de la réponse interféron nécessitait, pour être efficace, des ARN double brin de plus de 30 nucléotides. Cette caractéristique a suggéré à T. Tuschl, alors chercheur post-doctoral chez P. Sharp, qu'il devrait être possible d'induire une interférence sans déclencher de réponse interféron en introduisant directement des petits ARN double brin (Elbashir et al, 2001). Même s'il existe des limitations comme l'efficacité et la spécificité du silencing, cette approche est très rapidement devenue un outil de base de la biologie des mammifères.

1.2.2 Le complexe RISC

La possibilité de détecter une activité endonucléase spécifique de séquence dans les lysats de drosophile, puis d'autres organismes, a permis de mettre au point des

protocoles de purification de la machinerie effectrice de l'interférence. Dès le premier article du groupe de G. Hannon, les complexes ainsi purifiés ont été baptisés RISC pour « RNA Induced Silencing Complex » (Hammond et al, 2000). De plus, les premières purifications ont confirmé la présence de petits ARN et de protéines.

En fonction des conditions de purification, la taille apparente du complexe RISC peut être très différente. Dans la première approche du groupe de G. Hannon, un complexe de 500 kDa a ainsi été purifié à partir des cellules S2 de drosophile et par spectrométrie de masse il a été mis en évidence la présence de Ago2 (Hammond et al, 2001). De fait, dans tous les cas où le complexe a une activité endonucléase, il a été détecté la présence d'une protéine Argonaute, ce qui a rapidement été interprété comme indiquant que les protéines Argonaute jouent un rôle central dans le complexe RISC.

1.2.2.1 Les protéines Argonaute.

La première identification d'une protéine Argonaute a été faite chez *A. thaliana* dans une étude de mutations qui affectent la forme des feuilles (Bohmert et al, 1998). Le groupe de H. Vaucheret a montré alors que Ago1 était nécessaire au co-silencing post-transcriptionnel chez *A. thaliana* et était apparentée aux gènes QDE2 (Quelling deficient) de *N. crassa* et Rde1 (RNAi deficient) de *C. elegans*. L'implication de Ago2 de drosophile par le groupe de G. Hannon étendait donc à la drosophile, et dans le cadre d'une approche biochimique, le rôle des protéines Argonaute dans le silencing post-transcriptionnel. Il existe des protéines de la famille Argonaute chez tous les eucaryotes (à l'exception de la levure *S. cerevisiae*), qui sont souvent exprimées dans tous les types cellulaires. Des protéines apparentées existent aussi chez les archaebactéries.

Les arbres phylogénétiques (Parker & Barford, 2006) indiquent l'existence de deux sous-familles distinctes : les protéines Argonaute et les protéines Piwi (Figure 3). Chez les mammifères ceci se traduit par la présence de quatre protéines Argonaute « Ago 1, 2, 3, 4 » et de trois ou quatre protéines Piwi « PiwiL-Piwi Like 1, 2, 3 chez *homo sapiens* ». Cette distinction s'applique sans ambiguïté aux protéines Argonaute

Introduction

des animaux, mais la sous-famille Piwi est absente chez les plantes et les champignons. Les protéines Piwi seront peu discutées dans la suite de cette présentation, leur expression étant essentiellement restreinte aux cellules germinales chez les mammifères. Enfin, la genèse des petits ARN associés aux protéines Piwi (Pi-ARN) ne dépend pas de Dicer et leur taille est plus élevée que celle des si ou micro ARN (26-31 nt par rapport à 21-24 nt) (Seto et al, 2007).

Globalement, on peut remarquer qu'il existe une grande diversité de protéines Argonaute chez *C. elegans* et dans une certaine mesure chez les plantes, ce qui est en accord avec l'importance biologique de ces régulations chez ces organismes.

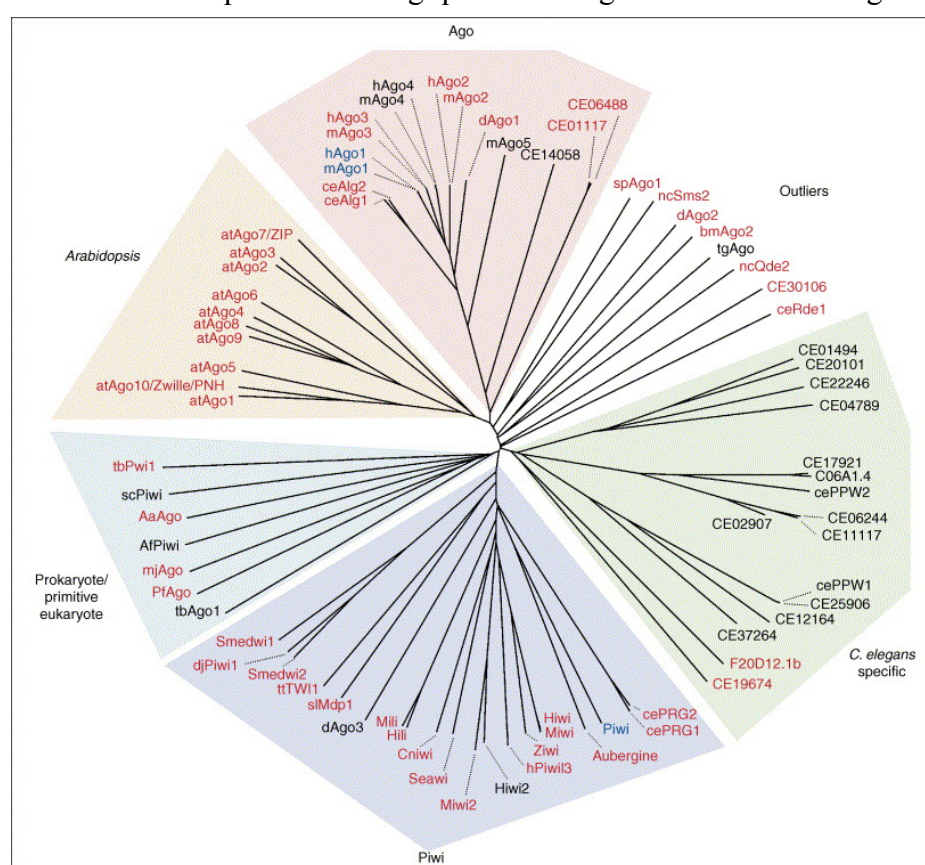


Figure 3 :
L'analyse phylogénétique de la famille des protéines Argonaute (repris de (Parker & Barford, 2006)), y compris tous les protéines Argonaute trouvées en utilisant BLAST des humains (huit), souris (huit), la drosophile (cinq), *Caenorhabditis elegans* (25) et

Arabidopsis (une dizaine), et les autres discutés dans la littérature. L'arbre a été divisé en cinq sous-familles. (Ago, *C. elegans* spécifiques, Piwi, procaryotes et eucaryotes primitifs, et *Arabidopsis*) ainsi que les valeurs aberrantes (outliers). La police de couleur indique la capacité de la protéine Argonaute pour trancher en ce qui concerne le motif Asp-Asp-His/Asp catalytique: rouge, contiennent un motif plein Asp-Asp-His (ou occasionnellement Asp-Asp-Asp) motif; bleu, contiennent un motif partiel (Asp-Asp-Xaa) (tel que le tranchage drosophile Piwi); noir, n'ont pas au moins un catalyseur acide aspartique et sont peu susceptibles de trancher. Pleine longueur séquences ont été alignées en utilisant Clustal W (1, 83). La création d'arbre phylogénétique a été effectuée par la méthode Neighbour-Joining dans Clustal W (1, 83) (pas de corrections pour des lacunes ou des substitutions multiples). L'arbre a été tracé à l'aide de Phylodendron (version 0.8d).

Introduction

1.2.2.2 Ago2 est une trancheuse

L'identification de la nucléase active dans le complexe RISC a été rendue difficile par l'absence de motif clairement identifiable dans les protéines qui avaient été détectées dans le complexe. De fait si une nucléase a bien été identifiée, Tudor-SN (Caudy et al, 2003), il était à peu près clair dès sa caractérisation qu'il ne s'agissait pas de l'endonucléase recherchée.

L'idée que la protéine Argonaute elle-même soit l'élément catalytique du complexe s'est progressivement imposée au fur et à mesure que les différentes approches biochimiques et génétiques convergeaient sur les protéines Argonaute (Liu et al, 2004). Ainsi, Ago2 est la seule protéine présente après une purification stringente de l'activité endonucléase de cellules S2 de drosophile (Rand et al, 2004). S'il n'y a pas de motif nucléase classique, l'étude de la structure du domaine Piwi de Ago *Pyrococcus furiosus* a permis de mettre en évidence une analogie avec le domaine catalytique des RNase H « RNase est une enzyme qui hydrolyse le brin d'ARN dans un double brin hybride ADN:ARN » des rétrovirus des vertébrés (Song et al, 2004). A posteriori, les caractéristiques des RNase H sont effectivement voisines de celles du complexe RISC : la coupure sur un brin d'un acide nucléique double brin « ARN/ADN dans le premier cas donc la RNase H, ARN/ARN dans l'autre donc le RISC ». Parmi les quatre protéines Argonaute de mammifère, seule Ago2 a une activité endonucléase. Cette activité nucléase nécessite trois acides aminés (D : Aspartate, D : Aspartate, E : Glutamate) impliqués dans la coordination d'un ion métallique Mg²⁺ (Song et al, 2004) et l'activité endonucléolytique de RISC nécessite effectivement un ion métallique divalent Mg²⁺ (Schwarz et al, 2004). L'absence de ces acides aminés explique pourquoi Ago 1 et 3 n'ont pas d'activité endonucléase tandis que dans le cas d'Ago 3 bien qu'ayant les acides aminés DDE ce sont d'autres substitutions qui la rendent inactive « Q : Glutamine 633 et H : Histidine 634 » (Liu et al, 2004).

Introduction

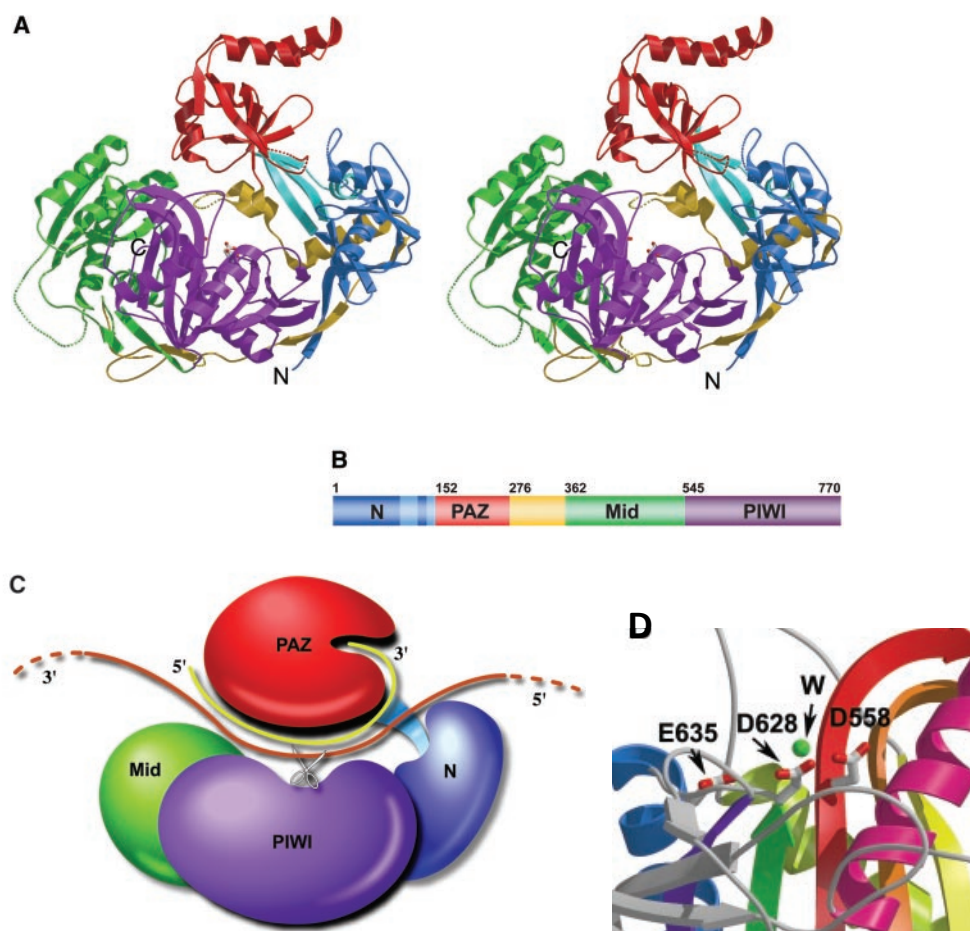


Figure 4 : Structure Crystal d'Argonaute *P. furiosus*. (A) Vue en stéréo du ruban représenté d'Argonaute démontrant le domaine N-terminal (bleu), la "tige" (bleu claire), le domaine PAZ (rouge), le domaine milieu (vert), le domaine PIWI (violet), et le connecteur inter-domaine (jaune). Les résidus des sites actifs sont dessinés dans la représentation bâton. Les boucles désordonnées sont dessinées en pointillées. (B) Schéma de la frontière des domaines. (C) Représentation schématique du modèle du clivage d'ARNm guidé par le siARN. Les domaines sont colorés comme dans A. Le siRNA (jaune) se lie avec son extrémité 3' dans la PAZ-lièvre et le 5' est prévu pour se lier à l'autre bout de la fente. L'ARNm (marron) entre dans la partie N-terminale et les domaines PAZ, puis sort à partir du domaine PAZ et le domaine du milieu. Le site actif dans le domaine PIWI (représenté par des ciseaux) clive l'ARNm à l'opposé au milieu du siARN guide.

La démonstration directe de l'activité trancheuse de Ago 2 a été apportée par la reconstitution *in vitro* avec une protéine Ago 2 purifiée et un petit ARN (Rivas et al, 2005). Cette activité endonucléase ne demande pas de caractéristique particulière du substrat au delà de la complémentarité avec le petit ARN guide. Dans les cellules, il est d'ailleurs possible d'utiliser l'interférence pour cibler des transcrits non codant ou sans queue poly(A), et la traduction n'est pas un déterminant majeur de l'efficacité du silencing (Sen et al, 2005).

Introduction

1.2.2.3 Les autres protéines du complexe RISC

En plus d'une protéine Argonaute, d'autres protéines sont trouvées dans le complexe RISC. En particulier, le groupe de T. Tuschl (Meister et al, 2005) puis celui de G. Meister (Hock et al, 2007) ont purifié des complexes RISC et analysé leur contenu en protéine par spectrométrie de masse. Les complexes sont isolés par immunoprécipitation de Ago (le plus souvent Ago2 ou Ago1) à partir de cellules HeLa ou HEK293. Dans la deuxième étude, les complexes ont aussi été analysés par centrifugation sur un gradient de sucrose, ceci a permis de définir trois classes : I (250 - 350 kDa), II (600 - 700 kDa) et III (> 900 kDa). *In vitro*, le complexe I a une activité de l'hydrolyse sur une cible parfaite et représente donc une forme « ex vivo » du complexe RISC minimal. Cependant il n'est pas actuellement possible de conclure sur l'organisation du complexe RISC *in vivo*. En particulier, certaines protéines comme RBM4 qui ne sont présentes que dans le complexe III semblent jouer un rôle dans le silencing d'une cible parfaite dans les cellules (Hock et al, 2007).

Les protéines identifiées dans le complexe RISC :

- Dicer

Si une interaction avec Ago était prévisible dans le cadre du transfert des petits ARN interférant vers RISC, celle-ci semble durer au-delà de cette période de formation des complexes.

- TRBP

TRBP est une protéine qui se fixe aux ARN double brin et interagit avec Dicer. Le rôle de TRBP dans l'activité de Dicer n'est pas clairement établi (Haase et al, 2005) (Chendrimada et al, 2005) et il est proposé que TRBP pourrait jouer un rôle dans le chargement du complexe RISC (le transfert des petits ARN produits par Dicer vers Ago).

- GW182 / TNRC6

Parmi les protéines fréquemment identifiées figurent les différents membres de la famille GW182 (TNRC6A, B, C chez les mammifères). Ces protéines interagissent avec les protéines Argonaute et jouent probablement un rôle central dans la régulation par les micro ARN. Les protéines TNRC6 font l'objet d'une présentation détaillée

Introduction

dans la 2^{ème} partie.

- Gemin3 et 4

Les protéines Gemin3 et Gemin4 ont aussi été détectées dans ces études. Gemin3 est une ARN hélicase de la famille DEAD qui interagit fortement avec la Gemin4. Ces protéines interagissent avec SMN (survival of motor neuron) qui est impliquée dans l'assemblage cytoplasmique des « snURNP », les complexes ribonucléoprotéiques qui interviennent dans l'épissage. Il est probable que ces protéines ont d'autres fonctions et leur localisation est à la fois cytoplasmique et nucléaire.

- Hsp90

Cette chaperonne a été détectée dans plusieurs études. Il a été observé très tôt que l'interaction entre Dicer et Ago2 dans des cellules humaines nécessitait Hsp90 (Tahbaz et al, 2001; Tahbaz et al, 2004), l'utilisation d'un inhibiteur de Hsp90 « la geldanamycine » conduisant à une diminution de l'accumulation d'Ago2. De plus, la geldanamycine diminue le silencing par les petits ARN dans les cellules de mammifère (Pare et al, 2009). En parallèle, il y a une disparition des P-bodies (définis par un anticorps GW182), (voir dans le §I-2.4.3). Cette dépendance vis à vis de Hsp90 reflète son intervention dans une étape précoce du chargement de RISC. Au moins chez la drosophile (Miyoshi et al, 2010), l'inhibition de Hsp90 par la geldanamycine bloque le transfert des petits ARNdb vers Ago2. Ceci suggère que le changement de conformation nécessaire à la mise en place des petits ARNdb dans Ago2 est réalisé par Hsp90 avec consommation d'ATP. Dans ce système, contrairement à ce qui a été décrit chez les cellules de mammifère, le blocage de Hsp90 n'a pas de conséquence sur la stabilité de Ago2 (Johnston et al, 2010).

- CAF1, CCR4, PABP

Du fait de la déadénylation qui est fréquemment observée dans les régulations par les micro ARN, un effort particulier a été fait pour détecter des déadénylases dans les complexes RISC. Une première étude chez la drosophile avait impliqué les déadénylases CCR4/NOT1 (Behm-Ansmant et al, 2006) mais sans détecter d'interaction avec Ago. « Le complexe CCR4-NOT (1 mDa en taille), composé des protéines CCR4, CAF1, et NOT1 à NOT5, régule l'expression du gène tant

Introduction

positivement que négativement et il est distinct des autres grands complexes transcriptionnels chez *Saccharomyces cerevisiae* tels que SNF/SWI, TFIID, SAGA, et l'ARN polymérase II holoenzyme. La protéine CAF1 s'est avérée absolument nécessaire pour l'association de CCR4 avec les protéines NOT, et CCR4 et CAF1, à son tour, physiquement interagit avec NOT1 à travers sa région d'acides aminés à partir des sites centraux de 667 à 1152 (Wagner et al, 2007)» Par contre, dans l'étude de Fabian (Fabian et al, 2009), CAF1 a été détectée dans les complexes RISC par spectrométrie de masse et par co-immunoprécipitation dans les cellules HeLa. Mais dans une étude similaire par co-immunoprécipitation avec Ago2, Piao et col. (Piao et al, 2010) ont détecté des niveaux extrêmement faibles de CAF1. L'ensemble de ces données suggère que l'interaction entre le cœur du complexe RISC et CAF1 est soit transitoire soit de faible affinité. Le rôle de la déadénylation est discuté dans la 3^{ème} partie.

Au total, plus d'une cinquantaine de protéines a été détectée dans les complexes obtenus par immunoprécipitation (Hock et al, 2007). Si beaucoup d'interactions ont été confirmées par d'autres approches, la définition d'un complexe RISC fonctionnel et de son assemblage reste très incomplète. De plus, ces études sont faites en partant de l'idée qu'il n'existe qu'un seul type de complexe RISC ce qui, à ce stade, n'a été ni infirmé ni confirmé. Il est cependant vrai que peu de différences ont été observées entre les complexes purifiés à partir de Ago2 ou des autres protéines Argonaute de mammifère (Liu et al, 2004). La détection de la PABP-poly(A) binding protéine parmi les protéines du complexe RISC illustre bien la difficulté à définir ce qui fait intrinsèquement partie du complexe et ce qui résulte d'un assemblage supramoléculaire (le complexe RISC étant fixé sur l'ARN messenger interagit avec les protéines qui sont par ailleurs présentes sur celui-ci).

Introduction

Bilan :

La caractérisation du complexe RISC a permis de fournir un cadre simple pour expliquer les grandes lignes du mécanisme de l'interférence par l'ARN. Dicer produit des petits ARN interférant qui peuvent être incorporés dans les protéines Argonaute. Après élimination de l'un des deux brins (le brin passager), le brin restant (l'ARN guide) est en partie présenté sous une forme accessible aux molécules extérieures et peut ainsi initier l'interaction avec un ARN messenger par complémentarité entre les séquences. Dans le cas où cette complémentarité est pratiquement complète, le domaine Piwi de la protéine Argonaute peut hydrolyser l'ARN messenger grâce à une activité endonucléase apparentée à celle de la RNaseH. Le complexe Ago/ARN peut alors être recyclé et possède donc une activité catalytique.

2^{ème} partie : Les micro ARN, origine et mode d'action

2.1 Introduction : L'origine des petits ARN et les micro ARN

La description du mécanisme de l'hydrolyse des ARNm cibles par le complexe RISC illustre le rôle clé joué par les petits ARN guides. Dans le cas de l'interférence par l'ARN telle qu'elle a été décrite initialement par Fire et Mello, l'origine de ces ARN est clairement identifiée : lorsque l'on introduit dans les cellules un ARN double brin de grande taille (typiquement de quelques centaines de nucléotides), l'enzyme Dicer produit des petits ARN double brin qui sont transférés au complexe RISC. Dans cette approche, la nature double brin de l'ARN joue un rôle essentiel. Ainsi on peut envisager une séparation complète entre le monde des ARN simple brin (comme les ARN messagers et leurs produits de dégradation) et celui des petits ARN régulateurs (comme les petits ARN interférant). Une des questions qui se pose est donc celle de l'origine des petits ARN régulateurs en dehors du cas artificiel de l'injection d'ARN double brin. A priori, il existe deux sources possibles d'ARN double brin dans les cellules : les virus à ARN et les séquences répétitives dont la transcription sur l'un ou l'autre brin peut conduire à la formation d'ARN double brin. Cependant, chez les mammifères ce sont des molécules simple brin (surtout des transcrits Pol II mais pas exclusivement) qui constituent la principale source de petits ARN double brin. Cette observation n'est pas très surprenante compte tenu du fait que les ARN messagers sont très fortement structurés et donc contiennent fréquemment des tiges boucles avec des régions double brin plus ou moins parfaites. La question est donc plutôt de savoir dans quelles conditions une tige boucle sur un ARN peut être prise en charge par la machinerie de l'interférence.

2.1.1 Description initiale des micro ARN

Chez *C. elegans*, les cribles génétiques pour l'identification de gènes impliqués dans le contrôle du développement ont permis l'identification de *lin-4* et de *let-7*. Les analyses génétiques ont permis de montrer que *lin-4* était un régulateur négatif de l'expression de plusieurs gènes cibles dont *lin-14* (Wightman et al, 1991). Le clonage de *lin-4* a montré que le seul produit détectable dans les cellules était deux petits ARN

Introduction

de 61 et 22 nt, le plus petit étant probablement issu du plus long par un processus de maturation (Lee et al, 1993). De plus, il a été observé la présence dans la région 3' non traduite de *lin-14* de 7 séquences partiellement complémentaires de celle du petit ARN *lin-4* (Lee et al, 1993; Wightman et al, 1993) et une diminution de la protéine *lin-14* sans dégradation apparente de l'ARN messenger. Ceci a conduit à un modèle de la régulation de l'expression par *lin-4* dans lequel l'interaction du petit ARN avec des sites partiellement complémentaires dans la région 3' non traduite d'un ARN messenger conduisait à un blocage de la traduction.

Jusqu'en 2000, il était pensé que ce mode de régulation n'existait que chez les nématodes ; mais le clonage de *let-7* a rapidement ouvert le débat avec l'observation que le gène et son produit (un petit ARN de 21 nt) existait chez de nombreuses espèces y compris les mammifères (Pasquinelli et al, 2000). A partir de cette première observation, de nombreux autres petits ARN ont été identifiés chez presque tous les eucaryotes. A la différence des petits ARN interférant, ces molécules sont issues d'un précurseur qui est un ARN simple brin mais qui peut prendre une conformation en tige boucle avec une région appariée d'une trentaine de nucléotides. Ces petits ARN ont été baptisés micro ARN et les premières données ont confirmé qu'ils agissaient au niveau post-transcriptionnel sur des cibles partiellement complémentaires conformément au modèle de *lin-4 / lin-14*. L'estimation actuelle est que le génome humain contient environ un millier de gènes de micro ARN et que ceux-ci régulent de l'ordre de 60 % des ARN messagers. Ainsi, les régulations par les micro ARN sont susceptibles de jouer un rôle essentiel dans la biologie des mammifères. Il existe des exemples de régulation par des micro ARN pour pratiquement toutes les fonctions cellulaires (Lim et al, 2005)(Bartel, 2009; Brennecke et al, 2003) (Yi & Fuchs, 2011) et les profils d'expression peuvent être soit spécifiques d'un type cellulaire et d'un état physiologique soit au contraire très généraux. Enfin, une dérégulation de l'expression des micro ARN a été impliquée dans de nombreux états pathologiques (Sayed & Abdellatif, 2011) ce qui rend attrayante l'idée d'utiliser des micro ARN (ou des inhibiteurs de micro ARN) à des fins thérapeutiques.

2.2 Les gènes de micro ARN et leur expression

Les exemples historiques de *lin-4* et *let-7* ont montré que les micro ARN pouvaient être le produit de gènes spécifiques non codants. Dans la plupart des cas, le transcrite primaire dont est issu le micro ARN (pri-miARN) est un produit de transcription de la polymérase II et est coiffé et polyadénylé (Saini et al, 2007). Il existe cependant des cas de gènes de micro ARN transcrits par la polymérase III « Pol III transcrit l'ADN pour synthétiser le rARN 5S ribosomal, tARN et les autres petits ARN » à partir des séquences Alu. Une séquence Alu est un court fragment d'ADN de type SINE (short interspersed element) caractérisé par la présence d'un site de restriction de l'endonucléase de restriction Alu I présente dans le génome humain (Borchert et al, 2006). De manière inattendue, les micro ARN « intergéniques » (ceux qui sont issus de gènes non codants et ne correspondant pas aux gènes précédemment identifiés) sont souvent organisés en groupes, un pri-miARN pouvant générer jusqu'à 6 micro ARN différents. Il a été estimé qu'environ 40 % des micro ARN sont ainsi organisés en groupe (Altuvia et al, 2005). C'est par exemple le cas du groupe 17-92 dont la surexpression peut participer à la progression tumorale (He et al, 2005). Mais dans ce cas, tous les micro ARN produits n'ont pas la même importance pour le phénotype (Olive et al, 2009), et le rôle de l'organisation en groupe de micro ARN n'a pas été clairement identifié (on s'attendrait à ce que les différents micro ARN d'un groupe régulent des gènes impliqués dans une même fonction, mais même si l'on peut trouver des parentés fonctionnelles dans les cibles ceci ne concerne qu'une partie des cibles). En plus des unités de transcription spécifiques de micro ARN, les ARN messagers des gènes « classiques » peuvent aussi servir de précurseurs de micro ARN. Dans ce cas, la région qui va donner naissance au micro ARN est le plus souvent dans un intron mais peut aussi être dans la région 3' non traduite. L'estimation est qu'environ 50 % des micro ARN sont issus de ces ARN messagers classiques (Saini 2007) (par abus de langage, ces micro ARN sont souvent baptisés « introniques » même s'ils sont situés dans le dernier exon). Le profil d'expression des micro ARN introniques est souvent proche de celui du gène hôte ce qui suggère que c'est bien le transcrite primaire de l'ARNm qui sert de pri-miARN ; cependant il existe aussi fréquemment des

Introduction

promoteurs potentiels à l'intérieur de l'intron qui pourrait générer un pri-miARN indépendamment de l'ARN messager (Monteys et al, 2010).

Une des caractéristiques qui permet d'identifier les gènes de micro ARN est le fait que la séquence du micro ARN mature fait initialement partie d'une structure en tige boucle réminiscente des ARNdb qui donnent naissance aux siARN. Mais dans le cas des micro ARN, la tige n'est que d'une trentaine de nucléotides et comprend presque toujours des nucléotides non appariés. La première étape de la maturation des micro ARN est l'excision de cette tige boucle (d'environ 70 nt) par Drosha, l'autre membre de la famille des RNase III avec Dicer chez les mammifères. Comme Dicer, Drosha utilise des ARN double brin (ou fortement appariés) comme substrat et génère une extrémité 3'-OH protubérante de 2 nucléotides. Mais à la différence de Dicer, Drosha ne peut se positionner correctement sur son substrat sans l'aide d'une protéine accessoire : DGCR8 (Syndrome de DiGeorge Critical Region 8) ou Pasha chez les invertébrés. L'association des deux protéines forme le complexe microprocesseur et les deux sont nécessaires pour la production de micro ARN (Denli et al, 2004; Gregory et al, 2004). Le site de l'hydrolyse est situé à environ 11 nucléotides de la base de la tige soit presque à un tour de double hélice. Le microprocesseur est situé dans le noyau et le pre-miARN ainsi produit est exporté dans le cytoplasme par une voie de transport spécifique qui utilise l'exportine 5 (Lund et al, 2004; Yi et al, 2003) « l'exportine 5 est une protéine de la famille de l'importine β qui assure l'export du noyau vers le cytoplasme et utilise RanGTP comme source d'énergie ». L'exportine 5 reconnaît sur le pre-miARN les deux nucléotides libres en 3' générés par Drosha (Okada et al, 2009) et la surexpression de pre-miARN dans le noyau peut provoquer une saturation de l'exportation des micro ARN endogènes qui peut être létale chez la souris (Grimm et al, 2006). (Voir Figure 1, page 10).

Dans le cytoplasme, la deuxième étape de la maturation est assurée par Dicer, comme si le pre-miARN était un ARNdb. Aussi le clivage fait par Dicer a lieu à une vingtaine de nucléotides de celui fait par Drosha et génère un petit ARN presque parfaitement double brin, le micro ARN « duplex » avec les mêmes extrémités protubérantes qu'un siARN. En fonction de la stabilité relative des extrémités, l'un ou l'autre des brins (et

Introduction

dans certains cas les deux) constituent le micro ARN mature.

Chez la drosophile, il existe deux protéines Dicer qui interviennent préférentiellement dans le clivage des ARNdb parfaits (Dicer2) ou des pre-micro ARN (Dicer1). Cette spécialisation se poursuit au niveau des protéines Argonaute, Dicer1 transférant préférentiellement les petits ARN produits à Ago1 et Dicer2 à Ago2. Chez les mammifères où il n'existe qu'une seule Dicer, il n'y pas d'indication que les micro ARN soient intégrés préférentiellement à certaines protéines Argonaute. Toutefois dans le modèle proposé, seule Ago2 peut éliminer le brin passager en l'hydrolysant, les autres Ago dépendant d'une déstabilisation du duplex par les mésappariements pour « perdre » le brin passager. Ainsi on s'attend à ce que les complexes RISC actifs formés avec Ago1, 3, 4 soit enrichis en micro ARN avec plusieurs mésappariements.

Dans le cas des plantes, la maturation des micro ARN est légèrement différente puisqu'une seule enzyme de la famille des RNase III est impliquée « DL1 : Dicer Like 1 » dans les deux clivages. Comme DL1 est nucléaire, c'est donc un micro ARN mature mais en duplex qui est exporté dans le cytoplasme par un homologue de l'exportine 5 après que les extrémités 3' aient été méthylées par HEN1 (Hua-Enhancer1) (Kim, 2005).

2.3 L'interaction entre micro ARN et les gènes cibles

Notre compréhension des interactions entre les micro ARN et leurs ARN cibles a été fortement influencée par la description initiale de la régulation de *lin-14* par *lin-4* (Figure 5) (Banerjee & Slack, 2002). En effet, dès cette description initiale, on pouvait remarquer plusieurs caractéristiques de l'interaction entre *lin-4* et *lin-14* :

- i) Tous les sites forment des hybrides incomplets entre l'ARN messenger et le micro ARN
- ii) Tous les sites sont dans la région 3' non traduite
- iii) Sept sites sont présents, ce qui suggère que la régulation ne peut être obtenue qu'à travers la présence de plusieurs complexes RISC et probablement une interaction coopérative.

Introduction

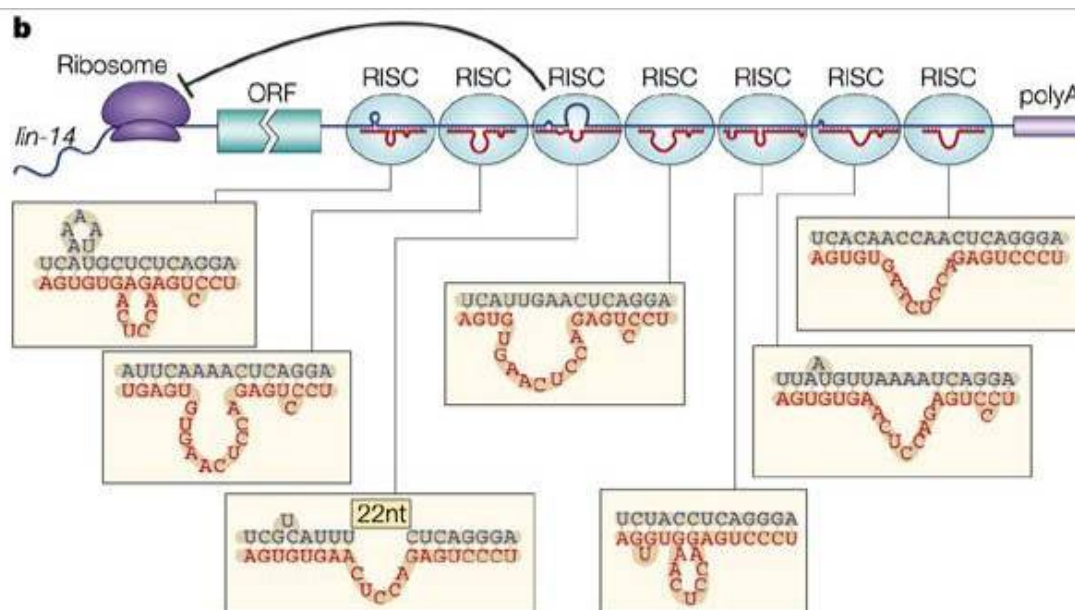


Figure 5 : Représentation des sites de fixation de *lin-4* dans la région 3' non traduite de *lin-14* (Banerjee & Slack, 2002). Il existe 7 sites de fixation de *lin-4* qui est de type micro ARN, l'interaction avec *lin-4* mis en place de même nombre de complexe RISC dans la région 3'-UTR de *lin-14*, qui effectue un silencing.

En fait les études suivantes ont montré que bien que cet exemple soit représentatif d'une grande partie des interactions entre les micro ARN et leurs cibles, il fallait se garder de leur donner une signification trop forte.

Ainsi, en ce qui concerne un appariement incomplet, c'est effectivement le cas dans une très grande majorité des interactions mais il existe chez les mammifères quelques exemples de complémentarité parfaite. C'est en particulier le cas pour miR-196a et sa cible HoxB8 « qui ne diffère que par une paire G : U » et pour laquelle il a été montré qu'il y avait effectivement une hydrolyse (Yekta et al, 2004). De manière intéressante, le gène de miR-196 est lui-même situé à l'intérieur du complexe homéotique HoxB « entre HoxB9 et HoxB10 », dans lequel est située sa cible (Yekta et al, 2008). Ainsi dans le cadre de ce groupe de gènes essentiels pour l'établissement de l'axe antéro-postérieur au cours du développement, et dont l'expression est fortement contrôlée au niveau transcriptionnel suivant un schéma séquentiel, miR-196 intervient dans une boucle de régulation post-transcriptionnelle en complétant l'inhibition de l'expression d'un gène plus « antérieur ». Ce type d'organisation est conservée chez

Introduction

les vertébrés et l'appariement presque parfait aussi chez le poisson et la grenouille, bien que les séquences voisines UTR sont divergentes (Yekta et al, 2004). Qui plus est, une organisation similaire est aussi présente dans les autres groupes de gènes homéotiques (Yekta et al, 2008), mais dans ces cas, l'appariement est du type « classique » micro ARN. Au-delà du côté anecdotique cette observation d'une hydrolyse induite par un micro ARN confirme qu'il n'existe pas de spécialisation forte chez les mammifères qui conduirait à la présence des micro ARN dans Ago1, 3, 4 et à celle des siARN dans Ago2.

On peut aussi remarquer que chez les plantes (Jones-Rhoades et al, 2006), même si les micro ARN ont généralement des cibles parfaites - et devraient donc agir par coupure - il y a quand même une action au niveau de la traduction, ce qui suggère que les deux activités ne peuvent être complètement dissociées (Brodersen et al, 2008).

De même, s'il est toujours possible que la majorité des sites fonctionnels de micro ARN soient effectivement dans la région 3' non traduite, ceci n'est pas une règle absolue. D'une part, il existe des sites dans la région 5' non traduite par exemple (Orom et al, 2008) et d'autre part, des exemples de régulation par des sites situés dans la région traduite ont aussi été décrits dans le cadre du contrôle de l'état comme dans les cellules souches (Tay et al, 2008). Chez les plantes, il n'y a pas vraiment de restriction sur l'emplacement des sites (He & Hannon, 2004), ce qui reflète probablement la différence dans le mode d'action des micro ARN, l'hydrolyse de cibles parfaites et / ou régulation de la traduction et de la stabilité. Ainsi, il convient d'être prudent avant de trop généraliser les règles principalement issues d'études chez *C. elegans* (Brodersen & Voinnet, 2009). D'ailleurs, dans une étude récente, il est proposé qu'environ un tiers de sites de micro ARN soit en fait dans la région codante (Leung et al, 2011).

Toujours en lien avec ces observations initiales, il est clair que certains des ARN messagers cibles ont plusieurs sites de fixation pour des micro ARN et plus spécifiquement pour le même micro ARN. C'est par exemple le cas pour *let-7* et ses cibles Ras (Johnson et al, 2005) et HMGA-2 avec sept sites dont les contributions ont été analysées par mutagenèse (Mayr et al, 2007). Cependant, il existe aussi de

Introduction

nombreux exemples de gènes qui sont effectivement régulés par un micro ARN alors qu'ils ne contiennent qu'un site unique pour celui-ci. De plus, la nature coopérative de la fixation de plusieurs micro ARN sur un même transcrit n'a pas été clairement analysée (Doench & Sharp, 2004) et une étude récente indique que cette coopérativité pourrait être spécifique de Ago1, 3, 4 et ne pas concerner Ago2 (Broderick et al, 2011). Ils ont démontré que pour Ago1, Ago3 et Ago4, de multiples sites adjacents de fixation des petits ARN peuvent faciliter les interactions coopératives qui stabilisent l'interaction d'Argonaute. En revanche, les petits ARN liés à Ago2 et l'appariement parfait à une cible d'ARNm agissaient indépendamment pour l'inhibition de l'expression. Le silencing non coopératif par les Ago2 ne nécessite pas l'activité de la protéine endoribonucléase. Un Ago2 mutant qui ne peut pas cliver la cible d'ARNm inhibe non coopérativement également. Ils proposent qu'Ago2 passe par un mécanisme fondamentalement distinct de celui utilisé par les trois autres protéines Argonaute mammifères (Broderick et al, 2011).

2.4 Le mécanisme du silencing par les micro ARN

2.4.1 Introduction

Le mécanisme du silencing par les micro ARN a fait l'objet de nombreuses controverses. Ceci est dû en partie au fait que les premières observations faites chez *C. elegans* indiquaient un mécanisme original dans lequel les ARN messagers soumis à une régulation par les micro ARN restaient associés à des polysomes et n'étaient pas dégradés (Wightman et al, 1993). Ceci suggérait une régulation de la traduction au niveau de l'élongation ou une dégradation co-traductionnelle de la protéine (Olsen & Ambros, 1999). Mais rapidement d'autres études, y compris chez *C. elegans*, sont parvenues à d'autres conclusions (dégradation des ARN chez *C. elegans* (Bagga et al, 2005), ou régulation de l'initiation de la traduction). Dans les cellules de mammifères il a été observé que *let-7* induisait une déadénylation et déstabilisait les ARNm cibles (Wu et al, 2006). Toutefois l'activité des micro ARN ne peut être réduite à cette déstabilisation des messagers puisque l'on peut observer une inhibition de la

Introduction

traduction, sans changement de l'abondance de l'ARNm cible, sur un ARNm qui n'a pas de queue poly(A) dont l'extrémité 3' est générée par la voie de maturation des ARNm des histones (Wu et al, 2006). L'interprétation de ces données expérimentales est compliquée par le manque d'approche technique performante pour mesurer le taux de traduction d'un ARN messenger. L'empreinte ribosomique permettra probablement d'avoir des données plus précises sur ce niveau de régulation en permettant de mesurer avec la même approche les ARNm et leur occupation par les ribosomes. Dans une première étude, le groupe de Bartel a conclu que les micro ARN n'induisaient pas de diminution de l'efficacité de traduction dans des cellules HeLa et que le silencing était entièrement explicable par l'accélération de la dégradation des ARN messagers (Guo et al, 2010). Comme les études faites dans des lysats cellulaires montrent que la diminution de l'expression précède la dégradation des ARN messagers (Fabian et al, 2009), une synthèse possible des différentes observations intègre deux idées : i) d'une part il existe probablement plusieurs modes d'action des micro ARN, la réponse observée dépendant des autres protéines présentes sur le messenger, ii) d'autre part, la cinétique des événements est telle que si l'on étudie un système « à l'équilibre », dans lequel les niveaux d'expression du gène cible et du micro ARN ne changent pas pendant plusieurs heures, alors la régulation par les micro ARN est surtout détectable au niveau de l'accumulation des messagers. Ce deuxième point est lié à l'hypothèse que lorsque les messagers sont soumis à une inhibition de la traduction, ceci est rapidement suivi par leur déadénylation et leur dégradation. En conséquence, dans un système « à l'équilibre », les ARNm observés sont ceux qui échappent à la régulation et il est donc très difficile d'étudier le mécanisme de la régulation. Il n'y aurait donc que dans des situations dynamiques où l'on observe la mise en place de la régulation que l'on pourrait détecter les ARNm bloqués dans leur traduction ou dans des contextes où l'activité de dégradation est ralentie.

Bilan de l'introduction sur le mécanisme

Introduction

En fonction des modèles expérimentaux, la régulation par les micro ARN semble utiliser des mécanismes différents. Si les données initiales sur un blocage de l'élongation / dégradation du peptide en cours de traduction n'ont pas été retrouvées de manière générale, il est cependant possible qu'un tel mécanisme soit effectivement mis en œuvre dans certaines situations (en particulier in vivo). La majorité des données peut être classée dans la catégorie inhibition de l'initiation de la traduction associée à une déstabilisation des ARN via une déadénylation. L'importance relative de l'inhibition de la traduction et de la dégradation dépend, pour une part, des conditions cinétiques de l'observation mais pourrait aussi être spécifique de l'ARNm cible comme cela a été observé chez la drosophile pour le cas de mir-9b et mir-1 (Eulalio et al, 2007b). Globalement, il ne semble pas qu'il y ait un mécanisme unique du silencing par les micro ARN et il est plausible que les autres protéines présentes sur l'ARNm jouent un rôle déterminant dans le mode d'action des micro ARN même si cela n'a pas encore été démontré.

2.4.2 La nature du silencing

2.4.2.1 Les données globales sur la régulation de l'expression

Au-delà des observations initiales chez *C. elegans*, plusieurs milliers d'études chez *C. elegans*, la drosophile et les vertébrés ont montré que la présence de site de fixation sur des ARNm cibles pour des micro ARN pouvait conduire à une diminution de l'expression protéique. Fréquemment, cette diminution de la quantité de protéine est associée à une diminution de la quantité d'ARN messenger. Toutefois, à la différence de ce qui est observé pour le mode siARN, il n'y a pas d'indication de l'hydrolyse endonucléolytique de l'ARN messenger mais plutôt d'une accélération de sa dégradation par la voie « normale » de dégradation. Ainsi, on peut observer une déadénylation des ARNm régulés par les micro ARN (Wu et al, 2006). Comme un simple blocage de la traduction n'est pas suffisant pour induire une déadénylation, ceci reflète le mécanisme spécifique de l'inhibition de la traduction par les miARN ou l'existence de deux mécanismes distincts, l'un agissant sur la traduction, l'autre sur la

Introduction

demi-vie des ARNm (Wu et al, 2006).

Chez les mammifères, la déadénylation des transcrits se fait normalement par l'intervention séquentielle de deux groupes de déadénylases PARN2/PARN3 et CCR4/NOT. PARN2, la sous-unité catalytique du complexe PARN2/PARN3 a une activité distributive et est probablement responsable de la limitation de la longueur des queues poly(A) dans le cytoplasme au cours du « vieillissement » des ARN messagers, leur déadénylation progressive au cours du temps, tandis que CCR4/NOT assure la déadénylation presque complète des messagers par une action processive. C'est chez la drosophile que l'implication de CCR4/NOT dans la régulation par les micro ARN a été initialement observée (Behm-Ansmant et al, 2006), mais des observations similaires ont été faites chez les mammifères (Chen et al, 2009). L'absence de PARN2/PARN3 n'a qu'un faible impact sur la cinétique de déadénylation, ce qui est en accord avec un rôle déterminant de CCR4/NOT dans la dégradation « active » des ARNm. Après la déadénylation, le messenger ciblé par les micro ARN est décoiffé par le complexe DCP1/DCP2 (Chen et al, 2009), ce qui génère un substrat non protégé contre les exonucléases XRN1 et l'exosome qui sera donc rapidement éliminé dans les cellules. Ce schéma correspond à ce qui est généralement proposé pour la voie de dégradation « normale » des ARN messagers cellulaires ; ainsi les micro ARN pourraient recruter sur leurs ARNm cibles la machinerie de dégradation « classique » et les déstabiliser sans qu'il y ait de coupure endonucléolytique.

Une dégradation des ARNm régulés par les micro ARN a été observée dans les études à grande échelle chez les cellules de mammifère (Baek et al, 2008; Selbach et al, 2008) ou de drosophile (Behm-Ansmant et al, 2006). La précision des résultats ne permet pas de définir la contribution d'une régulation « pure » de la traduction -une inhibition de la traduction qui n'entraînerait pas de déstabilisation du transcrit. Sur la base des résultats observés dans les cellules de drosophile, le groupe de E. Izaurralde a cependant proposé qu'en fonction du messenger ciblé par un micro ARN, sa régulation ait lieu principalement au niveau de la traduction ou de la déstabilisation des ARN (Behm-Ansmant et al, 2006; Eulalio et al, 2008). Comme discuté par (Behm-Ansmant

Introduction

et al, 2006), la mesure du taux de traduction d'un ARNm est actuellement peu précise et repose principalement sur des mesures comparatives (quantité de protéine / quantité d'ARN messager) ou indirectement par le taux de traduction (comportement des ARNm dans des gradients de sédimentation). Ces approches sont très imprécises et, à moins d'une régulation très forte de l'efficacité de la traduction, peuvent conduire à des conclusions erronées. Avec ce qui est probablement la meilleure mesure de l'efficacité de traduction par une analyse de l'empreinte ribosomique le groupe de Bartel (Guo et al, 2010) a conclu que la plupart des gènes régulés sont au niveau de l'accumulation des ARNm. Ceci ne veut pas dire qu'il n'existe pas de régulation de la traduction mais que celle-ci est en général associée à une déstabilisation de l'ARN cible au moins dans un système « à l'équilibre ». Par contre, à la différence de ce qui a été décrit chez la drosophile, ceci suggère qu'il n'existe pas (ou peu) de transcrits qui soient purement régulés au niveau de la traduction. Enfin, chez la drosophile, des données indiquent que le mécanisme de la déstabilisation des transcrits par les micro ARN est spécifique de la cible considérée et nécessite, par exemple, différents co-activateurs du décoiffage (Eulalio et al, 2007b).

En conclusion, la régulation par les micro ARN est le plus souvent, au moins toujours dans les cellules de mammifère en culture, associée à une déstabilisation des ARNm ciblés qui est due à une déadénylation. Le recrutement du complexe CCR4/NOT par le complexe RISC n'est pas actuellement compris puisque, selon les études, on détecte (Fabian et al, 2009) ou ne détecte pas (Behm-Ansmant et al, 2006) ou qu'extrêmement faiblement (Piao et al, 2010) les composants de CCR4/NOT au sein du complexe RISC. Une étude plus précise de cette étape permettait de répondre à la question du couplage (ou de son absence) entre le silencing traductionnel et la déadénylation. Par contre, il a été montré en utilisant une extrémité 3' de l'ARN messager d'histone qu'une régulation de la traduction pouvait avoir lieu en l'absence de queue poly(A) et de dégradation du transcrit (Sanchez & Marzluff, 2004). A minima, ceci indique qu'il existe bien une régulation de la traduction même si dans la pratique elle est souvent difficile à mettre en évidence. Réciproquement, chez la drosophile, on peut observer une déstabilisation de certains ARNm ciblés par les

Introduction

micro ARN même en l'absence de traduction (Eulalio et al, 2007b) ce qui indique un découplage partiel entre les deux niveaux de régulation.

2.4.2.2 Etudes de lysats cellulaires *in vitro*

Les données présentées dans la section précédente ne permettent pas de savoir si la déstabilisation des transcrits est indépendante d'une régulation de la traduction. Les modèles *in vitro* permettent des études cinétiques et biochimiques qui sont difficilement réalisables dans les cellules ou encore moins *in vivo* et peuvent donc apporter des éléments de réponse à cette question. Par contre, il est aussi clair que ces modèles ne reflètent qu'une partie des régulations qui opèrent naturellement ; par exemple, dans le lysat de réticulocyte, la queue poly(A) et la coiffe ne sont pas indispensables pour observer un silencing d'ARNm du genre clivage de la cible, au contraire, sans la queue poly(A), on ne peut pas observer une inhibition de traduction par micro ARN. On peut cependant observer une régulation par les micro ARN dans ce lysat et la régulation est purement traductionnelle aux temps précoces de la réaction (10 minutes) (Wang et al, 2006). Cette régulation nécessite une coiffe et une queue poly(A) et n'est observable que si l'on introduit le petit ARN guide sous une forme simple brin (dans ces conditions il n'est pas possible de charger un complexe RISC à partir d'un ARN double brin). Le rôle de la coiffe, et l'utilisation de sites internes d'entrée du ribosome suggèrent que la régulation observée a lieu au niveau de l'initiation de la traduction. Dans un autre modèle de lysat cellulaire, l'ascite de Krebs, des résultats de même nature ont été obtenus : une inhibition de la traduction précède la dégradation des ARNm (Mathonnet et al, 2007) ainsi que l'implication de CAF1 dans la déadénylation. L'ensemble de ces données est en faveur d'un modèle séquentiel dans lequel le complexe RISC induit tout d'abord une inhibition de la traduction (probablement au niveau de l'initiation) puis une déadénylation. Une autre observation faite dans ces études est le rôle important de la Poly(A) Binding Protein (PABP) qui est nécessaire pour la déadénylation (Wang et al, 2006) et interagit avec la moitié C-terminale de GW182 (voir dans la section suivante).

Bilan

Les études in vitro sont en faveur d'une régulation de la traduction comme événement primaire de l'action des micro ARN qui peut être suivi d'une déadénylation due au recrutement du complexe CCR4/NOT. Expérimentalement, dans des cellules de mammifère en culture, l'effet détectable des micro ARN est d'induire une dégradation des ARNm ciblés. Une analyse plus précise de la cinétique des événements (régulation de la traduction, régulation de la queue poly(A)) sera indispensable pour pouvoir identifier si des données sont réellement incompatibles avec une régulation de la traduction comme événement initial de la réponse aux micro ARN (Djuranovic et al, 2011).

2.4.3 Les protéines GW182

2.4.3.1 Introduction : Identification des protéines GW182

Le premier membre de cette famille à avoir été caractérisé est la protéine GW182 dans des cellules humaines. Elle a été identifiée à partir des autoanticorps d'un patient atteint d'une neuropathie sensorimotrice (Eystathioy et al, 2002). La séquence de GW182 contient deux motifs apparents : d'une part la présence de nombreuses répétitions des acides aminés glycine et tryptophane « d'où l'appellation GW182 qui prend en compte son poids moléculaire » et d'autre part un motif RRM (RNA Recognition Motif) situé dans la région C-terminale. Cette caractérisation initiale a aussi révélé que cette protéine s'accumulait dans des structures cytoplasmiques qui ont été baptisées corps GW et qui, à ce stade, apparaissaient comme de nouvelles structures cytoplasmiques (Eystathioy et al, 2002). Enfin, l'observation que GW182 est associée à des ARN messagers suggérait un rôle dans les régulations post-transcriptionnelles.

Chez les mammifères, il existe trois gènes dont les produits ont des séquences très similaires et qui avaient été baptisés TNRC6A, B et C (Figure 6) du fait de la

Introduction

présence de répétitions de trinuécléotides ; GW182 est identique à TNRC6A. Dans la suite de cette présentation, on utilisera donc GW182 pour désigner la famille ou TNRC6A lorsque, dans le contexte mammifère, on s'intéresse spécifiquement à ce membre de la famille GW182.

Chez la drosophile, il existe un homologue de GW182, Gawky (Figure 6 : DmGW182). L'inactivation de Gawky par une mutation non-sens conduit à un arrêt du développement embryonnaire. Comme chez les mammifères, Gawky s'accumule dans des corps cytoplasmiques, denses aux électrons et sans membrane externe (Schneider et al, 2006).

Des protéines apparentées existent chez *C. elegans*, Ain1 et 2 (Figure 6), mais diffèrent significativement dans leur organisation, en particulier par leur taille plus petite (~ 70 kDa) et l'absence du domaine RRM (Ding et al, 2005). Cependant, comme les protéines de la famille GW182, Ain1 et 2 ont été impliquées dans les régulations post-transcriptionnelles et en particulier l'action des micro ARN (Ding et al, 2005). Par contre, il n'existe ni chez *S. pombe*, ni chez les plantes, d'homologue identifiable de GW182 (Djupedal et al, 2005); toutefois chez ces espèces, des protéines contenant des motifs GW ont été impliquées dans le silencing (voir dans l'analyse fonctionnelle de GW182).

2.4.3.2 Les corps GW, P-bodies et l'implication de la famille GW182 dans les régulations par les micro ARN

Chez la drosophile, rapidement après la description des corps GW, il est apparu que ceux-ci étaient probablement identiques - au moins dans certains cas - à d'autres structures cytoplasmiques qui contiennent les enzymes de la machinerie de dégradation des ARN : Xrn1 (l'exonucléase 5' cytoplasmique), Dcp1 (l'enzyme de décoiffage) et LSM4 (Eystathioy et al, 2003). L'implication de ces structures dans la dégradation des ARN messagers (Cougot et al, 2004) a renforcé l'idée que les protéines GW182 jouaient un rôle dans les régulations post-transcriptionnelles. On peut remarquer que la question de la relation entre les corps GW et les autres

Introduction

structures cytoplasmiques (corps Dcp1, P-bodies) est toujours ouverte, certaines données suggérant qu'il existe des sous-ensembles distincts de ces structures (Gibbins et al, 2009). Le nombre (en général moins d'une dizaine) et la taille des P-bodies (« recouplé » maintenant avec les corps GW) varient au cours du cycle cellulaire. Ainsi il y a plus de P-bodies dans des cellules en prolifération et leur taille est maximale en phase G2, avant qu'ils ne soient dissociés en mitose (Yang et al, 2004). Les P-bodies sont des assemblages de protéines et d'acides nucléiques denses aux électrons et qui ne sont pas entourés d'une membrane lipidique (Souquere et al, 2009; Yang et al, 2004). Dans les études de récupération après photoblanchiment, on observe un renouvellement rapide de la majorité des constituants des P-bodies, ce qui suggère qu'ils résultent d'un équilibre entre une phase cytoplasmique soluble et la forme agrégée détectable en microscopie optique ou électronique (Aizer et al, 2008; Andrei et al, 2005; Kedersha et al, 2005; Leung et al, 2006). Toutefois, Dcp2, Ago2 et TNRC6A ont des temps de résidence beaucoup plus longs que les autres membres dans les P-bodies ce qui pourrait correspondre à un rôle dans l'organisation des P-bodies.

C'est la mise en évidence de la présence des protéines Argonaute dans les corps GW / P-bodies qui a suggéré un rôle direct de ces corps dans les régulations par les petits ARN. En particulier, il a été montré que toutes les protéines Argonaute de mammifère s'accumulaient dans les P-bodies tout comme les mutants de Ago2 n'ayant pas d'activité trancheuse (Liu et al, 2005; Sen & Blau, 2005), ces observations orientaient plutôt vers un rôle dans les régulations par les micro ARN. De fait, en présence du micro ARN correspondant, un ARN messager soumis à une régulation par un micro ARN s'accumule dans les P-bodies (Liu et al, 2005). Enfin, dans l'une des premières analyses des complexes RISC, il a été observé la présence de TNRC6B (Meister et al, 2005), tandis que chez *C. elegans*, les protéines Ain1 et 2 étaient impliquées dans le silencing par les micro ARN et le recrutement des protéines Argonaute dans les P-bodies (Ding et al, 2005). L'ensemble de ces données suggérait que les protéines de la famille GW182 jouaient un rôle dans la régulation par les

Introduction

micro ARN en favorisant le recrutement des ARNm cibles dans les P-bodies. Cette prédiction a été validée par l'étude de E. Izaurralde qui a montré que le silencing de GW182 produisait les mêmes modifications de l'expression que celui de Ago1, la protéine Argonaute de drosophile qui interagit avec les micro ARN (Behm-Ansmant et al, 2006).

Cependant, d'autres mécanismes ont été proposés pour le silencing par les micro ARN qui n'impliquent pas directement GW182. C'est le cas du recrutement de eIF6 par Ago (Chendrimada et al, 2007) ou de l'interaction directe entre Ago et la coiffe (Kiriakidou et al, 2007). Dans ce deuxième cas, le mécanisme était proposé pour le silencing : une compétition avec le complexe d'initiation de la traduction eIF4E pour la fixation sur la coiffe, résulterait d'une activité directement portée par Ago, comme dans le cas du clivage endonucléolytique. Toutefois, les études ultérieures, dont celles menées chez les cellules de drosophile, n'ont pas confirmé ces deux observations ou plutôt leur interprétation. Dans le cas de eIF6, les effets observés par déplétion de eIF6 sont au plus modestes si on les compare avec ceux de la déplétion de Ago ou de GW182 (Eulalio et al, 2008; Eulalio et al, 2007b). Tandis que pour le site d'interaction avec la coiffe, il a été montré que les deux acides aminés critiques sont aussi impliqués dans la fixation du petit ARN guide et l'interaction avec GW182 ce qui permet d'expliquer l'ensemble des résultats observés par l'absence de recrutement de GW182 (Eulalio et al, 2008).

2.4.3.3 Domaines fonctionnels des protéines GW182

Dans cette section ce sont les formes longues des protéines TNRC6 qui seront considérées (6A iso2 et 6B iso1) (Figure 6). Il existe aussi une forme plus longue de TNRC6A-TNGW1 (Li et al, 2008) qui comprend dans son extension N-terminale un motif riche en glutamine (Q-riche), en plus de celui déjà présent sur les autres isoformes. En première analyse, les deux isoformes de TNRC6A ont les mêmes activités biologiques. Par contre peu de choses sont connues sur les isoformes courtes de TNRC6B qui d'après les données présentées dans le paragraphe suivant pourraient être des interacteurs faibles avec Ago.

Introduction

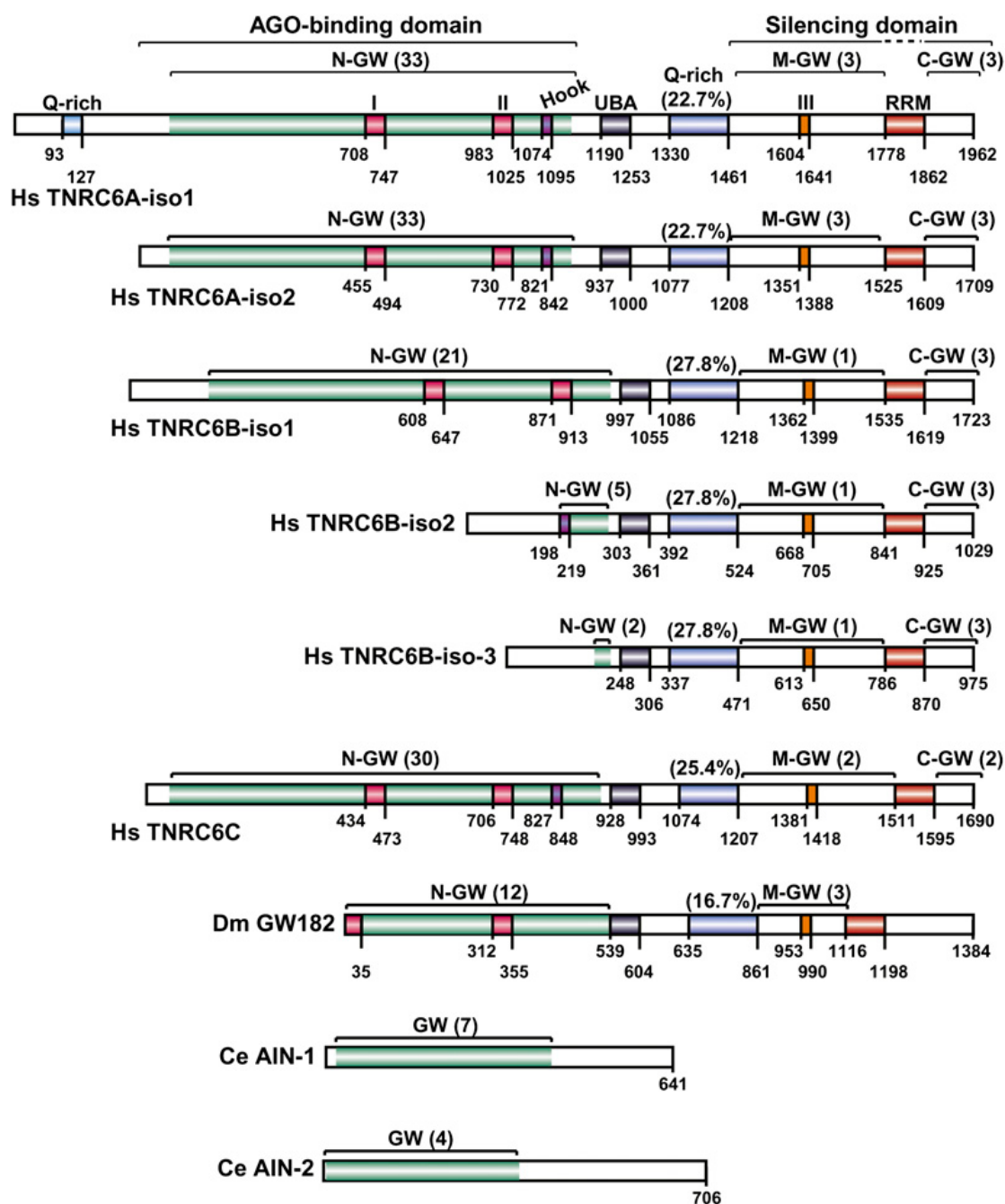


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des protéines TNRC6 (Eulalio et al, 2009b). L'organisation du domaine des protéines GW182. (Hs) *Homo sapiens*; (Dm) *Drosophila melanogaster*. (N-GW, M-GW, C-GW) N-terminale, GW-répète au milieu et au C-terminal, respectivement (le nombre de GW-répète pour chaque région est indiqué entre parenthèses). Les secteurs blancs dans les régions N-terminales ne contiennent pas de GW-répétitions. UBA (boîte grise): domaine d'ubiquitine associée similaire; Q-rich (boîte bleue): région riche en glutamine; RRM (boîte rouge): motif de reconnaissance ARN. Boîtes fuchsia I et II: deux motifs conservés au sein des répétitions GW N-terminales. Boîte violette: Ago crochet motif. Orange Box: conservée motif III (DUF). Les numéros sous le schéma de protéines représentent positions d'acides aminés aux frontières pour chaque protéine. Les domaines AGO-binding et les domaines silencing sont indiqués. *C. elegans* (Ce) AIN-1 et AIN-2 protéines sont inclus pour comparaison.

Introduction

En plus des répétitions GW et du RRM, les différentes protéines GW182 contiennent d'autres domaines identifiables, soit parce qu'ils ont déjà été décrits soit par leur conservation entre espèces (Eulalio et al, 2009b). Comme pour le domaine RRM, ces autres domaines sont présents dans les trois protéines de mammifère et chez la drosophile mais pas dans les protéines de *C. elegans* (Figure 6). Par contre, certains d'entre eux ne sont pas présents dans toutes les isoformes de TNRC6. Le groupe de E. Izaurralde a ainsi décrit :

- le domaine UBA (ubiquitin associated),
- une région riche en glutamine et asparagine (Q-rich),

Tandis que les répétitions GW peuvent se diviser en trois blocs inégaux :

- N-terminal (qui contient la grande majorité des répétitions),
- Central (1 à 3 répétitions ; M-GW),
- C-terminal (2 à 3 répétitions, absent de Gawky, C-GW).

En ce qui concerne le domaine RRM, on peut remarquer que sa structure et les acides aminés exposés à sa surface ne sont pas en faveur d'une interaction avec l'ARN ; il est donc plus probable qu'il s'agisse d'un domaine d'interaction avec des protéines (Eulalio et al, 2009a).

Enfin l'alignement des différentes protéines permet d'identifier des motifs conservés (hors protéines de *C. elegans*) d'environ 40 acides aminés (I et II au sein de la région N-terminale, III dans la région centrale) (Figure 6). Le domaine III est un motif potentiel d'interaction avec la PABP. La protéine d'insecte est plus courte que celles des vertébrés et commence avec le motif I (Figure 6).

2.4.3.4 Analyse fonctionnelle

A partir des observations de départ sur GW182, plusieurs aspects ont été analysés dans les études fonctionnelles : l'interaction avec les protéines Argonaute, le rôle dans le silencing par les micro ARN et la localisation dans les corps GW / P-bodies. Plus récemment, a été abordée l'interaction avec des protéines susceptibles d'être les effecteurs du silencing par les micro ARN.

a - Interaction avec les protéines Argonaute

Dans des expériences d'immunoprécipitation chez la drosophile, il a été observé que le domaine N-terminal de Gawky était suffisant pour une interaction avec DmAgo1 (Behm-Ansmant et al, 2006). Comme ce domaine contient la plupart des répétitions GW, ceci suggérait que ces répétitions jouaient un rôle dans l'interaction avec Ago. Ceci a été confirmé par l'étude de Till et col. dans laquelle a été identifié un motif (l'hameçon à Ago) qui contient deux répétitions WG et permet l'interaction avec Ago, la présence des tryptophanes étant nécessaire pour l'interaction (Till et al, 2007). Au sens strict, le point de départ de cette étude n'est pas l'interaction d'une protéine GW182 avec une protéine Ago mais celle de Tas3 avec Ago1 au sein du complexe RITS de *S. pombe*. Le complexe RITS (RNA induced Initiation of Transcriptional Silencing) est un analogue de complexe RISC, impliqué dans des régulations transcriptionnelles et donc de localisation nucléaire. Néanmoins, cette étude a étendu l'observation au cas des protéines TNRC6, en identifiant un hameçon à Ago très conservé dans la forme 2 de TNRC6B. Cet hameçon est aussi présent chez TNRC6A et TNRC6C mais pas dans l'isoforme longue de TNRC6B (celle que nous prendrons comme référence dans la suite de ce travail) ni dans la protéine GW182 de drosophile. Par ailleurs, s'il n'existe pas au sens strict d'homologues de GW182 chez les plantes, il existe des protéines qui contiennent des répétitions GW et qui interagissent avec certaines protéines Ago des plantes (El-Shami et al, 2007). Ainsi, le rôle des répétitions GW comme motif d'interaction avec les protéines Argonaute est retrouvé chez l'ensemble des eucaryotes.

Après ces premières observations, plusieurs études ont essayé de préciser le rôle des répétitions GW dans l'interaction avec les protéines Ago sans parvenir à une réponse simple ; en particulier une contribution déterminante de l'hameçon à Ago n'a pas été observée dans les autres études même si une interaction avec Ago a été confirmée. Même si plusieurs études ont conclu que les répétitions du domaine central et C-terminal ne jouent pas de rôle (Eulalio et al, 2009b; Lazzaretti et al, 2009; Takimoto et al, 2009; Zipprich et al, 2009), deux autres ont montré qu'elles pouvaient

Introduction

aussi interagir avec Ago (Lian et al, 2009; Yao et al, 2011). Ces conclusions divergentes reflètent probablement les différentes approches techniques (expression de domaines protéiques ou délétion de ces domaines, mesure d'une interaction par co-immunoprécipitation de protéines surexprimées, GST-pull down ...) et l'absence de données précises sur la force des interactions. Dans des expériences de GST pull-down « semi-quantitatives », Yao et collaborateurs concluent que l'hameçon à Ago a une efficacité d'interaction de l'ordre de 20 % de celle du domaine N-GW, tandis que le domaine C-ter (comprenant les motifs GW centraux, M-GW et C-ter, C-GW) a une efficacité de 23 %. L'ensemble de ces données suggère que la région N-terminale contient les sites de haute affinité pour les protéines Ago, tandis que les autres répétitions sont capables d'interactions de faible affinité (Lian et al, 2009; Yao et al, 2011).

L'importance des répétitions GW pour l'interaction avec Ago a été confirmée par des expériences de compétition, l'addition de l'hameçon à Ago sous forme de peptide permet de supprimer la régulation par les micro ARN dans un système de traduction *in vitro* (Till et al, 2007) ou la déadénylation des transcrits induite par *let-7* dans un lysat cellulaire (Fabian et al, 2009). De même, la surexpression du domaine N-ter de DmGW182 mais pas de la protéine complète supprime le silencing par les micro ARN dans des cellules de drosophile (Eulalio et al, 2008). Par ailleurs, chez les plantes, un gène du virus du navet (TCV) contient un motif GW qui bloque l'interaction de Ago1 avec les effecteurs du silencing micro ARN (Azevedo et al, 2010). Dans ce cas, la multimérisation de la protéine GW182 renforce probablement l'interaction avec Ago. Une observation similaire a été faite par un virus de la patate douce (Giner et al, 2010). Etonnement, si ces données confirment l'importance des interactions entre les motifs GW et les protéines Argonaute, dans le cas des plantes on ignore toujours la nature des protéines impliquées dans le silencing par les micro ARN. Une autre interprétation de ces résultats est d'ailleurs que la fixation de la protéine virale par ses motifs GW agit directement en bloquant stériquement l'interaction de la protéine Ago avec les ARN messagers cibles. Ce modèle est en partie suggéré par l'observation que chez la protéine Ago c'est le domaine Piwi qui

Introduction

interagit avec GW182 (Till et al, 2007) et les acides aminés qui ont été proposés pour interagir avec la coiffe des ARNm et qui en fait sont essentiels pour l'interaction avec GW182 sont situés dans la région de fixation du groupement 5' phosphate du petit ARN guide (Phe 470 et 505 sur hsAgo2) (Eulalio et al, 2008).

Bilan

Un ensemble d'études indique que les motifs GW permettent une interaction directe entre les protéines de la famille GW182 et le domaine Piwi des protéines Argonaute. Du fait de la présence de nombreuses répétitions GW (39 dans TNRC6A, 25 dans TNRC6B) il n'est pas possible d'identifier précisément quels motifs sont responsables d'une interaction in vivo, mais ce sont ceux du domaine N-ter qui jouent un rôle prépondérant.

S'il est facile de supposer que les différents motifs GW peuvent interagir avec Ago avec des affinités différentes, il est par contre plus difficile de comprendre comment s'organise l'interaction in vivo ; comment la présence de plusieurs motifs GW peut-elle aboutir à une interaction coopérative à moins qu'il n'existe sur les protéines Ago plusieurs sites d'interaction pour les motifs GW ?

b - Le domaine responsable du silencing par micro ARN

Identification d'un domaine de « silencing »

L'analyse fonctionnelle des protéines GW182 a été faite principalement par la méthode d'ancrage. Après avoir introduit dans la séquence de l'ARNm cible des motifs BoxB (un tige-boucle d'ARN, détaillé dans matériels et méthodes), l'expression d'une protéine de fusion λ N-GW182 permet de recruter celle-ci directement sur l'ARN indépendamment des protéines Argonaute et d'un petit ARN guide. L'ancrage de GW182 de drosophile (Behm-Ansmant et al, 2006), ou de mammifère (Li et al, 2008) induit un silencing - avec un composant de déstabilisation des ARNm - et celui-ci est indépendant des protéines Argonaute (Lazzaretti et al, 2009), ce qui indique que GW182 suffit à apporter la fonction de silencing au sein du complexe RISC.

Introduction

L'ancrage du domaine C-ter (C-terminal) de DmGW182 induit un silencing du transcrit ciblé (Chekulaeva & Filipowicz, 2009), ce qui suggère que si le domaine N-ter (N-terminal) permet normalement, à travers son interaction avec Ago, le recrutement de GW182 par le complexe RISC, ce serait le domaine C-ter qui assurerait la fonction de silencing. C'est le point de vue qui est présenté dans la synthèse de ces études publiée par le groupe de E. Izaurralde (Eulalio et al, 2009b). Toutefois, dans le détail, les différentes études fournissent une image beaucoup plus complexe. Ainsi, l'ancrage du domaine N-ter de DmGW182 peut aussi induire un silencing (Chekulaeva & Filipowicz, 2009) tandis que l'étude des différents domaines de TNRC6A permet d'identifier un domaine de silencing dans la région N-ter (Yao et al, 2011). Néanmoins les effets les plus importants, ou observés le plus fréquemment, sont ceux dus à la région C-ter. Ainsi le groupe de E. Izaurralde a identifié deux régions importantes pour le silencing : les motifs M-GW et C-GW (Eulalio et al, 2009b).

c - La localisation dans les P-bodies / corps GW

Dans les cellules de mammifères, de nombreuses protéines s'accumulent dans les corps GW: XRN1, DCP1, DCP2, les activateurs du décoiffage, la déadénylase CAF1 (Zeng et al, 2008) ... Comme plusieurs de ces protéines ont aussi été identifiées dans les P-bodies chez la levure (Sheth & Parker, 2003), il est devenu l'usage d'utiliser l'appellation P-bodies pour désigner les corps GW même si l'on ne sait pas à l'heure actuelle si toutes les structures détectées à partir de l'un ou de l'autre de leurs constituants sont réellement identiques. D'ailleurs, si dans la plupart des cas les P-bodies ne sont pas clairement associées à d'autres structures cellulaires, si ce n'est un contact fréquent avec les mitochondries (Huang et al, 2011), une étude a décrit les corps GW-P-bodies détectés par un anticorps dirigé contre GW182, comme associés aux endosomes tardifs (Gibbins et al, 2009), ce qui est différent de ce qui est classiquement observé lorsqu'on utilise d'autres anticorps pour identifier les P-bodies. Bien que l'on puisse détecter à la fois les protéines Argonautes, les protéines TNRC6

Introduction

et les petits ARN dans les P-bodies, la présence de P-bodies n'est pas essentielle pour le silencing par les micro ARN (Eulalio et al, 2007a; Serman et al, 2007). Ce qui suggère que la formation des P-bodies est plutôt une conséquence non obligatoire du silencing par les micro ARN (Eulalio et al, 2007a).

Une délétion des domaines situés dans la région C-ter de DmGW182 (M-GW, RRM, C-GW) n'affecte pas la localisation de la protéine dans les P-bodies (Behm-Ansmant 2006). Par contre, le domaine d'interaction avec Ago (N-GW) et le domaine Q-riche sont nécessaires (Eulalio et al, 2009b). L'importance du domaine riche en glutamine pour la localisation dans les P-bodies a aussi été retrouvée dans les protéines TNRC6 (Lazzaretti et al, 2009). Plusieurs protéines présentes dans les P-bodies ont un domaine riche en glutamine (ou Glutamine Arginine comme dans le cas de DmGW182) : GW182, LSm4, Ge1. On peut donc envisager que ces domaines présents dans plusieurs constituants permettent l'assemblage des P-bodies en favorisant l'agrégation de ces protéines et de celles qui interagissent avec elles. GW182 est d'ailleurs responsable du recrutement de DmAgo1 dans les P-bodies (Behm-Ansmant et al, 2006).

d - Les effecteurs du silencing

L'identification d'un domaine de GW182 responsable du silencing ne constitue pas encore une identification des protéines en cause dans le silencing. L'observation que dans des cellules de mammifère (Fabian et al, 2009) ou de drosophile (Zekri et al, 2009), GW182 interagit avec la poly(A) binding protein (PABP) fournit une première piste. En interagissant avec la queue poly(A), la protéine PABP cytoplasmique joue un rôle essentiel dans la traduction et la stabilité de l'ARN messager. Au niveau de la traduction, la PABP interagit avec PAIP1 et PAIP2, deux régulateurs de l'initiation de la traduction. On peut donc supposer qu'une interaction directe entre GW182 et la PABP soit responsable de l'arrêt de la traduction et intervienne dans la déadénylation. Un motif d'interaction entre les protéines PAIP et la PABP qui avait été décrit (PAM2) est aussi présent dans les protéines TNRC6 (au sein du domaine conservé III, figure 6 et figure 7) et a été impliqué dans leur interaction avec la PABP (Fabian et al, 2009).

Introduction

En particulier une mutation ponctuelle de la phénylalanine centrale est suffisante pour supprimer l'interaction avec PABPC1 (cytoplasmic polyA-binding protein) et l'activité de TNRC6B dans le silencing par les micro ARN (Huntzinger et al, 2010). Toutefois, dans la protéine DmGW182, ce motif PAM2 n'est pas essentiel pour l'interaction avec PABP, que l'on utilise DmPABPC1 ou HsPABPC1 comme partenaire. Pour DmGW182, ce sont les domaines C-ter et M2 qui jouent un rôle critique (Figure 7). De même, les domaines de PABPC1 impliqués dans ces interactions sont différents : MLLE en C-ter pour TNRC6B, RRM1 en N-ter pour DmGW182 (Figure 7). Comme il est possible de compléter un silencing de DmGW182 par l'expression de TNRC6B, les mécanismes semblent conservés entre espèces mais être mis en œuvre par d'autres interactions. Ainsi, non seulement plusieurs domaines semblent jouer un rôle dans le silencing, mais même lorsque l'on s'intéresse à un partenaire particulier, on peut observer plusieurs modes d'interaction.

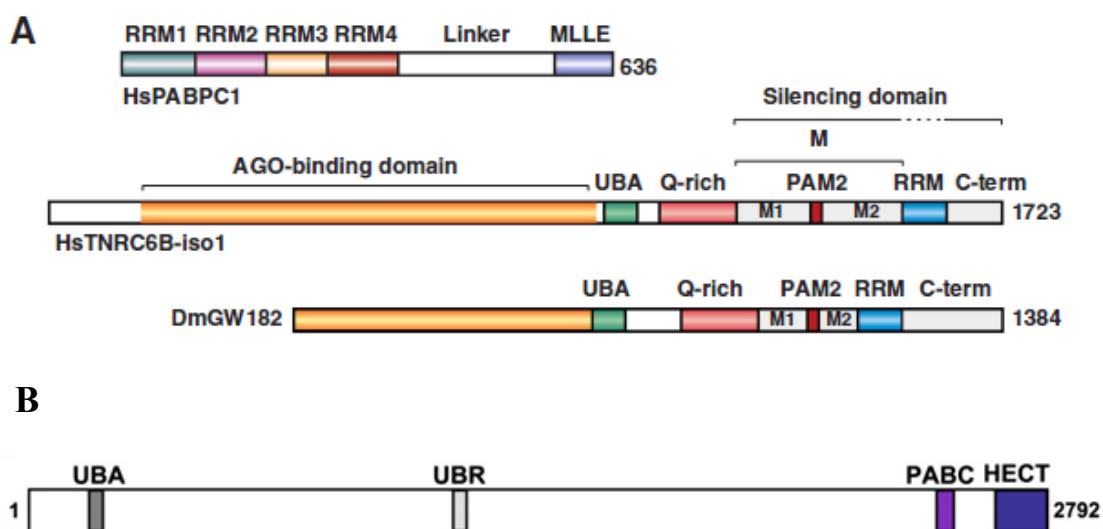


Figure 7 : (A) PABPC1 possède deux sites d'interaction pour les protéines GW182. En haut : l'organisation du domaine de HsPABPC1, HsTNRC6B isoforme 1 et DmGW182. « Hs : *Homo sapiens* ; Dm : *D. melanogaster* ». PABPC1 se compose de quatre domaines RRM à l'extrémité N-terminale, un linker riche en prolines non structurées, et un domaine conservés à l'extrémité C-terminale, nommé MLLE. HsTNRC6B et DmGW182 se composent d'un N-terminal du domaine AGO-binding, qui contient plusieurs GW-répétitions (jaune), et un domaine silencing (SD) qui comprend une région mi (M) et C-terminale, mais pas de RRM. UBA, domaine d'ubiquitine-associé ; Q-riche, région riche en glutamine; PAM2, motif 2 interagissant PABP; RRM, reconnaissance du motif de l'ARN; M1 et M2, les régions au sein du domaine milieu (M); C-term, région C-terminale. (B) Un schéma montrant la structure du domaine connu de protéines EDD. UBA, domaine ubiquitine-associé ; UBR : ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin ; PABC : PABP C-terminal ; HECT : short for Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus.

Introduction

Un autre niveau de complexité a été apporté par l'observation qu'EDD, l'homologue chez les mammifères du gène hyperplastic discs de drosophile, est nécessaire au silencing par les micro ARN (Su et al, 2011). De plus cette activité dans le silencing est due au domaine d'interaction avec le domaine PABP C-terminal (PABC) sur EDD et non à son activité connue comme ubiquitine ligase E3. Or EDD est recruté dans des complexes contenant les protéines Argonaute via son interaction avec la famille GW182 et cette interaction a lieu entre son domaine PABC et le motif PAM2 de GW182-MLLE. Ainsi le même domaine de GW182 peut interagir avec deux effecteurs distincts, PABPC1 ou EDD, ce qui suggère l'existence de complexes mutuellement exclusifs. A son tour, EDD interagit avec plusieurs protéines connues pour réguler la traduction et/ou la stabilité des ARN messagers comme : eRF3a et b, ATXN2 et DDX6, Tob1 et 2, PAIP1 et 2 (Su et al, 2011). Enfin, la présence d'un motif UBA dans EDD permet un autre mode d'interaction avec GW182 via l'hétérodimérisation des motifs UBA.

La Figure 8 présente un schéma qui essaye de regrouper les différents mécanismes de l'action des micro ARN sans prendre en compte EDD (Djuranovic et al, 2011).

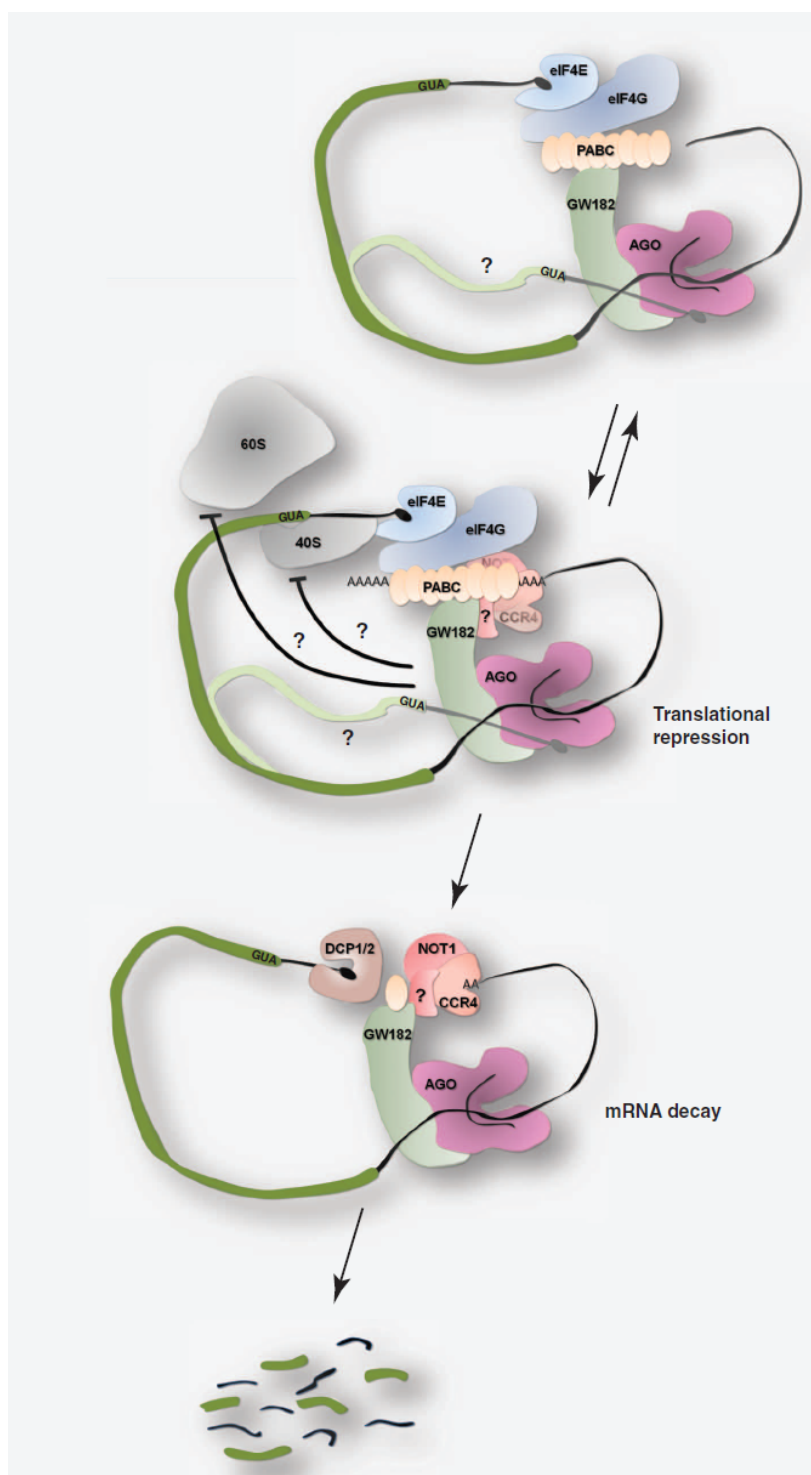


Figure 8 : Représentation schématique des interactions du complexe RISC avec un ARN messager en cours de traduction (Djuranovic et al, 2011). Ce schéma décrit le modèle proposé, qui commence par le recrutement d'Argonaute et l'association de GW182, impliquant des interactions potentielles avec la coiffe m7G de l'ARNm. Ces événements finalement conduisent à la répression traductionnelle en bloquant certaines des premières étapes dans l'initiation de la traduction. La déadénylation par CCR4:NOT1 peut contribuer à la répression de la traduction à l'étape initiale. Enfin, après la déadénylation, miARN-ARNm ciblé peut être soumise à la dégradation grâce au recrutement du complexe de décoiffage (DCP1 / 2).

Introduction

La figure 9 illustre le réseau d'interactions chez les mammifères lorsque l'on prend en compte EDD (Su et al, 2011)

C

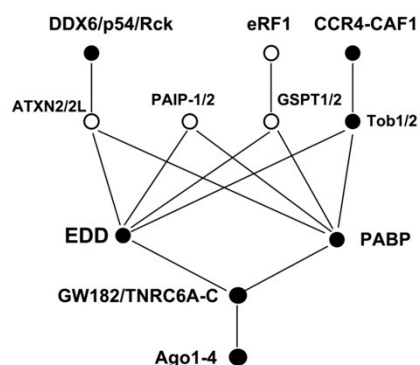


Figure 9 : Réseau d'interaction des protéines Argonaute (Su et al, 2011). Toutes les interactions prédictes entre EDD et les autres protéines. Donc EDD et PABP interagissent avec GW182 (TNRC6) qui est le premier partenaire des protéines Ago. EDD ou PABP amènent les autres protéines comme PAIP-1/2, Tob 1/2 etc, pour réaliser l'interaction avec CCR4-CAF1.

Ces interactions ont pu être validées par des expériences de capture GST et de co-immunoprécipitation, les ronds pleins identifient les protéines pour lesquelles un rôle direct dans le silencing par les micro ARN a été validé.

Bilan

Le mécanisme proposé pour le silencing par les micro ARN repose sur une série d'interactions protéine-protéine initiées par la fixation du complexe RISC sur un messenger cible. Tout d'abord, la protéine Argonaute du complexe RISC permet le recrutement de l'un des paralogues de GW182, à ce stade on ne peut conclure sur la présence constitutive ou non des TNRC6 dans le complexe RISC. Puis la protéine TNRC6 peut interagir avec les protéines PABPC1 présentes sur la queue poly(A). Par des mécanismes encore peu caractérisés, l'interaction entre TNRC6 et PABPC1 est susceptible de diminuer la traduction et de déstabiliser le messenger. De fait, d'autres interactions sont aussi importantes pour le silencing par les micro ARN comme le recrutement de EDD par son interaction avec le même motif PAM2 de GW182. A son tour EDD est capable d'interagir avec des régulateurs de la traduction et ou de la stabilité des ARN messagers. Ainsi, alors que le silencing par les siARN repose sur

Introduction

une activité intrinsèque de la protéine Ago2, dans le cas du silencing par les micro ARN, le complexe RISC se comporte plus comme une plate-forme de recrutement pour d'autres protéines qui vont pouvoir moduler les régulations déjà présentes de la traduction et de la dégradation des ARN messagers.

3^{ème} partie : L'interférence transcriptionnelle

3.1 Introduction

Dans la description initiale de l'interférence par l'ARN (Fire et al, 1998), plusieurs éléments suggéraient qu'il s'agissait d'un phénomène cytoplasmique et donc d'un silencing post-transcriptionnel. Cette conclusion s'appuyait en particulier sur l'observation que seule l'introduction d'ARN double brin correspondant à des séquences contenues dans les ARN messagers matures (séquences exoniques) pouvaient induire un silencing (Fire et al, 1998). Pourtant, chez les plantes, il avait été observé dès le début des études sur le co-silencing que celui-ci pouvait être transcriptionnel (TGS) ou post-transcriptionnel (PTGS) (Vaucheret & Fagard, 2001). Après la découverte du rôle des ARNdb, ceci a été rationalisé sous la forme suivante : si l'ARN double brin correspond à des régions transcrites, le silencing est post-transcriptionnel, s'il correspond à des régions promotrices le silencing est transcriptionnel (Mette et al, 2000). Toutefois il était aussi clair que la division entre les deux mécanismes n'était pas complète puisque le silencing post-transcriptionnel s'accompagne d'une méthylation de l'ADN au niveau des régions ciblées par l'ARNdb (Wassenegger & Péliissier, 1998). Chez les plantes, l'interférence par l'ARN est donc toujours associée à une modification de la chromatine. Le silencing transcriptionnel a aussi été observé chez la levure *S. pombe*, dans laquelle la machinerie de l'interférence joue un rôle essentiel dans la formation de l'hétérochromatine constitutive. Par contre, chez les animaux et en particulier les vertébrés, les données disponibles actuellement sur le silencing transcriptionnel ne permettent pas de dégager une vision claire de son rôle biologique et des mécanismes sous-jacents.

3.1.1 Activités nucléaires du complexe RISC : silencing post-transcriptionnel

A la différence des observations initiales de A. Fire, il a été montré rapidement chez *C. elegans* que le ciblage de séquences présentes sur des précurseurs nucléaires pouvait dans certains cas induire un silencing (séquences introniques ou ciblage du transcrit

Introduction

commun *lir-1 / lin-26*) (Bosher et al, 1999). Ainsi, même si l'essentiel du silencing post-transcriptionnel est cytoplasmique, ces données suggéraient que le complexe RISC pouvait aussi agir dans le noyau. Une diminution de l'abondance des transcrits nucléaires avait d'ailleurs été observée par l'équipe de A. Fire (Montgomery et al, 1998). Le co-silencing de *lir-1* et *lin-26* a été utilisé pour un crible génétique afin d'identifier les gènes spécifiquement impliqués dans le silencing des transcrits nucléaires. Ceci a permis d'identifier une protéine Argonaute NRDE-3 (Nuclear RNAi defective-3) comme étant nécessaire à cette interférence nucléaire (Guang et al, 2008). La protéine NRDE-3 contient un NLS (nuclear location sequence) et en présence d'un siARN, s'associe avec le pre-ARNm correspondant dans le noyau. Les caractéristiques des petits ARN associés à NRDE-3 suggèrent qu'il s'agit de siARN secondaires (issus du traitement par Dicer d'un ARN double brin produit par une ARN polymérase dépendant de l'ARN, en utilisant un petit ARN initial comme amorce). Ces données montrent qu'en plus de l'activité de l'hydrolyse des ARNm dans le cytoplasme, une forme spécialisée du complexe RISC peut induire un silencing nucléaire. Dans cet article, il est supposé que cette activité nucléaire est post-transcriptionnelle sans que soient présentées des données directes sur cet aspect. Un autre résultat de cette étude est que l'assemblage du complexe « RISC » (Ago / petit ARN) a lieu dans le cytoplasme même pour ce mode de silencing nucléaire.

Chez les mammifères, il a tout d'abord été supposé que le complexe RISC était purement cytoplasmique car les données d'immunofluorescence indiquaient que les protéines Ago étaient concentrées dans le cytoplasme. Pourtant, par fractionnement biochimique, il est possible de détecter une concentration de protéine Ago, plus faible que dans le cytoplasme, mais détectable dans la fraction nucléaire (Meister et al, 2004; Robb et al, 2005). De plus une activité endonucléase spécifique de séquence peut être observée dans la fraction nucléaire (Meister et al, 2004). Enfin, la transfection d'ARN interférant permet d'induire le silencing de transcrits purement nucléaires (les transcrits 7SK et U6) (Robb et al, 2005). Par ailleurs une étude par corrélation de fluorescence a montré que les complexes RISC qui peuvent être observés dans le

noyau sont importés à partir du cytoplasme (Ohrt et al, 2008). L'ensemble de ces données suggère qu'il existe des complexes RISC nucléaires, au moins ceux organisés autour de Ago2, et que ces complexes peuvent induire un silencing post-transcriptionnel dans le noyau (Robb et al, 2005). En ce qui concerne les micro ARN, il a été clairement établi que TNRC6B faisait la navette entre le cytoplasme et le noyau (Till et al, 2007), ainsi il est possible que des complexes de type miRISC puissent exister dans le noyau. De plus, dans des expériences de séquençage en profondeur des petits ARN de la fraction nucléaire, il a été mis en évidence de nombreux micro ARN (Liao et al, 2010). De manière importante, la distribution en taille de ces petits ARN est la même dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique avec un pic à 22 nucléotides.

3.2 Le silencing transcriptionnel

3.2.1 Chez les plantes

L'observation de départ est que dans le cadre des expériences de transgénèse, on observe souvent un silencing non seulement des transgènes mais aussi des copies du même gène présentes dans le génome. Dans le cadre du mécanisme de ce silencing HdGS (Homology-dependent Gene Silencing), il est observé que le silencing est associé à une méthylation de l'ADN, ce qui pouvait être interprété comme l'indication d'un rôle de l'ARN double brin pour guider la méthylation (Wassenegger & Pélissier, 1998). De plus la nature transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle du silencing semble être définie pour une grande part par les régions d'homologies entre les transgènes et les gènes résidents. Si ces homologies sont situées dans le promoteur il y aura un silencing transcriptionnel, en revanche si elles se situent dans la partie codante le silencing sera post-transcriptionnel (Kooter et al, 1999). Ces données ont été directement confirmées par les expériences du groupe de Matzke avec l'introduction d'un transgène qui produit de l'ARN double brin correspondant à la séquence du promoteur de la nopaline synthase et qui induit un silencing transcriptionnel de ce gène avec une méthylation de l'ADN (Mette et al, 2000).

Introduction

3.2.2 Chez *C. elegans*

Le silencing transcriptionnel d'un transgène a été décrit chez *C. elegans* (Grishok et al, 2005). Il diffère du silencing post-transcriptionnel tant dans ses caractéristiques globales, en absence de transmission aux générations suivantes, que par les gènes impliqués : i) *alg-1*, une protéine Argonaute qui n'est pas nécessaire au silencing post-transcriptionnel, ii) *hpl-1* et *hpl-2*, des homologues de HP1 (Heterochromatin protéine 1). De plus, on observe une désacétylation des histones en accord avec une modification de la transcription via l'état de la chromatine.

Il a aussi été décrit qu'un silencing post-transcriptionnel « classique » (par des ARN double brin ciblant une région transcrite) pouvait évoluer vers un silencing transcriptionnel à très long terme (plus de 80 générations) - au moins pour certains gènes cibles (8 % des gènes étudiés) (Vastenhouw et al, 2006). Ainsi, le silencing post-transcriptionnel initial peut évoluer vers un silencing transcriptionnel (dominant et stable) ce qui illustre de nouveau qu'il n'existe pas de barrière absolue entre les deux types de silencing.

3.2.3 Chez *S. pombe*

Du fait de la puissance de la génétique, c'est chez *S. pombe* que le rôle des petits ARN et de la machinerie de l'interférence a été le plus étudié. Pourtant cet organisme n'est probablement pas le meilleur modèle pour suivre les changements de l'organisation de la chromatine puisque les régions d'hétérochromatine sont surtout constitutives (régions péricentromériques et sous-télomériques). Dès 2002, les groupes de S. Grewal et R. Martienssen ont montré que la machinerie de l'interférence jouait un rôle essentiel dans l'organisation des régions péricentromériques (Volpe et al, 2002). Spécifiquement, l'inactivation de Dicer, Ago1 ou RdRP (RNA-dependent RNA polymerase), qui sont des gènes uniques chez *S. pombe*, permet l'expression d'un gène *ura4* intégré dans les régions péricentromériques qui sont normalement sous forme d'hétérochromatine silencieuse. Il faut noter que les autres régions d'hétérochromatine ne sont pas affectées par ces

Introduction

inactivations. En parallèle, on observe une perte de la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9me3) et une accumulation de transcrits provenant des répétitions présentes dans les régions péricentromériques (transcrits sens et antisens). L'implication de Dicer, Ago1 et d'ARN sens et antisens évoque un mécanisme qui partage les points clés de celui de l'interférence par l'ARN. En 2004, les groupes de Moazed et Grewal ont purifié un complexe baptisé RITS (RNA Induced Transcriptional Silencing¹) en partant de la protéine Chip1 (une protéine à chromodomaine qui se fixe sur H3K9me3). Ce complexe comprend outre Chip1, Ago1 et Tas3 (une protéine de fonction inconnue, mais qui contient un motif d'interaction avec Ago similaire à celui de la famille GW182 comme discuté dans la section 2) et des petits ARN qui proviennent des séquences répétitives péricentromériques. La production de ces petits ARN nécessite Dicer et ils sont nécessaires pour que le complexe RITS s'associe aux régions péricentromériques.

Ces résultats conduisent au schéma suivant :

- i) la présence d'ARN sens et antisens provenant des répétitions péricentromériques induit la formation de petits ARN interférants par Dicer.
- ii) ces ARN interférants servent de guide pour localiser un complexe apparenté à RISC sur les régions péricentromériques.

L'analogie avec l'interférence par l'ARN est donc frappante, même si de nombreux points restent à clarifier. Un point central dans tous les modèles qui ont été proposés vient de l'observation que ce mécanisme contient plusieurs possibilités de boucles d'autorenforcement. Un rôle d'Ago1 dans la localisation du complexe RITS sur les répétitions péricentromériques est facile à comprendre dans le cadre d'un mécanisme de reconnaissance de séquence par un petit ARN guide. Mais Chip1 qui est l'un des constituants de RITS peut aussi induire une localisation du complexe via l'histone

¹ L'appellation initiale était RNA Induced Initiation of Silencing pour insister sur le fait que l'hétérochromatine pouvait se maintenir indépendamment de la machinerie de l'interférence une fois qu'elle est établie.

Introduction

H3K9me3. Ainsi, deux mécanismes peuvent contribuer en parallèle (indépendamment ou en interaction) au recrutement de RISC sur l'hétérochromatine. Comme d'une manière directe ou indirecte RITS va permettre la méthylation de H3K9, le rôle des petits ARN dans la localisation de RITS va être complété par la présence de H3K9me3. De plus, RITS est en interaction avec un complexe qui contient la RdRP aussi nommé RdRC, (Motamedi et al, 2004). La fixation de RITS sur un transcrit naissant, peut donc conduire au recrutement de la RdRP et à la synthèse d'ARN double brin sur la région ciblée par les « premiers » petits ARN. Ainsi ce premier événement va permettre la production de petits ARN secondaires qui pourront entretenir le recrutement de RITS sur les mêmes transcrits. D'où l'idée que la fixation de RITS va être renforcée par la méthylation de H3K9 et la production de siARN secondaires. De manière inattendue par rapport à cette description, l'activité de trancheuse d'Ago1 est aussi nécessaire pour l'établissement de l'hétérochromatine (Irvine et al, 2006). Une interprétation de ce résultat est que l'activité trancheuse serait nécessaire pour la synthèse d'ARN double brin par le complexe RdRP. De fait, *in vitro*, la RdRP peut utiliser un substrat simple brin en l'absence d'amorce (Motamedi et al, 2004) et l'on peut donc concevoir qu'un transcrit hydrolysé par RITS puisse servir de substrat.

Une question posée pour tous les modèles de régulation transcriptionnelle est la nature de la cible reconnue par le petit ARN. A priori ce pourrait être soit l'ADN (sous forme simple brin) soit les transcrits naissants qui permettraient un positionnement du complexe RISC à proximité de la séquence correspondante sur la chromatine. Trois types d'arguments plaident en faveur d'une reconnaissance des transcrits naissants : i) l'absence d'activité hélicase dans le complexe RITS rend peu probable une interaction directe avec l'ADN sauf dans le contexte de la transcription où les deux brins sont dissociés par la mise en place du complexe de transcription; ii) l'ancrage du complexe RITS sur les transcrits induit la formation d'hétérochromatine (Buhler et al, 2006). Ainsi, l'interaction avec un transcrit peut permettre la formation d'hétérochromatine. Cependant le fait que, dans ces conditions, Dicer soit toujours nécessaire et donc la

Introduction

production de siARN correspondant aux régions péri-centromériques peut être pris comme une indication que l'ancrage sur le transcrit induit une cascade d'événements qui permettent la mise en place du silencing plutôt qu'un silencing direct (Grewal & Elgin, 2007). iii) Enfin l'implication de la RdRP plaide en faveur d'un recrutement sur les transcrits naissants. Il existe donc un faisceau d'arguments en faveur d'une interaction avec les transcrits naissants mais qui ne permet pas d'exclure que dans certaines conditions, il y ait une interaction avec l'ADN.

Une autre conclusion de ces études chez *S. pombe* est l'importance du contexte transcriptionnel (Moazed, 2009). Seuls des gènes situés dans un environnement adéquat peuvent être inhibés. De fait, chez *S. pombe* il est difficile d'observer des effets *en trans* sur une copie du gène ciblé qui est intégrée dans une région d'euchromatine. Parmi les paramètres qui ont été identifiés, figurent la quantité de siARN produits, l'abondance des marques chromatiniennes de silencing accrue par surexpression de HP1 et l'existence de transcrits antisens (Iida et al, 2008). Si effectivement l'interaction de RITS a lieu avec des transcrits naissants, on peut supposer que celle-ci est transitoire et ne peut induire des effets que s'il existe des relais pour la mise en place de l'hétérochromatine. Les boucles d'autorenforcement constituent un tel mécanisme et en particulier le rôle de H3K9me3 pourrait correspondre à une condition préalable : on ne peut former de l'hétérochromatine que sur des régions d'hétérochromatine. Dans une version plus nuancée, seuls les gènes dans un contexte de « pré-silencing » transcriptionnel peuvent faire l'objet d'un silencing transcriptionnel.

Puisque comme chez *S. pombe* il n'existe qu'une seule protéine Argonaute (Ago1), les données génétiques permettent d'établir clairement qu'elle est impliquée dans l'établissement des régions d'hétérochromatine (Lippman & Martienssen, 2004; Matzke & Birchler, 2005). D'ailleurs, jusqu'à présent un silencing post-transcriptionnel n'a pas été identifié chez *S. pombe* (Moazed, 2009).

3.2.4 Le silencing transcriptionnel chez les mammifères

Puisque chez les plantes l'introduction d'ARN double brin contenant des séquences de régions promotrices peut induire un silencing transcriptionnel, de nombreux laboratoires ont essayé d'induire un silencing dans des cellules de mammifère avec des petits ARN correspondant à des promoteurs. Dans la plupart des cas, ces expériences faciles à réaliser n'ont pas donné de résultat. Pourtant en 2004, K. Morris a publié un exemple de silencing transcriptionnel induit par un petit ARN (Morris et al, 2004). Le « siARN » utilisé est situé à -106/-86 (par définition +1 indique le site d'initiation de la transcription, '-' signifie en aval) dans le promoteur et plusieurs arguments indiquent que le silencing observé est lié à une inhibition de la transcription : i) une mesure de la transcription par "run-on" ; ii) le silencing est supprimé par un traitement 5'AZA + TSA (5'AZA + TSA pourrait induire la déméthylation) suggérant qu'il dépend d'une modification de l'ADN et/ou de la chromatine, par contre l'interférence classique qui cible le messager est insensible à ce traitement ; iii) une méthylation de l'ADN est détectable après silencing, ceci a été vérifié par l'étude sur un site de l'enzyme HinP1I : le site d'interaction du siARN utilisé contient un site de restriction de l'enzyme HinP1I, HinP1I est une enzyme qui est sensible à la méthylation, la méthylation empêche l'activité de restriction de cette enzyme. Un silencing du promoteur EF1A endogène peut aussi être observé à condition de permettre un transport des petits ARN vers le noyau, par l'utilisation du peptide MPG qui forme des complexes stables non-covalents avec nucléiques acides et améliore leurs déplacements. Outre la technique de transfection du petit ARN, cet article introduit la notion d'une fenêtre d'accessibilité au silencing transcriptionnel. En effet, le gène ciblé est introduit dans les cellules au moyen d'un vecteur lentiviral et le silencing transcriptionnel n'est observé que lorsque la transfection du petit ARN a lieu dans des cellules récemment infectées (Morris et al, 2004). Cette observation pourrait donc correspondre à l'idée que les petits ARN peuvent influencer sur la mise en place d'une organisation chromatinienne pour les gènes dans lesquels celle-ci n'est pas encore clairement établie, mais ils ne suffisent pas pour modifier une organisation déjà en place. On peut noter que cette question de l'accessibilité d'un gène aux

Introduction

régulations par les petits ARN rejoint celle discutée pour d'autres organismes comme *S. pombe* (Moazed, 2009).

En ce qui concerne les mammifères, et depuis la publication de K. Morris, seules quelques études ont montré la mise en place d'un silencing transcriptionnel (Janowski et al, 2005) (Ting et al, 2005) (Pulukuri & Rao, 2007) (Kim et al, 2008) (Napoli et al, 2009). Pour mémoire, l'article de Kawasaki (Kawasaki & Taira, 2004) a été rétracté sur le ciblage du promoteur de la E-cadhérine au niveau des ilots CpG. Les données sur le mécanisme sous-jacent sont souvent divergentes entre ces modèles, ce qui peut soit indiquer un mécanisme indirect qui dépend du gène étudié, soit que les approches expérimentales utilisées sont trop imprécises pour renseigner de manière fiable sur le mécanisme. De plus, alors que les travaux initiaux de K. Morris insistaient sur la nécessité d'une technique de transfection particulière, ce point a disparu de leurs travaux plus récents et, de fait, ne figure pas dans les autres études. En ce qui concerne la nature de la cible (ADN ou ARN naissants) l'ensemble des travaux est en accord avec un rôle de transcrits naissants, ce qui dans la vision « classique » des promoteurs, n'est pas sans poser quelques problèmes ; mais le point de vue sur une restriction de la transcription aux gènes exprimés a été complètement changé depuis la mise en œuvre du séquençage en profondeur (Clark et al, 2011). Ainsi, par différentes techniques mais, dans le cas de ces études, principalement par des expériences de RT-PCR, il a été montré l'existence de transcrits sens (Han et al, 2007; Napoli et al, 2009) ou antisens (Schwartz et al, 2008) au niveau du promoteur en prenant l'ARN messenger comme définissant le « sens ». Ceci permet d'envisager, comme il a été proposé chez *S. pombe*, que le complexe RISC recrute au voisinage de la chromatine des activités susceptibles de modifier la transcription. En ce qui concerne les modifications de la chromatine associées au silencing transcriptionnel, plusieurs articles ont indiqué avoir détecté des changements de modification des histones mais sans que ces données soient très concluantes sur le plan expérimental. Pour le gène EF1A, une augmentation de H3K9me2 et de H3K27me3 sont observées en réponse au siARN ciblant le promoteur (Weinberg et al, 2006), par une mesure effectuée à 48 h post-transfection. Cette augmentation (~4 fois) est détectable non seulement au niveau

Introduction

de la région ciblée mais aussi au site + 700 dans le gène (même définition de la position d'acide nucléique relative au site 0 comme TSS, '+' signifie en amont). Cette méthylation H3K9me2 nécessite une transcription active et est absente en cas de blocage de la transcription par l' α -amanitine. Par contre, dans l'étude du groupe de Corey sur le récepteur de la progestérone (PR), aucune modification des histones n'a été détectée (Janowski et al, 2006).

Par analogie avec la situation chez les plantes, dans laquelle l'ARN double brin peut induire une méthylation de l'ADN spécifique de séquence, plusieurs études ont cherché à mettre en évidence une modification de la méthylation de l'ADN dans des cas de silencing transcriptionnel. En fonction des modèles utilisés et des approches expérimentales, il a été observé ou non une implication de la méthylation de l'ADN. Le groupe de Baylin (Ting et al, 2005) a repris le modèle de la E-cadhérine décrit dans l'article de Kawasaki (Kawasaki & Taira, 2004) et par plusieurs mesures de la méthylation dont le séquençage après bisulfite a conclu que le silencing transcriptionnel de la E-cadhérine est indépendant d'une méthylation de l'ADN dans les cellules HCT 116 ou MCF-7. A minima, ceci indique que dans les expériences transitoires, dans ce cas les études ont été faites à 7 jours après la transfection, une méthylation de l'ADN n'est pas indispensable. Par contre, dans les études de Morris sur le promoteur EF1A (Morris et al, 2004; Weinberg et al, 2006) un rôle de la méthylation est perçu à travers la sensibilité à la 5'AZA+TSA et aux enzymes de restriction. Ces approches sont moins complètes que celles du groupe de Baylin mais il est néanmoins possible qu'en fonction du gène cible et des conditions expérimentales, la méthylation soit (Castanotto et al, 2005) ou non impliquée dans le silencing transcriptionnel. Dans le cas de EF1A, le groupe de K. Morris a observé une interaction entre le petit ARN et l'ADN méthyl transférase 3A par « pull down ». Toutefois, il manque des données pour savoir si cette interaction est présente en général, DNMT3A serait un composant du complexe RISC au sens large, ou seulement dans le cas de silencing transcriptionnel.

Ces divergences dans les observations s'étendent aussi au rôle des protéines Argonaute. Ainsi, certaines études ont mis en évidence un rôle de Ago1 (Kim et al,

Introduction

2006), tandis que d'autres impliquaient Ago2 (Chu et al, 2010), ou Ago1 et Ago2 (Janowski et al, 2006). On peut d'ailleurs remarquer que les différentes publications d'un même groupe n'en sont pas toujours en accord entre elles.

De manière surprenante, étant donné la nature du phénomène, les différents exemples de silencing transcriptionnel dans des cellules de mammifère ont été étudiés dans des expériences à court terme. L'une des rares études à « long terme » (quelques semaines) est celle de Hawkins (Hawkins et al, 2009). Outre la mise en évidence d'un silencing qui perdure au-delà de la présence des petits ARN, cette étude suggère que les gènes impliqués dans l'initiation et la maintenance du silencing sont différents. De plus il apparaît que les modifications au niveau de la chromatine sont séquentielles, la méthylation de l'ADN étant un événement tardif qui pourrait marquer un silencing stable. Ce dernier point est important pour essayer d'intégrer les observations faites sur les modifications de la chromatine dans les différents modèles expérimentaux.

Puisque nous savons maintenant que des micro ARN matures sont présents dans le noyau, il était logique de chercher si ceux-ci pouvaient induire un silencing transcriptionnel. Dans une première étude, il a été recherché s'il existait des sites parfaitement complémentaires dans le promoteur proximal (-200/-1) de gènes humains (Kim et al, 2008). En restreignant à une complémentarité parfaite, on obtient des réponses, mais dans tous les cas, il s'agit en fait de la présence de micro ARN situé dans le promoteur d'un gène hôte et le transcrit en sens inverse de l'ARNm. Néanmoins dans le cas étudié (gène POLR3D- "polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D", miR-320) les données montrent que la transfection de miR-320 réprime l'expression de POLR3D donc que le micro ARN peut agir en trans. La diminution de la transcription mesurée en "run-on" s'accompagne du recrutement de Ago1, de EZH2 et d'une méthylation de H3K27. Enfin un transcrit sens en amont du promoteur est détecté mais avec une faible abondance (1% du pré-miARN). Si l'on étend l'analyse à des sites partiellement complémentaires, alors le nombre de gènes candidats croît très vite : 1200 avec 3 mésappariements, suggérant la possibilité d'un important réseau de régulation de la transcription par les micro ARN.

3.3 Activation de l'expression par les petits ARN

3.3.1 Observation de « l'activation par l'ARN »

A travers ses différentes manifestations, l'interférence par l'ARN est systématiquement un mécanisme d'inhibition de l'expression. Il existe cependant deux observations qui montrent une augmentation de l'expression dans un contexte de régulation post-transcriptionnelle. Dans le premier cas, il a été décrit que la régulation par un micro ARN peut maintenir l'efficacité de traduction d'un ARN messager dans des cellules quiescentes et donc, de fait, augmenter son expression par rapport à une version non régulée du même ARN (Vasudevan & Steitz, 2007; Vasudevan et al, 2007). Toutefois, ces données non pas été confirmées depuis. Une deuxième situation est celle des ARN messagers des protéines ribosomiques qui peuvent contenir un site de fixation pour miR-10a dans la région 5' non traduite (Orom et al, 2008). Dans ce cas il est proposé que la fixation du complexe RISC ait une action antagoniste de celle conférée par la région 5'TOP (l'ARNm TOP est un transcrit vertébré qui contient un 5' terminal oligopyrimidine tract) et que donc l'induction résulte en fait d'une inhibition d'une inhibition. Ces observations indiquent que, dans certains contextes, le complexe RISC peut « interférer » avec une régulation négative existante et ainsi stimuler l'expression.

Au vu du petit nombre d'articles (une douzaine) qui décrit une régulation transcriptionnelle par des petits ARN dans les cellules de mammifère, il est remarquable que plusieurs d'entre eux observent une augmentation de l'expression. C'est en particulier ce qui a été observé dans des situations où le petit ARN cible une région promotrice. Le groupe de R. Dahiya (Li et al, 2006) a décrit le premier que des petits ARN qui ciblent le promoteur de la E-cadhérine, de p21 ou du VEGF peuvent induire leur expression jusqu'à une dizaine de fois d'ARN accumulé. A l'image de ce qui a été observé chez les plantes, on peut supposer que le fait de cibler une région promotrice induit une régulation au niveau de la transcription. D'ailleurs, dans cette première description, il a été mis en évidence une diminution de la méthylation de H3K9 au niveau du promoteur du gène ciblé. Cet effet nécessite spécifiquement Ago2

Introduction

et pas clairement Ago1, 3, 4 ; toutefois le silencing de ces protéines réduit le niveau d'induction d'environ 30%.

Dans ce type d'étude, il est très difficile d'exclure un effet hors cible des petits ARN et il existe au moins une situation dans laquelle le rôle d'un silencing hors cible a été établi (Weinberg et al, 2007). Néanmoins, le fait que cette induction soit observée pour plusieurs petits ARN et plusieurs gènes cibles est en faveur d'une véritable réponse aux petits ARN. Dans cette première étude, il a aussi été observé qu'une interaction de type micro ARN était suffisante pour induire cet effet, ce qui suggère que l'activité endonucléase de Ago2 n'est pas en cause. Ces auteurs ont appelé ce phénomène « activation par l'ARN » (RNA activation : RNAa).

En utilisant les mêmes gènes cibles, le groupe de R. Dahiya a montré que cette activation pouvait être observée dans de nombreux types cellulaires et chez plusieurs espèces de mammifères (Li et al, 2006). D'autres groupes ont observé des réponses similaires en utilisant des approches expérimentales légèrement différentes. C'est en particulier le cas du groupe de D. Corey qui a utilisé des petits ARN ciblant les sites d'initiation de la transcription (Janowski et al, 2007). L'idée sous-jacente était que, comme cette région doit être ouverte pour que le complexe de transcription puisse jouer son rôle, les brins d'ADN pourraient être directement accessibles aux petits ARN. En fait, ces auteurs pensent maintenant qu'il n'y a probablement pas d'interaction directe avec l'ADN mais de nouveau, il n'existe pas de données permettant de conclure avec certitude. Cette étude a principalement porté sur le cas du gène du récepteur de la progestérone. Une première observation suggère qu'en fonction du positionnement exact du petit ARN, il peut être inhibiteur ou activateur de l'expression : siPR-9 (nommé selon leur position au promoteur), -9 à +10 est inhibiteur, tandis que siPR-11 : -11 à +8 est activateur ; par définition +1 indique le site d'initiation de la transcription (TSS). Comme dans les études de R. Dahiya, plusieurs petits ARN sont fortement activateurs (11 dans la région -56, + 17), ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'un effet hors cible. Une autre donnée est que la réponse

Introduction

dépend du niveau d'expression du gène cible, l'activation par PR-11 est forte dans des cellules qui expriment faiblement le récepteur de la progestérone comme les cellules MCF-7, mais faible dans les cellules T47D qui l'expriment fortement. Tandis que l'inverse est vrai pour les petits ARN inhibiteurs comme PR-9.

L'ensemble des observations est en accord avec une augmentation de la transcription qui peut être estimée par immunoprécipitation de la polymérase II (Chu et al, 2010) ou un marquage des transcrits naissants (Morris et al, 2008). En parallèle, on observe un changement des modifications des histones en accord avec une augmentation de la transcription : diminution de H3K9me3, (Li et al, 2006) ; augmentation de H3K14me2/3, (Janowski et al, 2007). Un premier niveau de compréhension du mécanisme a été obtenu en analysant l'implication des protéines Argonaute. L'observation initiale du groupe de R. Dahiya concernant Ago2 est compatible avec les résultats du groupe de D. Corey sur le récepteur de la progestérone (Chu et al, 2010); en particulier Ago1, 3, 4 ne jouent pas de rôle majeur dans l'activation du récepteur de la progestérone. Par contre, dans ce cas, les données sur Ago2 sont un peu plus difficiles à interpréter puisque le silencing de Ago2 conduit à une augmentation de l'expression du récepteur d'environ 3 fois en l'absence de petit ARN exogène. A minima, ceci implique Ago2 dans une régulation du niveau de base du récepteur. En présence d'un petit ARN activateur, le niveau d'activation est comparable entre le siAgo2 et le si contrôle. Dans cette étude, seule Ago2 est impliquée dans le silencing transcriptionnel par PR-9. Ainsi, l'activation par les petits ARN dépend du même partenaire protéique que le silencing post-transcriptionnel.

Pour qu'il y ait une régulation spécifique de la transcription quelque soit l'inhibition ou l'activation, il faut envisager que le petit ARN permette une reconnaissance du gène. Comme discuté dans le cas du silencing transcriptionnel, le modèle proposé actuellement est que cette reconnaissance ait lieu au niveau des transcrits naissants. En fonction des modèles expérimentaux, des transcrits qui recouvrent les promoteurs ont été caractérisés. Pour le récepteur de la progestérone, un transcrit antisens a été

identifié (Schwartz et al, 2008) et l'immunoprécipitation de Ago2 permet de mettre en évidence un recrutement de RISC sur ce transcrit qui dépend du petit ARN guide (Chu et al, 2010). Dans le cas de la E-cadhérine, le brin qui sert de guide est le brin antisens, ce qui suggère une interaction avec un transcrit sens au niveau du promoteur, les orientations étant définies par rapport au transcrit ARNm (Place et al, 2010). Ces données sont donc en faveur d'une reconnaissance « du gène » à travers des transcrits naissants. Bien que l'on puisse envisager un rôle direct de Ago2 par coupure de l'ARN sur lequel il se fixe, comme dans l'interférence « classique », cette hypothèse rend difficile l'interprétation du fait que les micro ARN peuvent induire l'expression (Li et al, 2006; Place et al, 2008) (voir cependant dans notre résultat).

3.3.2 Mécanisme de l'activation

Pour définir le mécanisme de l'activation, les différents modèles proposés se placent dans le cadre général d'une inhibition d'inhibition. Ce point de vue permet de prendre en compte la répression de l'expression qui est globalement associée à l'interférence par l'ARN et de ne pas entrer directement en conflit avec la « logique biologique » qu'on lui associe dans laquelle l'ARN interférence est un mécanisme de défense du génome contre les éléments génétiques indésirables, endogènes ou exogènes. Le modèle le plus complet est celui de K. Morris (Morris et al, 2008). Il a pour avantage de n'impliquer que des fonctions connues de l'interférence. Il part de l'observation que pour plusieurs des gènes où l'on observe une induction dont p21, il existe des transcrits antisens qui recouvrent les régions normalement transcrites du gène. Il est facile d'envisager qu'une telle situation induise une répression de l'expression du gène sous forme d'ARN messenger. Ce type de régulation a d'ailleurs été validé dans le cas du gène p15 pour lequel l'abondance des transcrits antisens est inversement corrélée au niveau d'ARNm (Yu et al, 2008). On peut envisager plusieurs mécanismes de régulation par une transcription antisens : i) du fait de la présence de transcrits sens et antisens, une inhibition du type interférence par l'ARN soit post-transcriptionnelle, soit transcriptionnelle, ii) une inhibition par modification de la chromatine due à la transcription antisens, comme cela a été observé chez la levure

Introduction

S. cerevisiae en l'absence de la machinerie d'interférence, (Camblong et al, 2007) ; iii) le recrutement du complexe polycomb par le transcrit antisens, comme il est proposé dans le cas de p15 (Camblong et al, 2007) ; iv) différentes formes de conflits transcriptionnels : rencontre des polymérase dans le corps du gène, occlusion du promoteur par la transcription antisens. Dans le modèle de K. Morris, la présence d'ARN antisens est donc à l'origine d'une répression initiale de l'expression du gène ciblé. D'ailleurs, si l'on utilise un siARN contre le transcrit antisens, on peut augmenter l'expression du gène (Morris et al, 2008). L'élément spécifique du modèle est l'observation que dans certains cas, le petit ARN activateur qui cible le promoteur est capable d'induire la dégradation du transcrit antisens du fait de la présence de cibles presque parfaites. L'interprétation proposée est donc que les petits ARN qui ciblent le promoteur, agissent en fait par une interférence classique sur un transcrit antisens du fait d'une complémentarité de séquence non prévue. Une hypothèse contraignante de ce modèle est qu'il suppose une dégradation significative des transcrits antisens dans le noyau et probablement au lieu même de leur transcription, si effectivement le transcrit antisens agit localement comme plate-forme de recrutement pour le complexe polycomb, par exemple. L'efficacité de silencing du transcrit antisens induite par le petit ARN activateur est d'ailleurs modeste (40 %) et il n'y a pas eu d'étude spécifique au sein du compartiment nucléaire. Enfin, au vu du côté fréquent mais non systématique de l'induction par des petits ARN qui ciblent le promoteur, il paraît peu probable qu'il s'agisse dans tous les cas d'un effet hors cible sur le corps du transcrit antisens.

Dans le cas du promoteur du récepteur de la progestérone (RP), le transcrit antisens est initié en aval du site d'initiation de la transcription sens (+ 536 ou +738 selon le type cellulaire) et s'étend très en amont, sa taille étant estimée à 70 kb. Le rôle de ce transcrit dans la régulation de l'expression du RP n'est pas établi et une diminution du transcrit antisens n'a pas d'impact sur le niveau de base d'expression du RP (Schwartz et al, 2008), en fait elle est légèrement inhibitrice. Par contre, cette diminution réduit l'activation par PR-11. Ainsi, le transcrit antisens est probablement

Introduction

nécessaire au recrutement d'un complexe RISC au voisinage du gène mais sa dégradation éventuelle ne peut expliquer l'induction. D'ailleurs, dans ces études, il est mis en évidence une interaction entre le transcrit antisens et Ago2 en utilisant des amorces situées de part et d'autre du petit ARN, ce qui est en accord avec une absence de dégradation de la cible par Ago2. Comme il est observé un déplacement de hnRNPK (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) qui est initialement présente sur le promoteur vers le transcrit antisens, le modèle proposé est que la présence du complexe RISC induit une redistribution de certains régulateurs de la transcription (Schwartz et al, 2008). Dans ce cas, le mécanisme suggéré reste évasif tout comme la raison pour laquelle des petits ARN avec des cibles voisines sur le transcrit antisens sont soit activateurs ou inhibiteurs de l'expression. Par contre, ce modèle diffère clairement de celui de K. Morris du fait que la dégradation du transcrit antisens et l'activité de trancheuse de Ago2 ne jouent pas de rôle direct dans l'activation. Finalement, un dernier point qui n'est pas vraiment discuté dans ces études est celui de la restriction de l'activation à Ago2 (Chu et al, 2010; Li et al, 2006). Puisque les études sur le silencing tendent à montrer qu'il n'y a pas de spécialisation forte entre les différentes protéines Argonaute de mammifère, cette restriction est inattendue. Une explication triviale pourrait être que l'utilisation de petits ARN double brin parfaits ne permet que l'activation de Ago2, une étude du rôle des autres Argonaute nécessitant l'utilisation de précurseurs de micro ARN qui contiennent des mésappariements.

Au-delà de l'observation d'un effet paradoxal, l'activation par l'ARN suscite beaucoup d'intérêt du fait de son application potentielle dans un cadre thérapeutique. De fait, les exemples présentés initialement par le groupe de R. Dahiya portent sur des gènes suppresseurs de tumeurs (E-cadhérine, p21) et les études suivantes ont permis d'étendre la liste de gènes activables à p53, WT1, NKX3.1 (un gène suppresseur des tumeurs de la prostate) (Huang 2010). Mais l'activation n'est pas une propriété spécifique des gènes suppresseurs de tumeurs et a aussi été observée pour des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation (PAR4, IL24, IL32) ou la

Introduction

migration et la nidification des cellules souches (CXCR4) (Huang 2010, Majid 2010). De plus, l'activation de l'expression de ces gènes est capable de diminuer la prolifération cellulaire *in vitro* (Li et al, 2006), voire d'induire une réversion du phénotype tumoral (Chen 2008, Whitson 2009, Junxia 2010). Ainsi la démonstration de principe que l'activation par l'ARN pouvait modifier les phénotypes par la réexpression d'un gène régulateur a déjà été apportée. Bien évidemment, une meilleure compréhension du mécanisme et en particulier des éléments qui peuvent déterminer la nature de la réponse (inhibition ou activation de l'expression) est une des conditions pour que l'on puisse développer une utilisation thérapeutique de l'activation par l'ARN. Parmi les nombreux aspects de l'activation qui n'ont pas encore été caractérisés, figure la question d'une induction à long terme. Jusqu'à présent les expériences par transfection de petits ARN montrent que l'activation est transitoire même si elle peut persister un peu plus longtemps que le silencing une dizaine de jours, (Place et al, 2010).

4^{ème} partie : Observations initiales du laboratoire

4.1 Mesure de la cinétique de coupure par RISC

Dans le laboratoire, Carole Ribet a effectué une étude de la cinétique de coupure des ARN ciblés par un complexe RISC. L'approche expérimentale reposait sur l'utilisation d'un promoteur régulé par la tétracycline dans la version Tet-Off afin de pouvoir mesurer la demi-vie des transcrits sans utiliser d'inhibiteur général de la transcription comme l'actinomycine D. L'actinomycine D (ou l'actinomycine) est un composé chimique utilisé en biologie comme un anti-mitotique, et un agent intercalant de l'ADN. Cette étude était focalisée sur des constructions β -globine, puisque le laboratoire avait montré qu'il était possible d'analyser l'ensemble de la maturation de ces transcrits par des études cinétiques exploitant l'induction ou l'inhibition du promoteur régulé par la tétracycline (Audibert et al, 2002). Pour obtenir des données suffisamment précises, ces études doivent être réalisées dans des transfectants stables afin de pouvoir disposer d'un niveau d'expression reproductible du gène étudié. En principe, une mesure de l'activité de dégradation associée au complexe était une extension simple de ces travaux précédents ; il s'agissait de mesurer la demi-vie des transcrits β -globine en présence d'un siARN contrôle ou d'un siARN β -globine. Dans la pratique une telle étude comprend deux difficultés principales :

- i) l'analyse de la demi-vie des transcrits ne peut se faire que si l'on est capable de les détecter, par nature un silencing très efficace est inanalysable puisque les transcrits sont trop peu abondants pour être mesurés précisément.
- ii) les études au niveau de l'ARN reposent sur l'extraction d'ARN au niveau d'un grand nombre de cellules, typiquement de l'ordre de plusieurs millions, et donc ne sont interprétables que si le système a un comportement homogène à tous les niveaux et à commencer par celui de la transfection des siARN.

Les principaux résultats obtenus par Carole Ribet ont été que la cinétique de coupure est assez lente avec une demi-vie du messager ciblé de l'ordre de 10 minutes pour le

siARN étudié le plus performant (siGloE1). De plus, cette cinétique de coupure évolue de manière importante au cours du temps : pour siGloE1, $t_{1/2} = 60$ min à 16 h après transfection des siARN, et $t_{1/2} = 10$ min à 24 h. Compte tenu des caractéristiques de la coupure par le complexe RISC mesurées *in vitro*, l'interprétation de ces résultats est que la cinétique est fortement dépendante du nombre des complexes RISC actifs, lequel évolue au cours du temps après la transfection des siARN.

Un résultat inattendu de ces études est que la très grande majorité des ARN β -globine était effectivement dégradée par les siARN, puisque seulement ~ 3 % des ARN messagers échappaient au silencing. Si les études avaient été faites sur des ARN totaux (cytoplasmiques et nucléaires), cette valeur était nettement inférieure à celle mesurée pour les ARN messagers matures présents dans la fraction nucléaire (de 5 à 10 %). Cette observation suggérerait donc que les ARN messagers matures présents dans le noyau étaient aussi dégradés par le complexe RISC (ou un variant nucléaire du complexe RISC). Incidemment, cette étude montrait aussi que la transfection des petits ARN était efficace puisqu'au maximum 3 % des cellules étaient non transfectées.

4.2 Etude de l'activité de coupure par RISC dans le noyau

Pour étudier directement l'activité du complexe RISC sur les ARN nucléaires, Carole Ribet a entrepris une étude de même type en mesurant des demi-vies de transcrit après arrêt de la transcription par la tétracycline sur la fraction nucléaire. Par rapport à l'étude précédente, les difficultés techniques sont évidemment plus grandes puisque l'interprétation des données dépend de la qualité du fractionnement biochimique et que les signaux dans la fraction nucléaire sont au moins dix fois plus faibles que dans la fraction cytoplasmique. Pour suivre la maturation des transcrits dans le noyau, le gène de la lymphotoxine- α ($LT\alpha$) constitue un modèle de choix du fait d'un épissage lent et d'une accumulation importante des espèces matures (Audibert et al, 2002; Weil et al, 2000; Weil et al, 1990). C'est donc tout d'abord sur les transcrits $LT\alpha$ que Carole Ribet a étudié l'activité de coupure de RISC. Dans ce cas les mesures

Introduction

d'abondance des transcrits sont effectuées par la protection à la RNase qui permet de distinguer entre les différents transcrits et qui est plus quantitative qu'une approche par Northern blot, les ARN cyclophiline étant utilisés comme témoin de charge à l'intérieur du même échantillon. Comme illustré Figure 10A, on peut observer que si l'abondance des transcrits mature « complètement épissés » diminue de - 40 %, celle des précurseurs augmente dans les mêmes proportions (+ 40 %). Ces observations indiquaient que d'une part le complexe RISC ou un complexe apparenté était capable de diminuer l'abondance des transcrits nucléaires mais que d'autre part l'expression des précurseurs augmentait.

Une limitation du modèle $LT\alpha$ est qu'il n'a pas été possible d'identifier des siARN capables d'induire un silencing très fort, ceci reflète probablement la composition riche en G/C de ce transcrit. De plus, la maturation des transcrits $LT\alpha$ comprend aussi une rétention d'intron : l'ARN contenant encore l'intron 3 étant exporté dans le cytoplasme, ce qui peut rendre l'analyse plus difficile. Carole Ribet a aussi analysé le comportement des transcrits nucléaires β -globine en présence d'un siARN (Figure 10B). Dans ce cas aussi on observe une diminution de l'accumulation des transcrits matures et une augmentation des précurseurs.

Introduction

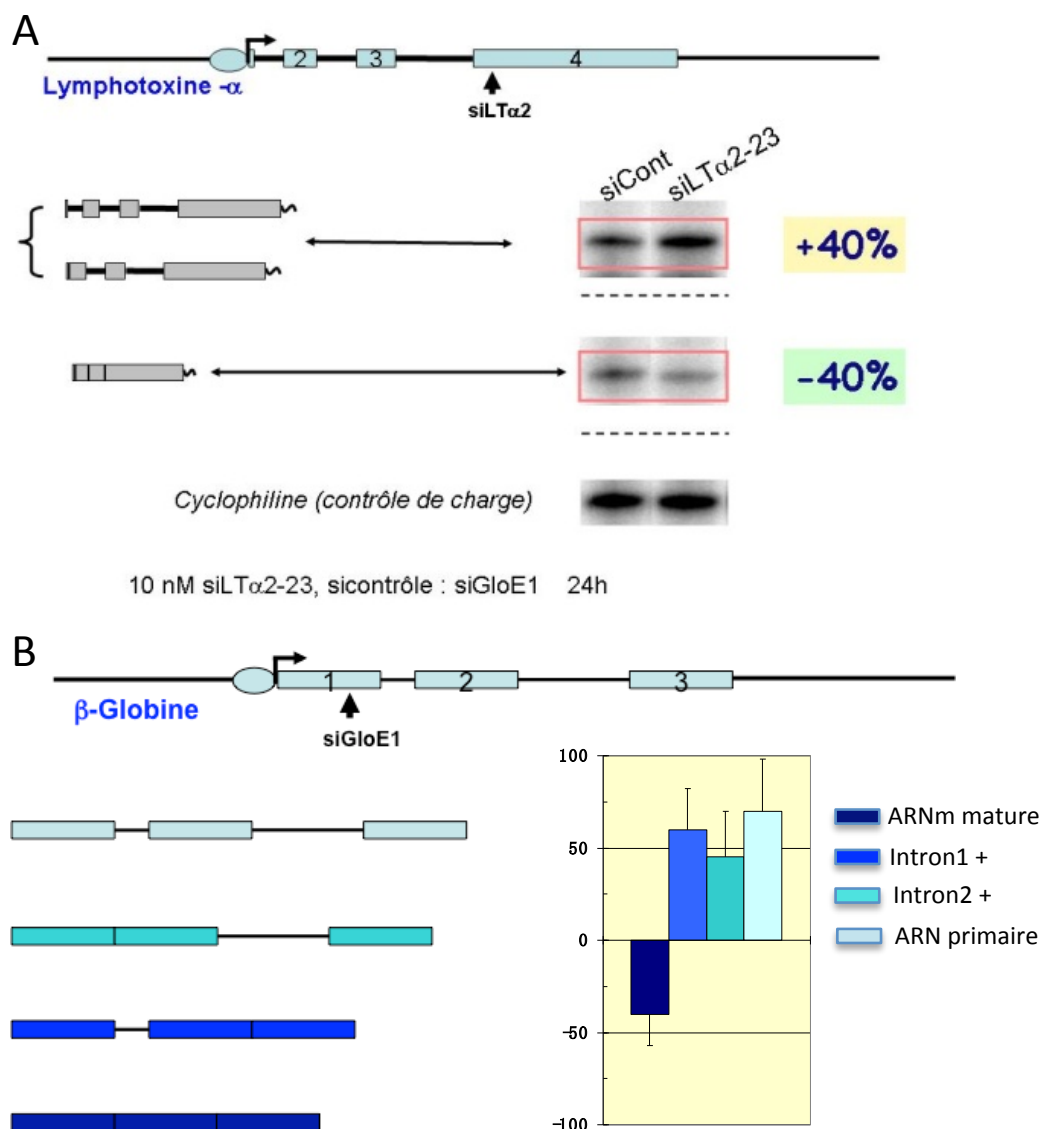


Figure 10 : Analyse de la coupure des transcrits nucléaires par RISC en utilisant la méthode protection à la RNase.

(A) Cas des transcrits lymphotoxine- α . Dans le cytoplasme, le siLT α 2-23 induit un silencing de l'ARNm mature de lymphotoxine- α d'environ 40%, mais augmente l'abondance des transcrits précurseurs (40% dans le noyau). (B) Cas des transcrits β -globine. Dans le noyau, le siGloE1 ciblant l'intron1 augmente les signaux des précurseurs de β -globine autour de 50% pour chacun, en accompagnant un silencing de l'ARNm mature de 40% dans le cytoplasme.

A priori il y avait deux interprétations possibles de ces résultats : i) le fait de cibler un transcrit avec un petit ARN pourrait avoir un impact du ralentissement sur l'épissage et ainsi augmenter l'abondance des précurseurs, ii) le fait de cibler un transcrit par un petit ARN pourrait agir sur la transcription du gène cible.

Pour distinguer entre ces deux modèles il faut soit pouvoir mesurer la vitesse

Introduction

d'épissage soit le taux de transcription. Ni l'une ni l'autre de ces deux approches n'ont permis de conclure. Une vraie mesure de la vitesse d'épissage nécessiterait des mesures cinétiques sur l'ensemble de la maturation des transcrits qui ne peuvent être envisagées sur les signaux plus faibles observés en présence d'un petit ARN. A défaut, Carole Ribet a mesuré la demi-vie de précurseurs après arrêt de la transcription. En effet, il avait été montré que pour la lymphotoxine- α , il existait peu de dégradation des transcrits nucléaires et donc que, dans des conditions d'arrêt de la transcription, les précurseurs disparaissent par épissage (Audibert et al, 2002; Weil et al, 2000; Weil et al, 1990). Dans ces expériences aucun changement de la vitesse d'épissage n'a été observé mais cette mesure est critiquable puisque après arrêt de la transcription, l'épissage est beaucoup plus lent. Quant à une mesure de la transcription, une mesure de la densité de Polymérase II effectuée par immunoprécipitation de la chromatine a donné des résultats ambigus : une augmentation d'environ 40% non statistiquement significative dans le cas de la β -globine.

En conclusion, ces observations suggéraient la possibilité que le ciblage d'un transcrit puisse conduire à une augmentation de la transcription du gène correspondant. Si les données disponibles chez de nombreux organismes montrent que les petits ARN peuvent induire un silencing transcriptionnel, l'idée qu'il puisse y avoir une induction apparaissait à l'époque complètement inattendue et peu crédible. Il était donc indispensable de développer une approche qui puisse mettre en évidence de manière plus directe un effet transcriptionnel des petits ARN. Dans ce but, le laboratoire a entrepris la construction de vecteurs d'expression reposant sur un promoteur bidirectionnel pour contrôler l'expression de deux protéines fluorescentes, le messenger de l'une pouvant servir de cible pour un ARN interférant, tandis que l'autre serait utilisé comme indicateur de l'activité du promoteur.

MATERIELS ET MÉTHODES

1^{ère} Partie: Cellules

1.1 Les lignées cellulaires

La lignée cellulaire HEK293 est une lignée obtenue à partir de cellules de rein embryonnaire humain au début des années 1970. La lignée HEK293 est fréquemment utilisée comme système modèle de cellules en culture du fait de sa croissance rapide et de sa très grande efficacité de transfection. Qui plus est, ces cellules sont efficacement transfectables par presque toutes les techniques existantes et en particulier le phosphate de calcium et la lipofectamine. La lignée HEK293 Tet-On est une lignée dérivée de HEK293 qui est commercialisée par Clontech ©. Il s'agit d'un transfectant stable pour le gène rtTA, obtenue par sélection avec la généticine (G418). rtTA est une molécule de fusion entre une version mutée du répresseur de la tétracycline et le domaine transactivateur de VP16. Contrairement au répresseur sauvage, la fixation du répresseur muté sur son site au niveau de l'ADN dépend de la présence de tétracycline. Aussi l'addition de tétracycline (ou de préférence de doxycycline) dans le milieu de culture entraîne la fixation du transactivateur sur ses séquences cibles, induisant l'activité des séquences promotrices correspondantes. En pratique, l'induction est progressive au cours du temps et en fonction de la dose de doxycycline. La dose que nous utilisons (1 µg/mL) assure une réponse maximale avec une activité importante du promoteur après 24 h d'induction. Une limitation des cellules HEK293 est leur faible adhérence au plastique, ce qui fait que pour les transfecter, on est obligé d'attendre 48 h après leur ensemencement. Par contre, cette faible adhérence est un avantage pour l'analyse en cytométrie puisqu'il est relativement facile d'obtenir une suspension cellulaire en complexant le calcium.

Les cellules HeLa Tet-On ont été dérivées de la même manière par transfection de rtTA dans la lignée HeLa. Par rapport aux cellules HEK293, l'efficacité de transfection est un peu plus faible, mais leur adhérence au plastique est plus forte (on peut les transfecter 24 h après leur ensemencement).

1.2 Culture cellulaire

Toutes les lignées sont cultivées dans une étuve humidifiée à 37°C et à 5% de CO₂. Pour le maintien de la culture, les cellules sont divisées lorsqu'elles atteignent la confluence par dissociation avec une solution de trypsine-EDTA et réensemencées à des dilutions variant de 1/6 à 1/20 en fonction de la durée prévue de la culture. Les cellules HEK293 Tet-On et HeLa Tet-On sont cultivées dans du DMEM (avec 4,5g/L glucose et sans pyruvate, Gibco BRL[®]) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine.

1.3 Transfections

1.3.1 Principe de la transfection au phosphate de calcium

La transfection par le phosphate de calcium a été mis au point par S. Bachetti et F.L. Graham en 1977. Une solution saline tamponnée par l'HEPES (HEPES-buffered saline solution – HeBS) doublement concentrée et contenant des ions phosphate est combinée avec une solution de chlorure de calcium contenant les acides nucléiques à transférer (petits ARN et/ou plasmide). Lorsque ces deux solutions sont combinées, il se forme un fin précipité de phosphate de calcium, dans lequel sont intégrés les acides nucléiques présents dans la solution. La suspension contenant le précipité est alors ajoutée aux cellules à transférer (habituellement une culture cellulaire monocouche). Par un procédé non entièrement compris, les cellules incorporent le précipité contenant l'ADN ou le petit ARN (les ions Ca²⁺ masquent la polarité négative de l'ADN lui permettant d'entrer dans le cytoplasme de la cellule). Dans les cellules HeLa, et encore plus dans les cellules HEK293, la technique au phosphate de calcium est très efficace et permet d'obtenir l'expression du gène d'intérêt dans pratiquement toutes les cellules. De plus, la co-transfection (de deux ou trois plasmides, ou d'un plasmide et d'un petit ARN) est très efficace.

1.3.2 Protocoles de transfection au phosphate de calcium

Pour les transfections au phosphate de calcium, les cellules sontensemencées la veille

Matériels et Méthodes

à 5×10^5 /boîte de 85 mm de Φ , ou bien 1×10^5 /puits de plaque de 12 puits, ou bien 5×10^4 /puits de plaque de 24 puits. Au minimum deux heures avant la transfection, le milieu est renouvelé.

Pour les boîtes de 85mm de Φ , les siARN et les plasmides sont dilués dans une solution de Tris 1 mM pH 7,8 et d'EDTA 0,1 mM dans un volume final de 220 μ L (50 μ L pour chaque puits des plaques de 12 puits, 25 μ L pour chaque puits des plaques de 24 puits). Puis sont ajoutés 30 μ L de CaCl_2 2M (6 μ L pour chaque puits des plaques de 12 puits ; 3 μ L pour chaque puits des plaques de 24 puits) et la solution est mélangée au vortex. Puis il est ajouté doucement un volume égal de HBS 2 x et la précipitation est déclenchée en initiant le mélange de deux solutions en faisant par deux fois des bulles au fond du tube avec une micropipette. Après 20 min à température ambiante, le précipité est ajouté sur les cellules (500 μ L pour une boîte de 85, 100 μ L pour un puits d'une plaque de 12). Pour les analyses à 24 heure (h) ou plus après la transfection, le milieu est renouvelé 16 heures après l'ajout du précipité.

Solution utilisée pour la transfection :

HBS 2x (le pH est ajusté à 7,05 avec une solution de NaOH)

HEPES	50 mM
NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na_2HPO_4	1,5 mM

1.3.3 Transfection par la Lipofectamine 2000

Les transfusions à la lipofectamine (Invitrogen©) ont été faites dans des boîtes de 35 mmensemencées avec 10^5 cellules la veille (pour les cellules HeLa) et 48h avant la transfection pour les cellules HEK293. Le jour de la transfection, les siARN sont dilués dans 50 μ L de Opti-MEM I sans ajouter de sérum, mélangé et 1 μ L de lipofectamine 2000 puis sont mélangés avec 50 μ L de Opti-MEM I. Après cinq minutes sous la hôte, les deux solutions sont mélangées doucement. 20 min après, les 100 μ L de mélange sont ajoutés dans la boîte. Les milieux de culture peuvent être

changés au-delà de 6 heures post-transfection.

1.4 Détection des protéines fluorescentes par cytométrie en flux

Les constructions indicatrices utilisées permettent l'expression de l'EGFP et de la DsRed. La cytométrie en flux permet une mesure quantitative de l'expression de ces protéines au niveau de chaque cellule. De plus comme il s'agit de protéines ayant des fluorescences intrinsèques, il n'est pas nécessaire de perméabiliser ou de fixer les cellules. Pour disposer d'un nombre suffisant de données exploitables, la lecture est faite sur 50 000 à 100 000 cellules, d'où le choix d'utiliser des plaques 12 puits dans lesquelles 10^5 cellules sontensemencées.

1.4.1 Préparation des échantillons

Pour les cellules HEK293 Tet-On

Pour les plaques 12 puits : le milieu est aspiré puis on ajoute par puits 200 μ L de PBS 1X contenant 15% de tampon de dissociation cellulaire (GIBCO). Il s'agit d'un milieu tamponné sans Ca^{++} et contenant une quantité non spécifiée d'EDTA. Les cellules sont alors dissociées en pipetant vigoureusement la solution avec une pipette P1000, puis transférées dans un tube sur la glace (tube polystyrène 5 mL pour analyse avec les cytomètres Becton Dickinson ou format libre pour le cytomètre Accuri, par exemple tube Eppendorf de 1.5 mL). Les échantillons peuvent être gardés dans la glace et à l'abri de la lumière pendant quelques heures sans que les résultats soient affectés.

1.4.2 Protocole d'analyse utilisé

1.4.2.1 Analyse en deux couleurs : EGFP et DsRed

Acquisition : Pour analyser l'expression de l'EGFP et de la DsRed à partir des constructions indicatrices, nous avons utilisé l'excitation par le premier laser (488 nm) et les deux premiers détecteurs de fluorescence (FL1 : 533 ± 15 nm et FL2 : 585 ± 20 nm). Cette combinaison est bien adaptée à la détection de l'EGFP (excitation max : 488 nm, émission max : 509 nm) et un peu moins bien à celle de la DsRed express (excitation max : 557 nm, émission max : 579 nm) puisque l'excitation à 488 nm est

Matériels et Méthodes

environ 50 % de l'excitation maximale. La lecture est faite sans compensation pour les passages d'une fluorescence sur l'autre (la compensation sera faite à posteriori au cours de l'analyse des données afin de vérifier que les conclusions ne dépendent pas fortement de la valeur utilisée pour la compensation). Pour chaque échantillon, nous avons analysé au minimum 5×10^4 cellules avec un seuil sur la diffusion vers l'avant afin d'éliminer les débris les plus petits dès l'acquisition. Une difficulté est que les cytomètres « classiques » (par exemple BD FACScan ou FACS calibur), ne peuvent analyser que sur une gamme de quatre ordres de grandeur, ce qui compte tenu de la saturation des détecteurs observée aux signaux les plus forts se réduit à 3.5 décades exploitables. Or la gamme de signaux que nous observons entre les cellules non transfectées (autofluorescence) et les plus forts expresseurs après induction par la doxycycline est proche de 5 décades. Aussi sur les cytomètres BD, nous avons procédé à deux lectures avec des réglages différents de sensibilité afin de couvrir l'ensemble des niveaux d'expression (lecture « haute » et « basse » sensibilité). Le cytomètre Accuri permet une quantification des signaux sur 7 décades, par contre il n'est pas prévu de changer la sensibilité des détecteurs. Cette configuration fixe a l'avantage de rendre l'utilisation immédiate mais s'est avérée limitante dans notre cas puisque les signaux les plus forts dépassaient la sensibilité de l'appareil. Aussi avons-nous dû utiliser des filtres neutres pour atténuer les signaux de 10 ou 100 fois selon les cas.

Analyse : Pour les données acquises sur les cytomètres BD nous avons utilisé le logiciel Weasel (Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne). Pour celles acquises sur l'Accuri nous avons utilisé le logiciel intégré (CFlow plus) qui permet de traiter les données sur une gamme de sept ordres de grandeur. Dans les deux cas, l'analyse est menée de la même manière avec tout d'abord une sélection sur la diffusion qui permet d'éliminer les cellules mortes, les débris ou les agrégats. En général au moins 80% des événements sont retenus et les valeurs finales ne varient pas fortement en fonction du choix de la sélection sur le profil de diffusion. Dans l'analyse de base nous avons retenu deux types de données pour définir l'expression moyenne : 1) la valeur moyenne globale de la fluorescence dans les canaux FL1 et FL2 obtenue sur la lecture

Matériels et Méthodes

à basse sensibilité, 2) ou les valeurs moyennes obtenues en utilisant un seuil pour la fluorescence de la DsRed ($FL2 > 0$). En effet, la quantification des signaux est faite de manière discrète sur 256 niveaux et le premier est défini comme étant 0. Comme ces cellules représentent une part importante de la population, leur inclusion dans l'analyse est peu informative et l'introduction d'un seuil permet de ne pas en tenir compte. En fonction du contexte, d'autres analyses ont été effectuées avec des sélections sur des sous-populations et le calcul des valeurs moyennes ou du nombre de cellules correspondant.

Compensation

Le réglage de la compensation a été défini en utilisant des cellules transfectées uniquement avec le vecteur CMV-EGFP ou CMV-DsRed afin de mesurer le passage d'une fluorescence dans l'autre canal. Comme attendu le passage du signal de l'EGFP dans le canal de la DsRed ($\sim 20\%$) est beaucoup plus important que le passage inverse ($\sim 2\%$). Toutefois, du fait du manque de linéarité des détecteurs, il n'est pas possible de compenser correctement les signaux à tous les niveaux d'expression. Cette limitation ne devient gênante que lorsque les signaux sont fortement déséquilibrés, par exemple pour mesurer précisément l'expression résiduelle après silencing. Dans le cas du cytomètre Accuri, une compensation satisfaisante peut être obtenue sur l'ensemble de la gamme (le canal $FL1 = -7.9\%FL2$; le canal $FL2 = -6.6\%FL1$).

1.4.2.2 Analyse en trois couleurs : EGFP, DsRed et marquage par un anticorps couplé APC

A partir d'une boîte de $85\text{mm}\Phi$ transfectée, les cellules sont rincées au PBS, trypsinées et transférées dans un microtube de 1,5 mL. Après une centrifugation à 200 g pendant 5 min à 4°C , le surnageant est aspiré et le culot est lavé dans 500 μL de PBS froid puis recentrifugé. Après aspiration du surnageant, 100 μL de paraformaldéhyde à 4% sont ajoutés au culot et après mélange, l'ensemble est incubé 10 min à 37°C . Les cellules fixées sont rincées une fois au PBS, recentrifugées et remises en suspension dans du méthanol absolu pré-refroidi à -20°C . La

Matériels et Méthodes

perméabilisation est réalisée pendant 4 minutes à -20°C puis les cellules sont centrifugées et reprises dans du PBS contenant 0,5% BSA deux fois de suite. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 700 μL de PBS+0,5% BSA. Avant d'ajouter les anticorps, 100 μL de cellules sont saturées avec le tampon incubation (PBS + 0,5%BSA) pendant 10 minutes à température ambiante. Le premier anticorps est ajouté à une concentration finale de 1/50 à 1/100 et l'incubation est poursuivie pendant une heure à température ambiante. Après un rinçage avec du PBS + 0,5% BSA, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire au 1/250 dans PBS + 0,5% BSA à température ambiante pendant 30 minutes. Les cellules sont rincées une fois avec du PBS + 0,5% BSA puis resuspendues dans 250 μL de PBS. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux en utilisant le canal FL 4 (excitation à 640 nm et détection à 675 ± 12.5 nm) pour détecter la fluorescence des anticorps secondaires marqués l'allophycocyanine (APC) « Remarque : l'allophycocyanine, $E_{x_{\max}} = 650$ nm, $E_{m_{\max}} = 660$ nm n'est pas excitable par le laser à 488 nm ».

2^{ème} Partie: Biologie moléculaire

2.1 siARN

Les siARN sont synthétisés chimiquement par MWG Biotech ou Sigma Aldrich et fournis lyophilisés sous forme double brin. Les siARN sont mis en solution à une concentration finale de 100 μM (solution stock) dans une solution contenant du sel comme le siMAX 1X (MWG / Operon). Pour les transfections on utilise une solution à 10 μM ou moins si nécessaire, afin de pouvoir mesurer la quantité nécessaire de manière précise ; typiquement l'ajout de 1 μL de solution siARN à 10 μM dans le mélange de transfection d'un puits d'une plaque de 12 (2 mL de milieu de culture) donne une concentration finale de 5 nM. La notion de concentration est utilisée ici par simplicité pour définir la quantité de siARN utilisée mais n'a pas de signification réelle puisque dans la plupart des techniques de transfection, les acides nucléiques sont sous forme d'agrégats et non d'une solution homogène.

Matériels et Méthodes

siMax (MWG / Operon)

HEPES (pH 7.3)	30 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	1mM

Tableau 1 : Description des siARN ou miARN :

(A) siARN contre Argonaute

Argonaute				
Gène cible	Nom de siARN ou miARN	Source de Sélection	Nature de la cible	Séquence (de 5' à 3')
Ago1	Ago1A	Labo sisearch	ARNm	GAAUGCCAGCUACAACUUA
Ago1	Ago1B	Li,L ;C.,Okino (2006)	ARNm	GAGAAGAGGUGCUCAAGAA
Ago1	Ago1D	Sigma 1	ARNm	CAACCUUGUUUCUGCAAU
Ago2	Ago2A	Labo sisearch	ARNm	CGAAGUGCAAGUUUCAACA
Ago2	Ago2B	Li,L ;C.,Okino (2006)	ARNm	GCACGGAAGUCCAUCUGAA
Ago2	Ago2C	Aleman RNA 13, 385 (2007)	ARNm	GCAGGACAAAGAUGUAUUA
Ago2	Ago2D	Sigma1	ARNm	CUAUCAUUAUGAAUUGGAU
Ago3	Ago3A	Li,L ;C.,Okino (2006)	ARNm	GAAAUUAGCAGAUUGGUA
Ago3	Ago3B4	Labo sisearch	ARNm	CGAUGUAUCAAGAAGCUAA
Ago3	Ago3SC	Santa Cruz biotechnology	ARNm	Mélange des trois séquences
Ago3	Ago3D	Sigma1	ARNm	CACACUUACGUACGUGUA
Ago4	Ago4A	Li,L ;C.,Okino (2006)	ARNm	GGCCAGAACUAAUAGCAAU
Ago4	Ago4B	Labo sisearch	ARNm	GGAUGUACAGUAGCUCAA
Ago4	Ago4D	Sigma1	ARNm	GGAUGUACAGUAGCUCAA

(B) siARN ou miARN contre β -globine

β -globine			
Nom de siARN ou miARN	Source de Sélection	Nature de la cible	Séquence (de 5' à 3')
GloE1	Labo	messenger exon1	GGUGAAUGUGGAAGAAGUU
GloE1B	Labo sisearch, specificity server	messenger exon 1	GCAAGGTGAATGTGGAAGA
GloE1mA	Labo specificity server	messenger exon 1	GAACUCUGUGGAAGAAGUU
GloE1mB	Labo specificity server	messenger exon 1	GGUUCUUGAGGAAGAAGUU
GloE2	Labo	messenger exon2	GGCUCAUGGCAAGAAGGUG
GloE2mA	Labo specificity server	messenger exon2	GGUAGUUCGCAAGAAGGUG
GloE1s	Labo	messenger exon1	GGUGAAUGUGGAAGAAGUU
GloE1asbiotin	Labo	messenger exon1	AACUUCUCCACAUUCACC
GloE1mAasbio	Labo	messenger exon1	AACUUCUCCACAGAGUUC
GloE1mAas	Labo	messenger exon1	AACUUCUCCACAGAGUUC
GloE1mAs	Labo	messenger exon1	GAACUCUGUGGAAGAAGUU
GloE1mAsmi	Labo	messenger exon1	GAACUCUGUGGAACUAGUA
gloE1mCas	Labo	messenger exon1	AACACGAUCCACAUUCACC

Matériels et Méthodes

(C) siARN contre TNRC6/GW182

TNRC6			
Nom de siARN	Source de sélection	Nature de la Cible	Séquence (de 5' à 3')
TNRC6A1	Labo sisearch, specificity server	messenger	CACUGUAAGUUCUUCauc
TNRC6A2	Dominique Weil GW182	messenger	GCCUAAAUUUGGUGAUUA
TNRC6B1	Labo sisearch, specificity server	messenger	AGGAAGUAGUCAGUCAU
TNRC6B2	Labo sisearch, specificity server	messenger	GUCAUGGUUUUGUUGGAAA
TNRC6C1	Labo sisearch, specificity server	messenger	CCAAGACAACAAUGUGAGU
TNRC6C2	Labo sisearch, specificity server	messenger	CCAACACCUUUGCUCCUUA

(D) siARN contrôle ou miARN

siContrôle				
Nom de siARN ou miARN	Espèce	Source de sélection	Nature de la cible	Séquence (de 5' à 3')
Ly1 (LTa2)	souris	Ambion	Exon4	GGUGUUUUCUCUGGAGAA
Ly2	souris	Ambion	Exon4	GGUUUUUGUGGUCUAGG
LTI3	souris	Labo	Intron3	CCAUCCACUUGUCCAGUGUU
CD9	souris	Labo sisearch, specificity	messenger	UUCUCUUGCUGAAGAUGC
miARN				
CXCR4	homme	Labo sisearch, specificity	CXCR4	UGUUAGCUGGAGUGAAAAC
siLet-7a	homme	Labo sisearch, specificity	Let-7	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAG
siLet-7b	homme	Labo sisearch, specificity	Let-7	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGG

Remarque : Pour les siARN qui ont été choisis dans le laboratoire, les logiciels utilisés sont indiqués ; pour ceux qui avaient été décrits dans la littérature, les auteurs sont indiqués.

2.2 Vecteurs et sondes

2.2.1 Construction indicatrice pBiFluo et dérivés

Le vecteur pBiFluo a été dérivé du vecteur pBiFluo-Glo (Figure 11A) initialement construit par Maria-Antonietta Buccheri. Celui-ci avait été obtenu par intégration dans un plasmide contenant un promoteur bidirectionnel régulé par la tétracycline (pBI, Clontech), les séquences de la DsRed Express (Clontech) et d'un gène de fusion entre l'EGFP et la β -globine de lapin (contenant les deux introns). La digestion du plasmide pBiFluo-Glo par BglII permet d'exciser la région β -globine et ainsi après re-ligation d'obtenir pBiFluo (Figure 11B). L'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) diffère de la protéine initiale de la méduse (*Aequorea victoria*) par deux mutations (F64L et S65T) qui améliorent son repliement et augmente le rendement de fluorescence tout en déplaçant le spectre d'excitation (Ex_{max} de 395 à 488 nm) vers des valeurs proches de celles des instruments habituellement utilisés. La DsRed est

Matériels et Méthodes

une protéine tétramérique issue d'un corail (*Discosoma*) capable de fluorescer dans le rouge. Comme la GFP sauvage, la DsRed a des problèmes de repliement qui peuvent être en partie contournés par l'introduction de mutations. La DsRed express est un variant qui a une maturation plus rapide dans les cellules de mammifère, néanmoins son expression sous une forme fonctionnelle est plus lente que celle de la GFP.

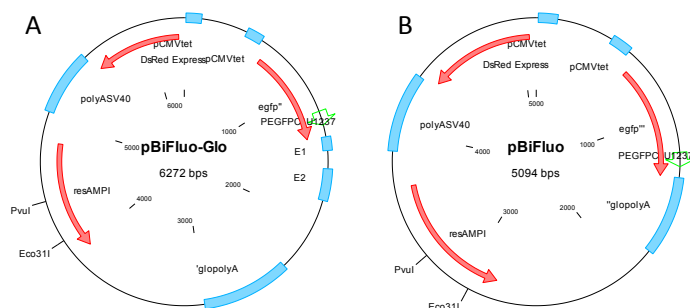


Figure 11 : Carte des plasmides, (A) pBiFluo-Glo ; (B) pBiFluo. Les sites de restriction pour la linéarisation PvuI et Eco31I utilisés dans la partie de résultats sont affichés.

Afin de pouvoir insérer de nouvelles séquences dans le

plasmide pBiFluo, un linker ayant deux extrémités BglII a été introduit dans le site BglII de pBiFluo (situé dans la région 3' non traduite de la GFP) (figure 12A).

La séquence du linker est la suivante :

5' -GATCTTAGCTAGCCAGACTGTACCCATCCCAAACGACCCTTAAGGCAGCGGGCCCCACGC
GTTAAGGATCGGATCAAAAATAGGGGGTGT-3'

Le site ApaI est indiqué.

Le linker contient un codon stop (TAG pour l'insertion sens et TAA pour l'insertion antisens) en phase avec l'EGFP, chaque codon stop est en amont des sites de restriction (AflII et ApaI) qui servent pour l'intégration des sites d'hybridation, les sites d'hybridation seront donc placés en aval du codon stop quelque soit l'insertion du Linker, sens ou antisens.

2.2.1.1 Constructions pBiFluo-BoxBxn

Pour effectuer les expériences d'ancrage, nous avons inséré un site de restriction XhoI dans le site ApaI de la région linker (site indiqué dans la figure 12A), la séquence du linker XhoI est la suivante :

GACTCGAGTCGGCC

Le site XhoI est souligné.

Matériels et Méthodes

La méthode utilisée pour introduire les sites BoxB est celle décrite par Kulozik et collaborateurs (Gehring et al, 2008), elle permet d'introduire de manière répétitive des blocs de deux séquences BoxB. L'oligo qui contient la séquence des deux sites est en effet bordé par les sites Sall et XhoI qui peuvent être clonés dans le site XhoI initial. Seul le site XhoI/XhoI peut être de nouveau digéré ce qui permet de s'assurer de l'orientation et aussi de procéder à une nouvelle insertion. La séquence de l'oligo est indiquée dans la figure 11B. Pour éviter d'avoir à synthétiser un fragment trop long, un oligo sens et un oligo antisens qui se recouvrent partiellement ont été synthétisés par MWG et les séquences simple brin ont été remplies avec la Taq DNA polymérase (Invitrogen référence : 10342-053). Le mélange de PCR est composé par 1 μ M de chaque oligo soit BoxBx2 sens soit BoxBx2 antisens ; 0,2 mM de dNTP mix ; 1,5 mM de MgCl₂ ; 1,5 unité de Taq DNA polymérase dans 50 μ L de tampon 1x. Protocole de PCR : 95°C, 3 minutes ; 95°C, 1 minute, 50°C, 2 minutes, 72°C une heure 30 minutes, 1 cycle. Le produit PCR a été purifié par une méthode utilisant un "kit" de purification de produit "PCR" Minelute (Qiagen référence : 28004) et digéré par Sall et XhoI, puis déposé sur le gel, la bande correspondante est découpée et purifiée par le "kit" de purification du gel "Qiaquick" (Qiagen référence : 28706). Le plasmide pBiFluo-XhoI est digéré par XhoI et purifié de la même façon comme le fragment BoxBx2. Le pBiFluo-BoxBx4 a été construit à partir du pBiFluo-BoxBx2 en insérant un nouveau fragment Sall-XhoI dans la même orientation. Le même protocole a été utilisé pour le pBiFluo-BoxBx6.

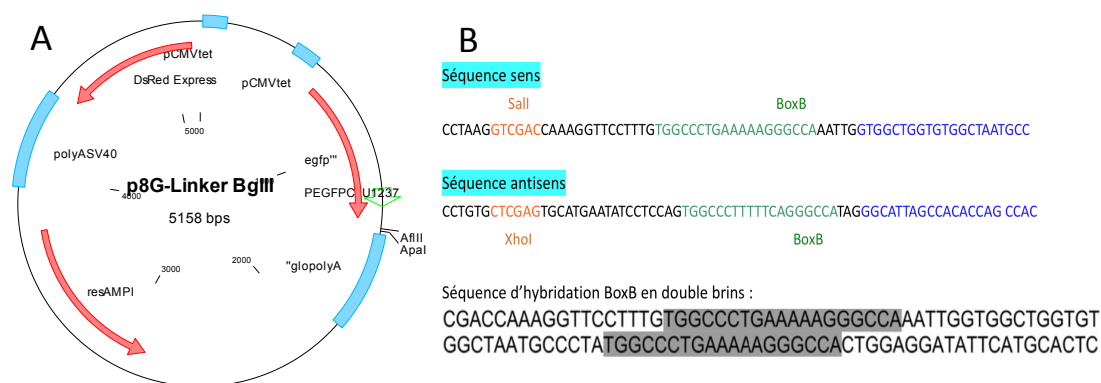


Figure 12: (A). Carte de pBiFluo-Linker (il avait été nommé p8G-Linker BgIII dans le labo). (B). Sites d'insertion des BoxB. Construction générique pour un fragment Sall - XhoI contenant deux sites de fixation BoxB.

Matériels et Méthodes

2.2.1.2 Constructions pBiFluo-3miLet7 ; pBiFluo-2CXCR4

Les constructions dérivées de pBiFluo et contenant des sites de type micro ARN ont été réalisées par Lue Huang dans le laboratoire en utilisant pBiFluo (p8G)-linker BglII. Les sites ont été introduits au moyen d'oligonucléotides insérés dans le linker après digestion par AflIII et ApaI (site marqué dans la figure 12A), ce qui permet de contrôler l'orientation. J'ai surtout utilisé les constructions 2 sites CXCR4 et 3 sites Let-7 pour lesquels les séquences sont indiquées ci-dessous :

3miLet-7 sens :

5' -TTAAGGGACAGCCTATTGAACTACCTCACTCGGAGCACAGCCTATTGAACTACCTCAGGCCTGCACAGCCTATTGAACTACCTCAGGGCC-3'

3miLet-7 anti-sens :

5' -CTGAGGTAGTTCAATAGGCTGTGCAGGCCTGAGGTAGTTCAATAGGCTGTGCTCCGAGTGAGGTAGTTCAATAGGCTGTCCC-3'

2CXCR4 sens :

5' -TTAAGAAGTTTTACAAAAGCTAACACCGGAAGTTTTACAAAAGCTAACACCGGGGGCC-3'

2CXCR4 anti-sens :

5' -CCCGGTGTTAGCTTTGTGAAAACCTCCGGTGTAGCTTTGTGAAAACCTC-3'

2.2.2 Plasmides pCIneo-λN-HA TNRC6A, B, et C et dérivés

Les plasmides pCIneo-λN-HA TNRC6A, B, et C ont été fournis par E. Izaurralde (Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen) (Lazzaretti et al, 2009). Ces vecteurs contiennent un promoteur CMV, une double étiquette λN-HA, puis les régions codantes de TNRC6A, B, C. Une cartographie du plasmide pCIneo-λN-HA TNRC6C a toutefois montré que la région codante de TNRC6C n'était pas complète. Pour créer des délétions dans la région codante de TNRC6B, j'ai utilisé le kit « Phusion Site-directed Mutagenesis » de Finnzyme. Le principe de cette technique est d'utiliser une polymérase ADN « Phusion® Hot Start II DNA polymerase » (Finnzyme Référence : F-541) qui est hautement processive et très fidèle (la procédure est démontrée comme Figure 13). Ainsi, à partir d'un plasmide circulaire, il est possible de synthétiser des fragments jusqu'à 10 kb et en utilisant des amorces phosphorylées de générer un nouveau plasmide après ligation du fragment généré.

Matériels et Méthodes

Dans les conditions de réaction du "kit", l'estimation est que, pour chaque kb de plasmide amplifié, environ 1 à 3% des molécules contiennent une mutation. Donc pour une amplification de 10 kb, environ une molécule sur sept serait mutée. Du fait que l'on utilise une réaction d'amplification, les molécules produites sont plus abondantes que le plasmide de départ et il n'est donc pas nécessaire de séparer le produit de PCR de la matrice initiale. Les conditions de PCR conseillées sont : dénaturation initiale 98°C 30 sec ; puis 26 cycles avec 10 sec de dénaturation à 98°C, 15 sec d'hybridation à la température de fusion des amorces, élongation à 72°C (20 sec/kb); puis extension finale 10 min. L'utilisation d'amorces phosphorylées, permet d'utiliser la « T4 quick ligase » (New England Biolabs) fournie dans le "kit" pendant 5 minutes à température ambiante avec 5µL de produit PCR et 5µL de tampon "Quick ligation" (NEB). Les 10 µL de produit de ligation sont transformés dans des bactéries DH5α™ « Library Efficiency competent cells » (Invitrogen, Cat. No. 18263-012).

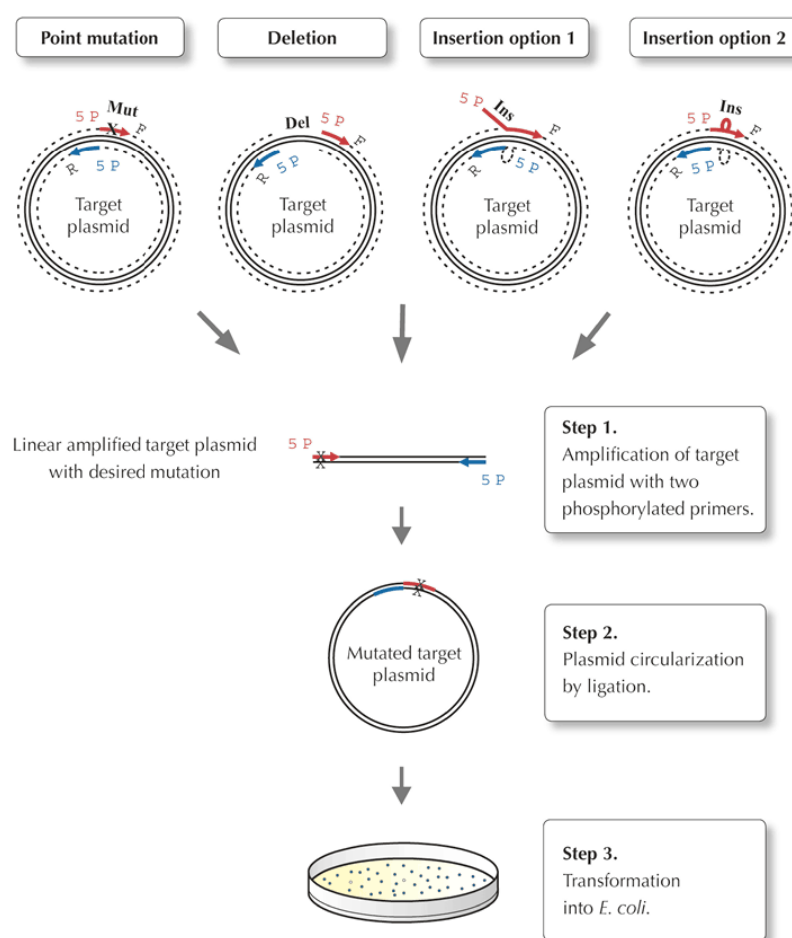


Figure 13 : Délétion ou mutation par le "kit Phusion site-directed mutagenesis"

(Finnzyme réf : F541).

Le plasmide cible est amplifié par PCR avec les amorces de mutagenèse phosphorylées, comme désigné en haut de la figure. En fonction de différents objectifs, les amorces pourraient porter les sites de mutation ; ou amplifier une partie du plasmide donc réaliser une délétion ; ou bien désigner les amorces contenant les sites d'insertion (détaillé dans la section suivante). Le produit PCR est circularisé et transformé pour obtenir les clones.

Matériels et Méthodes

2.2.2.1 Préparation des amorces

Toutes les amorces ont été commandées avec une purification par HPLC. La température de fusion des amorces doit être entre 65°C et 72°C pour être dans la gamme de température optimale pour l'enzyme Phusion® Hot Start II ADN polymérase. La phosphorylation des amorces est faite avec la T4 polynucléotide kinase (Fermentas, référence : EK0031). Pour chaque amorce, 300 pmoles d'oligonucléotide sont diluées dans l'eau distillé, puis on ajoute 5 µL de tampon A de T4 kinase 10X, 5 µL d'ATP 10 mM, 2 µL de T4 polynucléotide kinase et le volume final est ajusté à 50 µL avec de l'eau distillée. La réaction est faite à 37°C pendant 20 minutes, puis l'enzyme est dénaturée à 75°C pendant 10 minutes. Le mélange est extrait une fois au phénol/chloroforme/isoamyl alcool 25:24:1 (pH 8.0) et les amorces précipitées avec 125 µL d'éthanol absolu et 5.8 µL d'acétate de sodium 3M (pH 5.5) et 0,5 µL de glycogène (10 µg/µL) comme entraîneur. On incube au minimum 30 minutes à -20°C avant de centrifuger à 13 500 rpm, 4°C, 20 minutes. Le culot est rincé une fois à l'éthanol 70% et repris dans 45 µL d'eau distillé pour avoir une concentration de 5 µM.

2.2.2.2 Obtention des délétions par PCR

L'amplification est réalisée à partir de 50 pg de matrice en présence de 0,5 µM de chaque amorce sens et anti-sens, 200 µM de chaque dNTP et 1 unité de Phusion® Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µL) dans le tampon Phusion® HF 1x.

Protocole de PCR : on commence par une dénaturation de 30 secondes à 98°C puis 25 cycles de [98°C 30 sec, T_m de l'amorce (65°C-72°C) 15 sec, 72°C (30 secondes/kb)], la réaction est terminée par une incubation à 72°C, 10 minutes.

Toutes les séquences des amorces utilisées et leur T_m sont indiqués dans le tableau 2 (page suivante). Les délétions effectuées sont représentées sur la figure 14 (page 87).

Matériels et Méthodes

Tableau 2 : Amorces de mutagenèse :

Nom de l'amorce (S-sens ; AS-antisens)	Séquence (de 5' à 3') les nucléotides en bleu sont des sites restrictions insérées	Longueur (nt)	Tm°C (cf : http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html)
6B Cter2-S	TTGCTGAGTCAGACTGAAGATAATCC	26	65.83°C
6B Cter2-AS	TTGGCTTAAACTTGGTTTCGTCAC	24	67.08°C
6B Cter3-S	CCAATGACCAGTAAATCGGCATCAG	25	71°C
6B Cter3-AS	GCTTAAACTTGGTTTCGCTCACTTCGG	26	70.03°C
6B DNLS1-S	GCGGCCGCG AAAGAAGCCACTCAGAAGGTCACG	24+9	68.82°C
6B DNLS1-AS	TTCCATTAACCTGTTCTCCCTTTCTTGC	28	69.41°C
6B DCGW1-S	GCGGCCGCG CCTGCTCCTTTACTACCTGGTGACCT	26+9	69.22°C
6B DCGW1-AS	CTGTTTGGTGCTGTATCGGATCAGG	25	71.35°C
6B DMGW1-S	TTCGTCCTAGTTACTGGCTGGTTCTTCAC	29	71.26°C
6B DMGW1-AS	TCTTTCTCTGGTTCTGTAACAACTGCTGC T	30	71.16°C
6B DCGW2-S	GCGGCCGCG GATCTTGCTGGCGCTTCATTGTG	23+9	71.95°C
6B DCGW2-AS	CTGTTTGGTGCTGTATCGGATCAGG	25	71.35°C
6B DCGW3-S	GCGGCCGCG ACGGTGAAGATCCCATAGGATG	24+9	71.64°C
6B DCGW3-AS	CCACAATGAAGCGCCAGCAAGAT	23	71.34°C
6B DRRM-S	GCGGCCGCG GATGATGAAGTCAGCCGCTTTCTGG	25+9	72.6°C
6B DRRM-AS	pareille avec DCGW2-AS	25	71.35°C
6B CGW-S	GTGTGTGTGGGAAACACTACCATCC	26	70.18°C
6B CGW-AS	ATAGATTTGGAATCTGATGCCGATTTACT G	30	69.69°C
6B DQ1-S	TGTTACAGAACCAGAGAAAGATTCGTCC T	29	69.41°C
6B DQ1-AS	GTGCTGTTCCAAACAACCATGAC	25	69.38°C
6B DRRM2-S	GCGGCCGCG GTGTTGGGAAACACTACCATCCTTGC	26+9	71°C
6B DRRM2-AS	CAACTGAACTGGGGAATTTGTGGAA	26	71.23°C
6B Q-rich-S	TCCTTTACTACCTGGTGACCTTCTG	25	65.58°C
6B Q-rich-AS	CGTACAGCTTGAGAAATCTTTCTCTG	26	65.44°C

Les Tm°C des amorces sont calculés par le siteweb de finnyzyme qui est spécifique au "kit Phusion site-directed mutagenesis". Le calcul ne prend pas en compte les nucléotides qui ne sont pas complémentaire avec le plasmide matrice, par exemple les nucléotides qui servent à la digestion de l'enzyme (marqué en bleu dans le tableau 2).

Matériels et Méthodes

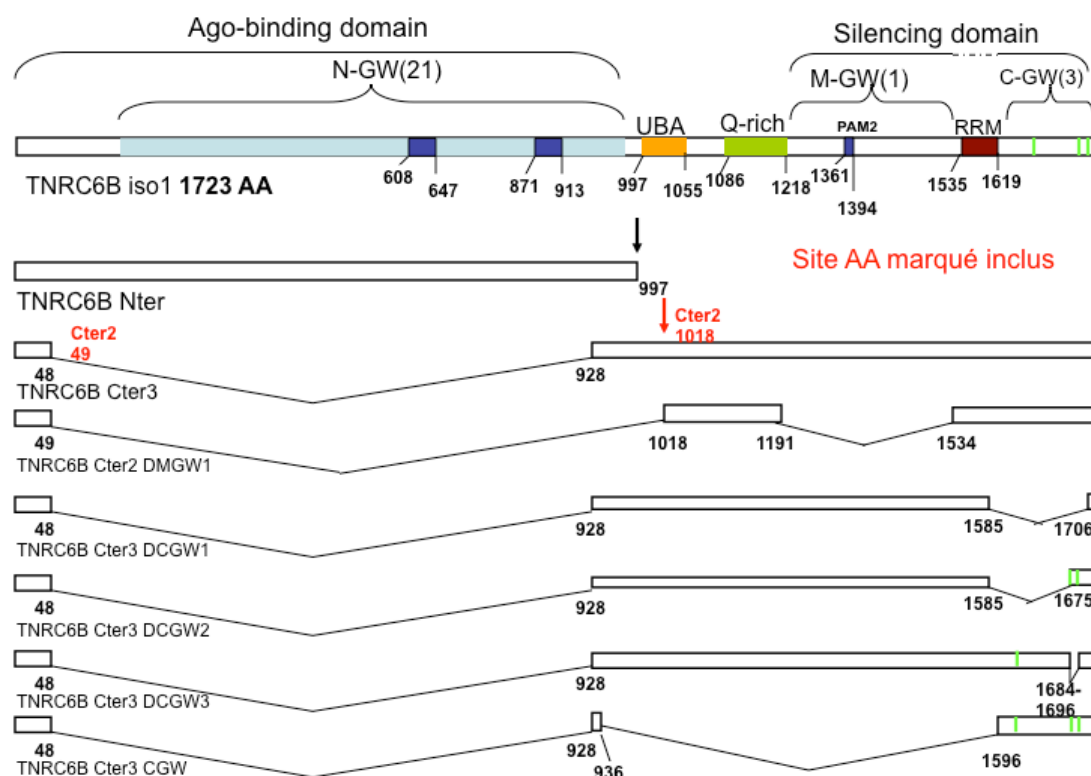


Figure 14 : Carte des délétions des différents domaines de TNRC6B effectuées par l'amorce mutagenèse. La protéine TNRC6B est composée d'un domaine à N-terminal qui sert à l'interaction avec les protéines Ago (Ago-binding domain), un silencing domaine C-terminal qui sert à recruter les protéines comme PABP pour effectuer le silencing, et au milieu une région UBA (orange) et Q-rich (box verte), plus un motif RRM (rouge) au milieu de C-ter. Les motifs conservés sont en bleu (2 dans le N-terminal, 1 dans le C-terminal-PAM2). Les 3 répétitions GW dans la région C-GW sont marquées en vert. Les sites qui représentent les positions d'acides aminés sur la protéine complète sont marqués pour chaque délétion.

2.2.3 Sonde pour Northern Blot

2.2.3.1 sonde pour détecter l'ARNm de la DsRed

La sonde pour détecter l'ARNm de la DsRed a été faite à partir de la matrice pKS-DsRed linéarisée par EcoRI (Figure 15A), Les sondes ARN sont synthétisées avec la RNA polymérase du phage T7 (Fermentas référence : EP0111). Le plasmide pKS-DsRed a été construit par l'insertion du fragment NheI-NotI de pCMVDsRed (Clontech Référence : 632416) dans le site XbaI-NotI de pBluescript KS-.

La sonde mesure 774 nucléotides qui couvrent tout l'ARNm de la DsRed.

Matériels et Méthodes

2.2.3.2 sonde pour détecter l'ARNm de l'EGFP ou le transcrit antisens de la région EGFP

La sonde pour détecter l'ARNm de l'EGFP est synthétisée à partir de la matrice pSK-EGFP linéarisée par NotI (Figure 15B), qui a été transcrite par la RNA polymérase de T7. La sonde mesure 762 nucléotides qui couvrent tout l'ARNm de l'EGFP.

Pour détecter le transcrit antisens de l'EGFP, la sonde est synthétisée à partir du même plasmide mais linéarisé par l'enzyme EcoRI, et transcrite avec la RNA polymérase de T3 (Fermentas référence : EP0101).

2.2.3.3 sonde pour détecter l'ARNm de β -globine et le transcrit antisens de la région β -globine

Pour fabriquer une sonde permettant de détecter l'ARNm de β -globine, nous avons utilisé le plasmide pBt β -glo (recombinant construit par D.Weil et appelé pBt β -glo geno del Hinc2 linéarisé par PVuII (Figure 15C), et transcrite par l'ARN polymérase du phage T7. C'est une sonde qui fait 778 nt en taille.

Pour détecter le transcrit antisens de la région β -globine, le plasmide est linéarisé par MseI, puis transcrite par l'ARN polymérase du phage T3.

2.2.3.4 sonde 28S

Un oligonucléotide de 25 nucléotides complémentaire de l'ARN 28S est utilisé pour contrôler la quantité d'ARN présent dans chaque piste des Northern blots (Barbu & Dautry, 1989).

La séquence est la suivante :

5' -AACGATCAGAGTAGTGGTATTACCC -3'

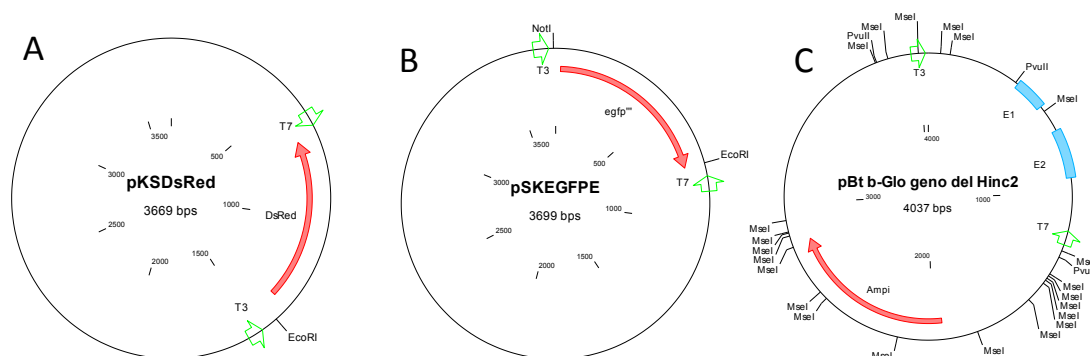


Figure 15 : (A) Carte de la matrice utilisée pour sonder l'ARNm de la DsRed ; (B) Carte de la matrice pour sonder l'ARNm de l'EGFP et le transcrit antisens ; (C) Carte de la matrice pour sonder β -globine.

Matériels et Méthodes

2.3 Extraction d'ARN

2.3.1 Lyse au thiocyanate de guanidine et ultra-centrifugation

Cette technique a l'avantage de fournir des ARN intacts et avec une contamination très faible par l'ADN, ce qui est très utile pour les cellules transfectées. Par contre, la centrifugation sur coussin de césium conduit à la perte des molécules de petite taille et la présence éventuelle de traces de thiocyanate de guanidine peut gêner les réactions enzymatiques ultérieures.

Les cellules d'une boîte de 85 mm de Φ sont lysées avec 2 mL de solution de thiocyanate de guanidine 5,5 M. Ces lysats sont centrifugés sur un coussin de 1,5 mL de chlorure de césium 5,5 M dans un rotor Beckman de type SW55 pendant 16 heures à 40 000 tours/min à 20°C. Le culot est rincé une fois avec 1 mL d'éthanol 70% et repris dans 100 μ L de tampon TE contenant 0,2% SDS. Les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie.

Solution de lyse :

Thiocyanate de guanidine 5,5 M

Citrate de sodium 5 mM (pH7)

2-mercaptoéthanol 100mM

Sarkosyl 0,5%

Coussin de césium

Chlorure de césium 5,7 M

Acétate de sodium 25 mM (pH 5,5)

2.3.2 Utilisation du "kit SV total RNA isolation system" de Promega

Ce "kit" permet d'obtenir des ARN de bonne qualité qui sont de bons substrats pour les réactions enzymatiques, mais *même après traitement par la DNase*, il reste une contamination par l'ADN, de plus la capacité du kit est limitée et permet de traiter des boîtes de 60 mm mais pas de 85 mm de Φ .

Les cellules d'une boîte de 60 mm sont lysées avec 800 μ L de solution dénaturante. 800 μ L d'isopropanol 100% sont ajoutés au lysat et, après agitation, le mélange est placé à -20°C pendant minimum 30 min, puis centrifugé 20 min à 4°C à 13000 rpm.

Matériels et Méthodes

Le surnageant est aspiré et le culot repris et fortement vortexé dans 175 μL de tampon de lyse « SV RNA lysis buffer ». La suite du protocole (cf. Promega©) utilise une purification par affinité sur une colonne de silice. Les ARN sont élués avec 100 μL d'eau et quantifiés par spectrophotométrie.

Solution dénaturante :

Thiocyanate de guanidine 4 M

Citrate de sodium 25 mM, pH7

2- β -mercaptoéthanol 100 mM

Sarkosyl 0,5%

2.3.3 Isolement des petits ARN par un protocole au phénol-chloroforme

Les deux méthodes pour extraire les ARN totaux décrites ci-dessus ont chacune leurs avantages et leurs limites. Dans les deux cas, elles n'ont pas été optimisées pour la purification d'ARN de petite taille. Comme dans le cadre de la recherche de transcrits antisens, nous ne savons pas exactement la taille des ARN attendus, ce biais de la purification pourrait constituer une sérieuse limitation. C'est pourquoi j'ai aussi utilisé une technique qui permet de purifier les ARN de petite taille, cette technique sert de base pour la purification des micro ARN.

Solutions :

1. Denaturing solution
 - 4 M guanidine isothiocyanate (GITC)
 - 0.02 M sodium citrate
 - 0.5% sarcosyl
2. Solution D: Solution D is prepared by adding 0.72 μL of β -ME for every 100 μL of denaturing solution
3. 2 M Sodium acetate (pH 4.0)
4. Chloroform:isoamyl alcohol
5. Isopropanol
6. Phenol (equilibrated to pH 5.3–5.7 with 0.1 M succinic acid)
7. β -Mercaptoethanol (β -ME) (14.4 M)

Matériels et Méthodes

8. Glycogen (2 mg/mL)
9. Diethylpyrocarbonate (DEPC)
10. DEPC-treated water
11. 75% (v/v) ethanol (prepared using DEPC-treated water)
12. Dounce, micro-Dounce, or mechanical microhomogenizer (for tissue samples only)
13. 1× PPBS (for collecting adherent cells only)
14. 1× Trypsin and EDTA solution (for collecting adherent cells only)
 - 0.05% trypsin
 - 0.53 mM EDTA

Pour cette préparation d'ARN, les cellules HEK293 Tet-On sont transfectées dans une boîte de 35 mm de Φ et collectées 48 heures post-transfection. Après avoir aspiré le milieu, les cellules sont rincées avec 2 mL de PBS froid puis reprises dans 1 mL de PBS froid et transférées dans un tube 2 mL. Après centrifugation à 2000 rpm à 4°C, les cellules sont de nouveau reprises dans 1 mL de PBS froid puis le culot est lysé dans 800 μ L de la solution D. On ajoute 80 μ L de sodium acétate 2M (pH4.0) (1/10 de volume) et un volume de phénol équilibré (pH 5.3-5.7) et 1/5 de volume de chloroforme/isoamyl alcool (160 μ L). Les échantillons a été vortexés fortement pour bien mélanger, puis le mélange a été centrifugé à 13,000 rpm 5 minutes, à température ambiante. On reprend la phase aqueuse et on la transfère dans un tube eppendorf 1.5 mL. Un volume d'isopropanol (800 μ L) a été ajouté et mélangé en vortexant. Les échantillons sont laissés à -20°C, au moins 45 minutes, puis centrifugées à 13,000 rpm, 30 minutes, 4°C. Le surnageant est enlevé. Le culot a été rincé 2 fois avec 800 μ L d'éthanol 75%. Au final, le culot a été repris dans 100 μ L de H₂O traitée DNase/RNase. Les ARN sont stockés à -20°C.

2.4 Analyse des ARN

2.4.1 Par Northern blot

Le gel dénaturant utilisé est un gel d'agarose contenant du formaldéhyde avec un tampon phosphate ; du fait de la faible capacité du système tampon utilisé, une circulation du tampon est nécessaire au cours de la migration. Les ARN sont transférés sur une membrane de nylon non chargée dans un tampon de faible force ionique.

Le gel d'agarose 1.2% contient 7% de formaldéhyde dans du tampon de migration. Par échantillon, 4 µg d'ARN totaux sont déposés dans un tampon d'échantillon contenant 50 % de formamide et du tampon de migration. Après migration (1,5 V/cm), les ARN sont fragmentés par incubation du gel dans une solution NaOH/NaCl (2 x 15 min) puis neutralisés dans la solution de transfert (2 x 15 min). On peut colorer les ARN en ajoutant du bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) dans le premier bain de neutralisation. Le transfert est effectué sur une membrane de nylon non chargée (Hybond N, Amersham) en tampon NH₄Ac à 0,15 M pendant 4 à 5 heures. Les ARN sont ensuite fixés sur la membrane par exposition aux UV (dose optimale de 120 mJ/cm²).

Les membranes sont préhybridées pendant 1h au minimum dans du tampon de préhybridation et l'hybridation (entre 12-16 heures) dans 5 à 8 mL de tampon d'hybridation. Pour les sondes ADN, les préhybridations et hybridations sont faites à 42°C ; pour les sondes ARN, elles sont faites à 60°C, sauf pour la sonde *actineNB* pour laquelle la température est de 63°C.

Le lavage de la membrane se fait à 68°C dans une solution de SSPE 1x et SDS 0,1% pour les hybridations avec les sondes ADN et de SSPE 0,5x et SDS 0,1% pour les sondes ARN. Puis les membranes sont autoradiographiées. Les désybridations sont faites dans un litre de tampon TE bouillant contenant 0,1% SDS.

Tampon d'échantillon

Formamide désionisée	50 %
Formaldéhyde	7 %
Tampon de migration	1X final

Matériels et Méthodes

Tampon de migration

Tampon phosphate	20 mM, pH 7
EDTA	0,1 mM

Solution NaOH / NaCl

NaOH	50 mM
NaCl	10 mM

Tampon de transfert 50 x

NH ₄ Ac	7,5 M
--------------------	-------

Tampon de préhybridation

formamide désionisée	50 %
SSPE	5 x
Denhardt's	5 x
ADN de sperme de saumon	100 µg /mL
SDS	0,1 %

Tampon d'hybridation

formamide désionisée	50 %
SSPE	5 x
Denhardt's	1 x
ADN de sperme de saumon	100 µg /mL
SDS	0,1%

2.4.2 Analyse par RT-PCR quantitative

Comme indiqué dans le partie 2.3, on utilise de préférence les ARN extraits par le « kit Promega ». La réverse transcription est effectuée en utilisant la transcriptase inverse RevertAidTM H Minus M-MuLV (Fermentas) selon le protocole suivant :

- 1 µg d'ARN a été repris dans de l'eau distillé pour un volume final de 12 µL
- 1 µL d'amorces hexamériques aléatoires à 0,2 µg/µL sont ajoutées ou, dans le cas d'une reverse transcription, à partir de la queue poly(A) d'amorce dT₁₈ à 0,5 µg/µL (Fermentas).
- Les tubes sont incubés à 65°C pendant 5 minutes puis mis dans la glace 1 minute.
- Dans chaque tube 4µL du tampon 5 x de transcription a été rajouté, 2 µL de dNTP (10 mM), 1 µL de transcriptase inverse (200 U/µL), le mélange est incubé à 42°C, une heure.

Les PCR en temps réel ont été effectuées dans un appareil Light Cycler (Roche) dans un volume final de 10 µL en utilisant le Syber green comme agent intercalant. Les

Matériels et Méthodes

réactifs utilisés sont ceux du « kit Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2X) » (Fermentas). Le « master mix » contient la Maxima® Hot Start *Taq* DNA polymérase, le SYBR® Green I et les dNTPs dans un tampon PCR optimisé. Selon le protocole de Fermentas, on distribue 8 µL/capillaire du mélange commun auquel on ajoute 2 µL de l'ADNc (produit de transcription inverse non dilué) dans le capillaire. Les capillaires sont centrifugés à 1500 tours/min pendant 1 minute.

Le protocole standard de réverse transcription est :

- pré-incubation à 95°C, 4 minutes
- 45 cycles d'amplification : 95°C, 15 sec, 60°C, 20 sec, 72°C, 30 sec.
- Courbe de fusion après le dernier cycle.

L'analyse des données est faite en utilisant la dérivée seconde de la fluorescence pour définir le cycle auquel émerge le signal (cycle du seuil « C_t »).

Mélange de PCR (par capillaire)

Mix 2X	5 µL
Amorce sens ou bien antisens	3 µM (0,3µL à partir des amorces à 10 µM)
H ₂ O qsp	8 µL/capillaire.

2.4.3 Marquage des sondes

2.4.3.1 Marquage par transcription avec les polymérases ARN T7 ou T3

Les sondes ARN sont issues de la transcription *in vitro* de matrices linéarisées avec des activités spécifiques de 250 x 10³ dpm/ng dans les expériences de Northern blot. Les protéines sont ensuite extraites avec un volume de phénol/chloroforme et les sondes précipitées à l'éthanol. L'activité des sondes est mesurée après précipitation au TCA 10%.

2.4.3.2 Marquage du phosphate 5' avec la T4 polynucléotide kinase

100 ng d'oligo sont incubés avec 50 µCi ATP-γP³² (Réf. BLU502H PerkinElmer), 10 unités de T4 PNK dans le tampon 1x. Ce mélange est incubé une heure à 37°C, puis les protéines sont extraites avec un volume de phénol/chloroforme et les oligos sont

précipités à l'éthanol.

Dans le cas d'un Northern blot, 4 µg d'ARN totaux ont été déposés par piste, ce qui représente environ 2 µg d'ARN 28S. Pour obtenir une détection proportionnelle à la quantité d'ARN présent, il est nécessaire d'hybrider le filtre avec un excès de sonde. Pour 10 pistes, soit 20 µg de 28S, si l'on veut obtenir un excès de 10 fois, il faut donc l'équivalent de 200 µg de 28S dans le mélange d'hybridation. Comme l'oligo est 200 fois plus petit que l'ARN 28S, il faut 1 µg dans le mélange d'hybridation. Les 100 ng de sonde marquée sont dilués avec 900 ng d'oligo 28S non marqué pour pouvoir hybrider un ou deux filtres de 10 pistes.

2.5 Chromatin Immunoprecipitation (CHIP)

1 x 10⁶ cellules sontensemencées dans une boîte de 80 mm de Ø 48 heures avant la transfection pour effectuer les expériences de CHIP. A partir d'une boîte, nous pouvons obtenir environ 200 µg de chromatine.

Tampon de lyse : 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, glycérol 10%, 0,5% NP-40, 0,25% Triton X-100, contenant des inhibiteurs de protéase.

Fixation et collecte des cellules

Après l'enlèvement du milieu par l'aspiration, 10 mL de PBS avec 400 µL de formaldéhyde 37% ont été déposés et incubés en agitation 15 minutes. Puis la neutralisation de la formaldéhyde a été faite par l'ajout de 1,41 mL de glycine 1M en incubant 5 minutes en agitant. Les cellules sont grattées et transférées dans un falcon de 15 mL. Le falcon a été centrifugé à 1500 tours/min pendant 3 minutes à 4°C. Reprendre le culot dans 10 mL de PBS froid. L'étape de centrifugation a été répétée une fois, et le culot a été repris dans 10 mL de PBS froid. La centrifugation est répétée une fois. 10 mL de tampon de lyse ont été préparés en ajoutant les inhibiteurs de protéases, sur la glace.

Lyse et sonication

La lyse des cellules est faite dans 500 µL de tampon de lyse avec des inhibiteurs de protéases par pipetage sur la glace. La lyse a été transférée dans un tube Eppendorf et

Matériels et Méthodes

centrifugée à 13 000 tours/min pendant 1 minute à 4°C. Le culot a été repris avec 500 µL de tampon de lyse avec inhibiteurs et transféré dans un falcon de 15 mL. La sonication a été faite par 3 fois 15 sec à la puissance 6. Une centrifugation est faite à 13 000 tours/min pendant 10 minutes. Le surnageant est transféré (environ 600 µL) dans un tube Eppendorf en faisant attention de ne pas prélever du culot. 50 µL de la reste dans le falcon ont été gardés à -20°C, et servent comme de contrôle de la quantité d'ADN.

Lavage :

Les billes sont lavées avec 200 µL de tampon IP froid. Les billes ont été mises en suspension avec la pipette. Le mélange a été incubé 10 min dans la glace, puis homogénéisé dans la glace 20 fois.

Elution :

100 µL de Chelex 10% sont ajoutés, remis en suspension puis pipetés pour remettre en suspension les billes magnétiques, 10 min dans l'eau bouillante.

Les billes ont été compactées 1 min sur le support aimanté.

80 µL de surnageant ont été prélevés puis transférés dans un nouveau tube. Les billes de chelex sont éliminés par centrifugation pendant 1 minute à 13 000 tours/min à température ambiante. 75 µL de surnageant ont été prélevés dans un nouveau tube.

Préparation des ADN contrôle :

L'ADN est précipité à partir des aliquotes de chromatine de 50 µL pendant 30 minutes à -20°C.

Résultats

1^{ère} partie : Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable, α 1A

La construction pBiFluo-Glo décrite dans la précédente section (page 81, figure 11A) a d'abord été utilisée pour obtenir des clones stables dans la lignée cellulaire HeLa Tet-On (Clontech) par Maria-Antonietta Buccheri, une étudiante du laboratoire. Parmi les clones obtenus, seuls certains avaient un faible niveau de base avec une expression inductible par la doxycycline. L'un de ces clones, α 1A, avait de plus une expression stable au cours des passages en culture et a été étudié plus en détail.

1.1 Mesure de l'expression de l'EGFP et de la DsRed

Les constructions pBiFluo (page 81, figure 11B) avaient été construites dans l'idée d'utiliser la cytométrie pour mesurer l'expression des deux protéines indicatrices : l'EGFP et la DsRed. Bien que cette idée soit très simple, elle n'avait été que peu utilisée avant le début de ma thèse. J'ai donc commencé par me familiariser avec l'utilisation de la cytométrie pour cette mesure qui présente des caractéristiques différentes de celles réalisées habituellement, en particulier du fait de la très large gamme d'intensité des signaux, qui excède la dynamique des détecteurs des cytomètres classiques. La cytométrie est réalisée sur des cellules vivantes puisque les protéines exprimées sont fluorescentes et qu'il n'est donc pas nécessaire de perméabiliser les cellules. Il faut noter que les procédures de fixation et de perméabilisation nécessaires aux marquages intracellulaires par des anticorps conduisent à une perte rapide de la fluorescence de l'EGFP et de la DsRed. Cette question sera discutée plus en détail dans le cadre des mesures d'expression lors des études par ancrage. Les expériences ont montré qu'après avoir été décrochées du plastique à l'aide de la trypsine, les cellules pouvaient être conservées dans la glace pendant deux heures sans que la fluorescence soit affectée (la lecture du même échantillon à plusieurs reprises fournit des résultats semblables). Remarque : par rapport aux cellules HEK293 que j'ai utilisées dans la suite, les cellules HeLa sont

Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

plus fortement adhérentes et ne sont pas facilement décollables par séquestration du calcium.

Le principe de la cytométrie en flux est de mesurer la fluorescence de chaque cellule en faisant passer une suspension cellulaire dans un faisceau laser pour exciter les molécules et en mesurant la fluorescence émise en utilisant un jeu de filtres devant des détecteurs de lumière. Classiquement, les cytomètres utilisent des photomultiplicateurs, ce qui permet une mesure quantitative sur une large gamme de signaux. Les données qui sont présentées dans ce manuscrit ont été obtenues avec trois types d'instruments : i) un cytomètre Becton Dickinson FACScan (pour les premières expériences), ii) un cytomètre Becton Dickinson FACSCalibur (pour la plupart des expériences), iii) un cytomètre Accuri C6 (pour certaines des expériences les plus récentes). Ce dernier instrument a des caractéristiques techniques un peu différentes de celles des autres cytomètres et ce point sera discuté en temps utile. Dans tous les cas, le laser d'excitation émet à 488 nm, ce qui permet d'exciter l'EGFP et la DsRed, mais moins efficacement pour cette dernière, comme on peut le voir sur la Figure 16.

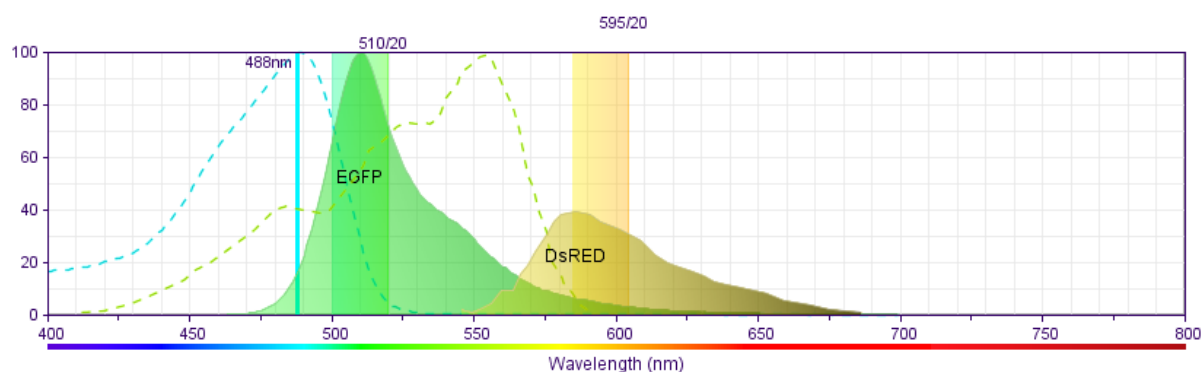


Figure 16 : Spectres d'excitation et d'émission de l'EGFP et de la DsRed.

Les courbes d'excitation sont en pointillé (bleue pour l'EGFP et verte pour la DsRed) tandis que le spectre d'émission est représenté sous forme pleine (vert pour l'EGFP et jaune pour la DsRed). La position de la longueur d'onde d'excitation (488 nm) et des bandes passantes des filtres sont indiquées (filtres BD pour leurs cytomètres FACScan et FACSCalibur).

Les filtres utilisés ont des bandes passantes de 40 nm et sont indiqués sur la figure 16. On peut constater qu'en plus d'une excitation moins efficace la détection de l'émission de la DsRed est aussi moins efficace. Néanmoins, il est possible de

Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

mesurer simultanément la fluorescence de l'EGFP dans le canal 1 (510 nm) et de la DsRed dans le canal 2 (595 nm). Comme sur les instruments classiques (par opposition avec le cytomètre Accuri), il est possible de régler la sensibilité des détecteurs, j'ai choisi un réglage qui amène les signaux EGFP et DsRed à des niveaux comparables. Il reste néanmoins un problème de compensation des signaux du fait que la fluorescence de l'EGFP s'étend jusqu'à la gamme d'émission de la DsRed. Il faut donc soustraire une partie du signal EGFP du signal DsRed. Dans la pratique, cette compensation est définie de manière expérimentale par l'étude de la fluorescence de cellules transfectées par un vecteur qui exprime uniquement l'EGFP ou la DsRed. Avec les réglages que j'utilise, la compensation EGFP > DsRed est de l'ordre de 20 % tandis qu'il existe une petite compensation DsRed > EGFP (de l'ordre de 2 %). Cette compensation est inattendue sur la base des spectres d'émission mais au-delà des limites du matériel (qualité des filtres), elle provient du fait qu'au cours de sa maturation, la DsRed commence par émettre dans le vert. Dans un premier temps, les données présentées sont non compensées afin de permettre une discussion complète des données.

1.2 Caractérisation de l'expression de l'EGFP et de la DsRed dans les cellules $\alpha 1A$

Les données « brutes » d'une analyse par cytométrie sont présentées Figure 17A (page 102) sous forme d'un nuage de points. Dans ce schéma, chaque point représente les données pour une cellule, en fonction de la fluorescence mesurée dans le canal 1 (axe des x, vert) et le canal 2 (axe des y, rouge). En fait, dans ce schéma, seule les cellules intactes et effectivement isolées ont été prises en compte du fait d'une sélection sur les profils de diffusion (voir matériels et méthodes). Dans cette expérience, l'expression de la construction a été induite pendant 48 heures avec 1 $\mu\text{g/mL}$ de doxycycline qui est ajoutée au moment du changement de milieu avant la transfection. Il est important de noter que les axes ont des échelles logarithmiques qui couvrent quatre ordres de grandeurs. En pratique, on peut observer une saturation des signaux lorsqu'ils approchent de 5000 et les réglages ont été choisis pour que les signaux les

Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

plus forts ne dépassent pas cette valeur. Avec ce réglage une partie des cellules sont « collées » sur les axes et l'analyse porte donc sur les cellules qui expriment fortement la construction.

1.3 Analyse de la réponse au siARN siGloE1

Pour étudier la réponse des cellules $\alpha 1A$ aux petits ARN, j'ai mis au point des conditions de culture qui permettent de réaliser des transfections et une analyse en cytométrie sur une série d'échantillons. Pour mener à bien l'analyse en cytométrie, il est utile de disposer d'au moins 100 000 cellules de manière à pouvoir en analyser au moins 50 000, compte tenu des volumes morts et de la sélection sur les cellules intactes. Le protocole retenu comprend un ensemencement de 100 000 cellules dans un puits d'une plaque 24 puits, 24 h plus tard le milieu est changé avec l'addition de 1 $\mu\text{g/mL}$ de doxycycline. La transfection au phosphate de calcium est faite 3 à 4 h après ce changement de milieu et l'analyse en cytométrie 48 h plus tard. Pour indiquer la dose de siARN utilisée, je présente une donnée de concentration (en nM). Il est important de souligner que si cette donnée permet de définir les conditions dans lesquelles l'expérience a été faite, elle ne doit pas être prise comme une indication de la concentration réelle dans les cellules du petit ARN. De fait, il existe plusieurs limitations importantes liées à l'utilisation de cette concentration. Tout d'abord, il s'agit d'une concentration théorique dans le milieu extracellulaire puisque dès lors qu'il y a un agent de transfection, le petit ARN n'est pas en solution dans le milieu mais est sous forme d'agrégats (précipité de phosphate de calcium ; liposomes, complexes avec des molécules chargées ...). Deuxièmement, dans ces expériences on ne contrôle pas la pénétration réelle dans les cellules de ces agrégats ; au mieux on peut observer que lorsqu'on utilise les mêmes cellules dans les mêmes conditions, les résultats sont assez reproductibles. Dans le cas de $\alpha 1A$, l'écart-type pour la plupart des données mesurées en valeur moyenne sur la population cellulaire est de l'ordre de 15 %. Par contre, il est difficile de comparer les données obtenues avec différentes lignées cellulaires, ou avec différents agents de transfection sur une même lignée. Enfin, la pénétration dans la cellule ne définit pas la biodisponibilité du petit ARN et

il est probable que, pour la plupart des agents de transfection, une grande partie des petits ARN ne soit jamais incorporée dans un complexe fonctionnel. Par contre, nous avons volontairement limité nos modèles cellulaires à des lignées facilement transfectables et, comme nous le verrons dans le cas de HEK293, toutes les cellules sont effectivement transfectées et peuvent mettre en place un silencing par un petit ARN. De ce point de vue, les cellules HeLa Tet-On utilisées pour créer la lignée $\alpha 1A$ sont efficacement transfectables mais avec une plus grande variabilité entre expériences que les cellules HEK293.

1.3.1 Mise en évidence d'un silencing de l'EGFP et d'une induction de la DsRed

La Figure 17A (page suivante) présente le profil de cellules transfectées avec 10 nM de siGloE1 ou d'un siARN contrôle (dans ce cas LTi3) à 48h.

On peut constater un déplacement vers la gauche de l'ensemble des points qui correspond à une diminution de l'expression de l'EGFP/ β -globine. Un calcul du niveau moyen de fluorescence peut être réalisé avec différents logiciels et dans ce travail, j'ai principalement utilisé Weasel (WEHI, Melbourne). Si l'on définit la valeur moyenne de la fluorescence dans les cellules contrôle comme étant 100, alors celle observée dans le canal 1 en présence de siGloE1 est de 18. Ce qui permet de définir un silencing de 82% (Figure 17B). Pour la fluorescence rouge dans le canal 2, celle-ci augmente de 100 à 122 (Figure 17C) ce qui nous représentons comme une induction de 22% (Figure 17D). Les résultats dans ce manuscrit seront souvent présentés sous forme d'histogrammes comme ceux dans la figure 17 qui correspondent soit à des niveaux moyens de fluorescence (Figures 17B et C) ou à des valeurs relatives par rapport au contrôle, dans le cas de cette expérience – 82% pour l'EGFP (en vert) et + 22% pour la DsRed (en rouge) (Figure 17D).

Au cours de ces expériences (Figure 17 E) nous avons pu constater que la dispersion des contrôles (siARN LTi3, Ly1, Ly2, CPEB1, CD9) est de l'ordre de 10 à 15% pour l'expression de la DsRed et de l'EGFP. L'augmentation de la DsRed de 22 % observée en présence de siGloE1 est donc significative comme on peut le confirmer par une analyse statistique. Comme les données présentées sont non compensées, elles

Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

ne peuvent pas occuper tout l'espace du diagramme dans la Figure 17A. Le trait bleu indique la position de cellules qui n'expriment que la DsRed et l'on observe qu'après transfection de siGloE1, la plupart des cellules α 1A fortement fluorescentes sont très proches de cette limite EGFP = 0. Il convient toutefois de faire attention à l'échelle logarithmique. Enfin, on observe que les cellules qui n'expriment pas la construction pBiFluo-Glo et correspondent au niveau de l'autofluorescence des cellules HeLa ne sont pas sensibles au siGloE1.

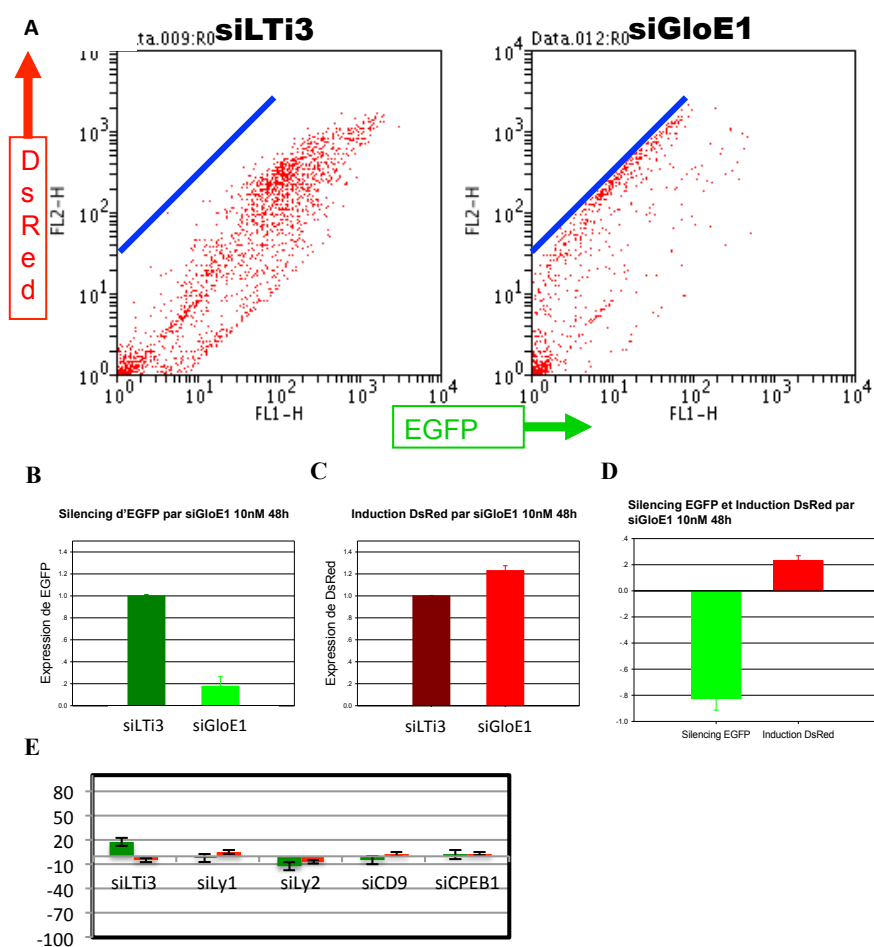


Figure 17: Analyse de la fluorescence des cellules α 1A, 48 h après transfection de 10 nM de siARN

(A) Présentation de la fluorescence de chaque cellule sous forme d'un nuage de points. L'axe X représente le canal FL1 (EGFP), l'axe Y représente le canal FL2 (DsRed). Chaque point correspond au niveau de fluorescence d'une cellule. (B) Analyse des valeurs moyenne de fluorescence de l'EGFP sous forme d'histogramme. Le siGloE1 inhibe l'EGFP d'environ 80% par rapport à un siContrôle (siLTI3). (C) Analyse des valeurs moyenne de fluorescence de la DsRed. En présence de siGloE1 la fluorescence de la DsRed augmente de 22%. (D) Expression des résultats sous forme d'un changement des valeurs moyennes (les valeurs observées en présence de siGloE1 étant exprimées par rapport à celles observées en présence du si contrôle). Pour l'EGFP le changement est indiqué par l'histogramme vert, la valeur négative correspondant au silencing de 80% observé. Pour la DsRed le changement indiqué par la barre rouge correspond à une induction de 22%. (E) Effet des siContrôle sur l'expression de l'EGFP et la DsRed représenté par leur changement par rapport à la valeur moyenne des Contrôles.

1.3.2 Cinétique du silencing et de l'induction

Cinétique du silencing de EGFP et de l'induction de la DsRed GloE1 10nM

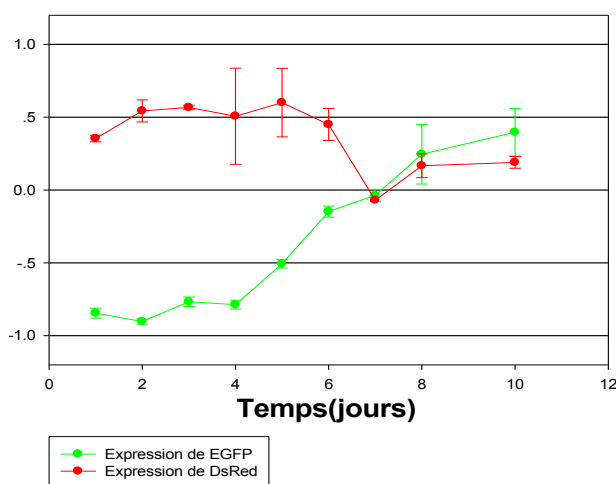


Figure 18: Cinétique du silencing et de l'induction par siGloE1 10nM.

Le silencing de l'EGFP induit par le siGloE1, est à priori post-transcriptionnel et correspond aux expériences initiales de silencing dans les cellules de mammifère de T. Tuschl (Elbashir et al, 2001). Dans ces conditions, on s'attend à ce que le silencing soit transitoire et disparaisse progressivement au fur et à

mesure que le petit ARN est soit dégradé soit dilué par les divisions cellulaires. Par contre, si l'induction correspond à une modification de l'environnement chromatinien, il est possible que celle-ci perdure au-delà du signal initial. J'ai donc effectué une étude cinétique du silencing et de l'induction en comparant la fluorescence de cellules α 1A transfectées par un siARN contrôle (LTi3) et le siGloE1. La Figure 18 présente les données concernant l'EGFP en vert et la DsRed (en rouge) issues de la comparaison siGloE1 / siLTi3 (valeurs moyennes et écart-type sur 3 expériences jusqu'à 10 jours ; les cellules sont divisées lorsqu'elles atteignent la confluence). On observe que les cinétiques du silencing et de l'induction sont très voisines avec un léger retard pour l'induction : mise en place un peu plus lente, disparition plus tardive de un ou deux jours. A 7 jours, les niveaux de fluorescence sont comparables dans les cellules siGloE1 et les contrôles.

Dans certaines expériences, j'ai pu observer un léger excès de fluorescence (DsRed *et* EGFP) dans les cellules traitées par le siGloE1 après cette période de sept jours (présentée figure 18). Cette observation pourrait être l'indication qu'après la fin du silencing, la construction bidirectionnelle est dans une configuration chromatinienne qui facilite son expression. Toutefois, il faut noter que cette observation n'a pas été

Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

faite systématiquement et qu'au-delà de 7 jours, il n'y pas de différence significative entre les deux populations cellulaires. Ainsi, l'induction comme le silencing est transitoire.

1.4 Etude de la réponse à d'autres siARN

Dans ces premières expériences, j'ai donc observé que siGloE1 pouvait induire en plus d'un silencing efficace de l'EGFP, une légère augmentation de l'expression de la DsRed. La première difficulté est évidemment de savoir si cette induction peut être due à un effet hors cible du siARN utilisé. Dans le cas des transfectants stables, et contrairement au cas des transfections transitoires qui sont présentées dans la 2^{ème} partie de résultat, il n'existe pas de réponse directe à cette question. La seule approche qui puisse être mise en œuvre simplement est d'analyser l'activité d'autres siARN qui ciblent le messenger EGFP/ β -globine ou celui de la DsRed. Les séquences des siARN utilisés sont présentées dans la section Matériels et Méthodes : siGloE2, siGloE23, siGloE1B ciblent la partie globine du messenger EGFP/globine, siEGFPA cible l'EGFP et siDsRedB cible la DsRed.

1.4.1 Etude de différents siARN ciblant le messenger de l'EGFP ou de la DsRed

Pour ces différents siARN, les résultats présentés sont ceux du silencing à 48h et de l'induction à 72h, période à laquelle ces réponses sont maximales (Figure 19). La dose de siARN utilisée est de 10 nM, ce qui assure une réponse maximale.

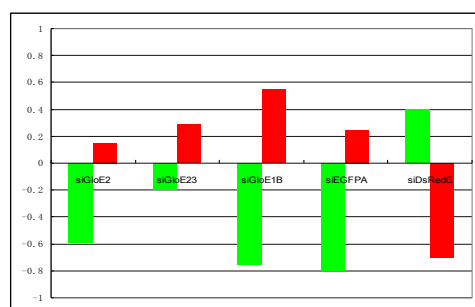


Figure 19 : Silencing et induction induits par différents petits ARN. L'activité de silencing par un siARN efficace n'est pas nécessaire pour avoir une induction efficace. La discussion des résultats est détaillée dans le texte de la page suivante.

siGloE1B et siEGFPA induisent un silencing efficace de l'EGFP et une induction de la DsRed, celle-ci est particulièrement marquée pour siGloE1B. Par contre, siGloE2 génère un silencing significatif de l'EGFP mais pas d'induction significative de la DsRed, tandis que siGloE23 bien que peu actif en terme de silencing entraîne une induction. Ainsi, différents siARN n'induisent pas tous la même réponse, et sur cette

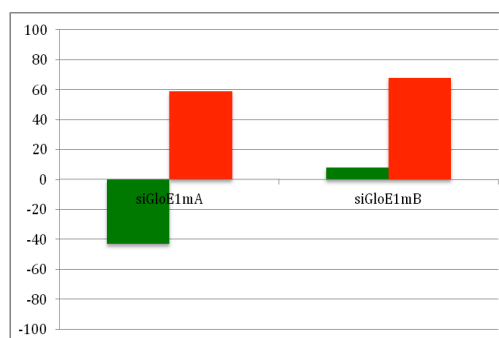
Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

série limitée, il n'est pas possible de conclure s'il existe ou non un lien entre l'efficacité de silencing et celle de l'induction. Enfin un siARN dirigé contre le messenger de la DsRed (siDsRedB) induit un silencing efficace de la DsRed et une induction de l'EGFP. Ceci montre que le modèle expérimental peut fonctionner de façon symétrique, le silencing de l'un des deux rapporteurs pouvant induire l'expression de l'autre.

1.4.2 Transformation de siGloE1 en un « micro ARN »

Comme présenté dans l'introduction, le silencing induit par les siARN utilise un mécanisme différent de celui induit par les micro ARN. Pour savoir si l'induction était spécifiquement associée au silencing de type siARN, j'ai modifié la séquence de siGloE1 pour la rendre semblable à celle d'un micro ARN. Pour cela deux modifications ont été faites à partir de la séquence siGloE1 : siGloE1mA et siGloE1mB (séquences détaillées dans Matériels et Méthodes : tableau 1). Dans les deux cas la séquence du brin guide du siARN a été modifiée et contient des mésappariements dans la région 3' du guide, mais le duplex du petit ARN reste complémentaire parfait. Ces deux modifications conduisent à une induction de la DsRed significativement, mais seulement siGloE1mA entraîne un silencing de l'EGFP efficace. De toute façon, par rapport au siARN de départ, le silencing est moins fort comme attendu du fait du passage à un mode micro ARN, tandis qu'une induction significative persiste tout particulièrement dans le cas de siGloE1mB par le quel nous n'observons pas un silencing de l'EGFP (Figure 20).

Figure 20 : Activités biologiques de versions modifiées en mode micro ARN de siGloE1 à 10 nM, 48h.



En conclusion, plusieurs siARN ciblant le transcrite EGFP/ β -globine peuvent induire l'expression de la DsRed et le phénomène symétrique peut être observé avec le siDsRedB. Ainsi, au moins trois régions d'amorçage différentes peuvent conférer

Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

cette propriété à des petits ARN ; ce qui rend très improbable une explication par un effet hors cible. Par ailleurs, un silencing efficace n'est pas nécessaire pour qu'il y ait une induction de la DsRed comme le montre les versions micro ARN de siGloE1. Il est important de noter que, dans toutes ces expériences, les siARN contrôles n'ont jamais induit de silencing ou induction significative.

1.5 Identification du petit ARN guide

L'observation d'une induction est évidemment non-conforme à ce qui est attendu dans le cadre d'une interférence par l'ARN. L'une des questions qui se posent est de savoir si le même brin guide est utilisé pour les deux activités biologiques observées : le silencing de l'EGFP et l'induction de la DsRed. Pour approuver cette hypothèse j'ai cherché à biaiser l'incorporation de l'un des deux brins par rapport à l'autre. L'idée est d'exploiter l'incorporation préférentielle du brin dont l'extrémité 5' est la moins stable (Khvorova et al, 2003). Le point de départ est l'observation que le siGloE1mA est biologiquement actif et diffère spécifiquement du siGloE1 dans la région 5' du brin « sens » (si l'on utilise la polarité de l'ARN messager EGFP comme référence). La molécule hybride entre un brin sens siGloE1 et un brin antisens siGloE1mA est donc issue de deux siARN biologiquement actifs. Toutefois, du fait de la présence d'une région non appariée en 5' du brin sens, on peut s'attendre à ce que seul le brin sens siGloE1 soit incorporé. Ce siARN hybride n'a pas d'effet significatif sur la fluorescence des cellules transfectants stables α 1A (Figure 21 : siGloE1s/siGloE1mAAs).

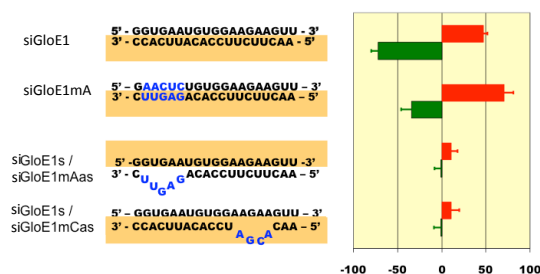


Figure 21 : Identification du brin guide actif dans le siGloE1.

Les séquences qui diffèrent entre les différents siARN sont indiquées en bleu ; le brin qui doit être principalement incorporé dans le complexe RISC, d'après la stabilité thermodynamique des extrémités, est surligné en beige.

J'ai aussi réalisé une autre molécule hybride avec cette fois une région non appariée dans la partie 5' du brin antisens (Figure 21 : siGloE1s/siGloE1mCas). Dans une telle construction, le changement de séquence a deux conséquences : favoriser

Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

l'incorporation du brin antisens et changer la spécificité de cet ARN guide. De nouveau, une telle molécule n'a pas d'activité biologique, ce qui confirme qu'il faut incorporer le brin antisens de siGloE1 pour observer le silencing de l'EGFP et l'induction de la DsRed.

1.6 Rôle des protéines argonautes dans l'inhibition et l'induction

Les données présentées indiquent qu'un brin guide antisens est nécessaire pour l'induction de la DsRed. Le silencing de l'EGFP a toutes les apparences d'une interférence par l'ARN et devrait donc être dépendant de Ago2. Si l'induction de la DsRed reflète une activité d'un complexe RISC, on s'attend aussi à ce qu'elle dépende des protéines Argonaute. Pour cela, nous avons procédé à des expériences de "knock-down" des protéines argonautes par la co-transfection ou la double transfection séquentielle d'un siARN ciblant une des protéines Argonaute (désigné par siAgo) puis d'un siARN GloE1.

1.6.1 Efficacité du silencing des différents Ago par les siAgo

L'efficacité du silencing des différents messagers Ago a été mesurée par RT-PCR sur les ARNm de cellules transfectées avec 5 nM de siAgo. La transcription inverse a été faite avec l'amorce d(T)₁₈ tandis que les analyses par PCR ont été faites avec des amorces spécifiques décrites dans les Matériels et Méthodes. Les différents siARN utilisés diminuent l'abondance de leur ARNm cible d'environ deux cycles (soit un silencing de l'ordre de 75%).

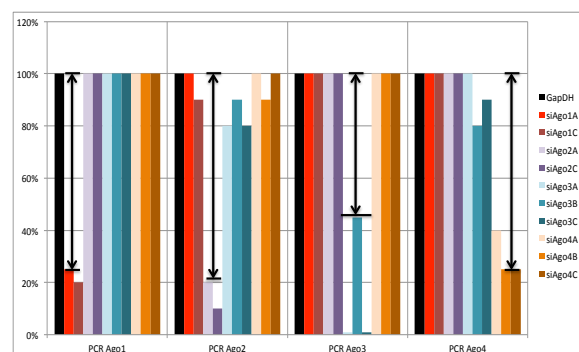


Figure 22 : Représentation des données de PCR quantitative sur l'efficacité des siAgo. L'histogramme en noir représente le signal du contrôle. Les flèches indiquent les changements d'expression observés en présence de siARN correspondant au messenger Ago analysé.

J'ai sélectionné les siAgo qui n'ont pas d'effet sur l'expression de l'EGFP et de la DsRed dans les cellules α 1A pour procéder aux expériences de co-silencing

Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

(détaillées dans les Matériels et Méthodes). Dans la co-transfection, les protéines argonautes sont présentes dans les cellules au moment de la transfection du si/miARN qui cible le transcrite de l'EGFP dans les cellules, ce qui pourrait masquer en partie l'effet de leur silencing. Dans des double transfusions réalisées à 24h d'intervalle, on peut diminuer significativement le niveau des protéines argonautes avant l'introduction du siARN ou miARN qui cible le transcrite de l'EGFP. Par contre cette double transfection induit un stress important susceptible d'interférer avec les régulations cellulaires.

Par ces approches, nous avons observé que Ago2 et, dans une moindre mesure, Ago1 étaient nécessaires au silencing induit par siGloE1 et siGloE1mA (Figure 23A, page suivante). Pour mieux apprécier l'impact du silencing des Ago par 5 nM de siARN Ago, la réponse à siGloE1 et siGloE1mA a été mesurée pour trois doses différentes de si. On peut remarquer que les doses réponses sont différentes pour siGloE1 et siGloE1mA, la réponse étant déjà maximale à 1 nM pour siGloE1 en accord avec une action catalytique pour siGloE1 (sur cible parfaite) et pas pour siGloE1mA (cible imparfaite).

L'induction de la DsRed dépend principalement de Ago1 et de Ago2 (Figure 23B, page suivante). Il est important de noter que cette réponse très forte au silencing de Ago1 n'est pas retrouvée avec d'autres siAgo1 contre ce messager, pour cette raisons d'autres siAgo1 seront utilisés dans les parties suivantes. Par ailleurs, comme pour le silencing, il suffit d'augmenter la dose de siGloE1 pour échapper à l'effet du silencing Ago, tandis que ceci est beaucoup moins vrai dans le cas du siGloE1mA. Cette réponse pourrait suggérer que le mécanisme de l'induction est différent dans les deux cas ; mais elle pourrait aussi indiquer qu'il existe une compétition entre le silencing et l'induction. En effet, le silencing est à priori, cytoplasmique tandis que l'induction devrait être nucléaire ; il est donc possible que cette plus grande sensibilité de l'induction à une diminution de Ago1 ou 2 reflète la « séquestration » des complexes RISC dans le cytoplasme dans le cas d'un silencing de type « miARN » (sur cible imparfaite).

Résultats I- Etude de l'induction par les petits ARN dans un transfectant stable

implication de Ago3 dans un mécanisme de réduction de l'expression de la DsRed soit une compétition entre les différents rôles des complexes RISC. En principe, les complexes formés avec un petit ARN double brin parfait et Ago3 ne peuvent être actifs (sauf s'il y a une dissociation spontanée du brin passager) et le silencing de Ago3 pourrait donc augmenter la quantité de petit ARN disponible pour la formation de complexes actifs.

Bilan

Ces premières études réalisées dans un transfectant stable ont montré que le silencing de l'EGFP conduisait à une légère induction de l'expression de la DsRed. Ceci a été observé avec plusieurs ARN interférants tandis que le siDsRedB induit un silencing très efficace de la DsRed et une induction de l'EGFP. Ainsi il semble peu probable que ces effets soient dus à des activités hors cible des ARN interférant. L'introduction de mésappariements dans le petit ARN siGloE1 suggère que l'ARN messenger EGFP est effectivement la cible et non pas un ARN antisens qui pourrait être exprimé dans ces cellules. Une étude du rôle des protéines Argonaute montre que Ago2 est l'acteur central du silencing et de l'induction. Par contre avec les siARN utilisés, Ago1 et Ago2 sont impliqués dans l'induction. Enfin, le silencing de Ago3 tend à augmenter l'induction suggérant l'existence d'une compétition pour un (des) partenaire(s).

Bien que ces résultats soient en accord avec les observations faites sur l'induction des ARN pré-messagers de la lymphotoxine et de la β -globine, la faiblesse des inductions observées rend ce modèle peu approprié à l'étude du mécanisme sous-jacent.

2^{ème} Partie: Etude de l'induction en transitoire

2.1 Propriétés générales du modèle

Les transfectants stables comme $\alpha 1A$ permettent d'observer une induction mais l'amplitude de l'effet rend difficile toute étude plus détaillée du mécanisme. De plus, il est probable que l'organisation des transgènes joue un rôle dans l'induction ce qui complique la comparaison entre clones stables différents. C'est pourquoi j'ai exploré la possibilité d'étudier l'induction dans un modèle de transfection transitoire. Si les conditions s'éloignent un peu plus de celles d'un gène cellulaire endogène, par contre il devrait être possible de comparer des constructions différentes dans des conditions d'expression très similaires. De plus, comme le modèle de transfection transitoire a été utilisé pour analyser certains aspects de l'organisation de la chromatine, on peut supposer qu'au moins une partie des régulations de l'expression liées à la chromatine se mettent en place sur une échelle de 48 h. Les premières études ont été faites dans les cellules HeLa Tet-On qui avaient été utilisées pour les clones stables mais rapidement nous avons utilisé les cellules HEK293 Tet-On. En effet, comme l'efficacité de transfection est un paramètre essentiel des expériences transitoires, l'efficacité de transfection exceptionnelle des cellules HEK293 permet d'obtenir des résultats beaucoup plus fiables et de réaliser des transfusions multiples en une seule étape.

2.1.1 Premières observations : réponse de pBiFluo-Glo aux ARN interférant β -globine

Pour commencer, nous avons analysé la réponse de pBiFluo-Glo à des petits ARN ciblant la β -globine comme siGloE1. La figure 25 (page suivante) présente les résultats d'une expérience représentative effectuée dans des cellules HeLa Tet-On. 1×10^5 cellules par puits ont étéensemencées dans des plaques 24 puits, la transfection de 0.5 μ g du plasmide pBiFluo-Glo et 5 nM siCD9 (contrôle) ou siGloE1 a été faite par la méthode phosphate de calcium. L'expression a été analysée 48 h après transfection et 24 h après l'induction par 1 μ g/mL de doxycycline. Le nuage de points est présenté en données non compensées. Par rapport aux expériences réalisées en

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

utilisant les clones stables, on observe un niveau important d'expression mais avec un profil dans lequel l'expression de l'EGFP et celle de la β -globine sont faiblement corrélées. En présence de 5 nM siGloE1, on observe un silencing marqué de l'EGFP et un déplacement des points représentant la fluorescence des cellules vers des niveaux plus élevés de la DsRed. Ceci est particulièrement évident pour les plus forts expresseurs^{*2} avec une augmentation d'un facteur 10 du niveau maximal de DsRed. Comme indiqué dans la première partie, le fait de travailler sur les données non compensées sous-estime l'induction de la DsRed. L'histogramme de la Figure 25 présente le changement des valeurs moyennes de l'EGFP et de la DsRed après compensation en présence de siGloE1. Par rapport aux clones stables, on observe une induction beaucoup plus marquée (+ 600 % qui signifie un changement de 7 fois).

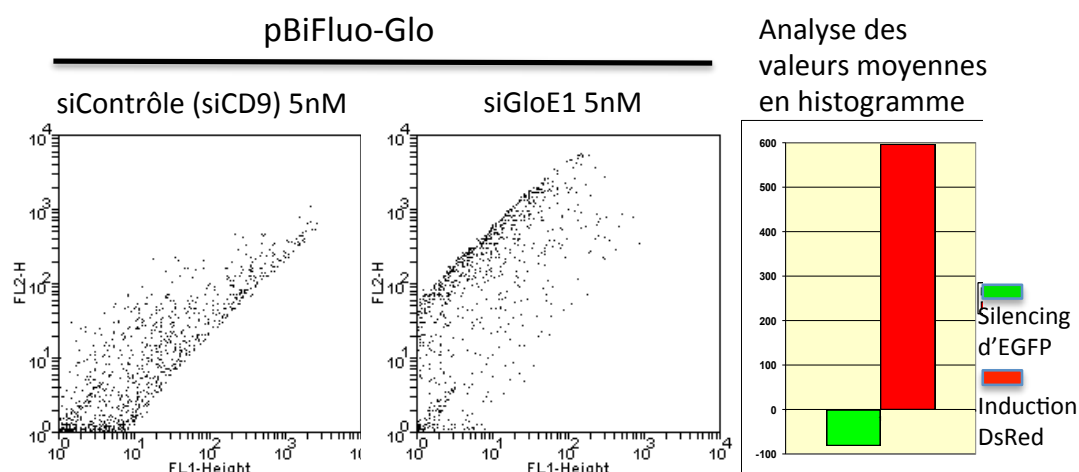


Figure 25 : Expression de pBiFluo-Glo transitoire dans les cellules HeLa Tet-On et réponse à siGloE1 (5nM, 48h). Les deux dotplot à gauche sont la lecture des fluorescences des cellules par cytométrie. L'histogramme à droite est l'analyse des valeurs moyennes représentant le changement de niveau d'expression de fluorescence EGFP et DsRed entraîné par siGloE1 (5 nM) par rapport à un siContrôle.

Pour compléter cette analyse, nous avons étudié la réponse à d'autres siARN ciblant la β -globine et comparé les résultats avec ceux obtenus avec le clone α 1A (Tableau 3). Dans l'ensemble, il existe une bonne concordance entre les résultats obtenus dans les deux modèles, le silencing de l'EGFP s'accompagnant d'une induction de la DsRed, laquelle est toujours plus forte dans le modèle transitoire. Ainsi certaines inductions

² Les cellules qui expriment le plus de fluorescence sont appelées « fort expresseur ».

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

qui étaient peu significatives en stable deviennent très évidentes en transitoire notamment pour siGloE2 et siGloE1B. Pour le silencing, la comparaison entre les deux modèles est un peu plus délicate. En effet, d'une part siGloE23 qui n'induisait pas de silencing significatif dans les clones stable a une action clairement mesurable en transitoire (40 +/- 10 %) tandis que d'autre part, certains des ARN interférant qui induisaient un silencing efficace ont une activité nettement plus faible en transitoire : siGloE2 est l'exemple le plus marqué, mais la même constatation est vraie pour siGloE1. Une interprétation possible qui sera validée dans la section suivante est que cette diminution du silencing reflète une activation de la transcription au niveau du promoteur bidirectionnel et donc des effets antagonistes de l'ARN interférant.

Tableau 3 : Comparaison des effets des ARN interférant dans le clone stable a1A et lors de transfections transitoires de pBiFluo-Glo.

Les données présentées sont issues d'une compilation de différentes transfections (n de 3 à 20) et pour la facilité de lecture, les valeurs ont été arrondies ; dans les tableaux et figures qui suivent, les données exactes correspondant à un jeu d'expériences sont indiquées.

siARN	silencing		induction	
	Clone stable	Transfection transitoire	Clone stable	Transfection transitoire
siGloE1	80% ± 5%	70%± 10%	50% ± 5%	550% ± 80%
siGloE2	60% ± 5%	22%± 10%	15% ± 10%	200% ± 35%
siGloE23	20% ± 5%	40% ± 10%	25% ± 10%	80% ± 15%
siGloE1B	75% ± 10%	58%± 5%	50% ± 10%	300% ± 50%
siGloE1mA	10% ± 5%	40% ± 10%	60% ± 10%	80% ± 15%

2.1.2 Spécificité de l'induction par les petits ARN

Du fait que nous utilisons l'expression de la DsRed comme une donnée expérimentale, nous ne disposons pas d'une référence interne pour l'efficacité de transfection. Aussi l'exploitation des données obtenues en transitoire dépend tout d'abord de la reproductibilité des transfections. Comme le montrent les résultats présentés dans le tableau 3, la dispersion des résultats est globalement faible même si l'on observe une

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

amplification du signal et de la dispersion dans le cas de l'induction de la DsRed. De fait, l'ensemble des données que j'ai obtenues aux cours de mes travaux montre que le modèle en transitoire est suffisamment reproductible pour mener à bien des analyses sur le mécanisme sous-jacent.

Comme pour les clones stables, une question essentielle est de savoir si l'induction pourrait être due à un effet hors-cible du siARN. Au début de ces études, un tel effet hors-cible venait d'être mis en évidence dans le cas de l'induction du promoteur du VIH par un siARN (Weinberg et al, 2007). Dans ce cas, un des siARN ciblant la région promotrice du VIH, a un effet hors-cible qui inhibe l'expression d'un répresseur de la transcription. Ainsi, l'augmentation de l'activité du promoteur du HIV résulte-t-elle de cet effet hors-cible sur un autre gène que celui dont on suit l'expression. Dans nos études sur les clones stables, nous avons pris soin de montrer que plusieurs siARN différents qui ciblent le messenger EGFP étaient capables d'induire la DsRed. Cependant, une démonstration plus directe était nécessaire. L'utilisation de la transfection transitoire permettait de modifier la séquence du plasmide et ainsi d'introduire ou de supprimer des sites pour des siARN.

J'ai tout d'abord utilisé 1) des constructions dérivées de pBiFluo-Glo dans lesquelles des sites de fixation pour des siARN ou miARN avaient été introduits, 2) puis des constructions dérivées de pBiFluo. La figure 26 illustre qu'en l'absence de séquence cible de siGloE1, la construction indicatrice ne répond pas à 10 nM de celui-ci. Réciproquement, si on introduit des sites pour let-7 (un site parfait ou trois sites imparfaits de type micro ARN), la construction pBiFluo-Glo devient sensible à la présence de let-7 avec un silencing et une induction.

Ainsi, la présence de la séquence cible dans la construction est nécessaire pour observer une induction et un silencing puisqu'à ce stade, les deux sont toujours associés. On retrouve aussi l'observation, faite sur les clones stables, montrant que les micro ARN sont capables d'induire l'expression de la DsRed.

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

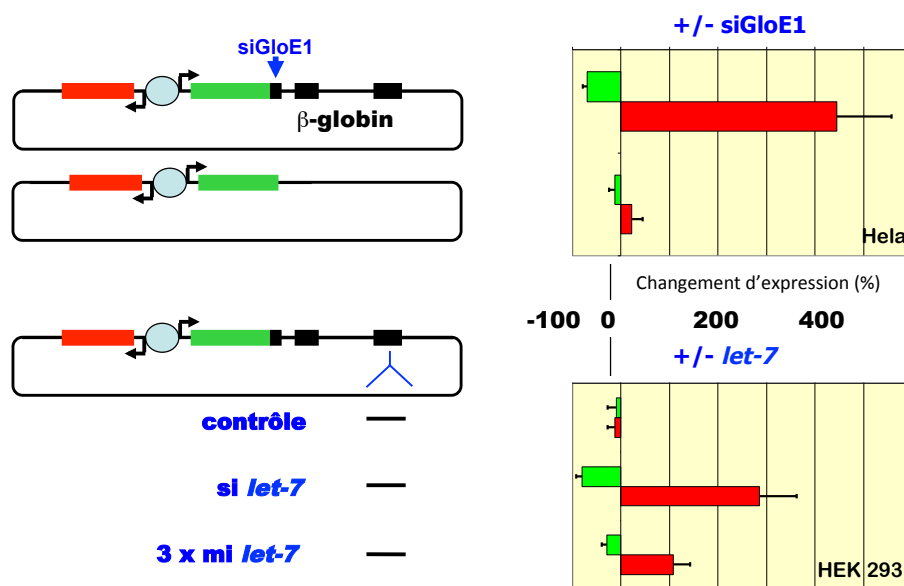


Figure 26: Mise en évidence de la spécificité de l'induction au moyen de différentes constructions dérivées de pBiFluo-Glo.

Panneau du haut : siGloE1 n'a d'effet sur l'expression de la DsRed que si sa séquence cible est présente dans la construction.

Panneau du bas : l'insertion de séquences cibles pour let-7 rend pBiFluo-Glo sensible à let-7 - que ce soit en mode siARN (un site) ou en mode miARN (3 sites).

2.1.3 Constructions avec le site en orientation inverse

La plupart des siARN que j'ai utilisée a été choisie au laboratoire en utilisant des outils informatiques communément disponibles. Parmi les paramètres utilisés par ces logiciels, figure l'asymétrie dans la stabilité des extrémités des siARN. En effet, les données obtenues dans le laboratoire d'Amgen et al. (Khvorova et al, 2003) montrent que c'est le brin dont l'extrémité 5' est la moins stablement appariée qui est choisi comme brin guide, l'autre brin devenant le brin passager. En fonction de ces règles, les siARN ont été choisis pour cibler l'ARN messager de l'EGFP ou du messenger EGFP-βGlo dans le cas de pBiFluo-Glo et non un éventuel transcrit antisens. Toutefois l'efficacité de cette sélection du brin guide n'est probablement pas aussi tranchée que le suggère la formulation initiale {Wei, 2009 #1498} et nous avons donc choisi une stratégie complémentaire pour identifier la nature de la cible dans nos modèles, en insérant la séquence silet-7 dans les deux orientations possibles. L'expression de la construction avec le site en orientation inverse n'est pas affectée par la présence de silet-7 (données non montrées), ce qui confirme que c'est bien

l'ARN messenger de l'EGFP qui est la cible des petits ARN activateurs.

Bilan

En conclusion de cette section, nous avons observé que dans des expériences d'expression transitoire, le silencing de l'EGFP s'accompagnait de manière générale d'une induction de la DsRed. Cet effet nécessite la présence d'un site de fixation pour le petit ARN sur le messenger cible et peut être observé soit avec des siARN soit des miARN. Enfin, par rapport aux expériences en utilisant les clones stables, l'amplitude de l'induction est beaucoup plus marquée et peut atteindre 600 % dans le cas de pBiFluo-Glo avec siGloE1.

2.2 Mise en évidence d'une régulation transcriptionnelle

2.2.1 Etude des niveaux d'ARN messagers

Du fait de l'induction plus importante observée dans les expériences transitoires, j'ai cherché à démontrer que l'augmentation de la fluorescence reflétait bien une régulation transcriptionnelle. Dans un premier temps, j'ai analysé l'expression des ARN messagers par des expériences de Northern. Afin de disposer des données concernant les protéines et l'ARN relatif dans les mêmes échantillons, les transfections ont été réalisées dans des boîtes de 6 cm de diamètre et avant la lyse, les cellules ont été collectées à partir d'une petite région (environ 4 cm² de surface) pour être analysées en cytométrie.

La Figure 27A présente les résultats de l'analyse par Northern blot pour des échantillons co-transfectés soit par pBiFluo soit pBiFluo-Glo et les siARN indiqués. Pour normaliser les résultats en fonction de la quantité d'ARN déposée, l'ARN ribosomique 28S a été détecté avec une sonde oligonucléotique (Barbu & Dautry, 1989). Le silencing de l'expression de l'EGFP par le siARN « relevant » est clairement détectable (Figure 27A) tandis que la différence de taille entre les messagers EGFP et EGFP-Glo correspond à celle attendue. En ce qui concerne l'expression de la DsRed, une légère augmentation est visible dans le cas de pBiFluo

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

+ siEGFPA et une beaucoup plus marquée pour pBiFluo-Glo + siGloE1.

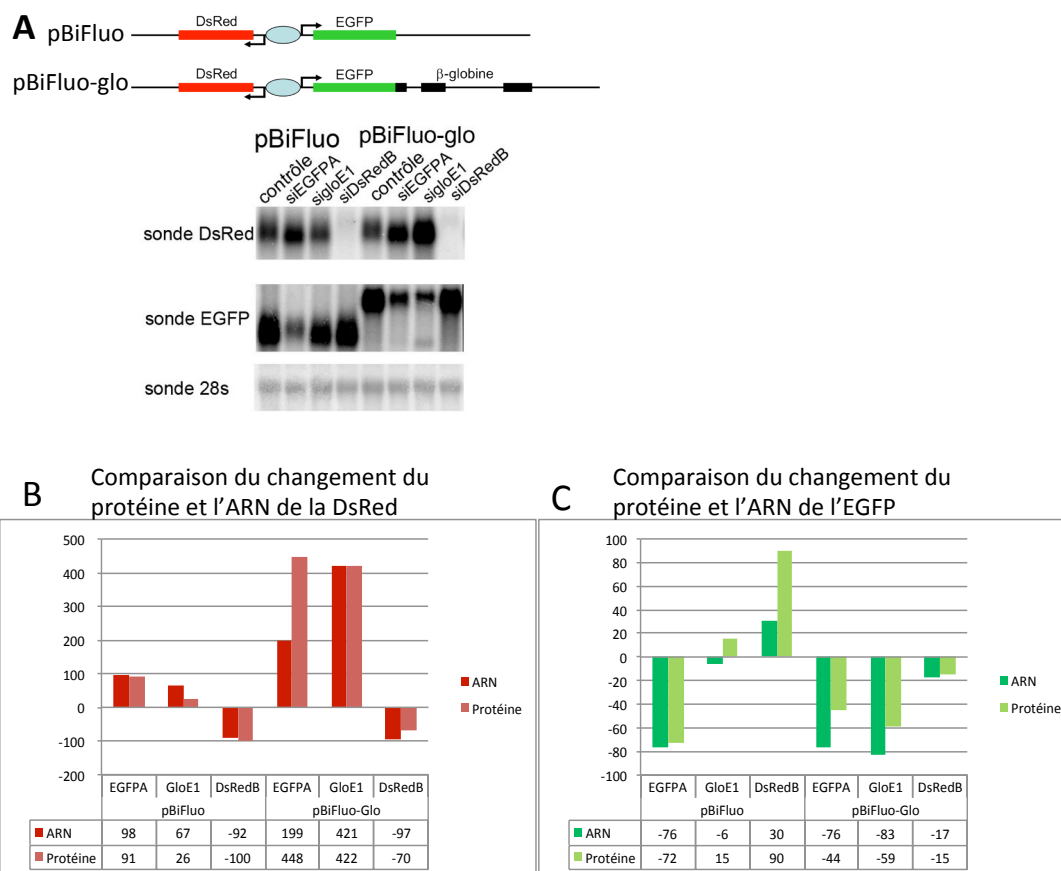


Figure 27 : Comparaison de l'expression de l'EGFP et de la DsRed vis à vis de l'ARN messenger et protéine.

A) Analyse par Northern blot de l'expression de la DsRed et de l'EGFP, la détection de l'ARN 28S sert à normaliser les échantillons en fonction de la quantité d'ARN total.

B) Comparaison de l'expression de la DsRed au niveau de l'ARN et de la protéine (changements induits par le siARN indiqué par rapport au siARN contrôle).

C) Comparaison de l'expression de l'EGFP au niveau de l'ARN et de la protéine.

La quantification de ces résultats est présentée figure 27B pour la DsRed et Figure 27C pour l'EGFP. A partir des données obtenues au phosphorimager pour les Northern avec normalisation par le 28S et en cytométrie pour les protéines. Globalement, il existe une bonne corrélation entre les changements d'expression observés en protéine et en ARN, la seule exception étant l'induction de la DsRed par le siEGFPA où l'augmentation du messenger bien qu'importante reste plus faible que celle observée en protéine. Dans cette analyse on peut observer un silencing particulièrement efficace du messenger de la DsRed par le siDsRedB. Le décalage entre les données ARN et protéine peut dans ce cas être attribué à la difficulté de mesurer l'expression résiduelle de la DsRed, problème probablement dû à

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

l'autofluorescence et à la compensation. De ce point de vue, l'utilisation de rapporteurs fluorescents est moins performante que celle de la luciférase du fait du très faible bruit de fond d'activité luciférase dans les lysats de cellules non transfectées. Par contre, l'approche fluorescente permet d'avoir accès à plus d'information puisqu'elle préserve l'identité des cellules. Le silencing de la DsRed n'est accompagné que d'une petite induction de l'EGFP au niveau protéique qui n'est que partiellement retrouvée au niveau de l'ARN. En résumé, on observe que la forte induction de la DsRed dans pBiFluo-Glo est associée à une augmentation similaire de l'accumulation de l'ARN messenger.

Cette augmentation de l'accumulation des messagers DsRed pourrait être due soit à une stabilisation du messenger, soit à une synthèse accrue. Encore qu'il soit difficile de formuler une hypothèse cohérente pour la stabilisation du messenger DsRed par une interaction de RISC avec le messenger EGFP, j'ai analysé si la demi-vie du messenger DsRed était modifiée. En présence d'actinomycine D, la demi-vie du messenger DsRed n'est pas différente en présence du siARN contrôle ou de siGloE1. Pour approcher de manière plus directe la transcription, j'ai effectué des expériences d'immuno-précipitation de chromatine avec un anticorps anti-PolIII. Les données obtenues sont présentées dans la figure 28 et montrent une augmentation de la présence de PolIII sur les deux unités de transcription contrôlées par le promoteur bidirectionnel. L'amplitude de l'augmentation de PolIII est du même ordre que celle de l'expression en protéine ou en ARN messenger.

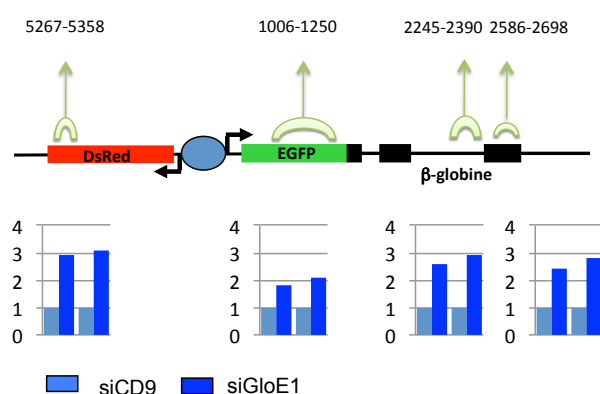


Figure 28 : Analyse de la densité de polymérase II sur le promoteur des constructions indicatrices par immuno-précipitation de chromatine. Données obtenues à partir de deux expériences indépendantes, l'analyse par PCR étant faite en triplicate.

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

3.3 Effet de la linéarisation du plasmide

L'ensemble des résultats présentés jusqu'ici suggère que, dans le cas de notre construction indicatrice, l'induction par un petit ARN est un phénomène général en ce sens que pratiquement tous les siARN que nous avons analysés induisent - plus ou moins fortement - l'expression de la DsRed. Comme il est présenté dans l'introduction, d'autres laboratoires ont observé une induction de l'expression. Or ceci n'est le cas que pour certains gènes cibles et le plus souvent pour certains siARN. Il semble donc que nos constructions indicatrices aient une particularité qui les rende sensibles à l'induction. Comme une des spécificités de nos constructions est d'utiliser un promoteur bidirectionnel, on peut se demander si ce n'est le promoteur bidirectionnel lui-même qui est responsable de cette sensibilité à l'induction. Dans le modèle proposé par K. Morris (Morris et al, 2008), l'induction reflète la présence de transcrits antisens qui limitent l'expression du gène étudié, le rôle du petit ARN étant de déplacer l'équilibre entre transcrits sens et antisens. Dans notre cas, la présence du promoteur bidirectionnel pourrait être à l'origine de transcrits antisens si la terminaison de la transcription n'est pas complète (Figure 29). Pour aborder cette question, nous avons choisi de transférer des plasmides préalablement linéarisés. Si des transcrits antisens sont issus du promoteur bidirectionnel, la linéarisation dans le corps du plasmide empêchera leur production.

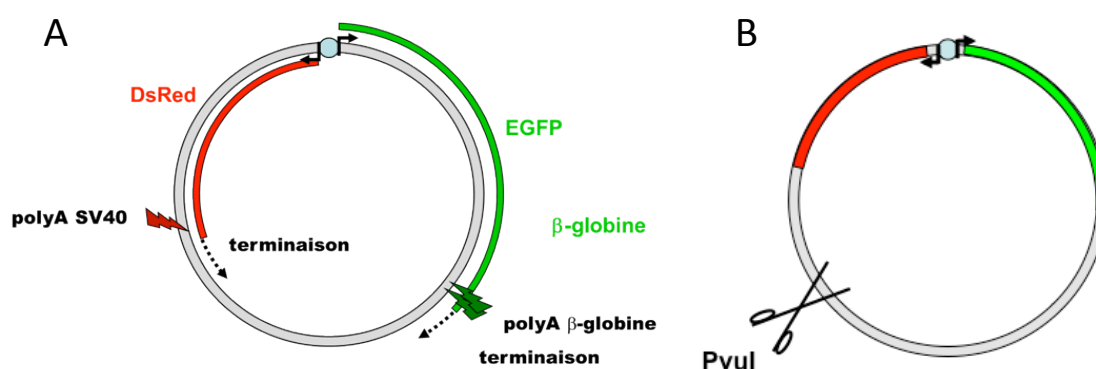


Figure 29: (A) Organisation de la transcription dans les plasmides pBiFluo. (B) La linéarisation du pBiFluo est faite sur le site de PvuI, dans la région plasmidique entre l'EGFP et la DsRed. Même légende pour le pBiFluo-Glo.

La transfection de plasmides linéarisés induit une expression de même type que celle du plasmide circulaire mais avec des niveaux globalement plus faibles (Figure 30).

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

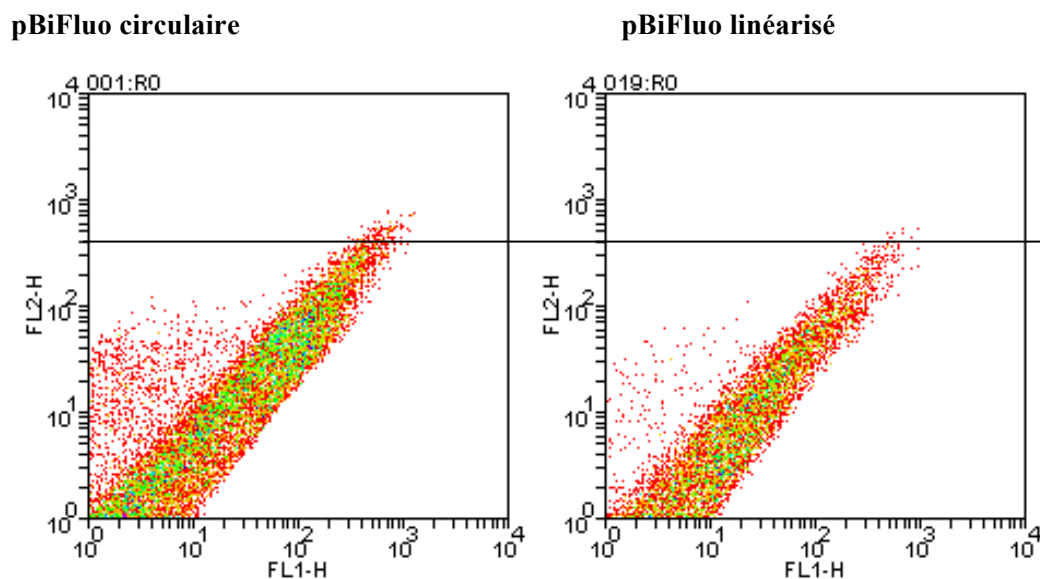


Figure 30 : Comparaison du profil d'expression de pBiFluo circulaire et linéarisé. Une information importante qu'on peut obtenir à partir de ce jeu de données, concerne le pBiFluo linéarisé (droite) qui exprime moins bien par rapport à pBiFluo circulaire (gauche). Ici, le nuage des points est présenté en couleur selon la densité des points dans une région. Par exemple dans ces deux profils, les régions qui sont en vert signifient là où il y a plus de points.

Dans le cas de pBiFluo (Figures 30, 31) la linéarisation réduit de manière marquée l'induction de la DsRed par le siEGFPA. L'histogramme représente le changement de l'expression de l'EGFP et de la DsRed induit par 10 nM de siEGFPA par rapport à 10 nM de siContrôle. En parallèle, le silencing de l'EGFP est plus complet et passe de ~ 60% à ~ 85%. Ces résultats sont en accord avec un rôle de la transcription convergente dans le phénomène d'induction et d'un antagonisme entre le silencing et l'activation du promoteur bidirectionnel.

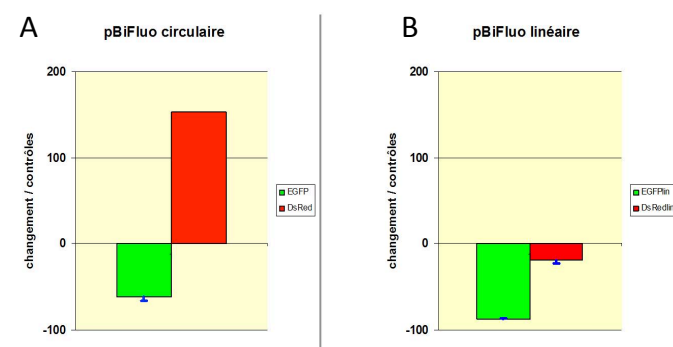


Figure 31 : La linéarisation de pBiFluo renforce le silencing (histogramme vert négative) mais empêche l'induction (histogramme rouge). (A) Changement de l'expression de l'EGFP et la DsRed chez pBiFluo circulaire avec siEGFPA 10nM par rapport à siContrôle.

(B) Même comme A mais chez pBiFluo linéarisé.

Dans le cas de pBiFluo-Glo, la linéarisation du plasmide conduit à une diminution de

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

l'induction d'environ 1/3, mais il reste une induction significative (Figure 32). On peut cependant observer une augmentation du silencing comme dans le cas de pBiFluo, en accord avec une diminution de l'activité du promoteur bidirectionnel.

Si l'on se place dans le cadre du modèle proposé par K. Morris, le bilan de ces expériences peut être formulé de la manière suivante. Dans le cas de pBiFluo la linéarisation abolit presque complètement l'induction, dans certaines expériences une induction résiduelle a été observée. Il semble donc probable que le promoteur bidirectionnel joue un rôle essentiel dans l'induction.

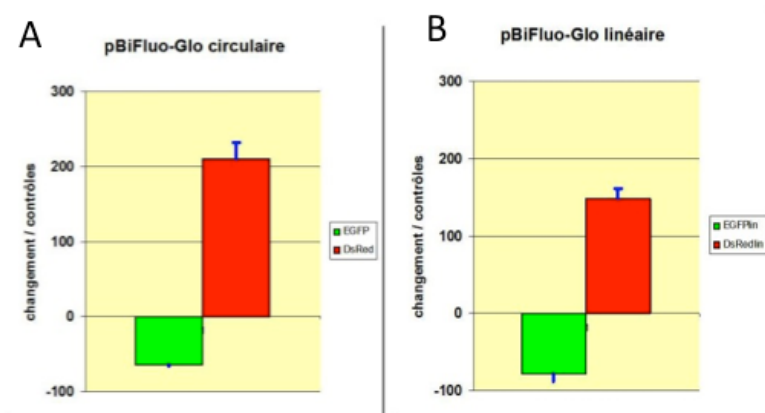


Figure 32 : La linéarisation de pBiFluo-Glo renforce le silencing mais ne supprime pas l'induction. (A) Changement de l'expression de pBiFluo-Glo circulaire en présence de 10 nM siEGFP. (B) Changement de

l'expression de pBiFluo-Glo linéarisé en présence de 10 nM siEGFP.

Dans le cas de pBiFluo-Glo, comme la suppression n'est que partielle, si l'on veut rester dans le cadre du modèle de K. Morris, il doit exister une autre source de transcription antisens qui est indépendante du promoteur bidirectionnel. Il est intéressant de remarquer que le profil de pBiFluo-Glo est très différent de celui de pBiFluo, lequel est conforme à ce que l'on peut attendre de l'expression à partir d'un promoteur bidirectionnel. En particulier il existe un biais en faveur de l'expression de la DsRed qui suggère l'existence d'une inhibition de l'expression de l'EGFP. Toujours dans le cadre d'un modèle de transcription sens et antisens, on peut donc envisager qu'il y ait une autre source de transcription que le promoteur bidirectionnel, par exemple situé dans la région β -globine qui joue un rôle inhibiteur de l'expression de l'EGFP. La persistance de ces transcrits antisens après linéarisation permet une induction par les siARN qui ciblent les transcrits EGFP- β Globine. Enfin, l'observation qu'il persiste une induction de pBiFluo-Glo montre que la linéarisation du plasmide ne rend pas impossible une induction, par exemple pour des raisons de

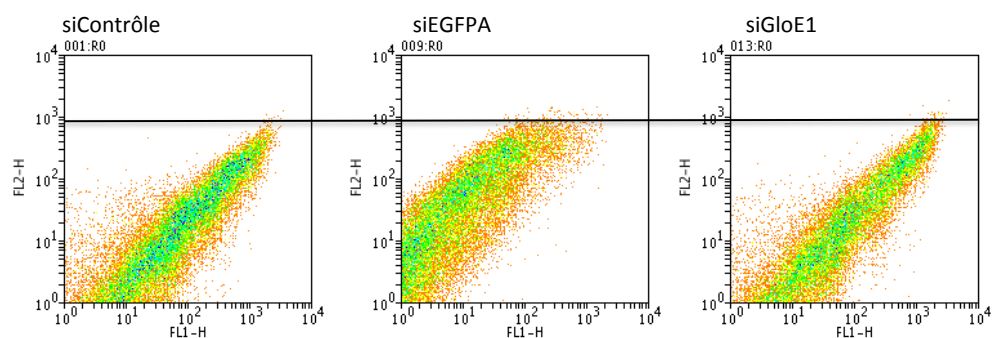
Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

topologie du plasmide, ADN relâché au lieu d'être superenroulé.

2.4 Effets en trans

Dans nos expériences, le siARN cible le messager EGFP tandis qu'une des réponses observées concerne l'expression de la DsRed. Comme de plus nous avons observé une augmentation de la transcription, l'interprétation la plus simple de ces résultats est que la réponse observée résulte d'un effet en *cis* dans lequel la molécule cible (EGFP) et la molécule indicatrice (DsRed) partagent un promoteur bidirectionnel. En interagissant avec les transcrits naissants de l'EGFP, le complexe RISC peut agir sur la chromatine du plasmide et ainsi modifier l'activité du promoteur. Dans ce schéma, on peut prédire que si les deux molécules fluorescentes ne sont pas exprimées à partir du même plasmide, il ne devrait plus y avoir d'induction de la DsRed. Pour analyser cette hypothèse, nous avons dérivé des constructions « monochromes » à partir de pBiFluo : pBiRed et pBiGFP. Celles-ci ont été obtenues par l'excision de l'unité de transcription DsRed ou EGFP dans pBiFluo et elles contiennent donc le même promoteur que la construction parentale. La co-transfection de pBiRed et pBiGFP dans les cellules HEK293 Tet-On permet de reconstituer un profil d'expression qui est très voisin de celui de pBiFluo (Figure 33).

A. pBiRed + pBiGFP



B.

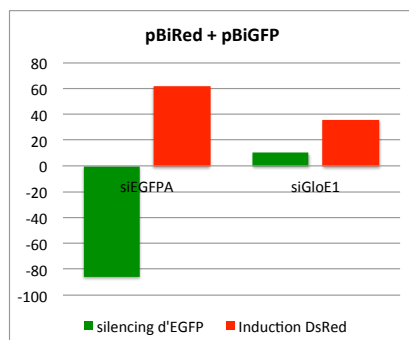


Figure 33 : Absence d'effet en trans dans les co-transfections pBiRed + pBiGFP. (A) Profils en nuage de points des expressions avec différents siARN (10 nM) ; (B) Silencing de l'EGFP et l'induction de la DsRed en histogramme par rapport à siContrôle.

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

Ceci illustre l'efficacité de la co-transfection dans ces cellules. Le silencing par siEGFPA est très efficace tandis que siGloE1 n'a pas d'effet sur l'expression de ces constructions qui ne contiennent pas de séquence cible. La quantification de ces résultats montre que, comme après linéarisation, le silencing de l'EGFP est très efficace tandis qu'il n'y a qu'une faible induction de la DsRed. L'ensemble des données sur pBiFluo obéit à un schéma simple dans lequel toutes les régulations agissent en cis : i) la linéarisation du plasmide abolit la transcription convergente et supprime l'induction de la DsRed, ii) le fait de séparer les deux unités de transcription sur deux plasmides différents abolit l'induction.

Les résultats concernant pBiFluo-Glo sont clairement différents comme le montre le profil d'expression obtenu par co-transfection de pBiRed et pBiGFP-Glo (Figure 34).

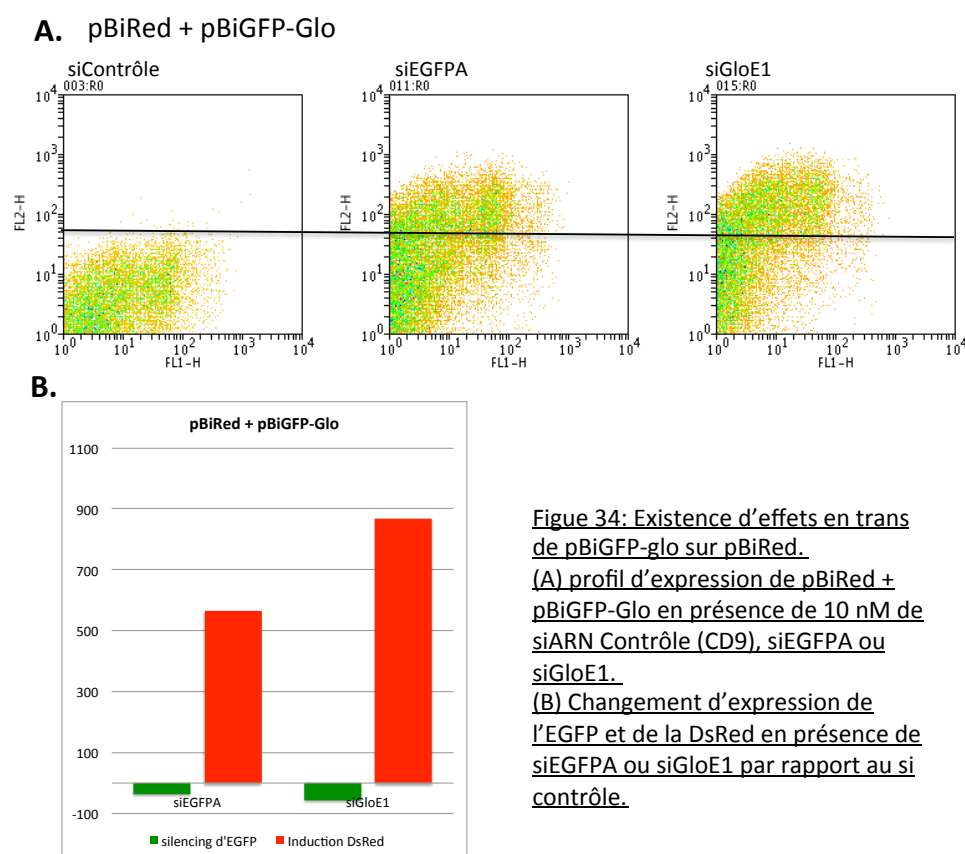


Figure 34: Existence d'effets en trans de pBiGFP-glo sur pBiRed.
(A) profil d'expression de pBiRed + pBiGFP-Glo en présence de 10 nM de siARN Contrôle (CD9), siEGFPA ou siGloE1.
(B) Changement d'expression de l'EGFP et de la DsRed en présence de siEGFPA ou siGloE1 par rapport au si contrôle.

En effet, alors que le vecteur d'expression pour la DsRed est le même que dans les expériences précédentes, son expression est beaucoup plus faible, une diminution de plus de dix fois du niveau maximal d'expression de la DsRed. De fait, le profil obtenu est très voisin de celui de pBiFluo-Glo. Ces observations, en association avec les données obtenues en l'absence des séquences globine, suggèrent que dans les deux

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

cas (en *cis* et en *trans*) il existe un silencing de la DsRed lorsqu'elle est exprimée dans la même cellule qu'un plasmide GFP-Glo. De plus, le silencing du messenger EGFP-Glo conduit à une dérèpression de l'expression de la DsRed que ce soit en *cis* ou en *trans*. L'effet limité de la linéarisation de pBiFluo-Glo sur l'induction de la DsRed suggérait l'existence de transcrits antisens issus de la région β -globine, le silencing en *trans* du plasmide pBiRed suggère l'existence d'un médiateur soluble produit par pBiGFP-Glo.

Les régulations transcriptionnelles par les petits ARN observées chez *S. pombe* agissent principalement en *cis*. Cependant lorsque la production de petits ARN est suffisamment élevée, on peut aussi observer des effets en *trans* spécifiques de séquence. Par analogie, on peut supposer que le plasmide pBiGFP-Glo produit des ARN antisens qui recouvrent la région du promoteur bidirectionnel en quantité suffisante pour agir en *trans* sous forme de simple brin ou de double brin. Le ciblage par le complexe RISC aboutissant à la diminution de la production de ces transcrits antisens par le plasmide pBiFluo-Glo.

Bilan

En conclusion, l'induction peut être observée dans le modèle transfection transitoire et les réponses sont plus fortes que dans le clone α 1A. De plus, la facilité de mise en œuvre de ce modèle et la possibilité de comparer des constructions différentes rend possible des études plus complètes sur le mécanisme de l'induction. Dans cette section cette approche a été illustrée par l'utilisation de nombreux petits ARN, la validation de la spécificité de l'induction liée à la présence de sites de fixation sur le messenger EGFP et par les données sur la densité de Pol II et l'induction bidirectionnelle de la construction.

De plus, les expériences de linéarisation des constructions avant transfection et de co-transfection de constructions monofluorescentes montrent que le mécanisme de l'induction est en partie différent dans le cas de pBiFluo et de pBiFluo-Glo. pBiFluo obéit à un schéma simple dans lequel l'induction nécessite que le plasmide soit circulaire et n'agit qu'en *cis* lorsque l'EGFP et la DsRed sont exprimées à partir du même promoteur. Par contre, le cas de pBiFluo-Glo apparaît plus complexe avec à la fois une induction de constructions

Résultats II – Etude de l'induction en transitoire

linéarisées et une possibilité d'induire l'expression en *trans*. En fait, le côté particulier de pBiFluo-Glo est déjà détectable dans son profil d'expression avec un silencing de la DsRed qui est observable aussi bien en *cis* qu'en *trans*.

3^{ème} Partie : Recherche de transcrits antisens

Les données de linéarisation apportent une démonstration indirecte du rôle de la transcription convergente dans l'induction de la DsRed. Nous avons donc cherché à mettre en évidence des transcrits antisens tout en sachant qu'un rôle de la transcription n'implique pas nécessairement la production d'ARN stables.

3.1 Approche par RT-PCR quantitative spécifique de brin

La PCR quantitative a l'avantage d'être très sensible et d'une grande flexibilité dans le choix de la région amplifiée. Par contre, dans une application à l'étude de transcrits, il faut d'abord procéder à une étape de transcription inverse ce qui est susceptible de faire perdre une partie des informations initiales. Ainsi, dans le cas classique d'une transcription inverse à partir d'une amorce oligodT, la polarité (sens ou antisens) du transcrit est perdue. En principe, l'utilisation d'une amorce spécifique d'un transcrit permet de conserver cette information. Cependant, on peut s'attendre à ce que cette notion de transcription inverse spécifique de séquence ne soit pas absolue mais plutôt soit beaucoup plus efficace à partir du site complémentaire qu'à partir de sites partiellement complémentaires. Cette approche n'est donc fiable que lorsque l'abondance des transcrits sens et antisens n'est pas trop différente. Une autre source de difficulté vient de ce que, dans nos expériences en transitoire, nous introduisons du plasmide dans les cellules qui inévitablement contaminera les préparations d'ARN même après un traitement à la DNase.

Afin de nous placer dans de bonnes conditions de spécificité, nous avons utilisé la M-Mulv premium reverse transcriptase ayant une température de polymérisation plus élevée que la moyenne, qui est utilisable à 50-60°C. De plus, nous avons choisi des amorces de 16 nucléotides qui ont des températures de fusion autour de 50°C.

Les positions des amorces de reverse transcription sur le plasmide sont indiquées dans la Figure 35. Leur désignation comprend la position du nucléotide 5' de l'amorce et une indication sur sa polarité par rapport au transcrit prédominant dans la région de l'ARN messenger EGFP ou DsRed suivant le cas. Les amorces sens qui permettent la reverse transcription de transcrits antisens sont indiquées en bleu (par exemple 766s)

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

et les amorces antisens (qui permettent la détection de l'ARN messager) en rouge (par exemple 1387as). La position des amplicons pour la réaction de PCR est indiquée par les deux amorces utilisées (par exemple 769-897) ; lorsqu'il y a une différence dans la numérotation entre pBiFluo-Glo et pBiFluo, cette dernière est indiquée en bleu. Les séquences de toutes les amorces sont indiquées dans les Matériels et Méthodes.

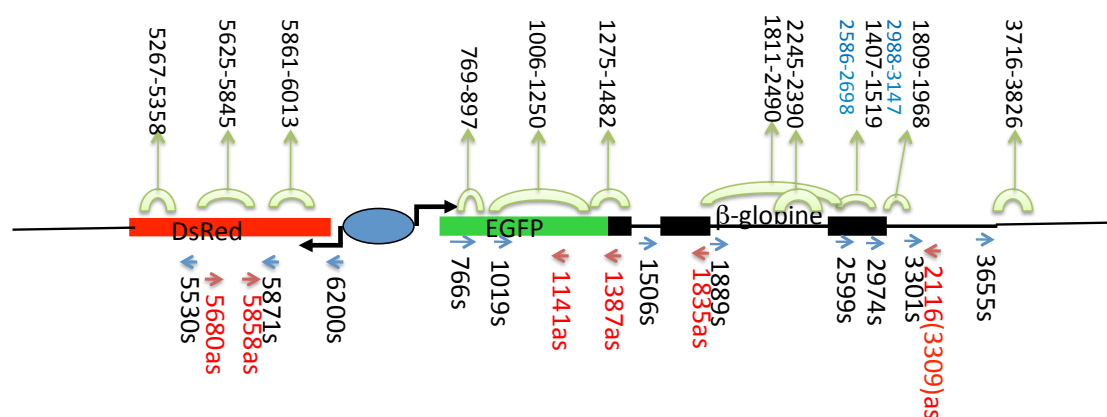


Figure 35 : Carte des positions des amorces de RT et des amorces de PCR sur la construction pBiFluo-Glo (position relative au pBiFluo marquée en bleu pour les amplicons).

3.1.1 Exemple d'analyse par RT-PCR

Pour illustrer l'approche expérimentale et l'analyse des résultats, je présente en détail le cas d'une analyse de la région EGFP dans des ARN de cellules transfectées par pBiFluo-Glo. La transcription inverse est réalisée à partir de 500 ng d'ARN totaux en présence de 1.5 pmole d'amorce spécifique du plasmide pBiFluo-Glo en utilisant l'amorce 766s ciblant un transcrit EGFP antisens, ou 1141as ciblant l'ARNm EGFP et 1.5 pmole d'une amorce spécifique du messager GAPDH (GAPDH727as). Le protocole de réverse transcription est détaillé dans les Matériels et Méthodes et comprend un ajout de la réverse transcriptase à 57°C suivi d'une diminution progressive de la température jusqu'à 46°C. Pour avoir une estimation de la fidélité de la réaction de réverse transcription un échantillon est préparé avec une amorce qui ne devrait pas générer de signal pour les amplicons étudiés (dans ce cas 1506s). Par ailleurs un échantillon non soumis à la réverse transcription, est analysé par PCR pour connaître la contamination éventuelle par l'ADN. L'amplification a été faite dans un appareil LightCycler et le seuil d'amplification (Ct) a été déterminé par la dérivée seconde de la fluorescence mesurée dans chaque tube. Les données présentées sont la

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

moyenne de l'analyse faite en triplicata au sein de la même expérience.

Tableau 4 : Analyse des transcrits en RT-PCR spécifique de séquence.

RT \ Amplicon	GAPDH	769-897(amplicon EGFP)
766s+GAPDH727	22 ± 0.5	28.6 ± 0.5
1141as+GAPDH727	23 ± 0.3	18.2 ± 0.5
1506s+GAPDH727	22.4 ± 0.2	29.5 ± 0.3
Echantillon sans RT	Pas de signal	34.4

Les ARN totaux de cellules transfectées par pBiFluo-Glo ont été rétro-transcrits avec les amorces indiquées dans la colonne de gauche ; puis une PCR a été effectuée et les amplicons sont indiqués sur la ligne du haut. La valeur moyenne et l'écart-type du cycle critique, déterminés par la dérivée seconde de la fluorescence, sont indiqués.

On constate tout d'abord qu'en absence de transcription inverse, un faible signal est détectable pour l'amplicon EGFP (769-897) mais pas pour la GAPDH, en accord avec l'idée qu'il subsiste une petite contamination de l'ARN par du plasmide transfecté. Dans cette expérience comme dans toutes celles qui suivent, le niveau de cette contamination est toujours plus faible que celui des autres signaux. L'amplification de la GAPDH a été utilisée comme référence pour la quantité d'ADNc et donc les signaux ont été définis par la valeur de $\Delta Ct = Ct \text{ pBiFluo-Glo} - Ct \text{ GAPDH}$. Pour une amplification efficace, un cycle correspond à une différence de 2 dans la concentration initiale en ADNc. On peut constater que le signal GAPDH varie assez peu entre les différents échantillons qui est d'environ 0.6 cycle entre les deux extrêmes, ce qui suggère qu'il y a peu de problème de compétition entre amorces de RT. Par contre, comme attendu, les signaux spécifiques de la construction indicatrice diffèrent fortement en fonction des amorces. Ainsi, alors que le messenger EGFP est détecté avant celui de la GAPDH $\Delta Ct = + 4.8$, l'inverse est vrai pour l'ARN antisens $\Delta Ct = - 6.6$, soit une différence entre les deux signaux de 11.4 cycles, ce qui correspond à un facteur 2702 si l'on suppose une efficacité de 100% par cycle, 2000 pour une efficacité de 95 %. Le premier résultat est donc que dans la région 769-897 les transcrits antisens sont 2000 fois moins abondants que l'ARN messenger. En fait, il est difficile de conclure que le signal observé est vraiment dû à des transcrits antisens

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

puisque dans l'échantillon contrôle (RT 1506s, qui ne peut générer d'ADN amplifiable dans l'amplicon 769-897, Figure 35) on observe un signal presque aussi fort $\Delta Ct = -7.1$ (au lieu de -6.6). Cet échantillon sert donc à mesurer la spécificité de la RT. La figure 36 présente ces résultats sous une forme graphique en utilisant le signal GAPDH comme référence ; on peut observer aisément l'écart important entre la détection de l'ARN messager EGFP (en vert) et d'un transcrit antisens éventuel (en bleu), ainsi que la faible différence entre le transcrit antisens et le signal non spécifique (en gris foncé).

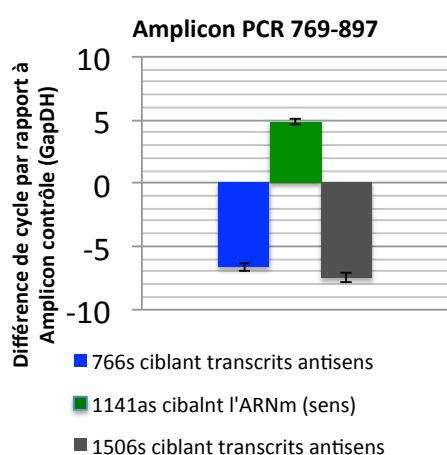


Figure 36 : Présentation des données de l'analyse RT-PCR sous forme d'histogrammes.

Ce résultat essentiellement négatif pourrait venir du choix de la région amplifiée située à proximité immédiate du promoteur bidirectionnel. Aussi j'ai utilisé la même approche pour couvrir les différentes régions du plasmide pBiFluo-Glo, en utilisant les amorces de reverse transcription et les amplicons de la Figure 35.

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

3.1.2 Analyse de la région EGFP-Glo de pBiFluo-Glo

Les Figure 37A et B présentent les différentes amorces utilisées dans cette analyse qui comprend sept amplicons qui couvrent l'ensemble de la région transcrite pour produire le messenger EGFP-Glo, y compris après le site de polyadénylation. Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes comme dans le cas précédent mais avec plus d'amorces de RT (cinq pour la Figure 37A et trois pour la figure 37B).

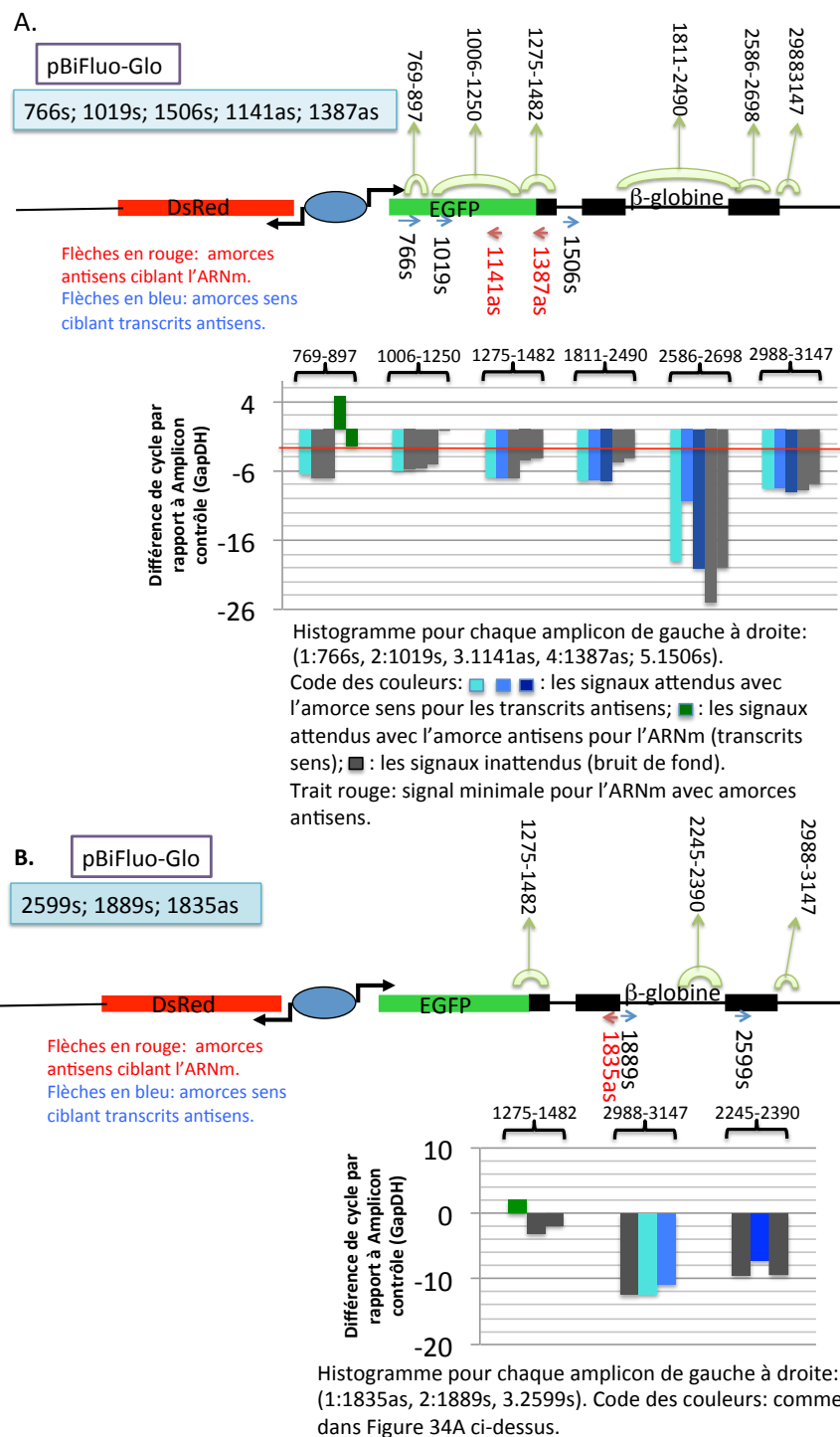


Figure 37 : Schéma de la région EGFP-Glo sur le pBiFluo-Glo avec les amorces RT spécifiques pour la recherche des transcrits antisens. Les amorces sens (flèches bleues: 766s, 1019s, 1506s) ciblent les transcrits antisens potentiels. Les amorces antisens (flèches rouges : 1141as, 1387as) ciblent l'ARNm (sens). (A) les amplicons dans la région codante. (B) Deux amplicons dans la région non-codante par rapport à un amplicon dans la région codante.

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

Pour chaque amplicon, les différents échantillons de RT sont présentés dans le même ordre. Les signaux correspondant à l'ARN messenger EGFP sont en vert, ceux des transcrits antisens en bleu et les signaux non spécifiques en gris foncé. Ce code couleur met en évidence l'absence de différence entre les signaux antisens et les signaux non spécifiques déjà observée dans l'analyse précédente. On peut aussi remarquer que l'écart entre le messenger EGFP et les signaux non spécifiques est très variable suivant les amorces de RT et l'amplicon utilisé. Il n'est que de quatre cycles dans une des situations de la Figure 37B. Par ailleurs, pour les deux amplicons introniques de la Figure 37B, les signaux sont plus faibles que ceux observés en moyenne dans la série de la Figure 37A à l'exception du cas de l'amplicon 2586-2698. Ceci est attendu compte tenu de la moindre abondance des ARN pré-messagers, et peut être pris comme une indication de la spécificité de la reverse transcription par rapport aux ARN pré-messagers. Finalement, les études sur les cellules transfectées par pBiFluo-Glo ne permettent pas d'identifier de transcrits antisens à des niveaux qui puissent être clairement distingués de la limite de la spécificité de la reverse transcription. La limite supérieure pour l'abondance de transcrits antisens varie en fonction des amorces et des amplicons, mais elle est typiquement de l'ordre de 100 à 1000 fois plus faible que l'abondance des ARNm EGFP.

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

3.1.3 Résultats sur l'ARN messager EGFP de pBiFluo

L'induction étant plus forte et les régulations agissant en *trans* dans le cas de pBiFluo-Glo, on peut supposer que le niveau des transcrits antisens est plus élevé que dans le cas de pBiFluo. J'ai néanmoins recherché la présence de transcrits antisens dans les ARN de cellules transfectées par pBiFluo. De nouveau, les signaux antisens ne sont pas différents des signaux non spécifiques (Figure 38).

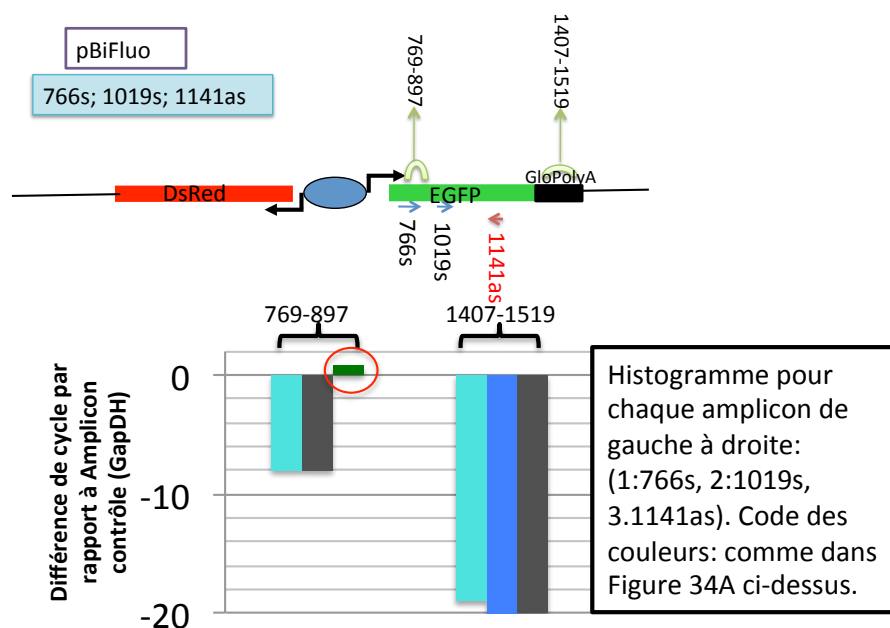


Figure 38 : Schéma des transcrits antisens et sens dans la région codant d'EGFP sur le pBiFluo en utilisant deux amplicons 769-897 et 1407-1519. L'amorce 1141as (flèche rouge) cible l'ARNm de l'EGFP. L'amorce 766s et 1019s ciblent les transcrits antisens potentiels.

3.1.4 Résultats sur l'ARN messager DsRed de pBiFluo

Les données d'induction montrent que nos constructions indicatrices sont asymétriques puisque le silencing de la DsRed n'induit que faiblement (pBiFluo) ou pas du tout (pBiFluo-Glo) l'expression de l'EGFP. L'interprétation la plus simple, confortée par la différence de comportement entre pBiFluo et pBiFluo-Glo, est qu'il existe une régulation spécifique du côté EGFP de la construction, par exemple à travers la présence de transcrits antisens. Cependant d'autres schémas sont possibles dans lesquels une partie de la régulation serait déplacée du côté DsRed même si la réponse est induite par un silencing de l'EGFP (voir Discussion). Nous avons donc

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

recherché aussi la présence de transcrits antisens dans la région concernant de la DsRed.

Les résultats obtenus sont présentés dans figure 39, en indiquant en rouge les messagers DsRed et en bleu les transcrits antisens), les signaux non spécifiques étant en gris foncé. Comme pour les études dans la région d'EGFP, nous n'avons pas détecté de signaux qui soient significativement au-dessus des signaux non spécifiques.

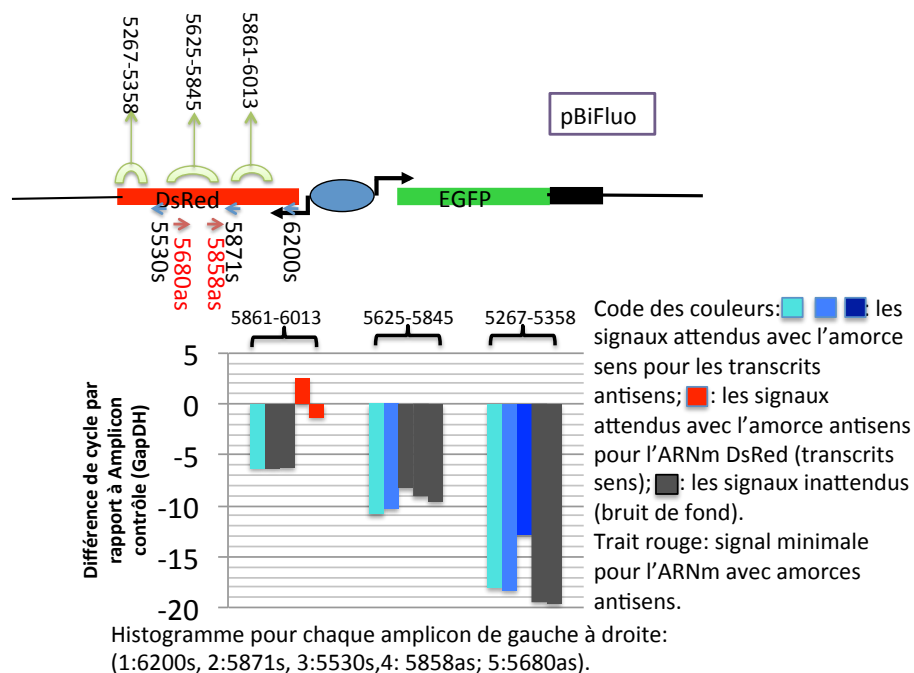


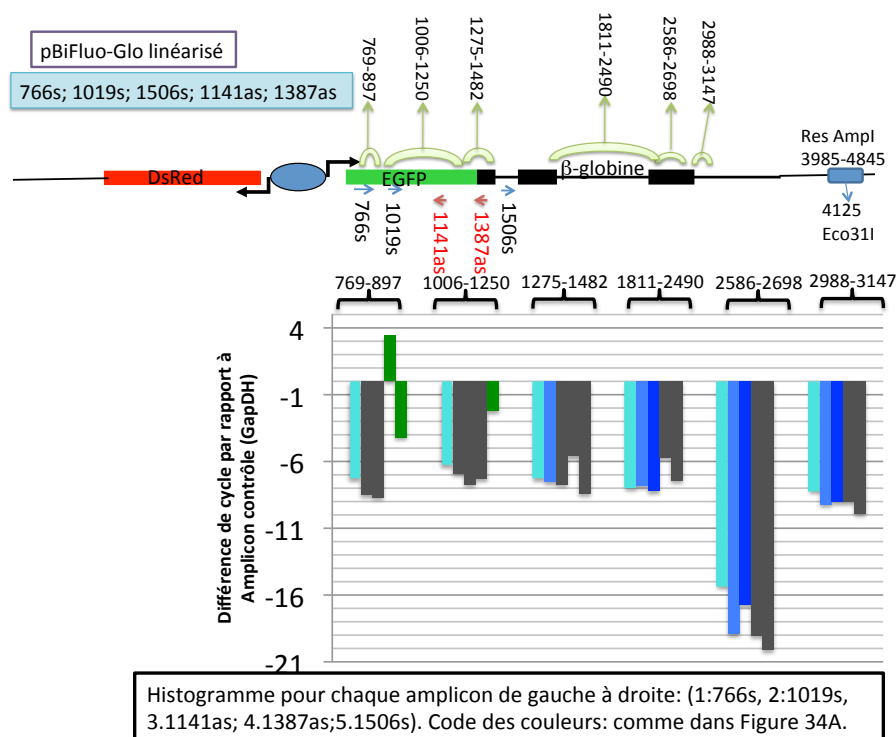
Figure 39 : Schéma des transcrits antisens et sens dans la région codante de la DsRed sur le pBiFluo en utilisant 3 différents amplicons PCR : 5267-5358 ; 5625-5845 ; 5861-6013. Les signaux attendus pour les transcrits antisens sont en couleur bleu. Dans cette figure, nous observons qu'il n'y a pas de signaux au-dessus du bruit de fond en utilisant l'amplicon et l'amorce RT qui ciblent les transcrits antisens.

3.1.5 Différence de signal entre les plasmides circulaires et linéaires

Dans les expériences précédentes, la définition du signal non spécifique est indirecte puisqu'elle repose sur l'utilisation d'une amorce différente pour estimer le niveau d'amorçage de la transcription inverse sur le messager EGFP. Globalement, on observe une bonne concordance dans ces signaux non spécifiques obtenus avec différentes amorces. Toutefois on ne peut complètement exclure qu'un signal du même ordre que les signaux non-spécifiques soit en fait un signal authentique de transcrits antisens. J'ai donc effectué une étude complémentaire en utilisant des

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

plasmides linéarisés. Dans le cadre du modèle de K. Morris, la linéarisation diminue l'induction parce qu'elle diminue la production de transcrits antisens, aussi devrait-on observer une diminution du signal dans les expériences de RT-PCR. La figure 40 présente les résultats d'une étude similaire à celle présentée de la Figure 40 mais faite sur des ARN de cellules transfectées avec le plasmide linéaire. Dans cette expérience le plasmide a été linéarisé par Eco32I, le site étant indiqué dans la figure 40. Le profil est remarquablement voisin de celui observé avec le plasmide circulaire (Figure 37) ce qui conforte l'idée que dans ces expériences précédentes, le signal observé pour les transcrits antisens n'était pas significativement au dessus des signaux non-spécifiques. On peut cependant remarquer une baisse du signal correspondant aux ARN messagers EGFP, en accord avec les données de cytométrie qui montrent une expression plus faible des plasmides linéarisés. L'analyse des ARN extraits des cellules transfectées avec des plasmides linéarisés a été effectuée pour toutes les combinaisons d'amorces de RT et d'amplifons présentées dans les expériences de cette partie de données sans mettre en évidence de modification spécifique (données non présentées).



site de résistance à l'ampicilline. Le site de linéarisation Eco31I est marqué : site 4125.

Bilan

En conclusion, l'approche par PCR avec une réverse transcription spécifique ne nous a pas permis de mettre en évidence de transcrits antisens. La sensibilité et la spécificité de cette approche dépendent fortement des amorces utilisées mais dans la plupart des cas, nous pouvons conclure que les transcrits antisens s'accumulent à des niveaux qui sont au moins 100 plus faibles que celui de l'ARN messager de la région étudiée (que ce soit dans la région d'EGFP ou DsRed).

3.2 Recherche d'ARN antisens par Northern

En principe, la sensibilité de l'approche PCR est supérieure à celle des techniques classiques comme les Northern blots. De plus, par une analyse locale sur un petit fragment défini par l'amplicon l'analyse par PCR ne demande pas que les transcrits aient une taille définie. Inversement, l'approche par Northern peut fournir d'autres informations sur les transcrits comme leur taille et sa sensibilité dépend d'un bruit de fond qui n'est pas de même nature que dans le cas des expériences de RT-PCR. J'ai donc recherché si l'on pouvait détecter des transcrits antisens par Northern. La polarité des ARN détectés provient cette fois de la nature de la sonde utilisée une sonde ARN transcrite *in vitro*. Comme pour la réverse transcription, on sait que cette spécificité n'est pas absolue, la transcription *in vitro* générant même dans les cas les plus favorables, par exemple le matrice linéarisée avec une enzyme qui génère une extrémité 5' protubérante, de l'ordre de 1% d'ARN antisens.

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

La Figure 41 présente un exemple d'analyse avec une sonde antisens (panneau de haut, pour détecter le messenger EGFP) et une sonde sens (panneau de bas) des ARN de cellules transfectées par pBiFluo-Glo. Les signaux détectés avec la sonde antisens sont en accord avec ce qui est attendu, c'est à dire un silencing efficace est observé par siEGFPA et siGloE1, l'expression du plasmide linéarisé par XmnI étant plus faible. Par contre, dans cette expérience comme dans d'autres de même nature que j'ai effectuées, le signal que l'on observe avec la sonde sens correspond à la détection du messenger EGFP par la faible composante antisens de la sonde.

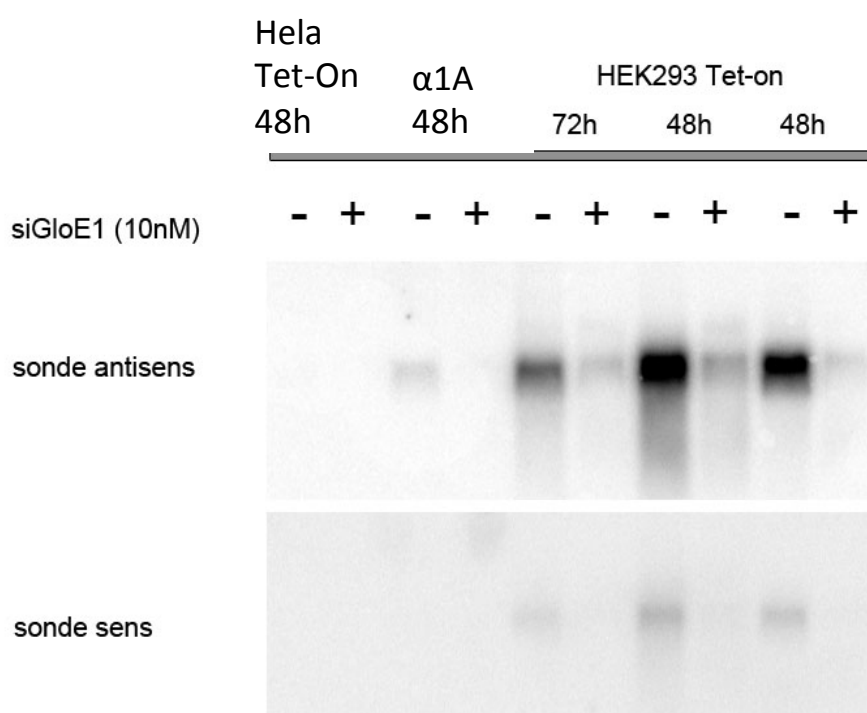


Figure 41 : Recherche par Northern blot de transcrits antisens d'EGFP.

Les ARN totaux extraits de 3 lignées de cellules ou à différents temps post-transfection sont indiqués. Le panneau du haut présente l'hybridation avec une sonde antisens pour détecter l'ARNm de l'EGFP ; le panneau du bas est l'hybridation avec une sonde sens qui cible les transcrits antisens potentiels. L'hybridation avec la sonde sens a été faite sur le filtre avant l'hybridation avec la sonde antisens.

Résultats III – Recherche de transcrits antisens

Bilan

Bien que les données sur les plasmides linéarisés suggèrent très fortement l'implication d'une transcription antisens, je n'ai pas réussi à détecter de tels transcrits que ce soit dans des expériences de Northern ou de RT-PCR spécifique de transcrit. Ceci indique que, s'il y a effectivement une transcription antisens, elle ne génère pas de transcrits suffisamment stables pour s'accumuler à un niveau détectable. En fonction des caractéristiques des amorces utilisées, le seuil maximum pour les transcrits antisens varie entre 1/100 et 1/1000 des transcrits sens.

4^{ème} Partie: Les protéines impliquées dans le silencing et l'induction

Que ce soit dans le cas des ARN interférant ou des micro ARN, le mécanisme du silencing par les petits ARN a fait l'objet de nombreuses études. L'élément commun à ces mécanismes est l'implication d'une protéine Argonaute comme composant central du complexe ribonucléoprotéique impliqué dans le silencing (RISC). J'ai donc commencé par aborder la question de l'implication des protéines Argonaute dans le silencing et l'induction observés dans les transfections transitoires. Dans le transfectant stable $\alpha 1A$, nous avons observé que le silencing et l'induction dépendaient de Ago2 et de Ago1. L'approche en transitoire nous permet de reprendre cette étude avec une meilleure sensibilité pour l'induction et la possibilité d'utiliser différentes constructions indicatrices. De plus, la mise en évidence d'un rôle de la transcription convergente soulève la question d'une régulation endogène par des petits ARN double brin dans l'expression de ces constructions.

4.1 Rôle des protéines Argonaute dans le silencing et l'induction

La stratégie utilisée a tout d'abord été de co-transfecter la construction indicatrice, le siARN inducteur et un siARN ciblant un messenger d'une des protéines Argonaute. Une telle approche a évidemment plusieurs limitations dont celle d'utiliser l'interférence pour bloquer l'interférence. On peut donc s'attendre à ce que dans le cas de Ago2, on ne puisse complètement supprimer son expression puisque Ago2 est nécessaire à son propre silencing. De plus, comme l'interférence agit au niveau des ARN messagers et non de la protéine, on ne peut espérer observer un effet qu'après la déplétion du "pool" préexistant de protéine. Dans ces expériences, l'induction de la construction indicatrice à 24 h permet de laisser aux siARN le temps de commencer à agir sur le "pool" de protéines.

Dans un premier temps, j'ai étudié l'expression « de base » des constructions indicatrices en l'absence d'un siARN qui cible les ARN messagers afin d'étudier si un mécanisme de type interférence par l'ARN intervenait dans un silencing « initial » de ces constructions. Dans ce cas, on peut réaliser l'expérience en ne transfectant qu'un

Résultats IV- les protéines impliquées

seul siARN soit contrôle, soit qui cible un des messagers Ago avec la construction indicatrice. Les deux premiers dotplot à gauche de la Figure 42A montre que la co-transfection d'un siContrôle (ici siCD9) et siAgo2 ne change pas le profil d'expression de pBiFluo, par rapport à celui de la co-transfection du siARN Contrôle réalisée deux fois. La Figure 42B montre les changements de fluorescence moyenne induit par les siAgo par comparaison avec l'expression en présence d'un siContrôle (siCD9). Dans ces expériences, aucun changement significatif de l'expression n'est observé en présence des siAgo (1 à 4). Le même résultat a été obtenu avec un autre jeu de siAgo. Ces études indiquent que le silencing initial de la construction pBiFluo ne dépend pas d'un mécanisme de type interférence.

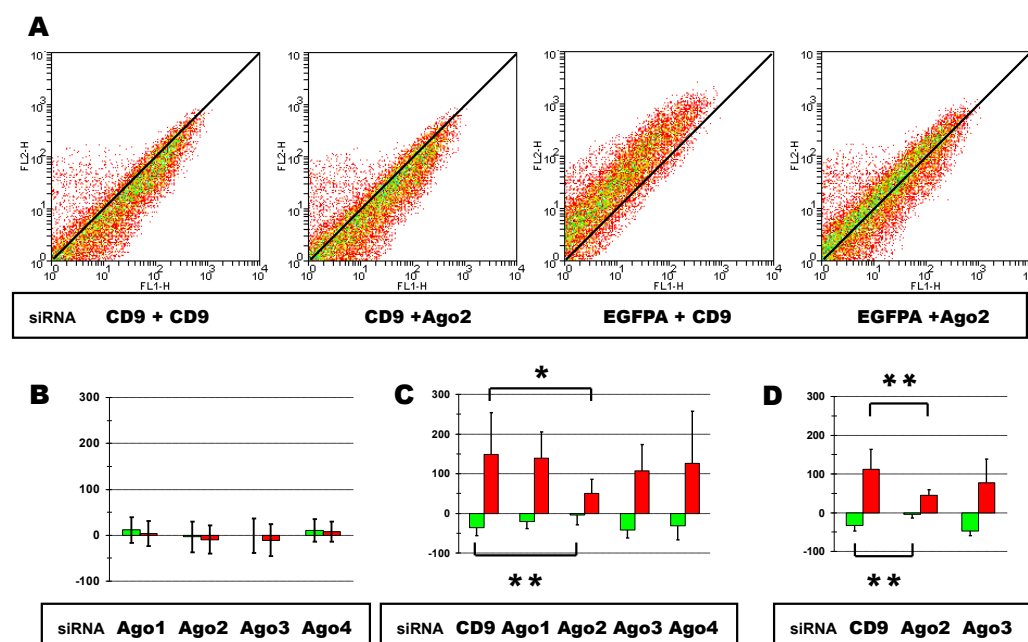


Figure 42 : Impact du silencing des protéines Ago sur l'expression de pBiFluo. (A) dotplot de cytométrie des cellules transfectées avec pBiFluo avec siARN marqué ; (B) expression de base de pBiFluo en l'absence de siARN ciblant l'EGFP ; (C) effet du silencing des Ago par siAgo (5 nM) sur le silencing et l'induction de pBiFluo (siEGFPA, 5 nM) ; (D) quantification du silencing et l'induction de pBiFluo-3miLet7 par silet7b 5 nM (n=4).

Deuxièmement, nous avons étudié le rôle des protéines Ago dans le silencing et l'induction de pBiFluo par le siEGFPA. Dans la figure 42A les deux nuages de points à droite représente la réponse au siEGFPA en présence d'un siARN contrôle (siCD9) ou du siAgo2. Le silencing et l'induction sont clairement observables à travers le déplacement du nuage de points vers la gauche et vers le haut, respectivement. En

Résultats IV- les protéines impliquées

présence du siAgo2, ce déplacement est beaucoup moins marqué dans les deux directions. Cela suggère que le silencing de l'EGFP mais aussi l'induction de la DsRed par siEGFPA dépendent de Ago2. Ces résultats sont quantifiés dans la Figure 42C à travers les valeurs moyennes de fluorescence. Nous observons que le siAgo2 diminue de manière significative le silencing ($p < 0.01$ dans un test de student) et l'induction ($p < 0.05$). La figure 42D représente l'effet de siAgo2 et siAgo3 sur le silencing et l'induction déclenchés par 5 nM de silet7b sur pBiFluo-3milet7 (trois cibles imparfaites). Les résultats sont similaires à ceux observés avec siEGFPA, siAgo2 diminuant fortement le silencing et aussi l'induction ($p < 0.01$).

Ces résultats suggèrent que le silencing et l'induction dépendent de Ago2 qu'ils soient induits par une interaction avec une cible parfaite ou imparfaite.

4.2 Rôle des protéines TNRC6 dans le silencing et l'induction

Les expériences de co-silencing de Ago indiquent que Ago2 joue un rôle clé sur le silencing et l'induction. Pour le silencing par un petit ARN interférant, ce résultat est le reflet direct du fait que seule Ago2 a une activité endonucléolytique. En ce qui concerne le silencing par les micro ARN, on pourrait s'attendre à ce que les autres protéines Argonaute jouent un rôle dans le silencing ; toutefois comme le micro ARN est introduit sous forme d'un double brin parfait, il est possible que seule Ago2 puisse former un complexe actif en éliminant le brin passager par hydrolyse. Dans le cas de l'induction dont on ne connaît pas encore le mécanisme, l'implication de Ago2 peut correspondre soit à un rôle direct (par hydrolyse de l'ARN) ou indirect, en recrutant le complexe RISC à proximité de la chromatine sur un transcrit naissant. Pour distinguer entre ces deux possibilités, j'ai étudié l'implication des protéines TNRC6/GW182, les constituants le mieux caractérisés des complexes RISC après les protéines Argonaute.

4.2.1 Etude du rôle des protéines TNRC6 par silencing

4.2.1.1 pBiFluo en présence du siEGFPA

Pour analyser le rôle des protéines TNRC6, j'ai réalisé des expériences de co-silencing comme dans l'étude du rôle des protéines Argonaute. Avec différents

Résultats IV- les protéines impliquées

siARN ciblant l'ARNm de TNRC6A, 6B ou 6C (1 nM) qui diminuent spécifiquement et efficacement l'expression de l'ARNm ciblé, j'ai d'abord mesuré le silencing et l'induction de pBiFluo par siEGFPA (1 nM). Nous observons que le "knock-down" de TNRC6A ou TNRC6B inhibe l'induction sans modifier fortement le silencing (Figure 43A). Cela suggère que contrairement au silencing, l'induction nécessite une protéine TNRC6.

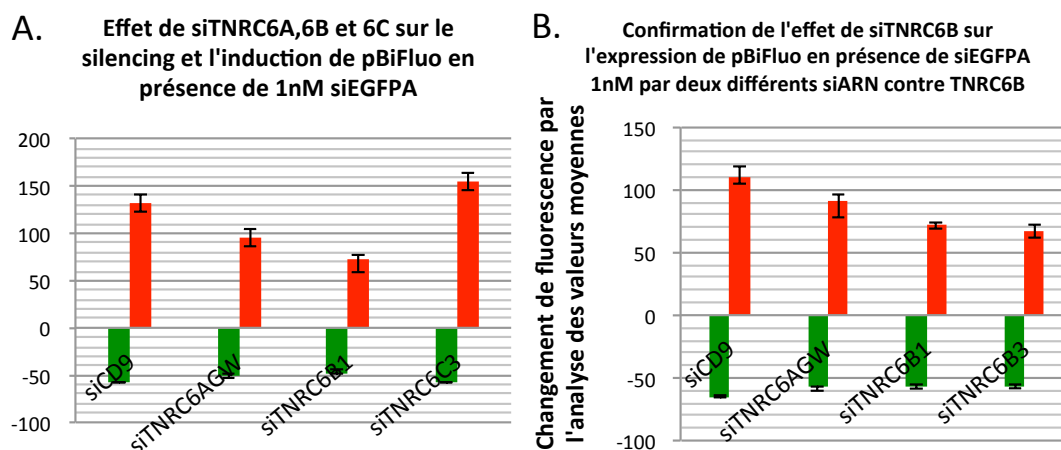


Figure 43: L'induction et le silencing de pBiFluo en présence de siEGFPA dépend de TNRC6 A et B. (A) Effet de siTNRC6A, 6B et 6C étudiés en utilisant les siARN contre TNRC6. Le siTNRC6B1 qui cible TNRC6B inhibe l'induction, ce qui suggère que l'induction dans ce contexte dépend de TNRC6B ; (B) Confirmation de l'effet de TNRC6B par 2 différents siARN contre TNRC6B.

Les histogrammes présentent le silencing et l'induction de pBiFluo par 1 nM siEGFPA en présence de 1 nM siTNRC6 ou siCD9 comme contrôle (n=6).

Ces résultats ont été confirmés avec d'autres siARN et en particulier dans le cas de TNRC6B avec le siTNRC6B3 (Figure 43B, siTNRC6B 1 et 3). Le silencing de TNRC6A a aussi un effet sur l'induction mais moins marqué que celui de TNRC6B. Par contre, au cours de ces expériences je n'ai jamais observé d'effet du silencing de TNRC6C.

4.2.1.2 pBiFluo-glo en présence du siGloE1

La même approche a été utilisée pour étudier le silencing et l'induction de pBiFluo-Glo par siGloE1 (Figure 44). Les résultats sont comparables à ceux observés dans le cas de pBiFluo avec une diminution marquée de l'induction et un maintien du silencing. Du fait de l'induction plus importante dans ce modèle, la réponse au

Résultats IV- les protéines impliquées

silencing de TNRC6B est particulièrement marquée. Comme dans le cas de pBiFluo, le silencing de TNRC6A a un effet plus faible sur l'induction de la DsRed que celui de TNRC6B.

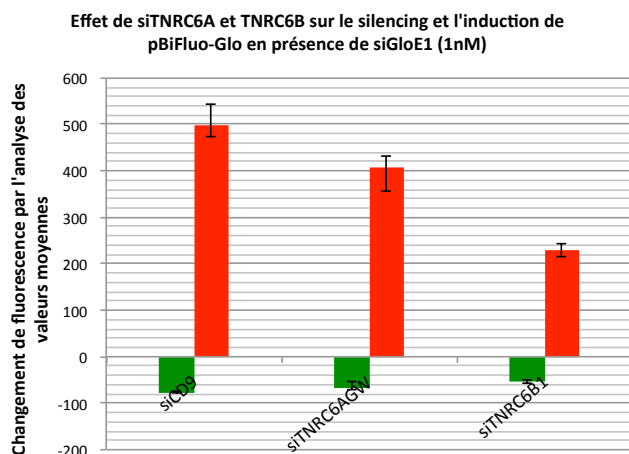


Figure 44: L'induction de pBiFluo-Glo en présence de siGloE1 dépend de TNRC6B.

Les histogrammes présentent le silencing et l'induction de pBiFluo-Glo par 1 nM siGloE1 en présence de 1 nM siTNRC6 ou siCD9 comme contrôle (n=6).

4.2.1.3 pBiFluo-2CXCR4 en présence de siCXCR4

Nous avons vu que chez pBiFluo et pBiFluo-Glo, le silencing de TNRC6A et B inhibe l'induction de manière marquée, sans modifier significativement le silencing. Pour analyser la situation dans le cas d'un micro ARN, j'ai utilisé la construction pBiFluo-2CXCR4 et le micro ARN artificiel CXCR4 initialement construit par le groupe de P. Sharp. Les deux sites CXCR4 sont imparfaitement complémentaires au petit ARN CXCR4 (Figure 45).

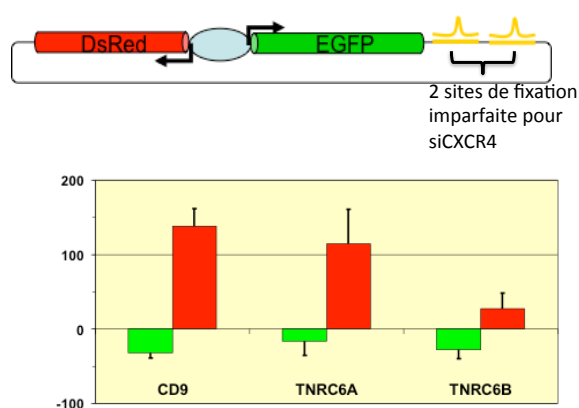


Figure 45: Effet de siARN contre TNRC6A ou 6B sur l'induction de pBiFluo-2CXCR4 par siCXCR4 (1 nM). L'induction de pBiFluo-2CXCR4 en présence de 1nM siCXCR4 dépend à TNRC6B. Par contre, le silencing de TNRC6A diminue fortement le silencing.

Comme on pouvait s'y attendre d'après les données de la littérature, le silencing induit par le micro ARN CXCR4 dépend de TNRC6 et tout particulièrement de TNRC6A (GW182). La réponse en matière d'induction est très proche de celle des autres modèles, avec de nouveau un rôle plus marqué de TNRC6B que de

Résultats IV- les protéines impliquées

TNRC6A.

4.2.2 Etude du rôle de TNRC6B par surexpression

Les résultats des expériences de silencing suggèrent fortement que les protéines TNRC6A et 6B sont impliquées dans l'induction transcriptionnelle des constructions indicatrices. Toutefois cette approche n'est pas sans risque d'artéfacts et, à ce stade l'interprétation, dépend entièrement de la spécificité de l'outil siARN. Même si nous avons obtenu des résultats similaires avec deux siARN différents une autre démonstration de l'implication des TNRC6 était nécessaire.

Une première approche a été de surexprimer TNRC6A ou TNRC6B dans les cellules, ce qui pourrait augmenter l'induction dans le cas où la quantité de TNRC6 serait limitante. Des vecteurs d'expression pour TNRC6A, B, C nous ont été fournis par E. Izzaualde. Ces vecteurs sont construits dans le plasmide pCIneo dans lequel le gène d'intérêt est exprimé à partir d'un promoteur précoce immédiat de CMV et est fusionné en N-terminal avec une séquence HA pour la détection par des anticorps α -HA et λ N pour l'ancrage sur des séquences BoxB, détaillé dans la section 4.2.3 suivante. Comme la construction indicatrice et le vecteur d'expression pour TNRC6B ne sont pas contrôlés par le même promoteur, leur expression n'est pas fortement corrélée dans les cellules transfectées.

J'ai commencé par étudier le rôle de la surexpression de TNRC6A ou B sur le silencing et l'induction de pBiFluo-Glo par siGloE1. Ces expériences sont réalisées par co-transfection de pCIneo-TNRC6A ou B et le rapporteur bidirectionnel en présence d'un siARN, l'expression de la construction indicatrice est induite 24 heures après la transfection (Figure 46). On n'observe peu de différence entre la transfection d'un plasmide vide (pSP), de TNRC6A ou TNRC6AN, le vecteur qui permet l'expression du domaine N-terminal de TNRC6A, lequel n'a pas d'activité de silencing de type micro ARN. La même constatation peut être faite avec TNRC6B en ce qui concerne les valeurs moyennes de la fluorescence (EGFP et DsRed). Toutefois, dans ce cas, on observe une diminution du nombre de cellules positives (définies par le canal FL2>1 = DsRed >1 dans la lecture à basse sensibilité) en présence de

Résultats IV- les protéines impliquées

TNRC6B. Ceci n'est pas observé avec TNRC6B-N-ter (TNRC6BN), ce qui indique un effet lié au domaine de silencing de TNRC6B. Par contre, en ce qui concerne la question initiale, peut-on augmenter l'induction en surexprimant TNRC6B (ou A), ces expériences ne mettent en évidence aucun effet.

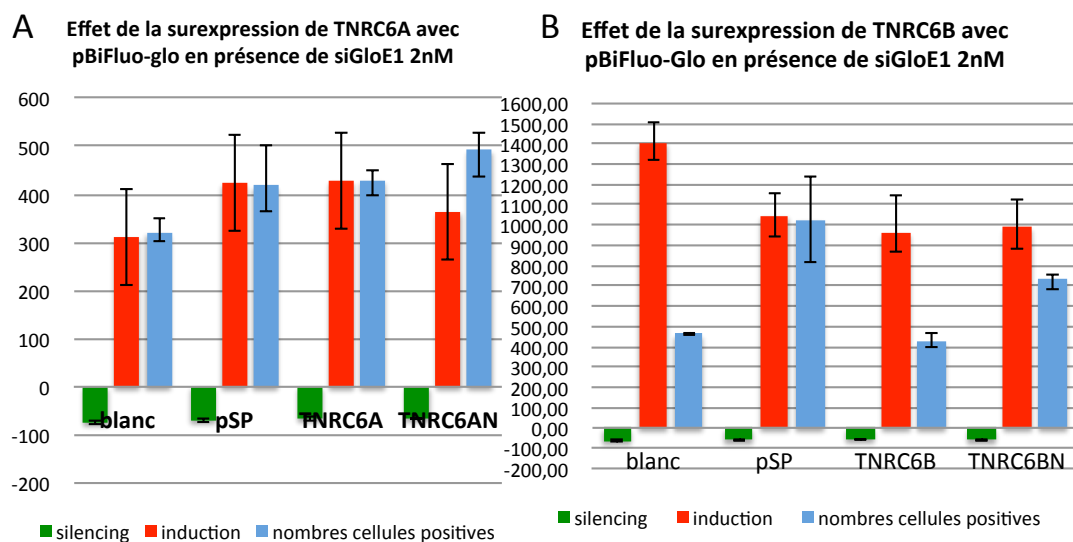


Figure 46 : Silencing et induction de pBiFluo-Glo par siGloE1 en présence de vecteurs d'expression pour TNRC6A ou B. Blanc : simple transfection de pBiFluo-Glo en présence de siGloE1 2nM ; pSP : un plasmide vide.

(A) Surexpression de TNRC6A. Le silencing et l'induction sont mesurés par comparaison entre la transfection de 2 nM siGloE1 et de 2nM de siContrôle (siCD9) ; (B) Surexpression de TNRC6B.

La co-transfection de pSP65, un plasmide contrôle qui ne contient pas de promoteur susceptible de s'exprimer dans les cellules de mammifère, est destinée à équilibrer la quantité d'ARN transfecté dans les différents échantillons. Nous observons que la transfection de ce plasmide contrôle améliore l'expression de la construction indicatrice (Figure 46A), ce qui suggère qu'en augmentant la quantité d'ADN on améliore l'efficacité de transfection.

Dans le cas de l'expérience avec les constructions TNRC6B (Figure 46B), la réponse à pSP est un peu plus difficile à analyser du fait d'une différence entre les niveaux d'induction et de silencing et le nombre de cellules positives. Cette expérience est un peu atypique du fait des valeurs très élevées de l'induction ($> 10x$) ; par contre on observe de nouveau que le nombre de cellules positives augmente si l'on compare la piste pSP au blanc, la simple transfection de pBiFluo-Glo en présence de 2nM siGloE1. Plus inattendue est l'observation que la co-transfection avec TNRC6B

Résultats IV- les protéines impliquées

diminue fortement le nombre de cellules positives, ce qui n'est pas clairement observé avec la construction TNRC6BN-ter. Cet effet inhibiteur de TNRC6B sur l'expression des constructions indicatrices a été observé dans toutes les expériences mais à des niveaux variables ; il ne dépend pas de la présence de petits ARN qui ciblent la construction. Il est donc probable que la surexpression de TNRC6B a un effet non spécifique d'inhibition de la transcription.

Comme l'induction de pBiFluo est plus faible que celle de pBiFluo-Glo, il est possible que celui-ci soit plus sensible à une augmentation de la quantité de TNRC6 dans la cellule dans l'hypothèse où la faible induction serait due à un défaut de recrutement de TNRC6. Toutefois, comme on peut le constater dans la figure 47, la surexpression de TNRC6A n'a pas d'effet significatif sur l'induction de pBiFluo, tandis que pour TNRC6B, on retrouve un effet inhibiteur de l'expression mais pas du silencing ou de l'induction.

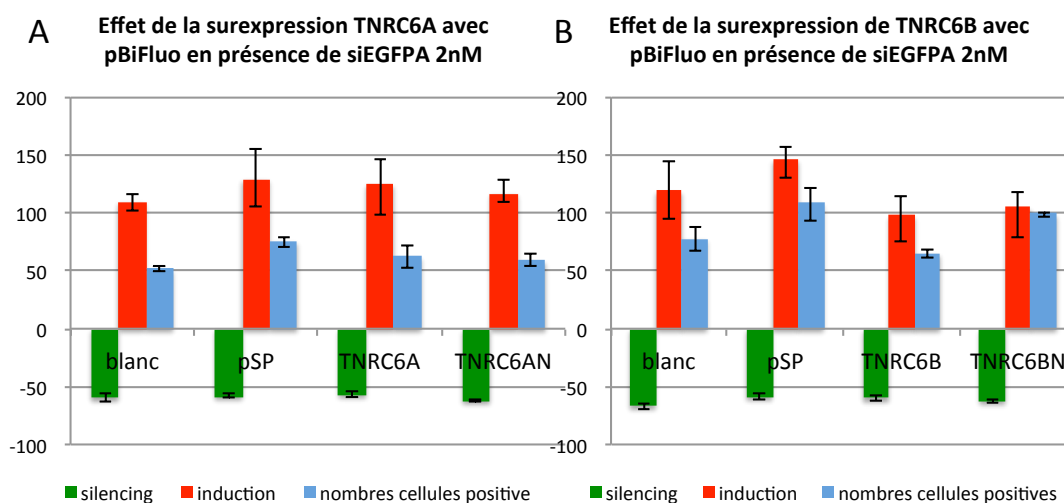
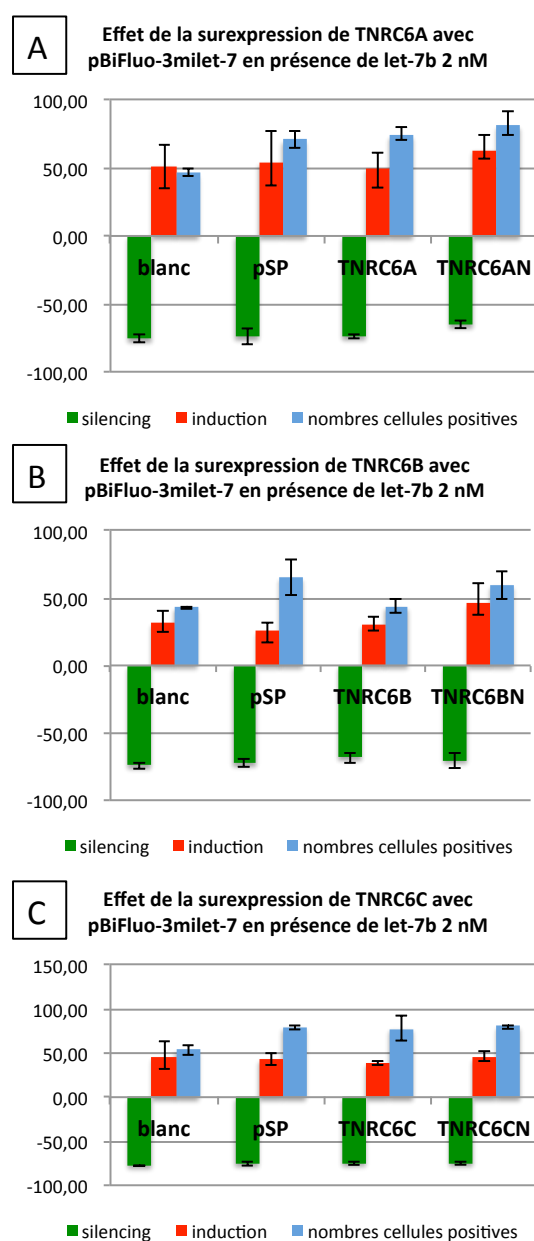


Figure 47 : Silencing et induction de pBiFluo par siEGFPA en présence de vecteurs d'expression pour TNRC6 A ou B. Blanc : simple transfection de pBiFluo-Glo en présence de siGloE1 2 nM ; pSP : un plasmide vide.

(A) Surexpression de TNRC6A. Le silencing et l'induction sont mesurés par comparaison entre la transfection de 2 nM siEGFPA et de 2 nM de siContrôle (siCD9). (B) Surexpression de TNRC6B.

Résultats IV- les protéines impliquées

Pour compléter cette étude, j'ai utilisé un vecteur pBiFluo-3milet-7 qui contient trois sites de fixation imparfaits pour let-7. Dans la mesure où les protéines TNRC6 sont nécessaires pour le silencing de type « micro ARN », l'utilisation d'une construction avec des cibles imparfaites pour le petit ARN pourrait être plus pertinente pour détecter un effet lié à l'abondance de TNRC6. En présence de 2 nM let-7b, on n'observe pas d'effet sur l'induction de la surexpression de TNRC6A, B, C (figure 48); mais de nouveau TNRC6B produit une diminution du nombre de cellules positives (figure 48B). Toutefois les niveaux faibles d'induction observés dans ces expériences en particulier dans celle avec TNRC6B ne permettent pas une conclusion



très forte sur ce point. Les données obtenues avec les vecteurs d'expression de TNRC6C sont aussi présentées (Figure 48C) même si notre analyse a montré que le vecteur TNRC6C ne pouvait contenir l'ensemble des régions codantes de TNRC6C. Aussi dans cette analyse ces vecteurs servent-ils de contrôle et renforcent la conclusion sur l'effet inhibiteur de l'expression de TNRC6B.

Figure 48 : Silencing et induction de pBiFluo-3milet7 par let-7 en présence de vecteurs d'expression pour TNRC6 A, B ou C. Blanc : simple transfection de pBiFluo-Glo en présence de siGloE1 2nM ; pSP : un plasmide vide.
 (A) Surexpression de TNRC6A. Le silencing et l'induction sont mesurés par comparaison entre la transfection de 2 nM siEGFP et de 2 nM de siContrôle (siCD9).
 (B) Surexpression de TNRC6B.
 (C) Surexpression de TNRC6C.

L'ensemble des données de surexpression des protéines TNRC6 ne nous a donc pas fourni d'indication supplémentaire sur le rôle de TNRC6 dans l'induction. L'hypothèse la plus simple est que le niveau d'expression de TNRC6 dans les cellules HEK293 est déjà suffisant pour assurer une réponse maximale. Par contre des effets non spécifiques ont été observés dans le cas de la surexpression de TNRC6B, ce qui peut indiquer un rôle dans la régulation de la transcription et compliquer l'interprétation des données obtenues par surexpression de cette protéine.

4.2.3 Etude du rôle de TNRC6B par ancrage

4.2.3.1 Introduction

Pour mettre en évidence de manière positive et pas seulement à travers les expériences de silencing un rôle de TNRC6, j'ai donc utilisé la technique d'ancrage sur ARN. Cette approche a été utilisée pour étudier les régulations post-transcriptionnelles {Gehring, 2003 #1507} et consiste à utiliser une interaction spécifique de séquence entre une protéine et un ARN pour permettre « l'ancrage » de la protéine d'intérêt sur un transcrit. En ce qui concerne l'interférence par l'ARN, on substitue donc à la protéine Argonaute et au petit ARN guide un autre mécanisme spécifique de séquence pour interagir avec l'ARN. Comme on peut s'y attendre, même si on utilise ce mécanisme pour assurer l'ancrage de Ago2, il n'y pas de coupure possible du fait du positionnement « incorrect » de la protéine sur le transcrit (Pillai et al, 2004). Dans ces travaux, j'ai utilisé l'une des deux versions classiques de l'ancrage, celle qui utilise la reconnaissance de la séquence BoxB par le peptide λ N (Gehring et al, 2008).

Les études que j'ai menées ont été réalisées avec la construction pBiFluo dans laquelle j'ai introduit des sites BoxB dans la région transcrite de l'EGFP, après le codon stop mais avant le site de polyadénylation (Matériels et Méthodes). Le principe de ces constructions est d'introduire un bloc de deux sites BoxB, puis d'en ajouter un deuxième et enfin un troisième ; j'ai ainsi généré les constructions pBiFluoBoxBx2, pBiFluoBoxBx4 et pBiFluoBoxBx6. Le profil d'expression de ces différentes

Résultats IV- les protéines impliquées

constructions est similaire à celui de la construction parentale pBiFluo, mais on peut cependant remarquer que l'expression de l'EGFP diminue progressivement en fonction du nombre de sites BoxB. De plus, en présence d'un siEGFPA, on observe le silencing de l'EGFP et l'induction de la DsRed, ce qui indique que la présence des sites BoxB ne modifie pas la réponse de la construction au siEGFPA (Figure 49).

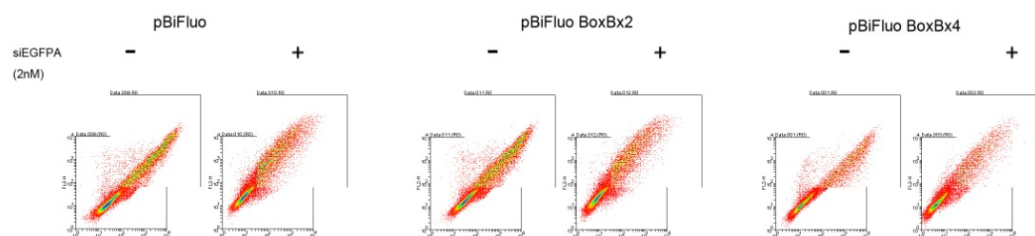


Figure 49 : Profil d'expression de pBiFluo, pBiFluo BoxBx2, pBiFluo BoxBx4, +/-siEGFPA (2 nM). Les données de deux lectures au cytomètre, une à basse sensibilité et l'autre à haute sensibilité sont combinées en un seul graphique.

Il est habituellement considéré qu'il faut au moins quatre sites BoxB pour obtenir une réponse forte à l'activité biologique de la protéine ancrée. J'ai donc commencé par analyser la réponse de mes constructions en fonction du nombre de sites BoxB. La Figure 50 présente la réponse des constructions pBiFluo-BoxB à la co-transfection avec pCIneo- TNRC6B.

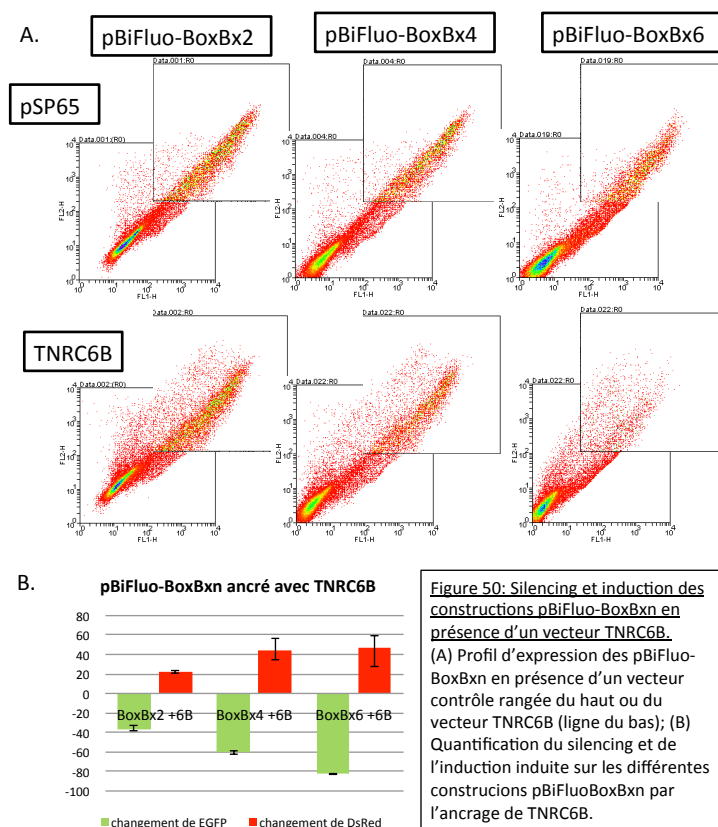


Figure 50: Silencing et induction des constructions pBiFluo-BoxBxn en présence d'un vecteur TNRC6B. (A) Profil d'expression des pBiFluo-BoxBxn en présence d'un vecteur contrôle rangée du haut ou du vecteur TNRC6B (ligne du bas); (B) Quantification du silencing et de l'induction induite sur les différentes constructions pBiFluoBoxBxn par l'ancrage de TNRC6B.

Résultats IV- les protéines impliquées

Les profils de cytométrie indiquent une réponse marquée d'une partie des cellules ; l'image obtenue suggérant que les cellules qui répondent se déplacent perpendiculairement à la distribution initiale, ce qui indiquerait un silencing de l'EGFP et une induction de la DsRed. Cette réponse qui ne concerne qu'une partie des cellules pourrait correspondre au fait qu'il faut un niveau suffisant d'expression de TNRC6, celui-ci dépendant aussi du niveau d'expression de la cellule considérée, ce point sera abordé dans la section 4.2.3.4 suivante. Cette perception d'un silencing et d'une induction est confirmée par les analyses des valeurs moyennes (Figure 50B). Les histogrammes de la Figure 50B ont été obtenus en effectuant une sélection des cellules qui ont une forte expression de la DsRed : FL2 > 20 dans la lecture à basse sensibilité, ce qui permet une meilleure mise en évidence de l'induction même si la réponse à l'ancrage ne concerne qu'une partie des forts expresseurs. Dans la suite des expériences, j'ai utilisé la construction pBiFluo-BoxB4 qui donne une réponse claire à l'ancrage.

4.2.3.2 Etude de la réponse de pBiFluo-BoxBx4 à l'ancrage des protéines TNRC6

Dans un premier temps, j'ai étudié la réponse de pBiFluo-BoxBx4 à l'ancrage des différentes protéines TNRC6. Dans cette première analyse, j'ai aussi inclus des vecteurs pour TNRC6A-Nter et TNRC6B-Nter qui nous avaient été fournis par E. Izaurralde, ces constructions correspondent à la moitié N-ter de ces protéines qui est responsable de l'interaction avec les protéines Argonaute mais n'a pas d'activité de silencing. Ces expériences sont réalisées par co-transfection de 0.25 µg de plasmide pBiFluo-BoxBx4 et 0.25 µg de pCIneo-TNRC6 dans les cellules HEK293 Tet-On cultivées dans un puits d'une plaque de douze. L'expression est induite 24 h après transfection avec 1 µg/mL de doxycycline et la lecture en cytométrie effectuée à 48 h. Certaines expériences ont été lues à 72 h, ce qui permet d'avoir des réponses plus fortes mais avec des effets non spécifiques plus grands. Il est important de souligner que la co-transfection est très efficace dans les cellules HEK293 et ne constitue pas une étape limitante dans cette approche expérimentale. Chaque point est effectué en

Résultats IV- les protéines impliquées

triplicata avec une lecture de 50 000 cellules au cymomètre FACScalibur.

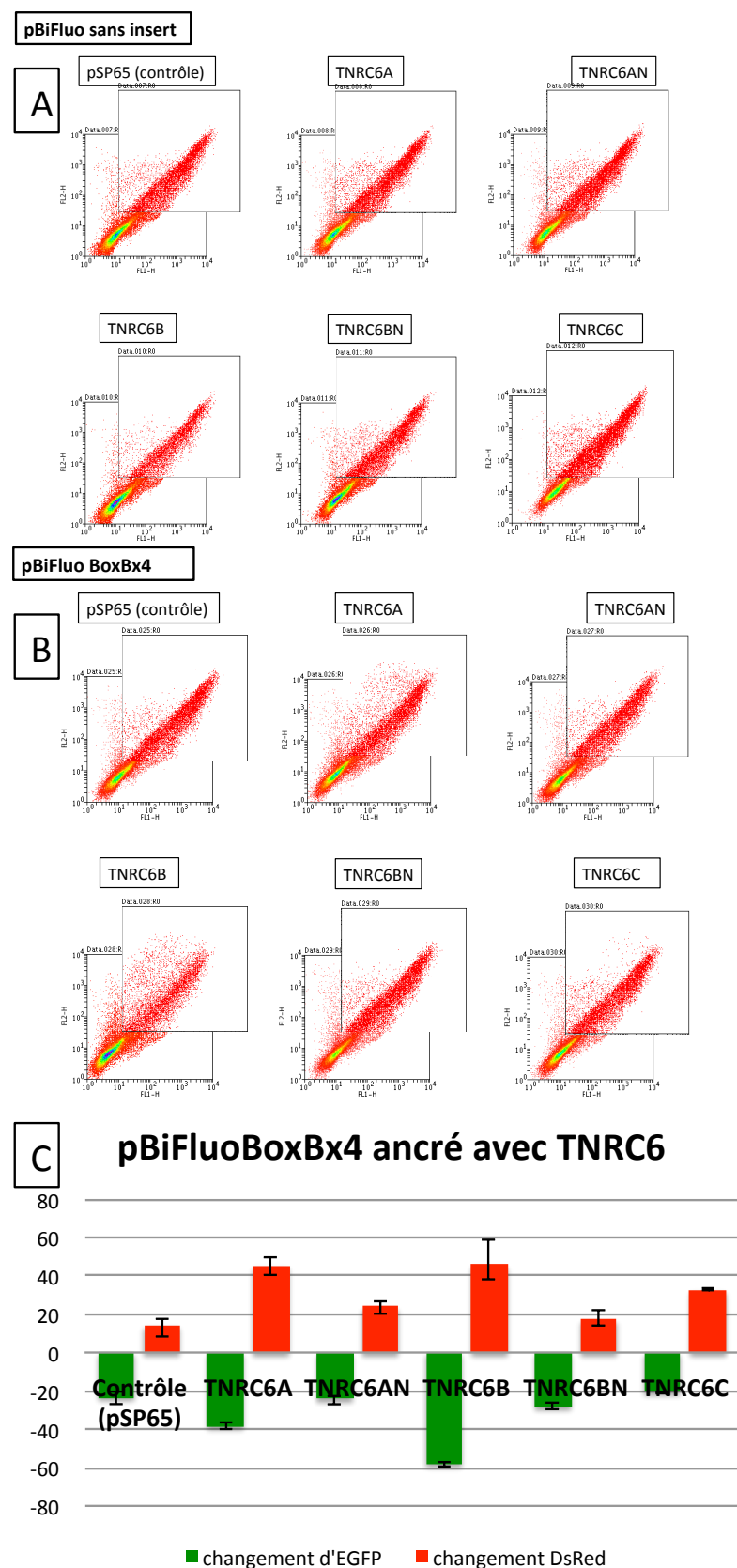


Figure 51 : Réponse de pBiFluo-BoxBx4 à l'ancrage des protéines TNRC6. (A) Profil d'expression de pBiFluo sans insert co-transféré avec les différents vecteurs TNRC6 (B) Profil d'expression de pBiFluo-BoxBx4 co-transféré avec les différents vecteurs TNRC6 (C) Quantification des changements de fluorescence en valeur moyenne (n = 3)

Une première analyse en valeur moyenne de ces co-transfections met en évidence une réponse à l'ancrage de TNRC6A, 6B et 6C (Figure 51). Les domaines N-Terminaux de TNRC6 A et B n'ont pas d'effet significatif, ce qui

suggère que le recrutement des protéines Argonaute sur le transcrit EGFP n'a pas de

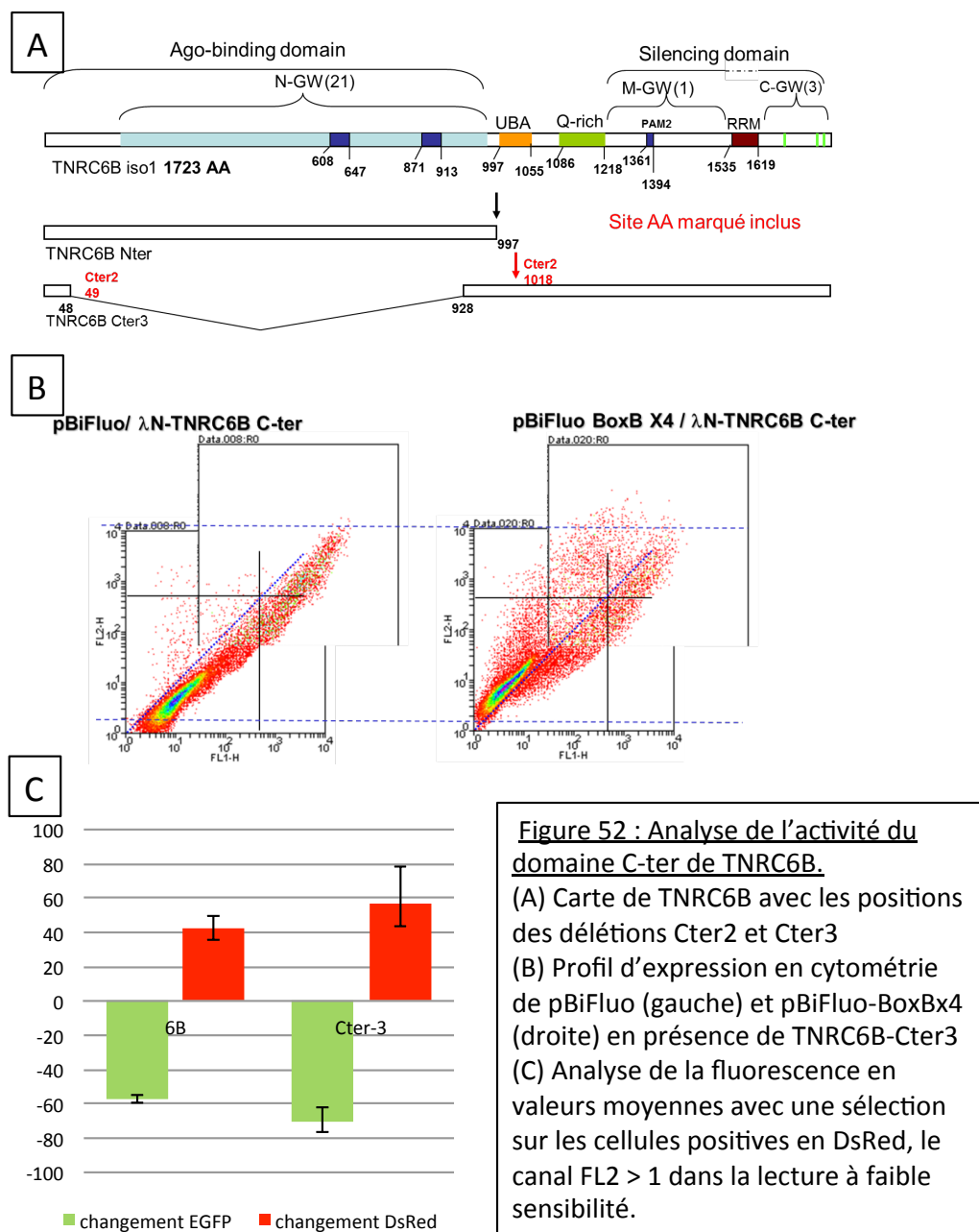
Résultats IV- les protéines impliquées

conséquence importante sur l'expression de pBiFluo-BoxBx4. Dans ces analyses, le silencing est calculé par rapport au niveau d'expression de la construction pBiFluo sans sites BoxB co-transfectée avec la même construction TNRC6. Comme l'indique la colonne contrôle, et en accord avec les résultats généraux présentés dans la section d'introduction 4.2.3.1, la présence des sites BoxB est suffisante pour induire une légère diminution de l'expression de l'EGFP, tandis que la très légère augmentation de l'expression de la DsRed n'est pas toujours observée. En conclusion, ces analyses en valeur moyenne mettent en évidence un silencing de l'EGFP et une induction de la DsRed qui évoquent la réponse au silencing par un siARN mais sont plus faibles en amplitude, lorsqu'on les analyse en valeurs moyennes. Par contre, un examen des profils d'expression met en évidence qu'une partie des cellules répond fortement à l'ancrage avec un effet important sur l'expression de l'EGFP et de la DsRed. Les domaines N-terminaux de TNRC6A et B ont peu d'effet sur l'expression par rapport au contrôle.

4.2.3.3 Analyse des domaines de TNRC6B par ancrage

Comme le domaine N-ter n'a pas d'activité notable sur l'expression, ceci suggère que le domaine C-ter doit être responsable de l'activité d'induction et de silencing observée par l'ancrage de la protéine complète. J'ai donc réalisé différentes délétions dans le vecteur d'expression correspondant TNRC6B afin d'identifier le domaine responsable du silencing et de l'induction, en commençant par l'obtention d'un vecteur permettant l'expression du domaine C-ter (Figure 52). Ces constructions ont été réalisées par une technique de mutagenèse par PCR et pour chaque construction, quatre clones ont été analysés pour se prémunir de l'effet de mutations fortuites au cours de l'amplification. Les premiers acides aminés de TNRC6B ont été conservés dans toutes les constructions pour éviter de modifier l'environnement de l'extrémité N-terminale de la protéine de fusion qui contient en particulier le motif λ N de reconnaissance des sites BoxB.

Résultats IV- les protéines impliquées



Des données comparables ont été obtenues avec deux délétions Cter2 et Cter3 (Figure 52A), les données concernant Cter3 sont détaillées dans les secteurs B et C de la Figure 52. L'examen du profil indique que par comparaison avec une construction indicatrice dépourvue du site BoxB, l'ancrage de TNRC6B-Cter3 induit dans une partie des cellules un déplacement important qui se manifeste, entre autre, par une augmentation de la fluorescence DsRed. Les données en valeur moyenne confirment cette perception visuelle avec un silencing et une induction légèrement plus marquée que dans le cas de la protéine TNRC6 entière. Ainsi, comme attendu d'après les

Résultats IV- les protéines impliquées

descriptions des domaines fonctionnels de TNRC6, les activités effectrices sont portées par la moitié Cter de TNRC6.

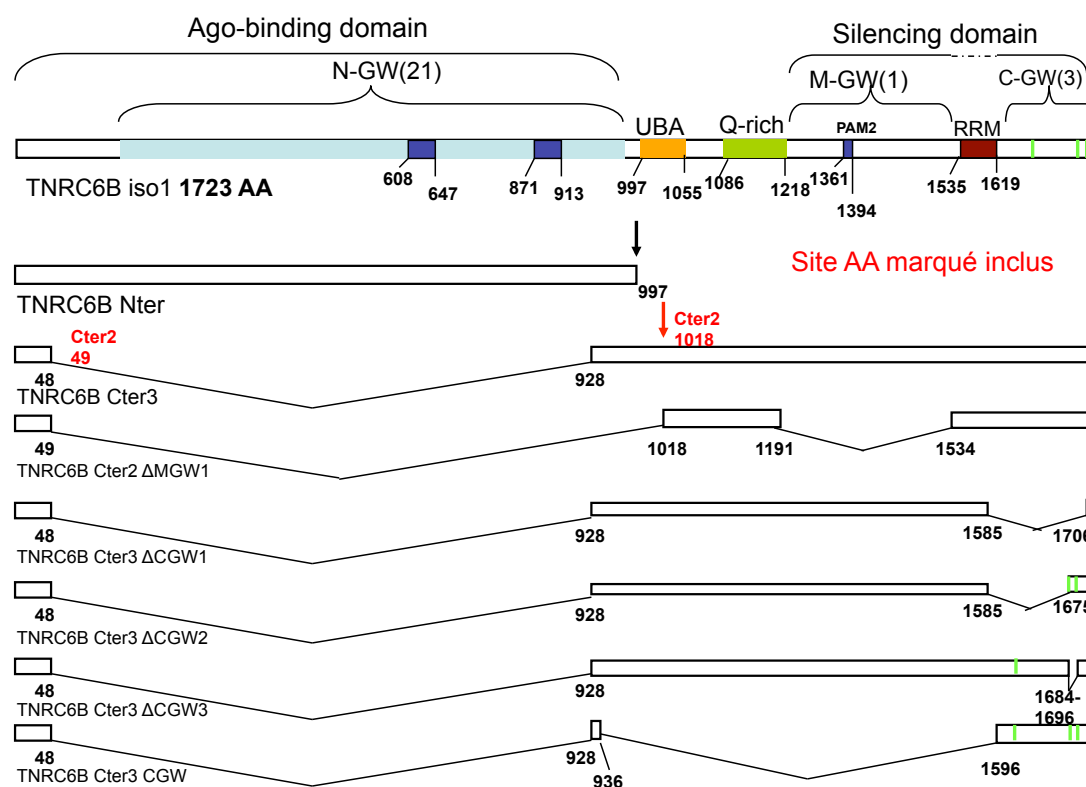
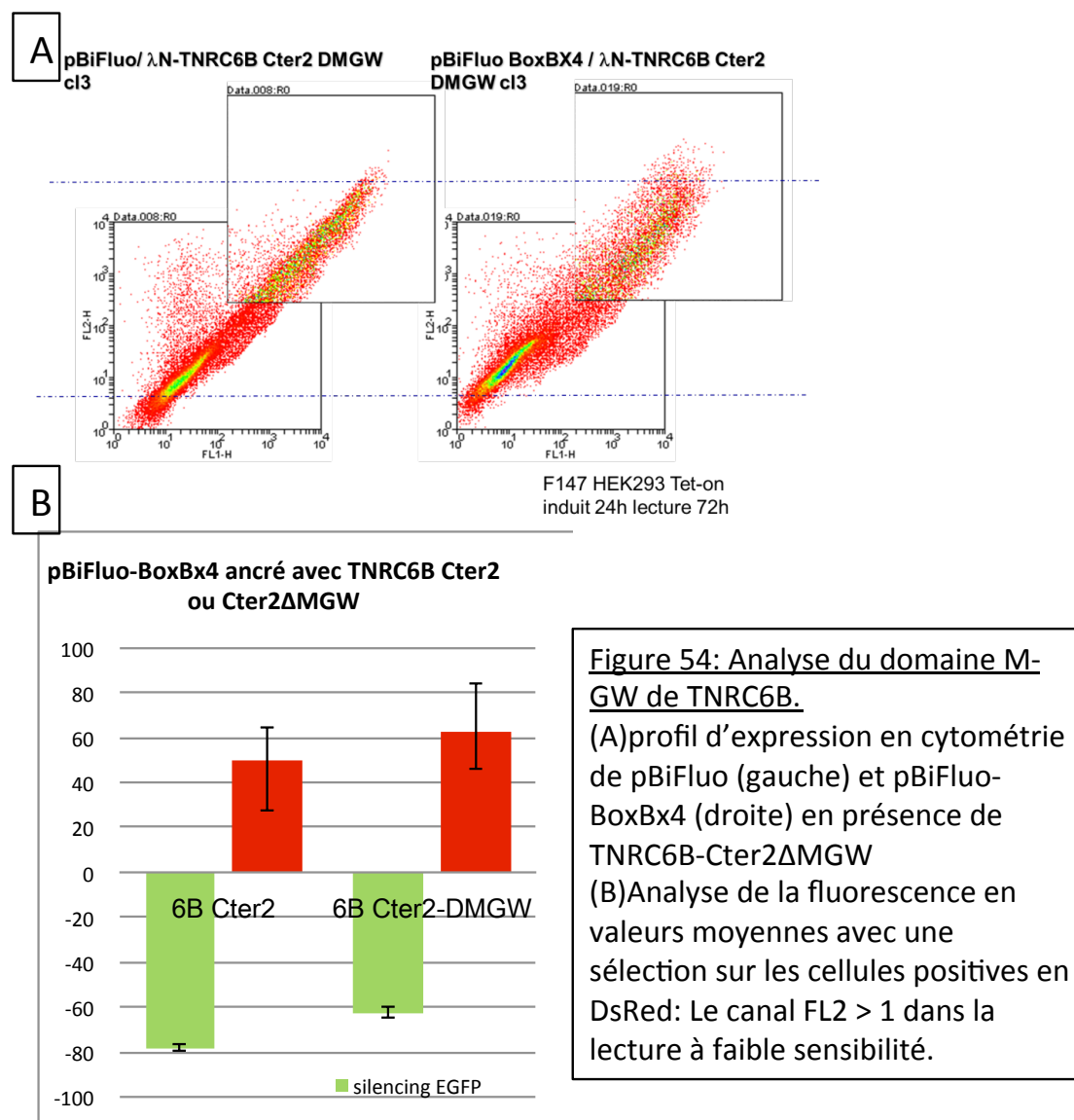


Figure 53 : Carte des délétions construites dans la région C-terminale de TNRC6B. Δ : délétion. Les nombres de répétitions GW dans N-GW, M-GW et C-GW sont marqués entre parenthèses. Les sites de délétion d'acides d'aminés sont marqués pour chaque délétion.

J'ai donc utilisé les constructions Cter pour analyser plus en détail les domaines impliqués dans le silencing et l'induction. Les travaux menés en particulier par l'équipe de E. Izaurralde ont permis d'identifier plusieurs domaines situés dans la région Cter (Figure 53) dont l'UBA, la région Q riche, le RRM et les motifs GW de la région centrale (M-GW) et de l'extrémité C-terminale (C-GW). Comme il a été proposé par plusieurs groupes que les motifs M-GW et C-GW pourraient être impliqués dans l'activité de silencing, j'ai commencé par déléter la région M-GW créant ainsi la construction Cter- Δ MGW (Figure 53). Le profil obtenu (Figure 54A) met en évidence une augmentation de l'expression de la DsRed et un silencing qui est particulièrement observable sur les faibles expresseurs. Cette perception est confirmée par les valeurs moyennes qui montrent une légère diminution du silencing par rapport

Résultats IV- les protéines impliquées

au clone de départ (Cter2), mais une induction inchangée. Ces résultats sont en accord avec ceux du groupe de E. Izaurralde (Huntzinger et al, 2010) dans la mesure où ils impliquent la région M-GW dans la silencing mais ils diffèrent dans la mesure où la délétion de la région M-GW y compris le motif PAM2 d'interaction avec la PolyA binding protein n'a qu'un effet modeste sur le silencing.



Certaines études ont aussi impliqué le domaine C-GW dans le silencing, j'ai donc construit trois délétions dans cette région Cter3ΔCGW1, 2 et 3 (Figure 53). La construction Cter3ΔCGW1 correspond à une délétion des trois motifs GW qui se trouvent dans le C-GW ; dans le Cter3ΔCGW2, j'ai laissé les deux derniers motifs GW tandis que dans le Cter3ΔCGW3 j'ai enlevé que les deux motifs GW situés en C-ter. La co-transfection de pBiFluo-BoxBx4 avec les constructions Cter3ΔCGW1 ou

Résultats IV- les protéines impliquées

important sur l'expression des constructions au-delà de la diminution de l'expression de l'EGFP qui est, pour l'essentiel dûe à la présence des sites BoxB (Figures 55A et B). De fait l'analyse de l'expression de ces constructions en cytométrie avec l'anticorps anti-HA a montré que celles-ci sont très peu exprimées, ce qui suggère que ces protéines sont instables. La construction Cter3 Δ CGW3 qui supprime les deux derniers GW (Figure 55B) a une activité importante avec un silencing maximal et une induction comparable à celle de la protéine entière. Ainsi, même si les deux premières constructions ne sont pas informatives, les deux derniers motifs C-GW ne sont pas essentiels pour le silencing et l'induction.

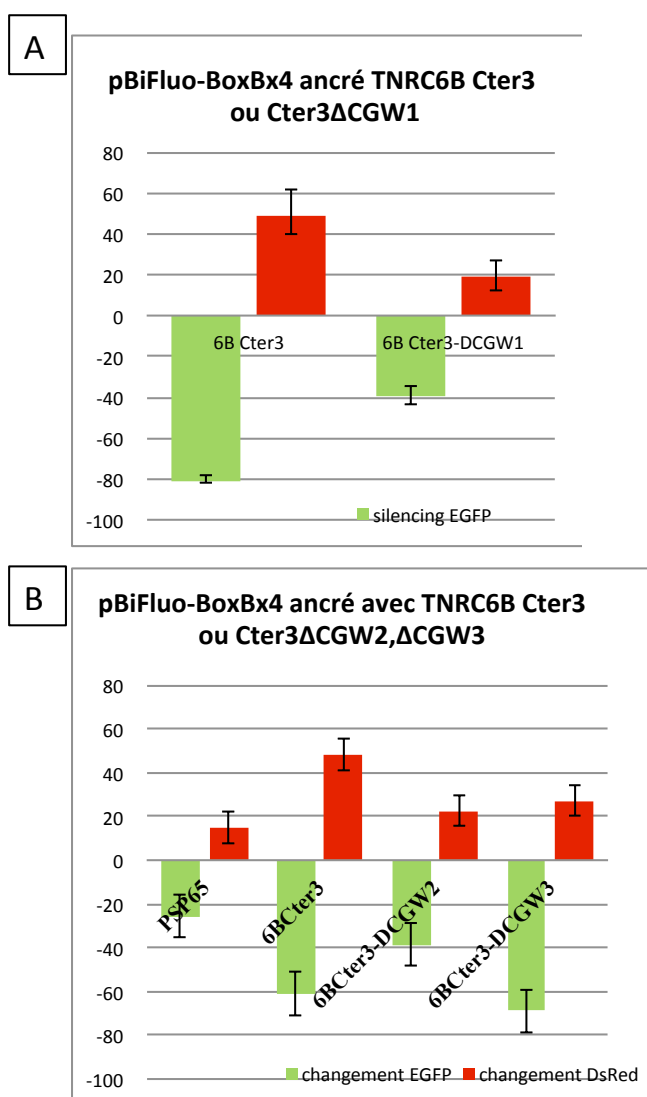


Figure 55 : Etude des délétions du domaine C-GW.

(A) Δ CGW1 (toute la région C-GW)

(B) Δ CGW2 (délétion du premier motif CGW) et Δ CGW3 (délétion des deux derniers CGW).

Pour compléter ces études sur le rôle des motifs C-GW, j'ai réalisé une construction qui permet d'exprimer le domaine C-GW indépendamment des autres régions

Résultats IV- les protéines impliquées

contenues dans la partie C-ter de TNRC6B : Cter3-CGW. La co-transfection n'induit pas de réponse marquée de la construction indicatrice pBiFluo-BoxBx4, de nouveau avec l'effet sur l'expression de l'EGFP dû à l'introduction des sites BoxB. Sous réserve de l'expression de cette construction vérifiée dans la section suivante, ce résultat indique que le domaine C-GW, à lui seul, n'est pas suffisant pour provoquer une induction de la DsRed (Figure 56).

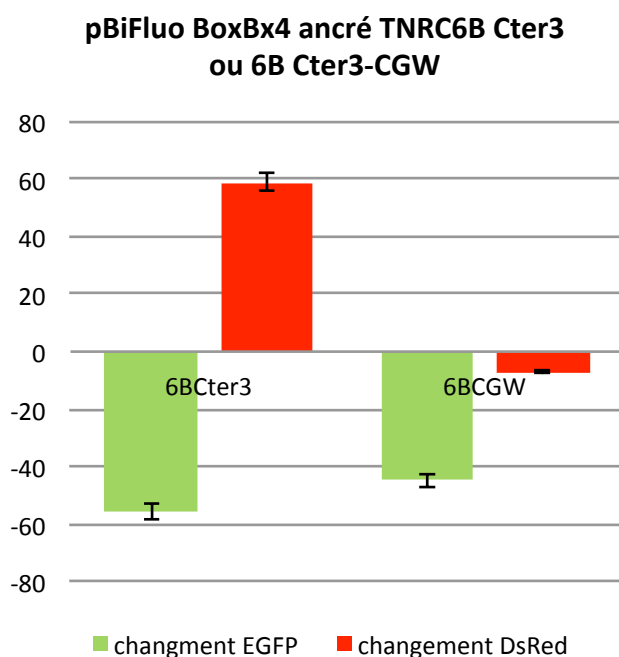
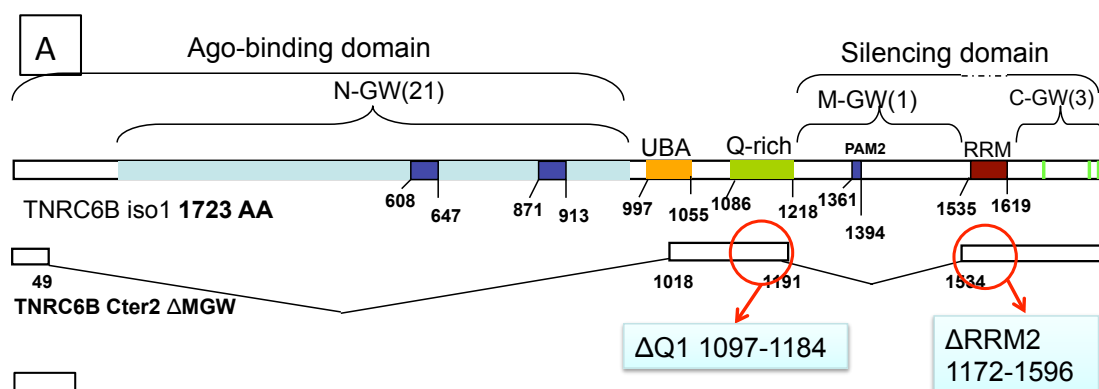


Figure 56 : Analyse de l'activité du domaine C-GW de TNRC6B. Quantification des données en valeur moyenne de fluorescence.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'induction dépend de certains des motifs « classiques » contenus dans la région C-ter de TNRC6B: UBA, Q-riche et RRM. Les résultats publiés sur le rôle de ces motifs dans le silencing par les micro ARN ne sont pas complètement concluants, ils attribuent au motif Q-riche un rôle dans la localisation de TNRC6 dans les P-bodies tandis que le domaine RRM contribuerait au silencing. Comme les constructions C-ter2 ne contiennent qu'une partie du domaine UBA, je me suis concentrée sur les deux autres domaines et j'ai réalisé des délétions de Q-riche (TNRC6B Cter2- Δ Q1) ou de RRM (TNRC6B Cter2- Δ RRM2) dans la construction TNRC6B Cter2- Δ MGW (Figure 57A). La co-transfection avec ces constructions a permis d'observer que la délétion du RRM abolissait complètement le silencing sans affecter l'induction (Figure 57B). Ainsi cette construction permet de

Résultats IV- les protéines impliquées

distinguer les deux fonctions effectrices de TNRC6B : le silencing et l'induction.



B Effet de la délétion Q-riche ou RRM à partir du TNRC6B Cter2 sur pBiFluo-BoxBx4



Figure 57 : Analyse de l'activité des constructions TNRC6B Cter2- Δ Q1; TNRC6B Cter2- Δ RRM2.
(A) Représentation schématique des constructions.
(B) Quantification des valeurs moyennes de fluorescence.

Par contre, la délétion du domaine Q-riche conduit à une absence de silencing et d'induction (Figure 57B). Pour compléter cette analyse qui met en évidence un rôle de la région Q-riche, j'ai réalisé une construction qui permet d'exprimer le domaine Q riche seul pour analyser si, à lui seul, il pouvait induire un silencing ou une induction (TNRC6B-Q-riche). La transfection TNRC6B-Q-riche en valeur moyenne a un effet très faible sur cette construction (Figure 58).

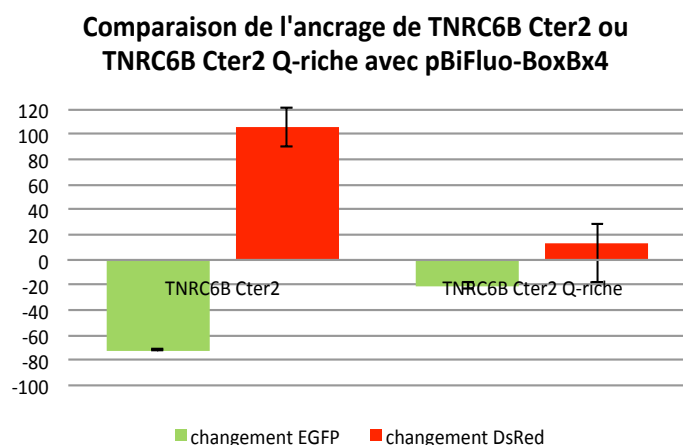


Figure 58 : Analyse de l'activité du domaine Q-riche de TNRC6B en comparant avec TNRC6B Cter2.

Résultats IV- les protéines impliquées

4.2.3.4 Etude de la réponse par l'ancrage en fonction du niveau d'expression de la construction TNRC6B : analyse en trois couleurs

Les conclusions de l'analyse précédente ne sont valables que dans la mesure où les constructions TNRC6B sont effectivement exprimées. La présence de l'étiquette HA dans le vecteur pCIneo permet de mesurer le niveau d'expression de la protéine co-transfectée. J'ai d'abord procédé à des essais de détection en Western blot qui se sont révélés peu satisfaisants, le niveau moyen d'expression des constructions étant assez faible. De plus l'utilisation de la cytométrie permet en principe d'avoir accès à une donnée beaucoup plus informative puisque l'on peut mesurer l'expression de la construction dans chaque cellule. J'ai donc développé une approche pour détecter simultanément l'expression des protéines fluorescentes (EGFP et DsRed) et de TNRC6B au moyen d'un anticorps anti-HA et d'un anticorps secondaire couplé à l'allophycocyanine (APC) qui émet dans le proche infrarouge. La mesure en cytométrie repose sur l'utilisation des canaux FL1 (EGFP), FL2 (DsRed) et FL4 (APC).

4.2.3.4.1 Exemple d'analyse en trois couleurs

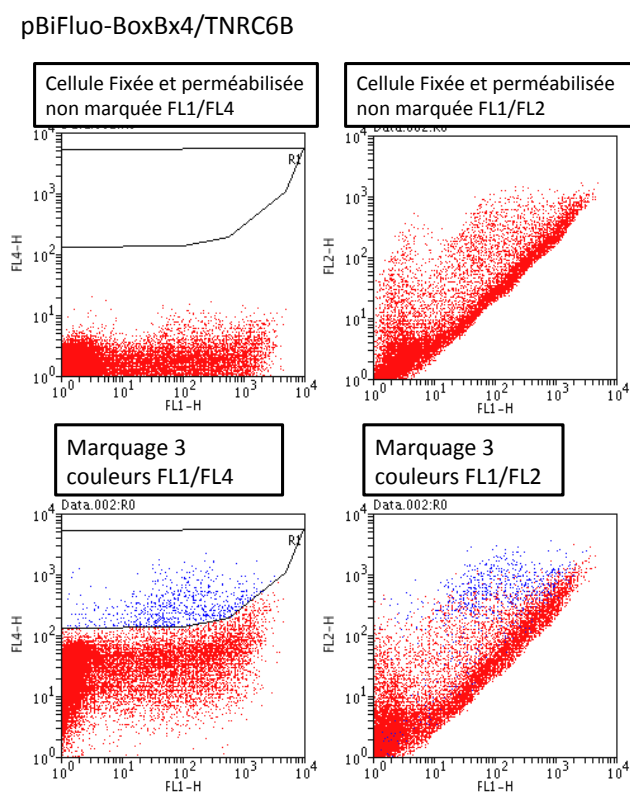


Figure 59: Détection simultanée de l'expression de TNRC6B et de l'expression de la construction indicatrice dotplot de cytométrie dans l'analyse de trois couleurs.

Une limitation de cette approche est due au fait que la fluorescence de l'EGFP et de la DsRed sont sensibles aux techniques de fixation. Aussi le protocole utilisé correspond-t-il à une fixation minimale qui ne permet de détecter que les cellules qui ont des niveaux d'expression très forts de TNRC6B. La Figure 59 illustre la démarche suivie.

Tout d'abord le marquage

Résultats IV- les protéines impliquées

spécifique de l'étiquette HA est défini par comparaison entre des cellules contrôles et celles transfectées avec la construction TNRC6B. Ceci permet de définir une région sur le profil du canal FL1/FL4 qui correspond à ce marquage. On peut alors identifier les cellules présentes dans cette région sur le dot plot d'origine FL1/FL2 (EGFP/DsRed) au moyen d'une couleur spécifique (en bleu sur la Figure 59). Comme attendu, ce sont les cellules qui sont déplacées en présence de TNRC6B qui expriment effectivement cette protéine. Ces données confirment de manière directe le lien entre ancrage de TNRC6B et changement du profil d'expression. Dans ce profil, on peut aussi observer quelques cellules qui expriment faiblement la construction indicatrice mais expriment fortement TNRC6B, ceci est en accord avec le fait que les deux constructions n'utilisent pas le même promoteur et donc que les niveaux d'expression ne sont pas fortement couplés. D'autres représentations des données sont possibles en particulier sous forme de diagrammes en trois dimensions, mais celles-ci ne sont pas très explicites dans leur projection en deux dimensions. Au total, la détection simultanée de l'expression de TNRC6B permet d'analyser de manière précise son activité sur l'expression de la construction indicatrice au niveau de chaque cellule. On peut cependant remarquer que le profil de l'EGFP et de la DsRed sont modifiés dans ces expériences du fait de la procédure de fixation.

4.2.3.4.2 Analyse des constructions de délétion par marquage trois couleurs

La technique d'analyse en trois couleurs offre donc un moyen d'objectiver l'activité biologique des différents mutants que j'ai construits. La figure 60 présente les données pour les constructions qui ont une activité détectable par un changement du profil d'expression de pBiFluo-BoxBx4. Comme dans la figure 59, les points bleus indiquent les cellules qui ont un fort niveau d'expression de TNRC6B.

Résultats IV- les protéines impliquées

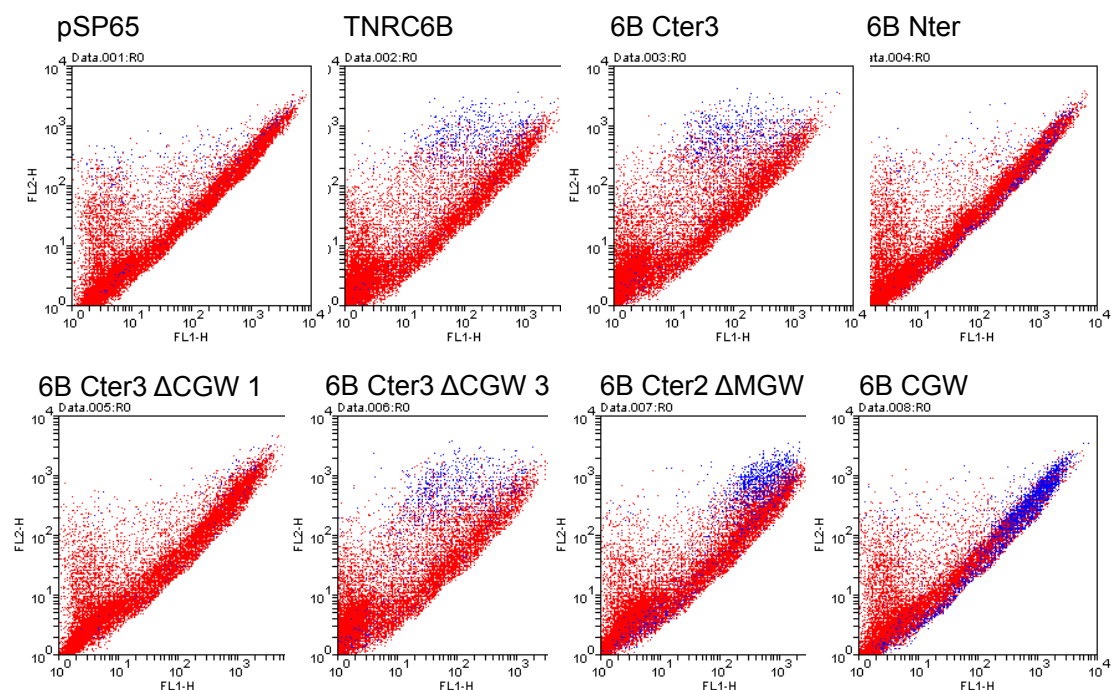


Figure 60: Analyse en trois couleurs de l'activité des différents mutants de TNRC6B. Les nuages de point en bleu signifient les fortes expresseurs des constructions TNRC6B ou ses constructions délétées.

Dans ces différents profils, il est évident qu'à chaque fois que des cellules ont une expression très différente de celle de départ (EGFP moyen, DsRed très fort), elles expriment fortement TNRC6B. C'est notamment le cas pour TNRC6B, Cter3 et Δ CGW3. La spécificité de ces réponses est apparente si l'on compare avec les profils du contrôle négatif (pSP) ou encore plus clairement avec des mutants inactifs de TNRC6B comme le domaine N-ter ou le vecteur CGW. Enfin, la délétion de MGW n'affecte clairement pas la capacité de TNRC6B à induire l'expression de la DsRed tandis que le silencing de l'EGFP est nettement plus faible. De ce point de vue, la comparaison avec les mutants inactifs est particulièrement parlante. Ces mutants sont exprimés dans des cellules qui sont situées au sein de la population principale et distribuées à tous les niveaux d'expression. Au contraire l'expression de Δ MGW est détectée dans des cellules qui expriment fortement TNRC6B et seulement un peu moins l'EGFP que dans la population principale.

Résultats IV- les protéines impliquées

Bilan

Le silencing et l'induction des constructions indicatrices dépendent de Ago2 et ce, que le petit ARN fonctionne sur une cible parfaite ou imparfaite. Cette restriction reflète probablement l'activation plus efficace des complexes RISC dans le cas de Ago2 du fait que les petits ARN sont introduits sous forme de double brin parfaits (et sont donc de fait de ARN interférant et pas des micro ARN). Le silencing des ARNm TNRC6 montre que l'induction dépend fortement de la présence de TNRC6B et dans une moindre mesure de TNRC6A. Comme le silencing sur une cible parfaite est dans le cas d'un silencing en mode siARN, celui-ci est peu affecté par le co-silencing de TNRC6B, ces données montrent que l'on peut séparer le silencing de l'activation ; elles montrent aussi que l'activité de coupure de Ago2 n'est pas suffisante pour induire l'expression de la DsRed. J'ai pu confirmer cette implication de TNRC6B en faisant des expériences d'ancrage sur le messager EGFP. L'ancrage de la protéine TNRC6B complète ou de sa moitié C-terminale induisent à la fois un silencing de l'EGFP et une induction de la DsRed. Le silencing est attendu et la capacité des membres de la famille GW182 à induire un silencing par ancrage a été utilisée pour identifier le domaine effecteur du silencing. Dans une approche similaire j'ai pu identifier les domaines nécessaires à l'induction de la DsRed et montrer qu'ils sont distincts de ceux du silencing. Ainsi, alors que le motif MGW est impliqué dans le silencing, il n'est pas nécessaire pour l'induction. Cette séparation des deux activités est encore plus évidente dans le cas de la délétion du motif RRM (en plus de MGW) qui supprime complètement le silencing alors que l'induction est intacte. Logiquement, la délétion du seul motif restant, la région Q-riche, abolit l'induction. Par contre, l'expression du domaine Q-riche seul n'est pas suffisante pour permettre une induction ce qui indique que d'autres éléments situés dans la région C-ter sont aussi nécessaires.

L'approche par ancrage a permis d'établir que les domaines effecteurs du silencing en mode microARN et de l'induction de la DsRed sont distincts. Ainsi l'induction de l'expression n'est pas seulement une conséquence indirecte de l'activité de silencing.

DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce document ne sont pas conformes à l'orthodoxie de l'interférence par l'ARN pour deux raisons principales : d'une part ils décrivent une induction de l'expression, d'autre part ils portent sur une activité nucléaire (transcriptionnelle) des petits ARN dans les cellules de mammifère. Même s'il existe déjà quelques descriptions de résultats similaires dans la littérature, il est clair que, pour le moment, de telles observations sont accueillies avec un certain scepticisme ou du moins que l'on attend une explication sur le mécanisme sous-jacent. Même si je n'ai apporté que quelques éléments de réponse au cours de ce travail, le modèle utilisé permet d'envisager d'aller plus loin dans un tel programme. Au cours de cette discussion je vais donc d'abord reprendre l'ensemble de mes résultats et les mettre en perspectives par rapport à l'approche expérimentale utilisée, puis je discuterai des modèles possibles et enfin j'aborderai les perspectives ouvertes par ce travail.

1ère Partie : Bilan des résultats et de l'approche expérimentale

Mise en évidence d'une induction de la DsRed

1.1 Réalité du phénomène

La construction pBiFluo et celles qui en ont été dérivées permettent d'observer de manière systématique une induction de l'expression de la DsRed en réponse à un silencing de l'EGFP. Cette observation a été faite par moi-même ou d'autres personnes du laboratoire plusieurs centaines de fois. On peut donc considérer que cette donnée est très robuste même si les effets sont d'amplitude variable d'une expérience à l'autre. De fait, les transfections transitoires avec pBiFluo-Glo permettent d'avoir une réponse extrêmement forte (une induction de ~ 6 fois), ce qui lève toute incertitude sur la réalité de ce phénomène. Dans ce contexte, il est d'ailleurs possible d'observer l'induction de la DsRed en observant les cellules sous un éclairage UV.

1.1.1 L'analyse en cytométrie

Une première possibilité d'artefact, celle d'une erreur de compensation, peut donc

Discussion

maintenant être éliminée, même si au début de mon travail, elle a constitué une préoccupation importante. La question sous-jacente est que si l'on surestime le passage du signal EGFP dans celui de la DsRed, lorsque l'on diminue l'expression de l'EGFP le signal DsRed peut être artificiellement augmenté (parce qu'il était sous-estimé au départ). Pour éviter cette difficulté j'ai donc analysé les signaux de clones stables dans lesquels l'induction était de faible amplitude, en l'absence de toute compensation. En toute logique, ceci conduisait à une sous-estimation de l'induction de la DsRed mais protégeait contre cet artéfact. Dans le cas de pBiFluo-Glo en transitoire, une forte induction est observable quels que soient les paramètres utilisés pour analyser les données et peut-être vérifiée visuellement par l'expérimentateur en exposant les cellules aux UV. La question de la compensation n'est donc pas une source majeure de difficulté dans l'analyse de nos données, même si elle peut influencer sur la quantification de l'induction. Dans la pratique, le niveau de compensation de FL1 dans FL2 est de l'ordre de 20% dans nos expériences, ce qui au maximum pourrait entraîner une erreur de ce type sur la mesure de l'induction dans nos conditions d'analyse (compensation nulle ou sous-estimée). En fait il est difficile d'éliminer complètement la question de la compensation du fait d'une particularité de notre approche expérimentale : la très large gamme de signaux à traiter. Bien que la cytométrie soit en principe une approche adaptée à cette question, j'ai observé au cours de mes travaux que i) sur les cytomètres classiques avec une gamme dynamique de quatre ordre de grandeur, les détecteurs saturent dès que l'on approche de 3,5 log (3300), ii) la compensation n'est pas la même aux différents niveaux d'expression, ce qui indique que la détection est non linéaire, iii) sur l'appareil Accuri où la dynamique annoncée est de sept log, la détection est non linéaire pour les signaux faibles (les premiers 2,5 log) ce qui fait qu'en réalité la gamme dynamique n'est pas très différente de celle des appareils classiques.

1.1.2 Compétition pour l'expression entre l'EGFP et la DsRed

Une deuxième possibilité est que l'augmentation de l'expression de la DsRed reflète une redistribution des ressources entre l'EGFP et la DsRed. Cette question est

Discussion

d'autant plus importante que l'induction est plus forte dans les cellules qui expriment la construction à un très haut niveau. On pourrait donc envisager que, par exemple, la traduction devienne limitante dans ces forts expresseurs et que le fait de diminuer la quantité de messenger EGFP conduise à une traduction plus efficace de la dsRed. Plusieurs observations permettent d'exclure cette hypothèse, comme l'absence d'induction dans les constructions pBiFluo linéarisés ou par co-transfection pBiRed x pBiGFP. D'autres mécanismes du même type, mais agissant au niveau du promoteur et donc dans le noyau, sont plus difficiles à exclure dans la mesure où l'on ne connaît pas exactement les contraintes qui peuvent s'exercer sur un promoteur bidirectionnel. De tels effets supposeraient que le ciblage d'un transcrit par RISC permette de rendre disponibles pour l'expression de la DsRed des éléments de la machinerie de transcription et / ou de la maturation des transcrits initialement utilisés pour l'expression de l'EGFP. Toutefois, l'asymétrie de la réponse (faible induction de l'EGFP en réponse à un silencing très efficace de la DsRed) et le fait que, comme il est discuté dans la section suivante sur le mécanisme de l'induction, tout indique que l'induction est bidirectionnelle et concerne aussi bien la transcription de l'EGFP que celle de la DsRed rendent de tels modèles très peu probables. De plus il est intéressant de replacer ces observations dans le contexte des observations initiales du laboratoire : une augmentation des ARN pré-messagers de gènes ciblés par un ARN interférant. Ainsi, nos résultats ne peuvent être attribués à des biais de mesure ou à une compétition entre les deux unités de transcription contrôlées par le promoteur bidirectionnel.

1.1.2.1 Spécificité du phénomène

Une difficulté centrale dans l'étude de phénomènes induits par des petits ARN est le manque de spécificité. Tout petit ARN peut agir comme un micro ARN et ainsi avoir en plus de la cible exacte une centaine de cibles difficiles à identifier. Pour cette raison, dans mes premières études sur le clone stable, j'ai cherché à utiliser un grand nombre de petits ARN différents pour minimiser le risque que l'effet observé soit dû à une activité hors-cible de type micro ARN ou autre. L'utilisation des transfections

Discussion

transitoires offre une possibilité beaucoup plus complète d'étudier la spécificité des effets. En particulier en introduisant de nouvelles séquences cibles, on peut montrer que c'est la présence de la séquence en *cis* sur la construction qui la rend sensible à l'action des petits ARN. Au cours de mes études j'ai identifié un exemple d'induction hors-cible avec le petit ARN siDsRedA qui est capable d'induire l'expression de plasmides qui ne contiennent pas la séquence DsRed.

1.1.2.2 L'induction de la transcription

Les effets observés dans les clones stables étaient trop faibles pour pouvoir être analysés en détail, par contre dans les essais en transitoire il est possible de comparer l'induction au niveau de la protéine avec l'accumulation des ARN messagers. Dans les études que j'ai menées, il existe une bonne corrélation entre les deux mesures, ce qui indique que l'augmentation de la fluorescence est dûe à une augmentation de l'accumulation des ARN messagers. Je n'ai pas observé de différence dans la stabilité des messagers, mesurée après inhibition de la transcription par l'actinomycine D, (données non montrées), ce qui ne laisse que la synthèse des ARN messagers comme source de la réponse. Comme mesure de la transcription, j'ai effectué une immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps anti polymérase II. Cette approche a montré une augmentation de la présence de PolII sur les deux côtés du promoteur après induction d'un silencing de l'EGFP ; elle est donc en accord avec une augmentation de la transcription de la construction indicatrice. A elle seule, la mesure de la présence de Pol II n'est pas une indication directe de la transcription et une pause de la transcription se manifesterait aussi par une augmentation de la densité de Pol II. Par contre, dans un contexte où il y a une augmentation de la quantité d'ARN messager, l'interprétation la plus simple de ce résultat est qu'il y a une augmentation de la transcription (sans que l'on puisse trancher entre un déblocage de l'élongation ou une augmentation de l'initiation). L'ensemble de ces données est donc en accord avec une induction de la transcription en réponse au silencing

1.1.2.3 Compétition entre le silencing et l'induction

Puisque l'augmentation de la densité de Pol II a lieu des deux côtés du promoteur, il

Discussion

est légitime de supposer que l'expression de l'EGFP est l'objet de deux régulations antagonistes : un silencing de type classique par dégradation de l'ARN messager et une augmentation de la transcription. C'est précisément ce qui avait été observé dans le cas des observations initiales avec une augmentation de l'accumulation des ARN pré-messagers. En fonction des hypothèses que l'on fait sur la cinétique du silencing par les petits ARN interférant, cette augmentation de la transcription pourrait ou non réduire l'efficacité du silencing. Dans mes observations j'ai systématiquement observé que lorsqu'il n'y a pas d'induction, l'efficacité du silencing est plus importante ; c'est le cas par exemple lorsque la construction pBiFluo est linéarisée ou lorsque les deux protéines fluorescentes sont portées par deux plasmides distincts (co-transfection pBiRed x pBiGFP). Ainsi, même en présence d'un petit ARN interférant efficace, le fait qu'il y ait une induction de la transcription réduit l'efficacité du silencing. Il est donc possible que pour des gènes cellulaires un phénomène d'induction de la transcription similaire à celui que nous avons observé limite l'efficacité du silencing. Bien évidemment, dans ce contexte, seule une étude de la transcription ou par défaut des ARN messagers pourrait mettre en évidence les deux réponses antagonistes au petit ARN.

1.1.2.4 Méthode de transfection

L'ensemble des données que je présente a été obtenu par la technique de transfection au phosphate de calcium. Dans les cellules HEK293 cette technique présente de nombreux avantages car elle est très efficace et permet de transférer toutes les cellules avec des combinaisons de plasmides et de petits ARN. Par contre, cette technique est souvent jugée archaïque et toxique pour les cellules. Cette opinion relève de plusieurs malentendus. Tout d'abord et contrairement aux autres techniques de transfection, la méthode au phosphate de calcium ne peut être utilisée que pour quelques lignées cellulaires (uniquement des cellules adhérentes et en pratique seulement quelques lignées classiques comme HeLa, HEK, NIH 3T3). C'est donc une méthode de « niche ». Par contre, du fait de son côté « en masse », la transfection au phosphate de calcium introduit beaucoup moins de compétition entre les acides

Discussion

nucléiques transfectés. C'est aussi que, dans certains types cellulaires il a été observé que lorsque l'on utilise la lipofectamine pour transfecter un plasmide et un petit ARN, les cellules reçoivent soit l'un soit l'autre des composants mais pas toujours les deux. Dans mon travail, cette grande capacité de l'approche au phosphate de calcium m'a permis d'associer plusieurs plasmides et plusieurs petits ARN avec une grande reproductibilité. Néanmoins, il est exact que la technique au phosphate de calcium peut induire un stress cellulaire, qui peut être mis en évidence à travers l'apparition de granules de stress, qui est une agrégation d'ARN messagers non traduits. Si ce type de réponse n'est pas observé avec la lipofectamine, par contre celle-ci est manifestement toxique comme il apparaît sur les courbes de croissance. Les doses de calcium que j'ai utilisées, n'induisent pas d'effet détectable sur le phénotype cellulaire, mais on pourrait quand même envisager que l'induction de la DsRed dépende pour une part d'un stress induit par la transfection. Au cours de mon travail sur la ligne stable $\alpha 1A$, j'ai aussi utilisé la lipofectamine tandis qu'en transitoire Lue Huang dans le laboratoire a utilisé, à plusieurs reprises, la lipofectamine. Dans tous ces cas, l'induction de la DsRed a été observée à des niveaux comparables avec ceux que j'ai obtenus avec le phosphate de calcium.

1.1.3 Clone stable et transfections transitoires

Le point de départ de ces études étaient des observations faites dans des transfectants stables pour des constructions destinées à l'étude de la maturation des transcrits. En conséquence j'ai commencé par analyser la réponse des constructions fluorescentes dans les mêmes conditions, dans des clones stables. Cette approche a, dans une certaine mesure, fourni les résultats attendus en montrant que le silencing de l'EGFP pouvait induire une expression de la DsRed (et réciproquement). Par contre, elle s'est avérée décevante dans la mesure où les effets observés étaient trop faibles pour servir de point de départ à des études ultérieures ; de plus il a été difficile d'obtenir un clone qui exprime la construction de manière stable au cours du temps, ce qui a réduit de fait l'étude au seul cas du clone $\alpha 1A$. Cette difficulté est peut-être plus

Discussion

qu'anecdotique et pourrait indiquer que les copies intégrées sont soumises à un silencing du type de la co-suppression observée chez les plantes. De fait, si l'intégration de multiples copies est susceptible de produire des transcrits sens et antisens, cette possibilité est encore plus importante dans le cas de constructions avec un promoteur bidirectionnel. Cette difficulté fait qu'il est peu réaliste de vouloir comparer la réponse de constructions différentes, puisqu'il faudra isoler des clones stables dans lesquels l'organisation des transgènes joue probablement un rôle essentiel sans que l'on puisse le maîtriser.

Ces considérations m'ont amené à faire des études en transfection transitoire, même si à priori pour des études sur des réponses transcriptionnelles, on se place dans une configuration différente de celle d'un gène intégré dans le génome. Il apparaît clairement de ces études que l'on dispose d'une approche souple permettant de comparer des constructions différentes et qui peut fournir des réponses d'amplitude plus importante. Outre le côté artificiel de cette approche, une de ses principales limitations vient de la variabilité entre expériences puisque le modèle est reconstruit à chaque fois. Ceci oblige à répéter les expériences jusqu'à ce qu'elles soient statistiquement significatives. Ainsi, si les réponses sont d'amplitude plus forte, elles sont aussi plus variables et l'étude du mécanisme reste encore délicate puisque dans la plupart des approches, on peut s'attendre à une diminution partielle des réponses. Un des développements possibles sera donc d'introduire un témoin de l'efficacité de transfection pour améliorer l'analyse de ces résultats.

2^{ème} Partie: Mécanisme de l'induction

2.1 Induction est une inhibition d'une inhibition

Globalement, l'interférence par l'ARN et les mécanismes apparentés conduit à une inhibition de l'expression que ce soit au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Comme de plus les mutations qui inactivent un des composants de cette machinerie conduisent à la dérégulation d'éléments génétiques envahisseurs (éléments transposables, virus à génome ARN) il est très tentant de penser que l'activation que j'ai observée – où celle décrite par quelques groupes dans les cellules

Discussion

de mammifères - correspond à une activation indirecte de l'expression : l'interférence interférant avec une autre régulation négative. Pourtant, jusqu'à présent il n'existe pas de démonstration directe de ce schéma. Appliqué à notre modèle expérimental, la première prédiction est que les constructions inductibles ne sont pas exprimées à leur niveau maximal du fait d'une régulation négative « intrinsèque » (non liée au silencing par les petits ARN qui va être introduit après). Comme toutes les variantes de la construction pBiFluo sont inductibles, il est difficile de mettre en évidence une régulation négative qui préexisterait. Tout au plus peut-on remarquer que dans le cas de pBiFluo-Glo qui a une induction très forte en réponse au silencing de l'EGFP, l'expression de la DsRed est particulièrement basse par comparaison avec celle de pBiFluo ou de la construction monochrome « pBiRed ». Une situation qui aurait pu être informative est celle de la linéarisation de pBiFluo puisque, dans ce cas, l'inductibilité est presque complètement supprimée. Malheureusement, il n'est pas possible de comparer directement l'expression du plasmide linéarisé et celle du plasmide circulaire car le plasmide linéarisé est beaucoup moins exprimé pour d'autres raisons comme l'accessibilité aux nucléases et l'absence de contraintes topologiques sur l'ADN. A défaut d'une approche directe nous avons remarqué que la co-transfection de pBiRed et pBiGFP génère un profil d'expression qui est proche de celui de pBiFluo mais avec des valeurs moyennes de fluorescence plus élevées d'environ deux fois. Ainsi si l'on prend en compte cette observation, le fait de cibler le messager EGFP par un petit ARN permettrait au promoteur bidirectionnel de s'exprimer à pleine force, alors que dans les constructions bidirectionnelles il serait partiellement réprimé. Ces quelques éléments sont en accord avec l'existence d'un silencing initial de la construction mais ne l'établissent pas de manière précise. Une autre information qui fait défaut jusqu'à présent est le mécanisme de cette inhibition initiale. Mes observations sur le rôle des protéines Argonaute ont mis en évidence que le silencing de celles-ci ne modifiait pas l'expression de base des constructions indicatrices. Donc, même s'il est probable que des transcrits sens et antisens soient impliqués dans l'induction et par extension dans un silencing initial, ce dernier n'est pas dû à un mécanisme de type interférence par l'ARN.

2.2 Rôle d'une transcription antisens

L'expérience de linéarisation de pBiFluo suggère très fortement l'implication d'une transcription convergente dans le phénomène d'induction. Ceci expliquerait le côté systématique de l'induction sur nos différentes constructions et ce avec pratiquement tous les petits ARN étudiés. En ce qui concerne les observations initiales du laboratoire sur l'accumulation d'ARN prémessagers en réponse au silencing, il est important de noter que ces expériences ont été réalisées dans des transfectants stables qui contiennent de nombreuses copies intégrées dans le génome. Aussi il est très probable que cet ensemble de copies conduise à l'expression de transcrits antisens en plus des ARN messagers. Dans ce cas, nous serions peut-être dans une situation analogue à celle des transgènes qui a conduit à la mise en évidence de la co-suppression. Néanmoins, dans nos expériences, le fait d'introduire volontairement un ciblage par un complexe RISC conduit à une réversion du silencing initial, un mécanisme qui n'a pas été décrit dans les modèles de co-suppression.

2.3 Le modèle de K. Morris : la coupure des transcrits antisens

K. Morris a formulé le modèle le plus complet pour expliquer comment un petit ARN pourrait induire une augmentation de l'expression du gène cible et une partie de mon travail a été menée en utilisant ce modèle comme une référence possible. Ce modèle comprend deux éléments essentiels : i) un silencing initial dû à des transcrits antisens, ii) le fait de cibler le gène avec un petit ARN conduit à une diminution de l'abondance des transcrits antisens et par conséquent à une dérégulation de son expression. L'une des motivations de K. Morris est de montrer que l'induction de l'expression n'est pas due à une nouvelle activité du complexe RISC mais reflète un effet « hors-cible » spécifique, ici la dégradation non intentionnelle du transcrit antisens. Pour comprendre ce choix, il est utile de rappeler que K. Morris a été le premier à décrire un silencing transcriptionnel dans des cellules de mammifère (Morris et al, 2004). Même si le mécanisme n'en est toujours pas compris, il est supposé que le complexe RISC apporte des activités modificatrices de la chromatine qui conduisent à

Discussion

la mise en place de l'hétérochromatine. Aussi K. Morris juge-t-il important de démontrer que les situations d'activation ne sont pas dues à un effet du complexe RISC sur la chromatine puisque celui-ci devrait inhibiteur de l'expression. Dans ce contexte, il est intéressant de remarquer que dans aucune de mes expériences, je n'ai observé la mise en place d'un silencing transcriptionnel qui ce seras traduit par une diminution de l'expression de l'EGFP *et* de la DsRed.

Depuis mes premières observations, ce modèle apparaissait peu adapté au cas de mes constructions indicatrices, en effet :

- i) Contrairement aux autres exemples d'induction, je cible intentionnellement le transcrit EGFP (et non pas le promoteur), aussi je connais a priori la polarité de la cible des petits ARN que j'ai vérifiée expérimentalement. Dans le cas d'une construction circulaire, le messenger EGFP peut jouer le rôle d'un transcrit antisens pour la DsRed et le fait de cibler le messenger avec un siARN conduit effectivement à sa dégradation. Par contre, dans le cas d'une construction pBiFluo-Glo linéarisée, il subsiste une induction que l'on peut interpréter comme due à la présence de transcrits antisens dans la région EGFP-Glo ; ce transcrit pourrait agir au niveau du promoteur et diminuer son expression. Dans ce cas, il est plus difficile de comprendre comment le fait de cibler le messenger EGFP peut alors déréguler l'expression de la DsRed.
- ii) Assez vite, j'ai observé qu'un petit ARN construit sur le mode d'un micro ARN était capable d'induire l'expression de la DsRed, or les micro ARN n'induisent pas directement une dégradation des transcrits qu'ils ciblent. Dans le cytoplasme, ils peuvent induire une déadénylation qui déstabilise le transcrit mais ce processus est habituellement jugé moins efficace que celui de la coupure par les siARN. De plus, il n'existe aucune indication qu'un tel mécanisme soit actif dans le noyau.
- iii) Même si le mode d'action du transcrit antisens n'est pas connu, il est probable que ce transcrit agit dans le noyau, l'alternative serait un effet de type interférence par l'ARN dans lequel l'ARN double brin pourrait être

Discussion

formé ailleurs puis agir dans le noyau; plus probablement le transcrit antisens doit agir au voisinage immédiat de la chromatine et c'est donc le transcrit naissant qu'il convient de dégrader. Or les données obtenues dans le laboratoire indiquent que la cinétique de coupure par le siARN siGloE1 est de l'ordre de 10 minutes. Il est donc difficile de concevoir que le complexe RISC puisse avoir un impact important sur les transcrits naissants (et a fortiori un micro ARN).

L'ensemble de ces données rendait peu probable que le modèle de K. Morris puisse expliquer nos résultats. Néanmoins c'est l'observation que le silencing de TNRC6B diminue fortement l'induction sans diminuer le silencing siARN et que l'ancrage d'un domaine C-ter de TNRC6B peut induire la DsRed alors qu'il ne recrute pas efficacement les protéines Argonaute qui démontre directement que l'activité de dégradation liée à Ago2 n'est pas nécessaire à l'induction. Formellement, ceci n'exclut pas encore que l'induction ne soit pas due à une dégradation de type micro ARN. C'est donc la mise en évidence de domaines effecteurs distincts pour le silencing et l'induction qui clôt ce débat ; l'induction peut être dissociée non seulement du silencing siARN par Ago2 mais aussi du silencing miARN induit par les protéines GW182. Ce résultat est en désaccord avec le modèle proposé par K. Morris et suggère un autre type de mécanisme dans lequel le recrutement du complexe RISC sur des transcrits naissants permet d'amener au voisinage de la chromatine du gène ciblé des activités qui peuvent supprimer le silencing initial. A ce stade, je ne peux conclure sur la nature du mécanisme, j'ai juste constaté que l'induction n'est que temporaire et ne persiste pas au-delà de la présence des petits ARN. Ainsi, je n'ai pas observé d'induction transmissible de l'expression épigénétique, mais une modification de l'expression en réponse au silencing. Parmi les effets envisageables qui ne mettent pas en cause une modification directe de la chromatine, il est possible que la présence du complexe RISC sur les transcrits naissants induise un ralentissement de la polymérase. Une modification de la cinétique de transcription pourrait contribuer à modifier l'expression des transcrits sens et antisens et ainsi à changer l'activité du promoteur. Un effet de ce type est proposé pour expliquer l'effet

d'un silencing sur l'épissage des transcrits ciblés {Alló, 2010 #1586}.

2.4 Les effets en trans

L'observation la plus curieuse est celle des effets en *trans* dans le cas des constructions qui contiennent la β -globine. Il faut noter que cet effet est essentiellement spécifique du promoteur bidirectionnel puisqu'il n'est pas observable dans des co-transfections du type pBiGFP-Glo et CMVRed (absence de diminution de l'expression de la DsRed et de « dépression » par le siGloE1). L'interprétation la plus simple d'une spécificité de séquence est que le mécanisme implique un acide nucléique et donc probablement un ARN. Celui-ci peut être soit de grande taille, le transcrit antisens évoqué par K. Morris, ou de petite taille, produit par Dicer ou un autre mécanisme. Dans ce contexte, le fait de cibler la construction pBiGFP-Glo supprime cet effet en *trans*, ce qui nous amène au modèle précédent, l'ancrage du complexe RISC modifie les conditions d'expression et la production de ce signal ARN. La mise en évidence de ce signal ARN (voir perspectives) constituerait une source d'information sur la régulation initiale de l'expression de nos constructions et peut-être sur le mécanisme de l'induction.

3^{ème} Partie: Perspectives

3.1 Le mécanisme de l'induction

3.1.1 Le rôle de TNRC6

La mise en évidence d'une induction en réponse à l'ancrage de TNRC6 constitue une étape importante dans la compréhension du mécanisme de l'induction. Pour autant, ceci ne fournit pas encore d'information directe sur le mécanisme. D'ailleurs dans un domaine très proche étudié par de nombreux laboratoires, celui du silencing par les micro ARN, la démonstration de l'implication de la famille GW182 et les analyses fonctionnelles par ancrage de domaines de ces protéines n'ont pas encore permis de clarifier le mécanisme. Une des difficultés vient de ce que les protéines GW182 n'ont

Discussion

pas de domaine qui porte une fonction biologique identifiable. Aussi, deux types de fonctions sont possibles, soit les protéines GW182 agissent en inhibant / modifiant une interaction, un peu comme il a été proposé que les protéines Argonaute interagissent avec la coiffe et ainsi interfèrent avec la traduction, soit elles recrutent d'autres protéines qui apportent les activités biologiques requises pour le silencing, par exemple une déadénylase, mais précisément une telle interaction n'a pas vraiment pu être mise en évidence jusqu'à présent. Dans le cas de GW182, le groupe de E. Izaurralde a proposé que le domaine PAM2 présent dans le région M-GW remplisse une fonction du premier type en permettant une interaction avec la polyA binding protéine cytoplasmique (Huntzinger et al, 2010). Même si l'on ne sait pas qu'elle serait la conséquence d'une telle interaction, on peut concevoir qu'elle interférerait avec le rôle de la polyA binding protéine dans la protection de la queue polyA et dans la traduction. Toutefois comme le montrent nos données, le rôle de ce motif dans le silencing n'est que partiel, ce qui indique que d'autres interactions sont impliquées dans le silencing. La mise en évidence d'un autre partenaire du motif PAM2, EDD (Su et al, 2011), qui est lui aussi capable d'induire un silencing par ancrage montre d'ailleurs que même sur ce petit motif, la situation est plus complexe qu'initialement envisagé. Ainsi, les protéines GW182 apparaissent plus comme des plates-formes de recrutement d'autres protéines que comme des acteurs directs. Cette notion est rendue encore plus complexe par la présence des motifs GW, dont il est raisonnablement montré qu'ils jouent un rôle dans l'interaction avec les protéines Argonaute, mais dont il n'est toujours pas clairement établi lesquelles parmi la vingtaine présente sont réellement fonctionnelles.

A ce stade de mon travail, nous ne disposons pas de piste précise sur le rôle de TNRC6B dans l'induction. De plus, le motif Q-riche qui est impliqué dans cette activité présente l'inconvénient d'être un motif d'agrégation entre protéines d'une spécificité probablement limitée. Le fait qu'il ne soit pas suffisant confirme d'ailleurs que d'autres éléments sont nécessaires, ceux-ci sont probablement apportés par la région C-terminale et n'impliquent pas les deux derniers GW.

Une approche rationnelle possible serait donc de chercher les partenaires protéiques

Discussion

du domaine d'activation de la transcription, par exemple dans des expériences de double hybride. Une autre approche qui a été initiée dans le laboratoire repose sur l'analyse du rôle de gènes candidats. En effet de nombreux partenaires des protéines GW182 ont été identifiés, que ce soit lors des analyses du complexe RISC isolé par une immunoprécipitation, ou dans des expériences de double hybride ou à travers les constructions de cartes d'interactions qui intègrent les données disponibles. Un de ces candidats a été analysé par une étudiante du laboratoire, Badia Adjirou, et son ancrage sur le messager EGFP produit une réponse similaire à celle induite par TNRC6B avec un silencing de l'EGFP et une induction de la DsRed. A minima, ceci montre qu'il existe d'autres moyens d'induire un silencing de type micro ARN que ceux déjà identifiés. Ce candidat a été choisi sur le fait qu'il a été décrit comme un facteur de transcription et est donc connu pour avoir une influence sur la transcription, il a par ailleurs aussi été décrit comme un régulateur post-transcriptionnel. Les travaux à venir vont analyser les domaines fonctionnels de cette protéine et aussi les interactions avec GW182.

3.1.2 Modifications de la chromatine liées à l'induction.

L'un des points faibles des études telles qu'elles ont été menées jusqu'à présent est l'absence de données sur les modifications de la chromatine dans les cellules transfectées en transitoire avec les constructions indicatrices. Dans le laboratoire, il y a eu des essais pour étudier les modifications classiques de la chromatine (H3K9me3, H3K27me3, acétylation des histones) mais la conclusion provisoire est que celles-ci sont trop peu abondantes pour être étudiées de manière fiable. Une étude par des inhibiteurs des histones désacétylases a d'ailleurs montré que celles-ci ne jouaient pas de rôle important dans le phénomène de l'induction que l'inhibition des histones désacétylases ne permettait pas d'augmenter le niveau de base d'expression des constructions indicatrices. Comme les transfections transitoires ont été utilisées pour analyser certaines des régulations épigénétiques, on ne peut pas les rendre directement responsables de cette absence de détection. On peut d'ailleurs remarquer que les

Discussion

études publiées jusqu'à présent sur le rôle de la chromatine dans le silencing transcriptionnel ne sont pas concluantes, alors même qu'elles portaient sur des gènes cellulaires.

Il semble donc qu'une approche technique plus performante soit nécessaire pour à la fois mesurer et identifier les modifications qui interviennent dans les régulations. Une approche possible serait de purifier les épisomes présents dans les cellules transfectées et d'analyser les histones qui leur sont associées.

Incidentement, tous ces modèles reposent sur l'idée que l'interaction entre le complexe RISC et sa cible ait lieu sur des transcrits naissants. La technique d'ancrage permet - dans une certaine mesure - de répondre à ce point. Une construction dans laquelle les sites BoxB seraient insérés après le site de polyadénylation du messenger EGFP pourrait mettre en évidence une induction (et pas de silencing), si effectivement l'ancrage a lieu sur des transcrits naissants. Toutefois, un positionnement au voisinage du site de polyadénylation est peut être inadapté car cette partie du transcrit est rapidement dégradée après la coupure par la machinerie de polyadénylation. Une autre construction possible qui échappe à cette critique mais ne répond pas aussi complètement à la question, serait de mettre les sites BoxB dans un intron, ceci permettrait de vérifier qu'un ancrage nucléaire est efficace.

3.1.3 Rôle de la transcription antisens

Mes analyses par RT-PCR n'ont pas permis de mettre en évidence des transcrits antisens alors que les expériences de linéarisation indiquaient un rôle pour la nature circulaire du plasmide qui suggère très fortement l'implication de transcrits antisens dans les régulations observées. Clairement, la technique utilisée a une sensibilité limitée principalement du fait de l'étape de reverse transcription. On peut remarquer que j'ai utilisé des ARN totaux et que si j'avais utilisé des ARN issus d'une fraction nucléaire, j'aurais pu gagner environ un facteur dix en sensibilité, parce que les ARN messagers matures dans la fraction nucléaire représentent entre 5 et 10 % des ARN messagers (Gondran et al, 1999; Weil et al, 2000). Par ailleurs, la mise en évidence de

Discussion

transcrits potentiellement instables dans la fraction nucléaire pourrait utiliser de l'inhibition de la RNase 5' présente dans le noyau ou de l'exosome nucléaire. Enfin, en association avec l'utilisation d'ARN nucléaire, une technique de séquençage en profondeur permettrait d'avoir une vision plus complète de la transcription des constructions indicatrices. La principale difficulté d'une telle approche est d'ailleurs d'identifier quels sont les éléments importants par rapport à un bruit de fond de transcription qui n'a peut-être pas de conséquence directe sur l'expression de la construction indicatrice. Dans notre cas nous bénéficions de la possibilité de modifier l'expression du système avec des conséquences connues sur l'expression de la DsRed ; ainsi, il serait intéressant d'effectuer la séquence sur des échantillons de cellules transfectées avec le plasmide circulaire ou linéaire ou en présence d'un siARN contrôle ou d'un siARN ciblant le messenger EGFP. La comparaison entre ces échantillons devrait permettre de mettre en évidence les changements d'expression associés à l'induction de la DsRed.

Un autre domaine où le séquençage devait apporter des informations précieuses est celui des effets en *trans*. L'interprétation plus simple du silencing de pBiRed en présence de pBiGFP-Glo est que ce dernier produit des ARN qui peuvent réguler l'expression du premier, par exemple parce qu'ils contiennent des séquences du promoteur bidirectionnel.

3.2 Le modèle expérimental

3.2.1 Utilisation des constructions indicatrices

L'approche expérimentale que j'ai développée présente de nombreux avantages en termes de facilité de mise en œuvre et de quantification. Le point le plus important est certainement la possibilité de faire des études au niveau des cellules isolées. Toutefois dans la version que j'ai utilisée, plusieurs limitations subsistent :

- i) La détection de l'expression de TNRC6B au moyen d'anticorps anti-HA est un compromis entre la nécessité de fixer les cellules et la sensibilité des protéines fluorescentes de telles procédures. Une autre version serait de

détecter l'expression de TNRC6B par une autre protéine fluorescente, par exemple la protéine NirFP {Shcherbo, 2010 #1584} a une émission dans le proche infrarouge qui est voisine de celle du fluorochrome que j'ai utilisé (APC) et elle est aussi excitée par le même laser (640 nm). Une analyse en trois couleurs de l'expression des protéines fluorescentes, sans traitement des cellules, pourrait donc renseigner sur l'expression de TNRC6B avec la même qualité de données que pour l'expression de la construction indicatrice. Une limitation de cette approche est évidemment qu'elle présuppose que la protéine de fusion TNRC6B-protéine fluorescente soit fonctionnelle. Pour augmenter la probabilité que ce soit le cas, il conviendra probablement d'échanger les protéines fluorescentes et d'utiliser une GFP monomérique pour marquer la protéine TNRC6B, tandis que la protéine NirFP qui est dimérique serait utilisée pour la construction indicatrice. Des essais avec un vecteur d'expression pour la NirFP sont actuellement en cours dans l'équipe.

- ii) Si l'on compare notre approche avec celle dite « dual luciférase », une différence est que nous ne disposons pas d'une référence de transfection puisque l'expression de la DsRed est affectée par les petits ARN. Aussi pour la plupart des données, j'ai dû procéder à de nombreuses expériences afin de pouvoir analyser les résultats de manière statistique. Dans les cellules HEK293, où l'efficacité de transfection est très élevée, on peut donc envisager d'ajouter une construction de plus dont le seul rôle serait de permettre de corriger les niveaux de fluorescence, en fonction de l'efficacité de transfection. Bien que différentes stratégies soient possibles y compris l'utilisation de constructions luciférase, elles présentent généralement l'inconvénient de nécessiter plusieurs analyses en parallèle sur le même échantillon, ce qui alourdit l'expérience et introduit des sources de variations. Une autre approche serait donc d'utiliser une construction pour une protéine fluorescente qui puisse être détectée en parallèle des deux ou trois autres déjà présentes. Une protéine telle que la

Discussion

BFP (blue fluorescent protein, {Subach, 2008 #1585}) présente des caractéristiques spectrales adéquates ; elle nécessite cependant un cytomètre équipé d'un laser violet (405 nm), ce qui n'est pas le cas des appareils facilement accessibles à l'équipe.

3.2.2 Le cas des gènes cellulaires

Une limitation de mon travail vient de la nature artificielle des constructions indicatrices, un élément qui est encore renforcé par les transfections transitoires. Comme il y a plusieurs exemples de gènes cellulaires induits par des petits ARN il serait intéressant d'analyser dans le cas de ceux-ci si le mécanisme de l'induction est le même que pour mes constructions indicatrices. Parmi les différents modèles possibles, le laboratoire a choisi d'explorer le cas de la E-cadhérine. En effet, d'une part plusieurs articles du groupe de R. Dahiya décrivent une induction de la E-cadhérine par des petits ARN qui ciblent son promoteur dont le micro ARN miR-373 (Li et al, 2006; Place et al, 2008), d'autre part et contrairement à d'autres gènes cibles comme p21, une augmentation de l'expression de la E-cadhérine n'a qu'un effet indirect sur la prolifération cellulaire. De plus, comme ces auteurs ont observé que l'induction ne nécessitait qu'une complémentarité de type micro ARN, il est peu probable que l'induction soit due à la coupure d'un transcrite au niveau du promoteur. Des expériences préliminaires ont été effectuées pour reproduire les résultats publiés et ont confirmé ceux-ci dans une certaine mesure, les réponses observées dépendent de la lignée de cellules PC3 utilisée. La première expérience serait donc d'analyser si le co-silencing de TNRC6B diminue cette induction. Comme l'efficacité de transfection dans ces cellules est limitée, il sera probablement utile d'analyser l'expression de la E-cadhérine en cytométrie, en observant simultanément la présence du petit ARN inducteur et le niveau d'expression de TNRC6B. De manière plus générale, le développement d'une approche expérimentale performante sur le modèle E-cadhérine permettrait au fur et à mesure de la caractérisation du mécanisme dans le cas des constructions indicatrices d'en tester la validité sur ce gène cellulaire.

Bibliographie

Aizer A, Brody Y, Ler LW, Sonenberg N, Singer RH, Shav-Tal Y (2008) The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol Biol Cell* **19**: 4154-4166

Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* **33**: 2697-2706

Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Luhrmann R (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *Rna* **11**: 717-727

Audibert A, Weil D, Dautry F (2002) In vivo kinetics of mRNA splicing and transport in Mammalian cells. *Mol Cell Biol* **22**: 6706-6718.

Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T, Voinnet O (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* **24**: 904-915

Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**: 64-71

Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation. *Cell* **122**: 553-563

Banerjee D, Slack F (2002) Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. *Bioessays* **24**: 119-129

Barbu V, Dautry F (1989) Northern blot normalization with a 28S rRNA oligonucleotide probe. *Nucleic Acids Res* **17**: 7115

Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**: 215-233

Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DPC2 decapping complexes. *Genes Dev* **20**: 1885-1898

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.

Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C (1998) AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *Embo J* **17**: 170-180

Bibliographie

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 1097-1101

Bosher JM, Dufourcq P, Sookhareea S, Labouesse M (1999) RNA interference can target pre-mRNA: consequences for gene expression in a *Caenorhabditis elegans* operon. *Genetics* **153**: 1245-1256.

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* **113**: 25-36

Broderick JA, Salomon WE, Ryder SP, Aronin N, Zamore PD (2011) Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *Rna* **17**: 1858-1869

Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**: 1185-1190

Brodersen P, Voinnet O (2009) Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 141-148

Buhler M, Verdel A, Moazed D (2006) Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing. *Cell* **125**: 873-886

Camblong J, Iglesias N, Fickentscher C, Dieppo G, Stutz F (2007) Antisense RNA stabilization induces transcriptional gene silencing via histone deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell* **131**: 706-717

Castanotto D, Tommasi S, Li M, Li H, Yanow S, Pfeifer GP, Rossi JJ (2005) Short hairpin RNA-directed cytosine (CpG) methylation of the RASSF1A gene promoter in HeLa cells. *Mol Ther* **12**: 179-183

Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AM, Tops BB, Silva JM, Myers MM, Hannon GJ, Plasterk RH (2003) A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* **425**: 411-414

Chekulaeva M, Filipowicz W (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 452-460

Chen CY, Zheng D, Xia Z, Shyu AB (2009) Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1160-1166

Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**: 823-828

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R

Bibliographie

(2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**: 740-744

Chu Y, Yue X, Younger ST, Janowski BA, Corey DR (2010) Involvement of argonaute proteins in gene silencing and activation by RNAs complementary to a non-coding transcript at the progesterone receptor promoter. *Nucleic Acids Research* **38**: 7736-7748

Clark MB, Amaral PP, Schlesinger FJ, Dinger ME, Taft RJ, Rinn JL, Ponting CP, Stadler PF, Morris KV, Morillon A, Rozowsky JS, Gerstein MB, Wahlestedt C, Hayashizaki Y, Carninci P, Gingeras TR, Mattick JS (2011) The Reality of Pervasive Transcription. *PLoS Biol* **9**: e1000625

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

Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**: 231-235

Ding L, Spencer A, Morita K, Han M (2005) The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol Cell* **19**: 437-447

Ding SW, Voinnet O (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**: 413-426

Djupedal I, Portoso M, Spahr H, Bonilla C, Gustafsson CM, Allshire RC, Ekwall K (2005) RNA Pol II subunit Rpb7 promotes centromeric transcription and RNAi-directed chromatin silencing. *Genes Dev* **19**: 2301-2306

Djuranovic S, Nahvi A, Green R (2011) A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science* **331**: 550-553

Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* **18**: 504-511

El-Shami M, Pontier D, Lahmy S, Braun L, Picart C, Vega D, Hakimi MA, Jacobsen SE, Cooke R, Lagrange T (2007) Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* **21**: 2539-2544

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E (2007a) P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* **27**: 3970-3981

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E (2008) GW182 interaction with Argonaute is essential for

Bibliographie

- miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 346-353
- Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E (2007b) Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* **21**: 2558-2570
- Eulalio A, Tritschler F, Buttner R, Weichenrieder O, Izaurralde E, Truffault V (2009a) The RRM domain in GW182 proteins contributes to miRNA-mediated gene silencing. *Nucleic Acids Res* **37**: 2974-2983
- Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E (2009b) The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *Rna* **15**: 1433-1442
- Eystathiou T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzier MJ (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* **13**: 1338-1351
- Eystathiou T, Jakymiw A, Chan EK, Seraphin B, Cougot N, Fritzier MJ (2003) The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLsm4 in cytoplasmic GW bodies. *Rna* **9**: 1171-1173
- Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, Rivas F, Jinek M, Wohlschlegel J, Doudna JA, Chen CY, Shyu AB, Yates JR, 3rd, Hannon GJ, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2009) Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* **35**: 868-880
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE (2008) Tethering assays to investigate nonsense-mediated mRNA decay activating proteins. *Methods Enzymol* **448**: 467-482
- Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* **11**: 1143-1149
- Giner A, Lakatos L, Garcia-Chapa M, Lopez-Moya JJ, Burgyan J (2010) Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog* **6**: e1000996
- Gondran P, Amiot F, Weil D, Dautry F (1999) Accumulation of mature mRNA in the nuclear fraction of mammalian cells. *FEBS Lett* **458**: 324-328
- Gregory RI, Yan K-p, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**: 235-240

Bibliographie

- Grewal SI, Elgin SC (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* **447**: 399-406
- Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**: 537-541
- Grishok A, Sinskey JL, Sharp PA (2005) Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans*. *Genes Dev* **19**: 683-696
- Guang S, Bochner AF, Pavelec DM, Burkhart KB, Harding S, Lachowiec J, Kennedy S (2008) An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus. *Science* **321**: 537-541
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**: 835-840
- Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep*
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**: 1146-1150.
- Han J, Kim D, Morris KV (2007) Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12422-12427
- Hassel BA, Zhou A, Sotomayor C, Maran A, Silverman RH (1993) A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J* **12**: 3297-3304
- Hawkins PG, Santoso S, Adams C, Anest V, Morris KV (2009) Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* **37**: 2984-2995
- He L, Hannon GJ (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* **5**: 522-531
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene.

Bibliographie

Nature **435**: 828-833

Hock J, Weinmann L, Ender C, Rudel S, Kremmer E, Raabe M, Urlaub H, Meister G (2007) Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* **8**: 1052-1060

Huang L, Mollet S, Souquere S, Le Roy F, Ernoult-Lange M, Pierron G, Dautry F, Weil D (2011) Mitochondria Associate with P-bodies and Modulate MicroRNA-mediated RNA Interference. *J Biol Chem* **286**: 24219-24230

Huntzinger E, Braun JE, Heimstadt S, Zekri L, Izaurralde E (2010) Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J* **29**: 4146-4160

Iida T, Nakayama J, Moazed D (2008) siRNA-mediated heterochromatin establishment requires HP1 and is associated with antisense transcription. *Mol Cell* **31**: 178-189

Irvine DV, Zaratiegui M, Tolia NH, Goto DB, Chitwood DH, Vaughn MW, Joshua-Tor L, Martienssen RA (2006) Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading. *Science* **313**: 1134-1137

Janowski BA, Huffman KE, Schwartz JC, Ram R, Hardy D, Shames DS, Minna JD, Corey DR (2005) Inhibiting gene expression at transcription start sites in chromosomal DNA with antigene RNAs. *Nat Chem Biol* **1**: 216-222

Janowski BA, Huffman KE, Schwartz JC, Ram R, Nordsell R, Shames DS, Minna JD, Corey DR (2006) Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 787-792

Janowski BA, Younger ST, Hardy DB, Ram R, Huffman KE, Corey DR (2007) Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nat Chem Biol* **3**: 166-173

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**: 635-647

Johnston M, Geoffroy M-C, Sobala A, Hay R, Hutvagner G (2010) HSP90 Protein Stabilizes Unloaded Argonaute Complexes and Microscopic P-bodies in Human Cells. *Molecular Biology of the Cell* **21**: 1462-1469

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs AND THEIR REGULATORY ROLES IN PLANTS. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 19-53

Kawasaki H, Taira K (2004) Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* **431**: 211-217

Bibliographie

Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fitzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* **169**: 871-884

Kennerdell JR, Carthew RW (1998) Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway. *Cell* **95**: 1017-1026

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**: 209-216

Kim DH, Saetrom P, Snove O, Jr., Rossi JJ (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 16230-16235

Kim DH, Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ (2006) Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 793-797

Kim VN (2005) Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells* **19**: 1-15

Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* **129**: 1141-1151

Kooter JM, Matzke MA, Meyer P (1999) Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends in Plant Science* **4**: 340-347

Lazzaretti D, Tournier I, Izaurralde E (2009) The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *Rna* **15**: 1059-1066

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843-854

Leung AK, Calabrese JM, Sharp PA (2006) Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18125-18130

Leung AK, Young AG, Bhutkar A, Zheng GX, Bosson AD, Nielsen CB, Sharp PA (2011) Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 237-244

Levin D, London IM (1978) Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1121-1125

Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R (2006) Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17337-17342

Bibliographie

- Li S, Lian SL, Moser JJ, Fritzler ML, Fritzler MJ, Satoh M, Chan EK (2008) Identification of GW182 and its novel isoform TNGW1 as translational repressors in Ago2-mediated silencing. *J Cell Sci* **121**: 4134-4144
- Lian SL, Li S, Abadal GX, Pauley BA, Fritzler MJ, Chan EK (2009) The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *Rna* **15**: 804-813
- Liao JY, Ma LM, Guo YH, Zhang YC, Zhou H, Shao P, Chen YQ, Qu LH (2010) Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *PLoS one* **5**: e10563
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**: 769-773
- Lippman Z, Martienssen R (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**: 364-370
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**: 1437-1441
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* **7**: 719-723
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-98
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **317**: 1764-1767
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**: 607-620
- Matzke MA, Birchler JA (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* **6**: 24-35
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP (2007) Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* **315**: 1576-1579
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15**: 185-197
- Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T (2005) Identification of

Bibliographie

novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* **15**: 2149-2155

Mette MF, Aufsatz W, van Der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* **19**: 5194-5201.

Miyoshi T, Takeuchi A, Siomi H, Siomi MC (2010) A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1024-1026

Moazed D (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* **457**: 413-420

Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, Davidson BL (2010) Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna* **16**: 495-505

Montgomery MK, Xu S, Fire A (1998) RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15502-15507

Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ (2004) Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* **305**: 1289-1292

Morris KV, Santoso S, Turner AM, Pastori C, Hawkins PG (2008) Bidirectional transcription directs both transcriptional gene activation and suppression in human cells. *PLoS Genet* **4**: e1000258

Motamedi MR, Verdel A, Colmenares SU, Gerber SA, Gygi SP, Moazed D (2004) Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell* **119**: 789-802

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

Napoli S, Pastori C, Magistri M, Carbone GM, Catapano CV (2009) Promoter-specific transcriptional interference and c-myc gene silencing by siRNAs in human cells. *Embo J* **28**: 1708-1719

O'Farrell MK (1977) Synthesis and modification of nuclear proteins in serum-stimulated 3T3 cells [proceedings]. *Biochem Soc Trans* **5**: 940

Ohrt T, Mutze J, Staroske W, Weinmann L, Hock J, Crell K, Meister G, Schwillle P (2008) Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC in vivo in human cells. *Nucleic Acids Res* **36**: 6439-6449

Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T (2009) A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* **326**: 1275-1279

Bibliographie

Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li Q-J, Lowe SW, Hannon GJ, He L (2009) miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes & Development* **23**: 2839-2849

Olsen PH, Ambros V (1999) The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Developmental Biology* **216**: 671-680

Orom UA, Nielsen FC, Lund AH (2008) MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol Cell* **30**: 460-471

Pare JM, Tahbaz N, Lopez-Orozco J, LaPointe P, Lasko P, Hobman TC (2009) Hsp90 regulates the function of argonaute 2 and its recruitment to stress granules and P-bodies. *Mol Biol Cell* **20**: 3273-3284

Parker JS, Barford D (2006) Argonaute: a scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends Biochem Sci* **31**: 622-630

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**: 86-89.

Piao X, Zhang X, Wu L, Belasco JG (2010) CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol* **30**: 1486-1494

Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna* **10**: 1518-1525

Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008) MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1608-1613

Place RF, Noonan EJ, Foldes-Papp Z, Li LC (2010) Defining features and exploring chemical modifications to manipulate RNAa activity. *Curr Pharm Biotechnol* **11**: 518-526

Pulukuri SM, Rao JS (2007) Small interfering RNA directed reversal of urokinase plasminogen activator demethylation inhibits prostate tumor growth and metastasis. *Cancer Res* **67**: 6637-6646

Rand TA, Ginalski K, Grishin NV, Wang X (2004) Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 14385-14389

Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 340-349

Bibliographie

Robb GB, Brown KM, Khurana J, Rana TM (2005) Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 133-137

Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ (2007) Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 17719-17724

Sanchez R, Marzluff WF (2004) The oligo(A) tail on histone mRNA plays an active role in translational silencing of histone mRNA during *Xenopus* oogenesis. *Mol Cell Biol* **24**: 2513-2525

Sayed D, Abdellatif M (2011) MicroRNAs in Development and Disease. *Physiological Reviews* **91**: 827-887

Schneider MD, Najand N, Chaker S, Pare JM, Haskins J, Hughes SC, Hobman TC, Locke J, Simmonds AJ (2006) Gawky is a component of cytoplasmic mRNA processing bodies required for early *Drosophila* development. *J Cell Biol* **174**: 349-358

Schwartz JC, Younger ST, Nguyen NB, Hardy DB, Monia BP, Corey DR, Janowski BA (2008) Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 842-848

Schwarz DS, Tomari Y, Zamore PD (2004) The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr Biol* **14**: 787-791

Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**: 58-63

Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* **7**: 633-636

Sen GL, Wehrman TS, Blau HM (2005) mRNA translation is not a prerequisite for small interfering RNA-mediated mRNA cleavage. *Differentiation* **73**: 287-293

Serman A, Le Roy F, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D (2007) GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Res* **35**: 4715-4727

Seto AG, Kingston RE, Lau NC (2007) The coming of age for Piwi proteins. *Mol Cell* **26**: 603-609

Sheth U, Parker R (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**: 805-808

Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**: 1434-1437

Souquere S, Mollet S, Kress M, Dautry F, Pierron G, Weil D (2009) Unravelling the ultrastructure of

Bibliographie

- stress granules and associated P-bodies in human cells. *J Cell Sci* **122**: 3619-3626
- Su H, Meng S, Lu Y, Trombly MI, Chen J, Lin C, Turk A, Wang X (2011) Mammalian hyperplastic discs homolog EDD regulates miRNA-mediated gene silencing. *Mol Cell* **43**: 97-109
- Tahbaz N, Carmichael JB, Hobman TC (2001) GERp95 Belongs to a Family of Signal-transducing Proteins and Requires Hsp90 Activity for Stability and Golgi Localization. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 43294-43299
- Tahbaz N, Kolb FA, Zhang H, Jaronczyk K, Filipowicz W, Hobman TC (2004) Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep* **5**: 189-194
- Takimoto K, Wakiyama M, Yokoyama S (2009) Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *Rna* **15**: 1078-1089
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* **455**: 1124-1128
- Till S, Lejeune E, Thermann R, Bortfeld M, Hothorn M, Enderle D, Heinrich C, Hentze MW, Ladurner AG (2007) A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 897-903
- Ting AH, Schuebel KE, Herman JG, Baylin SB (2005) Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat Genet* **37**: 906-910
- Vastenhouw NL, Brunschwig K, Okihara KL, Muller F, Tijsterman M, Plasterk RH (2006) Gene expression: long-term gene silencing by RNAi. *Nature* **442**: 882
- Vasudevan S, Steitz JA (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* **128**: 1105-1118
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**: 1931-1934
- Vaucheret H, Beclin C, Fagard M (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* **114**: 3083-3091.
- Vaucheret H, Fagard M (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet* **17**: 29-35.
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**: 1833-1837.

Bibliographie

- Wagner E, Clement SL, Lykke-Andersen J (2007) An unconventional human Ccr4-Caf1 deadenylase complex in nuclear cajal bodies. *Mol Cell Biol* **27**: 1686-1695
- Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD (2006) Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell* **22**: 553-560
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**: 567-576
- Wassenegger M, Pelissier T (1998) A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology* **37**: 349-362
- Weil D, Boutain S, Audibert A, Dautry F (2000) Mature mRNAs accumulated in the nucleus are neither the molecules in transit to the cytoplasm nor constitute a stockpile for gene expression. *Rna* **6**: 962-975
- Weil D, Brosset S, Dautry F (1990) RNA processing is a limiting step for murine tumor necrosis factor beta expression in response to interleukin-2. *Mol Cell Biol* **10**: 5865-5875
- Weinberg MS, Barichiev S, Schaffer L, Han J, Morris KV (2007) An RNA targeted to the HIV-1 LTR promoter modulates indiscriminate off-target gene activation. *Nucleic Acids Res* **35**: 7303-7312
- Weinberg MS, Villeneuve LM, Ehsani A, Amarzguioui M, Aagaard L, Chen ZX, Riggs AD, Rossi JJ, Morris KV (2006) The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. *Rna* **12**: 256-262
- Wianny F, Zernicka-Goetz M (2000) Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* **2**: 70-75.
- Wightman B, Burglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G (1991) Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev* **5**: 1813-1824
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**: 855-862
- Wu L, Fan J, Belasco JG (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4034-4039
- Yang S, Tutton S, Pierce E, Yoon K (2001) Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **21**: 7807-7816.
- Yang Z, Jakymiw A, Wood MR, Eystathioy T, Rubin RL, Fritzler MJ, Chan EK (2004) GW182 is

Bibliographie

critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci* **117**: 5567-5578

Yao B, Li S, Jung HM, Lian SL, Abadal GX, Han F, Fritzler MJ, Chan EK (2011) Divergent GW182 functional domains in the regulation of translational silencing. *Nucleic Acids Res* **39**: 2534-2547

Yekta S, Shih IH, Bartel DP (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**: 594-596

Yekta S, Tabin CJ, Bartel DP (2008) MicroRNAs in the Hox network: an apparent link to posterior prevalence. *Nat Rev Genet* **9**: 789-796

Yi R, Fuchs E (2011) MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells. *Journal of Cell Science* **124**: 1775-1783

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**: 3011-3016

Yu W, Gius D, Onyango P, Muldoon-Jacobs K, Karp J, Feinberg AP, Cui H (2008) Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature* **451**: 202-206

Zekri L, Huntzinger E, Heimstadt S, Izaurralde E (2009) The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol Cell Biol* **29**: 6220-6231

Zeng Y, Sankala H, Zhang X, Graves PR (2008) Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J* **413**: 429-436

Zipprich JT, Bhattacharyya S, Mathys H, Filipowicz W (2009) Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *Rna* **15**: 781-793