



Analyse cinétique de l'interférence par l'ARN dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique des cellules de mammifères

Carole Ribet

► To cite this version:

Carole Ribet. Analyse cinétique de l'interférence par l'ARN dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique des cellules de mammifères. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2005. Français. NNT : . tel-00084397

HAL Id: tel-00084397

<https://theses.hal.science/tel-00084397>

Submitted on 6 Jul 2006

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.

UNIVERSITE DE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD
Ecole doctorale de Cancérologie

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS XI
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire
présentée et soutenue publiquement par

Carole RIBET

le 15 décembre 2005

Analyse cinétique de l'interférence par l'ARN dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique des cellules de mammifères

Directeur de thèse : M. François DAUTRY

JURY

M. Claude MALVY	Président
M. Edouard BERTRAND	Rapporteur
M. Jérôme CAVAILLE	Rapporteur
M. Christophe ANTONIEWSKI	Examineur
M. Pierre LEGRAIN	Examineur
M. François DAUTRY	Directeur de thèse

Laboratoire génétique moléculaire et intégration des fonctions cellulaires, UPR 1983,
institut André Lwoff, 7 rue Guy Môquet, 94801 Villejuif

Résumé

L'interférence par l'ARN (ARNi) désigne la dégradation spécifique de séquence des ARN induite par des ARN double brin. Dans les cellules de mammifères, l'ARNi peut être induite par des petits ARN interférants (siARN). L'ARNi est effectuée par le complexe RISC (RNA induced silencing complex) contenant, entre autre, la séquence d'ARN guide, qui permet la reconnaissance de la cible et la nucléase Ago2, responsable de son clivage.

Ces travaux ont porté sur l'analyse cinétique de la dégradation des ARNm induite par les siARN dans des cellules de mammifères. Nous avons mesuré les vitesses de dégradation des ARNm de β -globine et de lymphotoxine- α sous interférence et montré, d'une part, que les différences d'efficacité des siARN sont liées à des différences de vitesses de dégradation et, d'autre part, que ces vitesses s'accélérent entre 16h et 24h après la transfection pour deux siARN inhibant 80 à 90% des messagers. Nous avons aussi observé qu'un même siARN induit des inhibitions différentes pour les deux messagers de la lymphotoxine- α , ce qui nous a amené à proposer l'existence d'une interaction entre la traduction et l'interférence par l'ARN.

Nous avons analysé l'impact de l'interférence sur le métabolisme nucléaire des ARNm. Nous avons ainsi démontré que les siARN induisent la dégradation des ARN nucléaires avec une efficacité qui dépend d'une compétition cinétique entre l'interférence et les réactions de maturation et d'export qui affectent le transcrit ciblé. De plus, nous avons observé que la dégradation d'un ARN messager pouvait s'accompagner d'une accumulation de ses précurseurs, probablement par une augmentation de synthèse. Ainsi, l'interférence permet-elle de mettre en évidence de nouvelles régulations du métabolisme nucléaire des ARN.

mots-clés: ARN interférence, siARN, cinétique de dégradation, ARN nucléaires, traduction

Abstract

RNA interference (RNAi) is a mechanism by which double stranded RNA trigger the sequence specific degradation of RNA. In mammalian cells, RNAi can be induced by short interfering RNA (siRNA). RNAi is carried out by the RISC complex (RNA induced silencing complex) that contains at least the RNA guide sequence and the Ago2 nuclease, enabling target identification and cleavage, respectively.

In this thesis we focused on the kinetic analysis of the mRNA degradation induced by siRNA in mammalian cells. We measured the half-lives of the β -globin and lymphotoxin- α (LT α) silenced mRNA and showed that these kinetics reflected in part the efficiency of silencing of the corresponding siRNA. However, we also observed for two efficient siRNA, that the degradation kinetics accelerate between 16 h and 24 h after transfection. In addition, the observation that the same siRNA induce different inhibitions for the two LT α messengers has led us to propose an interaction between translation and RNA interference.

We have investigated the impact of RNA interference on the nuclear mRNA metabolism. We thus demonstrated that siRNA induce the degradation of nuclear RNA with an efficacy that depends on a kinetic competition between interference and processing reactions involving the targeted transcript (splicing, transport). Moreover, we observed that the degradation of a messenger RNA could be accompanied by the accumulation of its precursors, probably due to a higher RNA synthesis. Thus, interference can shed light on new regulations of the nuclear mRNA metabolism.

keywords: RNA interference, siRNA, decay kinetics, nuclear RNA, translation

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier François pour m'avoir accueillie dans le laboratoire et m'avoir confiée ce sujet de thèse. Merci pour son encadrement attentif, les nombreuses discussions scientifiques et sa patience lors des corrections de rédaction. Merci aussi pour m'avoir appuyée et soutenue lors des démarches pour les dossiers de financement. Merci encore pour m'avoir permis d'assister à de nombreux congrès.

Je tiens à remercier aussi très vivement Dominique d'avoir été si disponible tout au long de ma thèse, de m'avoir encadrée et tant appris, à la paillasse autant que sur la réflexion scientifique. Merci pour tes qualités humaines, ta bonne humeur et merci aussi d'avoir à maintes reprises, participé à la rédaction des dossiers et articles.

Je voudrais aussi remercier Claude Malvy, Edouard Bertrand, Jérôme Cavaille, Christophe Antoniewski et Pierre Legrain qui ont accepté de faire parti de mon jury de thèse.

Merci à Philippe Bastin qui a suivi l'avancée de mes travaux et avec qui j'ai eu des discussions très enrichissantes.

Mes remerciements vont aussi à Claude Boucheix et Eric Rubinstein qui m'ont prodiguée des conseils forts utiles pour mes premiers essais avec CD9 et avec la cytométrie en flux. Merci énormément à Michel Prenant pour son aide, pour sa gentillesse et pour sa disponibilité sans faille!

Merci aussi à Gérard Pierron pour ses nombreux conseils et qui m'a beaucoup aidée lors de la préparation du congrès de Cold Spring Harbour.

Merci à Marylinne pour son aide, sa gentillesse, sa bonne humeur qui ont égayé notre grand labo.

Merci à Marianne, Noélie et Chrystelle pour leurs nombreux conseils, leur disponibilité, leur gaieté et leur bienveillance.

Merci à Thierry aussi pour ses conseils et ses avis scientifiques.

Merci à Christelle pour ses conseils, sa disponibilité, son amitié et pour nos conversations sur l'avenir après-thèse.

Merci encore à Antonietta pour sa joie de vivre et nos nombreuses discussions, pas seulement scientifiques, et à Daniela pour sa gentillesse.

Un énorme merci aux filles: Chrystelle, Evelyne, Laurence, Marianne, Sylvie S et Sylvie P grâce auxquelles les pauses cafés ont été des petits moments de détente et de rire.

Merci à Michelle, Muriel, Caroline et Michel pour les nombreuses discussions enrichissantes, leur disponibilité, leur gentillesse et leur aide.

Merci à l'équipe "poulet", Anne, Rima, Véro et Thomas, pour leur bonne humeur et leur café expresso!

Merci à Marie-Claude Labastie pour son aide lors de ma recherche d'un sujet de thèse, sa disponibilité à l'IFSBM et pour ses nombreux conseils sur l'après-thèse.

Merci à Thomas pour son soutien pendant la rédaction.

Et un énorme merci à tous les amis qui m'ont supportée (dans tous les sens du terme): Antoine, Aurèle, Benoît, Béra, Bich-Tuyen, Bruno, Céline, Célinou, David, Greg, Guillaume, Jeff, Jérôme, Johanne, Ketty, Mathieu, Mélanie, Raph, Seb, Sophie... J'espère n'avoir oublié personne. Merci aussi à Sylvain pour m'avoir toujours soutenue et encouragée.

Et enfin, merci à ma famille qui n'a jamais douté et m'a toujours soutenue tout au long de mes études.

INTRODUCTION: L'interférence par l'ARN, un mécanisme de régulation de l'expression génétique par l'ARN double-brin **9**

partie I : Genèse des petits ARN double-brins responsables de la spécificité de l'interférence par l'ARN **13**

1. Classification et fonctions des petits ARN endogènes	13
a. Les microARN	13
(i) Définition	13
(ii) Biogenèse des miARN	14
(iii) Mécanismes d'action des miARN	19
(iv) Fonctions des miARN	21
b. Les siARN	23
(i) Les polymérases à ARN dépendantes de l'ARN (RdRP) sont impliquées dans la biogenèse de certains siARN	25
(ii) Les siARN associés à des répétitions (rasiARN)	26
(iii) Les siARN endogènes qui agissent en trans (tasiARN)	34
(iv) Les petits ARN scanner (scnARN)	37
2. Induction de l'interférence par l'ARN par des siARN exogènes	38
a. Extinction de gène induite par les virus	38
b. Extinction de l'expression des gènes par des ARN double-brin exogènes	41

partie II : Assemblage et mécanisme d'action du complexe effecteur de l'interférence par l'ARN : RISC **43**

1. Composition des complexes RISC	43
a. Le complexe RISC contient une protéine Argonaute.	43
b. Selon les formes de RISC purifiées, le complexe contient d'autres protéines	45
(i) Purification chez <i>D. melanogaster</i>	45
(ii) Purification à partir de cellules humaines	48
2. L'assemblage du complexe RISC	49
a. L'enzyme Dicer est une composante des complexes précurseurs de RISC	49
(i) Dicer participerait à l'assemblage de RISC	49
(ii) Les complexes R2D2/DCR2 et RLC sont des précurseurs de RISC	50
b. Un seul brin du siARN est présent dans RISC	52
(i) Un des brins du siARN est préférentiellement intégré dans RISC	55

(ii) Le brin guide du siARN est associé à la protéine Argonaute dans RISC	59
3. Le clivage de l'ARNm par RISC	61
a. La nucléase (Slicer) de RISC est une protéine Argonaute	61
b. La partie 5' du brin guide est déterminante pour l'activité de RISC	62
c. La réaction de clivage de la cible	63
partie III : Les petits ARN double brin comme outil pour la génomique fonctionnelle dans les cellules de mammifères	69
1. Les siARN doivent être de taille inférieure à 30 nucléotides	69
2. La stabilité du siARN doit faciliter l'incorporation du brin guide dans RISC	70
3. La séquence du siARN doit être choisie pour minimiser la dégradation d'ARNm non ciblés	71
partie IV : Régulation de la dégradation des ARNm dans les cellules eucaryotes	75
1. Les deux voies générales de dégradation des ARNm cytoplasmiques	75
a. La déadénylation des ARNm initie leur dégradation	75
(i) Le complexe contenant les nucléases CCR4p et POP2p	75
(ii) Le complexe contenant Pan2p et Pan3p	76
(iii) L'enzyme PARN (poly(A) ribonuclease)	76
b. La voie exonucléasique 5' vers 3'	77
c. La voie exonucléasique 3' vers 5'	80
2. Les voies spécialisées de dégradation des ARNm	80
a. Les transcrits nucléaires aberrants sont dégradés par l'exosome	80
b. La dégradation des transcrits contenant des codons non-sens (NMD)	83
c. La dégradation spécifique de séquence par l'ARNi	88
3. Les corps dcp ont un rôle dans la dégradation et le stockage des ARNm	88
partie V : Problématique	91
1. Etat de lieux en 2002	91
2. Approche expérimentale	92
3. Organisation du rapport	96

RESULTATS ET DISCUSSION

99

partie I : Choix des siARN et mesure de leur efficacité à inhiber l'expression de la β -globine et de la lymphotoxine- α

101

1. Choix de la technique de transfection des siARN 101
2. Choix des séquences des siARN 103
 - a. Méthode de choix 103
 - a. Trois siARN ciblant l'ARNm de β -globine 105
 - b. Quatre siARN ciblant l'ARNm de la lymphotoxine- α 107
3. Dose réponse aux siARN sélectionnés 109
 - a. Efficacités des siARN ciblant la β -globine 109
 - b. Efficacités des siARN ciblant la lymphotoxine- α 111
4. Mise en place et durée de l'effet des siARN 113
 - a. Cinétique de la diminution des ARNm de β -globine induite par les siARN 113
 - b. Cinétique de la diminution des ARNm de lymphotoxine- α induite par les siARN 115
5. Discussion 117

partie II : Etude de la cinétique de dégradation des ARNm induite par les siARN dans les cellules de mammifères

123

1. Mesure et caractérisation des vitesses apparentes de dégradation des ARNm de β -globine. 123
2. Méthode de calcul des vitesses de dégradation des ARNm de β -globine par RISC 139
3. Caractérisation des vitesses de dégradation des ARNm de β -globine par RISC 145
 - a. Etude de β Glo2 145
 - b. Etude de β Glo1 147
 - c. Etude de β Glo3 149
 - d. Bilan des études cinétiques de la dégradation de l'ARNm de β -globine induite par les siARN 151
4. Etude de l'effet de l'épissage sur l'activité de β Glo3 153
5. Discussion 157
 - a. RISC clive les ARNm selon des vitesses qui peuvent être de l'ordre de la minute ou de l'heure 157
 - b. Limites de la méthode d'analyse cinétique 159
 - c. Implications pour le mécanisme de l'interférence par l'ARN 163

partie III : Etude de la dégradation des ARN nucléaires induite par les siARN	169
1. Effets des siARN sur l'accumulation des ARN nucléaires 24h après la transfection	171
2. Analyse des cinétiques de décroissance des transcrits nucléaires de lymphotoxine- α .	175
3. Evolution de l'effet des siARN sur l'accumulation des ARN nucléaires.	227
4. L'accumulation des pré-messagers peut être observée sur un autre gène	229
5. Discussion	231
a. La sensibilité des transcrits nucléaires à l'ARNi dépend de la cinétique de leur maturation	231
b. L'ARNi induit une accumulation plus ou moins tardive des pré-messagers	233
partie IV : Etude de l'incidence de la traduction d'un messager sur sa dégradation par l'ARNi	241
1. Le différentiel d'activité sur C0 et C1 est propre à chaque siARN ciblant l'exon 4 de la lymphotoxine- α	243
2. Développement d'une lignée exprimant la lymphotoxine- α dont la traduction est régulable par le fer	245
a. Mise au point d'une méthode pour détecter la lymphotoxine- α de souris	245
b. Construction des clones stables	247
c. Définition des conditions permettant de contrôler l'activité du système IRE/IRP	249
d. Régulation de la lignée IRE-LT α 1A5	251
3. Discussion	255
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	263
MATERIEL ET MÉTHODES	275
partie I : Biologie cellulaire	275
1. Culture cellulaire	275
2. Transfections	275
3. Réactifs chimiques	277
4. Analyse du cycle cellulaire	279
5. Détection de la lymphotoxine- α par immunofluorescence	279
partie II : Biologie moléculaire	281
1. Préparation des siARN	281

2. Vecteurs et sondes	283
a. Construction du vecteur pCM2 IRE-LTa	283
b. Construction du plasmide pBt-Bglo.geno-.delHin2 pour détecter les transcrits de β -globine.	283
c. Détection des ARN de β -globine	285
d. Détection des ARN de lymphotoxine- α	285
e. Détection des ARN d'actine	285
f. Détection des ARN de cyclophiline	285
3. Fractionnement noyau/cytoplasme	287
4. Extraction d'ARN	287
a. Par ultra-centrifugation	287
b. Avec le kit 'SV total RNA isolation system' de Promega [®]	289
5. Analyse des ARN	289
a. Par Northern blot	289
b. Par cartographie à la RNase	291
c. Marquage des sondes	291
ANNEXES	295
partie I : Annexe 1: profils des stabilités internes des siARN contre la β-globine	295
partie III : Annexe 2: estimation de l'impact des demi-vies des messagers C1 et C0 sur leur inhibition par un siARN	299
Bibliographie	307

INTRODUCTION

INTRODUCTION: L'interférence par l'ARN, un mécanisme de régulation de l'expression génétique par l'ARN double-brin

L'interférence par l'ARN (ARNi) désigne l'ensemble des régulations spécifiques de séquence de l'expression des gènes qui sont guidées par une molécule d'ARN de petite taille qui sert de séquence guide. L'interférence par l'ARN peut aussi être désignée par le terme silencing ou extinction des gènes.

Ces régulations de l'expression génétique peuvent être de différentes natures: elles peuvent induire l'arrêt de la transcription du gène ciblé, c'est la voie de l'extinction transcriptionnelle des gènes (TGS: transcriptional gene silencing), ou bien elles peuvent agir au niveau de l'ARN messager soit par un mécanisme de dégradation soit par l'arrêt de sa traduction, il s'agit alors de la voie de l'extinction post-transcriptionnelle des gènes (PTGS: post-transcriptional gene silencing). Parfois le terme ARNi est utilisé pour désigner spécifiquement la dégradation post-transcriptionnelle des messagers.

Les diverses voies de l'interférence par l'ARN suivent un schéma commun dont le fil conducteur est l'ARN guide (cf. figure 1) (Sontheimer and Carthew 2005). Dans un premier temps, l'ARN guide est présent sous une forme double-brin et il est pris en charge par une ou plusieurs enzymes de type RNase III des familles Dicer et Drosha qui vont le découper en petites molécules d'ARN double-brin de 21 à 28 nucléotides. Ces petits ARN sont ensuite intégrés dans des complexes protéiques où ils servent de séquence guide pour l'activité de TGS ou de PTGS. Ces complexes régulateurs, dont font partie RISC (RNA induced silencing complex) et RITS (RNAi mediated initiation of transcriptional silencing), sont composés de diverses protéines cependant ils sont tous dépendant d'un membre de la famille des protéines Argonaute. Le complexe RISC est impliqué dans les voies du PTGS et le complexe RITS dans celles du TGS.

La régulation de l'expression génétique par l'ARN double-brin a été mise en évidence dans la plupart des organismes sauf chez *S. cerevisiae*, *T. cruzi* et *Leishmania* (Robinson and Beverley 2003; DaRocha, Otsu et al. 2004). Selon les organismes, les

voies de l'ARNi présentent des différences à différentes étapes du schéma général décrit précédemment, notamment dans le nombre de membres des familles de protéines impliquées dans l'ARNi. Une autre différence importante réside dans la capacité des plantes et des vers à amplifier et à diffuser le signal déclenchant l'extinction des gènes, ce qui se traduit par une propagation à travers tout l'organisme. Ces deux compétences sont associées à l'existence dans ces organismes d'une famille de protéines: les polymérases à ARN dépendantes de l'ARN (ou RdRP). Dans les autres organismes qui ne possèdent pas de telles enzymes, l'ARNi est localisé dans les régions où le signal a été généré (Tijsterman, Ketting et al. 2002; Ullu, Tschudi et al. 2004; Tomari and Zamore 2005).

L'interférence par l'ARN a clairement été mise en évidence en 1998 par l'équipe d'A. Fire et il s'est rapidement avéré que l'ARNi était un mécanisme cellulaire important pour la viabilité des organismes. Par exemple, les souris dont le gène *dicer* a été invalidé ne sont pas viables (Bernstein, Kim et al. 2003). L'ARNi a deux fonctions majeures: d'une part la protection de la cellule contre des acides nucléiques indésirables comme ceux des éléments mobiles génétiques et des virus et d'autre part la régulation de l'expression génique dans de nombreux processus cellulaires (Baulcombe 2005).

Cette introduction présente d'abord les différentes classes d'ARN qui sont au cœur de l'ARNi ainsi que leurs multiples fonctions. Puis la seconde partie décrit la formation et le mécanisme d'action du complexe RISC qui intervient dans la dégradation des ARNm. La troisième partie décrira l'utilisation de l'ARNi comme un outil de génomique fonctionnelle dans les cellules de mammifères et dans la quatrième partie seront exposées les différentes voies de la dégradation des ARNm dans les cellules eucaryotes dont la dégradation spécifique de séquence par l'ARNi fait partie.

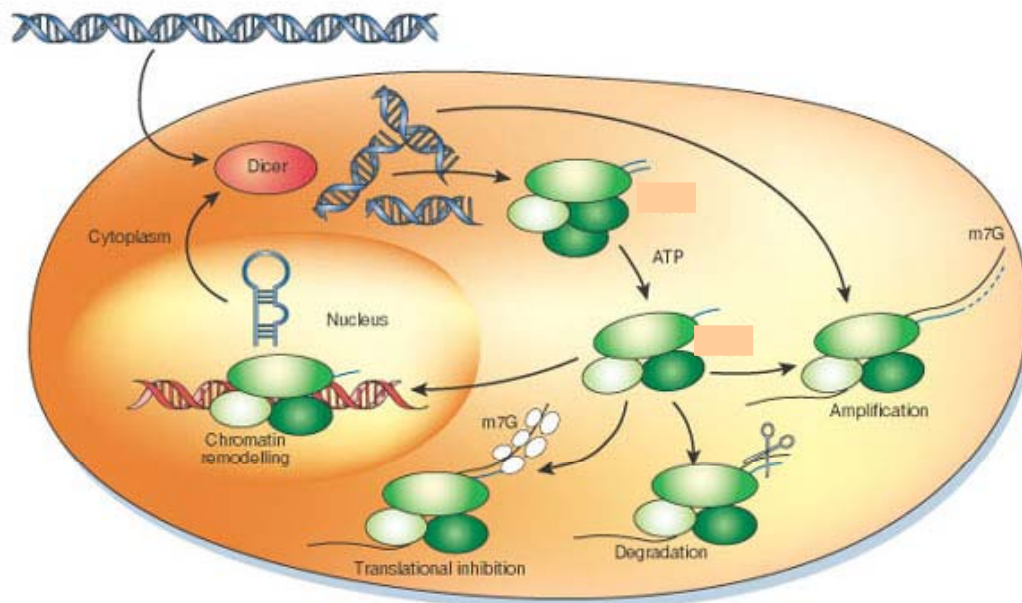


Figure 1: La régulation de l'expression génique par l'interférence par l'ARN. Les ARN double-brin sont clivés dans un premier temps par un membre de la famille Dicer et les produits de clivage sont incorporés dans un complexe ribonucléo-protéique. Les complexes guidés par un des brins d'ARN modulent l'expression du gène ciblé selon trois voies possibles: la dégradation des ARNm, l'arrêt de la traduction des ARNm ou la répression transcriptionnelle. Dans certains organismes l'ARN interférant est amplifié. (Hannon 2002)

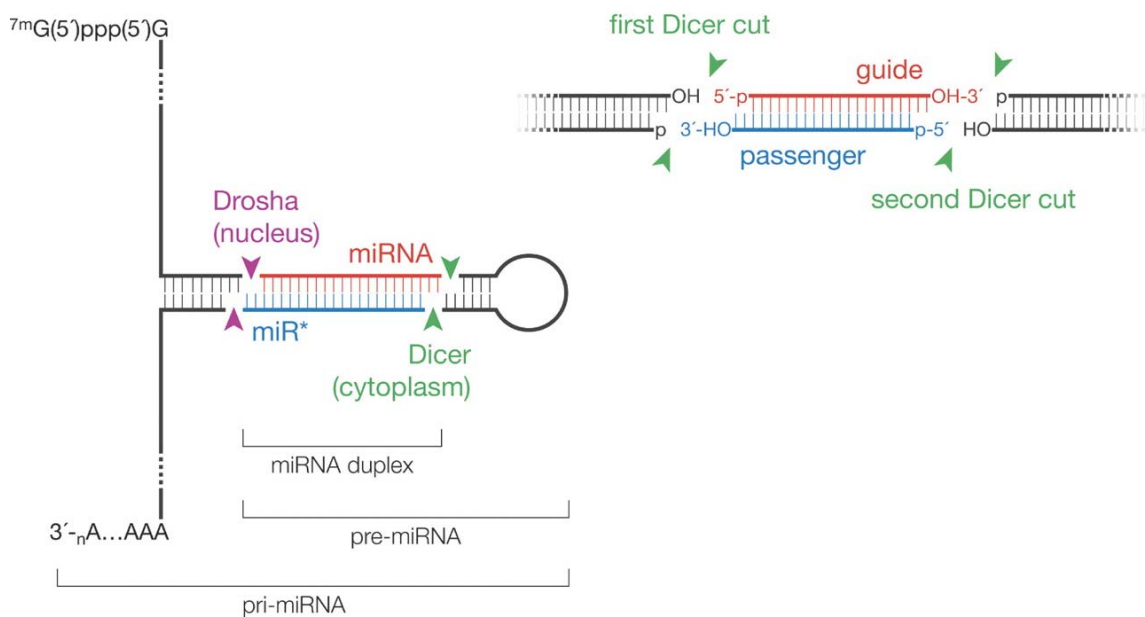


Figure 2: structures des miARN et des siARN. A gauche: le pri-miARN est clivé par Drosha à la base de la structure en tige pour donner le pre-miARN. Puis le pre-miARN est clivé par Dicer ce qui libère le duplex du miARN apparié avec son brin complémentaire (appelé miR*). A droite: le siARN est issu du clivage d'une longue molécule d'ARN double-brin par Dicer et est caractérisé par les deux nucléotides libres aux extrémités 3' et par une longueur de 21 à 27 nucléotides. (Tomari and Zamore 2005)

partie I : Genèse des petits ARN double-brins responsables de la spécificité de l'interférence par l'ARN

Les petits ARN qui déclenchent l'extinction de l'expression des gènes constituent une famille d'ARN non codant, régulateurs de 19-28 nt issus d'ARN double brin (Kim 2005). Ces petits ARN peuvent être classés en deux sous-ensembles en fonction de la nature de leurs précurseurs: les miARN, qui proviennent d'un ARN simple brin se repliant selon une structure spécifique en épingle à cheveux, et les siARN, qui sont issus d'une molécule d'ARN double-brin. Des miARN et des siARN ont été identifiés dans la majorité des génomes eucaryotes testés mais ils peuvent aussi être de nature exogène.

Dans une première partie, je décrirai les différentes familles de petits ARN double-brin ainsi que leurs fonctions putatives puis la seconde partie traitera de l'ARNi induite par les petits ARN exogènes.

1. Classification et fonctions des petits ARN endogènes

Bien que les petits ARN qui initient les divers mécanismes de l'extinction des gènes forment une famille homogène de molécules d'ARN double-brin ayant des tailles relativement proches, ils proviennent de différents précurseurs, qui alimentent des voies de maturation spécifiques.

a. Les microARN

(i) Définition

Les microARN (ou miARN) sont des molécules d'ARN de 18 à 24 nt dont les précurseurs sont des ARN simple brin qui se replient selon une structure en tige-boucle (aussi appelée épingle à cheveux, cf. figure 2) et dont la structure tige contient des appariements imparfaits. Le plus souvent, un seul miARN mature (simple brin) est détectable dans les cellules qui expriment le précurseur.

Les miARN ont été les premiers petits ARN endogènes à avoir été identifiés (Lee, Feinbaum et al. 1993; Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001; Lau, Lim et al. 2001; Lee and Ambros 2001; Mourelatos, Dostie et al. 2002). Des miARN ont été trouvés chez toutes les espèces animales et végétales analysées jusqu'à présent mais en revanche aucun n'a été identifié chez *S. pombe* (Bartel 2004).

D'après le registre des miARN (<http://microrna.sanger.ac.uk/index.shtml>) (Griffiths-Jones 2004), 78 miARN ont été isolés chez *D. melanogaster* et 114 chez *C. elegans*. La base de données contient 321 séquences pour l'homme qui codent pour 313 miARN matures uniques et dont 223 ont été vérifiés expérimentalement. Chez la souris, il y a 245 séquences qui peuvent coder pour des miARN et l'existence de 180 miARN matures uniques a été confirmée expérimentalement. Chez *A. thaliana*, on trouve 117 gènes de miARN qui donnent 73 séquences matures distinctes dont 62 ont été vérifiées expérimentalement. Cependant cette liste de miARN potentiels continue de s'allonger et les gènes « codant » pour des miARN pourraient représenter de 2 à 3% des gènes humains, tandis qu'environ 20% de l'ensemble des gènes serait régulé par des miARN (Berezikov, Guryev et al. 2005; Sontheimer and Carthew 2005; Xie, Lu et al. 2005).

(ii) Biogenèse des miARN

→ mécanisme général de la biogenèse des miARN

Les miARN sont transcrits par la polymérase à ARN II sous la forme de transcrits primaires, appelés pri-miARN (cf. figure 3) (Cai, Hagedorn et al. 2004; Lee, Nakahara et al. 2004). Dans le monde animal, ces précurseurs sont convertis dans le noyau en pre-miARN d'environ 70 nucléotides, qui ont une structure en épingle à cheveux, et cette conversion est réalisée par l'enzyme DROSHA associée à son cofacteur DGCR8/Pasha (Lee, Jeon et al. 2002; Lee, Ahn et al. 2003; Denli, Tops et al. 2004; Gregory, Yan et al. 2004; Han, Goud et al. 2004; Landthaler, Yalcin et al. 2004). Les pre-miARN sont ensuite exportés dans le cytoplasme par la protéine EXPORTIN-5. Celle-ci ne possède pas de domaine de liaison à l'ARN (simple brin ou double brin) et le pre-miARN pourrait donc s'associer à l'EXPORTIN-5 par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice (Yi, Qin et al. 2003; Lund, Guttinger et al. 2004; Yi, Doehle et al. 2005).

Ensuite, dans le cytoplasme, les pre-miARN sont clivés par des enzymes de la famille Dicer qui ôtent la boucle de l'épingle à cheveux et donne naissance à un miARN double-brin (cf. figure 3) (Bernstein, Caudy et al. 2001; Grishok, Pasquinelli et al. 2001; Hutvagner, McLachlan et al. 2001; Lee, Nakahara et al. 2004; Xie, Johansen et al. 2004). Ce duplex ne s'accumule pas car un des brins est rapidement intégré dans un complexe

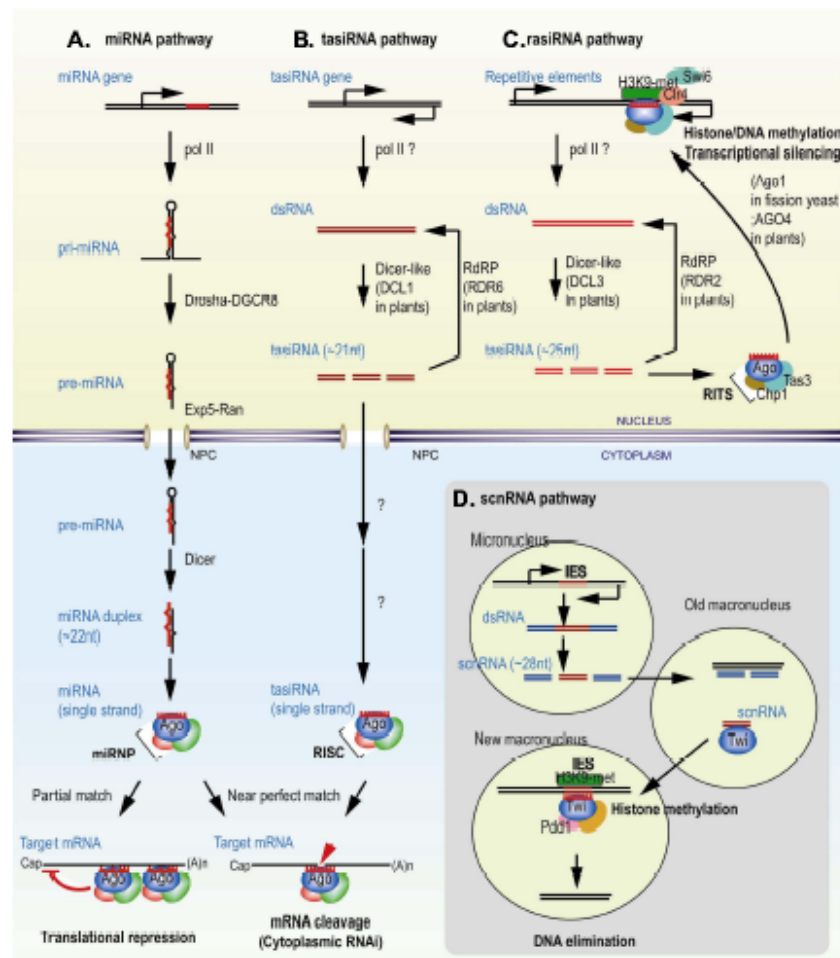


Figure 3: Les voies de l'ARNi, Biogenèse et mécanisme d'action des miARN (A), des tasiARN (B) et des rasiARN (C). La partie supérieure schématise les processus nucléaires et la partie inférieure les mécanismes cytoplasmiques. En D, biogenèse et mécanisme d'action des scnARN chez *Tetrahymena thermophila*. (Kim 2005)

ribonucléo-protéique où il devient un miARN mature alors que le brin complémentaire est dégradé (Khvorova, Reynolds et al. 2003; Schwarz, Hutvagner et al. 2003). Les mécanismes de séparation des brins du duplex miARN/miR* et de dégradation du miR* sont encore mal connus (cf Partie II.2.b).

Chez les plantes, c'est l'enzyme nucléaire DCL1 associée aux facteurs HEN1 et HYL1 qui est responsable de la genèse des miARN (Park, Li et al. 2002; Reinhart, Weinstein et al. 2002; Boutet, Vazquez et al. 2003; Papp, Mette et al. 2003; Han, Goud et al. 2004; Kurihara and Watanabe 2004; Vazquez, Gasparioli et al. 2004). Les plantes possèdent une protéine homologue à EXPORTIN-5, HASTY, qui pourrait participer au transport des miARN d'après le phénotype des mutants correspondant (Telfer and Poethig 1998; Bollman, Aukerman et al. 2003).

→ DROSHA est spécifique de la maturation nucléaire des pri-miARN chez les animaux

L'enzyme DROSHA est une endonucléase à ARN de type III spécifique des ARN double-brin. Elle contient deux domaines catalytiques RNase III en tandem et un domaine de liaison aux ARN double brin (dsRBD) en position C terminale (cf. figure 4). Cette enzyme est conservée chez les métazoaires et pour chaque espèce, il n'existe qu'un seul homologue de DROSHA (Filippov, Solovyev et al. 2000; Wu, Xu et al. 2000).

DROSHA est spécifiquement impliquée dans la maturation des miARN et elle n'intervient pas dans la transformation des longs ARN double-brin. La coupure par DROSHA laisse deux nucléotides libres à l'extrémité 3' et une extrémité 5' phosphorylée (Basyuk, Suavet et al. 2003; Lee, Ahn et al. 2003).

→ la famille multigénique Dicer est impliquée dans la maturation des ARN double-brin dans toutes les voies de l'ARNi

Les protéines DICER sont très conservées, ont un poids moléculaire d'environ 200 kDa et appartiennent à la famille des endonucléases de type III. Leur partie C-terminale contient deux domaines catalytiques RNaseIII en tandem et un domaine de liaison à l'ARN double-brin (cf. figure 4). La partie N-terminale possède un domaine hélicase à ARN de type DExH/ATPase, un domaine DUF283 et un domaine PAZ

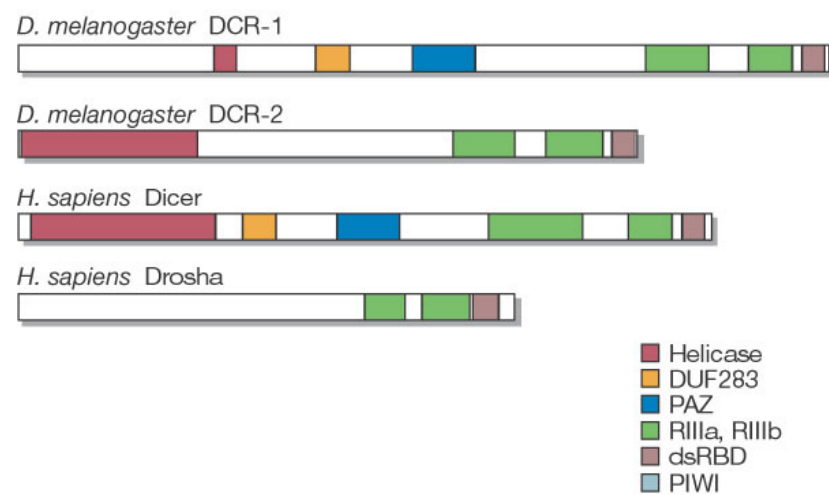


Figure 4: structures des enzymes de la famille RNase III impliquées dans l'ARNi. Elles possèdent deux domaines RNase III et un domaine de liaison aux ARN double-brin en position C terminale. Certains membres de la famille Dicer contiennent le domaine PAZ qui est aussi trouvé chez les protéines Argonaute. (Meister and Tuschl 2004)

(Kim 2005). DICER clive des molécules d'ARN double-brin et génère des duplex d'ARN d'environ 21 nucléotides qui ont une extrémité 5' phosphorylée et deux nucléotides non appariés à chaque extrémité 3' qui, elle, est hydroxylée (cf. figure 2) (Elbashir, Lendeckel et al. 2001).

Selon les organismes, il peut exister une ou plusieurs protéines DICER. Il en résulte la possibilité que chaque protéine DICER soit spécifiquement associée à la biogenèse d'une classe de petit ARN.

- Chez *D. melanogaster*, DICER a 2 paralogues : DCR-1 qui clive les précurseurs des miARN (Lee, Nakahara et al. 2004) et DCR-2 qui est requis pour le découpage des longs ARN double-brins (Liu, Rand et al. 2003; Lee, Nakahara et al. 2004; Pham, Pellino et al. 2004). DCR-1 s'associe in vivo avec la protéine LOQS (ou Loquacious) qui stimule son activité de clivage et est nécessaire pour la spécificité de substrat de DCR-1 (Forstemann, Tomari et al. 2005; Saito, Ishizuka et al. 2005).
- Chez *C. elegans*, *S. pombe* et l'homme, on ne trouve qu'une protéine Dicer: DCR-1, DCR et DICER (ou Helicase-MOI) respectivement. Dans ces organismes, la maturation faite par DICER des petits ARN semble donc être commune aux différentes classes, cependant la reconnaissance de la nature de l'ARN substrat pourrait être effectuée par des protéines associées à Dicer, ce qui permettrait de spécialiser les voies de maturation (Meister and Tuschl 2004).
- Chez *A. thaliana*, il existe quatre protéines DICER-like: DCL1, DCL2, DCL3, DCL4. DCL1 est localisée dans le noyau et elle clive les précurseurs des miARN. Les autres protéines Dicer interviennent dans la genèse des siARN: DCL2 a un rôle dans la maturation des siARN issus des génomes de virus, DCL3 est impliquée dans la genèse des siARN issus de séquences répétées (rasiARN, voir ci-après) et DCL4 est nécessaire pour la production d'une part des siARN impliqués dans la propagation de l'ARNi sur 10-15 cellules adjacentes et d'autre part des siARN agissant en trans (tasiARN, voir ci-après) (Boutet, Vazquez et al. 2003; Han, Goud et al. 2004; Vazquez, Gascioli et al. 2004; Xie, Johansen et al. 2004; Dunoyer, Himber et al. 2005; Gascioli, Mallory et al. 2005; Xie, Allen et al. 2005).

(iii) Mécanismes d'action des miARN

→ Les miARN induisent l'extinction post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.

Les miARN diminuent l'expression des gènes selon deux mécanismes: soit ils induisent le clivage de l'ARNm cible, ce qui entraîne sa dégradation, soit ils inhibent sa traduction. C'est le degré d'homologie entre la séquence du miARN et celle de l'ARN cible qui semble déterminer le mécanisme d'action.

Dans le monde animal, la plupart des miARN interagissent avec leurs cibles en s'appariant avec des séquences partiellement complémentaires situées dans la région 3' non traduite (3' UTR, cf. figure 5) et cet appariement imparfait induit une inhibition de la synthèse protéique. Jusqu'à récemment, le mécanisme modèle conduisant à l'inhibition de la traduction reposait sur une inhibition de l'initiation de la traduction impliquant la reconnaissance de la coiffe et sur la stabilité inchangée du messenger cible (Olsen and Ambros 1999; Seggerson, Tang et al. 2002; Ambros 2004; Bartel 2004; Humphreys, Westman et al. 2005; Pillai, Bhattacharyya et al. 2005). Cependant, il semblerait que les messagers cibles puissent aussi être dégradés et en conséquence les miARN pourraient avoir deux modes d'action affectant soit la stabilité du messenger cible, soit la synthèse protéique. Les paramètres déterminant le mode d'action du miARN sont encore inconnus (Bagga, Bracht et al. 2005; Lim, Lau et al. 2005).

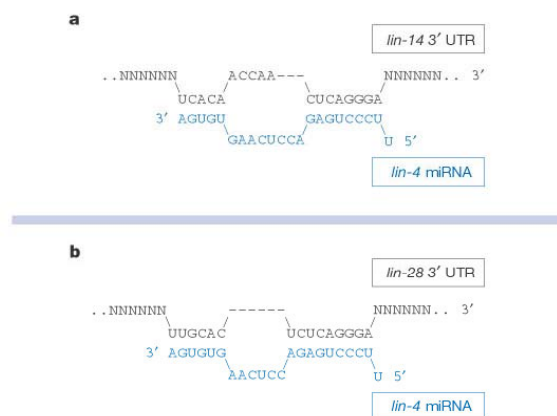


Figure 5: exemples de l'appariement imparfait entre des miARN et leur ARNm cible chez les animaux. Chez *C. elegans*, le miARN *lin-4* (en bleu) s'apparie avec les séquences complémentaires des régions 3' non traduites des ARNm *lin-14* et *lin-28* (en noir) ce qui induit l'arrêt de leur traduction. (Ambros 2004)

Cependant lorsque des miARN sont parfaitement complémentaires avec l'ARN cible, ils peuvent aussi le cliver. Ainsi chez la souris, le miARN miR-196 est complémentaire d'une séquence située dans le 3' UTR du gène *hoxb8*, qui code pour un facteur de transcription impliqué dans le développement, et il réprime son expression en induisant sa dégradation (Yekta, Shih et al. 2004). Un autre exemple de complémentarité parfaite entre miARN et ARNm a été décrit dans le cadre de gènes soumis à l'empreinte parentale où des miARN issus de transcrits dérivés des allèles maternels induisent la dégradation de transcrits homologues exprimés à partir des allèles paternels (Seitz, Youngson et al. 2003; Davis, Caiment et al. 2005).

Chez les plantes, les miARN peuvent aussi induire les deux voies mais la majorité des miARN s'apparie de manière quasi-parfaite à leurs cibles et les miARN sont donc principalement associés à la voie de dégradation des messagers cibles (Llave, Xie et al. 2002; Rhoades, Reinhart et al. 2002; Aukerman and Sakai 2003; Tang, Reinhart et al. 2003; Chen 2004).

Néanmoins, plusieurs études indiquent que cette classification sur la base de la complémentarité des séquences cibles ne rend pas pleinement compte de leurs activités biologiques. Récemment un lien fonctionnel a été mis en évidence entre un miARN et la dégradation d'ARNm contenant des éléments déstabilisateurs ARE (AU rich elements), chez *D. melanogaster* et chez l'homme, suggérant que les miARN pourraient aussi participer à la dégradation des ARNm instables (Calin, Dumitru et al. 2002; Jing, Huang et al. 2005). Enfin chez *A. thaliana*, il existe un exemple où un miARN est impliqué dans l'extinction transcriptionnelle de deux gènes (PHABULOSA et PHAVOLUTA) par un mécanisme impliquant la méthylation de l'ADN (Bao, Lye et al. 2004).

→ L'organisation des miARN et de leurs séquences cibles permettent une régulation fine de l'expression des gènes

Chez les animaux, les gènes codant pour les miARN sont souvent regroupés au sein du génome (Lau, Lim et al. 2001; Houbaviy, Murray et al. 2003) ce qui implique qu'ils sont probablement transcrits sous la forme d'un précurseur « polycistronique ». Ces regroupements peuvent contenir des miARN de séquences similaires, ce qui permet d'envisager qu'ils régulent un ensemble de gènes de manière additive, mais les miARN peuvent aussi être de séquences distinctes et il est probable que ces miARN régulent de

multiples gènes de façon coordonnée (Ambros 2004; Bartel and Chen 2004). Par exemple, chez la souris, un tel regroupement code pour six gènes étroitement liés: miR-290 à miR-295 qui sont uniquement exprimés dans les cellules embryonnaires souches (Houbaviy, Murray et al. 2003).

De plus, les miARN peuvent se fixer sur différents ARNm cible et différents miARN peuvent agir en coopération pour réguler un seul ARNm cible (Kim 2005). Ces combinaisons entre miARN et ARNm cibles permettent la constitution de réseaux de régulation de l'expression des gènes. Il est probable que le niveau final de répression est la résultante des différents miARN fixés sur un ARNm, ce qui permet une mesure particulièrement sensible de l'état cellulaire tel qu'il est représenté à travers son « miARNome ».

(iv) Fonctions des miARN

L'analyse des fonctions des miARN s'appuie principalement sur quatre méthodes:

- Le clonage de cDNA à partir de petits ARN et leur séquençage. Cette approche est efficace pour les miARN abondants mais est bruitée par la présence dans la cellule de produits de dégradation des ARN cellulaires dont on peut penser que du fait de leur nature simple brin, ils ne rentrent pas dans les voies de régulation par les petits ARN.
- L'analyse bioinformatique qui permet d'une part de prédire des gènes codant pour des miARN et d'autre part de rechercher les cibles potentielles des miARN qui possèdent des séquences homologues aux miARN. Cette approche est plus difficile chez les animaux car la complémentarité entre le miARN et le messenger est partielle et de ce fait, les cibles potentielles sont parfois trop nombreuses pour être testées. Divers algorithmes de prédiction des cibles ont été créés qui se basent sur différents modèles d'appariements entre le miARN et la cible à partir des exemples validés expérimentalement (Enright, John et al. 2003; Lewis, Shih et al. 2003; Stark, Brennecke et al. 2003; Kiriakidou, Nelson et al. 2004; Rajewsky and Socci 2004), revus dans (Ambros 2004). Toutes ces approches privilégient l'hybridation dans la région 5' de l'ARN guide.
- Les analyses génétiques directes qui identifient une mutation associée à un phénotype, la caractérisation des premiers miARN (*lin-4* et *let-7*) a été obtenue par cette approche.

- Les analyses génétiques inverses dans lesquelles un gène est surexprimé et/ou sous-exprimé afin d'identifier son rôle.

Les approches bioinformatiques et le clonage extensif de cDNA ont permis d'identifier un grand nombre de miARN. Chez les plantes, un grand nombre de cibles des miARN sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation du développement ou de la différenciation cellulaire. Cependant chez les animaux, on ne connaît la fonction que de quelques miARN (cf. tableau 1) seulement en raison de l'abondance des cibles prédites.

C'est chez le ver *C. elegans* que l'analyse de mutants montrant des défauts dans la synchronisation du développement larvaire a permis de cloner les premiers exemples de miARN: les miARN lin-4 et let-7, ainsi que leurs ARNm cibles (Lee, Feinbaum et al. 1993; Wightman, Ha et al. 1993; Moss, Lee et al. 1997; Reinhart, Slack et al. 2000; Slack, Basson et al. 2000). Récemment deux autres miARN ont été impliqués dans le contrôle du développement de *C. elegans*. Le miARN lsy-6 régule la synthèse du facteur de transcription COG-1 et le miARN mir-273 inhibe la synthèse du facteur de transcription DIE-1, ces deux protéines sont impliquées dans le contrôle de la spécification de l'asymétrie entre deux neurones chemosensibles (ASEL et ASER) (Chang, Johnston et al. 2003; Grad, Aach et al. 2003; Johnston and Hobert 2003; Chang, Johnston et al. 2004). Donc les voies qui contrôlent le développement semblent être régulées à de nombreuses étapes par des miARN.

Chez *D. melanogaster*, l'étude de mutants présentant des dérégulations des voies de mort cellulaire programmée et/ou de la prolifération cellulaire pendant le développement a conduit à l'identification du locus bantam qui code pour un miARN et du gène mir-14, qui est aussi impliqué dans la régulation du stockage des graisses. La synthèse de la protéine Hid est régulée par bantam (Hipfner, Weigmann et al. 2002; Brennecke, Hipfner et al. 2003; Xu, Vernooy et al. 2003).

Chez la souris, le miARN miR-181 qui est exprimé dans les cellules B de la moelle osseuse et dans le thymus, a été impliqué dans le développement hématopoïétique car sa surexpression dans des progéniteurs hématopoïétiques issus de moelle osseuse induit une augmentation de la production en cellules B et une diminution des cellules T CD8⁺ (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2003; Chen, Li et al. 2004).

Les fonctions de ces miARN ainsi que les effets importants sur le développement causés par des défauts dans la voie des miARN (Ambros 2004; Sontheimer and Carthew 2005) indiquent qu'ils ont des fonctions importantes dans le contrôle du développement animal, de la différenciation cellulaire et de la physiologie.

Tableau 1: fonctions, connues et putatives, des miARN chez les animaux (Wienholds and Plasterk 2005).

miRNA	Target(s)	Function(s)
<i>Ceanorhabditis elegans</i>		
<i>lin-4</i>	<i>lin-14, lin-28</i>	Early developmental timing
<i>let-7</i>	<i>lin-41, hbl-1, daf-12 pha-4, ras</i>	Late developmental timing
<i>lsey-6</i>	<i>cog-1</i>	Left/right neuronal asymmetry
<i>miR-273</i>	<i>die-1</i>	Left/right neuronal asymmetry
<i>Drosophila melanogaster</i>		
<i>bantam</i>	<i>hid</i>	Programmed cell death
<i>miR-14</i>	<i>Drice?</i>	Programmed cell death and fat metabolism
<i>miR-7</i>	Notch targets?	Notch signaling
<i>Danio rerio</i>		
<i>miR-430</i>	?	Brain morphogenesis
<i>Mus musculus</i>		
<i>miR-196</i>	<i>Hoxb8</i>	Developmental patterning
<i>miR-181</i>	?	Hematopoietic lineage differentiation
<i>miR-1</i>	<i>Hand2</i>	Cardiomyocyte differentiation and proliferation
<i>miR-375</i>	<i>Mtpn</i>	Insulin secretion
<i>Human and other vertebrate cell lines</i>		
<i>miR-16</i>	Several	AU-rich element-mediated mRNA instability
<i>miR-32</i>	Retrovirus <i>PFV-1</i>	Antiviral defense
<i>miR-143</i>	<i>Erk5?</i>	Adipocyte differentiation
<i>SVmiRNAs</i>	<i>SV40</i> viral mRNAs	Susceptibility to cytotoxic T cells
<i>Cancer in humans</i>		
<i>miR-15-miR-16</i>	?	Downregulated in B-cell chronic lymphocyte
<i>miR-143, miR-145</i>	?	Downregulated in colonic adenocarcinoma
<i>miR-155/BIC</i>	?	Upregulated in diffuse large B-cell lymphoma
<i>let-7</i>	<i>Ras?</i>	Downregulated in lung cell carcinoma
<i>miR-17-92</i>	?	Upregulated in B-cell lymphoma

b. Les siARN

La classe des siARN regroupe tous les petits ARN double-brin qui proviennent de précurseurs constitués de deux brins indépendants appariés. Ils peuvent être issus de la transcription bidirectionnelle d'une même séquence d'ADN ou alors de la synthèse d'une molécule d'ARN à partir d'un ARN matrice par une RdRP (cf. figure 3).

Contrairement aux miARN qui jusqu'à présent apparaissent comme ubiquitaires et nombreux chez les eucaryotes (à l'exception de *S. cerevisiae* et *S. pombe*), les siARN

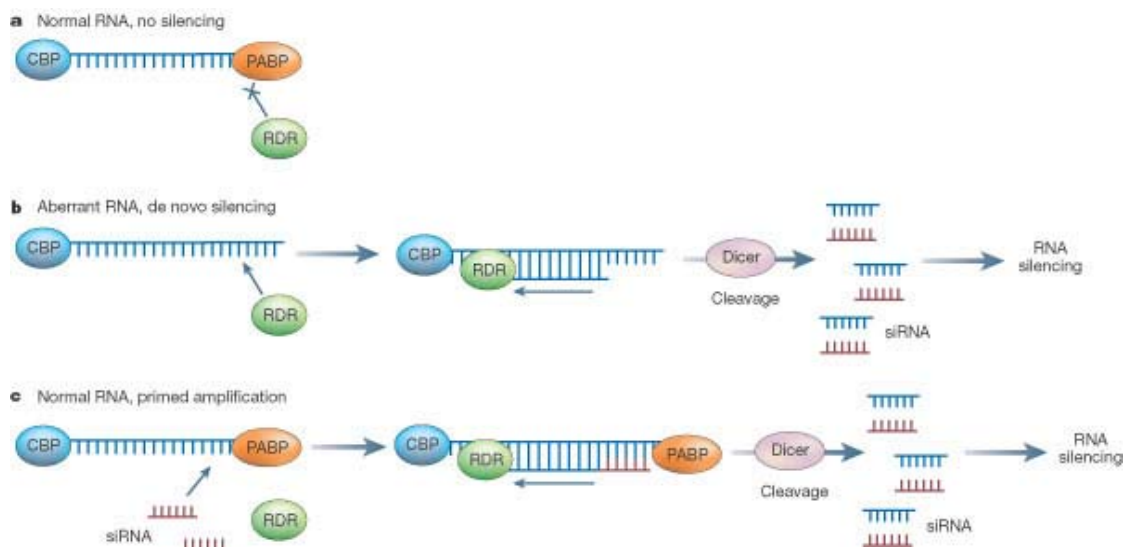


Figure 6: mécanismes d'action présumés des protéines RdRP dans l'initiation et l'amplification de l'ARNi chez les plantes et *C. elegans*. (a) Les ARNm ne sont pas des cibles usuelles pour les RdRP. (b) Si un ARN ne présente pas une structure normale, par exemple, si la queue poly(A) est absente, les RdRP peuvent initier la synthèse d'un brin d'ARN complémentaire et le duplex qui en résulte peut alimenter la voie de l'ARNi car il peut être clivé en siARN par Dicer. (c) Les siARN peuvent servir d'amorce aux RdRP qui synthétisent le brin d'ARN complémentaire à la cible et le duplex est ensuite clivé par Dicer en siARN, dans ce cas, il y a une amplification du signal qui induit l'interférence, car un siARN permet la production de plusieurs siARN secondaires. (Baulcombe 2004)

endogènes ont été plus difficilement identifiables et tous les organismes ne possèdent pas tous les types de siARN.

Les siARN sont séparés en trois sous-classes qui sont définies en fonction de leur mécanisme d'action et de l'origine de leur précurseurs (Kim 2005; Sontheimer and Carthew 2005) : les tasiARN (endogenous trans-acting siARN, siARN endogènes qui agissent en trans), les rasiRNA (repeat-associated siARN, siARN associés à des répétitions) et les scnRNA (small scan ARN, petits ARN scanner).

(i) Les polymérases à ARN dépendantes de l'ARN (RdRP) sont impliquées dans la biogenèse de certains siARN

Les RdRP sont des polymérases qui synthétisent de l'ARN double-brin à partir d'une matrice d'ARN simple-brin. L'étude de mutants des voies de l'ARNi a mis en évidence l'importance des RdRP chez certains organismes. Les gènes *qde-1* chez *N. crassa*, *ego-1* chez *C. elegans*, *sde1/sgs2* chez *A. thaliana* codent pour des RdRP et sont nécessaires pour la dégradation par l'ARNi déclenchée par un transgène (Cogoni and Macino 1999; Dalmay, Hamilton et al. 2000; Mourrain, Beclin et al. 2000; Smardon, Spoerke et al. 2000). Les RdRP ont pour rôle d'initier ou d'amplifier le mécanisme d'extinction par l'ARN. Il y a quatre RdRP chez le nématode et six chez *A. thaliana* alors qu'aucune n'a pu être identifiée chez les mammifères (Kim 2005).

Chez *C. elegans*, la fonction des RdRP est d'amplifier le signal qui induit l'ARNi. L'ARN double-brin qui induit l'interférence est découpé, lors d'une première étape, en siARN primaires qui servent ensuite à la synthèse d'une population secondaire de siARN à partir du messenger cible, ce qui a pour conséquence d'améliorer l'extinction du messenger. Dans ce cas, il semblerait que les siARN primaires jouent le rôle d'amorces pour la RdRP car le signal est propagé dans l'orientation 5' vers 3' du brin guide de l'ARN double-brin initial (Sijen, Fleenor et al. 2001).

Chez les plantes, les RdRP semblent agir différemment comme le suggère une étude chez *N. benthamiana* et *A. thaliana* où un transgène ciblant une partie seulement du messenger codant pour la protéine GFP permet d'obtenir une dégradation de séquences qui ne sont plus seulement localisées dans la région contenue par le transgène mais aussi dans

les régions adjacentes en 5' et en 3' de la séquence originellement ciblée. Cette propagation dépend de la polymérase à RNA SDE1/SGS2 et comme elle s'effectue dans les deux orientations, cela indique que les siARN ne sont pas utilisés comme amorces, mais que la polymérase utilise directement l'ARNm ciblé comme matrice (cf. figure 6) (Vaistij, Jones et al. 2002).

Les analyses biochimiques de l'activité RdRP dans des extraits de germe de blé ou avec l'enzyme purifiée montrent que la synthèse d'ARN par les RdRP peut se faire avec ou sans amorce d'ARN simple-brin (Schiebel, Haas et al. 1993; Schiebel, Haas et al. 1993; Makeyev and Bamford 2002; Tang, Reinhart et al. 2003).

En revanche, plusieurs études montrent que la dégradation induite par des siARN chez *D. melanogaster* et chez les mammifères reste spécifique de la séquence initiale. Cette caractéristique est probablement due à l'absence d'homologue des RdRP chez ces organismes (Celotto and Graveley 2002; Chiu and Rana 2002; Schwarz, Hutvagner et al. 2002; Roignant, Carre et al. 2003).

(ii) Les siARN associés à des répétitions (rasiARN)

Les rasiARN sont des siARN qui sont codés par des éléments répétés dans le génome comme des transposons ou des rétro-éléments et ils représentent la plupart des siARN endogènes identifiés. Par exemple, chez le trypanosome (*T. brucei*), des petits ARN double-brins de séquences correspondantes aux rétrotransposons INGI et SLACS sont relativement abondants par rapport aux autres petits ARN séquencés dans une fraction enrichie en complexes protéiques de haut poids moléculaire, suggérant qu'ils sont impliqués dans la physiologie normale de la cellule (Djikeng, Shi et al. 2001). Bien que des rasiARN aient été mis en évidence chez *S. pombe*, *D. melanogaster*, *T. brucei* et les plantes, aucun n'a encore été identifié chez le nématode ou chez l'homme. La taille de ces petits ARN est de 23 à 27 nt ce qui est supérieur à la taille des miARN (20-23 nt).

→ Chez *S. pombe*, les rasiARN ont un rôle majeur dans l'extinction transcriptionnelle des régions hétérochromatiniennes

Chez *S. pombe*, les rasiARN sont impliqués dans le maintien de l'hétérochromatine péricentromérique. Le rôle de l'interférence par l'ARN dans la répression

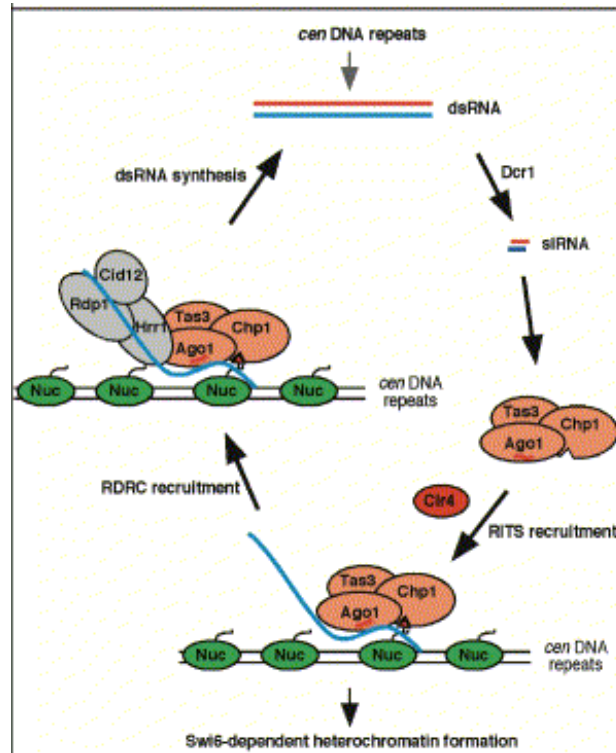


Figure 7: modèle du mécanisme d'action des complexes RITS et RDRC dans l'assemblage de l'hétérochromatine chez *S. pombe*. Les répétitions centromériques sont transcrites dans les deux orientations ce qui génère des ARN double-brins qui sont ensuite clivés par DICER en siARN. Le complexe RITS intègre un des brins de ces siARN et l'utilise comme séquence guide pour s'apparier aux transcrits naissants de séquence complémentaire et cette association entre RITS et les transcrits naissants induit la méthylation des H3K9 par Ctr4. Le complexe RITS reste stablement associé aux répétitions centromériques par la double interaction brin guide/transcrit naissant et Chp1/H3K9 méthylée et il peut alors recruter RDRC et sans doute Dicer, ce qui permet à la polymérase RDP1 de synthétiser des ARN double-brin à partir de transcrits aberrants qui échappent à la répression hétérochromatinienne. Ces duplex sont ensuite clivés par DICER en siARN secondaires, qui à leur tour sont intégrés dans de nouveaux complexes RITS. (Motamedi, Verdel et al. 2004)

hétérochromatinienne des régions péricentromériques a été montré par l'étude de mutants des gènes impliqués dans l'ARNi dont il n'existe qu'une seule copie chez *S. pombe* (*dicer*, *argonaute* et *RdRP*). Dans ces mutants, l'accumulation de transcrits issus des répétitions centromériques est accompagnée d'une diminution des marques de l'hétérochromatine comme les histones H3 méthylées sur les lysines situées en position 9 (H3K9) et les protéines à chromodomaine SWI6 (homologue de la protéine HP1 humaine) et CHP1 qui lient les H3K9 méthylées (Volpe, Kidner et al. 2002). Ces souches ont permis de montrer que l'ARNi participait à l'induction et au maintien de l'hétérochromatine péricentromérique et du loci sexuel. Cependant au niveau du loci sexuel, l'ARNi ne participe au maintien de la répression seulement si le facteur de transcription ATF1 est délété (Hall, Shankaranarayana et al. 2002; Volpe, Schramke et al. 2003; Jia, Noma et al. 2004; Hansen, Burns et al. 2005).

D'autre part, le clonage a permis l'identification de petits ARN issus de régions répétées qui sont structurées en hétérochromatine comme les séquences centromériques et subtélomériques, celles codant pour les ARNr et celles du loci sexuel (mating type) (Reinhart and Bartel 2002; Cam, Sugiyama et al. 2005). Ces rasiARN issus des centromères proviendraient en partie du clivage par DICER de duplex d'ARN issus de l'appariement des brins complémentaires synthétisés par la transcription bidirectionnelle des séquences répétées (Volpe, Kidner et al. 2002). Toutefois, chez *S. pombe*, un complexe ayant une activité RdRP a aussi été impliqué (voir plus bas).

Le mécanisme de répression des régions hétérochromatiniennes repose sur deux complexes protéiques: RITS (RNAi mediated initiation of transcriptional silencing) et RDRC (Rdr1 complex) dont les rôles respectifs commencent à être décryptés (cf. figure. 7)

Ce complexe est composé des protéines AGO1, CHP1 et TAS3 et il peut aussi comprendre des petits ARN générés par DICER ce qui le localise aux régions homologues (Volpe, Kidner et al. 2002; Noma, Sugiyama et al. 2004). De plus, RITS s'associe aux régions d'hétérochromatine seulement lorsque les H3K9 sont méthylées (Noma, Sugiyama et al. 2004; Cam, Sugiyama et al. 2005). En conséquence, le complexe RITS s'associe avec des siARN produits par DICER qui guident sa localisation aux

séquences homologues ce qui permettrait alors de diriger la méthylation des H3K9 par l'enzyme CLR4. Ensuite le maintien de l'interaction entre RITS et l'hétérochromatine repose principalement sur sa liaison avec les H3K9 méthylées (Noma, Sugiyama et al. 2004; Martienssen, Zaratiegui et al. 2005).

Le complexe RDRC est composé de la RdRP RDR1, de l'hélicase à ARN HRR1 et de CID12 dont on suppose qu'elle a un rôle dans la polyadénylation des ARNm (Motamedi, Verdel et al. 2004) et comme RITS, il est localisé dans les régions hétérochromatinienne riches en H3K9 méthylées. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que RDRC et RITS pouvaient interagir seulement si DCR1 et CLR4 sont fonctionnels et que l'association de RITS avec des siARN requiert la présence de RDRC, ce qui suggère un modèle où RITS joue le rôle d'un complexe "amorce" qui recruterait RDRC. Ainsi, lorsque RITS lie les histones modifiées, il mobilise RDRC et sans doute DICER, ce qui permet à la polymérase RDP1 de synthétiser des ARN double-brin à partir de transcrits aberrants qui échappent à la répression hétérochromatinienne. Ces duplex sont ensuite clivés par DICER en siARN secondaires, qui à leur tour sont intégrés dans de nouveaux complexes RITS. Le maintien de l'hétérochromatine est donc assuré par RITS et RDRC qui auto-entretiennent leur interaction avec l'hétérochromatine via la production de siARN secondaires (Motamedi, Verdel et al. 2004; Sugiyama, Cam et al. 2005).

Chez *S. pombe*, les rasiARN participent donc à la répression des séquences centromériques et du loci sexuel par la structure hétérochromatinienne. Le clonage extensif des siARN associés à RITS a aussi identifié des siARN dérivés des séquences répétitives d'ADN codant pour les ARNr qui pourraient être impliqués dans le maintien de l'intégrité des loci codant pour les ARNr (Cam, Sugiyama et al. 2005).

→ Chez les plantes, les rasiARN participent à la méthylation de l'ADN et à l'hétérochromatine

Chez les plantes, les rasiARN sont la classe majoritaire des siARN (Llave, Kasschau et al. 2002; Xie, Johansen et al. 2004). Les facteurs impliqués dans leur biogenèse ont été identifiés grâce à l'étude de deux rasiARN : le siARN 1003 qui est issu des séquences répétées codant pour l'ARNr 5S et le siARN AtSN1 qui dérive des rétroéléments SINE. L'accumulation de ces deux rasiARN est dépendante des gènes *dcl3*,

rdr2, *hen1* et *ago4* mais elle est indépendante de *dcl1*, *dcl2* et *rdr1* (Zilberman, Cao et al. 2003; Xie, Johansen et al. 2004). Il avait été aussi montré que leur synthèse était dépendante du gène *sde4* qui a été récemment identifié comme un gène codant pour une sous-unité (NRPD1a) d'une nouvelle polymérase à ARN: l'ARN pol IV (Herr, Jensen et al. 2005; Onodera, Haag et al. 2005; Pontier, Yahubyan et al. 2005).

La présence des rasiARN 1003 et AtSN1 corrèle avec l'hyperméthylation des séquences d'ADN correspondantes et avec la méthylation des H3K9 ce qui suggère que leur fonction est de réprimer la transcription en modifiant la structure de la chromatine (Zilberman, Cao et al. 2003; Xie, Johansen et al. 2004). Cependant, les mécanismes dépendant de l'ARN qui conduisent à la méthylation de l'ADN sont encore énigmatiques et une des problématiques est de discerner quels sont les facteurs nécessaires à l'initiation de la méthylation de ceux impliqués dans son maintien. En raison de leur nature endogène, l'étude des rasiARN ne permet pas de différencier les deux phénomènes et c'est l'étude de l'extinction transcriptionnelle médiée par des siARN issus de transgènes ou/et affectant le transgène lui-même qui a donné des indices sur la voie des rasiARN. Ces études ont montré que la méthylation de l'ADN dépendante de l'ARN implique les protéines AGO4 et les *de novo* méthyl-transférases DRM1 et DRM2 (Zilberman, Cao et al. 2003; Chan, Zilberman et al. 2004; Zilberman, Cao et al. 2004), mais elles n'ont pas encore permis de résoudre l'énigme de l'initiation du processus.

Les récents résultats sur l'implication d'une polymérase à ARN spécifique, la RNA pol IV, indiqueraient que la production de rasiARN par la RNA pol IV dépendrait de la méthylation de l'ADN par AGO4 qui elle-même dépendrait des rasiARN produits par Pol IV, ce qui suggère l'existence d'une boucle d'auto-entretien assurant le maintien de l'extinction transcriptionnelle, comme chez la levure (Herr, Jensen et al. 2005; Onodera, Haag et al. 2005; Pontier, Yahubyan et al. 2005).

→ Chez la drosophile, les rasiARN sont associés aux voies du TGS et du PTGS

Chez *D. melanogaster*, une étude du profil d'expression des petits ARN lors du développement (Aravin, Lagos-Quintana et al. 2003) a mis en évidence que les séquences de rasiARN clonés correspondent à toutes les formes d'éléments répétés connus : rétrotransposons, transposons à ADN, séquences d'ADN satellite et micro-satellite, le

locus Su(Ste) et d'autres motifs encore non caractérisés. D'un point de vue quantitatif, les populations de rasiARN et de miARN sont équivalentes dans l'embryon précoce et la proportion en rasiARN diminue pendant le développement pour représenter 10% des petits ARN régulateurs chez l'adulte, ce qui indique que le rôle des rasiARN est prépondérant surtout pendant le début du développement embryonnaire.

Comme chez *S. pombe* et chez les plantes, l'identification de rasiARN correspondant à des séquences répétées présentes dans les régions d'hétérochromatine ainsi que des études de mutants suggèrent un rôle pour l'ARNi dans l'extinction transcriptionnelle induite par la modification de l'état de la chromatine. Ainsi la mutation du gène *Spindle-E* (ou *homeless*) codant pour une hélicase à ARN et impliqué dans l'ARNi induit une augmentation de l'expression des rétrotransposons mdg1, 1731, F-element et de la séquence répétée mst40 (Aravin, Naumova et al. 2001; Kennerdell, Yamaguchi et al. 2002). En revanche, la mutation du gène *aubergine* qui code pour une protéine de la famille argonaute n'affecte pas l'accumulation de ces ARN. De plus, l'étude de transgènes spécifiquement insérés dans des régions d'hétérochromatine a mis en évidence que les gènes *piwi*, codant pour une protéine de la famille argonaute, *Spindle-E* et *aubergine* sont nécessaires pour une répression transcriptionnelle hétérochromatinienne, car leur mutation réduit le nombre de H3K9 méthylées et délocalise les protéines HP1 et HP2 des régions d'hétérochromatine (Pal-Bhadra, Leibovitch et al. 2004). Donc l'ensemble de ces résultats permet de penser que chez *D. melanogaster*, certains composants de la voie de l'ARNi participent à la formation de l'hétérochromatine et ce phénomène pourrait impliquer les rasiARN.

Il existe chez *D. melanogaster* un type de rasiARN qui est nécessaire au bon déroulement de la spermatogenèse. Les loci Stellate (Ste) et Suppressor of Stellate Su(Ste) sont des éléments répétés qui sont localisés sur les chromosomes X et Y respectivement et les répétitions Su(Ste) contiennent une région qui a environ 90% d'homologie avec les gènes Stellate. La délétion de la majorité des répétitions Su(Ste), induit une hyperexpression des gènes Ste ce qui cause des anomalies méiotiques, une accumulation d'agrégats cristallins dans les spermatocytes primaires (constitués de la protéine codée par Ste) et la stérilité des mouches mâles. La découverte de l'ARNi a permis d'expliquer comment les séquences répétées de Su(Ste) induisent l'extinction des

gènes paralogues *Ste* (Aravin, Naumova et al. 2001; Aravin, Klenov et al. 2004). Les gènes *Su(Ste)* sont transcrits dans les deux orientations dans les spermatocytes précoces et les transcrits antisens et sens sont colocalisés dans le noyau. Des petits ARN de 25-27 nucléotides, dont la biogenèse reste à définir, s'accumulent *in vivo* de manière dépendante des gènes *aubergine* et *Spindle-E*. Dans ce cas des rasiARN issus du locus *Su(Ste)*, l'hyperexpression du locus *Ste* serait inhibée par un mécanisme post-transcriptionnel et l'expression du gène *Su(Ste)* serait de plus autorégulée.

Dans des cellules souches embryonnaires de souris dont les deux allèles du gène *dicer* ont été inactivés, des transcrits correspondant aux séquences répétées qui constituent les centromères (répétitions satellites majeures et mineures) s'accumulent. Une fraction significative de ces transcrits est sous la forme de double-brin (Kanellopoulou, Muljo et al. 2005) et des rasiARN de même séquence ont été identifiés dans les cellules contrôle. D'autre part, l'ADN de ces cellules est moins méthylé et le nombre de H3K9 di et tri méthylées est fortement diminué. Donc ces résultats montrent que DICER et des rasiARN sont potentiellement impliqués dans le maintien de la structure hétérochromatinienne chez la souris.

Dans les autres espèces, certains éléments de la machinerie ARNi semblent aussi être nécessaires pour la formation et/ou le maintien de l'hétérochromatine mais la présence de rasiARN n'a pas été formellement démontrée. Chez les vers, dont les mécanismes de l'ARNi ont été inactivés, il n'y a pas de répression transcriptionnelle des transposons dans les tissus reproducteurs (Ketting, Haverkamp et al. 1999; Tabara, Sarkissian et al. 1999; Vastenhouw and Plasterk 2004).

Dans les cellules humaines, des siARN qui ciblent des régions promotrices, introduits expérimentalement pourraient également induire la méthylation de l'ADN et ainsi provoquer une extinction transcriptionnelle (Kawasaki and Taira 2004; Morris, Chan et al. 2004). Cependant ce mode d'action des siARN dans les cellules humaines est controversé car cette extinction transcriptionnelle n'est pas systématiquement observée (Park, Chen et al. 2004; Svoboda, Stein et al. 2004). Donc les cellules humaines possèdent la machinerie nécessaire pour modifier la structure de l'ADN et il est donc possible que des rasiARN guident la formation et/ou le maintien de l'hétérochromatine.

(iii) Les siARN endogènes qui agissent en trans (tasiARN)

Chez *A. thaliana*, une autre classe de siARN endogènes a émergé suite à la découverte de siARN induisant le clivage d'ARNm issus de gènes qui n'ont pas de forte homologie avec les gènes dont sont issus les siARN : ces siARN agissent donc en trans.

La taille des tasiARN est de 21 nucléotides et leur biogenèse est dépendante de gènes qui appartiennent à des voies distinctes (Peragine, Yoshikawa et al. 2004; Vazquez, Vaucheret et al. 2004; Xie, Johansen et al. 2004) :

- *ago1*, *dcl1*, *hen1*, *hyl1*, qui participent à la voie des miARN,
- *rdr6/sgs2*, *sgs3*, qui sont nécessaires pour l'extinction post-transcriptionnelle induite par des transgènes en orientation sens ou par des virus à ADN (Dalmay, Hamilton et al. 2000; Mourrain, Beclin et al. 2000).

Elle est indépendante des facteurs AGO7, DCL2, SDE3 et DCL3 et RDR2 qui interviennent dans la genèse des rasiARN. Il est probable que les produits des gènes *rdr6* et *sgs3* permettent la synthèse d'ADN double-brin à partir du transcrit sens et que ce long ARN double-brin soit ensuite découpé par DCL1, mais les conditions exactes de production des tasiARN restent encore à définir.

Actuellement, le mode de fonctionnement des tasiARN est décrit seulement chez *A. thaliana*. Dans un premier cas, douze petits ARN sont homologues aux brins sens ou antisens de l'intron de l'ARN non codant At2g27400 et neuf d'entre eux correspondent parfaitement à des incréments de 21 nucléotides (Vazquez, Vaucheret et al. 2004). Cinq ARNm, choisis en raison de leur forte complémentarité avec 4 des petits ARN issus de At2g27400, sont effectivement clivés dans des plantes de souche sauvage et s'accumulent dans des mutants des gènes RDR6/SGS2 et SGS3. Donc les tasiARN peuvent induire une dégradation post-transcriptionnelle. Ces analyses n'excluent pas la possibilité que ces siARN puissent agir en inhibant la transcription ou la traduction. Dans un deuxième cas, un criblage de mutants de *rdr6/sgs2* et *sgs3* a identifié un ARNm (At5g18040) qui serait clivé par les siARN endogènes sRNA255-like et suggère que les tasiARN sont impliqués dans le contrôle temporel de la transition entre l'état juvénile et la phase végétative adulte (Peragine, Yoshikawa et al. 2004).

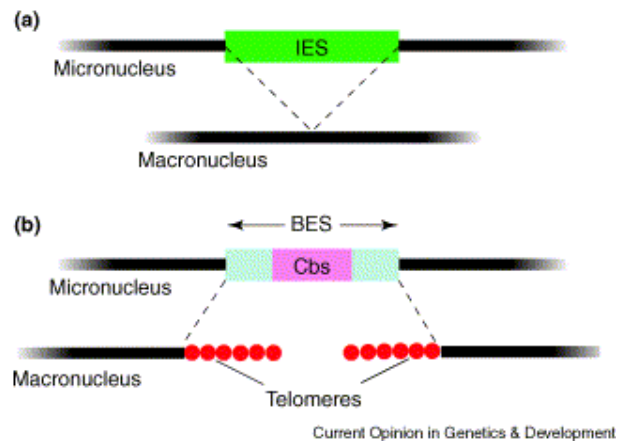


Figure 8: réarrangements du génome chez *Tetrahymena*. Dans le macronoyau pendant la conjugaison, (a) les séquences IES sont éliminées et il y a ligation des fragments qui en résultent (b) les séquences BES sont éliminées, ce qui génère des coupures de chromosome et des télomères sont ajoutés. (Mochizuki and Gorovsky 2004)

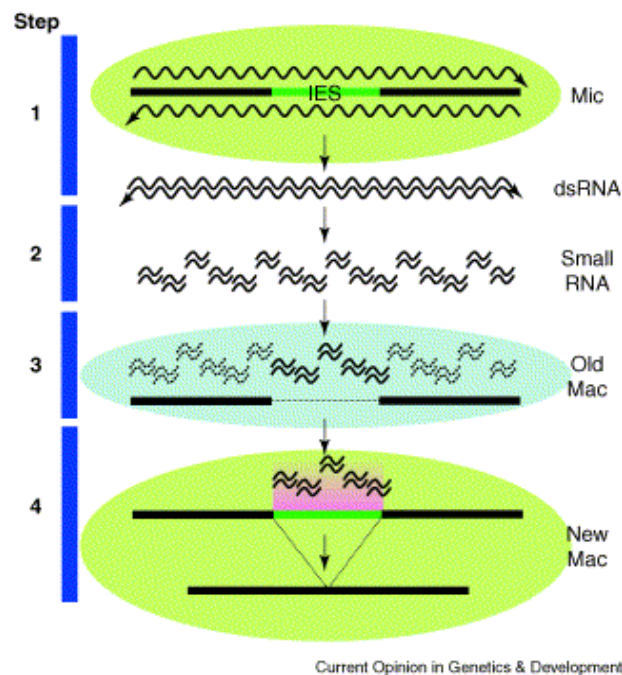


Figure 9: rôle des scnARN dans l'élimination des IES chez *Tetrahymena* pendant la reformation du nouveau macronoyau. étape 1: le génome de micronoyau est transcrit dans les deux orientations et les transcrits forment des ARN double-brin. étape 2: les ARN double-brin sont clivés en scnARN. étape 3: les scnARN sont relocalisés dans le vieux macronoyau et les scnARN qui ont des séquences homologues à l'ADN du vieux macro-noyau sont dégradées. La ligne en pointillée symbolise la position des IES qui ont été éliminées pendant la conjugaison précédente. étape 4: les scnARN restants sont transférés dans le nouveau macronoyau et ils ciblent les IES pour induire leur dégradation. (Mochizuki and Gorovsky 2004)

Chez *C. elegans*, le séquençage de petits cDNA a identifié des petits ARN qui pourraient faire partie des tasiARN mais dont les fonctions et les gènes cibles sont encore inconnus (Ambros, Lee et al. 2003).

(iv) Les petits ARN scanner (scnARN)

Chez *Tetrahymena thermophila*, un protozoaire cilié, deux noyaux sont présents: un macronoyau polyploïde qui est le centre de la transcription pendant la phase somatique et le micronoyau diploïde qui sert lors de la reproduction. Pendant la conjugaison, deux noyaux méiotiques haploïdes dérivés des micronoyaux fusionnent et forme le noyau zygotique qui donne naissance aux macro- et micronoyau. Lors de la formation du nouveau macronoyau, l'ancien macronoyau est détruit.

Lors de la conjugaison, le génome subit d'importants réarrangements (cf. figure 8):

- d'une part, environ 6000 fragments d'ADN sont éliminés, ce sont les segments internes éliminés (IES) de 0,5 à 20 kilobases ce qui représente une délétion d'environ 15% du génome,
- d'autre part, des cassures de chromosomes sont suivies de la délétion de fragments de moins de 50 paires de bases, les BES (breakage eliminated sequences), et de l'addition des télomères.

Le réarrangement des IES implique une reconnaissance des séquences à éliminer qui fait intervenir des siARN et des composants de la machinerie de l'ARNi (Mochizuki and Gorovsky 2004). Lors de la conjugaison, le génome du micronoyau est transcrit dans les deux directions ce qui génère des ARN double-brin (cf. figure 9) (Chalker and Yao 2001; Meyer and Garnier 2002; Mochizuki, Fine et al. 2002). Ceux ci sont transformés en scnARN d'environ 28nt par DCL1, une des trois protéines dicer-like, et sont relocalisés dans le vieux macronoyau pour scanner le génome macronucléaire. Chaque petit ARN qui est homologue à une séquence d'ARN est dégradé et les petits ARN qui sont complémentaires d'une séquence IES et donc ne peuvent s'apparier sont transférés dans le nouveau macronoyau.

Dans le nouveau macronoyau en développement, les scnARN guident la méthylation des H3K9 des séquences IES (Taverna, Coyne et al. 2002; Liu, Mochizuki et al. 2004). Ces H3K9 méthylés recrutent des protéines contenant des chromodomaines

(PDD1P et PDD3P) qui sont nécessaires pour l'excision des IES. Ces mécanismes font intervenir la protéine TWI1P qui appartient à la famille des Argonaute et dont la délétion est létale. Elle permettrait de produire ou de stabiliser les scnARN.

Les siARN endogènes peuvent donc induire l'extinction post-transcriptionnelle comme transcriptionnelle des gènes et ont même un rôle dans un mécanisme d'élimination d'ADN. Ils diffèrent des miARN par leur biogenèse, mais leurs mécanismes d'action ne leur sont pas spécifiques car les uns comme les autres peuvent cliver des ARNm cibles de forte homologie ou inhiber la synthèse protéique lorsque l'homologie est faible. Ils interviennent dans des fonctions cellulaires variées: répression de la transcription des éléments répétés, réarrangement du génome, contrôle du développement et il est probable que l'on mettra en évidence des rôles importants pour la classe émergente des tasiARN dans d'autres organismes, comme cela fut récemment le cas pour les miARN.

2. Induction de l'interférence par l'ARN par des siARN exogènes

a. Extinction de gène induite par les virus

L'expression 'extinction de gène induite par les virus' ou VIGS (virus induced gene silencing) désigne un phénomène apparenté au PTGS qui a été observé chez les plantes. L'étude des mécanismes de défense des plantes contre les virus a mis en évidence qu'à la suite d'une infection virale localisée, la plante pouvait développer une résistance à une deuxième infection et que cette résistance n'était pas localisée au lieu de l'inoculation mais s'était étendue dans tout l'organisme (Ratcliff, Harrison et al. 1997). Ce mécanisme de défense est assimilable à de l'interférence ARN induite par les virus car il présente les caractéristiques du PTGS des plantes (Baulcombe 2004; Lecellier and Voinnet 2004):

- Des siARN dérivés du génome viral s'accumulent à la suite de l'infection (Hamilton and Baulcombe 1999) et leur genèse est dépendante des gènes des RdRP: *rdr1* et *rdr6/sde1/sgs2* chez *A. thaliana* (cf. figure 10). Les études des mutants correspondants ont montré que ces RdRP seraient spécifiques de certains types de virus (Mourrain, Beclin et al. 2000; Dalmay, Horsefield et al. 2001; Xie, Fan et al. 2001).

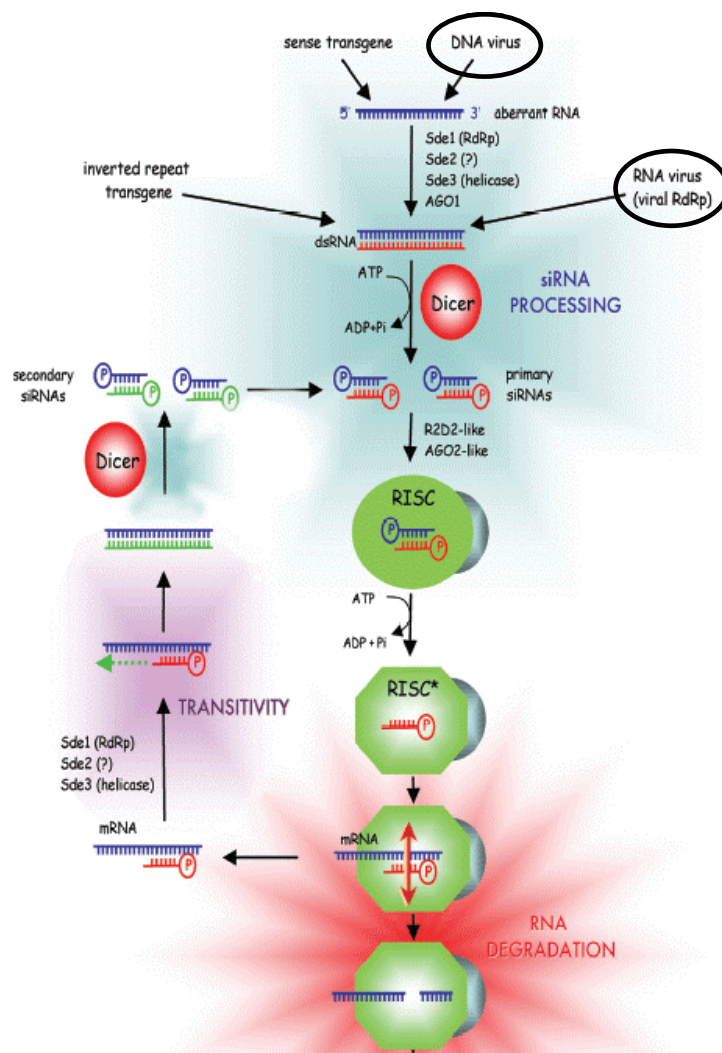


Figure 10: modèle moléculaire de l'extinction de gènes par ARNi chez les plantes. Dans le cas du VIGS: le génome viral est transcrit en ARN qui est reconnu comme aberrant par la cellule, celui-ci est transcrit par une RdRP associée à d'autres protéines comme une hélicase SDE3 et un ARN double-brin est alors formé. Cet ARN double-brin est clivé par Dicer en siARN qui d'une part sont utilisés par le complexe RISC pour induire le clivage endonucléolytique des ARN viraux et d'autre part peuvent servir d'amorce à une RdRP pour produire des siARN secondaires et amplifier le signal de dégradation. (Lecellier and Voinnet 2004)

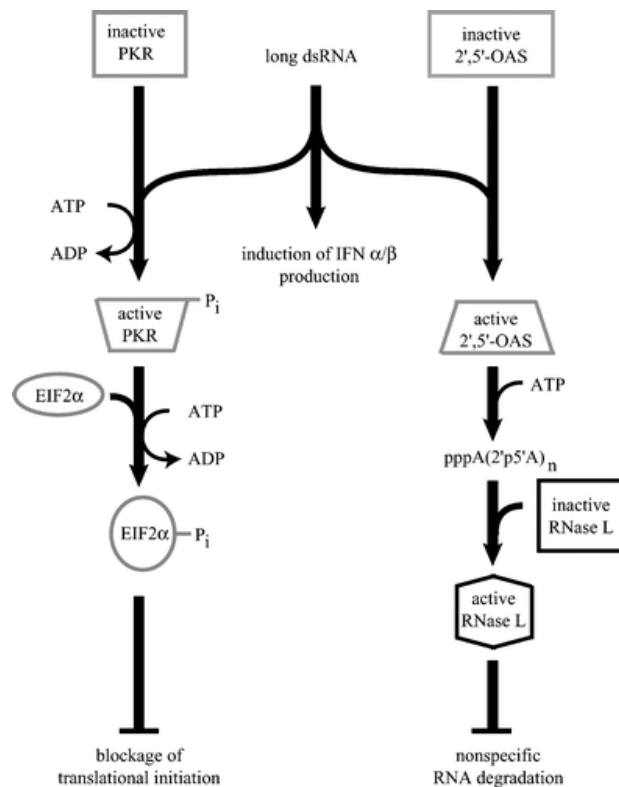


Figure 11: activation de la réponse interféron par les ARN double-brin de plus de 30 nucléotides chez les mammifères. L'enzyme PKR (proteine kinase R) est activée par sa liaison avec l'ARN double-brin, ce qui induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . Cette cascade conduit au blocage de la traduction. L'activation de la 2'-5' oligoA synthétase catalyse la polymérisation de l'ATP en une longue chaîne d'oligoadénylate qui active la RNase L, qui à son tour va dégrader l'ARN de la cellule. La cellule peut aussi activer la production et la sécrétion des molécules d'interféron α et β , qui induisent l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose. (Dykxhoorn and Lieberman 2005)

- Le phénomène d'extinction n'est pas restreint aux cellules où il a été initié mais il se propage dans tout l'organisme grâce à deux mécanismes. Une propagation sur de courtes distances (10 à 15 cellules) qui n'est pas affectée par la délétion de *rdr6/sde1/sgs2*, utiliserait des siARN de 21 nucléotides comme signal et emprunterait les jonctions plasmodermiques (Himber, Dunoyer et al. 2003; Lakatos, Szittya et al. 2004). La diffusion de l'extinction dans tout l'organisme se ferait via le phloème. Le type de molécules contenant la spécificité de la séquence à éteindre n'a pas été clairement identifié mais pourrait être des molécules d'ARN de grande taille.
- Par analogie avec l'activité de dégradation des petits ARN endogènes, il est probable que les siARN dérivés des virus soient incorporés dans des complexes RISC qui induisent le clivage du génome des virus à ARN. Cette voie de dégradation fait intervenir la protéine AGO1 (Fagard, Boutet et al. 2000; Vaucheret, Vazquez et al. 2004).

L'analyse de ces interactions entre les virus et les plantes ont aussi permis d'identifier des protéines codées par le génome viral qui sont des supresseurs du PTGS, comme par exemple la protéine P19 qui lie les duplex de siARN ce qui inhibe leur incorporation dans RISC (Baulcombe and Molnar 2004).

b. Extinction de l'expression des gènes par des ARN double-brin exogènes

La découverte de l'ARNi chez *C. elegans* puis dans les autres organismes a rapidement conduit à l'utilisation des ARN double-brin comme outil expérimental pour analyser la fonction d'un gène en éteignant son expression. Ainsi l'introduction de molécules d'ARN double-brin de grande taille (quelques centaines de nucléotides) ou de petite taille (entre 20 et 30 nucléotides) dans les divers organismes capables d'ARNi conduit à la dégradation séquence spécifique des ARNm (Elbashir, Harborth et al. 2001; Hannon 2003).

Les modalités d'utilisation de cette technique diffèrent entre les organismes. Ainsi pour des études chez *C. elegans*, l'ARN double-brin est produit par des bactéries qui servent à nourrir le ver. Chez les plantes, des vecteurs viraux permettent de détourner le mécanisme du VIGS pour éteindre l'expression du gène que l'on a ciblé (Hannon 2003). D'autre part l'extinction de l'expression des gènes par des ARN exogènes n'a pas le même

mode d'action dans tous les organismes, ainsi chez le nématode, l'extinction par ARNi se propage à tout l'organisme et peut aussi affecter la descendance alors que chez *D. melanogaster*, le phénomène reste localisé aux cellules où il a été induit et n'est pas transmis à la génération suivante.

Une de principale difficulté pour utiliser cette technique chez les mammifères est l'existence de la réponse interféron induite par les ARN double brin qui conduit à une répression générale de l'expression génétique par des mécanismes post-transcriptionnels (cf. figure 11). La voie de l'interféron est activée à la suite de la liaison de la protéine kinase R (PKR) avec des molécules d'ARN double brin de plus de 30 nucléotides de long et elle induit d'une part l'arrêt généralisé de la traduction et d'autre part la dégradation non spécifique de séquence de l'ARN grâce à l'activation de la synthétase 2',5'-oligoadénylate (Williams 1997; Stark, Kerr et al. 1998). Il n'est donc pas possible d'utiliser des longs duplex d'ARN pour induire l'interférence dans des cellules de mammifère du fait de cette induction de la réponse interféron. Cette difficulté fut contournée par l'utilisation de duplex de petites tailles dont l'utilisation est décrite dans la troisième partie.

partie II : Assemblage et mécanisme d'action du complexe effecteur de l'interférence par l'ARN : RISC

Les mécanismes des diverses voies de régulation déclenchées par un ARN double-brin sont en cours d'étude et actuellement les complexes effecteurs de ces processus sont plus ou moins bien caractérisés. Deux complexes ribonucléo-protéiques ont été identifiés: RITS (RNA induced initiation of transcriptional silencing) impliqué dans le TGS de la levure, et RISC (RNA induced silencing complex) impliqué dans la voie de dégradation post-transcriptionnelle, cependant c'est surtout le complexe RISC qui a été caractérisé jusqu'à présent.

Le complexe RISC est défini par sa fonction nucléasique spécifique de séquence, c'est à dire par sa capacité à induire le clivage d'un ARNm cible en fonction de la séquence du siARN intégré. Les études biochimiques chez *D. melanogaster* et dans les cellules de mammifères ont permis de comprendre son assemblage et d'identifier la nucléase responsable de la coupure de la cible (aussi appelée Slicer). Récemment la cristallisation de cette nucléase a conduit à l'élaboration de modèles expliquant le mécanisme d'action de RISC (Hammond, Bernstein et al. 2000; Zamore, Tuschl et al. 2000; Martinez, Patkaniowska et al. 2002; Tang, Reinhart et al. 2003; Yuan, Pei et al. 2005).

1. Composition des complexes RISC

La composition des complexes RISC a été étudiée par fractionnement biochimique d'extraits de cellules ou d'embryons de drosophile et de cellules humaines (Hela) couplé aux méthodes d'analyses par Western blot et spectrométrie de masse. Dans ces fractions, la présence du complexe assemblé est définie par la capacité à cliver un ARNm cible en fonction de la séquence du siARN intégré.

a. Le complexe RISC contient une protéine Argonaute.

Dans toutes les formes de RISC purifiées et quel que soit l'organisme d'origine, on trouve une protéine de la famille Argonaute. Les protéines Argonaute sont caractérisées par la présence de deux domaines: PAZ et PIWI, ce sont des protéines très basiques, d'un poids moléculaire d'environ 100 kDa. Le domaine PAZ est composé de 130 acides

aminés et est aussi présent dans les protéines de la famille Dicer, le domaine PIWI est situé en position C terminale et comporte 300 acides aminés (Cerutti, Mian et al. 2000). Tandis que le domaine PIWI est très conservé et est aussi retrouvé chez les procaryotes, le domaine PAZ n'a été identifié que chez les eucaryotes (Cerutti, Mian et al. 2000). La famille Argonaute est plus ou moins diversifiée selon les organismes. Chez *S. pombe*, il n'y a qu'un seul gène codant pour une protéine Argonaute, alors que chez *Arabidopsis* on trouve 10 représentants de cette famille (Carmell, Xuan et al. 2002).

Des protéines Argonaute sont impliquées dans tous les mécanismes de régulation associés aux ARN double-brin. Ainsi, chez *D. melanogaster*, parmi les cinq membres de la famille Argonaute, la protéine AGO1 semble se lier préférentiellement avec les miARN (Okamura, Ishizuka et al. 2004) tandis que AUBERGINE et PIWI sont nécessaires pour la répression hétérochromatinienne (Pal-Bhadra, Leibovitch et al. 2004). Cette diversité de la famille Argonaute pourrait donc être liée à une spécialisation de chacun de ses membres pour une voie de l'ARNi. Ainsi toujours chez *D. melanogaster*, AGO2 est indispensable au clivage dirigé par les siARN mais son inactivation n'altère par la fonction des miARN (Okamura, Ishizuka et al. 2004). Cependant cette spécialisation ne semble pas exister chez tous les organismes.

Ainsi, dans les cellules humaines, les quatre protéines Argonaute (AGO1-4) sont capables de lier les siARN mais seuls les complexes contenant AGO2 peuvent cliver leur cible (Liu, Carmell et al. 2004; Meister, Landthaler et al. 2004). En revanche AGO2 est aussi capable de réprimer la traduction lorsqu'il est artificiellement associé au 3'UTR d'un messenger rapporteur (Pillai, Artus et al. 2004), ce qui suggère un recouvrement avec les fonctions de AGO1,3,4. Chez *S. pombe* il n'existe qu'une protéine ARGONAUTE qui est nécessaire pour le TGS et pour le PTGS et il n'y a donc pas de spécificité de fonction d'AGO1 chez cet organisme. Au contraire, chez *C. elegans*, les données actuelles supportent l'hypothèse d'une spécificité des membres de la famille Argonaute car d'une part la protéine RDE1 est nécessaire pour l'extinction de gènes induite par l'ARN double-brin exogène et n'est pas indispensable à la fonction des miARN tandis que d'autre part la biogenèse et/ou la fonction des miARN dépend des protéines Argonaute ALG1 et ALG2 qui n'ont aucun rôle dans l'ARNi (Tabara, Sarkissian et al. 1999; Grishok, Pasquinelli et al. 2001; Tabara, Yigit et al. 2002; Hutvagner, Simard et al. 2004).

b. Selon les formes de RISC purifiées, le complexe contient d'autres protéines

Plusieurs études biochimiques ont permis de purifier des complexes capables de cliver un ARN cible de façon spécifique de séquence, cependant ces complexes présentaient une variété de taille allant de ~160kDa (Martinez, Patkaniowska et al. 2002) à ~550kDa (Hutvagner and Zamore 2002; Mourelatos, Dostie et al. 2002) et de composants (cf. tableau 2) qui, de fait, n'a pas facilité la compréhension du mécanisme d'action du complexe RISC. Cette variabilité peut être due à l'organisme d'origine (*D. melanogaster* ou *H. sapiens*) et à la technique de purification mais les complexes purifiés peuvent aussi être des intermédiaires de l'assemblage de RISC. Actuellement la composition précise du complexe RISC n'a pas encore été définie car il n'y a pas de consensus sur le stade final de l'assemblage de RISC (Sontheimer 2005).

(i) Purification chez *D. melanogaster*

Les premiers essais de fractionnement biochimiques ont été réalisés par l'équipe de G. Hannon à partir de cellules S2 qui avaient été transfectées avec des ARN double brin induisant l'ARNi et ils ont montré que l'activité nucléasique était purifiée avec les ribosomes et correspondait à un complexe ribonucléo-protéique de 500 kDa contenant la protéine AGO2 (Hammond, Bernstein et al. 2000; Hammond, Boettcher et al. 2001). Par ailleurs, il est possible de modéliser la réaction d'ARNi in vitro à partir de lysats d'embryons de drosophiles, en ajoutant soit des longs ARN double-brin qui seront clivés par Dicer en siARN soit directement des siARN synthétiques (Tuschl, Zamore et al. 1999; Zamore, Tuschl et al. 2000). L'activité nucléase de ces lysats programmés avec des siARN synthétiques a été retrouvée dans une fraction de 200 kDa environ et dans un complexe de plus grande taille qui sédimente avec les ribosomes à 80S (Nykanen, Haley et al. 2001; Pham, Pellino et al. 2004). Le complexe de 80S est appelé holo-RISC ou R3.

L'analyse des constituants de ces divers complexes a identifié les protéines suivantes: ARGONAUTE 2, DICER 1 et 2, dFMR1, R2D2, une protéine avec de multiples répétition du domaine nucléase du staphylocoque (Tudor staphylococcal nucléase, TSN), VIG et dmp68. Leur appartenance à chaque complexe est détaillée dans le tableau 3. Les rôles de ARGONAUTE 2, DICER 2 et R2D2 ont été bien caractérisés et

seront détaillés dans les paragraphes suivants mais la fonction précise des autres protéines reste à découvrir.

La protéine dFMR1 est l'homologue de la protéine FMRP humaine codée par le gène *frm* (fragile X mental retardation 1 gene) situé sur le chromosome X et dont la mutation est à l'origine du syndrome de l'X fragile qui se caractérise entre autre par un retard mental (Ishizuka, Siomi et al. 2002). Comme pour la protéine humaine, la fonction de DFRM est probablement de réprimer la traduction de certains ARN messenger (Futsch) et son interaction avec RISC conduit à se demander si son mode d'action n'est pas lié au microARN.

TSN est une nucléase qui peut cliver des substrats ADN comme ARN de façon non spécifique de séquence. Cependant elle n'est pas responsable du clivage de l'ARNm cible mais elle pourrait participer à sa dégradation après le clivage. Chez *C. elegans*, Tsn est aussi un composant du complexe RISC qui est nécessaire pour la fonction du miARN *let-7* (Caudy, Ketting et al. 2003; Martinez and Tuschl 2004; Schwarz, Tomari et al. 2004).

La protéine dmP68 est l'homologue de l'hélicase à ARN p68 à boîte DEAD et elle forme un complexe avec AGO2 et dFMR1 dans les cellules S2, mais l'activité nucléase de ce complexe n'a pas été prouvée. Cependant si on diminue l'expression de dmP68 par ARNi, cela inhibe l'extinction induite par un ARN interférant d'un gène rapporteur codant pour l'EGFP, donc dmP68 a un rôle essentiel dans le mécanisme de l'interférence (Ishizuka, Siomi et al. 2002).

La protéine VIG est codée par un intron du gène Vasa et elle contient un domaine de liaison aux ARN, sa fonction n'est pas encore connue (Caudy, Ketting et al. 2003). La présence de DICER 1 dans les complexes RISC ayant une activité nucléase est inattendue puisqu'elle est spécifique de la biogenèse des miARN. Ceci pourrait refléter une interaction avec les siARN ou la présence de miARN dans les complexes RISC, en effet DICER 1 peut lier les miARN et ceux-ci sont effectivement détectables dans les fractions actives de 500kDa issues de cellules S2 (Caudy, Ketting et al. 2003; Pham, Pellino et al. 2004).

Tableau 2: complexes identifiés lors des purifications biochimiques de RISC (Sontheimer 2005)

Complex (original names)	Source	Known or apparent components	Estimated size	Apparent functions in the RNAi pathway	References
B	<i>D. melanogaster</i> embryos	NR	NR	siRNA binding, precursor to the RISC-loading complex?	32
Dcr2-R2D2	<i>D. melanogaster</i> S2 cells	Dcr2, R2D2	~250 kDa	dsRNA processing, siRNA binding	24
Dcr2-R2D2 (R1)	<i>D. melanogaster</i> embryos	Dcr2, R2D2	~250 kDa	dsRNA processing, siRNA binding, precursor to RISC	20
RISC-loading complex ⁴ , RLC (A)	<i>D. melanogaster</i> embryos	Dcr2, R2D2	NR	dsRNA processing, siRNA binding, precursor to RISC	20,32
R2	<i>D. melanogaster</i> embryos	NR	NR	RISC-assembly intermediate?	20
Holo-RISC (R3, RISC)	<i>D. melanogaster</i> embryos	Ago2, Dcr1, Dcr2, Fmr1/Fxr, R2D2, Tsn, Vig	~80S	Target-RNA binding and cleavage	20,32
RISC	<i>D. melanogaster</i> S2 cells	Ago2, Fmr1/Fxr, Tsn, Vig	~500 kDa	Target-RNA binding and cleavage	7,16,59, 60
RISC	<i>D. melanogaster</i> S2 cells	Ago2	~140 kDa	Target-RNA binding and cleavage	58
RISC*	<i>D. melanogaster</i> embryos	NR	~200 kDa	Target-RNA binding and cleavage	17
Fmr1-associated complex	<i>D. melanogaster</i> S2 cells	L5, L11, 5S rRNA, Fmr1/Fxr, Ago2, Dmp68	NR	Target-RNA binding and cleavage?	48
Minimal RISC	HeLa cells	eIF2C1 (AGO1) or eIF2C2 (AGO2)	~160 kDa	Target-RNA binding and cleavage	9,29,61,75
miRNP	HeLa cells	eIF2C2 (AGO2), Gemin3, Gemin4	~550 kDa	miRNA association, target-RNA binding and cleavage	18,19

⁴Possibly analogous to a *Caenorhabditis elegans* DCR-1-RDE-1-RDE-4-DRH1-2 complex characterized by co-immunoprecipitation²². Ago, Argonaute; Dcr, Dicer; Dmp68, the *Drosophila melanogaster* orthologue of the mammalian p68 RNA unwindase; dsRNA, double-stranded RNA; eIF2C1, eukaryotic translation-initiation factor 2C1; eIF2C2, eukaryotic translation-initiation factor 2C2; Fmr1/Fxr, the *D. melanogaster* orthologue of the fragile-X mental-retardation protein (FMRP); miRNA, microRNA; miRNP, miRNA-protein complex; NR, not reported; RNAi, RNA interference; RISC, RNA-induced silencing complex; rRNA, ribosomal RNA; siRNA, short interfering RNA; Tsn, tudor-staphylococcal nuclease; Vig, vasa intronic gene.

Tableau 3: facteurs impliqués dans l'assemblage et dans la composition du complexe RISC (Sontheimer 2005)

Protein	Species	Domains	References
Dcr1	<i>D. melanogaster</i>	DUF283, PAZ, RNase III, dsRBD	20
Dcr2	<i>D. melanogaster</i>	Helicase, DUF283, RNase III, dsRBD	20,32
R2D2	<i>D. melanogaster</i>	dsRBD	20,24,32
Ago2	<i>D. melanogaster</i>	PAZ, PIWI	16,20,48,58
Fmr1/Fxr	<i>D. melanogaster</i>	RGG, KH	20,48,59
Vig	<i>D. melanogaster</i>	RGG	20,59
Tsn	<i>D. melanogaster</i>	Tudor, SN	20,60
Dmp68	<i>D. melanogaster</i>	Helicase	48
Polyribosomes, ribosome components	<i>D. melanogaster</i> , <i>T. brucei</i>	Numerous	7,16,20,48,69
eIF2C1(AGO1)	<i>H. sapiens</i>	PAZ/PIWI	9
eIF2C2(AGO2)	<i>H. sapiens</i>	PAZ/PIWI	9,19,29,75
Gemin3	<i>H. sapiens</i>	Helicase	18,19
Gemin4	<i>H. sapiens</i>	None known	18,19

*Numerous other proteins involved in RNAi in a range of species have been discovered by genetic or bioinformatic means⁹⁵. In a few cases, for example, Ago1, Aubergine and Armitage in *Drosophila melanogaster*, the biochemical roles of the proteins have been investigated by examining the activities of extracts from mutant embryos^{32,34,96}. However, these proteins have not been physically detected in association with active RISC. Ago, Argonaute; Dcr, Dicer; Dmp68, the *D. melanogaster* orthologue of the mammalian p68 RNA unwindase; dsRBD, double-stranded-RNA-binding domain; DUF283, domain of undefined function 283; Fmr1/Fxr, the *D. melanogaster* orthologue of the fragile-X mental-retardation protein (FMRP); KH, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K homology; PAZ, piwi/argonaute/zwillig; RGG, arginine-glycine-glycine RNA binding; RNase, ribonuclease; SN, staphylococcal nuclease; Vig, vasa intronic gene.

(ii) Purification à partir de cellules humaines

L'analyse biochimique de RISC dans les cellules humaines a débuté avec la mise en évidence que l'ARNi pouvait être récapitulée *in vitro* dans des extraits de cellules HeLa (Martinez, Patkaniowska et al. 2002). En effet, l'addition de siARN synthétiques à la fraction cytoplasmique S100 induit le clivage spécifique de séquence d'un ARN messager cible, ce qui indique que RISC peut s'assembler en un complexe fonctionnel dans cette fraction. A partir de cet extrait de cellules HeLa, une première tentative de purification de RISC à partir de siARN biotinylés en 3' a permis d'isoler un complexe d'une taille comprise entre 90 et 160 kDa contenant deux protéines Argonaute (eIF2C1/AGO1 et eIF2C2/AGO2) et un seul brin d'ARN (Martinez, Patkaniowska et al. 2002).

AGO2 forme aussi un complexe avec les protéines GEMIN 3 (une hélicase à ARN à boîte DEAD putative) et GEMIN 4, contenant des miARN. Ces ribonucléo-protéines sédimentent à 15S et peuvent cliver un ARN contenant une séquence parfaitement homologue au miARN, ce qui indique que ces miRNP sont des complexes RISC (Hutvagner and Zamore 2002; Mourelatos, Dostie et al. 2002).

D'après ces études biochimiques, le complexe RISC fonctionnel ne contient qu'un seul brin d'ARN et celui-ci peut provenir d'un miARN comme d'un siARN. Ce phénomène est aussi observé chez les plantes (Llave, Xie et al. 2002) et chez *C. elegans* où un complexe d'environ 250 kDa, composé entre autre de miARN, de VIG et de TSN, a été isolé dans des extraits cytosoliques d'animaux adultes (Caudy, Ketting et al. 2003). Si AGO2 n'est pas spécifique de la fonction de clivage, RISC pourrait aussi être l'effecteur de la voie des miARN. Cependant il manque un modèle *in vitro* pour l'étude du mécanisme d'action des micro-ARN qui permettrait de valider cette hypothèse. L'implication de RISC dans la voie des miARN est moins probable chez les organismes où les protéines Argonaute ont une spécificité de fonction, car elles peuvent alors appartenir à des complexes différents.

2. L'assemblage du complexe RISC

a. L'enzyme Dicer est une composante des complexes précurseurs de RISC

(i) Dicer participerait à l'assemblage de RISC

Lors de l'étude biochimique du complexe RISC chez la drosophile ou lors de l'utilisation de siARN synthétiques dans des cellules de mammifères, le complexe RISC est programmé à l'aide de duplex d'ARN qui ne sont pas issus du clivage par Dicer ce qui suggère que cette étape est facultative dans le fonctionnement de l'ARNi. D'autre part dans des cellules souches embryonnaires de souris dont le gène codant pour Dicer a été invalidé, il est possible d'éteindre l'expression d'un plasmide codant pour la GFP en transfectant les cellules avec un siARN spécifique de la GFP (Kanellopoulou, Muljo et al. 2005). Donc Dicer ne semble pas intervenir dans la fonction de RISC chez *M. musculus* ce qui a aussi été observé dans des extraits de cellules Hela qui conservent leur capacité à cliver un ARNm cible en absence de Dicer (Martinez, Patkaniowska et al. 2002).

Cependant il semblerait que l'enzyme Dicer soit nécessaire dans certains cas d'ARNi induite par des siARN. Dans les cellules humaines et murines, la diminution de l'expression d'un gène rapporteur induite par un siARN est quasiment abolie si on cotransfecte un siARN ciblant DICER (Doi, Zenno et al. 2003) ce qui indique que DICER est nécessaire pour l'ARNi provoquée par les siARN. C'est aussi le cas chez la drosophile où la protéine DICER 2 est nécessaire pour former le complexe holo-RISC dans des extraits d'embryons (Pham, Pellino et al. 2004). L'hypothèse d'un lien fonctionnel entre DICER et RISC est renforcée par l'observation d'une interaction entre ces deux protéines *in vivo* au sein d'un même complexe protéique et dans des études *in vitro* de protéines recombinantes chez *C. elegans*, *D. melanogaster* et *H. sapiens* (Hammond, Boettcher et al. 2001; Tabara, Yigit et al. 2002; Doi, Zenno et al. 2003; Tahbaz, Kolb et al. 2004). L'enzyme DICER intervient donc à deux étapes de l'ARNi: lors du clivage de longs ARN double-brin et pendant la phase effectrice, même si dans certains cas cette deuxième étape peut avoir lieu en l'absence de DICER.

La relation fonctionnelle entre DICER et RISC a été identifiée grâce aux études chez *D. melanogaster*. Dans les cellules S2, l'enzyme DCR2 est associée à la protéine

R2D2 qui est indispensable pour la réponse ARNi aux longs ARN double-brin (Liu, Rand et al. 2003). R2D2 contient deux motifs de liaison aux ARN double-brin et son association à DCR2 ne change pas les caractéristiques enzymatiques de la nucléase, mais permet à DCR2 de lier les siARN. Le complexe DCR2/R2D2 établit un lien entre les phases initiatrice et effectrice de l'ARNi car l'incorporation des siARN dans RISC est facilitée par leur liaison préalable à DCR2/R2D2 (Liu, Rand et al. 2003).

Chez *C. elegans*, le facteur RDE4 semble tenir un rôle similaire à R2D2. En effet les mutants *rde4* sont déficients pour l'ARNi déclenché par les ARN double-brin exogènes. Comme R2D2, RDE4 possède deux domaines de liaison aux ARN double-brin qui sont effectivement capables de lier les longues molécules d'ARN double-brin et il interagit avec DCR1 et RDE1 qui est une protéine Argonaute. En conséquence, RDE4 a toutes les caractéristiques pour lier les étapes d'initiation et effectrice de l'ARNi (Tabara, Yigit et al. 2002).

Chez les mammifères, deux études récentes suggèrent que la protéine TRBP joue le rôle de R2D2 et de loqs pour le transfert des siARN et des miARN aux protéines AGO. Il est ainsi possible d'isoler des complexes ternaires DICER / TRBP / AGO2 et la diminution de l'expression de TRBP induit à la fois une déstabilisation de la protéine DICER et une diminution de l'efficacité de l'interférence induite par des siARN (Chendrimada, Gregory et al. 2005; Haase, Jaskiewicz et al. 2005). Il est intéressant de noter que TRBP a été identifiée non seulement à travers son interaction avec le transactivateur tar de HIV mais aussi comme un régulateur de la kinase PKR. TRBP constitue ainsi un nouveau lien entre les régulations post-transcriptionnelles spécifiques et non spécifiques de séquence.

(ii) Les complexes R2D2/DCR2 et RLC sont des précurseurs de RISC

Les étapes de l'assemblage du complexe RISC ont été exclusivement étudiées chez *D. melanogaster* à partir de lysats d'embryons ou d'ovaires grâce à la technique d'électrophorèse en gel non dénaturant. Dans ces modèles, des études cinétiques et de pulse-chase ont montré que les ARN double-brin étaient d'abord intégrés dans des complexes contenant R2D2 et DCR2 puis étaient détectés dans le complexe effecteur

RISC sous une forme simple-brin (Pham, Pellino et al. 2004; Tomari, Du et al. 2004). RISC est donc assemblé en plusieurs étapes et certaines d'entre elles dépendent de la présence d'ATP.

Les siARN issus du clivage par Dicer sont caractérisés par des extrémités 5' phosphorylées et cette caractéristique est nécessaire pour obtenir un RISC fonctionnel dans des extraits acellulaires de *D. melanogaster* et de cellules Hela : la phosphorylation en 5' du brin guide est indispensable pour la fonctionnalité du siARN tandis que la présence d'un groupement phosphate en 5' du brin passager n'est pas essentielle mais elle améliore l'efficacité d'un siARN. Cependant les cellules Hela et les extraits d'embryons de drosophile contiennent une kinase qui phosphoryle les extrémités 5'-hydroxyl des siARN et en conséquence les siARN non phosphorylés, comme ceux produits par synthèse chimique, sont tout de même intégrés dans des complexes RISC fonctionnels (Nykanen, Haley et al. 2001; Martinez, Patkaniowska et al. 2002).

Deux complexes précurseurs ont été bien caractérisés dans des études parallèles (cf. figure 12). D'une part, à partir d'embryons de drosophiles, un complexe nommé R1 est formé rapidement après incubation avec des siARN (Pham, Pellino et al. 2004). Sa taille est d'environ 360 kDa et il contient seulement les protéines R2D2 et Dcr2 et le siARN sous la forme double-brin (Sontheimer 2005). La formation de R1 ne dépend pas de la présence d'ATP si le siARN est déjà phosphorylé et ce complexe conserve l'activité de Dicer. Ce complexe peut aussi s'associer à des siARN dont l'extrémité 5' est hydroxylée mais de façon instable, ce qui suggère que ce complexe pourrait discriminer entre les siARN fonctionnels ou non (Pham, Pellino et al. 2004).

D'autre part, à partir d'embryons ou d'ovaires de drosophiles, l'assemblage de RISC fait intervenir un complexe intermédiaire nommé RLC (RISC Loading Complex), ou anciennement complexe A (Tomari, Du et al. 2004; Tomari, Matranga et al. 2004). Ce complexe contient le siARN sous sa forme double-brin qui est directement lié par Dcr2 et R2D2 mais les autres composants de RLC sont encore à identifier (Sontheimer 2005). Il diffère du complexe R1 car il nécessite de l'ATP pour se former et peut contenir des siARN qui sont déroulés. Chez *C. elegans*, le complexe formé par RDE4, la protéine Argonaute RDE1, DCR1 et une des deux, ou les deux enzymes DRH1 et DRH2 qui séparent les brins dans des duplex d'ARN (RNA unwindase) est potentiellement un

complexe précurseur de RISC qui pourrait être assimilé à RLC (Tabara, Yigit et al. 2002).

Jusqu'à présent les complexes R1 et RLC n'ont pas pu être formellement replacés l'un par rapport à l'autre dans le processus d'assemblage de RISC et la figure 12 est un des modèles envisageables de la construction de RISC. Deux autres complexes ont été identifiés lors de ces études, mais leur composition n'a pas été déterminée et leur rôle reste à définir. Il s'agit de R2 qui est issu de R1 et qui pourrait être un précurseur de RISC et du complexe B situé en amont de RLC. Tous deux se forment en l'absence d'ATP.

L'analyse de la demande en ATP pendant l'assemblage de RISC dans des mutants de *D. melanogaster* a indiqué l'existence 2 étapes au minimum entre RLC et RISC. La première requiert de l'ATP pour dérouler le siARN afin de séparer les deux brins et la deuxième fait intervenir ARMITAGE qui est probablement une hélicase à ARN dépendante de l'ATP (Tomari, Du et al. 2004). L'assemblage de RISC dépend aussi des protéines AUBERGINE et AGO2 car dans les mutants respectifs il s'arrête au stade RLC (Okamura, Ishizuka et al. 2004; Tomari, Du et al. 2004).

b. Un seul brin du siARN est présent dans RISC

Le complexe RISC fonctionnel ne contient qu'un brin d'ARN (Martinez, Patkaniowska et al. 2002; Schwarz, Hutvagner et al. 2002) ce qui implique que soit les deux brins d'ARN sont d'abord séparés puis l'un d'entre eux est introduit dans RISC, soit le duplex est intégré dans RISC et le brin complémentaire du guide (appelé brin passager) est ensuite dissocié et/ou dégradé. La dégradation du brin passager, qu'elle fasse suite à une séparation des brins ou non, s'effectue après la formation du complexe intermédiaire RLC car celui-ci contient majoritairement les siARN sous leur forme double-brin (Tomari, Du et al. 2004; Tomari, Matranga et al. 2004). Cette étape nécessite la présence de la protéine AGO2, car dans des lysats d'embryons de drosophiles n'exprimant pas la protéine AGO2 fonctionnelle, la voie d'assemblage de RISC s'arrête au stade RLC qui ne contient que des siARN double-brin (Okamura, Ishizuka et al. 2004; Tomari, Du et al. 2004; Tomari, Matranga et al. 2004). De plus, il a été montré *in vitro* que le domaine PIWI de la protéine Ago2 humaine pouvait interagir avec le domaine RNase III de Dicer (Tahbaz, Kolb et al. 2004), ce qui permet d'envisager un modèle où l'interaction entre

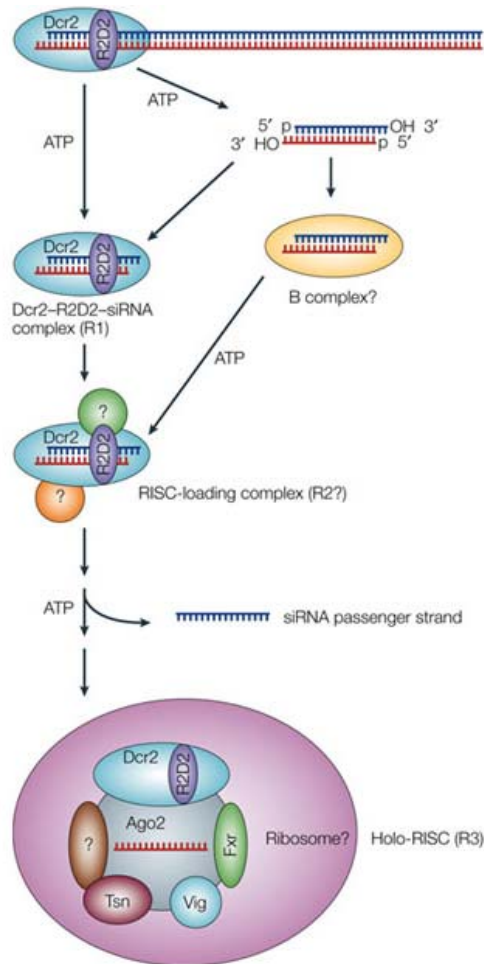


Figure 12: modèle moléculaire possible de l'assemblage du complexe RISC chez *D. melanogaster*. Les siARN sont issus du clivage d'un ARN double-brin par l'hétérodimère DCR2/R2D2 ou ont été transfectés tels quels. Le siARN peut rester associé à DCR2/R2D2 ou s'en détacher pour y être réassocié dans un deuxième temps. Le complexe DCR2/R2D2/siARN est semblable au complexe R1 identifié par (Pham, Pellino et al. 2004). Ensuite le siARN est intégré dans le complexe RLC (anciennement complexe A, et peut être équivalent au complexe R2). Le complexe RLC s'associe à d'autres facteurs pour former RISC selon un processus qui dépend de l'ATP et qui implique la séparation des brins du siARN. Le brin passager qui n'est pas intégré dans RISC est ensuite éliminé tandis que le brin guide est lié par AGO2. Le complexe ainsi formé est catalytiquement actif. Chez *D. melanogaster*, l'activité de RISC est purifiée avec un complexe contenant de multiples facteurs qui pourrait aussi contenir un ribosome. (Sontheimer 2005)

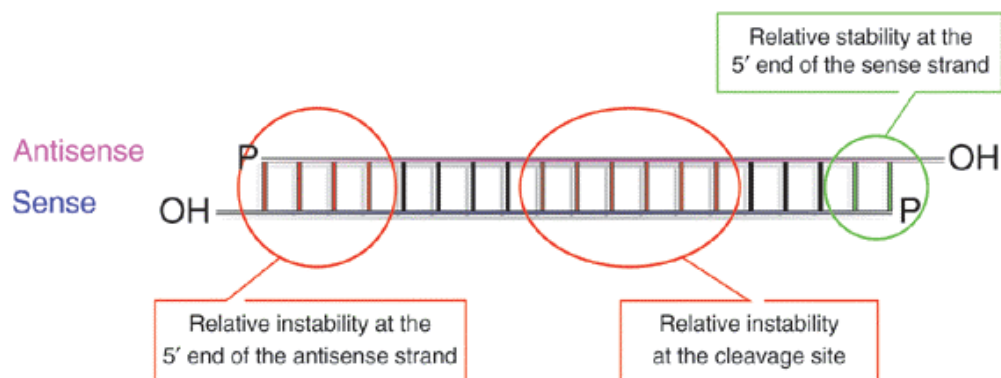


Figure 13: l'incorporation du brin guide dans RISC est guidée par le différentiel entre les stabilités des extrémités du siARN. Le brin qui sera incorporé dans RISC est celui dont l'appariement à l'extrémité 5' est moins stable par rapport à l'autre extrémité (le cercle rouge est moins stable que le cercle vert, le brin incorporé dans RISC est l'antisens). Les siARN fonctionnels sont caractérisés par un appariement de faible énergie au niveau du site de clivage. (Silva, Sachidanandam et al. 2003)

AGO2 et DICER2 induirait la délocalisation du siARN du complexe RLC vers le complexe holo-RISC où les brins seraient séparés (Tomari and Zamore 2005).

L'hypothèse de dissociation des brins préalable à la dégradation du brin passager est en accord avec les études génétiques et biochimiques qui ont identifié plusieurs protéines impliquées dans l'ARNi et possédant des domaines ATPase/hélicase à ARN putatifs: MUT6 chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Wu-Scharf, Jeong et al. 2000), SDE3 chez *A. thaliana* (Dalmay, Horsefield et al. 2001), MUT14 et DRH-1 et 2 chez *C. elegans* (Tabara, Yigit et al. 2002; Tijsterman, Ketting et al. 2002). Chez *D. melanogaster*, plusieurs protéines contenant des domaines hélicases à ARN ont été identifiées (DCR2, SPINDLE-E, DMP68 et ARMITAGE) mais les études sur l'assemblage de RISC n'ont pas montré leur implication dans la séparation des brins des siARN (Ishizuka, Siomi et al. 2002; Kennerdell, Yamaguchi et al. 2002; Liu, Rand et al. 2003; Lee, Nakahara et al. 2004; Okamura, Ishizuka et al. 2004; Pham, Pellino et al. 2004; Tomari, Du et al. 2004).

Cependant l'hypothèse alternative a été confirmée par des études *in vitro* qui ont montré que le brin complémentaire au brin guide était clivé par le complexe RISC de façon analogue au clivage d'un messenger cible (Matranga, Tomari et al. 2005; Rand, Petersen et al. 2005). Il apparaît donc que le duplex siARN s'associe à RISC dans un premier temps, puis celui-ci clive le brin complémentaire, induisant sa dégradation. Ces études ont aussi établi que cette étape ne nécessitait pas d'ATP ce qui implique l'existence d'étapes supplémentaires dans l'assemblage de RISC qui sont ATP dépendantes.

(i) Un des brins du siARN est préférentiellement intégré dans RISC

L'étude des miARN et des siARN a permis de mettre en évidence que les deux brins d'un siARN n'étaient pas également incorporés dans le complexe RISC (cf. figure 13). En effet, l'analyse statistique des séquences d'environ 280 siARN et d'environ 300 miARN prédits de divers organismes a montré que les siARN fonctionnels, c'est à dire qui dégradent plus de 70% de leur ARNm cible dans des cellules humaines, et les miARN partagent le même profil thermodynamique: l'appariement entre l'extrémité 5' du

brin guide et l'extrémité 3' du brin complémentaire est moins stable que l'appariement entre l'extrémité 3' du brin guide et l'extrémité 5' du brin complémentaire (Khvorova, Reynolds et al. 2003). Ces résultats ont été simultanément expliqués par une autre étude qui a utilisé des extraits d'embryons de drosophiles pour étudier la réaction de clivage des ARNm cible in vitro. Cette analyse biochimique a montré que les deux brins d'un siARN n'étaient pas incorporés avec la même probabilité dans RISC mais que RISC intègre préférentiellement le brin dont l'extrémité 5' est engagée dans l'appariement le plus labile, tandis que le brin complémentaire est dégradé (Schwarz, Hutvagner et al. 2003).

→ choix du brin d'un siARN synthétique

Le mécanisme moléculaire qui permet d'expliquer cette distinction entre les brins du siARN a été identifié chez *D. melanogaster*. Le différentiel de stabilité entre les extrémités d'un siARN est détecté par l'hétérodimère DCR2/R2D2 (Liu, Rand et al. 2003; Tomari, Matranga et al. 2004).

L'étude de la liaison de l'hétérodimère DCR2/R2D2 avec des siARN dont les appariements aux extrémités sont plus ou moins stables a montré que la protéine R2D2 s'associe à l'extrémité la plus stablement appariée alors que DICER2 est lié à l'extrémité dont l'appariement est plus labile (cf. figure 14). D'autre part, DICER2 a une faible efficacité de liaison pour les siARN ce qui indique que la liaison entre le siARN et l'hétérodimère est dirigée par R2D2. De plus R2D2 participe aussi à la reconnaissance des siARN fonctionnels car il lie préférentiellement les extrémités 5' contenant un groupement phosphate (Tomari, Matranga et al. 2004).

Donc chez *D. melanogaster*, la sélection d'un des brins d'un siARN se fait au niveau du complexe RLC par la liaison asymétrique de l'hétérodimère DCR2/R2D2. Cependant il reste à déterminer comment cet assemblage permet l'insertion d'un seul brin dans le complexe RISC final. En revanche, l'existence d'un tel mécanisme chez d'autres espèces est encore à prouver.

→ choix du brin d'un siARN issu du clivage par Dicer

Lorsque les siARN sont issus de la transformation par Dicer d'une longue molécule d'ARN, deux mécanismes sont envisageables: soit l'incorporation du brin guide est

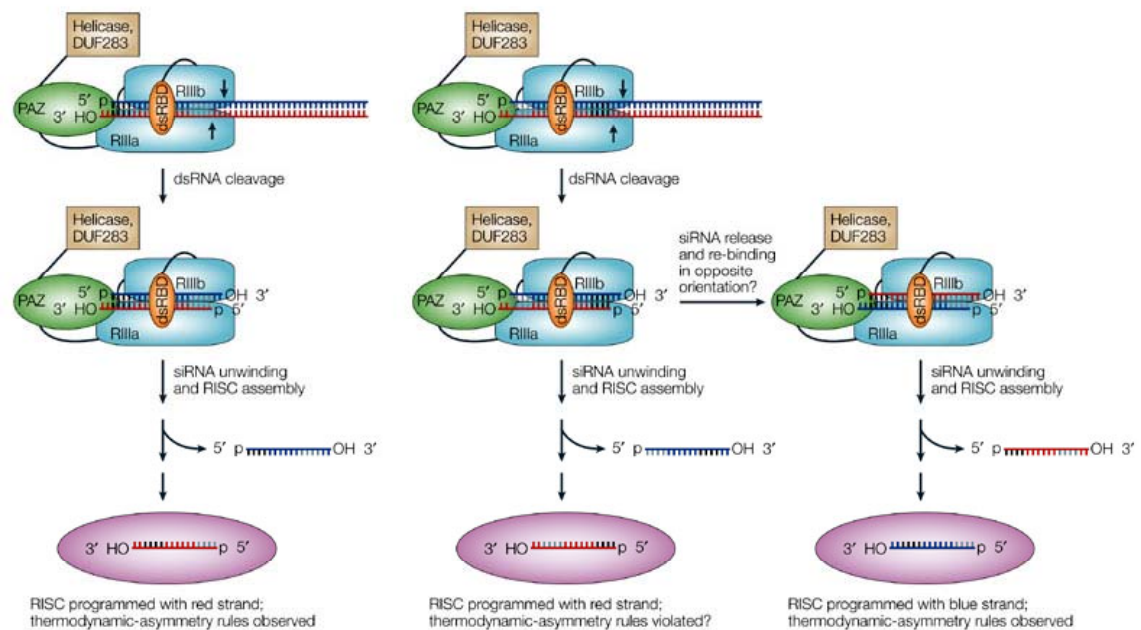


Figure 14: incorporation du brin guide dans RISC à partir d'un siARN issu du clivage d'un ARN double-brin par Dicer. Dicer est symbolisé par ses différents domaines: hélicase en marron, PAZ en vert, RNase III en bleu et domaine de liaison aux ARN double-brin en orange. Dicer émince l'ARN double-brin à partir d'une extrémité. Dans la colonne de gauche, après le clivage par Dicer, le siARN reste associé à Dicer et le brin guide est déterminé par l'orientation de Dicer sur l'ARN double-brin: les bases gris clair sont appariées de façon moins stable que les bases noires, donc dans ce cas, la règle des stabilités relatives aux extrémités est respectée. En revanche, dans la colonne du milieu, si le siARN généré par Dicer est orienté de manière inversée par rapport au cas de gauche, c'est le brin dont l'extrémité 5' est la plus stable qui sera incorporé dans RISC, ce qui viole la règle des stabilités relatives aux extrémités. Un modèle alternatif propose que le siARN se détache de Dicer pour s'y réassocier dans la bonne orientation dans un second temps (colonne de droite), ce qui permettrait de respecter la règle des stabilités relatives aux extrémités. (Sontheimer 2005)

définie par l'orientation de Dicer sur la molécule d'ARN double-brin, soit elle est déterminée par les stabilités des extrémités du siARN.

Dans la première hypothèse, Dicer reste associé au siARN qu'il vient de cliver à partir du long duplex d'ARN et l'orientation de Dicer par rapport au siARN ne tient alors pas compte des stabilités des extrémités, il y a donc une chance sur deux pour que Dicer soit associé à l'extrémité dont l'appariement est le plus labile. Donc lors de l'assemblage du siARN dans RISC, le brin du siARN qui est chargé dans RISC respectera la règle de l'asymétrie seulement dans la moitié des cas. L'hypothèse d'une rétention des siARN par Dicer est étayée par l'étude *in vitro* de la protéine recombinante Dicer humaine. En effet cette enzyme a une faible activité qui pourrait être due à un recyclage très lent de la protéine qui resterait associée à son produit (Zhang, Kolb et al. 2002). Cependant chez la drosophile, seule l'enzyme Dicer 2 participe au découpage des longues molécules d'ARN double-brin et sa capacité propre de liaison aux siARN est très faible ce qui conduit à envisager un second modèle (Liu, Rand et al. 2003; Lee, Nakahara et al. 2004).

Ce modèle alternatif postule qu'à la suite du clivage de l'ARN double-brin, le siARN peut se dissocier de DCR2 et se réassocier dans une deuxième étape à l'hétérodimère DCR2/R2D2 dans une configuration qui tient compte des stabilités relatives des extrémités. Ainsi le brin chargé par RISC serait en accord avec la règle de l'asymétrie dans tous les cas. La présence de siARN sous forme double-brin et non associés à des protéines a effectivement été observée dans les lysats d'embryons de drosophiles lors des essais *in vitro* reproduisant l'ARNi (Nykanen, Haley et al. 2001). De plus chez les plantes et dans les cellules humaines, la protéine virale P19 bloque l'ARNi *in vivo* (Chapman, Prokhnevsky et al. 2004; Dunoyer, Lecellier et al. 2004; Lakatos, Szittyá et al. 2004). Or c'est une protéine qui lie les siARN double brin ce qui est en faveur de l'existence d'une étape où les siARN sont dissociés de Dicer. Enfin, l'équipe de Sontheimer a récemment montré que l'orientation de Dicer sur le long duplex d'ARN ne détermine pas quel brin sera intégré dans RISC, renforçant l'hypothèse de la libération des siARN après l'étape de coupure chez la drosophile.

Donc chez *D. melanogaster* et dans les cellules humaines, le complexe RISC intègre un seul brin des siARN et le choix du brin est déterminé par les stabilités des appariements des extrémités du siARN (Khvorova, Reynolds et al. 2003; Schwarz, Hutvagner et al. 2003; Tomari, Matranga et al. 2004). Chez les plantes, les miARN et les tasiARN sont aussi engagés dans un mécanisme de sélection des brins en fonction de leurs stabilités ce qui suggère que la voie des miARN possède un homologue de R2D2 (Khvorova, Reynolds et al. 2003; Vazquez, Vaucheret et al. 2004). En revanche les siARN associés à RITS chez *S. pombe* ne semblent pas suivre cette règle de l'asymétrie ce qui suggère que tous les complexes guidés par des petits ARN ne sont pas assemblés selon le même modèle (Cam, Sugiyama et al. 2005).

(ii) Le brin guide du siARN est associé à la protéine Argonaute dans RISC

Au sein du complexe RISC, le brin guide est lié par la protéine Argonaute. Cette interaction a été montrée biochimiquement pour la protéine humaine AGO2 *in vitro* et *in vivo*. En effet, dans des cellules humaines en culture, lorsque l'on surexprime AGO2 étiquetée avec un peptide myc, l'immunoprécipitation de la protéine permet de copurifier le siARN marqué (Rand, Ginalski et al. 2004). De plus, une protéine recombinante AGO2 lie les siARN sous leur forme simple-brin et non la forme double-brin (Rivas, Tolia et al. 2005).

La cristallisation des domaines PAZ et PIWI de diverses protéines Argonaute a permis de comprendre comment le brin guide s'associe avec les protéines Argonaute. Les structures des domaines PAZ des protéines AGO1 et AGO2 de *D. melanogaster* sont semblables: elles présentent deux régions, une en forme de tonneau et une plus petite, qui forment un sillon (appelé PAZ fold) (Lingel, Simon et al. 2003; Song, Liu et al. 2003; Yan, Yan et al. 2003). Les acides-aminés constituant la surface de ce sillon sont très conservés au sein de la famille Argonaute, suggérant une fonction essentielle pour cette structure. Le sillon ressemble au repliement OB (pour oligonucléotide and oligosaccharide binding) trouvé dans des protéines capables de lier l'ARN simple-brin, ce qui a suggéré que le domaine PAZ pouvait sans doute lier les acides nucléiques. Cette hypothèse a été vérifiée biochimiquement et a pu être généralisée aux domaines PAZ des

protéines humaines AGO1, AGO2 et PIWI1 (Lingel, Simon et al. 2003; Yan, Yan et al. 2003).

L'interaction de PAZ avec les acides nucléiques a été détaillée grâce à la cristallisation des domaines PAZ d'AGO2 de *D. melanogaster* et d'AGO1 humaine associés à des oligomères d'ARN ou d'ADN. Il est apparu que ces domaines possèdent une poche hydrophobe très conservée où peuvent s'insérer les deux nucléotides de l'extrémité 3', les nucléotides suivant interagissent avec la surface du domaine PAZ grâce à des interactions de faible énergie mettant en jeu le squelette phosphate de l'oligomère et les résidus basiques du domaine PAZ (Lingel, Simon et al. 2004; Ma, Ye et al. 2004). Comme cette poche ne peut accueillir qu'un acide nucléique simple brin, le domaine PAZ des protéines Argonaute peut reconnaître et lier les extrémités 3' non appariées des siARN (cf. figure 15).

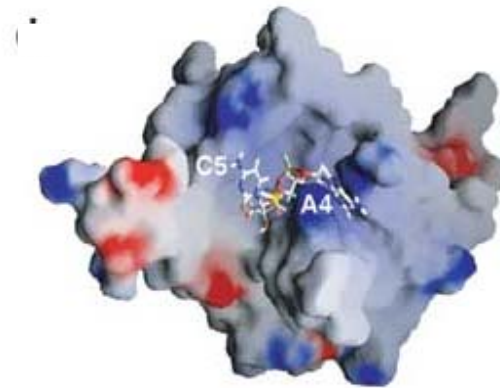


Figure 15: représentation de la surface domaine PAZ d'AGO2 de *D. melanogaster* associé à un pentamère d'ARN avec les charges électrostatiques symbolisées par les différentes couleurs (potentiel électrostatique neutre en blanc, positif en bleu et négatif en rouge). La surface du domaine PAZ qui lie les ARN est localisée dans un sillon qui est chargé positivement et qui est très hydrophobe. (Lingel, Simon et al. 2004)

La cristallisation de la protéine PIWI de l'archéobactérie *Archaeoglobus fulgidus* (AfPiwi) associée à un duplex d'ARN mimant un siARN a aussi mis en évidence que le domaine PIWI pouvait lier les brins guides des siARN. En effet AfPiwi possède une région qui est très conservée parmi les protéines Argonaute et qui est structurée en une poche basique où peut s'ancrer le nucléotide 5' terminal phosphorylé d'une molécule d'ARN (Ma, Yuan et al. 2005; Parker, Roe et al. 2005). Donc le brin guide du siARN est

ancré à deux endroits de la protéine Argonaute: son extrémité 3' est nichée dans le domaine PAZ et l'extrémité 5' dans le domaine PIWI.

3. Le clivage de l'ARNm par RISC

Le complexe RISC utilise le brin d'ARN guide pour identifier les ARNm complémentaires puis il les clive au milieu de la séquence homologue au brin guide. Le mode de fonctionnement de RISC a d'abord été étudié par des approches biochimiques *in vitro* et *in vivo* qui ont déterminé que le complexe contenait une endonucléase (appelée Slicer). Récemment les fractionnements biochimiques et la cristallisation des domaines PAZ et PIWI des protéines Argonaute ont conduit à l'identification de Slicer comme étant la protéine Argonaute du complexe RISC.

a. La nucléase (Slicer) de RISC est une protéine Argonaute

La purification biochimique de l'activité nucléasique dans les extraits de cellules S2 a permis d'isoler une seule protéine associée à un siARN et dotée de la capacité de clivage des ARNm qui a été identifiée par spectrométrie de masse comme étant AGO2 (Rand, Ginalski et al. 2004). D'autre part, dans des cellules humaines en culture, il est possible d'immunopurifier la protéine AGO2 humaine grâce à une étiquette myc et de reconstituer un RISC fonctionnel en incubant la protéine précipitée avec un siARN simple-brin (Liu, Carmell et al. 2004). Enfin la capacité de la protéine Ago2 humaine à cliver les ARN de manière séquence spécifique a été démontrée grâce à des études *in vitro* utilisant une forme recombinante de hAGO2 (Rivas, Tolia et al. 2005).

Afin de comprendre le fonctionnement des protéines Argonaute, plusieurs équipes se sont intéressées à leur structure obtenue par RMN et diffraction des rayons X. Cependant jusqu'à présent, aucune protéine Argonaute eucaryote n'a pu être cristallisée sous forme complète et les données structurales disponibles ont été obtenues avec les domaines PAZ eucaryotes décrits précédemment, le domaine PIWI d'*Archaeoglobus fulgidus* et les protéines Argonaute complètes des procaryotes *Pyrococcus furiosus* (PfAgo) et *Aquifex aeolicus* (AaAgo). Les cristallisations des domaines PIWI seul (AfPIWI) ou au sein d'une protéine Ago complète (PfAgo et AaAgo) concordent toutes et montrent que PIWI se replie selon une conformation qui est similaire à celle de la nucléase RNase H (Parker, Roe et al. 2004; Song, Smith et al. 2004). Le mode de

fonctionnement de RISC montre des caractéristiques voisines de celles des RNases H: le clivage par RISC nécessite la présence d'ions métaux divalents (Schwarz, Tomari et al. 2004), RISC clive un seul brin d'ARN d'un substrat qui est sous une forme double-brin alors que la RNase H clive un brin d'ARN dans un duplex ARN/ADN et enfin les extrémités résultant du clivage par RISC sont hydroxylées en 3' et phosphorylées en 5' comme celles laissées par les RNases H (Wintersberger 1990; Martinez and Tuschl 2004; Schwarz, Tomari et al. 2004). Le domaine PIWI des protéines Argonaute possède donc une structure qui peut rendre compte de l'activité catalytique observée.

Les études biochimiques avec la protéine hAGO2 recombinante ont montré que le domaine PIWI est fonctionnel et que son activité dépend de trois acides aminés qui d'une part sont conservés entre PfAgo et les protéines Argonaute eucaryotes et d'autre part correspondent à la triade catalytique des enzymes RNase H (Liu, Carmell et al. 2004; Rivas, Tolia et al. 2005). L'ensemble de ces travaux permet d'établir qu'une protéine argonaute comme AGO2 chez l'homme porte l'activité nucléasique du complexe RISC. Ceci a conduit le groupe de P. Zamore à proposer un autre mécanisme pour expliquer la séparation des brins, au moins dans le cas des complexes ayant une activité nucléase. Ils proposent en effet que le siARN soit intégré en tant que double brin dans AGO2 et que ce soit la coupure du brin « passager » qui induise sa dégradation. La spécificité du choix du brin guide est dans ce cas reportée au niveau de la présentation du siARN à AGO2. Du fait que les protéines AGO1, 3, 4 n'ont apparemment pas d'activité nucléase, un autre mécanisme doit intervenir dans la dissociation des brins des miARN.

b. La partie 5' du brin guide est déterminante pour l'activité de RISC

Les structures cristallographiques des domaines PIWI associés à des duplex d'ARN ont non seulement permis de caractériser l'ancrage du nucléotide en 5' du brin guide mais elles ont aussi apporté des renseignements sur les bases moléculaires de la sélection du site de clivage et sur la spécificité de séquence du complexe RISC (Ma, Yuan et al. 2005; Parker, Roe et al. 2005). En effet, ces deux études soutiennent un modèle où la région 5' du brin guide joue un rôle prépondérant dans la reconnaissance et le clivage de la cible par le complexe Argonaute-siARN:

- Le premier nucléotide en 5' du brin guide est ancré dans la poche basique du domaine PIWI et il ne peut pas s'apparier avec un nucléotide complémentaire. Donc il ne participe pas à la reconnaissance de la cible, ce qui avait déjà été observé chez *D. melanogaster* (Haley and Zamore 2004).
- Les quatre nucléotides suivants (nt 2 à 5) forment une hélice de forme A avec l'ARN cible et les interactions entre PIWI et le duplex d'ARN impliquent uniquement le squelette sucre-phosphate du brin guide ce qui explique pourquoi le complexe RISC n'a pas de spécificité pour la séquence des siARN et ce qui laisse envisager que le brin passager peut se dissocier après la coupure. Cette structure suggère aussi que la liaison des nucléotides 2 à 5 au domaine PIWI induit une disposition de forme hélicoïdale même en l'absence de la cible, ce qui favorise leur appariement aux ARNm complémentaires. En conséquence ces nucléotides constitueraient la région initiatrice de l'appariement guide/cible. Cette hypothèse est d'autre part soutenue par des études *in vitro* qui ont montré que les régions 5' des siARN et des miARN contribuent plus à la reconnaissance de leurs cibles que les régions 3' (Doench and Sharp 2004; Haley and Zamore 2004).
- La modélisation de duplex d'ARN ayant une forme A de plus grande longueur permet de placer le phosphate clivable à proximité de la région catalytique présumée de PIWI, ce qui est en accord avec le mode de clivage par RISC. En effet, plusieurs études ont montré que le site de clivage est mesuré à partir de l'extrémité 5' du brin guide selon une distance fixe qui le situe sur la liaison faisant face à celle des bases 10 et 11 de l'ARN guide (Elbashir, Lendeckel et al. 2001; Elbashir, Martinez et al. 2001; Haley and Zamore 2004).

c. La réaction de clivage de la cible

Les deux structures des protéines Argonaute complètes ont permis d'expliquer certaines caractéristiques du fonctionnement de RISC qui avaient été mises en évidence biochimiquement: la mesure du site de clivage à partir de l'extrémité 5' du guide, la prépondérance de la partie 5' dans la reconnaissance de la cible, le clivage par un mécanisme RNase H like. Cependant ces études divergent sur la structure la protéine dans sa globalité. En effet, même si chaque domaine (PAZ, PIWI, Nter et Mid) se replie de manière assez semblable, l'arrangement des uns par rapport aux autres est différent

entre AaAgo et PfAgo (cf. figure 16): AsAgo adopte une structure bilobaire avec les domaines N et PAZ d'une part et Mid et PIWI d'autre part, tandis que dans PfAgo PAZ est positionné au-dessus d'un croissant formé par les domaines N, PIWI et Mid (Song, Smith et al. 2004; Yuan, Pei et al. 2005). Ces deux structures sont associées à des flexibilités différentes entre les domaines et la résolution de la structure d'autres protéines Argonaute permettra sans doute de mieux définir les propriétés structurales des Argonaute eucaryotes.

Cependant un modèle de fonctionnement des protéines Argonaute dans le complexe RISC peut être envisagé à la lumière des structures déjà établies (Filipowicz 2005; Tomari and Zamore 2005; Yuan, Pei et al. 2005). Le complexe RISC effectuerait un cycle catalytique en quatre étapes (cf. figure 17):

- étape 1: la protéine Argonaute lie le brin guide par l'ancrage de l'extrémité 5' et des bases adjacentes dans la poche basique du domaine PIWI et des deux nucléotides libres de l'extrémité 3' dans la poche du domaine PAZ. Les contraintes topologiques indiquent que la région 3' du guide ne serait pas dans une forme hélicoïdale.
- étape 2: l'ARN cible s'apparie au niveau de la région 5' du guide et le duplex d'ARN peut adopter une forme hélicoïdale sur environ 7 nucléotides, le tout premier nucléotide étant exclu de l'appariement.
- étape 3: Le reste de l'ARNm vient s'apparier le long du brin guide ce qui nécessite un changement conformationnel de la protéine. Ce changement induit la délocalisation du domaine PAZ qui s'éloigne du domaine Nter et/ou la rupture de l'interaction entre l'extrémité 3' du guide et le domaine PAZ. L'espace dégagé entre les domaines PAZ et Nter serait ainsi occupé par le duplex ARN guide / ARNm.
- étape 4: le clivage a été induit par le positionnement du duplex qui permet de localiser l'ARN cible à proximité du motif catalytique du domaine PIWI et les deux fragments sont libérés. Le retour à la conformation initiale où le guide est ancré en 3' pourrait aider à la dissociation des fragments ou une hélicase à ARN pourrait aussi participer à cette étape.

Enfin ces études structurales ont aussi mis en évidence d'autres caractéristiques des protéines Argonaute dont la généralité reste encore à prouver. Ainsi AaAgo et AfPiwi se lient préférentiellement à des molécules d'ADN et non d'ARN et AaAgo peut fonctionner

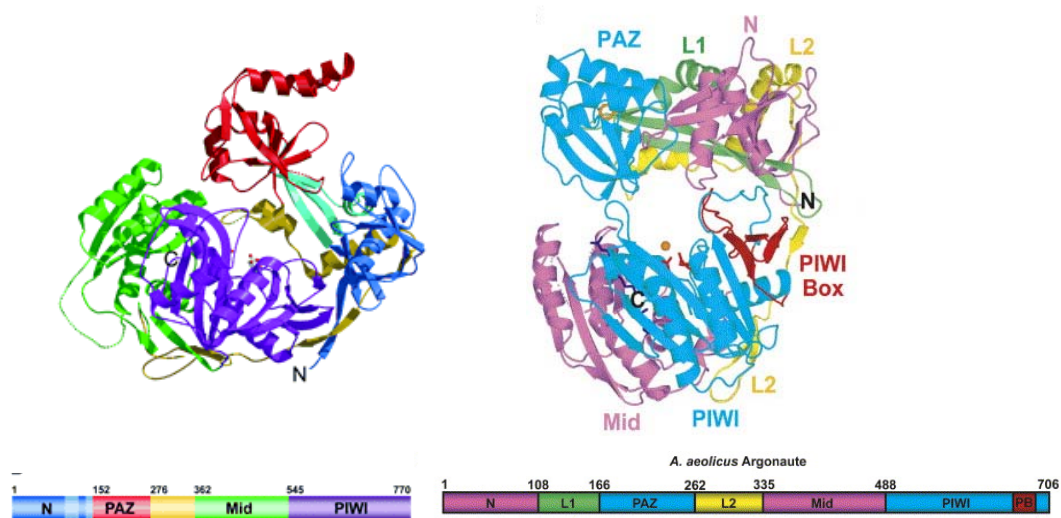


Figure 16: structures en ruban des protéines PfAgo (gauche) et AeAgo (droite) avec la représentation des différents domaines en bas de la figure. PfAgo adopte une structure en forme de croissant avec les domaines PIWI , Mid et Nter qui est surplombée par le domaine PAZ. AeAgo a une structure bilobaire avec d'une part PIWI et Mid et d'autre part PAZ et Nter. (Song, Smith et al. 2004; Yuan, Pei et al. 2005)

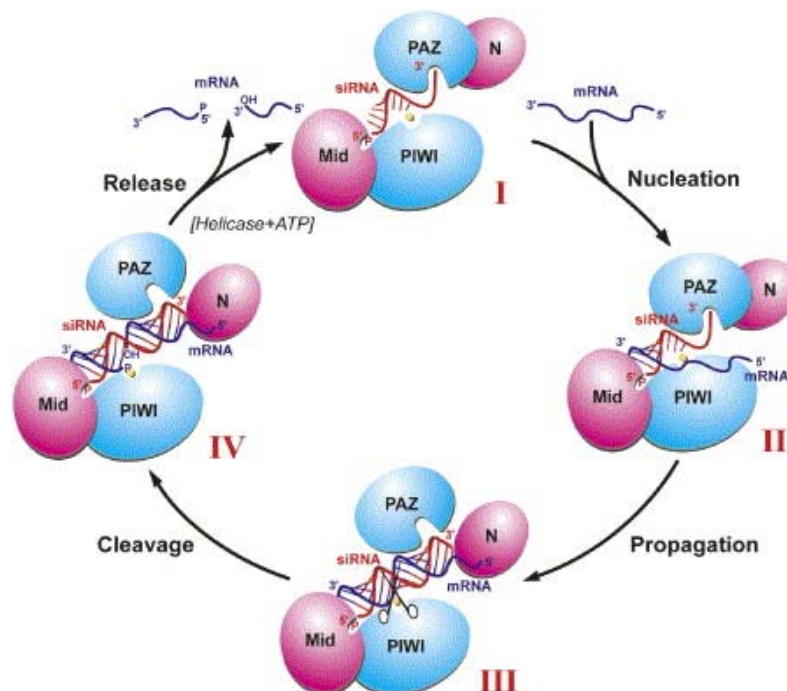


Figure 17: modèle du cycle catalytique de RISC associé au brin guide (en rouge) en quatre étapes. Les différentes étapes sont détaillées dans le texte. (Yuan, Pei et al. 2005)

comme une RNase guidée par un brin d'ADN, ce qui suggère que la sous-famille PIWI des protéines Argonaute pourrait avoir un rôle de RNase dépendante de l'ADN (Ma, Yuan et al. 2005; Yuan, Pei et al. 2005).

D'autres caractéristiques du mécanisme de RISC restent encore à expliquer: la réaction de clivage est ATP indépendante, cependant l'ATP permet d'améliorer le recyclage de RISC ce qui suggère que l'ATP doit aider à la dissociation des produits ou/et au retour à une conformation active (Hutvagner and Zamore 2002; Martinez, Patkaniowska et al. 2002; Haley and Zamore 2004; Martinez and Tuschl 2004). Mais l'analyse de la protéine recombinante hAGO2 indique que l'ATP ne change pas l'activité d'hAGO2 ce qui implique que la demande en ATP provient d'une autre sous-unité de RISC (Rivas, Tolia et al. 2005). D'autre part, le phosphate de l'extrémité 5' du brin guide a un rôle crucial lors de la sélection de ce brin, cependant les études de la protéine recombinante hAGO2 montrent qu'il n'est pas nécessaire à l'activité de clivage, mais qu'il aurait sans doute un rôle dans la stabilité et/ou la fidélité de l'enzyme (Meister and Tuschl 2004; Rivas, Tolia et al. 2005).

Le mécanisme d'action de RISC repose essentiellement sur l'association entre la nucléase AGO2 et le brin guide du siARN. Cependant il reste à définir les rôles des autres constituants de RISC qui pourraient peut être aussi nous éclairer sur le rôle des autres protéines Argonaute et sur le fonctionnement des différentes voies de l'ARNi.

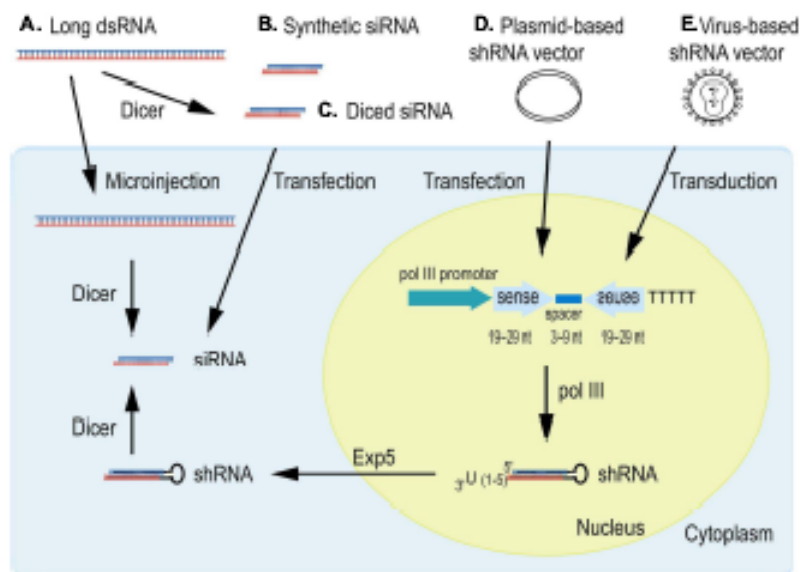


Figure 18: les diverses méthodes pour introduire des ARN double-brin dans les cellules. A, les ARN double-brin de grande taille peuvent être microinjectés ou transfectés ou d'abord émincés par la protéine recombinante Dicer (en C) puis transfectés. Il est aussi courant de transfecter des siARN synthétiques (B). Pour obtenir un effet stable, les ARN double-brins peuvent être exprimés sous forme de short-hairpin ARN qui mime la structure d'un miARN. Les vecteurs permettant l'expression des shARN peuvent être d'origine plasmidique (D) ou viral (E). (Kim 2005)

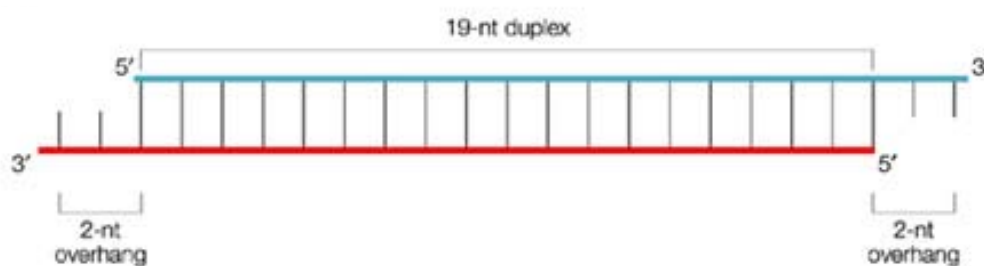


Figure 19: structure d'un siARN classique: les deux brins sont appariés sur 19 nucléotides et possèdent en 3' deux nucléotides non appariés. (McManus and Sharp 2002)

partie III : Les petits ARN double brin comme outil pour la génomique fonctionnelle dans les cellules de mammifères

Dans la plupart des organismes, l'introduction d'ARN double-brin de quelques centaines de nucléotides permet de programmer la machinerie de l'ARNi et d'induire la dégradation spécifique des ARNm. Cette dégradation est transitoire et dure plus ou moins longtemps en fonction de l'organisme. Pour obtenir une extinction stable, et éventuellement inductible, des systèmes d'expression ont été développés pour produire des molécules d'ARN capable de se replier selon une structure tige-boucle (shRNA, short hairpin RNA) qui miment des précurseurs de miARN (cf. figure 18). En revanche, l'utilisation de l'ARNi chez les mammifères n'était pas aussi simplement envisageable car les ARN double-brin dans les cellules induisent l'activation de la réponse interféron décrite précédemment.

Cependant des indices suggéraient que les cellules de mammifères pouvaient induire l'ARNi car d'une part certaines protéines clé du mécanisme était conservées et d'autre part dans les embryons ou dans des lignées de cellules embryonnaires, des longs ARN double brin pouvaient induire une réponse spécifique de séquence (Bernstein, Caudy et al. 2001; Hammond, Boettcher et al. 2001; Hannon 2002). De nombreuses études ont donc été menées pour déterminer dans quelles conditions un expérimentateur peut reprogrammer l'interférence par l'ARN afin d'en faire un outil spécifique et efficace pour aborder l'étude de la fonction des gènes.

1. Les siARN doivent être de taille inférieure à 30 nucléotides

Chez les mammifères, l'utilisation de duplex d'ARN d'une taille inférieure à 30 nucléotides permet de déclencher l'interférence par l'ARN sans induire la réponse interféron (Elbashir, Harborth et al. 2001). L'architecture des duplex d'ARN fut optimisée en utilisant des essais de clivages in vitro à partir de lysats de cellules de drosophiles et de mammifères, ce qui a permis de définir les premières règles pour concevoir des siARN synthétiques efficaces. La structure de ces siARN est un double brin de 21-23 nucléotides qui sont appariés sur 19-21 nucléotides et possèdent aux extrémités 3' deux nucléotides non appariés (cf. figure 19). Ces deux nucléotides ne sont pas déterminants pour la

spécificité de la réponse et afin de diminuer le coût de la synthèse, ce sont fréquemment des déoxythymidine (Elbashir, Martinez et al. 2001).

Dans un deuxième temps deux équipes ont évalué la capacité de duplex d'ARN de plus grande taille (27 nucléotides appariés) à induire la dégradation des ARNm par ARNi. Deux types de duplex synthétiques ont été testés: soit des molécules double-brin de 25 à 30 nucléotides avec un nombre variable de nucléotides libres aux d'extrémités (Kim, Behlke et al. 2005), soit une seule molécule d'ARN ayant une conformation tige-boucle, appariée sur 29 nucléotides et présentant une extrémité libre de deux nucléotides en 3' (Siolas, Lerner et al. 2005). Ces études ont montré qu'à une même concentration, ces longs duplex sont plus efficaces que les siARN "classiques" (19 à 21 nucléotides appariés avec 2 nucléotides non appariés en 3') dans des cellules de mammifères. Ces duplex sont des substrats de DICER et ces résultats sont en accord avec l'idée qu'être clivé par DICER potentialise leur intégration dans des complexes RISC.

La première caractéristique des duplex d'ARN initiant la dégradation par ARNi a avoir été identifiée fut leur taille car elle est déterminante pour éviter d'induire la réponse interféron. Cependant l'utilisation des siARN exogènes a été améliorée grâce à la meilleure compréhension du mécanisme.

2. La stabilité du siARN doit faciliter l'incorporation du brin guide dans RISC

L'étude de l'incorporation du brin guide dans RISC a mis en évidence que RISC intègre préférentiellement le brin dont l'extrémité 5' est moins stablement apparié avec le brin complémentaire tandis que le brin complémentaire est dégradé (Khvorova, Reynolds et al. 2003; Schwarz, Hutvagner et al. 2003). Ce biais d'incorporation implique qu'il est possible de favoriser l'intégration d'un brin dans RISC en sélectionnant des séquences qui placent en 5' du brin guide (antisens à l'ARNm cible) des nucléotides dont les énergies de liaison sont plus faibles qu'en 3'. Un des moyens d'optimiser l'efficacité d'un siARN est donc de favoriser l'incorporation dans RISC du brin qui est complémentaire à l'ARN cible, c'est à dire avec la séquence en antisens et de minimiser le nombre de complexes associés au brin sens.

3. La séquence du siARN doit être choisie pour minimiser la dégradation d'ARNm non ciblés

L'utilisation des siARN peut aussi dans certains cas induire la dégradation de cibles secondaires, désignées off-targets. Une première cause de cette dégradation non spécifique est la réponse interféron qui peut être activée dans certains cas. En effet plusieurs équipes ont rapporté l'activation de la PKR et des gènes stimulés par l'interféron (ISG) à la suite de la transfection de siARN synthétisés chimiquement ou enzymatiquement ou produits à partir de shARN. Il reste encore à déterminer quelles sont les éléments qui déclenchent cette réponse puisque celle-ci dépend de la séquence du siARN (Sledz, Holko et al. 2003; Kim, Longo et al. 2004; Pebernard and Iggo 2004; Persengiev, Zhu et al. 2004).

La dégradation d'ARNm qui ont une homologie limitée avec un siARN a aussi été observée. Ainsi des études ont mis en évidence que des mésappariements entre le siARN et un ARNm pouvaient être tolérés et n'empêchaient pas son clivage (Amarzguioui, Holen et al. 2003). Plus précisément, l'analyse systématique de l'extinction induite par deux siARN sur des cibles dont chaque nucléotide avait été successivement muté a montré que les mésappariements aux extrémités permettent une extinction alors que si la région 5' de l'ARN guide contient un nucléotide muté cela inhibe le clivage. D'autre part certains mésappariements comme A:C et G:U sont mieux tolérés (Dunoyer, Himber et al. 2005). L'impact de la permissivité de l'ARNi aux mutations a aussi été analysé avec des études de transcriptome qui ont mis en évidence que des ARNm qui ont seulement 11 nucléotides contigus en commun avec le siARN sont dégradés. Toutefois, tous les ARNm qui possèdent 11 nucléotides contigus en commun ne sont pas tous ciblés par le siARN (Jackson, Bartz et al. 2003). Chaque nucléotide d'un siARN ne contribue pas également à la reconnaissance de la cible et l'ensemble des études permet de conclure que c'est l'appariement de l'extrémité 5' du brin guide du siARN qui est prépondérant pour l'identification de la cible, comme c'est aussi le cas pour l'interaction miARN/ARNm (Doench and Sharp 2004). Dans les cas où une dégradation de l'ARNm est observée alors que seule la région 5' de l'ARN guide est complémentaire, le détail du mécanisme de la dégradation n'a pas été établi.

Enfin les siARN peuvent aussi diminuer l'expression d'un gène en inhibant la traduction de son messenger, autrement dit en agissant comme un miARN, lorsque la géométrie de l'appariement siARN/ARNm est altérée. Là encore les déterminants de l'inhibition ne sont pas encore clairement définis (Doench, Petersen et al. 2003; Saxena, Jonsson et al. 2003).

La spécificité des siARN n'est donc pas absolue et bien que certains nucléotides jouent un rôle prédominant dans la reconnaissance de la cible, il n'existe pas encore de règles permettant d'éviter les off-targets. Pour s'assurer de la spécificité du phénotype observé lors d'études utilisant l'ARNi, il est nécessaire d'utiliser la concentration la plus faible possible et de valider les résultats en ciblant une autre séquence du même ARNm et en restaurant l'expression du gène pour rétablir le phénotype (Hannon and Rossi 2004). De plus, malgré les efforts pour optimiser la technique, une des difficultés est de trouver une séquence cible qui permette d'obtenir une bonne efficacité de dégradation du messenger.

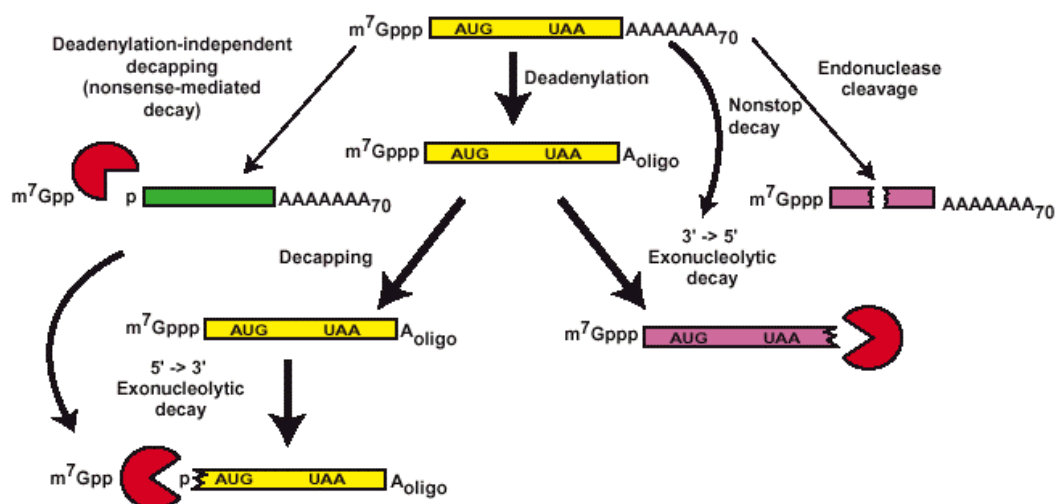


Figure 20: les voies de dégradation des ARNm chez les eucaryotes. Les voies majeures sont symbolisées par les grandes flèches noires. Après la déadénylation, les ARNm sont dégradés soit dans l'orientation 5' vers 3', soit dans l'orientation 3' vers 5'. Des voies de dégradation spécifiques sont aussi représentées: à gauche le NMD, à droite le NSD et les coupures endonucléolytiques. Les exonucléases sont symbolisées par les figures rouges. (Parker and Song 2004)

partie IV : Régulation de la dégradation des ARNm dans les cellules eucaryotes

La dégradation des ARNm dans les cellules eucaryotes est un mécanisme indispensable pour la physiologie cellulaire. En effet, elle permet aussi bien de contrôler le niveau de base d'expression d'un gène que de moduler cette expression. La dégradation des ARNm intervient dans le contrôle qualité des ARN qui assure la destruction des ARNm aberrants par des voies spécialisées. La dégradation des ARNm est aussi un moyen de défense contre les virus qui peut impliquer des voies générales comme des voies spécialisées de dégradation (Coller and Parker 2004).

1. Les deux voies générales de dégradation des ARNm cytoplasmiques

D'après les études chez la levure et chez les mammifères, deux mécanismes de dégradation des ARNm existent chez les eucaryotes (Parker and Song 2004). La première étape, commune aux deux voies, est la réduction de la queue poly(A) à l'extrémité 3' des ARNm appelée déadénylation (cf. figure 20). Dans une deuxième étape, la coiffe de l'ARNm est clivée ce qui conduit à la déprotection de l'extrémité 5' de l'ARNm. Ceci est suivi d'une dégradation exonucléolytique qui, chez la levure, intervient de manière prépondérante à partir de l'extrémité 5' avec l'exonucléase XRN1p. L'ARNm peut aussi être dégradé selon un mécanisme alternatif qui repose sur l'exosome, un complexe protéique contenant de multiples exonucléases 3' → 5'.

a. La déadénylation des ARNm initie leur dégradation

Trois complexes capables de digérer la queue poly(A) des ARNm ont été identifiées chez les eucaryotes et leur rôle biologique varie selon les organismes.

(i) Le complexe contenant les nucléases CCR4p et POP2p

Les deux nucléases CCR4p et POP2p associées à plusieurs protéines accessoires (NOT1-NOT5p, CAF4, CAF16, CAF 40 et CAF130p) forment un complexe qui déadényle les ARNm et qui est le mécanisme de déadénylation prépondérant chez la levure (Tucker, Valencia-Sanchez et al. 2001; Denis and Chen 2003).

CCR4p est une nucléase de la famille ExoIII et est conservée chez les eucaryotes et possède de multiples variants chez les plantes et les mammifères. Les études de protéines CCR4p mutantes *in vitro* chez la levure et *in vivo* chez la levure et l'homme montrent que cette protéine déadényle les ARNm chez ces organismes et que chez la levure, elle est majoritairement responsable de l'activité enzymatique de ce complexe (Chen, Chiang et al. 2002; Tucker, Staples et al. 2002). Son activité est inhibée par la protéine qui lie les séquences poly(A): PAB1p et n'est pas affectée par la coiffe de l'ARNm (Tucker, Staples et al. 2002; Viswanathan, Chen et al. 2003).

POP2p appartient à la famille des RNasesD et il en existe de multiples variants dans le génome des eucaryotes. Les résidus clés du site actif des RNasesD sont conservés chez POP2p ce qui suggère qu'elle possède une activité nucléasique. De plus POP2p aurait pour rôle d'améliorer l'activité de CCR4p soit en stabilisant le complexe soit en établissant des interactions entre le complexe et l'ARNm (Daugeron, Mauxion et al. 2001; Thore, Mauxion et al. 2003).

(ii) Le complexe contenant Pan2p et Pan3p

Chez la levure, l'enzyme PAN2p déadényle les ARNm en l'absence de CCR4p et les protéines PAN déadénylent certains messagers lors de leur maturation, ce qui pose la question d'un éventuel rôle pour les enzymes PAN de déadénylase spécifique de certains ARNm (Brown and Sachs 1998; Tucker, Valencia-Sanchez et al. 2001).

Les analyses de séquences montrent que PAN2p est de la famille des RNasesD et ce serait donc l'unité catalytique du complexe (Moser, Holley et al. 1997). Contrairement à celle de CCR4, l'activité des enzymes PAN est stimulée par la présence de PAB1b (Martinez, Ren et al. 2001).

(iii) L'enzyme PARN (poly(A) ribonuclease)

PARN est une exonucléase spécifique des séquences poly(A) et plusieurs études suggèrent qu'elle a un rôle important dans la déadénylation des ARNm dans les cellules de vertébrés. Des homologues sont aussi trouvés chez *C. elegans*, *A. thaliana*, *S. pombe* mais pas chez *S. cerevisiae* ni chez *D. melanogaster* (Astrom, Astrom et al. 1992; Lai, Kennington et al. 2003; Lejeune, Li et al. 2003).

Cette enzyme appartient aussi à la famille des RnaseD et elle possède un domaine dont la conformation suggère que PARN peut lier les acides nucléiques simple-brin (Moser, Holley et al. 1997; Lai, Kennington et al. 2003). Son activité est stimulée par la coiffe des ARNm mais est inhibée par la protéine PAB1p (Martinez, Ren et al. 2001).

La préférence de ces complexes pour des substrats qui n'ont pas le même environnement protéique (PAP1p, la coiffe des ARNm), donc qui appartiennent à des mRNP différents, indique qu'ils n'agissent pas sur les mêmes pools d'ARNm. D'autre part, cela implique que les protéines qui lient l'ARNm peuvent contrôler la déadénylation.

b. La voie exonucléasique 5' vers 3'

La dégradation 5' vers 3' des ARNm commence avec la dégradation de la coiffe des ARNm qui est effectuée par une enzyme constituée de deux sous-unités: DCP1p et DCP2p. DCP2p est la sous-unité catalytique et son activité est augmentée par DCP1p selon un mécanisme encore indéterminé (Dunckley and Parker 1999; Dunckley, Tucker et al. 2001; Lykke-Andersen 2002; Steiger, Carr-Schmid et al. 2003). DCP1p/DCP2p clive la coiffe m^7GpppX en m^7GDP et un ARNm monophosphorylé en 5', qui est rapidement dégradé par l'exonucléase XRN1p (Stevens 1980; LaGrandeur and Parker 1998). Le groupement m^7GDP est hydrolysé par l'enzyme DCPS (scavenger decapping enzyme) qui dégrade spécifiquement la coiffe des oligonucléotides (van Dijk, Le Hir et al. 2003).

La dégradation de la coiffe est contrôlée par trois étapes clé qui peuvent chacune être la cible de régulations (cf. figure 21) (Coller and Parker 2004; Parker and Song 2004). Tout d'abord, l'ARNm doit être déadénylé comme décrit ci-dessus car la queue poly(A) des ARNm inhibe le processus de decapping principalement par l'intermédiaire de la protéine PAP1p. Cependant la coiffe des ARNm peut parfois être dégradée sans réduction de la queue poly(A) préalable, par exemple, dans la dégradation induite par un codon non-sens (NMD: nonsense mediated RNA decay), ce qui indique que le contrôle par la queue poly(A) peut lui même être régulé (Muhlrad and Parker 1994; Coller, Gray et al. 1998).

Il existe un lien important entre l'arrêt de la traduction et la dégradation des ARNm messagers. De nombreuses études, en particulier chez la levure, suggèrent un modèle où

les ARNm sont répartis en différents pools: soit l'ARN est en cours de traduction et est associé au complexe liant la coiffe et à Pap1p, soit l'ARN est destiné à la dégradation et interagit avec les enzymes et les facteurs de dégradation de la coiffe (Schwartz and Parker 2000; Tharun and Parker 2001). Ce modèle binaire ne rend pas compte de toutes les situations chez les eucaryotes « supérieurs » et en particulier de la possibilité de stocker des ARNm non traduits pour un usage ultérieur au cours du développement ou dans des domaines subcellulaires spécifiques. La mise en évidence des corps dcp1 (ou P-bodies chez la levure) qui sont des foci cytoplasmiques où colocalisent les enzymes et les facteurs participant à la dégradation 5' vers 3' des ARNm joue un rôle important dans notre perception du devenir des ARNm. Les corps dcp1 sont vraisemblablement des sites spécialisés où sont dégradés les ARNm (Ingelfinger, Arndt-Jovin et al. 2002; Lykke-Andersen 2002; van Dijk, Cougot et al. 2002; Sheth and Parker 2003) et ils sont en liaison dynamique avec la traduction (cf paragraphe 3.). Une meilleure connaissance du fonctionnement des corps dcp1 et des facteurs déterminant l'arrêt de traduction d'un ARNm sera essentielle pour comprendre comment sont régulés la traduction et le decapping des ARNm. Une telle question est évidemment centrale pour la compréhension des activités biologiques des miARN.

Enfin la dégradation de la coiffe dépend de l'assemblage sur l'ARNm de divers complexes protéiques qui augmentent l'interaction des enzymes DCP avec leur substrat. Chez la levure, ce complexe de decapping est composé des protéines LSM1 à 7, qui lient l'ARNm, PAT1p, DHH1p, qui appartient à la famille des hélicases à boîte DEAD, et DCP1p/DCP2p (Parker and Song 2004). Des complexes de decapping spécifiques ont été décrits où le complexe DCP1p/DCP2p est recruté sur des ARN particuliers comme ceux ciblés par le NMD ou comme l'ARN Rps28a chez la levure dont la protéine correspondante est capable d'interagir avec le 3' UTR de Rps28a et le facteur EDC3p qui recrute DCP1p/DCP2p (Lykke-Andersen 2002; Schwartz, Decker et al. 2003; Badis, Saveanu et al. 2004). Là encore l'assemblage du complexe de decapping peut être régulé et moduler ainsi la dégradation de la coiffe.

Après la dégradation de la coiffe, l'ARNm est digéré par XRN1p, ou PACMAN chez *D. melanogaster* dont l'activité semble aussi contrôlée par la cellule (Muhlrad and Parker 1994; Till, Linz et al. 1998).

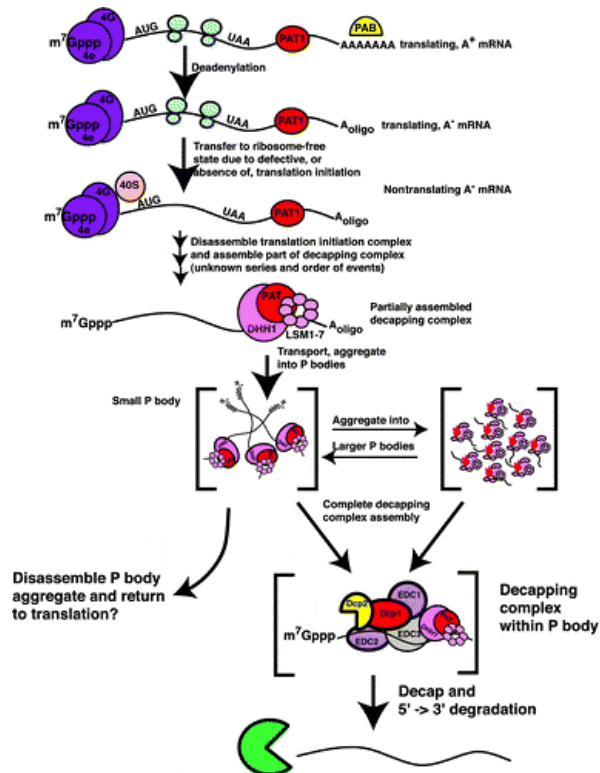


Figure 21: les étapes contrôlant la dégradation de la coiffe représentée selon un modèle chronologique hypothétique. La longueur de la queue poly(A) interviendrait en premier, puis l'ARNm échappe à la traduction et forme des mRNP spécifiques qui se groupent dans les corps dcp1 (ou P bodies). Enfin le complexe de decapping s'assemble et permet la dégradation efficace de la coiffe. (Coller and Parker 2004)

c. La voie exonucléasique 3' vers 5'

Chez les mammifères, à la suite de la déadénylation, les ARNm sont dégradés de 3' vers 5' par le complexe appelé exosome (Wang and Kiledjian 2001; Mukherjee, Gao et al. 2002). L'exosome est composé d'un cœur de neuf protéines qui s'assemblent selon une structure en anneau, dont six d'entre elles sont homologues à la RNase PH bactérienne et dont les trois autres contiennent un domaine putatif de liaison à l'ARN S1. Des protéines de la famille des RNases D sont aussi associées à l'exosome: RRP6p interagit avec l'exosome nucléaire uniquement et RRP44p/DIS3p s'associe avec l'exosome nucléaire et cytoplasmique (Parker and Song 2004; Raijmakers, Schilders et al. 2004).

Lors de la dégradation d'un ARNm chez la levure, l'exosome interagit avec un hétérotrimère, composé de SKI2p, SKI3p et SKI8p, par l'intermédiaire de SKI7p et qui semble avoir un rôle important dans la régulation de la dégradation des messagers par l'exosome (Brown, Bai et al. 2000; van Hoof, Staples et al. 2000; Araki, Takahashi et al. 2001). Cependant il existe des cas particuliers où l'exosome est recruté sur l'ARNm par des protéines liant des séquences spécifiques de l'ARN. Par exemple chez les mammifères, les séquences riches en éléments déstabilisateurs AU (séquences ARE) sont reconnues et liées par une ou plusieurs protéines spécifiques des ARE comme TTP ou KuR qui peuvent interagir avec l'exosome et ainsi le diriger vers cet ARNm (Chen, Gherzi et al. 2001). La récente implication du miR16 dans ce processus suggère l'existence d'un lien fonctionnel avec les complexes RISC. Cependant la fonction de l'exosome et la nature de ses interactions avec ses partenaires, substrats et adaptateurs, sont encore assez peu caractérisées.

2. Les voies spécialisées de dégradation des ARNm

a. Les transcrits nucléaires aberrants sont dégradés par l'exosome

La maturation nucléaire des ARN comporte plusieurs étapes: addition de la coiffe, épissage, polyadénylation et la plupart de ces événements sont soumis à un contrôle qualité qui induit la dégradation des ARN incorrectement maturés. Cette dégradation des

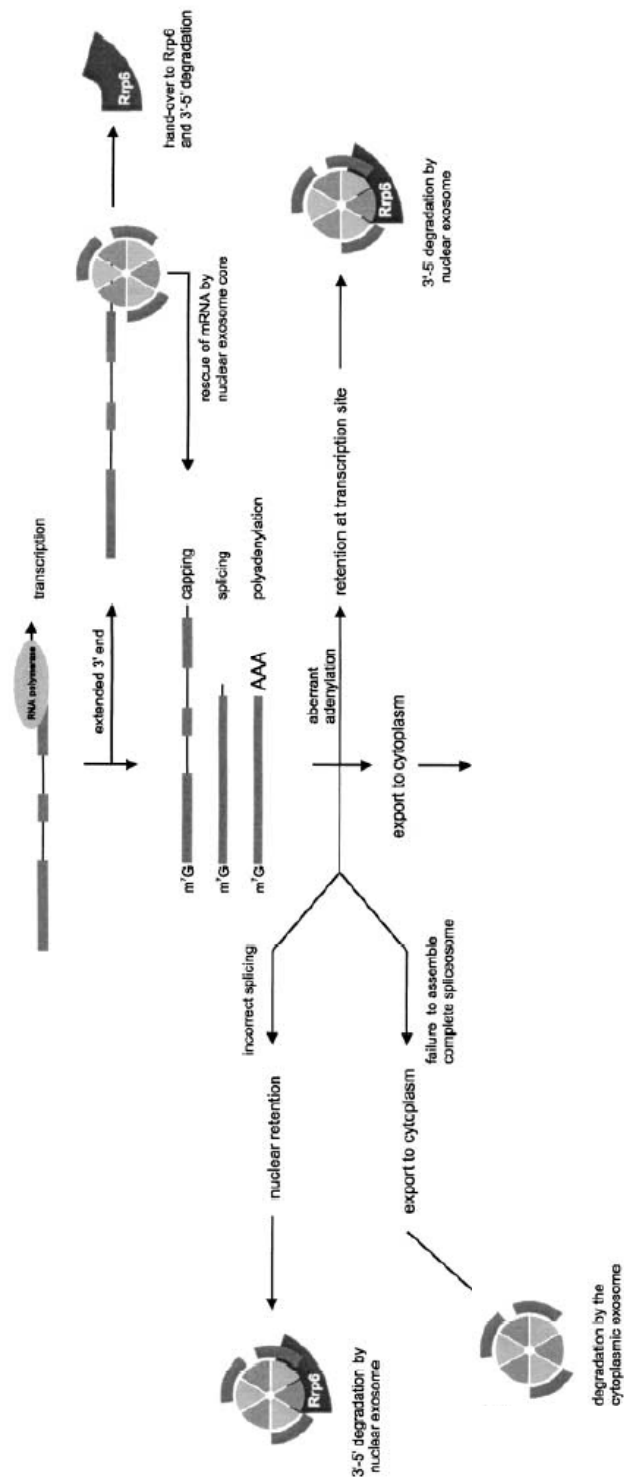


Figure 22: les différents mécanisme du contrôle qualité de la maturation des ARNm dans le noyau par l'exosome (Raijmakers, Schilders et al. 2004).

transcrits aberrants nucléaires est effectuée principalement par le complexe exosome nucléaire. Par ailleurs, il existe une exonucléase 5' vers 3' dans le noyau: Rat1p qui semble aussi participer au contrôle qualité des pré-ARNm (Moore 2002).

Les fonctions de l'exosome dans le contrôle de la maturation des ARN ont surtout été étudiées chez la levure. L'exosome nucléaire reconnaît et dégrade les ARN dont la synthèse s'est prolongée au-delà du site normal d'arrêt de transcription (cf. figure 22). Cette dégradation peut soit raccourcir le 3'UTR à la bonne longueur, permettant ainsi la maturation de l'ARNm, ou soit digérer l'ARNm en totalité (Torchet, Bousquet-Antonelli et al. 2002). Si l'épissage ne s'effectue pas correctement alors que le spliceosome est assemblé, les ARNm sont aussi dégradés par l'exosome nucléaire (Bousquet-Antonelli, Presutti et al. 2000; Hilleren and Parker 2003). Le contrôle qualité des ARNm vérifie aussi que la queue poly(A) a été correctement synthétisée et ainsi les ARNm non adénylés ou hyperadénylés sont retenus au site de transcription par un mécanisme impliquant l'exosome (Hilleren, McCarthy et al. 2001). Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'exosome aurait donc une fonction exonucléasique associée à un rôle dans la localisation des ARN.

b. La dégradation des transcrits contenant des codons non-sens (NMD)

Le processus de NMD (nonsense mediated RNA decay) désigne la dégradation des ARNm qui contiennent des codons stop situés en amont du codon stop normal. Ces codons sont appelés codon stop prématurés (PTC : premature termination codon) et entraînent un raccourcissement de la phase codante dont la traduction donne des protéines tronquées. La dégradation des ARNm qui contiennent un PTC est un des éléments du contrôle de qualité des ARNm qui peut protéger les cellules des effets délétères que pourrait avoir l'expression de protéines tronquées (Maquat 2004). De manière plus générale, le NMD reconnaît les aberrations dans la position du codon stop par rapport à certains traits caractéristiques de l'ARNm (Baker and Parker 2004).

Plusieurs voies semblent impliquées dans la reconnaissance d'un codon stop anormalement situé. D'une part, le mécanisme de la terminaison de la traduction de l'ARNm possédant un PTC diffère vraisemblablement de celui des ARNm normaux et

cette distinction pourrait induire le NMD. D'autre part, dans la majorité des cellules de mammifères, le NMD est déclenché uniquement si un codon stop est suivi d'une jonction exon-exon située à plus de 50-55 nucléotides en aval (cf. figure 23) (Nagy and Maquat 1998). Les jonctions exon-exon résultent de l'épissage d'un intron et elle sont caractérisées par la présence d'un complexe protéique environ 20-24 nucléotides en amont de la jonction appelé complexe de la jonction d'exons ou EJC (Le Hir, Izaurralde et al. 2000). L'EJC interagit *in vivo* avec les facteurs impliqués dans le NMD : UPF2, UPF3 et UPF3X (Lejeune, Ishigaki et al. 2002). Il pourrait aussi exister d'autres caractéristiques des mRNP susceptibles de déclencher le NMD comme chez *D. melanogaster* où il n'existe pas de règle de positionnement du codon stop par rapport à l'EJC (Maquat 2004).

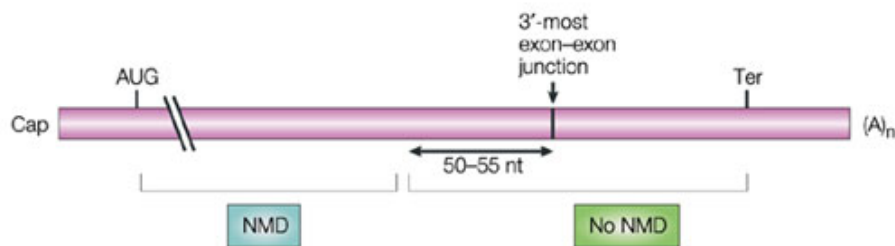


Figure 23: identification d'un PTC selon la règle de la position par rapport à la jonction exon-exon dans le NMD. Les codons stop qui sont suivis par une jonction exon-exon située à plus de 50-55 nucléotides en aval sont reconnus comme des PTC et induisent la dégradation de l'ARNm par le NMD. Seule la jonction exon-exon la plus en aval est symbolisée ici. (Maquat 2004)

Dans tous les cas, la reconnaissance des PTC nécessite que l'ARNm soit traduit et que sa coiffe soit liée à la CBP80 (Belgrader, Cheng et al. 1993; Carter, Doskow et al. 1995) or CBP80 fait partie d'un complexe qui lie la coiffe des ARNm naissants et qui est remplacé par eIF4E à la suite de la première traduction du messenger, ce qui implique que la reconnaissance du PTC se fait lors de cette étape (Ishigaki, Li et al. 2001).

Ces données ont permis d'établir un modèle de fonctionnement du NMD (Baker and Parker 2004). A son arrivée dans le cytoplasme, l'ARNm porte les EJC et est associé à la CBP80, c'est dans cette configuration qu'il est traduit pour la première fois (cf. figure 24) (first round of translation). Pendant cette traduction initiale, le(s) ribosome(s)

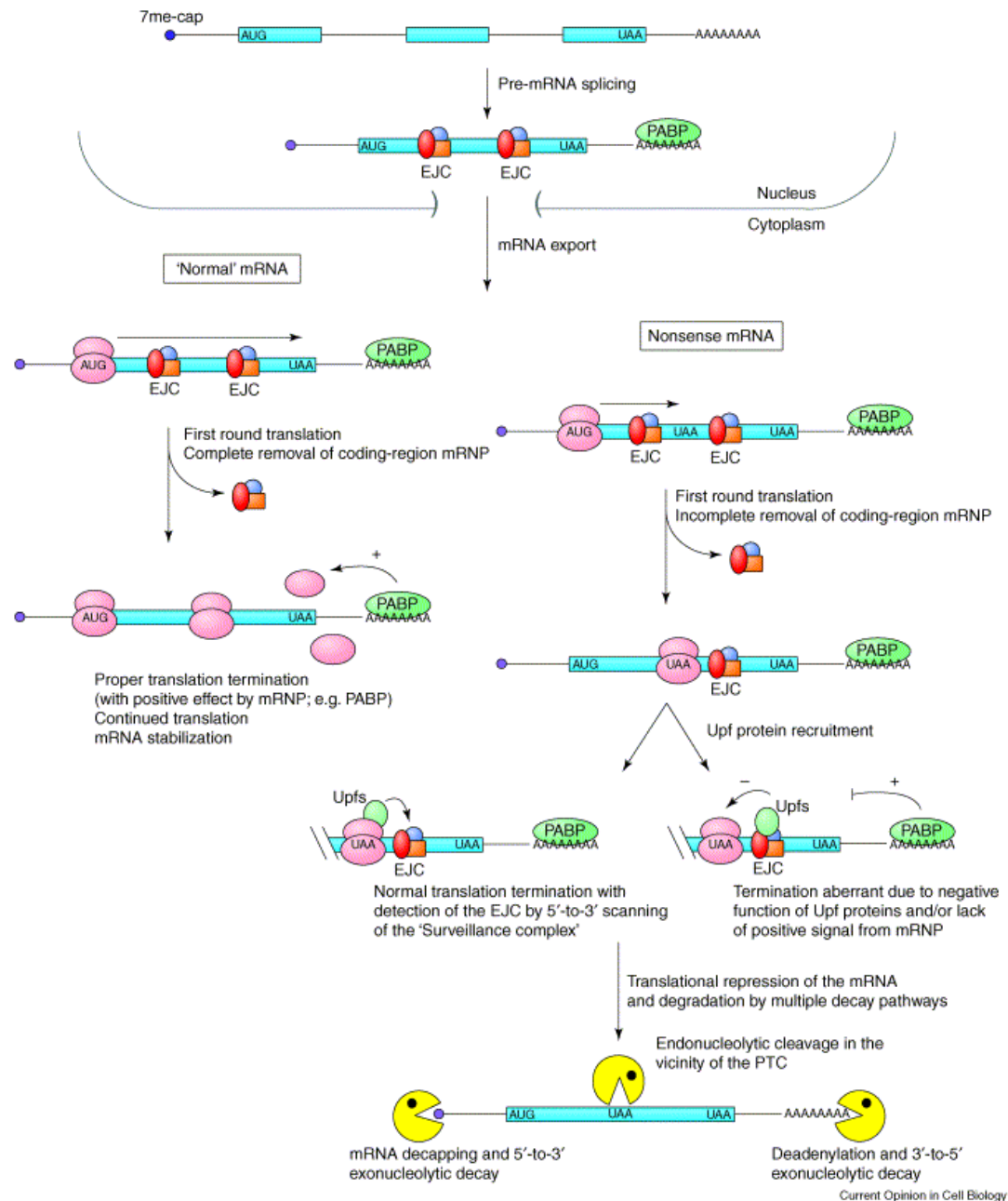


Figure 24: modèles de fonctionnement du NMD. A gauche: traduction d'un ARNm normal: les complexes des jonctions exon-exon (EJC) sont déplacées par les ribosomes scannant l'ARNm. A droite: l'ARNm contient un PTC et la première traduction ne déplace pas tous les EJC, deux modèles sont ensuite envisagés: soit les protéines Upf scanne l'ARNm à la recherche des EJC restant, soit les protéines Upf constituent un signal indiquant que la traduction s'est mal terminée et/ou d'autres signaux présents dans la terminaison de la traduction normale sont absents. Ces deux modèles conduisent à la dégradation des messagers par les voies exonucléolytiques classiques. La coupure endonucléolytique a été observée chez *D. melanogaster*. (Baker and Parker 2004)

induisent la dissociation des complexes EJC de l'ARNm et si l'ARNm possède un PTC, alors il reste des EJC sur l'ARNm en aval du codon-stop. Deux modèles sont actuellement envisageables pour expliquer l'activation du NMD. Dans un premier modèle, le ribosome arrêté par le codon stop engage un autre complexe protéique sur l'ARNm composé des facteurs Upf du NMD. Ce complexe "de surveillance" scanne l'ARNm à la recherche des EJC et déclenche le NMD si un EJC est effectivement rencontré. Dans le modèle alternatif, la terminaison de la traduction dans un contexte sans PTC induit une série d'évènements qui stabilisent l'ARNm et si un PTC empêche le fonctionnement correct de la terminaison, ces interactions positives ne sont pas induites et le NMD peut cibler l'ARNm.

Le NMD dégrade l'ARNm dans les deux directions chez les mammifères comme chez la levure et il stimule l'activité des enzymes des voies générales de la dégradation. Ainsi la digestion 5' vers 3' commence avec la dégradation de la coiffe indépendamment de la déadénylation suivie de la dégradation par XRN1 et la dégradation 3' vers 5' fait d'abord intervenir la déadénylation puis l'exosome (Lejeune, Li et al. 2003; Mitchell and Tollervey 2003). Dans certains cas particuliers, le NMD déclenche la coupure endonucléolytique de l'ARNm. Cependant le détail des mécanismes liant la reconnaissance des PTC à la dégradation n'est pas encore connu.

Une des questions posées par le NMD est la localisation des mécanismes de reconnaissances des PTC et de la dégradation. En effet, la plupart des cas, les ARNm sont dégradés alors qu'ils sont encore dans le compartiment nucléaire (Cheng and Maquat 1993), ce qui suggère que la reconnaissance des PTC ainsi que la dégradation des ARNm pourraient avoir lieu dans le noyau. Cependant, d'autres modèles sont possibles comme une traduction cytoplasmique associée à une dégradation cytoplasmique des ARNm lorsqu'ils sont encore attachés au pore nucléaire. Enfin, il est aussi possible que les conséquences du NMD soient visibles dans le compartiment nucléaire du fait de la nature particulière des ARNm matures qui s'y accumulent. Il a en effet été proposé par le laboratoire que les ARNm matures présents dans le noyau proviennent d'un rétrotransport depuis le cytoplasme (Audibert 2002). Aucune étude ne permet

actuellement d'éliminer ou de valider l'une de ces hypothèses (Dahlberg, Lund et al. 2003; Maquat 2004).

Un autre mécanisme de surveillance de l'ARNm intervient lorsque le messager ne contient pas de codon stop fonctionnel qui est le NSD (non-stop decay). Les ARNm sont alors dégradés par l'exosome qui serait recruté via l'interaction entre SKI7p et les ribosomes arrêtés à l'extrémité de la queue poly(A) (Frischmeyer, van Hoof et al. 2002; van Hoof, Frischmeyer et al. 2002).

c. La dégradation spécifique de séquence par l'ARNi

La seconde partie de l'introduction a décrit le mécanisme d'action du complexe RISC qui génère la coupure endonucléolytique de l'ARNm de manière spécifique de séquence. A la suite de ce clivage l'ARNm est dégradé très rapidement et les nucléases responsables de la digestion des fragments de l'ARN cible ont été identifiées chez *D. melanogaster* (Orban and Izaurralde 2005). Le fragment 5' de l'ARNm, c'est-à-dire celui qui possède une coiffe et l'extrémité 3' hydroxylée issue de la coupure par RISC est dégradé par l'exosome avec la participation des homologues chez la drosophile de SKI2p, SKI3p et SKI8p. Le fragment 3', lui, est digéré par XRN1p et n'est pas préalablement déadénylé. Donc la dégradation des fragments d'ARNm issus de la coupure par RISC fait intervenir les voies générales de dégradation des ARNm chez *D. melanogaster*.

3. Les corps dcp ont un rôle dans la dégradation et le stockage des ARNm

Les corps dcp (aussi appelés corps GW 182 ou P-bodies chez la levure) sont des structures cytoplasmiques qui ont été mises en évidence au cours de l'étude de la localisation des enzymes de décoiffage (DCP 1 et 2) ou de protéines liant l'ARN comme GW 182. Ils contiennent en outre la nucléase 5' -> 3' XRN1 ce qui a conduit à la suggestion qu'il s'agissait des sites actifs de dégradation des ARNm, il convient de noter cependant que l'exosome qui contient les nucléases 3' -> 5' a une localisation différente. Au cours d'une inhibition de la traduction ou dans le cadre d'une inhibition de l'expression de l'enzyme XRN1, les corps dcp augmentent de taille en accord avec une implication directe dans la dégradation des ARNm (Ingelfinger, Arndt-Jovin et al. 2002;

Lykke-Andersen 2002; van Dijk, Cougot et al. 2002; Sheth and Parker 2003). Récemment, l'équipe de Parker a montré que chez la levure, des ARNm localisés dans les P-bodies pouvaient sortir de ces structures et être traduits, démontrant ainsi que les P-bodies étaient non seulement des sites de dégradation mais aussi des sites de stockage transitoire des ARNm non traduits (Brenques, Teixeira et al. 2005).

D'autre part, des études sur la localisation de la protéine AGO2 humaine ont récemment montré qu'AGO2 se trouvait non seulement à l'état diffus dans le cytoplasme mais aussi concentrée dans les corps dcp (Liu, Valencia-Sanchez et al. 2005; Sen and Blau 2005). Dans des cellules Hela, des siARN fluorescents sont colocalisés avec GW182 dans les corps dcp (Jakymiw, Lian et al. 2005). Par ailleurs, AGO2 interagit avec les enzymes de dégradation de la coiffe DCP1p et DCP2p même si AGO2 n'est plus localisé dans les corps dcp, ce qui est le cas lorsque AGO2 est muté et ne peut plus lier les ARN. Les composants essentiels à la fonction de RISC sont donc tous localisés dans ces structures suggérant que RISC est capable d'interagir avec la machinerie de dégradation des ARNm (Liu, Valencia-Sanchez et al. 2005; Sen and Blau 2005). Ceci pourrait contribuer à l'efficacité de la dégradation des ARNm par les siARN en assurant qu'après le clivage initial les fragments générés soient dégradés par les corps dcp. De fait, l'implication des corps dcp est peut-être même plus importante puisque l'extinction de GW182 par interférence conduit à la dissociation des corps dcp et réduit l'efficacité d'un deuxième siARN (Jakymiw, Lian et al. 2005). Néanmoins chez la drosophile, l'extinction de GW182 et des DCP1p et DCP2p n'a pas d'effet significatif sur l'efficacité de dégradation par ARNi, il est donc possible que l'interaction des machineries de RISC et de la dégradation générale des ARNm soit spécifique des mammifères (Rehwinkel, Behm-Ansmant et al. 2005).

La localisation d'un ARNm dont la traduction est réprimée par un miARN a commencé à être caractérisée. De tels ARNm sont détectés, ainsi que les miARN dans les corps dcp – ou à proximité des corps dcp, à la résolution de la microscopie optique (Pillai, Bhattacharyya et al. 2005). De plus, le composant GW182 est nécessaire à la répression de la traduction par les miARN chez les mammifères et chez la drosophile (Liu, Rivas et al. 2005; Rehwinkel, Behm-Ansmant et al. 2005). Ces études sont en

accord avec un rôle des corps dcp dans la répression de la traduction et / ou la dégradation des ARNm induite par les miARN.

Les voies des siARN et des miARN ont donc GW182 comme facteur en commun et il est envisageable que le choix entre arrêt de la traduction et dégradation soit fait au niveau des corps dcp. Chez la levure, le destin d'un ARNm est organisé autour de deux pôles, la traduction en association avec les ribosomes et les corps dcp pour le stockage hors traduction et la dégradation. Chez les mammifères, il existe d'autres structures qui permettent le stockage à plus long terme des messagers hors traduction comme les granules de stress et il reste à mieux caractériser les implications de ces différentes voies dans les régulations post-transcriptionnelles par les petits ARN (Wilczynska, Aigueperse et al. 2005).

partie V : Problématique

1. Etat de lieux en 2002

La découverte de l'interférence par l'ARN en 1998, puis la démonstration que cette approche pouvait être utilisée dans des cellules de mammifère en 2001 ont ouvert une nouvelle voie pour l'étude fonctionnelle des gènes dans les cellules de mammifère. Lorsqu'ils sont transfectés dans les cellules, les petits ARN interférants induisent une dégradation spécifique de séquence des ARNm. En quatre années, leur utilisation est devenue courante car elle est relativement simple et rapide par comparaison avec les autres techniques permettant d'éteindre l'expression d'un gène, comme l'inactivation par recombinaison homologue. Elle offre de plus la possibilité d'une diminution graduée de l'expression.

Cependant la technique des siARN est encore dans une période de mise au point car leur mode d'action n'est encore que partiellement décrit. Ainsi, la spécificité de séquence sur laquelle repose le clivage des messagers peut tolérer certains mésappariements ce qui a pour conséquence la dégradation de messagers qui n'étaient pas initialement ciblés par l'expérimentateur. De plus, nous ne connaissons pas encore l'ensemble des déterminants de l'efficacité d'un siARN et il est donc nécessaire de tester plusieurs séquences pour trouver celles induisant la diminution souhaitée. Une meilleure compréhension du mécanisme d'action des siARN est indispensable pour optimiser leur utilisation. Ceci est évidemment aussi essentiel pour le développement des siARN comme outil thérapeutique. Car s'il a été facile de faire la démonstration de principe de l'activité des siARN sur des ARN viraux ou sur des ARN messagers d'intérêt, l'optimisation de la stratégie est critique pour l'efficacité et la spécificité du traitement. Les effets secondaires peuvent provenir aussi bien d'une activité sur des cibles partiellement complémentaires que de l'activation de réponses non spécifiques ou d'une interférence avec les fonctions endogènes des petits ARN présents dans les cellules.

La compréhension du mécanisme d'action des siARN est donc de première importance pour leur utilisation *in vivo* et *in vitro*, or celui-ci commence juste à être élucidé même si la situation a évolué de manière importante depuis le début de ce projet. La majorité des données a permis de documenter l'étape de coupure des ARNm par le

complexe RISC associé aux siARN. Elles ont été obtenues par des études biochimiques *in vitro* grâce à la purification de RISC dans des extraits acellulaires chez *D. melanogaster* et dans les cellules humaines. Récemment, l'identification de la protéine AGO2 comme la nucléase responsable du clivage des ARNm a permis de la localiser *in vivo* dans des structures particulières, les corps dcp1, où sont concentrées des enzymes impliquées dans la dégradation normale des ARNm. Cependant il n'existe que peu de données sur l'activité nucléasique *in vivo* de RISC.

Le projet de cette thèse était de développer une approche expérimentale pour mesurer l'activité enzymatique de RISC *in vivo* au moyen d'études cinétiques dans des cellules de mammifère. Cette analyse cinétique de la dégradation des ARNm par RISC avait pour objectifs, d'une part, d'analyser le lien entre les différences d'efficacité des siARN et l'activité nucléasique du complexe RISC; d'autre part, de déterminer si les siARN peuvent induire la dégradation des ARN localisés dans le compartiment nucléaire.

2. Approche expérimentale

L'objectif de ce travail est de mesurer la cinétique de la dégradation des ARN messagers induite par des siARN afin de décrire l'activité enzymatique *in vivo* de RISC. Cette étude s'inscrit dans le contexte général de l'analyse du métabolisme de ARN messagers qui est une des thématiques du laboratoire. Ainsi, la cinétique de la dégradation normale des ARN messagers a été auparavant décrite pour deux gènes rapporteurs exprimés dans des modèles cellulaires permettant de contrôler leur transcription.

Le premier gène modèle utilisé dans ce travail est celui codant pour la β -globine de lapin. L'ARN pré-messager de la β -globine contient trois exons et deux introns qui sont rapidement et efficacement épissés selon des demi-vies de 1,3 min et de 0,4 min respectivement. Seul l'ARNm mature est efficacement exporté vers le cytoplasme (cf. figure 25). Le second gène code pour une cytokine, la lymphotoxine- α de souris. Sa transcription produit un ARN pré-messager contenant 4 exons et 3 introns qui sont séquentiellement épissés dans le sens 5' vers 3'. Les introns 1 et 2 sont rapidement épissés, selon des demi-vies de 0,9 min et de 1,4 min respectivement, tandis que l'intron 3 est épissé selon un $t_{1/2}$ de 7,5 min (Audibert, Weil et al. 2002). Deux types d'ARNm de

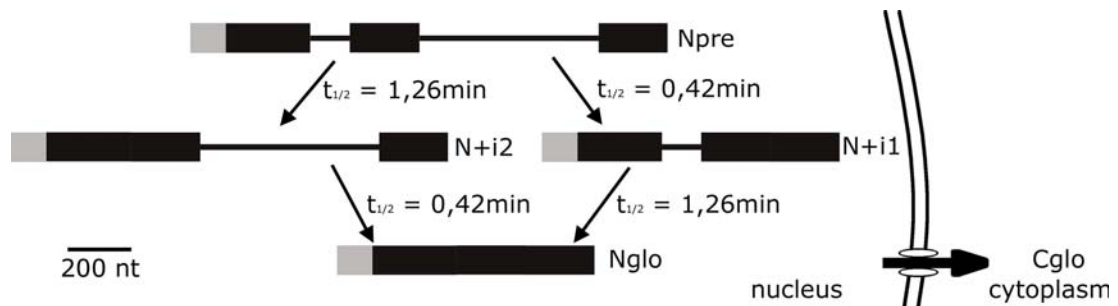


Figure 25: maturation et export de l'ARNm de β -globine. Les rectangles noirs symbolisent les trois exons de l'ARNm de β -globine, les traits noirs: les deux introns et le rectangle gris: la séquence transcrite provenant du vecteur d'expression. Dans le noyau, les deux introns sont épissés rapidement et totalement. Seul l'ARNm mature est exporté vers le cytoplasme. Npre: ARN premessager avec les 2 introns, N+i2: ARN précurseur dont l'intron 1 a été épissé, N+i1: ARN précurseur dont l'intron 2 a été épissé, Nglo: ARNm mature nucléaire et Cglo: ARNm mature cytoplasmique. Les temps de demi-vie ont été déterminées préalablement (Audibert, Weil et al. 2002).

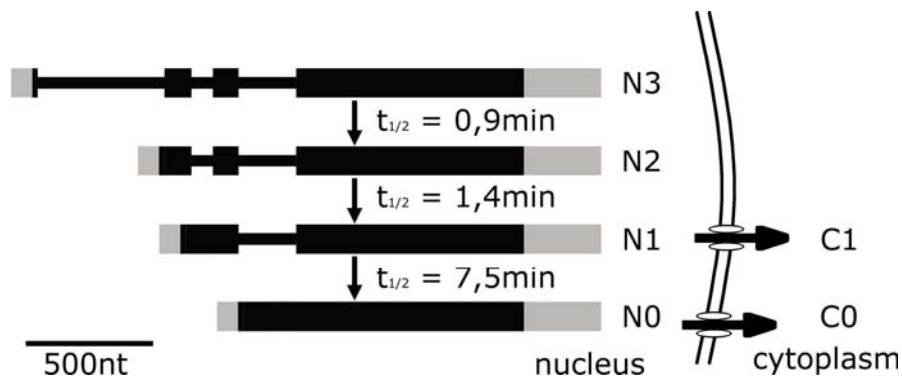


Figure 26: maturation et export de l'ARNm de lymphotoxine- α . Les rectangles noirs symbolisent les quatre exons de l'ARNm de lymphotoxine- α , les traits noirs, les trois introns et les rectangles gris, les séquences transcrites provenant du vecteur d'expression. Dans le noyau, les trois introns sont épissés séquentiellement dans l'orientation 5' vers 3'. Les ARNm mature et contenant encore le troisième intron sont exportés vers le cytoplasme. N3: ARN pré-messager avec les trois introns, N2: ARN précurseur avec les introns 2 et 3, N1: ARN précurseur avec l'intron 3, N0: ARNm mature nucléaire, C1: ARN avec l'intron 3 cytoplasmique, C0: ARNm mature cytoplasmique. Les temps de demi-vie ont été déterminées préalablement (Audibert, Weil et al. 2002).

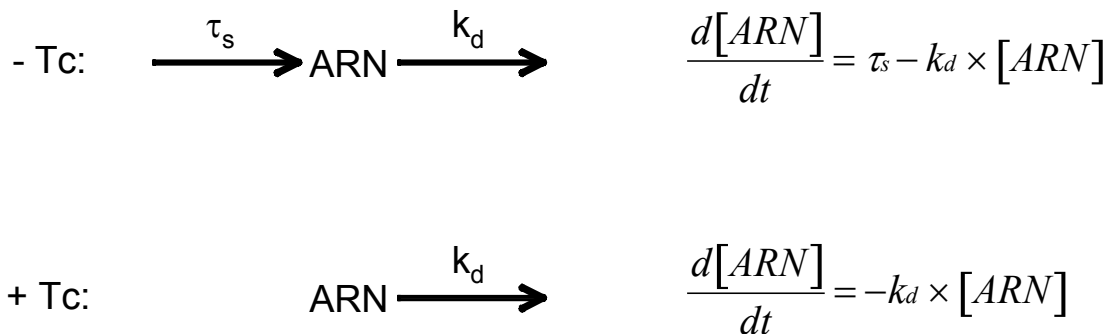


Figure 27: schéma réactionnel simplifié du devenir des ARNm. Dans le cas où le milieu de culture ne contient pas de tétracycline (-Tc), le pool d'ARN est alimenté par la synthèse d'ARN (taux de synthèse : τ_s) et est dégradé selon une constante cinétique k_d . La variation au cours du temps de ce pool suit donc l'équation indiquée et dépend à la fois de la synthèse et de la dégradation. Lors de l'ajout de la tétracycline (+Tc), la transcription est arrêtée et donc le taux de synthèse est nul. La variation du pool au cours du temps dépend donc uniquement de la dégradation.

lymphotoxine- α sont exportés vers le cytoplasme: l'ARNm totalement épissé (C0) et l'ARNm contenant l'intron 3 (C1, cf. figure 26).

Ces deux gènes ont été transfectés stablement dans des cellules de souris NIH 3T3 qui normalement ne les expriment pas. Ils ont été placés sous la dépendance d'un promoteur CMV lui-même contrôlé par un élément de réponse à la tétracycline (TRE). La lignée cellulaire dans laquelle ces rapporteurs ont été transfectés exprime le transactivateur VP16-tTA qui se fixe au TRE en absence de tétracycline et active la transcription du gène en aval. Lorsque la tétracycline est ajoutée dans le milieu de culture, le transactivateur se détache du TRE, ce qui inhibe la transcription. Deux lignées cellulaires ont été développées : la tTA- β -Glo exprime la β -globine et la tTA-LT- α , la lymphotoxine- α . Une concentration de 1 μ g/ml de tétracycline permet de réduire de 40 fois la transcription de la β -globine et de 18 fois celle de la lymphotoxine- α (Weil, Boutain et al. 2000).

Ces deux lignées cellulaires ont permis d'étudier *in vivo* la dégradation des ARNm en exploitant l'arrêt spécifique de la transcription induit par la tétracycline (cf. figure 27). Cette approche permet d'étudier le devenir des molécules existantes dans un contexte cellulaire normal puisque, à la différence de l'actinomycine-D qui bloque l'ensemble de la transcription cellulaire, seule l'expression du gène rapporteur est affectée par la tétracycline. Ces analyses ont montré que les ARNm de β -globine étaient dégradés avec une demi-vie de 7h et ceux de la lymphotoxine- α avec une demi-vie de 2h. De plus, l'étude de la répartition nucléo-cytoplasmique des ARNm de β -globine et de lymphotoxine- α a montré une accumulation d'ARN messagers matures dans le noyau. Ces ARNm, qui ne participent pas directement à l'expression cytoplasmique, s'accumulent à un niveau comparable (lymphotoxine- α) ou supérieur (β -globine) à celui des molécules en cours d'exportation.

Dans le cadre de l'analyse de l'activité *in vivo* du complexe RISC, nous avons utilisé ces deux gènes rapporteurs qui permettent une mesure directe de leur dégradation. Un des avantages de ces ARNm rapporteurs est qu'ils ont des demi-vies relativement longues, ce qui permet de mesurer leur décroissance avec une bonne précision. Par

ailleurs, la caractérisation détaillée des ARN présents dans le noyau rend possible l'analyse de l'impact de l'interférence par l'ARN sur les ARN nucléaires.

3. Organisation du rapport

La première partie présente les siARN qui sont utilisés dans ce travail. Le choix des séquences cibles ainsi que les efficacités des différents duplex y sont présentés.

La seconde partie porte sur la mesure des vitesses de dégradation des ARNm de β -globine lorsque la dégradation est induite par un siARN. La démarche expérimentale permettant les mesures cinétiques est tout d'abord présentée, puis les paramètres cinétiques obtenus avec des siARN de différentes efficacités sont analysés. Ces données définissent des vitesses de dégradation par RISC qui diffèrent entre siARN et en fonction de l'efficacité de l'inhibition. De plus, elles mettent en évidence la possibilité d'une accélération de la dégradation des ARNm au cours du temps. Enfin ces résultats soulignent l'importance de la stabilité des ARNm pour l'extinction de leur expression par des siARN.

La troisième partie est consacrée à l'étude de la dégradation induite par les siARN dans le noyau. Il y est d'abord montré qu'un siARN dirigé contre l'ARNm de la lymphotoxine- α peut induire la diminution des messagers matures nucléaires tandis que les ARN en cours d'épissage ne sont apparemment pas dégradés. L'étude cinétique de la dégradation des ARN nucléaires de la lymphotoxine- α met ensuite en évidence que la dégradation des ARN s'effectue dans le noyau et que les ARN en cours d'épissage peuvent aussi être ciblés par les siARN sous certaines conditions. Cette étude dans le noyau montre par ailleurs que les siARN induisent une accumulation des ARN pré-messagers qui est probablement due à une augmentation de leur synthèse.

Enfin le dernier chapitre porte sur l'analyse de l'effet de la traduction d'un ARNm sur sa dégradation par un siARN. En effet, au cours des études sur la dégradation de l'ARNm de lymphotoxine- α , nous avons mis en évidence qu'un même siARN dégradait les deux formes cytoplasmiques C0 et C1 avec des efficacités différentes. Une des hypothèses pouvant expliquer ce phénomène est l'existence d'un lien fonctionnel entre la traduction et la dégradation par RISC d'un ARNm. Afin de tester la validité de cette hypothèse, j'ai construit un gène rapporteur dont la traduction est modulable par la

concentration en fer dans le milieu de culture. La dernière partie présente la construction de cet outil ainsi que les résultats obtenus. Toutefois comme les difficultés rencontrées dans cette approche n'ont pas permis de conclure sur l'existence de cette interaction entre la traduction et l'interférence, une démarche expérimentale alternative est aussi présentée.

RESULTATS ET DISCUSSION

partie I

Choix des siARN et mesure de leur efficacité à inhiber l'expression de la β -globine et de la lymphotoxine- α

partie I : Choix des siARN et mesure de leur efficacité à inhiber l'expression de la β -globine et de la lymphotoxine- α

1. Choix de la technique de transfection des siARN

Les études au niveau de l'ARN nécessitent de pouvoir disposer d'un grand nombre de cellules. Pour notre projet, il était donc essentiel d'utiliser une technique de transfection qui permette de faire pénétrer les ARN interférants dans un grand nombre de cellules. Dans un premier temps, j'ai donc cherché à déterminer quelle technique de transfection permettait d'obtenir la meilleure efficacité de transfection des siARN et pouvait être adaptée à une « grande échelle » (plusieurs boîtes de 85 mm de diamètre). Pour cela j'ai utilisé un siARN ciblant la kinésine Eg5 qui permet d'optimiser la transfection des ARN interférants (Weil, Garcon et al. 2002). En effet, la protéine Eg5 est un moteur moléculaire nécessaire à la mise en place du fuseau mitotique et une inhibition de son expression ou de son activité induit un blocage du cycle cellulaire en prométaphase. Une quantification de ce phénotype peut être réalisée par un marquage de l'ADN à l'iodure de propidium et une analyse en cytométrie.

J'ai comparé trois techniques différentes pour transfecter les siARN: la coprécipitation avec le phosphate de calcium, les lipides cationiques (Oligofectamine) et l'électroporation. Pour les techniques au phosphate de calcium et avec l' Oligofectamine, la même quantité de siARN a été utilisée: 200 pmol pour 1×10^5 cellules tTA- β -glo ensemencées la veille dans une boîte de 35 mm de diamètre. Avec l'électroporation, $1,5 \times 10^6$ cellules ont été transfectées avec 45 pmol, car cette technique nécessite une forte densité de cellules et que nous avons observé qu'une inhibition maximale de l'expression d'Eg5 dans ces cellules pouvait être obtenue avec cette quantité de siARN. Les cellules ont été analysées 24h et 48h après la transfection par cytométrie en flux après marquage de l'ADN. La proportion de cellules qui sont en phase G2/M du cycle cellulaire et qui ont un contenu en ADN de $4n$, permet d'estimer le nombre de cellules dont la mitose est arrêtée et reflète donc l'efficacité du siARN. Les cellules constituant la population témoin ont été transfectées avec un siARN ciblant le messager de la protéine CPEB mais dont il avait été observé qu'il n'induit pas de diminution de l'expression.

La transfection des cellules tTA- β -Glo par électroporation est très cytotoxique et n'induit un phénotype d'arrêt en mitose que dans très peu de cellules. La transfection par Oligofectamine fait doubler la population cellulaire tétraploïde qui passe de 9% à 17% après

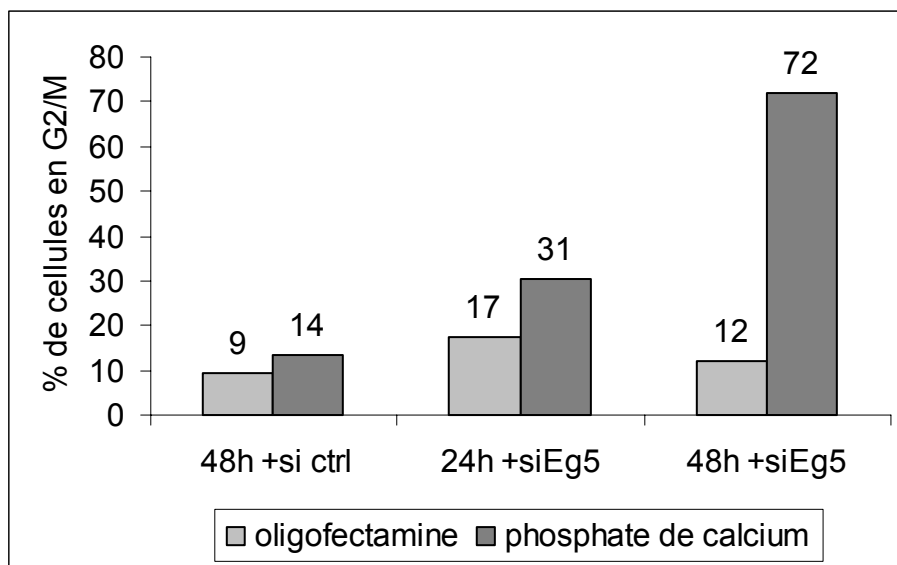


Figure 1: la transfection des siARN dans les cellules tTA- β -glo est plus efficace avec la technique au phosphate de calcium qu'avec l'Oligofectamine. Les cellules ont été transfectées avec 200 pmol de siARN dirigé contre Eg5 ou avec un siARN contrôle (ctrl), soit par phosphate de calcium (gris foncé) soit par Oligofectamine (gris clair). 24h et 48h après la transfection, l'ADN des cellules est marqué à l'iodure de propidium et analysé par cytométrie en flux. L'augmentation du pourcentage de cellules tétraploïdes reflète l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M.

24h de traitement mais l'effet n'est pratiquement plus visible à 48h (cf. figure 1). En revanche, la précipitation au phosphate de calcium est plus efficace que les deux autres méthodes et le pourcentage de cellules bloquées en G2/M atteint 31% et 72% à 24h et 48h, respectivement (cf. figure 1). Donc dans les cellules tTA- β -Glo, qui sont dérivées des cellules NIH 3T3, la technique de précipitation au phosphate de calcium permet de transfecter les siARN avec une meilleure efficacité que l'Oligofectamine et l'électroporation. Comme toutes les lignées cellulaires utilisées dans ce travail sont issues d'une lignée NIH 3T3, toutes les transfections ont été faites par précipitation au phosphate de calcium. La différence entre ces premières données et l'efficacité observée dans les expériences ultérieures reflète, d'une part, l'acquisition d'une meilleure maîtrise de la technique de précipitation au phosphate de calcium et, d'autre part, la cinétique plus rapide de l'inhibition de l'ARN par rapport à des mesures faites sur les protéines ou sur une activité biologique.

2. Choix des séquences des siARN

a. Méthode de choix

A l'initiation de ce projet en 2002, les séquences des siARN ont été choisies selon les règles qui avaient été décrites par T. Tuschl (Elbashir, Harborth et al. 2001; Elbashir, Martinez et al. 2001). La règle principale était de choisir une séquence de type AA(N)₁₉ contenant environ 50% de bases G et C dans les régions codantes. Comme cette restriction aux régions codantes ne reposait pas sur des données rationnelles, nous avons aussi cherché de tels motifs dans la région 3' non traduite (3'UTR). Puis nous avons recherché si les séquences candidates étaient présentes dans d'autres gènes de la base de données nr (non-redundant) de l'interface du NCBI grâce à l'algorithme BLAST. Pour cette recherche, les paramètres de BLAST qui ont été utilisés sont ceux qui détectent les appariements sur de courtes séquences (short, nearly exact matches). Nous avons alors sélectionné les séquences qui présentaient au plus 16 bases en commun avec d'autres ARNm identifiés dans la base de données nr, afin de minimiser les interactions avec d'autres cibles.

a. Trois siARN ciblant l'ARNm de β -globine

Pour cibler la β -globine, trois siARN ont été choisis, deux d'entre eux (β Glo1 et β Glo2) ciblent des séquences situées dans des exons tandis que la séquence reconnue par le troisième (β Glo3) recouvre la jonction entre l'exon 2 et l'exon 3 (cf. figure 2). Les siARN ont été synthétisés chimiquement et leurs caractéristiques sont détaillées dans le tableau 1.



Figure 2: position des siARN ciblant l'ARNm de β -globine. Les rectangles symbolisent les trois exons de la β -globine et les traits horizontaux les séquences ciblées par les siARN.

Tableau 1: caractéristiques des siARN ciblant la β -globine.

¹la séquence supérieure est celle du brin sens dans l'orientation 5' vers 3' et la séquence inférieure est celle du brin antisens dans l'orientation 3' vers 5'.

²la région de 19 nucléotides reconnue par le siARN est indiquée par rapport à la séquence génomique de la β -globine (identifiant GenBank: K03256), la région entre les nucléotides 920 et 1494 correspond à l'intron 2 qui est absent des ARNm matures.

³ Le site de clivage est défini comme faisant face aux nucléotides 10 et 11 du brin guide du siARN (en numérotant à partir de l'extrémité 5' du brin guide).

	séquence ¹	région ciblée ² (N) ₁₉	localisation du clivage par RISC ³
β Glo1	GGUGAAUGUGGAAGAAGUUDTdT dTdTCCACUUACACCUUCUCAA	533-551 exon1	541-542
β Glo2	GGCUCAUGGCAAGAAGGUGdTdT dTdTCCGAGUACCGUUCUCCAC	791-809 exon2	799-800
β Glo3	CUUCAGGCUCCUGGGCAACdTdT dTdTGAAGUCCGAGGACCCGUUG	914-920 et 1494-1505 jonction exon2/exon3	1495-1496

b. Quatre siARN ciblant l'ARNm de la lymphotoxine- α

L'ARNm de la lymphotoxine- α est présent sous deux formes dans le cytoplasme: avec ou sans l'intron 3. Trois siARN ont été choisis dans la séquence du quatrième exon et une dans celle de l'intron 3 afin de pouvoir cibler spécifiquement les ARN messagers contenant cet intron (cf. figure 3). Les caractéristiques des siARN sont détaillées dans le tableau 2.

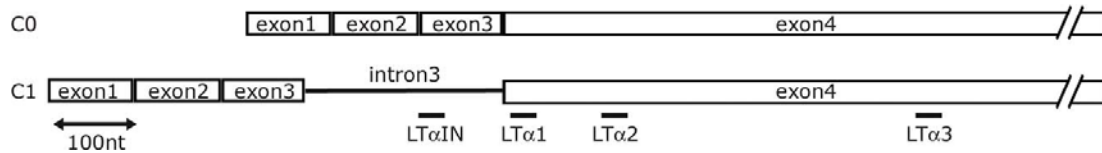


Figure 3: position des siARN ciblant l'ARNm de la lymphotoxine- α . Les rectangles symbolisent les quatre exons de la lymphotoxine- α , le trait noir: l'intron 3 et les traits horizontaux: les séquences ciblées par les siARN.

Tableau 2: : caractéristiques des siARN ciblant la lymphotoxine- α .

¹la séquence supérieure est celle du brin sens dans l'orientation 5' vers 3' et la séquence inférieure est celle du brin antisens dans l'orientation 3' vers 5'.

²la région de 19 nucléotides reconnue par le siARN est indiquée par rapport à la séquence génomique de la lymphotoxine- α (identifiant GenBank: Y00467).

³le site de clivage est défini comme faisant face aux nucléotides 10 et 11 du brin guide du siARN (en numérotant à partir de l'extrémité 5' du brin guide).

⁴le siARN LT α 2 est un duplex de 23 nucléotides tandis que les autres sont de 21 nucléotides.

	séquence ¹	région ciblée ² (N) ₁₉	localisation du clivage par RISC ³
LT α IN	CCAUCCACUUGUCCAGUGUU UUGGUAGGGUGAACAGGUCAC	2137-2155	2145-2146
LT α 1	GCAGAACUCACUGCUCUGGUU UUCGUCUUGAGUGACGAGACC	2234-2252	2242-2243
LT α 2-23 ⁴	CAGGUGGUUUUCUCUGGAGAAAdTdT dTdTGUCCACCAAAGAGACCUCUU	2349-2369	2359-2360
LT α 3	UAACCUUGGAGCUCUCACGGUU UUAUUGGACCUCGAGAGUGCC	2729-2747	2737-2738

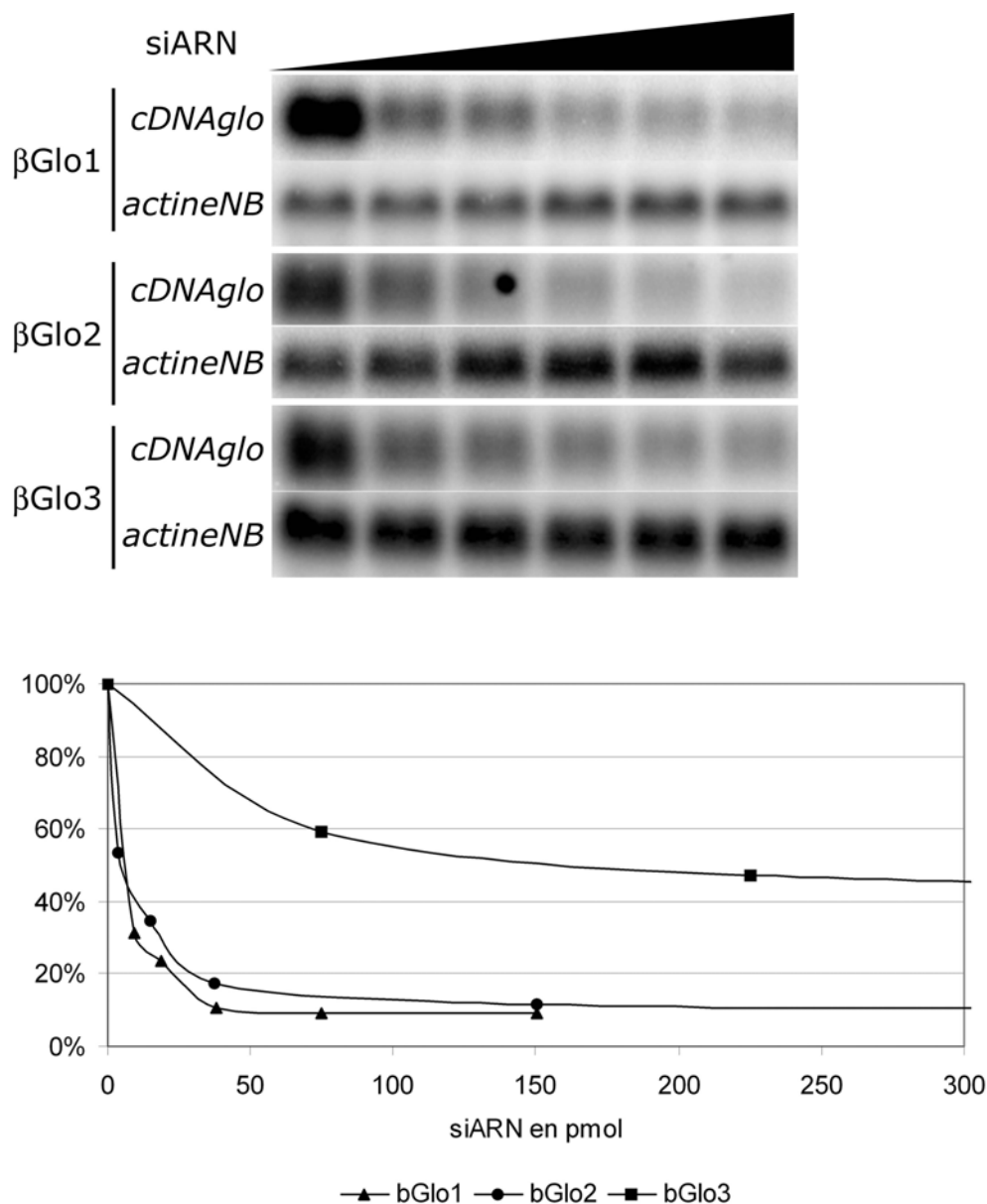


Figure 4: dose réponse à 24h des cellules tTA-β-Glo aux siARN ciblant la β -globine. Des quantités croissantes de siARN sont transfectées par phosphate de calcium dans les cellules, puis 24h après, les ARN sont extraits et analysés par Northern blot. (en haut) La membrane est hybridée successivement avec les sondes *cDNAglo* et *actineNB*. (en bas) Les signaux des ARNm sont quantifiés, le signal β-globine est normalisé par rapport au signal actine et le pourcentage d'ARNm de β-globine résiduel est calculé en fonction de la dose 0. ▲: βGlo1, ●: βGlo2, ■: βGlo3.

3. Dose réponse aux siARN sélectionnés

L'objectif de ce projet étant d'étudier de manière quantitative la dégradation des ARN messagers induite par les petits ARN interférants, il était essentiel de s'assurer que les conditions expérimentales sont reproductibles. De plus, l'utilisation de quantités inutilement importantes d'ARN interférants est susceptible d'induire des effets non spécifiques. C'est pourquoi j'ai d'abord mesuré la dégradation des ARN cibles en fonction de la quantité d'ARN interférants transfectés. Cette étude a été réalisée par Northern blot, 24 h après la transfection des ARN interférants.

a. Efficacités des siARN ciblant la β -globine

Le jour précédent la transfection, les cellules sont passées etensemencées à 500 000 cellules par boîte de 85 mm de diamètre. Le jour même, elles sont transfectées avec des quantités croissantes des siARN β Glo1, β Glo2 et β Glo3. 24h après, les ARN sont extraits et analysés par Northern blot avec une sonde désignée *cDNAglo* par la suite, qui est obtenue par transcription *in vitro* avec de l'UTP radiomarquée (32 P) de l'ADNc de β -globine. Les ARN d'actine sont utilisés comme contrôle interne avec la ribosonde *actineNB* et ils permettent de normaliser le signal β -globine.

Les siARN β Glo1 et β Glo2 sont très efficaces et peuvent induire la dégradation de 90% des ARNm de β -globine (cf. figure 4). Leur maximum d'efficacité est atteint dès 100 pmol de siARN pour 5×10^5 cellulesensemencées la veille. En revanche, le siARN β Glo3 est moyennement efficace car pour une quantité similaire de siARN, il reste entre 50% et 60% d'ARNm de β -globine. Lorsque la quantité de siARN β Glo3 est augmentée à 4,4 nmol, l'activité du siARN peut atteindre 70% mais elle est accompagnée d'une forte cytotoxicité, et il est probable que des doses aussi élevées induisent des effets non spécifiques.

Dans ce travail, les études mettant en jeu les siARN contre la β -globine ont été réalisées avec les doses minimales suffisantes pour obtenir une extinction maximale de l'expression de la β -globine. Aussi pour 5×10^5 cellulesensemencées la veille, 150 ou 300 pmol de siARN β Glo1 ou β Glo2 ont été utilisées.

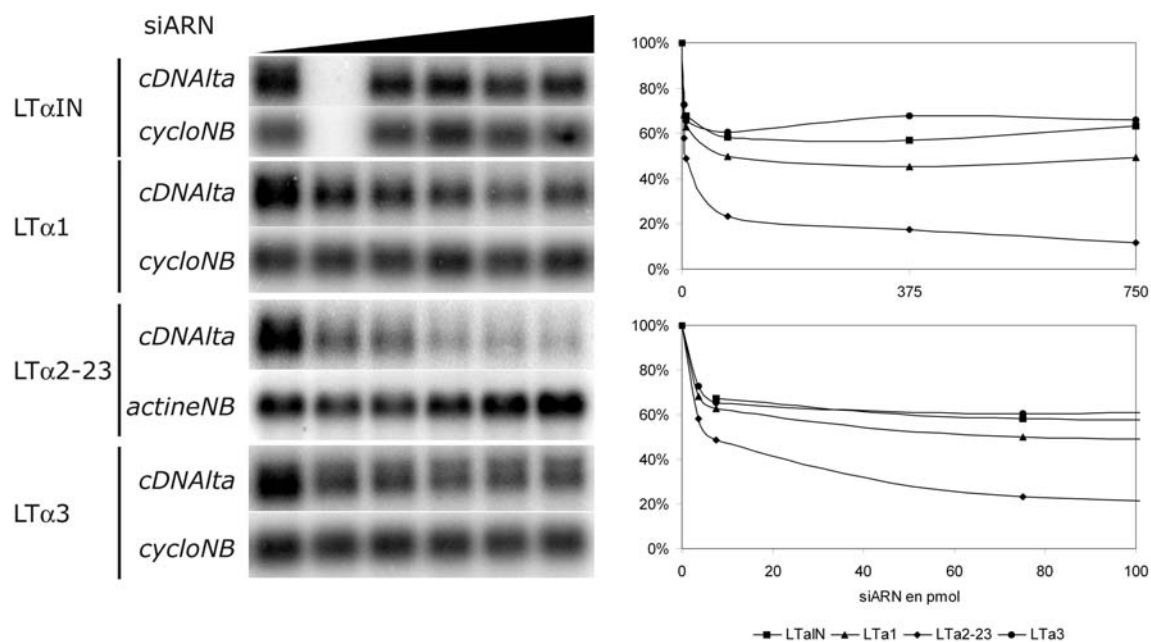


Figure 5: dose réponse à 24h des cellules tTA-LT-α aux siARN ciblant la lymphotoxine-α. Des quantités croissantes de siARN sont transfectées par phosphate de calcium dans les cellules, puis 24h après, les ARN sont extraits et analysés par Northern blot. (à gauche) La membrane est hybridée successivement avec les sondes *cDNAIta* et *cycloNB* ou *actineNB*. (à droite) Les signaux des ARNm sont quantifiés, le signal lymphotoxine-α est normalisé par rapport au signal cyclophiline ou actine. Le pourcentage d'ARNm de lymphotoxine-α résiduel est calculé en fonction de la dose 0. Le graphique du haut représente le pourcentage d'ARNm résiduel pour les toutes les quantités de siARN testées et celui du bas détaille la dose réponse pour les quantités inférieures à 100 pmoles. ■ : LTαIN, ▲ : LTα1, ◆ : LTα2-23, ● : LTα3.

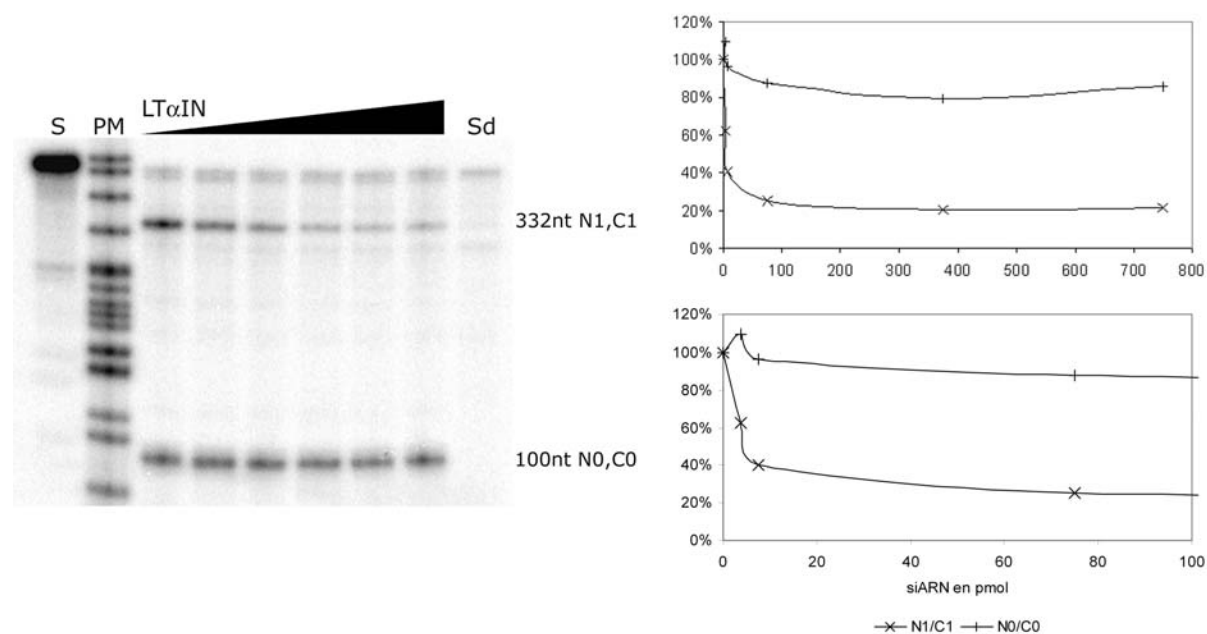


Figure 6: dose réponse des cellules tTA-LT-α au siARN LTαIN à 24h. Des quantités croissantes de LTαIN sont transfectées par phosphate de calcium dans les cellules, puis 24h après, les ARN sont extraits et analysés par cartographie à la RNase avec la sonde *LTaMAPb*. (à gauche) S : sonde non digérée. Sd : sonde digérée. Le marqueur de poids moléculaire (PM) est le vecteur Pbr digéré par *MspI* et radiomarqué. Les ARN issus de la

dose réponse sont chargés selon les quantités croissantes de siARN utilisées. Les deux protections observées correspondent aux ARN contenant l'intron 3 (N1 et C1 à 332 nt) et aux ARN totalement épissés (N0 et C0 à 100 nt). (à droite) Les signaux des ARNm sont quantifiés et les pourcentages de C1 et C0 résiduels sont calculés en fonction de la dose 0. Les graphiques représentent les pourcentages d'ARNm résiduels. +: C0/N0, x: C1/N1.

b. Efficacités des siARN ciblant la lymphotoxine- α

L'efficacité des siARN contre la lymphotoxine- α , a été analysée de la même manière. Les ARN sont ensuite analysés par Northern blot avec une sonde obtenue par marquage au dCTP radioactif avec amorçage aléatoire de l'ADNc de la lymphotoxine- α (*cDNA_{lta}*). Les ARN de cyclophiline (*cycloNB*) ou d'actine (*actineNB*) ont été utilisés comme contrôles internes à 24h, car leurs niveaux sont relativement constant et ne dépendent pas de la quantité de siARN transfectée. En revanche, lors des extractions d'ARN à différents temps, la quantité d'ARN d'actine n'était pas constante et nous avons alors utilisé l'ARN de cyclophiline comme contrôle interne.

Parmi les trois siARN qui ciblent l'exon 4 de la lymphotoxine- α , un seul, le siARN LT α 2-23, a une très bonne efficacité qui permet de dégrader plus de 85% des ARNm (cf. figure 5). Les deux autres, LT α 1 et LT α 3, dégradent au maximum 55% et 32% des ARNm, respectivement. Quant au siARN qui cible l'intron 3, il a une efficacité de 40% sur l'ensemble des ARNm de lymphotoxine- α . Comme, en principe, seuls les transcrits qui contiennent l'intron 3 sont ciblés par cet ARN interférant, (N1/C1, cf. figure 26 de l'introduction) l'analyse de la dose réponse a aussi été faite par cartographie à la RNase avec une sonde qui permet de différencier les ARN N0/C0 et N1/C1 (sonde *LTaMAPb*, cf. figure 26 dans la partie III des résultats).

La cartographie à la RNase montre que les ARNm N1/C1 diminuent de façon dose dépendante lorsque le siARN LT α IN est transfecté (cf. figure 6). La dégradation maximale des ARNm contenant l'intron 3 par LT α IN est de 80%, cet siARN est donc très efficace sur ses cibles (N1/C1). En revanche, la cartographie indique une diminution d'environ 20% pour les ARN N0/C0, une telle différence est à la limite de la précision expérimentale, mais pourrait correspondre à une activité nucléaire du siARN LT α IN (voir la discussion de la troisième partie des résultats).

Ces études de dose réponse montrent que les siARN ont atteint leur efficacité maximale dès 100 pmol pour 5×10^5 cellulesensemencées la veille de la transfection. Les siARN ciblant la lymphotoxine- α ont donc été utilisés par la suite à des doses de 150 ou 300 pmol

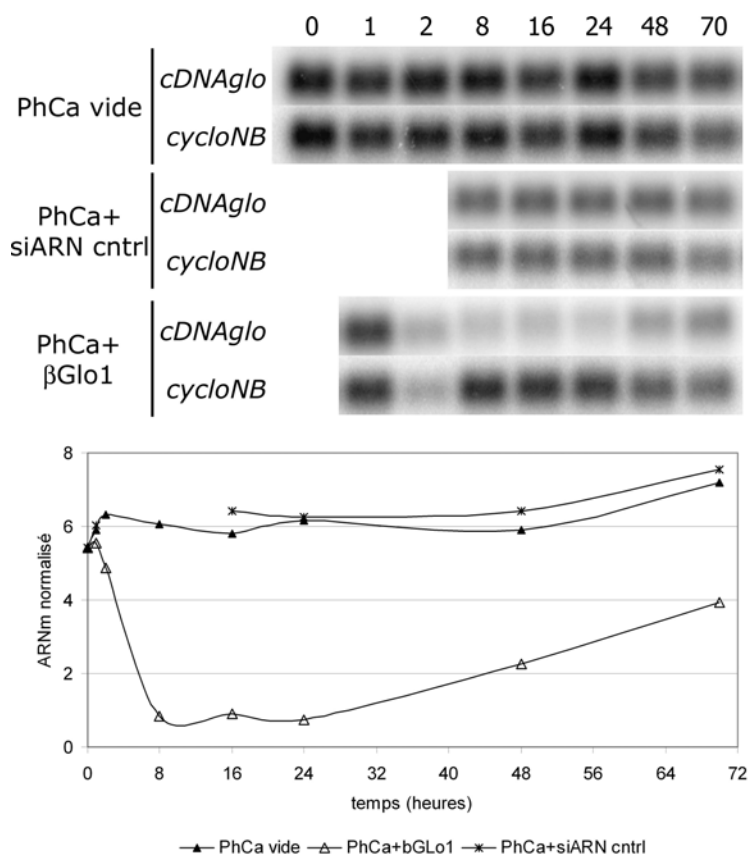


Figure 7: mise en place de l'effet du siARN β Glo1. Les cellules tTA- β -Glo sont transfectées avec 150 pmol de β Glo1 ou de siARN contrôle ou sans oligo et elles sont lysées à différents temps après la transfection (0, 1, 2, 8, 16, 24, 48, 70 heures). Leurs ARN sont extraits et analysés par Northern blot avec les sonde *cDNAglo* et *cycloNB* (à gauche). Les signaux β -globine sont normalisés avec les signaux cyclophiline et sont représentés en fonction du temps (à droite). Le point 0 est commun aux trois courbes car il correspond à des cellules qui ont été lysées juste avant la transfection.

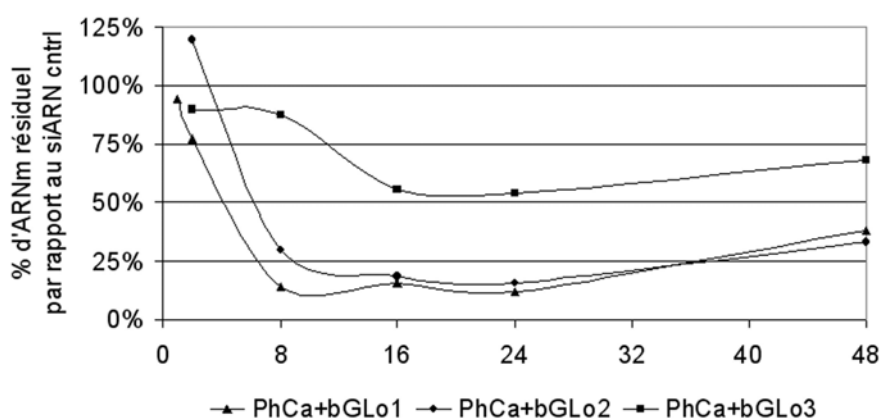


Figure 8: mise en place de l'effet des siARN ciblant la β -globine. Les cellules tTA- β -Glo sont transfectées avec 150 pmol de β Glo1 ou β Glo2 ou β Glo3 ou de siARN contrôle et elles sont lysées à différents temps après la transfection (1, 2, 8, 16, 24, 48 heures). Leurs ARN sont extraits et analysés par Northern blot avec les sondes *cDNAglo* et *cycloNB*. Les signaux β -globine sont normalisés avec les signaux cyclophiline. Pour chaque siARN et chaque temps le pourcentage d'ARNm restant dans les cellules traitées

avec les siARN spécifiques de la β -globine sont calculés par rapport aux ARN des cellules ayant reçu le siARN contrôle.

pour obtenir une extinction maximale tout en minimisant les effets sur les cibles partiellement homologues.

4. Mise en place et durée de l'effet des siARN

Dans cette étude de la cinétique de dégradation des ARNm par les siARN, il était important de déterminer en premier lieu l'intervalle de temps où l'efficacité des siARN est maximale afin de définir la période pendant laquelle la réaction de dégradation est à l'équilibre. J'ai donc évalué l'effet des siARN sur les ARNm de β -globine et de lymphotoxine- α à différents temps après la transfection.

a. Cinétique de la diminution des ARNm de β -globine induite par les siARN

La cinétique de l'effet des trois siARN ciblant la β -globine a été étudiée dans la lignée tTA- β -glo. La veille du jour de la transfection, les cellules sontensemencées à un million de cellules par boîte pour les temps inférieurs à 8h ou à 5×10^5 pour la période 16h à 70h. Le lendemain, elles sont transfectées avec soit 150 pmol de siARN β Glo1, soit la même quantité d'un siARN qui n'a pas de cible dans la cellule, soit un précipité de phosphate de calcium vide. Puis aux temps 1h, 2h, 8h, 16h, 24h, 48h et 70h, les cellules sont lysées et les ARN extraits. La diminution des ARNm de β -globine est quantifiée par Northern blot avec les ribosondes *cDNAglo* et *cycloNB*.

La transfection avec un siARN contrôle n'induit pas de diminution significative des ARNm de β -globine par rapport à une transfection avec un précipité de phosphate de calcium vide (cf. figure 7), donc afin de ne pas multiplier les contrôles lors de l'analyse de la cinétique de l'effet des deux autres siARN, j'ai utilisé comme échantillons de références des cellules transfectées avec un siARN contrôle. Les cellules ont été transfectées avec 150 pmol de β Glo2 ou de β Glo3 ou de siARN contrôle, puis elles ont été lysées 2h, 8h, 16h, 24h et 48h après. Leurs ARN ont été aussi analysés par Northern blot avec les sondes *cDNAglo* et *cycloNB*.

L'analyse comparative des trois siARN ciblant la β -globine est présentée Figure 8. Pour les trois siARN, l'inhibition est maximale à 16h et à 24h après la transfection, ce qui suggère

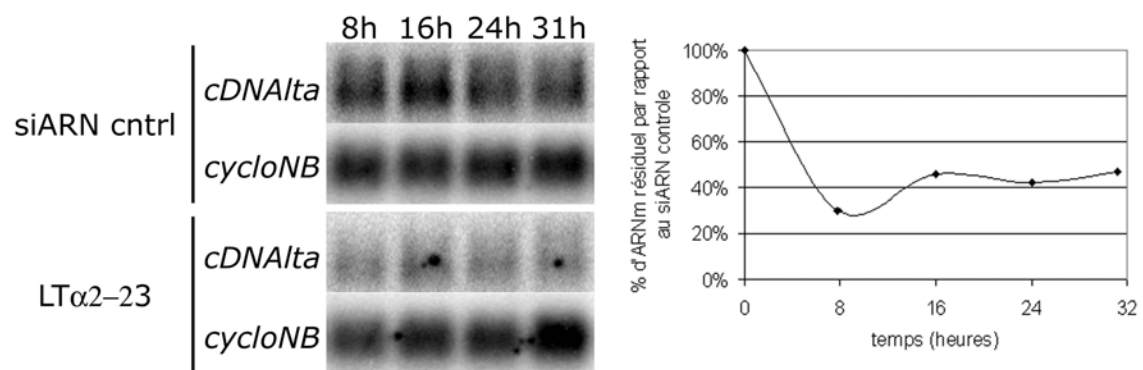


Figure 9: évolution de la dégradation de l'ARNm de lymphotoxine- α induite par LT α 2-23. Les cellules ont été transfectées avec 300 pmol de LT α 2-23 ou d'un siARN contrôle et la diminution de l'ARNm de lymphotoxine- α est évaluée par Northern blot comme dans la figure 8.

que la réaction de dégradation est à l'équilibre à ces temps. Pour le siARN β Glo1, l'inhibition se met en place rapidement et est détectable dès la deuxième heure suivant la transfection (-20%), elle atteint son maximum à 8h. Le siARN β Glo2 a déjà une bonne efficacité à 8h (-70%) même si ce n'est pas son optimum. En revanche, la diminution des ARNm due à β Glo3 n'est pas encore significative à 8h ce qui indique que sa mise en place est plus lente que celle des deux autres siARN. A 48h après la transfection, les effets des trois siARN commencent à diminuer: β Glo1 et β Glo2 ne dégradent plus qu'entre 60 et 70% des ARNm au lieu de 85-90% et β Glo3 plus que 30% au lieu de 50%. Il est important de noter que les études de dose réponse ont été faites à 24 h et donc que les doses utilisées n'ont pas été choisies pour prolonger l'inhibition de manière importante au-delà de cette période.

Ces données cinétiques indiquent que la diminution des ARNm est maximale à 16h et 24h après la transfection et que l'étude de la réaction de dégradation à l'équilibre doit se faire à ces temps. D'autre part, nous avons aussi observé que la mise en place était plus rapide pour β Glo1 et β Glo2 que pour β Glo3.

b. Cinétique de la diminution des ARNm de lymphotoxine- α induite par les siARN

L'étude de la diminution des ARNm de β -globine induite par les siARN a montré que leur efficacité pouvait être maximale sur une période comprise entre 8h et 24h après la transfection, les résultats dépendant de l'activité du siARN. Nous avons étendu cette analyse à la mise en place de la dégradation des ARNm de la lymphotoxine- α par le siARN le plus efficace (LT α 2-23). Les cellules tTA-LT- α ont donc été transfectées avec 300 pmol de LT α 2-23 pour 5×10^5 cellulesensemencées, puis elles sont lysées à 8h, 16h et 24h après. Les ARN sont extraits et analysés par Northern blot avec les sondes *cDNA α ta* et *cycloNB*.

La cinétique de la dégradation des ARNm de lymphotoxine- α est comparable à celle des ARNm de β -globine (cf. figures 8 et 9). En dépit d'une plus faible efficacité maximale par rapport à celle mise en évidence dans la dose réponse, le siARN LT α 2-23 induit, dès 8h après la transfection, la diminution maximale des ARNm de lymphotoxine- α et celle-ci perdure au moins jusqu'à 32h. Ces résultats suggèrent que la réaction de dégradation est à l'équilibre aux temps 16h et 24h et que la mise en place et la durée de l'effet des siARN ne dépend pas de manière importante de l'ARNm ciblé.

5. Discussion

Dans cette première partie, la méthode de transfection par le phosphate de calcium a été sélectionnée pour introduire les siARN synthétiques dans les cellules. Pour les deux gènes étudiés, nous avons choisi des siARN ciblant différentes séquences et mesuré leur capacité d'inhibition ainsi que leur cinétique d'activité. Nous disposons donc de trois siARN ciblant l'ARNm de β -globine et de quatre siARN pour la lymphotoxine- α qui ont des efficacités diverses allant de 30 à 90% de réduction des messagers pour des quantités de l'ordre de la centaine de pmol pour 5×10^5 cellulesensemencées. Aux doses utilisées, tous les siARN présentent leur efficacité maximale à 16h et à 24h après leur transfection.

La comparaison des deux techniques de transfection, par Oligofectamine ou par phosphate de calcium, indique que 24h après la transfection, l'effet du siARN dirigé contre Eg5 est deux fois plus élevé dans le cas du phosphate de calcium. De plus avec la technique par précipitation, l'effet s'intensifie à 48h tandis qu'il a disparu dans les cellules ayant été transfectées par les lipides cationiques. Ces deux observations peuvent s'expliquer par la capacité de la précipitation au phosphate de calcium à transfecter un plus grand nombre de cellules avec une plus grande quantité de siARN par cellule par rapport à l'Oligofectamine. D'autre part, la dégradation de 90% des messagers de β -globine par β Glo1 indique que la technique du phosphate de calcium permet de transfecter au minimum 90% des cellules NIH 3T3. On peut donc considérer que les siARN sont actifs dans une très grande majorité des cellules. De plus des études en cytométrie, non rapportées ici, ont montré une réponse homogène des cellules en terme d'inhibition de l'expression. Les populations cellulaires transfectées par phosphate de calcium sont donc essentiellement homogènes, et les données obtenues sur les ARN extraits de ces populations sont donc représentatives de l'interférence dans les cellules individuelles.

Tous les siARN ciblant la β -globine et le siARN LT α 2-23 ont été synthétisés avec des extrémités 3' dTdT et leurs efficacités d'inhibition varient de 50 à 90%. Les autres oligos possèdent des extrémités UU et induisent aussi des dégradations diverses de leurs cibles de 30% à 80%. Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la nature des extrémités 3' et l'efficacité des siARN. Cette observation est en accord avec la découverte récente que l'extrémité 3' du brin servant de séquence guide à RISC ne participe pas à la reconnaissance de la cible et est insérée dans une poche de la protéine Ago2 qui peut aussi bien accueillir des déoxyribonucléotides que des ribonucléotides (Lingel, Simon et al. 2003).

L'étude de la mise en place de la dégradation des messagers de β -globine et de lymphotoxine- α montre que tous les siARN testés ont une activité maximale à 16h et à 24h après transfection. Cependant cette dégradation maximale est atteinte plus ou moins rapidement en fonction du siARN. Le délai de mise en place est plus long pour le siARN β Glo3 qui est aussi le moins efficace. Deux mécanismes peuvent contribuer à cette cinétique plus lente. D'une part, la formation de complexes RISC à partir de β Glo3 pourrait être plus lente qu'avec β Glo1 ou β Glo2 induisant ainsi un retard dans la mise en marche de l'interférence. D'autre part, l'activité nucléasique des complexes pourrait être plus lente et ainsi retarder la mise en place de l'inhibition. L'étude cinétique de l'activité de RISC qui est présentée dans la deuxième partie permet de mieux comprendre cette observation.

RESULTATS ET DISCUSSION

partie II

**Etude de la cinétique de dégradation
des ARNm induite par les siARN
dans les cellules de mammifères**

partie II : Etude de la cinétique de dégradation des ARNm induite par les siARN dans les cellules de mammifères

1. Mesure et caractérisation des vitesses apparentes de dégradation des ARNm de β -globine.

Le premier volet de ce travail porte sur la mesure *in vivo* (dans des cellules de mammifère en culture) de la vitesse de dégradation des ARNm en présence de siARN. Dans cette étude, j'ai utilisé comme cible les ARNm de la β -globine contre lesquels nous disposons de trois siARN de différentes efficacités. Les études préliminaires sur ces siARN (β Glo1, β Glo2 et β Glo3) ont montré que leurs activités se mettent progressivement en place et qu'elles sont maximales à 16h et à 24h après la transfection. Pour que l'étude de la dégradation des ARNm ne reflète que la coupure par RISC et non pas les événements qui la précèdent, comme l'incorporation des siARN dans les cellules ou l'assemblage du complexe, nous avons choisi de situer l'analyse aux temps où l'activité des siARN a atteint un équilibre, c'est à dire à 16h ou à 24h après la transfection.

La démarche expérimentale pour mesurer la cinétique de dégradation des messagers repose sur l'arrêt spécifique de la transcription du gène β -globine par la tétracycline. Cette réponse intervient en quelques minutes après l'addition de tétracycline au milieu de culture. Dans toutes les études cinétiques sur l'ARNm de β -globine, les cellules ont été ensemencées à 5×10^5 par boîte la veille et transfectées avec 150 pmol de siARN par le phosphate de calcium. Puis après 16h ou 24h, le milieu de culture des cellules est remplacé par du milieu contenant 1 μ g/ml de tétracycline. A la suite de cet ajout, les cellules sont lysées à différents intervalles de temps pendant les 7 à 8h suivantes (cf. figure10).

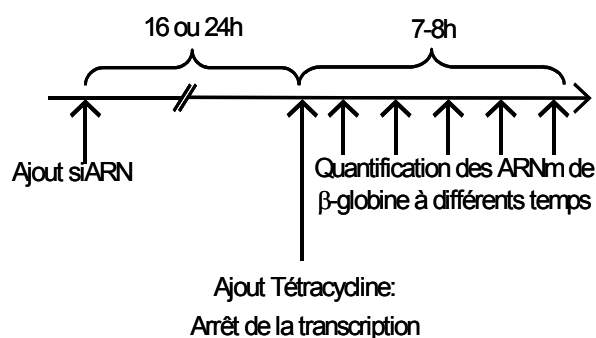


Figure 10: démarche expérimentale pour mesurer la vitesse de la dégradation des ARNm induite par les siARN. Les siARN sont transfectés au temps 0, puis 16h ou 24h après, la transcription est arrêtée en ajoutant 1 μ g/ml de tétracycline dans le milieu. A la suite de cet ajout, les cellules sont lysées à différents temps pendant les 7 à 8h suivantes.

Les ARN sont ensuite analysés soit par Northern blot, soit par cartographie à la RNase. La sonde utilisée dans les deux méthodes d'analyse est synthétisée par la transcription *in vitro* de la même matrice qui correspond à un fragment de l'ADNc de la β -globine (*cDNAglo*). Comme la région de l'ARNm mature qui va s'hybrider à cette sonde contient les trois sites de coupure correspondants aux siARN, elle permet de mesurer la réaction de clivage du messager. Les deux méthodes d'analyse donnent des résultats similaires (cf. figures 13 et 14). Les signaux β -globine sont normalisés avec les signaux des ARN de cyclophiline, qui sont obtenus soit par réhybridation des membranes de Northern blot avec la sonde *cycloNB*, soit par l'ajout d'une sonde protégeant un fragment de l'ARNm de cyclophiline dans les cartographies à la RNase (*cycloCARTO*).

Cette démarche expérimentale a été appliquée à l'étude des trois siARN dirigés contre la β -globine et pour chacun de ces siARN, la cinétique de dégradation a été analysée à 16h et à 24h après la transfection. Dans tous les cas (cf figure 11 à 17), les données expérimentales peuvent être représentées par une courbe exponentielle. Ainsi, en apparence, la décroissance des ARNm obéit à une cinétique d'ordre 1. Il est donc possible de caractériser cette décroissance par une demi-vie (intervalle de temps nécessaire pour dégrader 50% de la quantité de substrat), celle-ci ne dépend pas de la concentration initiale en substrat. Dans les cellules qui ont été transfectées avec les siARN contrôle, les ARNm de globine diminuent selon des demi-vies comprises entre 315 min et 693 min (cf. figure 11 à 17 et tableau 3). Les raisons de cette variabilité entre expériences n'ont pas été identifiées. C'est pourquoi dans toutes nos analyses, la demi-vie en présence des siARN est comparée à celle de la population contrôle au sein de la même expérience (ayant reçu un siARN non relevant). Lorsque les cellules sont traitées avec l'un des trois siARN contre la β -globine, les ARNm ont une demi-vie plus courte que celle des témoins. Par exemple, 16h après la transfection, les demi-vies des ARNm diminuent de 693 min à 266 min avec β Glo1, de 315 à 107 avec β Glo2 et de 693 à 289 min avec β Glo3 (cf. figures 11, 13, et 16 et tableau 3). 24h après la transfection, ces demi-vies sont réduites de 578 min à 257 min pour β Glo2 et de 433 min à 277 min pour β Glo3. (cf. figures 12, 15 et 17 et tableau 3). Donc les siARN induisent une accélération de la dégradation des ARNm. C'est dans le cas de β Glo1 à 24 h que l'effet du siARN est le plus faible, la demi-vie passant de 347 min à 257 min.

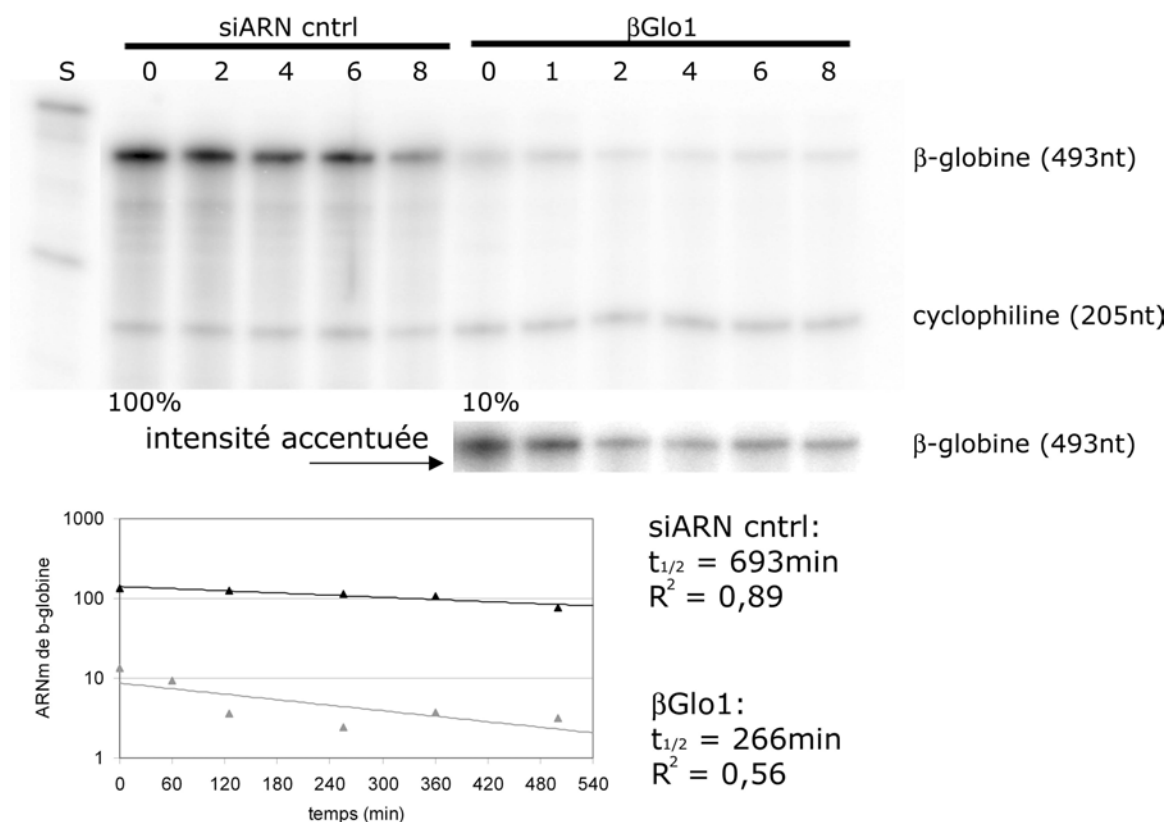


Figure 11: cinétique de la dégradation de l'ARN de β -globine 16h après la transfection de β Glo1. Le siARN contrôle ou β Glo1 est transfecté dans les cellules tTA- β -Glo et 16h après, le milieu de culture est remplacé par du milieu contenant 1 μ g/ml de tétracycline. A partir de cet ajout, les cellules sont lysées à différents temps pendant 8h. Les ARN sont extraits et analysés par cartographie à la RNase avec un mélange des sondes contre les ARNm de β -globine et de cyclophiline (*cDNAglo* et *cycloCARTO*). La piste S a été chargée avec le mélange des 2 sondes utilisées et les chiffres au-dessus de chaque piste correspondent aux différents temps de lyse des cellules, en heures. L'encart représente les signaux globine des échantillons traités avec β Glo1 après augmentation du contraste. L'efficacité du siARN est évalué au moment de l'ajout de la tétracycline (temps 0) par le pourcentage résiduel de signal dans les cellules transfectées avec β Glo1. Le graphe représente les signaux normalisés de globine des échantillons traités avec le siARN contrôle ($\blacktriangle$) ou avec β Glo1 ($\blacktriangle$). Les courbes de régression sont des courbes exponentielles obtenues avec le logiciel Excel (Microsoft[®]), dont les caractéristiques sont détaillées à droite du graphe.

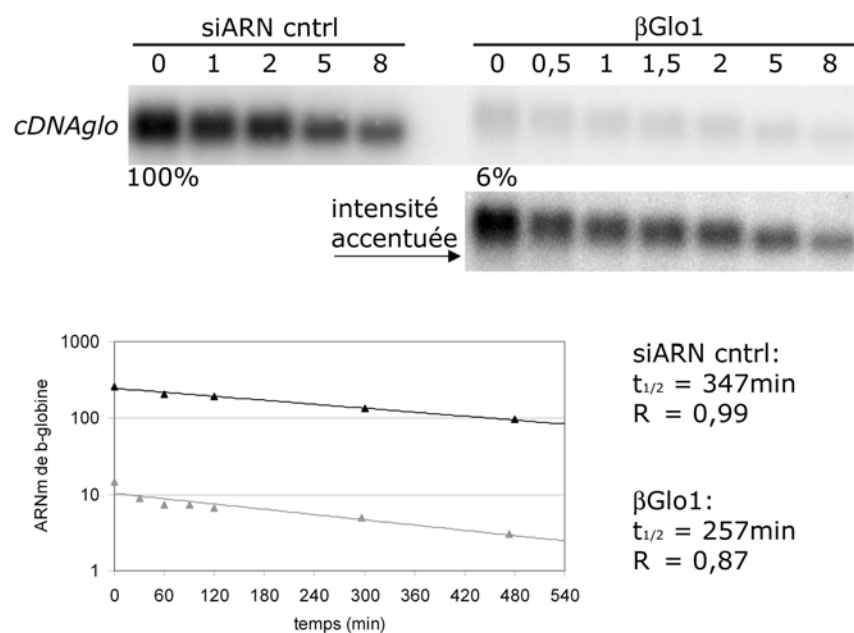


Figure 12: cinétique de la dégradation de l'ARN de β -globine 24h après la transfection de β Glo1. Le siARN contrôle ou β Glo1 est transfecté dans les cellules tTA- β -Glo et 24h après, le milieu de culture est remplacé par du milieu contenant 1 μ g/ml de tétracycline. A partir de cet ajout, les cellules sont lysées à différents temps pendant 8h. Les ARN sont extraits et analysés par Northern blot avec une sonde contre l'ARNm de β -globine (*cDNA_{glo}*). Les chiffres au-dessus de chaque piste correspondent aux différents temps de lyse de cellules, en heures. L'encart représente les signaux globine des échantillons traités avec β Glo1 après augmentation du contraste. L'efficacité du siARN est évalué au moment de l'ajout de la tétracycline (temps 0) par le pourcentage résiduel de signal dans les cellules transfectées avec β Glo1. Le graphe est obtenue selon la méthode présentée dans la figure précédente (siARN contrôle ($\blacktriangle$) ou avec β Glo1 ($\triangle$)).

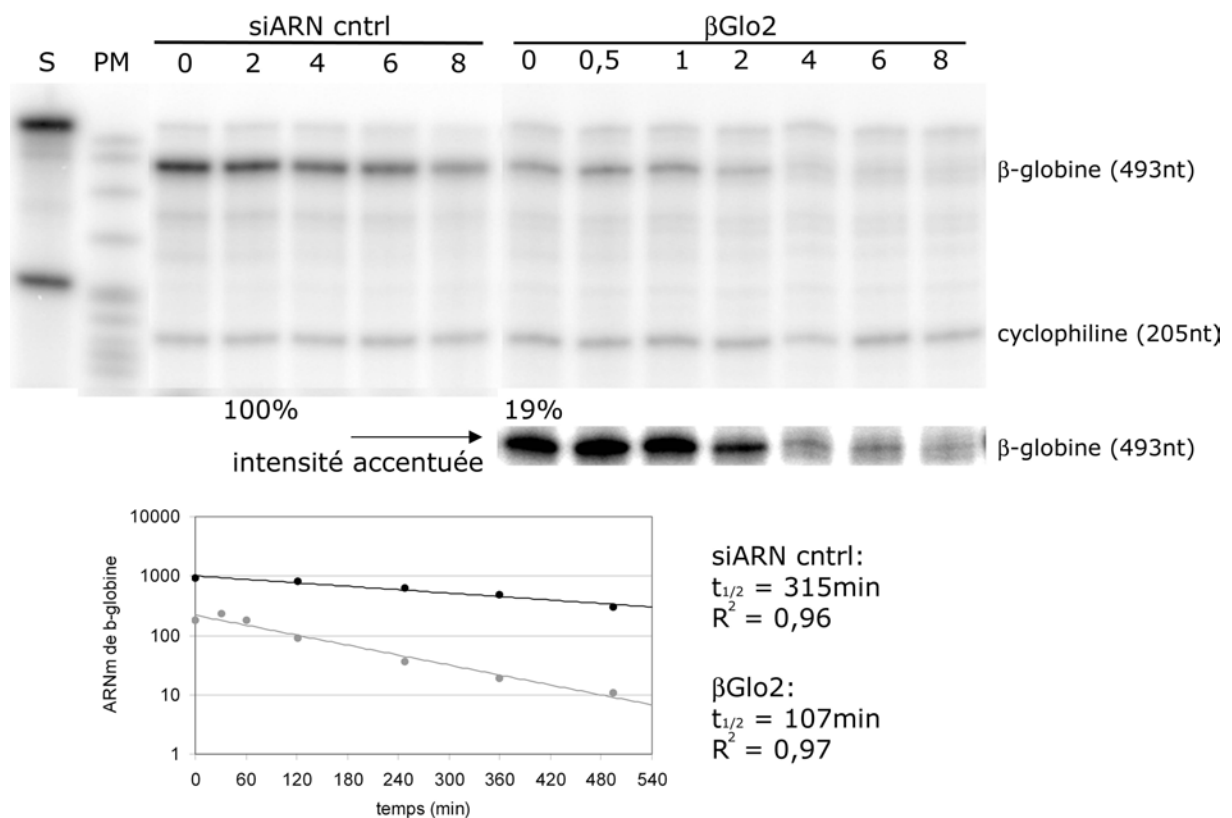


Figure 13: Analyse par cartographie à la RNase de la cinétique de la dégradation de l'ARN de β -gobine 16h après la transfection de β Glo2. Le protocole expérimental est identique à celui de la figure 11. La piste PM a été chargée avec un marqueur de poids moléculaire qui est constitué du plasmide Pbr digéré par MspI et radiomarqué. Le graphe représente les signaux normalisés des ARN de globine (siARN contrôle (●) ou avec β Glo2 (●)).

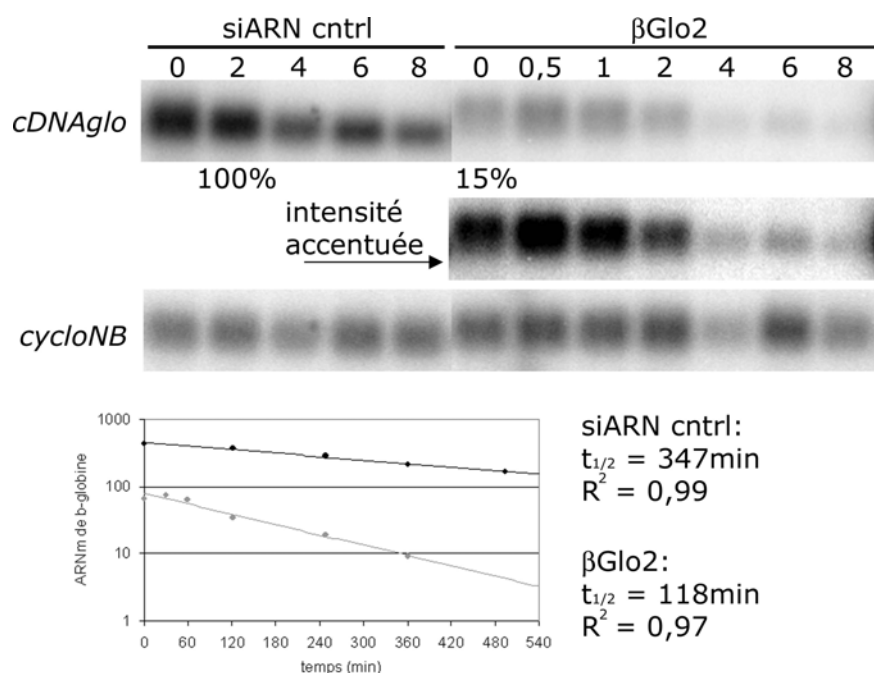


Figure 14: Analyse par Northern blot de la cinétique de la dégradation de l'ARN de β -globine 16h après la transfection de β Glo2. Les mêmes échantillons que ceux de la figure 13 ont été analysés par Northern blot avec les sondes *cDNAglo* et *cycloNB*. Le Northern blot et la cartographie à la RNase donnent des résultats similaires. Le graphe représente les signaux normalisés des ARN de globine (siARN contrôle (●) ou avec β Glo2 (●)).

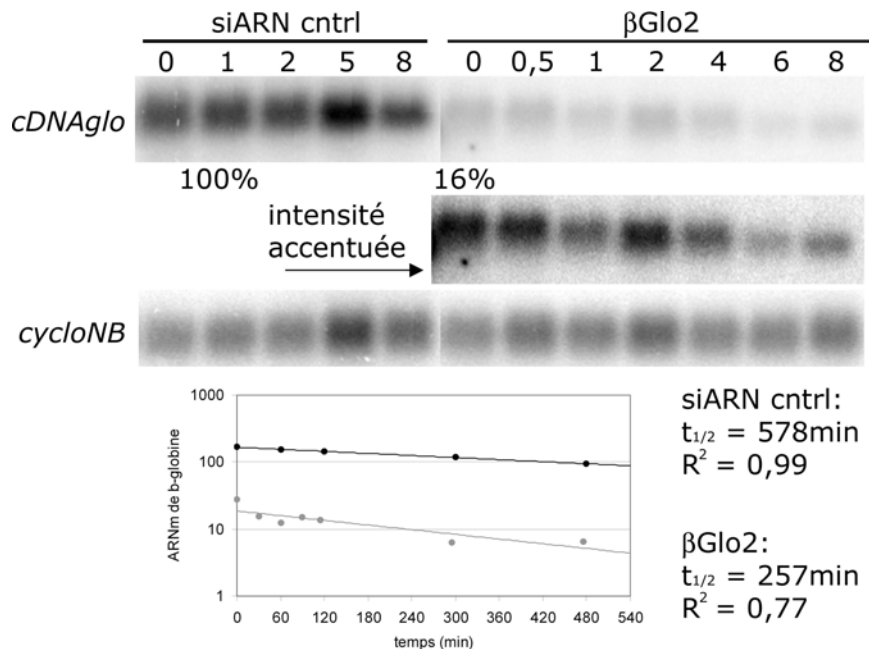


Figure 15: cinétique de la dégradation de l'ARN de β -globine 24h après la transfection de β Glo2. Le protocole expérimental est identique à celui de la figure 12. Les ARN sont analysés par Northern blot avec les sonde *cDNAglo* et *cycloNB*. Le graphe représente les signaux normalisés des ARN de globine (siARN contrôle (●) ou avec β Glo2 (●)).

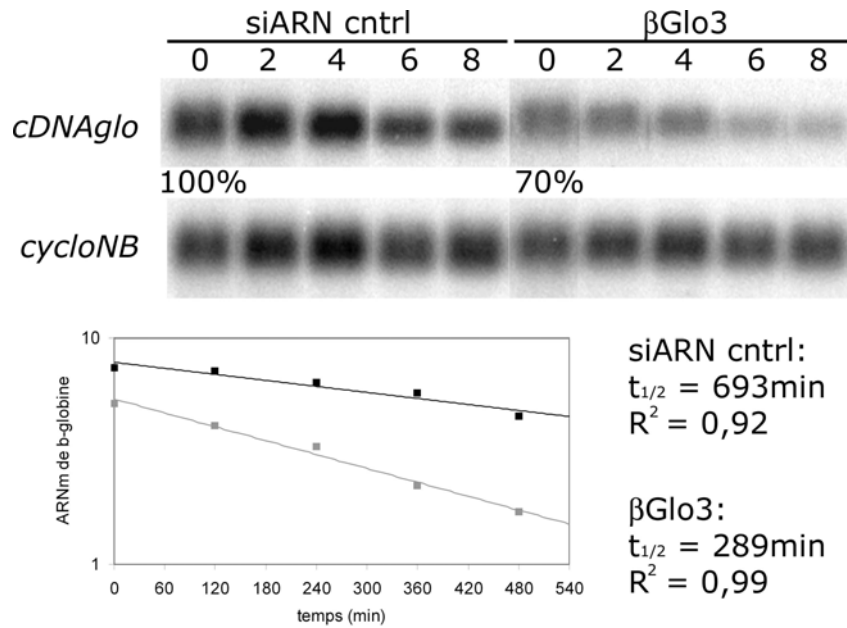


Figure 16: cinétique de la dégradation de l'ARN de β -globine 16h après la transfection de β Glo3. Le protocole expérimental est identique à celui de la figure 11 . Les ARN sont analysés par Northern blot avec les sonde *cDNA_{glo}* et *cycloNB*. Le graphe représente les signaux normalisés des ARN de globine (siARN contrôle (■) ou avec β Glo3 (■)).

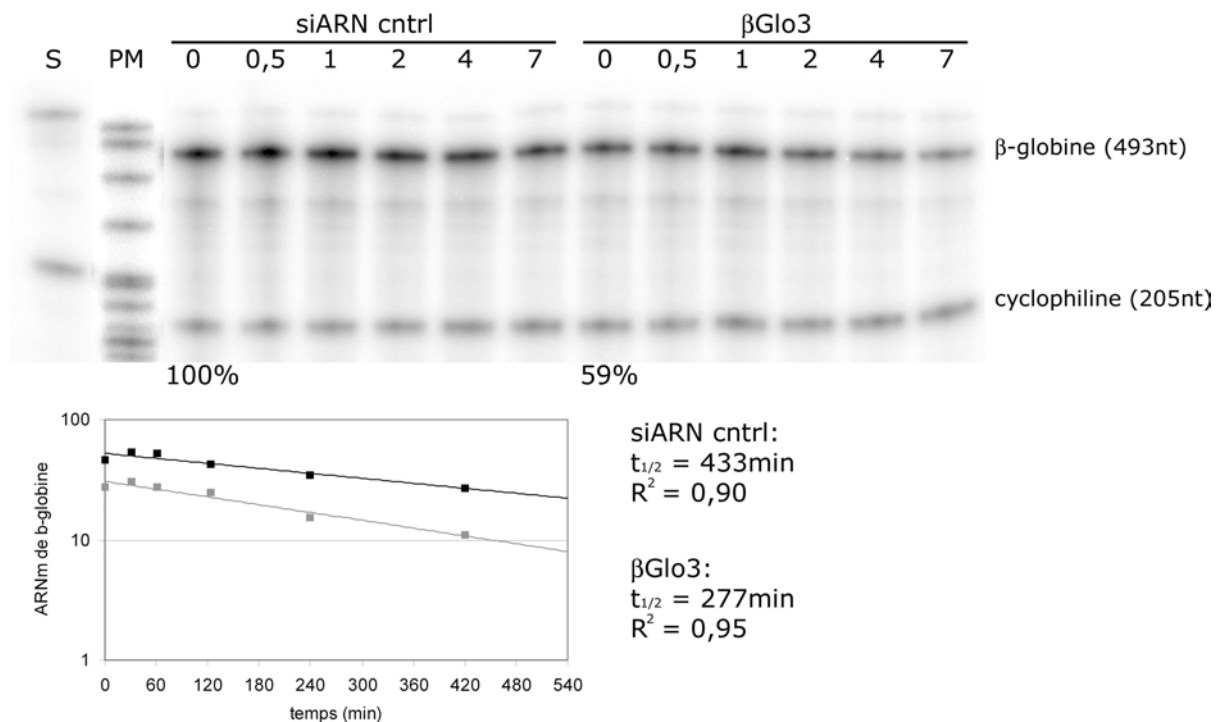


Figure 17: cinétique de la dégradation de l'ARN de β -globine 24h après la transfection de β Glo3. Le protocole expérimental est identique à celui de la figure 12 . Les ARN sont analysés par Northern blot avec les sonde *cDNA_{glo}* et *cycloNB*. Le graphe représente les signaux normalisés des ARN de globine (siARN contrôle (■) ou avec β Glo3 (■)).

Tableau 3: caractéristiques cinétiques de la dégradation des ARNm de β -globine induite par les siARN.

^adéstabilisation des ARNm calculée grâce au rapport des demi-vies $t_{1/2}$ (cntrl) / $t_{1/2}$ (β Glo).

^ble pourcentage restant prédit représente la population d'ARNm qui n'est pas dégradée théoriquement, il est calculé selon la formule: $100/\text{facteur de déstabilisation}$.

^cle pourcentage restant observé est la fraction d'ARNm de globine qui est observée au temps 0 de la cinétique de décroissance, il correspond à l'efficacité du siARN.

		siARN cntrl		siARN contre la β -globine		facteur de déstabilisation ^a	% restant prédit ^b	% restant observé ^c
		R ²	$t_{1/2}$	R ²	$t_{1/2}$			
β Glo1	16h	0,89	693	0,56	266	2,60	38%	10%
	24h	0,99	347	0,87	257	1,35	74%	6%
β Glo2	16h	0,96	315	0,97	107	2,94	34%	19%
	24h	0,99	578	0,77	257	2,25	44%	16%
β Glo3	16h	0,92	693	0,99	289	2,40	42%	70%
	24h	0,90	433	0,95	277	1,56	64%	59%

Afin de déterminer si notre description des résultats rend compte de l'inhibition de l'expression observée, j'ai comparé la déstabilisation causée par le changement de demi-vie des ARNm à la diminution des messagers à l'équilibre. Le rapport entre les demi-vies dans les cellules transfectées avec les siARN spécifiques de la globine et celles des cellules témoin permet de calculer un facteur de déstabilisation pour les ARNm qui sont ciblés par les siARN. Par exemple la demi-vie de la β -globine est réduite de 693 à 267 min, 16h après la transfection de β Glo1, ce qui reflète une déstabilisation de $693 / 267 = 2,6$. Pour que la comparaison entre la déstabilisation et l'efficacité des siARN soit plus aisée, le facteur de déstabilisation est utilisé pour calculer le pourcentage d'ARNm qu'il reste théoriquement à la suite de ce changement de demi-vie. Ainsi une déstabilisation d'un facteur 2,6 se traduit par la réduction d'une population de 100 molécules d'ARN à $100 \div 2,6 = 38$, ce qui permet de prédire qu'à l'équilibre l'accumulation d'ARNm serait réduite à 38% après le changement de demi-vie.

Comme il apparaît dans le tableau 3, les demi-vies obtenues avec les siARN β Glo1 et β Glo2 ne sont pas en accord avec l'efficacité de l'interférence observée. En effet, bien que les demi-vies soient plus courtes après traitement avec les siARN spécifiques de la globine, elles ne traduisent qu'une faible déstabilisation des messagers qui ne suffit pas à expliquer la diminution de leur accumulation. Pour β Glo1, les demi-vies à 16h et à 24h prédisent des pourcentages d'ARN résiduels de 38% et 74% respectivement, ce qui ne reflète pas les pourcentages réellement observés de 10% et 6% (cf. tableau 3). De même pour β Glo2, les données cinétiques indiquent qu'il devrait rester 34% et 44% après 16h et 24h de traitement aux siARN, or il reste respectivement 19% et 16% (cf. tableau 3). Donc pour les deux siARN très efficaces, les demi-vies observées dans les études de décroissance sont trop longues pour refléter la dégradation par RISC. Par contre, pour le siARN β Glo3 le même raisonnement conduit à une prédiction de l'inhibition plus forte que celle observée, avec 42 % d'ARNm résiduel alors que le pourcentage observé est de 70% (cf. tableau 3). Dans ce cas, la demi-vie observée est trop rapide pour expliquer la faible efficacité du siARN. Finalement, il n'y a que pour les données β Glo3 à 24 h que la demi-vie globale correspond avec l'inhibition observée.

Il apparaît donc que l'analyse utilisée ne peut rendre compte de l'inhibition de l'expression, bien que la représentation des données par une décroissance exponentielle soit satisfaisante (voir les coefficients de corrélation indiqués sur les figures 12 à 17). Cette difficulté illustre qu'une description des données doit s'appuyer sur une modélisation des processus sous-jacents. En effet, en parallèle de la coupure par RISC, les ARNm sont aussi

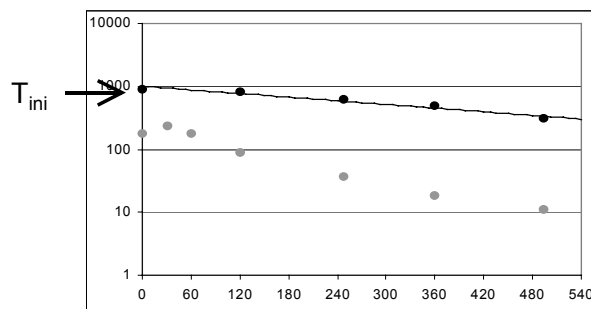
soumis aux mécanismes qui définissent la demi-vie « normale » de ces ARN. De plus, on peut légitimement supposer qu'une petite partie des ARNm échappent à l'interférence, par exemple parce qu'ils sont dans des cellules qui n'ont pas été transfectées par les siARN. Nous avons donc réanalysé nos cinétiques en prenant en compte l'existence possible de deux populations.

2. Méthode de calcul des vitesses de dégradation des ARNm de β -globine par RISC

Pour déterminer les constantes cinétiques de RISC, les courbes de décroissance obtenues précédemment ont été décomposées en deux populations distinctes : celle des ARNm soumis à l'interférence et celle des ARNm qui y échappent. Les paramètres cinétiques de la dégradation normale sont connus grâce aux ARN des cellules témoins. Une telle analyse nécessite donc l'introduction d'un paramètre supplémentaire, qui définit la répartition des ARNm entre ces deux populations, par commodité nous utiliserons le pourcentage d'ARNm qui échappent à l'interférence : α . Ce paramètre n'est pas connu a priori même si on peut l'estimer à partir des données. En effet, si l'on suppose que la dégradation des ARNm induite par l'interférence est rapide, six heures après l'arrêt de la transcription il ne devrait plus rester que les ARNm qui ont échappé à l'interférence. Pour ces analyses nous avons donc utilisé plusieurs valeurs pour α et déterminé pour chacune d'elle la demi-vie des ARNm soumis à l'interférence. Dans un deuxième temps, les demi-vies ainsi obtenues ont été comparées avec l'efficacité de l'inhibition et le couple vitesse de dégradation / pourcentage d'ARNm ciblé par RISC qui rend le mieux compte de l'inhibition est retenu. La méthode d'analyse des données cinétiques repose sur la soustraction de la population d'ARNm dégradée normalement, de la population des messagers totale. La figure 18 illustre ce calcul avec l'analyse de la cinétique de décroissance à 16h après la transfection de β Glo2:

- Etape 1: les ARNm des cellules témoins ont une demi-vie normale qui a pour constante de dégradation $K_{d \text{ norm}} = 0,0022$ et la quantité d'ARNm au temps 0 est utilisée comme référence (T_{ini}).
- Etape 2: si on fixe à 5% la proportion d'ARNm dégradée normalement dans les cellules traitées avec β Glo2 ($\alpha = 5\%$), la quantité d'ARNm résultant de cette dégradation est à chaque temps de la cinétique de:

$$5\% \times T_{ini} \times e^{-0,0022 \times t}$$



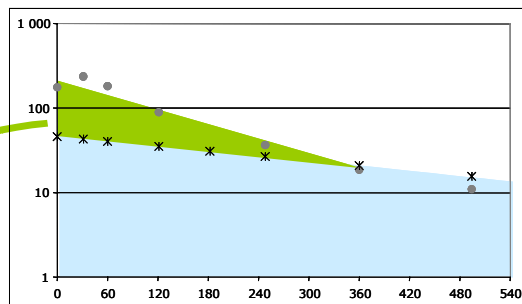
1) à partir de la cinétique de dégradation des ARNm témoin (•):

$$y = 1004,5e^{-0,0022x}$$

$$R^2 = 0,9622$$

→ définition du Kd normal Kd=0,0022

→ détermination de T_{ini} : $T_{ini} = 920$



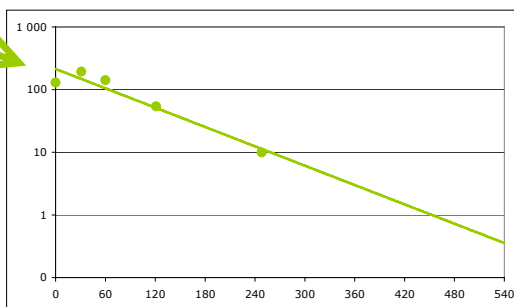
2) soustraction de 5% d'ARNm dégradés normalement des ARNm des cellules + β Glo2
 $\alpha = 5\%$

aire bleue: ARNm dégradés selon Kd=0,0022

aire verte: ARNm dégradés par RISC

• ARNm des cellules + β Glo2

$$* = 5\% \times V_{ini} \times e^{(-0,0022)t}$$



3) calcul de la constante de dégradation de RISC

$$y = 213,12e^{-0,0118x}$$

$$R^2 = 0,9262$$

→ $Kd_{RISC} = 0,0118$

→ $t_{1/2} = \ln(2) / 0,0118 = 59 \text{ min}$

4) répétition du calcul pour les différentes valeurs de α entre 1 et 12%

α	12	10	8	7	6	5	2,5	1
$t_{1/2} \text{ RISC}$	29	49	64	70	47	59	76	99

Figure 18: méthode d'analyse des cinétiques de dégradation en deux composantes. La figure présente les étapes de calcul et de validation des constantes cinétiques de RISC pour le cas de la cinétique obtenue avec β Glo2, 16h après la transfection. Les étapes 1 à 4 détaillent le calcul des constantes de dégradation de RISC pour un α fixé. Les points 5 et 6 expliquent les deux critères de validation des constantes calculées précédemment.

Les valeurs correspondantes sont représentées sur la figure 18 où la population dégradée normalement est symbolisée par la surface bleue.

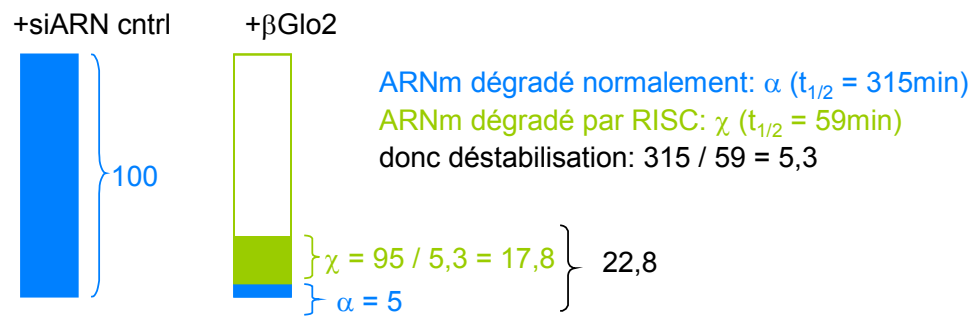
- Etape 3: l'ARN dégradé normalement est soustrait de chaque point expérimental de la cinétique des ARN des cellules ayant reçu β Glo2 ce qui permet de représenter graphiquement la décroissance de la population dégradée par RISC (la population complémentaire, représentée en vert). La courbe de tendance de cette diminution permet d'estimer les paramètres cinétiques de RISC.
- Etape 4: ce calcul est réalisé pour différentes valeurs de α , la population d'ARNm dégradés normalement. Dans cet exemple, ces valeurs vont de 1 à 12%, car d'une part, si aucun ARNm (0%) n'est dégradé normalement, l'analyse est identique à celle du paragraphe 1 et d'autre part, pour des valeurs comprises entre 12 et 19%, les données expérimentales ne permettent pas d'estimer une décroissance de la population d'ARNm clivés par RISC.

La deuxième partie de cette analyse a pour objectif de calculer l'expression résiduelle en ARNm qui résulterait des diverses vitesses de RISC ainsi obtenues. Ce calcul est basé sur la déstabilisation des ARNm induite par le changement de demi-vie. Pour 100 molécules d'ARNm dans des cellules traitées avec un siARN contrôle, il reste dans les cellules où le siARN contre la β -globine a été transfecté:

- La fraction α d'ARNm qui est dégradée normalement (cf. figure 18, en bleu). Ce pourcentage est un des paramètres du calcul donc il ne varie pas, dans l'exemple développé il est de 5%, c'est-à-dire de 5 molécules.
- La fraction d'ARNm clivée par RISC (en vert). Elle est issue de la dégradation des 95 molécules complémentaires, symbolisées par le cadre vert, et est déstabilisée d'un facteur 5,3 qui représente le rapport des demi-vies en présence et en l'absence de l'interférence. Le pourcentage χ représente l'accumulation des ARN soumis à la dégradation par RISC, dans ce cas il est de 17,8.

Ainsi dans l'hypothèse où 5% des ARNm échappent à RISC, le reste des messagers est dégradé selon une demi-vie de 59 min et à l'équilibre, il restera 22,8% des ARNm. Comme nous avons observé 19 % d'expression résiduelle, cette analyse rend compte de manière satisfaisante des données expérimentales. On peut par ailleurs noter que pour des petites molécules comme les siARN, une efficacité de transfection de 95% est vraisemblable.

5) calcul du pourcentage d'ARN résiduel prédit par la vitesse de dégradation par RISC calculée en 4), exemple de 5% d'ARNm dégradés normalement



α	12	10	8	7	6	5	2,5	1
% d'ARN résiduel prédit	20,0	23,9	26,6	27,7	20,0	22,8	26,1	32,1

6) Modélisation de la cinétique de décroissance résultant de la somme des 2 types de dégradation:

- composante due à la dégradation normale:

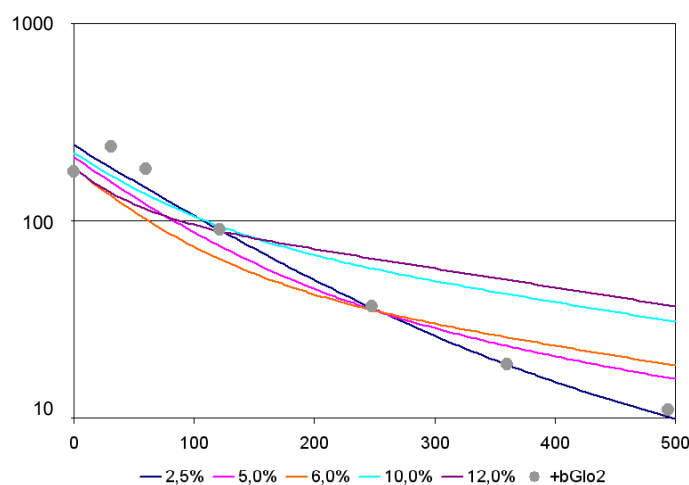
$$T_{ini} \times \alpha \times e^{(-Kd \text{ norm} \times t)}$$

- composante due à la dégradation par RISC

$$T_{ini} \times \chi \times e^{(-Kd \text{ risc} \times t)}$$

➔ Par exemple, si 5% d'ARNm sont dégradés normalement, alors la formule modélisant la décroissance est: $T_{ini} \times 5\% \times e^{(-0,0022 \times t)} + T_{ini} \times 17,8\% \times e^{(-0,0118 \times t)}$

Modélisation de la cinétique de décroissance pour les différents pourcentages d'ARNm dégradés normalement



suie de la figure 18

Ce calcul de la diminution de l'expression en régime stationnaire contraint l'analyse et peut dans certains cas permettre de fixer le pourcentage d'ARNm qui échappe à l'interférence. Comme il apparaîtra dans la suite ceci est en général le cas lorsque la demi-vie des ARN sous interférence est suffisamment différente de leur demi-vie « naturelle ». Toutefois, l'expression résiduelle peut dans certains cas correspondre à plusieurs modélisations, un changement de α et de la demi-vie sous interférence conduisant au même résultat final. Une contrainte plus forte sur l'analyse expérimentale peut-être obtenue en essayant de décrire l'ensemble de la cinétique sous tétracycline.

Dans cette seconde méthode de validation, les demi-vies et le pourcentage d'ARN qui échappent à l'interférence sont utilisés pour modéliser les courbes de décroissance. Ainsi l'équation correspondante comporte deux composantes:

- la dégradation normale qui est une décroissance exponentielle d'ordre 1 dont la constante a été déterminée d'après les ARNm témoins et qui concerne la fraction d'ARNm dégradée normalement:

$$\alpha T_{ini} \times e^{(-K_d \text{ norm}) t}$$

- la dégradation par RISC qui est aussi une décroissance exponentielle d'ordre 1 dont la constante a été déterminée par les calculs précédents et qui affecte le reste des ARNm. Comme les décroissances sont modélisées dans le cas d'une situation à l'équilibre, la part d'ARNm dégradés par RISC est celle prédite par la déstabilisation:

$$\chi T_{ini} \times e^{(-K_d \text{ risc}) t}$$

Ces équations servent à tracer les cinétiques de décroissance que donnerait un système cellulaire ayant les paramètres que nous avons calculés. La comparaison de ces courbes théoriques avec les points expérimentaux permet de déterminer quelles valeurs de demi-vie et de α décrivent au mieux la dégradation des ARNm par RISC. Nous avons appliqué cette méthode de calcul en deux composantes aux analyses cinétiques effectuées sur les trois siARN. En fonction des cas, le calcul a été fait manuellement ou la recherche de la meilleure description des données a été faite à l'aide du logiciel SigmaPlot[®] en paramétrant l'existence de deux populations dont l'une a une demi-vie connue.

Tableau 4: temps de demi-vie des ARNm ciblés par RISC et pourcentage d'ARN résiduel prédit, calculés à partir de la cinétique de décroissance à 16h après la transfection de β Glo2. Les calculs sont réalisés comme expliqués à la figure 18. Les cases grisées correspondent aux hypothèses qui sont invalidées par la comparaison avec le pourcentage résiduel expérimental (19%). Le cadre désigne les valeurs permettant d'obtenir la modélisation optimale dans la figure 19.

% ARNm dégradé normalement (α)	12	10	8	7	6	5	2,5	1
$t_{1/2}$ RISC (min)	29	49	64	70	47	59	76	99
% d'ARN résiduel prédit	20,0	23,9	26,6	27,7	20,0	22,7	26,1	32,1

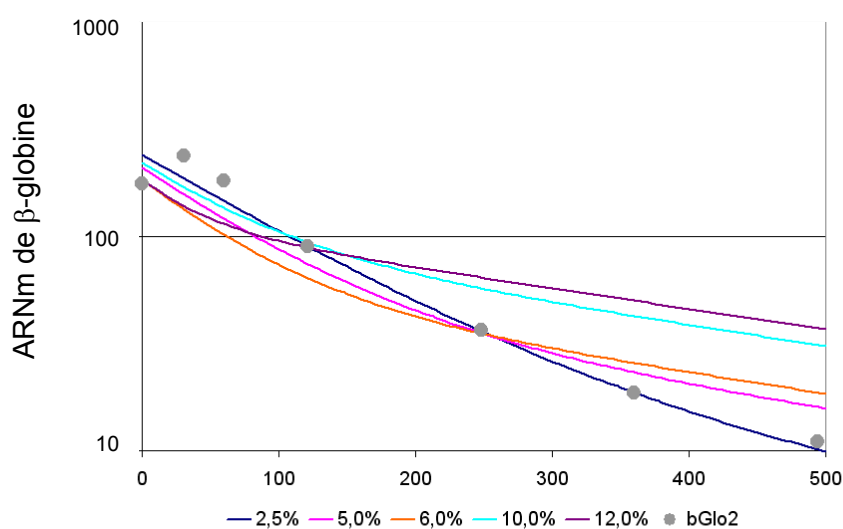


Figure 19: modélisation des décroissances des ARNm pour la cinétique obtenue 16h après transfection de β Glo2. Chaque courbe correspond à une valeur de α . Les vitesses de dégradation utilisées dans le calcul sont décrites dans le tableau précédent. ● : valeurs expérimentales issue de la figure 13.

3. Caractérisation des vitesses de dégradation des ARNm de β -globine par RISC

a. Etude de β Glo2

Le figure 18 a illustré la méthode de calcul à partir des données cinétiques obtenues 16h après la transfection de β Glo2. Ce calcul permet de déterminer des vitesses de dégradation des ARNm par RISC qui peuvent rendre compte de l'inhibition de 19% observée. Ainsi pour des proportions d'ARNm qui échappent à l'interférence comprises entre 2,5 et 12 %, les ARNm clivés par RISC ont des demi-vies de 29 à 99 min. Dans ces cas, les expressions résiduelles prédites sont comprises entre 20 et 30 % (cf. tableau 4) et plusieurs solutions, qui pourtant présentent des demi-vies différentes, pourraient être retenues.

Cependant, parmi les courbes modélisant les décroissances des ARNm qui résulteraient de ces différentes vitesses de dégradation, une seule suit l'ensemble des points expérimentaux (cf. figure 19) c'est celle obtenue avec 2,5% d'ARNm non dégradés par RISC. Les courbes obtenues avec d'autres valeurs de α s'éloignent significativement soit des points précoces soit des points tardifs. La meilleure description de nos résultats pour β Glo2 à 16h est donc obtenue avec 97,5% des messagers dégradés par RISC et un $t_{1/2}$ de 76 min. Il ressort de l'ensemble des données présentées pour cette analyse que la détermination des demi-vies n'est pas univoque et est souvent limitée par la précision de nos données expérimentales.

Pour les données cinétiques obtenues 24h après la transfection de β Glo2, la fonction de régression non linéaire du logiciel SigmaPlot[®] a été employée. Celle-ci a été configurée pour rechercher la courbe de tendance de type $a \times e^{-bx} + c \times e^{-dx}$ permettant de décrire au mieux les données. Le terme $a \times e^{-bx}$ représente la décroissance de la population dégradée normalement avec la constante b définie par la constante de dégradation normale (k_{dnorm}) et le paramètre a qui donne une évaluation de la population non dégradée par RISC ($a = \alpha \times T_{ini}$). La dégradation par l'interférence est modélisée par $c \times e^{-dx}$ et les paramètres c et d permettent d'estimer la part d'ARN résultant de la dégradation par RISC ($c = \chi \times T_{ini}$) et la demi-vie de ces ARN ($d = k_{dRISC}$).

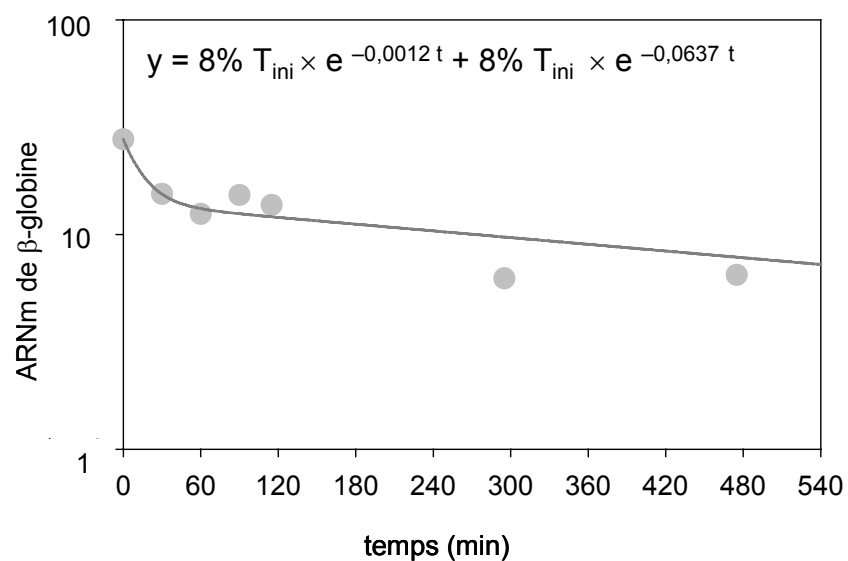


Figure 20: modélisation de la décroissances des ARNm pour la cinétique obtenue 24h après transfection de βGlo2. La courbe est obtenue avec la fonction de régression non linéaire de SigmaPlot[®] avec $b = \text{LN}(2) / t_{1/2\text{RISC}} = \text{LN}(2) / 578$. Son équation est indiquée en haut ($R^2=0,98$). T_{ini} : quantité d'ARNm dans les cellules témoin à $t=0$ (cf. figure 15 et 18). ● : valeurs expérimentales issue de la figure 15.

Appliquée aux données β Glo2 à 24h, cette régression fournit une courbe de décroissance qui a pour équation: $y = 8\% T_{ini} \times e^{-0,0012 \times t} + 8\% T_{ini} \times e^{-0,0637 \times t}$ et qui décrit les données de manière satisfaisante (cf. figure 20). Les paramètres de la dégradation issus de cette régression sont les suivants:

- la part des ARN échappant à l'interférence: $\alpha = 8\%$
- la demi-vie des ARN dégradés par l'interférence: $t_{1/2} = \text{LN}(2) / 0,0637 = 11 \text{ min}$
- la part résiduelle de la dégradation des ARN par RISC: $\chi = 8\%$.

Si ces valeurs rendent bien compte de cinétique de décroissance, elles ne sont pas complètement cohérentes en ce qui concerne l'expression résiduelle. En effet, ces paramètres prédisent une diminution de l'expression en régime stationnaire légèrement différente de celle observée, puisque 92% ($100\% - \alpha$) des messagers sont dégradés par RISC et que le rapport des demi-vies doit conduire à une déstabilisation d'un facteur 52 ($578 / 11 = 52$), il devrait donc en rester 1,8% ($\chi = 92\% / 52$) et l'expression résiduelle devrait être de 9,8% ($\alpha + \chi = 8\% + 1,8\%$), or celle ci est de 16%.

Pour comprendre cette différence, il faut prendre en compte que la première partie de la courbe est fortement influencée par la dégradation rapide due à RISC, donc les premiers points ont un rôle prépondérant dans l'estimation de k_{dRISC} . Ainsi, une imprécision de la mesure dans les temps précoces peut biaiser la modélisation et dans le cas de la figure 20, les points 4 et 5 ont des valeurs supérieures aux points 2 et 3 indiquant que ces derniers sont peut être sous-estimés. Il est donc possible que la forte pente des trois premiers points induise une surestimation de la vitesse de dégradation par RISC. La justesse de notre modélisation est évidemment dépendante de la précision des mesures précoces lorsque la cinétique de dégradation est rapide. En conclusion, dans ce cas, la demi-vie prédite de 11 min est probablement une borne inférieure de la valeur réelle.

b. Etude de β Glo1

La même méthode de régression automatique a été appliquée aux données cinétiques de β Glo1. A 16h, les ARN qui sont dégradés par RISC ont une demi-vie de 49 min ($t_{1/2} = \text{LN}(2) / 0,0140$) tandis que 3% des messagers échappent à la dégradation (cf. figure 21). La précision de cette estimation est satisfaisant car d'une part, la courbe de régression décrit bien la décroissance des ARN ($R^2=0,98$) et d'autre part, les valeurs obtenues permettent de prédire le pourcentage résiduel observé (10%, cf. figure 11). En effet, 97% des messagers sont

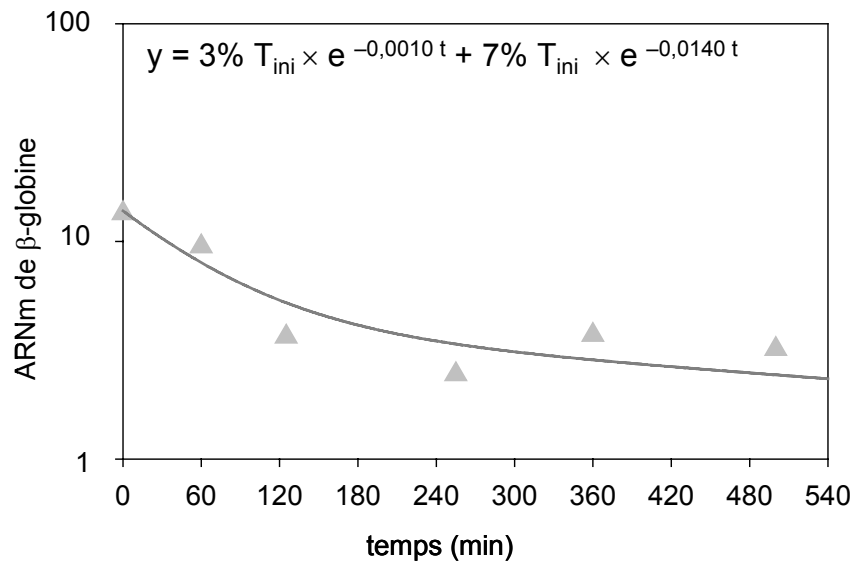


Figure 21: modélisation de la décroissance des ARNm pour la cinétique obtenue 16h après transfection de β Glo1. La courbe est obtenue avec la fonction régression non linéaire de SigmaPlot avec $b = \text{LN}(2) / t_{1/2\text{RISC}} = \text{LN}(2) / 693$. Son équation est indiquée en haut ($R^2=0,98$). T_{ini} : quantité d'ARNm dans les cellules témoin à $t=0$ (cf. figure 11 et 18). $\blacktriangle$: valeurs expérimentales issue de la figure 11.

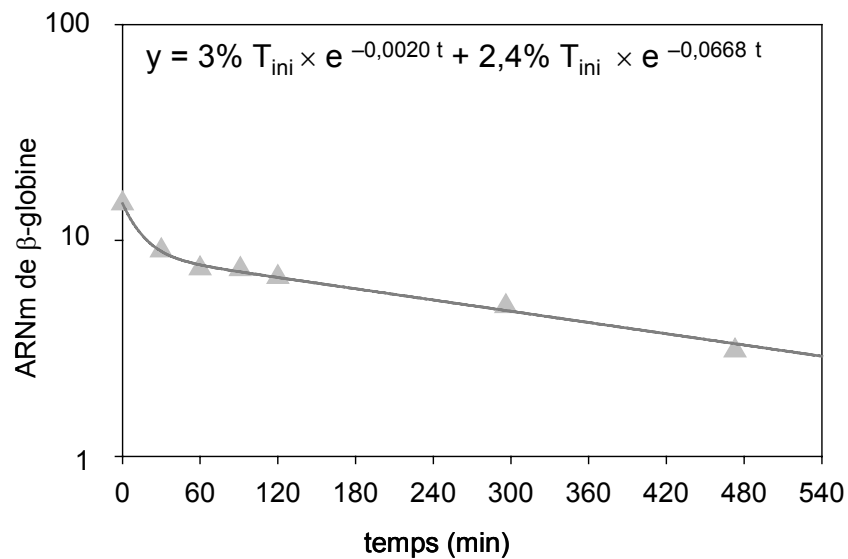


Figure 22: modélisation de la décroissance des ARNm pour la cinétique obtenue 24h après transfection de β Glo1. La courbe est obtenue avec la fonction régression non linéaire de SigmaPlot avec $b = \text{LN}(2) / t_{1/2\text{RISC}} = \text{LN}(2) / 347$. Son équation est indiquée en haut ($R^2=0,99$). T_{ini} : quantité d'ARNm dans les cellules témoin à $t=0$ (cf. figure 12 et 18). $\blacktriangle$: valeurs expérimentales issue de la figure 12

déstabilisés d'un facteur 14, ce qui donne 7% d'ARN restant de la dégradation par RISC, correspondant à une expression résiduelle prédite de 10% ($\alpha + \chi = 3\% + 7\%$).

A partir des résultats obtenus 24h après la transfection de β Glo1, la régression avec SigmaPlot[®] montre que l'interférence dégrade les ARN avec une demi-vie de 10 min tandis que 3% des ARN échappent à ce mécanisme. La courbe de tendance décrit quasiment parfaitement la décroissance ($R^2=0,99$) et les paramètres permettent de prédire correctement la part des ARN restant après l'interférence: 97% des messagers sont déstabilisés d'un facteur 33, il en resterait donc 3% et l'expression résiduelle prédite est donc de 6% ce qui est en accord avec ce qui est observé (6%, cf. figure 12).

Donc les cinétiques de décroissance à 16h et à 24h après la transfection de β Glo1 sont toutes les deux modélisables par une régression prenant en compte deux populations d'ARN. Dans les deux cas 3% des ARN échappent à l'interférence, le reste étant dégradé selon des demi-vies de 49 min et de 10 min à 16h et 24h respectivement. Ces résultats montrent que la demi-vie des ARNm ciblés par RISC est environ 5 fois plus courte à 24h qu'à 16h, donc l'activité nucléasique s'accélère entre 16h et 24h, ce qui peut refléter soit une augmentation du nombre de complexes RISC actifs, soit un changement de leurs caractéristiques enzymatiques.

c. Etude de β Glo3

β Glo3 est le moins efficace des trois siARN car il dégrade au maximum la moitié des ARNm. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer cette faible efficacité : soit la séquence ciblée par le β Glo3 n'est pas accessible au complexe RISC sur tous les ARN, par exemple du fait de l'existence de deux conformations possibles, soit la majorité des ARNm peut être la cible de la dégradation par RISC, comme observé pour β Glo1 et β Glo2, et alors c'est l'activité nucléasique induite par β Glo3 qui est lente. La détermination des valeurs de α et de la constante de dégradation devrait permettre de répondre à cette question.

Les cinétiques de décroissance à 16h et à 24h avec cet oligo n'ont pu être modélisées avec SigmaPlot[®] car dans ces cas l'algorithme de recherche des paramètres ne converge pas, j'ai donc appliqué la méthode de calcul « manuelle » détaillée précédemment.

L'analyse à 16h diffère de l'analyse faite à la figure 18 car il est possible de faire varier α sur une large gamme de valeurs qui s'étend de 1% à 60% (cf. tableau 5). En effet l'inhibition induite par β Glo3 à 16h est de 30%, il peut donc exister toutes les combinaisons

Tableau 5: temps de demi-vie des ARNm ciblés par RISC et pourcentage d'ARN résiduel prédit, calculés à partir de la cinétique de décroissance à 16h après la transfection de β Glo3. Les calculs sont réalisés comme expliqués à la figure 18. Les cases grisées correspondent aux hypothèses qui n'ont pas servi à la modélisation de la décroissance des ARNm car les paramètres cinétiques sont peu différents entre eux.

% ARNm dégradé normalement (α)	60	55	50	40	30	20	10	5
$t_{1/2}$ RISC (min)	54	72	128	102	151	210	257	277
% d'ARN résiduel prédit	63,1	59,7	59,3	48,8	45,2	44,2	43,3	43,0

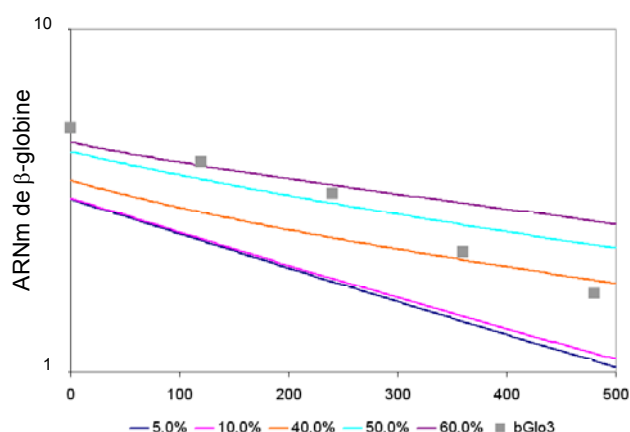


Figure 23: modélisation des décroissances des ARNm pour la cinétique obtenue 16h après transfection de β Glo3. Chaque courbe correspond à une valeur de α . Les vitesses de dégradation utilisées dans le calcul sont décrites dans le tableau précédent. ■ : valeurs expérimentales issue de la figure 16.

Tableau 6: temps de demi-vie des ARNm ciblés par RISC et pourcentage d'ARN résiduel prédit, calculés à partir de la cinétique de décroissance à 24h après la transfection de β Glo3. Les calculs sont réalisés comme expliqués à la figure 18.

% ARNm dégradé normalement (α)	41	30	20	10	5
$t_{1/2}$ RISC (min)	128	193	231	257	267
% d'ARN résiduel prédit	58,5	61,1	62,7	63,3	63,5

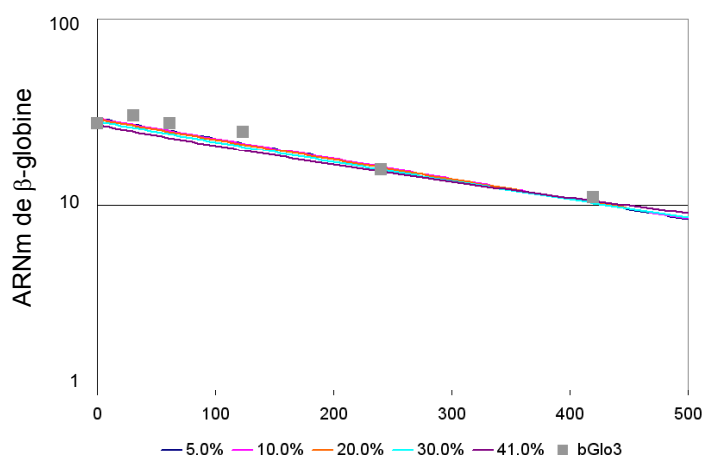


Figure 24: modélisation des décroissances des ARNm pour la cinétique obtenue 24h après transfection de β Glo3. Chaque courbe correspond à une valeur de α . Les vitesses de dégradation utilisées dans le calcul sont décrites dans le tableau précédent. ■ : valeurs expérimentales issue de la figure 17.

possibles respectant la relation: "% ARNm ciblé par RISC + % ARNm dégradé normalement = 70%". Le calcul des vitesses de dégradation par RISC indique que des taux d'ARNm résiduels proches de 70% peuvent être obtenus avec des demi-vies de 54 à 128 min associées à des pourcentages d'ARNm ciblés par RISC de 40 à 50% (cf. tableau 5). Cependant, aucune de ces vitesses de dégradation ne rend compte de la décroissance observée expérimentalement (cf. figure 23). Ceci est en particulier le cas pour des valeurs de α de 5 à 10 % comme celles utilisées pour décrire les cinétiques précédentes. De fait, si la pente de la courbe obtenue est proche de celle des données expérimentales, les expressions résiduelles qu'elles prédisent sont beaucoup trop faibles par rapport à ce qui est observé (de l'ordre de 40 % au lieu de 70 %).

En conclusion, aucune des modélisations ne permet de rendre compte à la fois des données à l'équilibre et des données cinétiques observées avec β Glo3 à 16h.

Au contraire, l'expression résiduelle 24h après la transfection de β Glo3 (59%) est compatible avec toutes les valeurs de la dégradation par RISC issues de la méthode de calcul en deux composantes. En effet, que le $t_{1/2}$ caractérisant les ARNm dégradés par RISC soit de 128 min ou de 267 min, il resterait toujours environ 60% d'ARNm (cf. tableau 6). De plus, la modélisation des décroissances valide tous les cas de figures envisageables, car toutes les courbes se superposent entre elles et avec les données (cf. figure 24). Cette analyse n'est donc pas discriminative et c'est pourquoi l'utilisation de SigmaPlot[®] a échoué. Toutefois cela permet d'estimer que RISC dégrade les ARNm selon des demi-vies comprises entre 128 et 267 min indiquant que l'activité nucléasique est moins rapide que pour β Glo1 et β Glo2, dont les $t_{1/2}$ à 24 h sont proches de 10 min. Il n'est cependant pas possible de répondre à la question posée sur l'abondance des cibles accessibles à RISC car la cinétique s'accorde aussi bien avec une population cible de moyenne importance (59%) qu'avec une large majorité d'ARN clivés (95%).

d. Bilan des études cinétiques de la dégradation de l'ARNm de β -globine induite par les siARN

L'analyse des cinétiques de dégradation en distinguant deux populations de demi-vies différentes permet de calculer des paramètres cinétiques qui sont en accord avec les valeurs expérimentales, ce qui n'était pas le cas avec le modèle cinétique simple utilisé premièrement. Effectivement, l'analyse des cinétiques obtenues à 16h et à 24h avec les siARN β Glo1 et β Glo2 a conduit à l'estimation de demi-vies qui rendent compte à la fois de la dégradation

observée à l'équilibre et pendant la cinétique (cf tableau 7). Cependant cette approche ne nous a pas permis de déterminer les constantes de dégradation de la coupure induite par β Glo3 à 16h, tandis que l'analyse à 24h conduit à des demi-vies de 128 à 267 min (cf. tableau 7).

La comparaison des paramètres cinétiques obtenus avec les trois siARN met en évidence que les cinétiques de dégradation peuvent refléter l'efficacité de l'inhibition, mais qu'il n'en est pas toujours ainsi. En effet, pour les deux siARN qui dégradent plus de 80% des messagers, les ARNm ciblés ont des demi-vies inférieures à 76 min, tandis que ceux qui sont ciblés par β Glo3 sont plus stables avec au minimum 128 min de demi-vie. Par contre, la vitesse de coupure s'accélère de façon remarquable entre 16h et 24h avec β Glo1 puisque la demi-vie diminue d'un facteur 5 environ sans que ceci soit associé à une augmentation importante de l'inhibition étant donné que celle-ci est déjà pratiquement maximale. Il est probable qu'une telle accélération intervienne aussi avec β Glo2 mais dans ce cas la mesure du $t_{1/2}$ à 24 h est moins précise (cf. tableau 7).

Tableau 7: caractéristiques des siARN ciblant la β -globine.

^aEfficacité: diminution de l'expression d'ARN, mesurée aux temps 0 des cinétiques.

^b% d'ARNm ciblés: pourcentage des ARNm totaux qui sont dégradés par RISC, calculé selon la formule: $100\% - \alpha$.

^c $t_{1/2}$ des ARNm ciblés: constante cinétique issue des analyses cinétiques.

		β Glo1	β Glo2	β Glo3
16h	Efficacité ^a	90%	81%	30%
	% ARNm ciblés ^b	97%	97,5%	nd
	$t_{1/2}$ des ARNm ciblés ^c	49 min	76 min	nd
24h	Efficacité ^a	94%	84%	41%
	% ARNm ciblés ^b	97%	92%	59-95%
	$t_{1/2}$ des ARNm ciblés ^c	10 min	>10 min	128-267 min

4. Etude de l'effet de l'épissage sur l'activité de β Glo3

Le siARN β Glo3 cible une séquence située sur la jonction entre les exons 2 et 3 de l'ARNm de β -globine tandis que β Glo1 et β Glo2 ciblent des régions appartenant aux exons 1 et 2 respectivement. Cette séquence est particulière car elle est issue de l'épissage de l'intron 2, et est donc située à proximité du site de fixation du complexe de jonction exon / exon. Il serait donc possible que l'épissage soit en partie responsable de la faible efficacité de β Glo3.

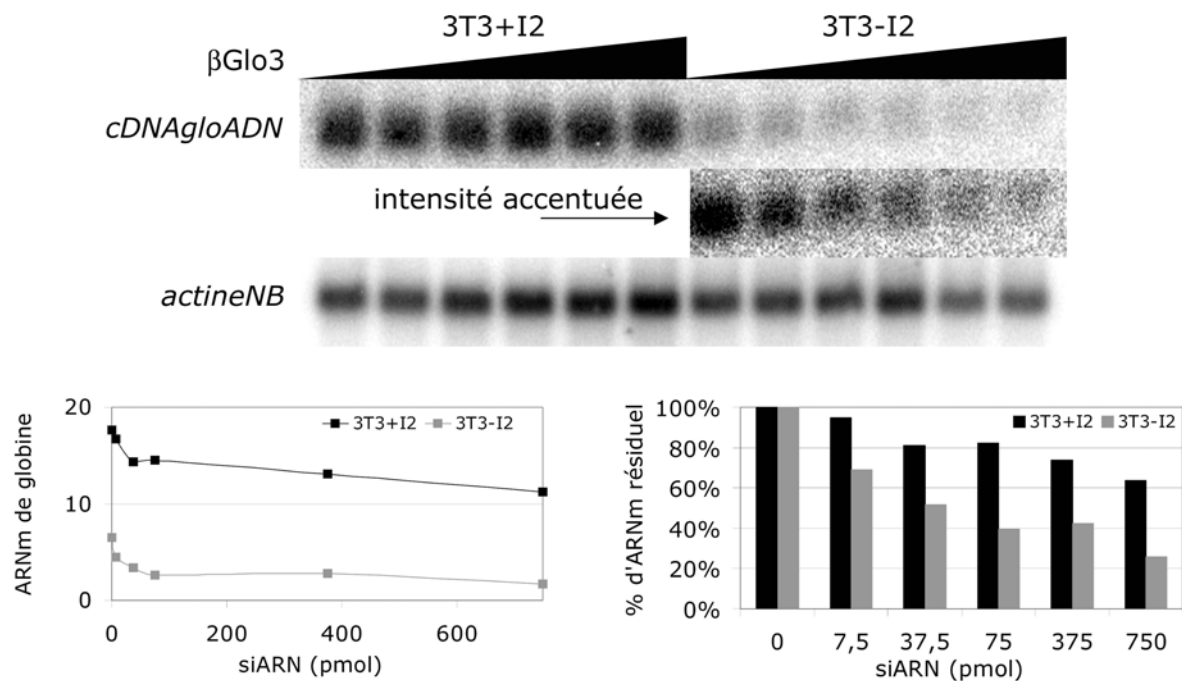


Figure 25: dose réponse à βGlo3 des cellules 3T3+I2 et 3T3-I2. Analyse par Northern blot des ARN extraits 24h après la transfection de quantités croissantes de siARN. La membrane est hybridée successivement avec les sondes *cDNA_{gloADN}* et *actine NB*. Après quantification, les signaux globine sont normalisés par rapport à l'actine et représentés sur le graphe en bas à gauche. Le pourcentage d'ARNm résiduel est calculé pour chaque concentration par rapport au point 0.

C'est pourquoi nous avons entrepris d'analyser l'efficacité de β Glo3 à induire la dégradation d'ARNm qui ont subi ou non l'épissage de l'intron 2.

Deux vecteurs permettant d'exprimer des ARN de β -globine avec ou sans l'intron 2 avaient été précédemment construits: pCMglo.geno.PAS et pCMglo.geno. Δ I2.PAS. Ces deux plasmides contiennent l'intron 1. Afin de s'affranchir des problèmes de reproductibilité de la transfection transitoire des plasmides, les plasmides ont été cotransfectés dans des cellules NIH 3T3 avec un plasmide codant pour le gène de résistance au G418 pour générer des transfectants stables. Quatre populations polyclonales ont été sélectionnées au hasard pour chaque vecteur et amplifiées pour analyser leurs niveaux d'expression de l'ARNm de β -globine. Pour chacun des vecteurs, la population stable qui exprimait le plus d'ARNm de β -globine a été choisie pour mener la suite de l'analyse. Les cellules transfectées avec pCMglo.geno.PAS sont nommées 3T3+I2 et celles ayant intégré pCMglo.geno. Δ I2.PAS, 3T3-I2. L'analyse par Northern blot a aussi montré que les cellules transfectées avec le vecteur contenant l'intron 2 expriment trois fois plus d'ARNm de β -globine que celles ayant reçu le plasmide sans intron 2, ce qui est illustré par les deux populations choisies dans la figure 25. Ainsi, bien que les deux constructions contiennent au moins un intron, la présence de l'intron 2 augmente l'accumulation des ARN messagers matures.

Dans un premier temps, une dose réponse a été menée avec le duplex β Glo3 pour déterminer la quantité à utiliser pour avoir la meilleure efficacité de dégradation des messagers. Les siARN ont été transfectés par phosphate de calcium et les ARN extraits 24h après. L'efficacité du siARN a été ensuite évaluée par Northern blot en hybridant successivement une sonde ADN contre l'ARNm de β -globine (*cDNA β gloADN*) puis la sonde *actineNB*. Le duplex β Glo3 dégrade au maximum 36% des messagers issus des cellules 3T3+I2 tandis qu'il induit une diminution maximale de 74% des ARNm des cellules 3T3-I2 (cf. figure 25). Donc β Glo3 est plus efficace sur les messagers qui n'ont jamais contenu l'intron 2 que sur ceux qui ont subi son épissage, ce qui suggère que l'épissage de l'intron 2 pourrait diminuer l'efficacité de l'interférence par les siARN. Cependant, même si ces deux populations cellulaires sont issues des mêmes cellules parentales il reste à vérifier qu'un autre siARN, par exemple β Glo1 ou β Glo2, induit une réponse identique dans les deux populations, afin d'exclure que l'effet observé soit dû à la différence de niveau d'expression ou à une différence d'efficacité de transfection.

5. Discussion

Dans cette première partie, la dégradation des messagers qui est induite par les siARN dans les cellules de mammifères a été étudiée *in vivo* selon une approche cinétique. Cette analyse avait pour objectifs de déterminer la vitesse de coupure due à l'interférence par l'ARN et de définir si l'efficacité d'un siARN est liée à sa cinétique de coupure. Pour cela, j'ai utilisé un gène rapporteur, codant pour la β -globine de lapin, qui avait déjà été employé pour mesurer *in vivo* les constantes cinétiques des réactions d'épissage et de transport des ARN.

La dégradation des messagers a été analysée lorsque le système est à l'équilibre à 16h et à 24h après la transfection de trois siARN d'efficacités différentes. Les siARN induisent effectivement une accélération de la dégradation des ARNm de β -globine ce qui est en accord avec l'activité nucléasique qu'ils initient. Une analyse en une seule composante de ces cinétiques ne permet pas de rendre compte des efficacités des siARN. Nous avons donc utilisé une analyse en deux composantes : l'une dégradée par les voies cellulaires assurant le renouvellement des ARNm et l'autre dégradée par le complexe RISC. Les paramètres cinétiques ainsi calculés permettent d'expliquer la diminution des ARNm induite par l'interférence dans la majorité des cas étudiés.

a. RISC clive les ARNm selon des vitesses qui peuvent être de l'ordre de la minute ou de l'heure

Les vitesses de dégradation induites par l'interférence par l'ARN qui ont été mesurées avec cette approche sont comprises entre 10 et 267 min. Trois catégories de cinétiques peuvent être distinguées en fonction des temps de demi-vie des ARNm dégradés par RISC.

La première classe regroupe les demi-vies comprises entre 49 et 76 min et correspond à des inhibitions très efficaces de l'expression de 80 à 90%. Les cinétiques à 16h de β Glo1 et β Glo2 appartiennent à cette classe. Une seconde catégorie est aussi caractérisée par une très bonne efficacité d'inhibition (94%) mais elle se définit pour une demi-vie extrêmement courte de l'ordre de la dizaine de minutes. Parmi les six situations étudiées, la cinétique à 24h avec β Glo1, dont la coupure a une demi-vie de 10 min, appartient clairement à cette classe et celle à 24h avec β Glo2 est probablement liée à ce groupe. Enfin, le dernier groupe est formé par

β Glo3 qui induit une coupure plus lente dont la demi-vie est au minimum de 128 min. Cette catégorie correspond aux siARN de moyenne et faible efficacité.

Cette étude met en évidence que la demi-vie des ARNm soumis à une interférence est souvent plus proche de l'heure que de quelques minutes comme on aurait pu l'anticiper pour des réactions efficaces. Cependant, cette conclusion ne repose pour l'instant que sur quelques exemples et d'autres études comprenant d'autres ARNm cibles seraient nécessaires pour en explorer la généralité.

D'un point de vue pratique, ces observations mettent en valeur l'importance de la stabilité de l'ARN cible pour l'efficacité de l'interférence par l'ARN. En effet plus la coupure par RISC est rapide par rapport à la dégradation normale, plus la stabilité du messenger sera réduite et ainsi plus l'efficacité du siARN sera élevée; autrement dit : plus un ARN est stable, plus facile est sa dégradation par RISC. Il est important de noter que pour un ARNm comme β -globine, dont la demi-vie est supérieure à 6 h, une demi-vie d'une heure sous interférence est suffisante pour induire une inhibition de l'expression efficace. De fait, si la demi-vie sous interférence est beaucoup plus courte que celle de la dégradation normale c'est la population de messagers qui échappent à l'interférence qui définit l'expression résiduelle. En revanche, pour un ARNm dont la demi-vie naturelle est courte, une interférence efficace nécessitera un siARN dont la cinétique de coupure soit particulièrement rapide. Si nos données sur β Glo1 et β Glo2 établissent qu'une telle situation est possible en particulier à 24 h, il resterait à déterminer la fréquence avec laquelle de tels siARN peuvent être trouvés.

b. Limites de la méthode d'analyse cinétique

Les paramètres cinétiques obtenus avec la méthode d'analyse proposée dépendent de la demi-vie des ARNm issus des cellules témoins car celle-ci est intégrée au calcul par la composante des ARNm non dégradés par RISC. Or cette demi-vie n'est pas constante entre les différentes cinétiques étant donné qu'elle varie de 5h15 à 11h30. La variation de la stabilité des témoins n'est pas due aux temps de mesure de la cinétique car à 16h, les ARN témoins des cinétiques avec β Glo1 et β Glo2 ont des demi-vies de 11h30 et 5h15. Elle ne résulte pas non plus de la transfection par le phosphate de calcium ou du siARN contrôle utilisé, mais semble être liée à l'état des cellules au moment de l'expérience. En effet, lorsque plusieurs contrôles ont été fait au sein d'une même expérience, les valeurs observées ont toujours été concordantes.

Par conséquent, même si les vitesses de dégradation sont estimées en fonction de la stabilité des contrôles, comme la cinétique de dégradation des témoins est cohérente au sein d'une même expérience, les paramètres cinétiques calculés sont bien spécifiques du siARN étudié et non de la demi-vie normale de l'ARNm ciblé. Deux types d'analyses cinétiques pourraient étayer cette conclusion: soit étudier la dégradation induite par β Glo1 ou β Glo2 sur un messager de globine dont la stabilité a été modifiée par des éléments de types ARE par exemple, soit réitérer les mêmes cinétiques pour analyser si les vitesses de dégradation mesurées sont liées aux demi-vies des contrôles. Lorsque j'ai reproduit dans des expériences indépendantes des études cinétiques, les mêmes résultats ont été obtenus pour la demi-vie sous interférence, mais dans ces cas, les demi-vies des témoins étaient peu différentes.

Les cinétiques ont été réalisées à 16h et à 24h après la transfection, afin de mesurer les constantes d'une réaction qui semblait à l'équilibre du fait que l'efficacité d'inhibition variait peu. Cependant dans le cas de β Glo1, l'activité s'accélère fortement entre ces deux instants, ce qui implique que la dégradation par RISC n'avait pas atteint un état d'équilibre à 16h et qu'elle continue sa mise en place entre 16h et 24h. Un élément surprenant de ces résultats est le fait que nos études cinétiques s'étendent sur un intervalle de temps qui est pratiquement le même que celui où la cinétique de coupure s'accélère (les mesures cinétiques interviennent entre 16 et 22 h). On aurait donc pu s'attendre à ce que ce phénomène soit détectable « en temps réel » au cours de nos études cinétiques. Plusieurs éléments peuvent contribuer au fait que nous ne l'ayons pas vu. Tout d'abord, même si la demi-vie à 16 h est de l'ordre de l'heure, il en résulte qu'au bout de 2 h d'observation l'essentiel (~75 %) de la population initiale a disparu. Les données cinétiques en ce qui concerne l'action de RISC dans ces cas là sont donc de fait limitées aux deux premières heures. Par ailleurs, les détails fournis sur l'analyse des données cinétiques illustrent de manière directe les limites de cette analyse. Nous estimons que les paramètres que nous en avons extraits sont fiables dans le contexte du modèle utilisé. Si nous souhaitions introduire d'autres paramètres comme une accélération de la coupure au cours du temps un nombre beaucoup plus grand de données et une plus grande précision seraient nécessaires.

L'explication la plus simple pour cette accélération est que le nombre de complexes RISC actifs dans la cellule augmente au cours du temps. En effet, si les premiers effets de l'interférence sont détectables dès 2 h après la transfection par le phosphate de calcium, il est plausible que la quantité de siARN biodisponibles dans la cellule croisse avec le temps. Alternativement, il est possible que l'activité intrinsèque des complexes RISC augmente au

fur et à mesure qu'il rencontre des cibles. Ceci pourrait conduire à des modifications post-traductionnelles de la protéine Ago2 ou d'un autre partenaire du complexe. Dans ce cadre, la réduction du nombre de cible du à l'arrêt de la transcription pourrait bloquer cette accélération qui de fait ne serait pas visible avec notre approche.

c. Implications pour le mécanisme de l'interférence par l'ARN

La méthode d'analyse proposée nécessite de prendre en compte une population d'ARNm qui n'est pas dégradée par RISC. Les cinétiques obtenues avec β Glo1 et β Glo2 montrent que ces ARN sont de l'ordre de 3 à 10%. Plusieurs hypothèses sur la nature de ces messagers peuvent être envisagées. Tout d'abord, les analyses sont effectuées à partir d'un ensemble de cellules qui peuvent ne pas avoir un même comportement. Ainsi, les ARNm qui échappent à l'interférence pourraient être ceux issus de cellules non transfectées. Le maximum d'efficacité observé sur β -globine est de 94% suggérant que 6% des cellules au maximum sont non transfectées. Une telle efficacité de transfection est effectivement envisageable pour des petites molécules comme les siARN. Une hypothèse alternative serait que certains messagers ne soient pas accessibles à l'interférence, soit parce qu'ils sont protégés de façon mécanique par leur couverture protéique ou bien par leur conformation, soit du fait d'une localisation cellulaire singulière. En particulier, les ARNm stockés dans le noyau, qui représentent de l'ordre de 5 à 10 % des ARNm de la cellule, pourraient constituer une telle population. Cette possibilité est étudiée dans la deuxième partie des résultats.

L'existence d'ARNm qui ne sont pas ciblés par la machinerie de l'interférence est aussi une des hypothèses qui pourrait expliquer la moindre efficacité de certains siARN. En effet certaines séquences pourraient être masquées et seraient donc de moins bonnes séquences cibles pour les siARN. Un des objectifs de cette étude cinétique était de déterminer si l'inhibition de 50% de β Glo3 était due à un nombre restreint d'ARNm cibles. Cependant notre approche n'a pas permis de conclure sur cet aspect et ce résultat met en évidence une autre limite de l'analyse cinétique. Lorsque les deux types de dégradation, normale et induite par les siARN, sont d'ordres de grandeur assez proches, la méthode de calcul ne peut distinguer les deux et c'est pourquoi elle est inefficace pour analyser les dégradations lentes.

La diversité des vitesses de coupure peut refléter soit des différences de caractéristiques enzymatiques entre les complexes RISC/brin guide (K_m , V_{max}), soit une différence dans le nombre de complexes RISC/brin guide formés. Lors de la synthèse des siARN utilisés dans

ces travaux, la définition des séquences des siARN a été faite selon un nombre restreint de règles, décrite dans la première partie des résultats. L'analyse systématique d'un grand nombre de siARN a mis en évidence que les stabilités d'appariements aux extrémités du duplex avaient un rôle dans l'incorporation du brin guide dans RISC (Khvorova, Reynolds et al. 2003; Schwarz, Hutvagner et al. 2003). Une des conséquences majeures de ce biais d'incorporation est que la stabilité interne du siARN peut induire l'intégration du brin sens au lieu de l'antisens, ce qui génère un complexe RISC actif qui ne peut pas reconnaître la cible étudiée. La séquence des siARN peut donc influencer sur le nombre de complexes actifs formés. Pour déterminer si les différences entre les vitesses de coupures des duplex contre la β -globine sont liées au nombre de complexes effecteurs, j'ai analysé la stabilité interne des trois siARN grâce au logiciel proposé par l'institut Wadsworth (<http://sfold.wadsworth.org/index.pl>). L'analyse des séquences des trois siARN indique que β Glo1 et β Glo2 ont une plus grande chance d'induire l'incorporation du brin antisens au messager. En revanche, le profil des stabilités internes de β Glo3 suggère que RISC intégrera préférentiellement le brin sens et par conséquent peu de RISC seront formés avec le brin capable de reconnaître l'ARN de β -globine. Ces résultats suggèrent que les différences entre les vitesses de coupure de β Glo1, β Glo2 et β Glo3 pourraient être dues à leurs diverses capacités à former des complexes RISC avec le brin guide correct. Il faut toutefois souligner que les doses réponses montrent qu'une augmentation de la quantité de siARN transfectée n'influe que modérément sur l'efficacité d'inhibition. De plus dans le cas de β Glo3, nos résultats suggèrent que la cicatrice de l'épissage contribue à son efficacité particulièrement faible.

RESULTATS ET DISCUSSION

partie III

**Etude de la dégradation des ARN
nucléaires induite par les siARN**

partie III : Etude de la dégradation des ARN nucléaires induite par les siARN

Jusqu'à récemment, des études biochimiques et fonctionnelles avaient montré que l'interférence par l'ARN dans les cellules de mammifères était un phénomène purement cytoplasmique. D'une part, une activité endonucléasique correspondant à l'action de RISC a été isolée uniquement à partir de la fraction cytoplasmique de cellules HeLa (Hutvagner and Zamore 2002). D'autre part, la protéine AGO2, qui est la nucléase responsable de la coupure par RISC, est localisée dans le cytoplasme et plus particulièrement dans les corps dcpl (Liu, Valencia-Sanchez et al. 2005; Sen and Blau 2005). Dans ces dernières études, un signal nucléaire correspondant à AGO2 peut être observé sur certaines images, mais il est généralement interprété comme non spécifique. Par ailleurs, la sensibilité de certains ARN nucléaires à la dégradation par les siARN a été étudiée indirectement et directement. Ainsi, l'équipe de Nagamine a montré qu'un siARN ciblant une séquence spécifique de l'isoforme p66 de la protéine SHCA induit effectivement son extinction sans faire diminuer les autres isoformes. Comme l'ARN précurseur de l'ensemble des isoformes contient cette séquence cible, ceci suggère que la dégradation induite par le siARN n'atteint pas les précurseurs nucléaires (Kisielow, Kleiner et al. 2002). D'autre part, la rétention nucléaire d'un ARN rapporteur, induite par l'absence de la protéine REV, abolit son extinction par des siARN (Zeng and Cullen 2002).

Cependant, des études chez les plantes et la levure ont démontré que les ARN double brin, siARN et shARN peuvent induire une extinction transcriptionnelle des gènes ciblés, établissant ainsi le fait que les petits ARN régulateurs peuvent déclencher des mécanismes dans le noyau (Schramke and Allshire 2003; Baulcombe 2004). Plus récemment, deux rapports ont établi que dans des cellules humaines en culture, des siARN dirigés contre des promoteurs pouvaient déclencher la méthylation au voisinage des régions ciblées et ainsi éteindre la transcription du gène (Kawasaki and Taira 2004; Morris, Chan et al. 2004). Enfin, en 2005, deux études ont mis en évidence une interférence sur certains ARN nucléaires. Dans des cellules humaines, un petit ARN non codant et un ARNm aberrant qui sont tous deux retenus dans le noyau peuvent être dégradés par l'introduction de siARN (Langlois, Boniface et al. 2005; Robb, Brown et al. 2005). Enfin, l'analyse biochimique des cellules HeLa a mis en évidence, dans la fraction nucléaire, la présence d'AGO1 et AGO2 ainsi qu'une activité de clivage identique à celle de RISC (Robb, Brown et al. 2005). Ces observations mettent en

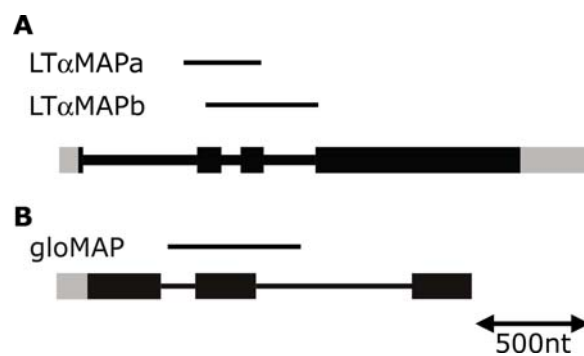


Figure 26: sondes utilisées dans les cartographies à la RNase. A: la sonde *LT α MAPa* permet de distinguer les transcrits N3 et N2 de lymphotoxine- α , *LT α MAPb* permet de détecter N2/N3, N1, N0, C1 et C0. B: la sonde *gloMAP* distingue les 4 types de transcrits nucléaires de β -globine.

évidence que le mécanisme de l'interférence par l'ARN est aussi présent dans le noyau de cellules de mammifère.

L'impact de l'interférence sur l'expression d'un gène dont les messagers sont exportés dans le cytoplasme reste cependant à explorer et constitue l'objet de cette section. Cette étude analyse les effets des siARN sur les ARN nucléaires de lymphotoxine- α et de β -globine. Ces deux modèles sont particulièrement adaptés à cette étude car les ARN précurseurs et matures sont assez abondants dans le noyau et la maturation des ARN pré-messagers a été caractérisée en détail. De plus, les ARN matures sont exportés et traduits dans le cytoplasme contrairement aux cas précédemment étudiés qui ont porté sur un petit ARN non codant, un ARNm anormal retenu dans le noyau par un mécanisme inconnu et un ARN modèle contenant un motif RRE (élément de reconnaissance par Rev) qui permet son export ou sa rétention nucléaire (Zeng and Cullen 2002; Langlois, Boniface et al. 2005; Robb, Brown et al. 2005).

Dans une première partie l'activité de dégradation nucléaire a été analysée pour différents siARN avec le modèle lymphotoxine- α . Cette étude a mis en évidence que des ARNm nucléaires peuvent être dégradés par l'ARNi mais que tous les ARN ne semblent pas sensibles à cette dégradation. Puis les conséquences des siARN sur le métabolisme et la maturation des ARN nucléaires ont été analysées par une approche cinétique et ce travail a fait l'objet d'un article qui est présenté ici. Enfin nous avons cherché à généraliser nos observations sur les effets nucléaires des siARN pour divers temps et siARN. Les principaux résultats de cette étude faisant l'objet d'un article qui est joint, la présentation qui suit vise à les replacer dans le contexte de l'ensemble des études que j'ai menées pour mettre en évidence une activité nucléaire de l'interférence.

1. Effets des siARN sur l'accumulation des ARN nucléaires 24h après la transfection

Afin de déterminer si l'interférence pouvait induire une dégradation des ARNm nucléaires, nous avons d'abord étudié l'impact des siARN sur l'accumulation des transcrits nucléaires à un moment où l'interférence est maximale dans le cytoplasme, soit 24h après la transfection. Cette analyse a d'abord été faite avec le modèle lymphotoxine- α car ses transcrits nucléaires sont plus abondants et sa maturation plus informative que celle de β -globine du fait de l'existence de deux messagers cytoplasmiques. Les trois siARN qui ont une

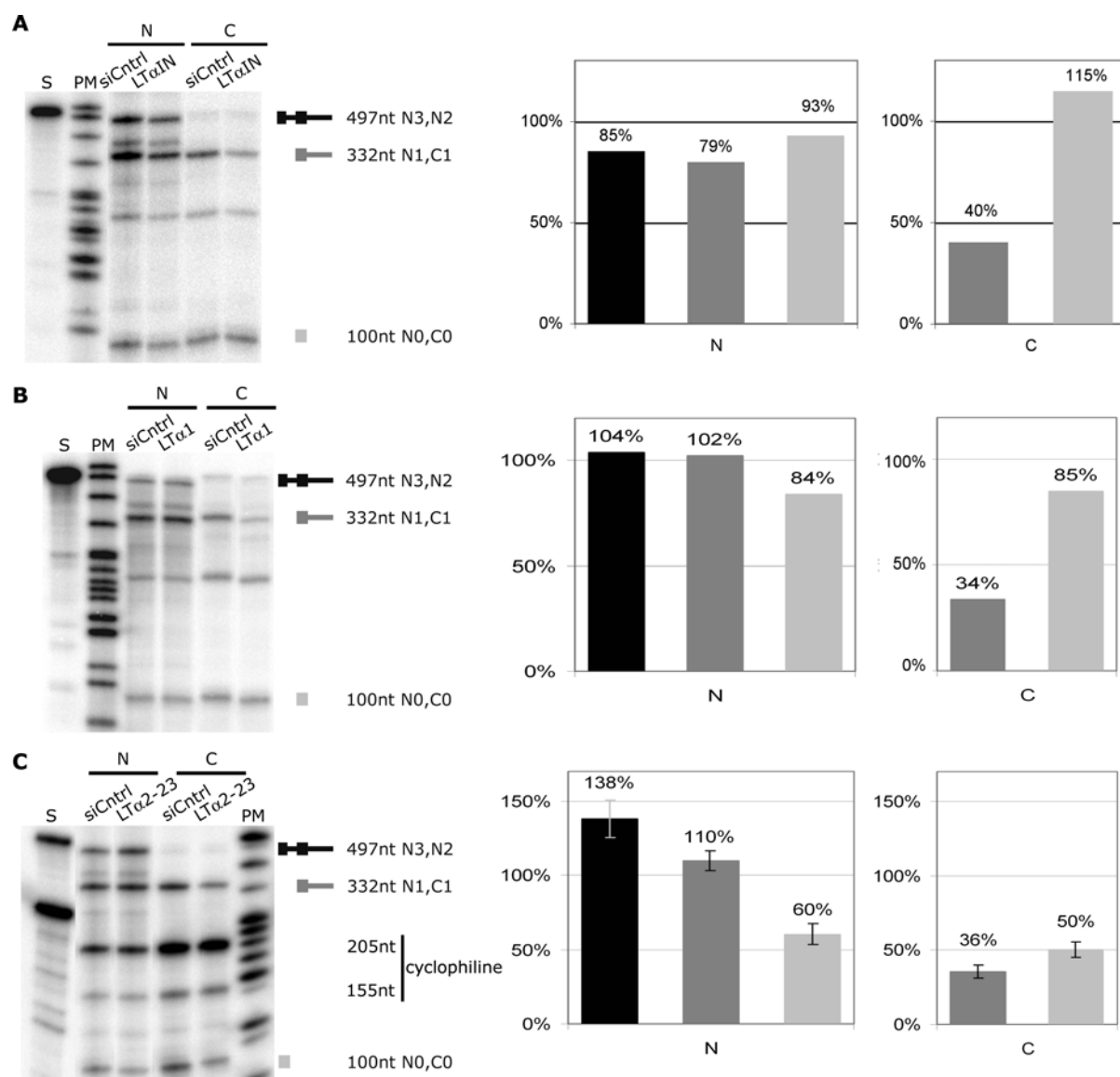


Figure 27: analyse des transcrits nucléaires et cytoplasmiques de lymphotoxine- α 24h après la transfection. Les cellules tTA-LT- α sont transfectées avec 300 pmol de siARN contrôle ou ciblant la lymphotoxine- α (**A**:LT α IN, **B**:LT α 1, **C**:LT α 2-23) et 24h après, les ARN des fractions nucléaire et cytoplasmique sont extraits et analysés par cartographie à la RNase avec la sonde LT α MAPb. Les ARN d'actine (**A** et **B**, cf. figure 28) ou de cyclophiline (**C**) sont utilisés comme contrôle interne. Les signaux de chaque transcrit sont quantifiés et normalisés par rapport au contrôle interne. Les graphiques représentent le pourcentage d'ARN résiduel par rapport aux cellules ayant reçu le siARN contrôle. En **C**, les valeurs sont des moyennes de quatre expériences indépendantes et les écart-types sont aussi représentés.

efficacité d'inhibition de leur cible supérieure ou égale à 50%, LT α IN, LT α 1 et LT α 2 ont été utilisés.

Les cellules tTA-LT- α ont été transfectées avec 300 pmol de siARN dans les mêmes conditions que précédemment. 24h après la transfection, des fractions nucléaires et cytoplasmiques ont été préparées et analysées par cartographie à la RNase avec la sonde *LTaMAPb* (cf. figure 26). Les ARNm de cyclophiline ou d'actine ont été utilisés comme contrôle interne (sondes *cycloCARTO* ou *actineCARTO*). Dans le cas d'une normalisation avec les ARN de cyclophiline, le mélange d'hybridation contient les deux sondes *LTaMAPb* et *cycloCARTO*. Tandis que pour la sonde *actineCARTO* une procédure en deux temps est nécessaire car le signal actine masque celui des transcrits N0/C0. Aussi, une cartographie est réalisée avec les sondes *LTaMAPb* et *actineCARTO*, puis le rapport des signaux N1/C1 et actine permet de normaliser une cartographie faite avec seulement la sonde *LTaMAPb* (cf. figure 27 et 28).

Lorsque les cellules sont transfectées avec LT α IN (cf. figure 27A), l'accumulation des ARN cytoplasmiques C1 diminue de 60%, tandis que celle des ARN nucléaires correspondant (N1) ne diminue que de 20%, ce qui est à la limite des erreurs expérimentales. De même, les précurseurs N3 et N2 ne varient pas de manière significative, tout comme les ARN complètement épissés qu'ils soient nucléaires (N0) ou cytoplasmiques. Ces données d'accumulation ne mettent donc pas en évidence une activité nucléaire pour un siARN qui cible l'intron 3 de la lymphotoxine- α .

L'étude de l'impact de LT α 2-23 dans le noyau montre par contre des effets variés sur l'accumulation des ARN nucléaires en fonction des transcrits (cf. figure 27C). Ainsi, l'accumulation des ARN complètement épissés diminue de 64% dans le cytoplasme et de 40 % dans le noyau, suggérant que ces transcrits sont la cible de l'interférence dans les deux compartiments. L'effet sur les ARN contenant l'intron 3 est, par contre, contrasté avec une légère augmentation dans le noyau et une diminution de 50% dans le cytoplasme. Enfin, l'accumulation des précurseurs N2 et N3 augmente de 40% dans le noyau, suggérant une modification du métabolisme des ARN de la lymphotoxine- α .

Dans le cas du siARN LT α 1, l'efficacité de dégradation diffère fortement entre les deux transcrits cytoplasmiques (cf. figure 27B): la diminution de l'accumulation est 4 fois plus marquée pour les ARN qui contiennent l'intron (- 66 %) que pour les complètement épissés (- 15 %). Cette différence de sensibilité à l'ARNi, déjà visible pour LT α 2-23, sera analysée plus

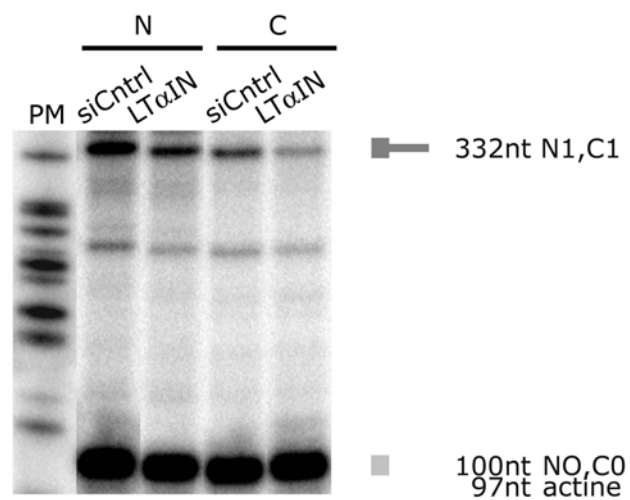


Figure 28: utilisation de l'ARN d'actine comme contrôle interne. Les ARN utilisés dans la figure précédente en A. sont hybridés avec les sondes *LTαMAPb* et *MAPactine*. Les signaux des ARN actine et NO,C0 de lymphotoxine- α sont superposés, mais comme l'ARN d'actine est plus abondant, le signal global est majoritairement causé par l'ARN d'actine. Le rapport des signaux actine et N1,C1 sert à normaliser les valeurs obtenues avec la cartographie en 2.A.

en détail dans la quatrième partie des résultats. Dans le noyau, les accumulations de N3, N2 et N1 ne sont pas modifiées tandis que celle de N0 est diminuée de 16%. Cette analyse montre que LT α 1 n'a pas d'effet sur N1 bien qu'il dégrade efficacement C1. En revanche, son activité est comparable sur les ARNm matures nucléaires et cytoplasmiques, mais comme cette diminution est de l'ordre de la précision de nos mesures, elle ne permet pas de conclure sur l'activité nucléaire de ce siARN.

L'analyse des trois siARN montre que 24h après leur transfection, seul LT α 2-23 a un effet significatif sur les accumulations à l'équilibre des ARN nucléaires. Nous avons donc analysé les cinétiques de dégradation des transcrits nucléaires induites par ce si ARN pour déterminer quels mécanismes conduisent à ces modifications.

2. Analyse des cinétiques de décroissance des transcrits nucléaires de lymphotoxine- α .

Pour réaliser cette étude cinétique, j'ai arrêté la transcription en ajoutant de la tétracycline 24h après la transfection du siARN, puis j'ai analysé la décroissance des ARN nucléaires et cytoplasmiques pendant les quatre heures suivantes. Ces données cinétiques, présentées dans l'article montrent que

- LT α 2-23 (appelé siLT α 2 dans l'article) induit la dégradation des transcrits nucléaires N0 et N1,
- les ARN nucléaires qui sont touchés par l'ARNi sont dégradés selon la même vitesse que les transcrits cytoplasmiques, du moins lorsque la transcription est arrêtée par la tétracycline,
- sachant que l'arrêt de la transcription induit un ralentissement de l'épissage, les données cinétiques (sensibilité de N1) et celles d'accumulation (absence de diminution de N1) peuvent être mise en concordance en prenant en compte la compétition cinétique entre la maturation des transcrits (épissage de l'intron 3, $t_{1/2} = 7$ min) et l'interférence ($t_{1/2} = 40$ min).
- De plus, l'analyse montre que les pré-messagers ont des demi-vies similaires dans les cellules transfectées avec un siARN non spécifique ou avec LT α 2-23. Ce résultat suggère que la hausse de leur accumulation n'est pas causée par un ralentissement de l'épissage et serait donc due à une plus forte synthèse d'ARN.

Enfin, nous montrons que ces effets de l'ARNi ne sont pas spécifiques de l'ARN de lymphotoxine- α , car la transfection d'un siARN dirigé contre l'ARN de β -globine induit aussi une forte accumulation des pré-messagers à 48 h alors que le niveau des transcrits nucléaires matures est diminué.

Cet article établit que les siARN ont un double effet sur les ARN nucléaires: la synthèse d'ARN est augmentée et les transcrits peuvent être dégradés si la vitesse de l'ARNi est suffisamment rapide par rapport aux vitesses d'épissage et d'export. Cet article indique aussi que ces changements se mettent en place avec des cinétiques qui diffèrent entre les 2 ARN étudiés.

Pour la clarté de l'article, les notations de siARN ont été modifiées ainsi: LT α 1 devient siLT α 1, LT α 2-23 devient siLT α 2, LT α 3 devient siLT α 3, β Glo1 devient si β Glo1, si β Glo2 devient si β Glo2.

siRNA can silence nuclear transcripts while increasing their synthesis

Carole Ribet, Dominique Weil, Maria-Antonietta Buccheri and
François Dautry

CNRS UPR 1983 génétique moléculaire et intégration des fonctions cellulaires,
Institut André Lwoff, 7 rue Guy Moquet, 94801 Villejuif France

ABSTRACT

RNA interference, the sequence-specific RNA degradation pathway induced by double-stranded RNA, has mostly been described as a cytoplasmic process acting on mature mRNA once they have been exported to the cytoplasm. Here, we investigated the impact of short interfering RNA on the nuclear metabolism of two Pol II transcripts that undergo export and translation, lymphotoxin- α and β -globin. By kinetic analyses, we show that the nuclease activity induced by an siRNA can be as active in the nucleus and in the cytoplasm. However, the impact on the steady state accumulation is determined by a kinetic competition between interference and the maturation reactions. Thus, while the mature mRNA, which are mostly stored within the nucleus, are subjected to a strong silencing, only particularly active siRNA can have access to precursors which are undergoing splicing. In addition, we have observed that RNA interference can lead to an increased accumulation of precursors which is due to a higher level of synthesis. This novel aspect of mRNA metabolism might reflect a general retrocontrol of gene expression by its mRNA products.

INTRODUCTION

RNA interference (RNAi) is a mechanism conserved among most eucaryotes by which dsRNA triggers a sequence-specific post-transcriptional gene silencing (8, 12). The effectors of RNAi are short RNA duplexes (21-28 nt, small interfering RNA, siRNA) and since the demonstration that, in mammalian cells, siRNA of 21-23 nt could be used to specifically induce the degradation of the homologous RNA (3, 7), RNAi has been widely used to conduct functional studies (6, 35). The RNA Induced Silencing Complex (RISC) contains one of the strands of the siRNA duplex which serves as a guide to identify target RNA by sequence complementarity (21). Several proteins are also part of RISC, including a member of the Argonaute family (36). The interaction of RISC with its target can result in mRNA degradation or translation arrest depending upon the level of complementarity between the guide sequence and its target. In addition, it is now apparent that siRNA can also initiate transcriptional silencing when incorporated into a related complex, RITS (RNA Induced Initiation of Transcriptional Silencing) (18, 37). While translational arrest and transcriptional silencing are expected to take place in the cytoplasm and in the nucleus, respectively, it is at present unclear whether the sequence specific nuclease activity is restricted to the cytoplasm or can also occur in the nucleus.

The endonuclease Argonaute 2 (Ago2) is an essential RISC component and together with a guide RNA can reconstitute the sequence-specific nuclease activity *in vitro* (22, 29). Assays conducted with fractionated *D. melanogaster* and human cell extracts led to the identification of a sequence-specific cleavage activity in the cytoplasm. In *D. melanogaster*, the cleavage activity co-fractionated with polysomes in S2 cells (11) whereas, in embryo lysates, it was found in an 80S cytoplasmic complex (27). In mammalian cells, Ago2 and short RNA sequences have been localised in the cytoplasmic P-bodies (13, 19, 28, 32) which have been proposed to be the sites of active mRNA degradation and / or storage (2, 4, 33). Importantly, many observations have led to the conclusion that nuclear transcripts cannot be targeted by RNAi. Thus, in *C. elegans* and *T. brucei*, dsRNA targeting intronic sequences did not induce a detectable silencing (8, 26). In HeLa cells, an siRNA targeting one alternative exon of the ShcA gene did not silence the other isoforms although they all share a common precursor (15). Finally, it has been shown that a reporter RNA which is retained in the nucleus in the absence of the Rev protein was not silenced by an siRNA (40).

Transcriptional silencing has to take place in the nucleus and, in the case of *S. pombe*, it involves the unique argonaute protein of this organism which is also responsible for sequence-specific cleavage of mRNA (34). In mammalian cells, the ability of siRNA to induce transcriptional silencing has recently been established (14, 23). In addition, two recent reports demonstrated that siRNA and short hairpin RNA (shRNA) can induce the degradation of nuclear transcripts in human cells (17, 30), provided that these transcripts are retained within the nucleus. However, while these observations establish the existence of a sequence-specific nuclease activity in the nucleus, its targets and its impact on gene expression are still unclear.

Herein, we investigated the impact of siRNA on the nuclear metabolism of two Pol II genes expressed in murine NIH 3T3 cells. We used two reporter genes whose maturation pathways have been well characterized, the murine lymphotoxin- α (LT α) and the rabbit β -globin (1, 38). In addition, these genes are under the control of a tetracycline regulated promoter (9) (Tet off version) allowing the specific arrest of their transcription by tetracycline and enabling the study of their kinetics of degradation (1, 38). Importantly, the accumulation of the corresponding precursors and mature mRNA within the nucleus is sufficient to allow a quantitative analysis of their metabolism (1). Using a combination of steady-state and kinetic analyses, we established that an siRNA can induce a decrease of the mature transcript in the nucleus which is caused by an accelerated turn-over. We further showed that splicing intermediates can also be targeted by siRNA but that the efficiency of silencing is determined by a kinetic competition between the interference and maturation processes. Finally, we observed that the siRNA-induced degradation of mRNA can be associated with an accumulation of the corresponding precursor RNA which can be ascribed by kinetic analysis to an increased synthesis of transcripts.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and transfection

NIH 3T3 cell lines expressing the murine LT α (tTA-LT- α) and the rabbit β -globin (tTA- β -glo) genes under the control of the Tet promoter have been previously described (38). Cells were routinely maintained in Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 0.8 μ g/ml of puromycin, 125 μ g/ml of hygromycin and 800 μ g/ml of Geneticin sulfate. For transfection procedures and kinetic studies, puromycin, hygromycin and Geneticin sulfate were omitted. To arrest transcription, the medium was replaced by medium supplemented with 1 μ g/ml tetracycline.

Transfection was performed using a standard calcium phosphate procedure (31). 24h before transfection, 5×10^5 cells were seeded in 85 mm dishes.. The siRNA was diluted with 1 mM Tris pH 7.8, 0.1 mM EDTA to a final volume of 220 μ l. 30 μ l of 2 M CaCl₂ and 250 μ l 2 $\times$ HBS were added (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 10 mM KCl and 1.5 mM Na₂HPO₄, adjusted to pH 7.05 with NaOH) and precipitation was triggered by bubbling air through the solution. After 20 min, the 500 μ l precipitate was added to one dish.

siRNA sequences and preparation

siRNA targeting the LT α gene have the following sequences: siLT α 1 sense and antisense strands are GCAGAACUCACUGCUCUGGUU and CCAGAGCAGUGAGUUCUGCUU, respectively; siLT α 2 sense and antisense strands are CAGGUGGUUUUCUCUGGAGAAAdTdT and UUCUCCAGAGAAAACCACCUGdTdT; siLT α 3 sense and antisense strands are UAACCUGGAGCUCUCACGGUU and CCGUGAGAGCUCCAGGUUAUU.

siRNA targeting the β -globin gene have the following sequences: si β Glo1 sense and antisense strands are GGUGAAUGUGGAAGAAGUdTdT and AACUUCUCCACAUUCACcdTdT, respectively; si β Glo2 sense and antisense strands are GGCUCAUGGCAAGAAGGUGdTdT and CACCUUCUUGCCAUGAGCCdTdT.

siRNA were purchased either from Dharmacon[®] (Lafayette, Colorado) as single strands, or from Ambion[®] (Austin, Texas) as a duplex. After deprotection according to the manufacturer's instructions, sense and antisense strands were mixed in 500 μ l annealing

buffer (100 mM potassium acetate, 30 mM HEPES pH 7.4, 2 mM magnesium acetate) at the final concentration of 10 μ M of duplex, denatured for 2 min at 95°C and annealed for 1 h at 37°C.

For dose response assays, cells were transfected with the following amounts of siRNA for 10⁶ cells: 0, 3.75, 7.5, 75, 375, 750 pmol for siLT α 1, 2, and 3, 0, 9.5, 19, 38, 75, 150 pmol for si β Glo1 and 0, 3.7, 15, 38, 150, 375 pmol for si β Glo2.

RNA extraction and analysis

Nuclear and cytoplasmic fractions were obtained following NP-40 lysis in the presence of 10 mM EDTA to dissociate polysomes from the nuclear envelope, as described previously (38). By confocal microscopy we have shown that under these conditions the cytoplasmic contamination of the nuclear fraction amounts to about 4% of the nuclear polyA⁺ RNA. RNA was extracted by denaturation in guanidine thiocyanate prior to ultracentrifugation over a cesium chloride cushion. The concentration of purified RNA was determined by spectrophotometry.

For Northern blots, 4 μ g of RNA was electrophoresed through 1.2% agarose-formaldehyde gels, transferred onto an uncharged nylon membrane, and hybridized with ³²P-labeled DNA probe (LT α) or ³²P-labeled riboprobes (β -globin, β -actin, cyclophilin), as described previously (1, 25). The cyclophilin probe contains nt 34 to 673 of the murine cyclophilin cDNA (GenBank accession number: X52803).

For RNase protection assays (RPA), 4 μ g of RNA was hybridized with 500 pg (LT α and β -globin probes), 1 ng (cyclophilin probe) or 2 ng (actin probe) of ³²P-labeled riboprobes, digested with RNases A and T1, and electrophoresed through 5% urea-polyacrylamide gels as described previously (1). The LT- α probes A and B were described earlier (25). The β -globin probe contains nt 598 to 1086 of the β -globin gene (GenBank accession number: K03256) and the protected fragments have a length of 484 nt for the intron 1-exon 2-intron 2 fragment, 384 nt for exon 2-intron 2, 232 nt for intron 1-exon 2 and 223 nt for exon 2. The β -actin probe protects nt 653 to 751 of the β -actin mRNA (GenBank accession number: X03672). The cyclophilin probe protects nt 468 to 673 of the cyclophilin mRNA (GenBank accession number: X52803).

Kinetic analysis

Kinetic data were treated as follows: after quantification of the radioactive signals with a Storm analyzer (Molecular Dynamics[®]), they were corrected for the number of labeled uridines and normalized with respect to the cyclophilin signal. Previous studies have shown the persistence of a basal level of transcription in the presence of tetracycline (38). This residual transcription, amounting to about 1/18 of the unrepressed transcription, was subtracted from the data before analysis. Signals too faint to be reliably quantified were omitted from analysis. The normalized data were presented in a semilogarithmic plot and an exponential fit was performed with Excel software (Microsoft[®]).

RESULTS

siRNA can decrease the nuclear accumulation of LT α mRNA

The LT α primary transcript contains 3 introns that are sequentially spliced according to a 5' to 3' order (Fig. 1A) and both the mature mRNA (N0) and the intron 3-containing transcripts (N1) are exported and accumulate in the cytoplasm giving the C0 and C1 species (39). In this study, we used a stable cell line (tTA-LT- α , an NIH 3T3 derivative) which expresses the LT α transcript under the control of the tetracycline-regulated promoter (38). We first evaluated the efficiency of three synthetic siRNA targeting exon 4 to reduce LT α RNA accumulation. Cells were transfected by the calcium phosphate precipitation technique with increasing amounts of siRNA and RNA were analyzed by Northern Blot 24h later. In NIH 3T3 cells, this procedure can induce an interference in more than 90% of the cells (data not shown). siLT α 1, siLT α 2 and siLT α 3 induced a global decrease of 50%, 75% and 34% of LT α RNA levels, respectively (Fig. 1B). siLT α 2, which was the most efficient, was used in the rest of this study.

Since the silencing is maximal at 16 and 24 h (data not shown), we assumed that at 24 h a new steady-state had been reached so that the observed accumulations reflected the half-lives of the transcripts under silencing. We first analyzed the accumulations of the LT α transcripts in the cytoplasm and in the nucleus, 24 h after the siLT α 2 transfection. As a control we used an siRNA directed against the rabbit β -globin mRNA (si β Glo2, see Fig. 6A) which has no matching target in this cell line. Cytoplasmic and nuclear fractions were

prepared using a lysis buffer containing mild detergents and 0,5 mM EDTA, see Materials and methods for details (38). RNA from both fractions were analyzed in an RNase protection assay (RPA) with a set of probes covering the three introns in order to distinguish among the LT α transcripts (Fig. 1A, probe A and B). A cyclophilin probe was used as an internal loading control. Figure 2A presents one example of raw data and figure 2B a quantification of the results from four independent experiments. For fully spliced mRNA, siLT α 2 induces a comparable decrease in the cytoplasmic (C0: - 50%) and the nuclear fractions (N0: - 40%). This suggests that the nuclear pool of mature mRNA can be silenced by siRNA to almost the same extent as in the cytoplasm. By contrast, for intron 3-containing containing mRNA, the 65 % decrease in the cytoplasm (C1) is associated with a ~ 10 % increase in the nucleus (N1), suggesting at first sight that these nuclear transcripts are immune from the siLT α 2-induced interference. Unexpectedly, the precursors N2 and N3 showed collectively a 40 % increase in accumulation (Fig. 2B), which can be further distributed by using probe A as a 60 % and 20 % increase of N3 and N2, respectively (Fig. 2D).

The accelerated turn-over of cytoplasmic transcripts account for their silencing

To investigate whether the decreases in mRNA accumulation in the cytoplasm and in the nucleus were due to an accelerated catabolism or to modifications of their maturation (e. g. at the level of splicing and transport), we measured the decay kinetics of these transcripts in the presence of siLT α 2 by exploiting the tetracycline regulation of their transcription. Tetracycline was added 24 h after siRNA transfection and the decay of LT α transcripts followed over 4 hours. We first analyzed cytoplasmic and nuclear RNA by Northern blot (Fig 3). In both compartments, the major species, corresponding to the fully spliced (N0, C0) and intron 3-containing transcripts (N1, C1) showed an accelerated decay in silenced cells. In addition, an accumulation of precursors was readily visible in the nucleus (Fig. 3B, right panel) even though this technique does not allow a complete characterisation of the LT α transcripts. Importantly, we were unable even after a prolonged exposure to detect the 3' fragment of 1100 nt generated by the endonucleolytic cleavage associated with siLT α 2, indicating that it is rapidly degraded upon the initial cleavage.

To determine more precisely the half-lives of the different transcripts, the same RNA from the cytoplasmic and nuclear fractions were analyzed by RPA with the LT α probe B (Fig

4 and 5). Fig. 4 B, D and 5 B, D present the results of the quantification of these assays following appropriate normalisation and background subtraction (see Materials and Methods). Time points before 50 min in the cytoplasm and 30 min in the nucleus were omitted from the determination of the half-lives since, after the transcription arrest, there is a prolonged production of N0 by splicing of the pre-existing N1 precursors, and of C0 and C1 by export of the N0 and N1 molecules (1). In all cases the transcripts decreased exponentially, indicating that the RISC activity can be described by a first order kinetics. This allowed us to derive half-lives for the different transcripts in the presence of either siβGlo2 or siLTα2 siRNA (Table 1).

In the cytoplasm, the half-life of the fully spliced mRNA C0 is reduced from 80 to 42 min in the presence of siLTα2. This twofold destabilization is in good agreement with the observed 50% silencing (fig 2 B). Similarly, the half-life of C1 is reduced from 193 to 71 min and this 2.7 fold destabilization is concordant with the - 64% decrease in accumulation (a 2.8 fold reduction). Taken together, these results establish that the reduced half-lives of the cytoplasmic species account for the observed silencing. Consequently, the siLTα2-induced interference does not induce any significant change in the flux of LTα mRNA exported from the nucleus.

siRNA accelerates the decay of nuclear transcripts

The kinetic analyses of Fig. 5 allowed a determination of the half-lives of the nuclear transcripts in the presence of siRNA. As suggested by the Northern blot of Fig. 3, the half-lives of both the fully spliced (N0) and intron 3-containing containing species (N1) were significantly reduced in the presence of siLTα2 (Fig. 5 and Table 1). For N0, its half-life was reduced from 92 min to 38 min, indicating either that N0 was actively degraded within the nucleus or that it was exported more rapidly. Since we already concluded that there was no change in the flux of exported molecules, this shorter half-life had to be due to an increased degradation. We have previously estimated, using a transcriptional induction, that the half-life of N0 transport from the nucleus is of the order of a few minutes in these cells and concluded that most of the mature mRNA which accumulate in the nucleus are not in the process of being exported (1). Thus, most of the N0 molecules are stored in the nucleus, in agreement with their long half-life in the presence of the control siRNA (92 min, Table 1), (38). Consequently, the observed 1.7 fold decrease in N0 accumulation (Fig. 2) could be ascribed

to

a 2.4 destabilization acting only on the stored molecules. The accelerated degradation of mature mRNA within the nuclear fraction supported the existence of a nuclear interference. In addition, these results indicated no major change in the flux of N0 generated by the splicing of N1 molecules.

The half-life of N1 was reduced 3-fold from 108 to 36 min by siLT α 2 interference, indicating that splicing, export or degradation of N1 was accelerated. Since there were no indications for a significant modification of the fluxes of N1 molecules through export (i. e. generating C1) or splicing (N0), the shorter half-life of N1 had to be due to a nuclear degradation. In addition, this kinetic analysis indicated that the fully spliced and the intron 3-containing transcripts were the target of a comparable interference ($t_{1/2}$ of 38 and 36 min for N0 and N1, respectively) when LT α transcription was turned off. This observation was at odd with the steady-state data of Fig. 2 which indicated that, if anything, there was a slight increase in N1 accumulation in silenced cells. This discrepancy between the steady-state and kinetic analysis should be considered in the light of the coupling between ongoing transcription and splicing that we have previously observed using the tetracycline-regulated promoter (1). Indeed, the half-life of N1 in control cells, that should mostly reflect the splicing of intron 3, is close to 2 hours (Table 1) while we measured formerly, in an ongoing transcription context, that this intron is spliced with an half-life of 7 min (1). Thus, the lack of a detectable silencing of N1 at steady-state reflects the fact that N1 molecules are spliced before the nuclease activity can significantly act on them. By contrast, when transcription is turned off, the slowing down of the intron 3 splicing enables the silencing of the N1 transcripts. Taken together, the results on N0 and N1 establish that the kinetic competition between maturation and interference will determine the steady state levels of nuclear transcripts.

RNAi is accompanied by a sequence specific accumulation of precursors

The steady-state analysis of LT α transcripts in the nucleus (Fig. 2) revealed an increased accumulation of N2 and N3 precursors upon siRNA transfection. This accumulation was also conspicuous in the Northern blot analysis of Fig. 3 and in the RNase protection assay of Fig. 5. As, after the synthesis of the primary transcript, there is no significant degradation of these transcripts during their maturation in the absence of silencing (1), their accumulation could

not be due to a stabilisation and required a modification of their production or their splicing. With respect to splicing, the kinetic analysis of Fig. 5 indicated that the N2/N3 precursors had a very similar half-life in control ($t_{1/2} = 13$ min) and silenced cells ($t_{1/2} = 12$ min) (Fig. 5B and D, Table 1). Thus, there was no indication that siLT α 2 induced a slowing-down of N3 and N2 splicing implying that their accumulation was due to a higher RNA synthesis.

To investigate whether the accumulation of precursors was specific of LT α , we turned to the β -globin gene, using an NIH 3T3 cell line (tTA- β -Glo) which express the rabbit β -globin gene. We have previously analyzed the maturation pathway of the β -globin transcripts in these cells and determined that each of the two introns was spliced with an half-life of the order of 1 min (1) (Fig. 6A). We first assessed the efficiency of two siRNA (si β Glo1 and si β Glo2, Fig 6A and 6B) and selected for further study the most efficient, si β Glo1 that knocked-down 90% of the β -globin mRNA (Fig. 6B). 24h and 48h after the transfection of si β Glo1, nuclear and cytoplasmic RNA were prepared and analyzed by RPA with a probe that enabled the identification of all the transcripts (Fig. 6A). In the nucleus, the level of fully spliced mRNA was reduced approximately 4-fold and 2-fold at 24 h and 48 h, respectively. Thus, for β -globin as for LT α , siRNA induced a decrease in nuclear accumulation of mature mRNA which was similar, albeit slightly less extensive, to what could be observed in the cytoplasm (- 90 % and - 75 % at 24 h and 48 h, respectively, data not shown). In addition, a significant decrease in the accumulation of β -globin precursors could be observed at 24 h (- 25 to - 45 % depending on the transcript) indicating that precursors could also be targeted by silencing. Nonetheless, at 48 h, an increased accumulation of the primary transcript as well as the partially spliced species was observed (+ 40 to + 60 %, Fig. 6B).

These observations on β -globin confirmed that mature nuclear mRNA constitute appropriate targets for silencing, with a steady-state impact almost as important as in the cytoplasm. In addition, at 24 h, si β Glo1 induced a decrease in precursor accumulation while for siLT α 2 the silencing of precursors was apparent only after transcriptional arrest. Finally, in spite of the accessibility of β -globin precursors to silencing, we observed an increased in their accumulation at 48h, extending the observation on LT α and suggesting that this effect could be masked by a simultaneous silencing.

DISCUSSION

Evidence for a nuclear RNA interference

In this study, we have used a combination of steady-state and kinetic approaches to assess the impact of siRNA on the LT α maturation pathway. We first observed, within the nuclear fraction, a reduced accumulation of mature LT α mRNA which is associated with an accelerated turn-over. This directly supports the possibility to induce a nuclear RNA interference by siRNA transfection. However, before reaching this conclusion, it is important to consider the nature of the nuclear mRNA population. Most of these mature mRNA are not in the process of being exported and are stored in the nucleus. This pool could be the result of either an incomplete export or a reimport from the cytoplasm. In this case, the reduction of the cytoplasmic pool by RNAi would be enough to induce a similar reduction in the nuclear pool. However, our measurement of a 40 min half-life within the nuclear fraction cannot be explained by a retrotransport since our previous observations have indicated that during changes in expression, an apparent equilibration of LT α transcripts between the nuclear and cytoplasmic compartments is achieved only after a few hours (1). Our results are therefore concordant with the observation that transcripts which are retained within the nucleus can be actively degraded by RNA interference (17, 30). It has been reported that, in mammalian cells, an active nuclear delivery of siRNA in the nucleus is a prerequisite for the induction of a nuclear activity, whether transcriptional or post-transcriptional (14, 17, 23, 30). Here we show that the calcium phosphate precipitation technique can be used to efficiently induce RNA interference in the cytoplasm as well as in the nucleus.

Kinetic parameters of RISC

In this study, the 5' and 3' fragments generated by RISC cleavage (10, 21) were undetectable indicating that, in living cells, the initial cleavage is the limiting reaction of the silencing process. Thus, our data provide the first *in vivo* kinetic analysis of siRNA programmed RISC. For all transcripts, we observed an apparent first order kinetics upon transcriptional arrest allowing the determination of half-lives. In the cytoplasm and the nucleus, the half-life of LT α mature mRNA is reduced to 40 min by RNAi indicating similar

kinetics for silencing in both compartments. This half-life is rather long in comparison to other nuclease reactions. However, it fits with the prediction of the most straightforward analysis of the silencing process, the change in half-life determining the efficiency of silencing. In the cytoplasm, the localisation of the essential RISC component Ago2 within the P-bodies (19, 28, 32) where enzymes that are involved in mRNA degradation accumulate (4, 33), provides a link between the initial cleavage and the cytoplasmic mRNA degradation machinery. It is currently unknown whether, in the nucleus, a similar proximity between RISC and the enzymes involved in RNA turn-over also exists. Moreover, beyond the presence of Ago2 in the nucleus (30), the nature of the nuclear RISC complex has yet to be determined.

Competition between splicing and RNA interference

The concordance between the reduction in half-life and the observed silencing which exists for mature mRNA does not hold for intron 3-containing transcripts. In this case, the accelerated degradation observed during a transcriptional arrest does not translate into a change in steady-state accumulation. While, as discussed below, an increase in primary transcript synthesis contributes to this result, we also have to take into account the coupling between ongoing transcription and splicing. Indeed, we have previously observed that the half-lives of LT α precursors upon addition of tetracycline were incompatible with their splicing kinetics determined either during a transcription induction or from their steady-state accumulations (1). We have therefore concluded that splicing of pre-existing transcripts is significantly slowed down (about tenfold) in the absence of transcription of the corresponding gene. Thus simple kinetic considerations suggest that most LT α transcripts are spliced before they could be targeted by RNA interference unless splicing is slowed-down by transcriptional arrest. Similarly, the export of mRNA from the nucleus occurs with a half-life of a few minutes explaining why the flux of cytoplasmic mRNA is unaffected by interference. By contrast, most of the mature mRNA present in the nucleus are stored and constitute accessible targets for interference.

This kinetic competition between pre-mRNA processing and RNA interference provides a framework to interpret the conflicting reports on nuclear RNA interference. Indeed, successes were associated with targeting stable nuclear transcripts (17, 30), while targeting precursors was usually ineffective. Moreover, while no nuclear silencing was observed in a study using a rev-regulated mRNA export (40) it is noteworthy that, in the absence of rev, the

transcripts do not accumulate in the nucleus, indicating that they are not stored but rapidly degraded. In this study, we observed a significant silencing of β -globin precursors at 24 h, directly illustrating that precursors are accessible to interference. Significantly, in kinetic studies (C. R., D. W., F. D. manuscript in preparation), si β Glo1 induces a much more rapid cleavage ($t_{1/2} < 10$ min) than siLT α 2 ($t_{1/2} \sim 40$ min) in agreement with the kinetic competition between silencing and processing.

Increased accumulation of primary transcripts

siLT α 2 silencing leads to an increased accumulation of the LT α precursors N3 and N2. A priori, this could result either from an increased synthesis of primary transcripts or from a slowing down of splicing. We observed no change in the half-life of N3 and N2 in the presence of cognate or control siRNA, suggesting that the splicing of intron 1 and 2 is unaffected. It is important to note that while splicing is slowed down by a transcriptional shut-off, the relative rates are nonetheless preserved (e. g. when comparing the splicing of intron 1 and 2 with that of intron 3, Table 1). Therefore, these kinetic studies support the induction by RNA interference of a higher rate of primary transcript synthesis.

If splicing is unchanged by RNA interference, the 40 % increase in abundance of N2, N3 should translate into a similar augmentation of the flux of molecules. Assuming that most N1 transcripts are being spliced with a $t_{1/2}$ of 7 min, a silencing with a $t_{1/2}$ of 40 min should reduce their abundance by ~ 15 %, leading to the prediction that silencing would be more than compensated by the increased synthesis. We indeed observed a slight increase in N1 accumulation ($\sim 10\%$). Taken together, these results support an increased production of primary transcripts as the main cause of the precursor accumulation induced by RNAi.

To extend our observation on the accumulation of precursors, we turned to the silencing of the β -globin gene by an efficient siRNA. An increased accumulation of β -globin precursors was also observed at 48 h. Importantly, this response was specific to the siRNA targeting the expressed gene, as a lymphotoxin- α siRNA had no effect on β -globin transcripts. The kinetics of the response of β -globin to si β Glo1 differs from that of LT α to siLT α 2, most likely because of the difference in cleavage activity. Indeed, at 24 h, we observed a significant silencing of all β -globin nuclear transcripts whereas at 48h, the visualisation of the increase in precursors became possible as the interference was beginning to wane. Thus an increase in primary transcripts abundance was observed in two independent models of gene silencing.

An increase in the level of precursor RNA has also been observed in the context of nonsense mediated mRNA decay (NMD) (24). This mechanism degrades mRNA that contain a premature termination codon (PTC), thus preventing the synthesis of truncated proteins (20). Genetic studies in *C. elegans* have indicated some overlap between the RNAi and NMD pathways (5). In common with RNA interference, NMD induces in the cases of “nucleus-associated NMD” a decrease of mature mRNA within the nuclear fraction. Moreover, quantification of precursors by RPA and *in situ* hybridization studies have shown that precursors of PTC-containing RNA accumulate to a higher level than their PTC- counterpart and could be detected near their site of transcription (24). In contrast with RNAi, NMD can be expected to act only on spliced transcripts and therefore to spare the precursors. Thus, the amplitude of the effects reported by Muhlemann, a more than 5 fold increase in (Ig)- μ precursors and a 3 to 4 fold one for (TCR)- β (24), could reflect this absence of competition between synthesis and degradation.

At present, we can only speculate on the underlying mechanism of this increased synthesis associated with RNA interference. Although siRNA can alter the transcription of a cognate gene this has only been associated, so far, with a repression of expression. In addition, the similarity between our results and those observed in response to a PTC highlights the possibility of a general response to transcript turn-over and suggests a negative retrocontrol of gene expression by their mRNA products. As, in the study of Muhlemann *et al.*, no significant increase of (Ig)- μ transcription was detected in spite of a five fold increase in precursors (24), we favour a post-transcriptional mechanism. Indeed, if factors involved in pre-mRNA 3' end formation are limiting, an accelerated turn-over in the vicinity of the gene could lead to higher rate of recycling and consequently to an increased production of primary transcripts. Such a simple self limiting feed-back loop could contribute to the stabilisation of gene expression by reducing fluctuations, while the localisation of highly expressed genes in a suitably rich environment could alleviate this limitation as has been observed for splicing factors (16).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the members of the research unit for discussions and critical reading of the manuscript. This research was supported by NRB. C. Ribet was the recipient of a BDI fellowship from the CNRS and M. A. Buccheri of a Marie Curie fellowship.

REFERENCES

1. **Audibert, A., D. Weil, and F. Dautry.** 2002. In vivo kinetics of mRNA splicing and transport in Mammalian cells. *Mol Cell Biol* **22**:6706-18.
2. **Brengues, M., D. Teixeira, and R. Parker.** 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**:486-9.
3. **Caplen, N. J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R. A. Morgan.** 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9742-7.
4. **Cougot, N., S. Babajko, and B. Seraphin.** 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* **165**:31-40.
5. **Domeier, M. E., D. P. Morse, S. W. Knight, M. Portereiko, B. L. Bass, and S. E. Mango.** 2000. A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **289**:1928-31.
6. **Dykxhoorn, D. M., C. D. Novina, and P. A. Sharp.** 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:457-67.
7. **Elbashir, S. M., W. Lendeckel, and T. Tuschl.** 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**:188-200.
8. **Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-11.
9. **Gossen, M., and H. Bujard.** 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5547-51.
10. **Haley, B., and P. D. Zamore.** 2004. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* **11**:599-606.
11. **Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach, and G. J. Hannon.** 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**:293-6.
12. **Hammond, S. M., A. A. Caudy, and G. J. Hannon.** 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* **2**:110-9.
13. **Jakymiw, A., S. Lian, T. Eystathiou, S. Li, M. Satoh, J. C. Hamel, M. J. Fritzler, and E. K. Chan.** 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol*.
14. **Kawasaki, H., and K. Taira.** 2004. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* **431**:211-7.
15. **Kisielow, M., S. Kleiner, M. Nagasawa, A. Faisal, and Y. Nagamine.** 2002. Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA. *Biochem J* **363**:1-5.
16. **Lamond, A. I., and D. L. Spector.** 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:605-12.

17. **Langlois, M. A., C. Boniface, G. Wang, J. Alluin, P. M. Salvaterra, J. Puymirat, J. J. Rossi, and N. S. Lee.** 2005. Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells. *J Biol Chem* **280**:16949-54.
18. **Lippman, Z., and R. Martienssen.** 2004. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**:364-70.
19. **Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon, and R. Parker.** 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.*
20. **Maquat, L. E.** 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:89-99.
21. **Martinez, J., A. Patkianowska, H. Urlaub, R. Lührmann, and T. Tuschl.** 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**:563-574.
22. **Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl.** 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15**:185-97.
23. **Morris, K. V., S. W. Chan, S. E. Jacobsen, and D. J. Looney.** 2004. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* **305**:1289-92.
24. **Muhlemann, O., C. S. Mock-Casagrande, J. Wang, S. Li, N. Custodio, M. Carmo-Fonseca, M. F. Wilkinson, and M. J. Moore.** 2001. Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription. *Mol Cell* **8**:33-43.
25. **Neel, H., D. Weil, C. Giansante, and F. Dautry.** 1993. In vivo cooperation between introns during pre-mRNA processing. *Genes Dev* **7**:2194-205.
26. **Ngo, H., C. Tschudi, K. Gull, and E. Ullu.** 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:14687-92.
27. **Pham, J. W., J. L. Pellino, Y. S. Lee, R. W. Carthew, and E. J. Sontheimer.** 2004. A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* **117**:83-94.
28. **Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, C. G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, and W. Filipowicz.** 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**:1573-6.
29. **Rivas, F. V., N. H. Tolia, J. J. Song, J. P. Aragon, J. Liu, G. J. Hannon, and L. Joshua-Tor.** 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* **12**:340-9.
30. **Robb, G. B., K. M. Brown, J. Khurana, and T. M. Rana.** 2005. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol* **12**:133-7.
31. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning, second edition ed, vol. old Spring Harbor Laboratory Press.
32. **Sen, G. L., and H. M. Blau.** 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* **7**:633-6.
33. **Sheth, U., and R. Parker.** 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**:805-8.
34. **Sigova, A., N. Rhind, and P. D. Zamore.** 2004. A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* **18**:2359-67.

35. **Silva, J. M., M. Z. Li, K. Chang, W. Ge, M. C. Golding, R. J. Rickles, D. Siolas, G. Hu, P. J. Paddison, M. R. Schlabach, N. Sheth, J. Bradshaw, J. Burchard, A. Kulkarni, G. Cavet, R. Sachidanandam, W. R. McCombie, M. A. Cleary, S. J. Elledge, and G. J. Hannon.** 2005. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet.*
36. **Sontheimer, E. J.** 2005. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:127-38.
37. **Verdel, A., S. Jia, S. Gerber, T. Sugiyama, S. Gygi, S. I. Grewal, and D. Moazed.** 2004. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**:672-6.
38. **Weil, D., S. Boutain, A. Audibert, and F. Dautry.** 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**:962-75.
39. **Weil, D., S. Brosset, and F. Dautry.** 1990. RNA processing is a limiting step for murine tumor necrosis factor beta expression in response to interleukin-2. *Mol Cell Biol* **10**:5865-75.
40. **Zeng, Y., and B. R. Cullen.** 2002. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *Rna* **8**:855-60.

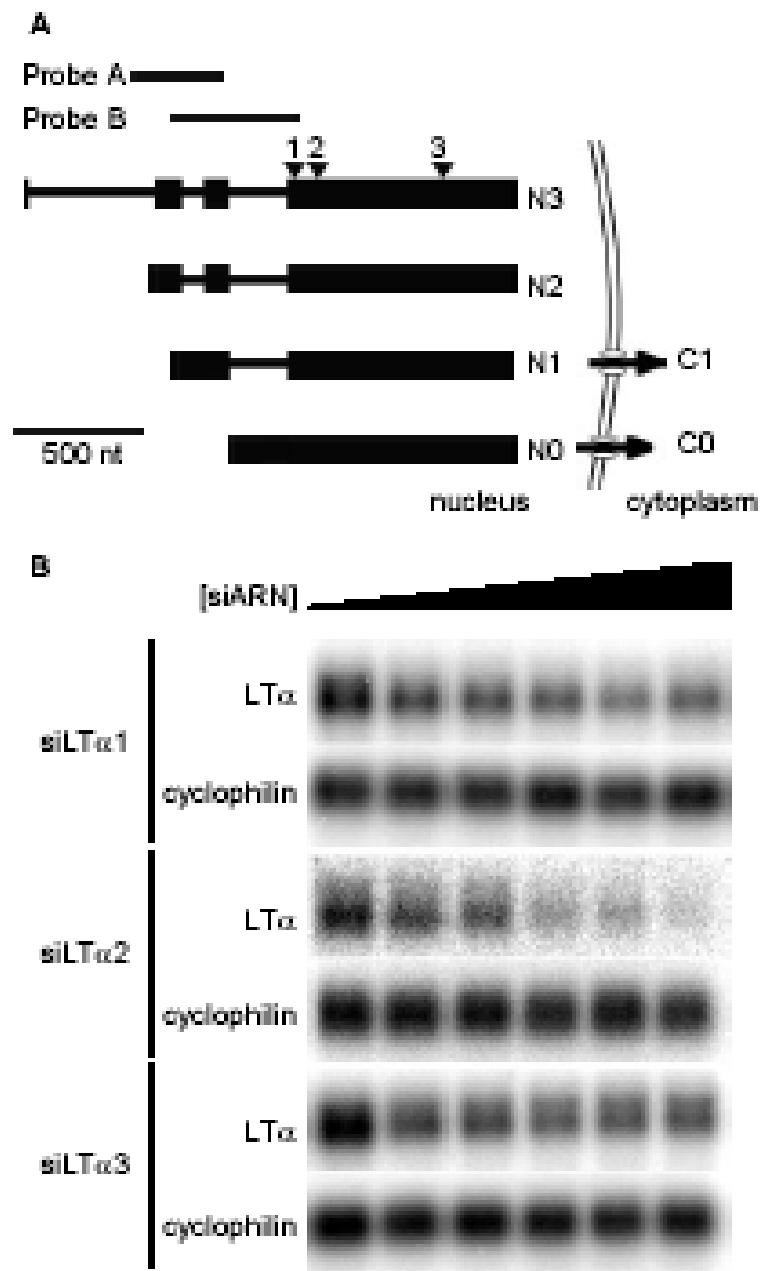


Figure 1: Maturation pathway and silencing of the LT α gene.

A. Nuclear processing and export of LT α messenger RNA. Boxes and lines represent exons and introns, respectively. Triangles indicate the location of the siRNA sequences, siLT α 1, 2 and 3. The location of the probes used in RPA is indicated at the top and the scale at the bottom.

B. Northern blot analysis of siRNA efficiencies. tTA-LT- α cells were transfected with increasing amounts of the indicated siRNA (0, 3.75, 7.5, 75, 375 and 750 pmol), total RNA was extracted 24 h later and analysed by Northern blot. The blot was successively hybridized with a LT α and a cyclophilin probe (upper and bottom lanes, respectively).

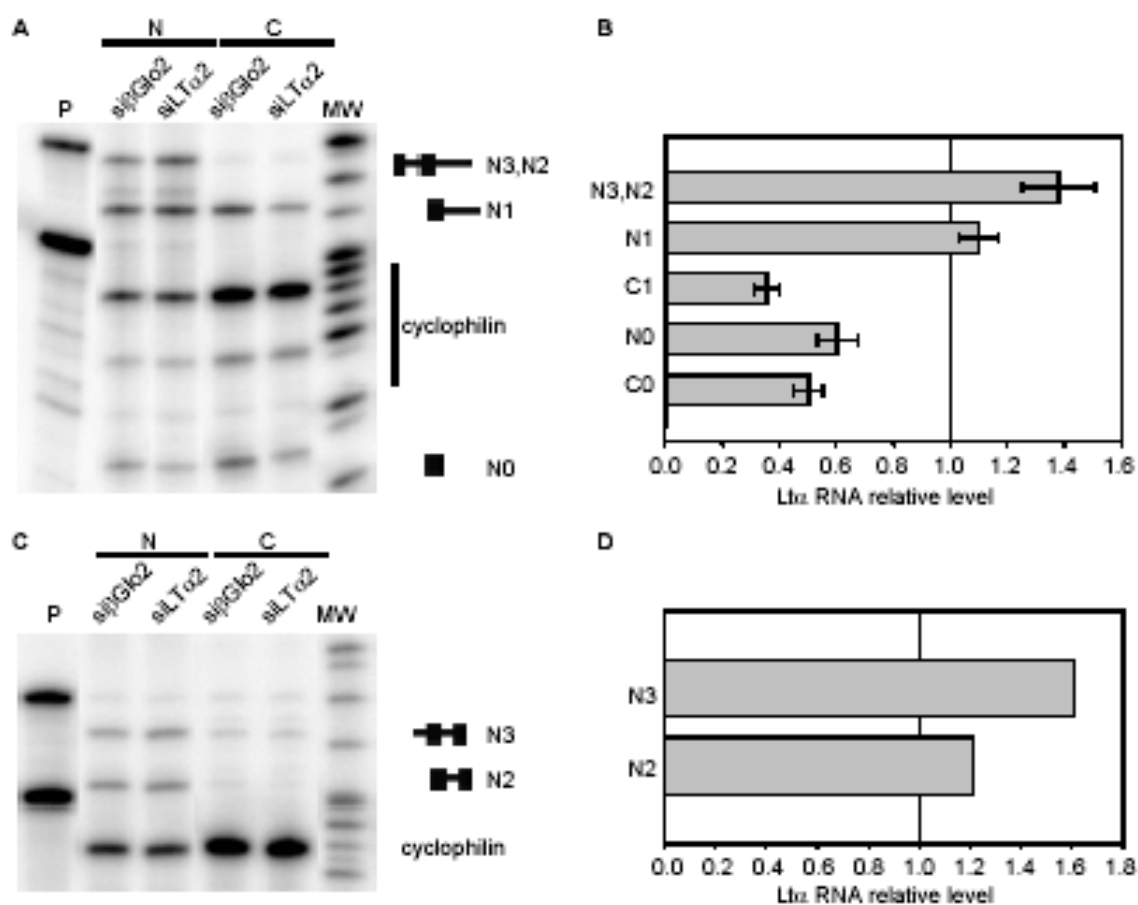


Figure 2: siLTα2 silencing alters the steady state accumulation of cytoplasmic and nuclear LTα transcripts.

A. RNase protection assay with probe B. Nuclear (N) and cytoplasmic (C) RNA were prepared 24 h after siRNA transfection and analysed by RPA. Equal amounts of nuclear and cytoplasmic RNA were analysed with a combination of LTα probe B (Fig. 1) and a cyclophilin probe as an internal control. Migration of the fragments protected by partially and fully spliced transcripts is indicated on the right. The molecular weight marker lane (MW) contains pBr322 DNA digested with Msp1. In the probe lane (P), the LTα and cyclophilin probes are the upper and lower bands, respectively.

B. Quantification of the RPA data as in (A). Raw data of four independent experiments were normalized with respect to cyclophilin. The histograms represent, for each transcript, the ratio of the signal in siLTα2 transfected cells to that of cells transfected with siβGlo2. Standard deviations are indicated.

C. RPA with probe A. The same samples as in (A) were hybridized with LTα probe A (Fig. 1) and the cyclophilin probe. The nomenclature is as in (A).

D. Quantification of the RPA data of panel (C), as in (B).

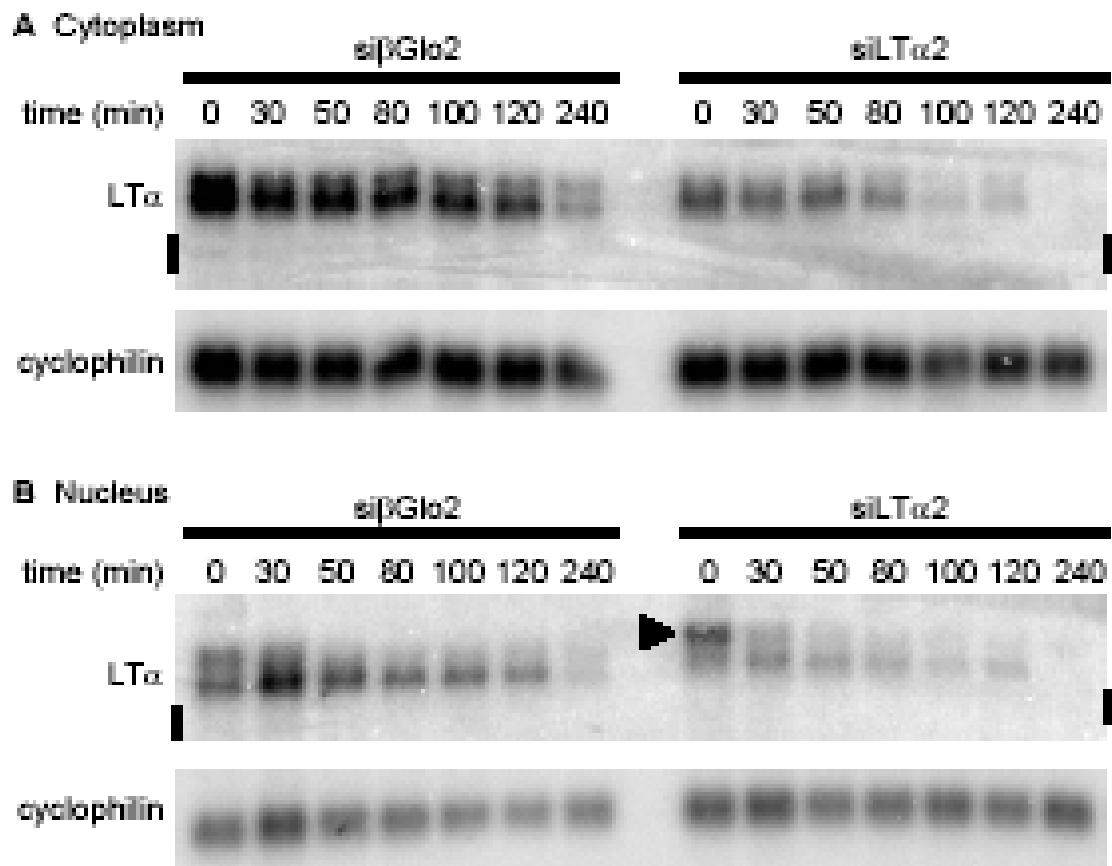


Figure 3: Northern blot analysis of siRNA-induced LTα RNA decay.

tTA-LT-α cells were transfected with siβGlo2 or siLTα2 and 24 h after treated with 1μg/ml of tetracycline. Nuclear and cytoplasmic RNA were prepared at the indicated times following tetracycline addition. Equal amounts of cytoplasmic (A) and nuclear (B) RNA were successively analysed by Northern blot with a LTα and a cyclophilin probe. The vertical bar indicates the expected migration of the LTα 5' fragment generated by RISC cleavage. The arrow points to the accumulation of LTα precursors.

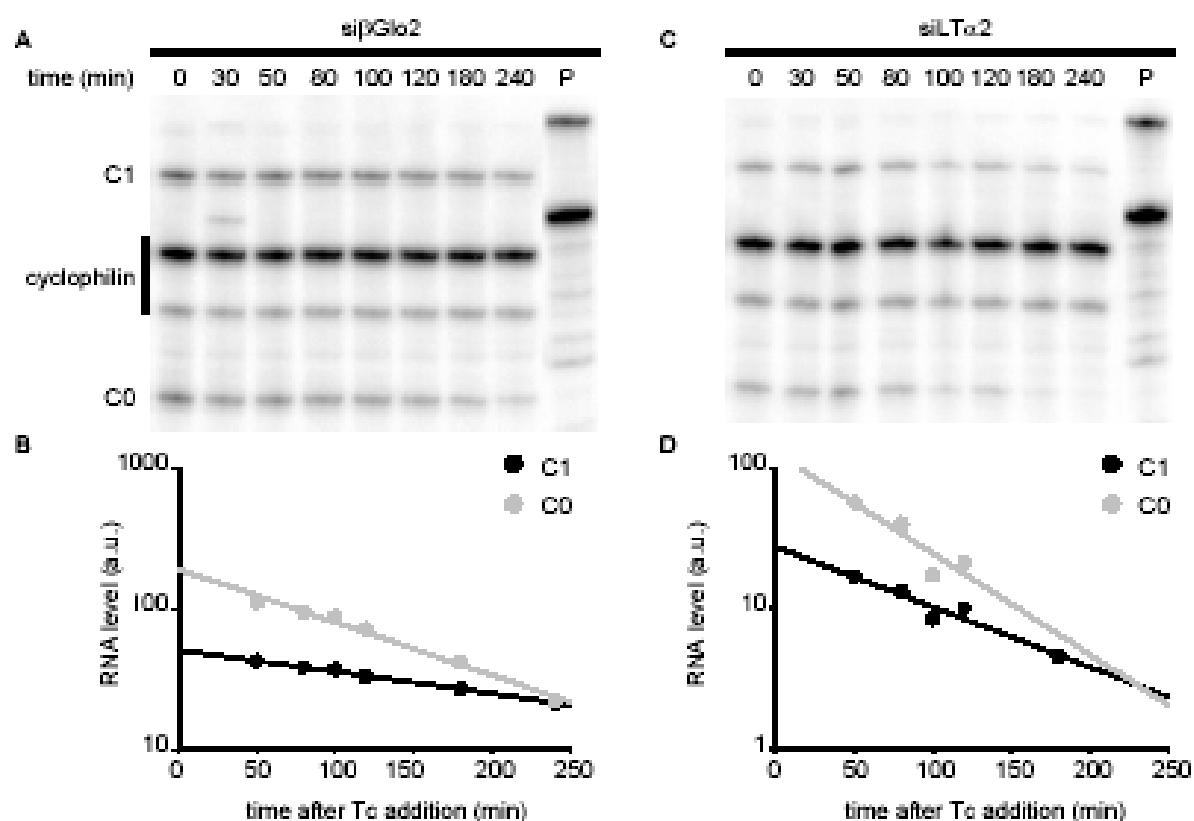


Figure 4: Kinetic analysis of cytoplasmic LTα RNA decay.

The cytoplasmic RNA samples used in Fig. 3 were analyzed by RNase protection assay with LTα probe B and the cyclophilin probe, as in Fig. 2A.

A, C: RPA of cytoplasmic RNA from siβGlo2 and siLTα2 transfected cells, respectively.

B, D: Quantification of the RPA data in (A) and (C), respectively. After quantification, normalization and background subtraction, LTα signals were plotted as a function of time (for details see material and methods). As discussed in the text, the earlier time points were omitted from the regression analysis.

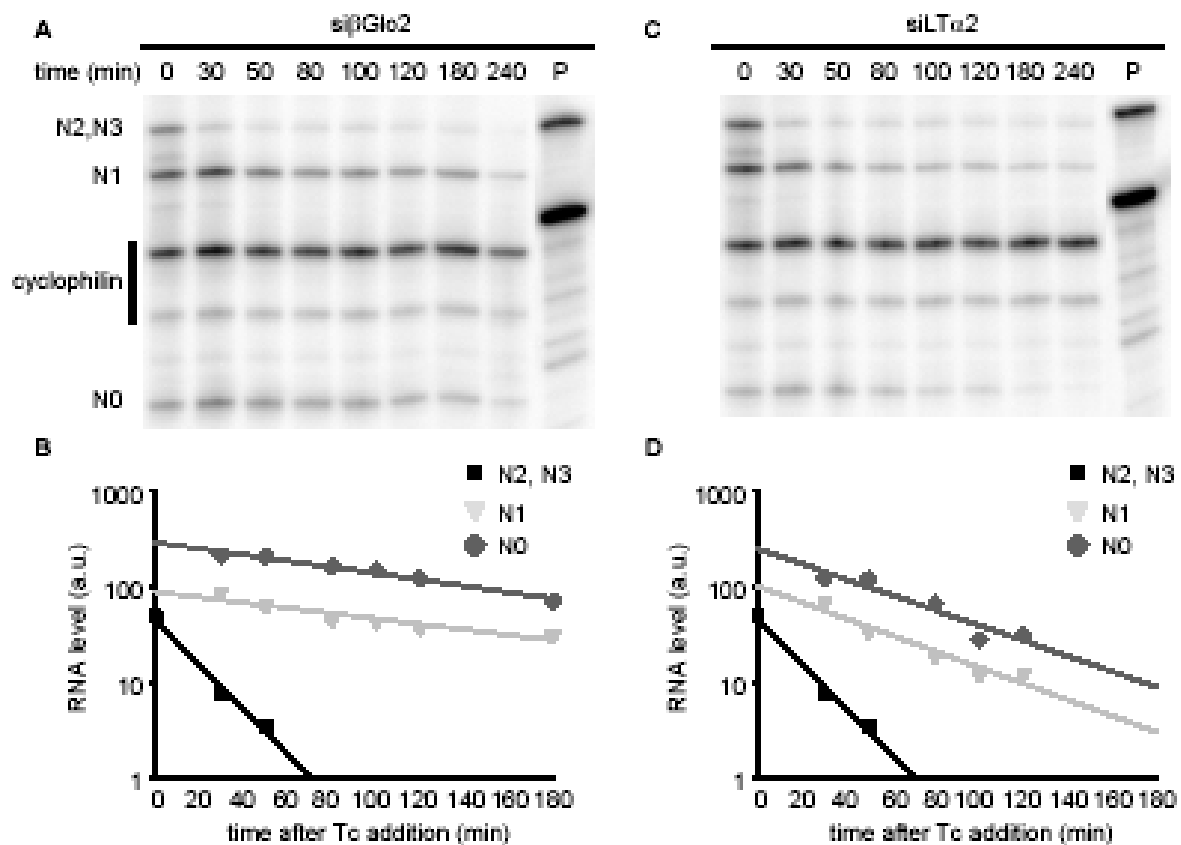


Figure 5: Kinetic analysis of nuclear LTα RNA decay.

The nuclear RNA samples used in Fig. 3 were analyzed by RPA as in Fig. 4.

A, C: RPA of nuclear RNA from siβGlo2 and siLTα2 transfected cells, respectively.

B, D: Quantification of the RPA in (A) and (C), respectively.

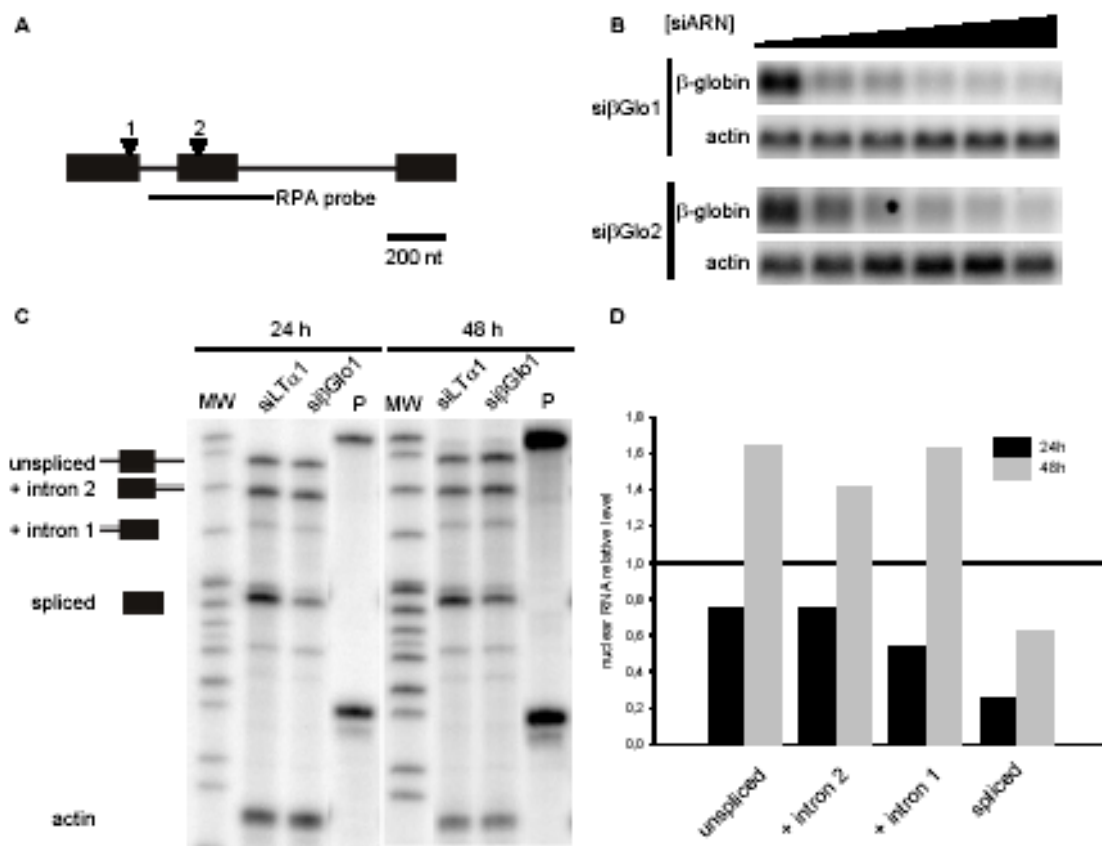


Figure 6: Increased accumulation of β -globin precursors 48 h after transfection with si β Glo1

A. Schematic representation of the rabbit β -globin gene. Boxes and lines represent exons and introns, respectively. Triangles indicate the location of the siRNA sequences, si β Glo1 and si β Glo2. The location of the probe used for RPA is indicated.

B. Northern blot analysis of siRNA efficiencies. tTA- β -Glo cells were transfected with increasing amounts of the indicated siRNA (0, 9.5, 19, 38, 75, 150 pmol), total RNA was extracted 24 h later and analysed by Northern blot. The blot was successively hybridized with a β -globin and a β -actin probe, as indicated.

C. RPA of nuclear RNA. tTA- β -Glo cells were transfected with the indicated siRNA. 24 h and 48 h after transfection, nuclear RNA was prepared and analysed by RPA with the β -globin RPA probe and a β -actin probe. The expected migrations of the protected fragments are indicated on the left.

D. Quantification of RPA data in (C). Following quantification, data were normalized to the β -actin signal. The histograms represent, for each transcript, the ratio of the signal in si β Glo1 transfected cells to that of cells transfected with siLT α 1.

Table 1: Kinetic parameters of LT α decay

^a) The half-lives were derived from the experimental data of Fig. 4 and 5, using the Excel software (Microsoft[®]) to identify the best fit for an exponential decay, the value of the corresponding coefficient of determination is indicated.

^b) The destabilisation factor is the ratio of the half-life in the presence of siLT α 2 to that in the si β Glo2 control.

	si β Glo2		siLT α 2		
transcript	t _{1/2} (min) ^a	R ²	t _{1/2} (min) ^a	R ²	destabilisation ^b
N2, N3	13	0.98	12	0.96	1
N1	108	0.86	36	0.92	3
N0	92	0.97	38	0.89	2.4
C1	193	0.99	71	0.93	2.7
C0	80	0.98	42	0.8	1.9

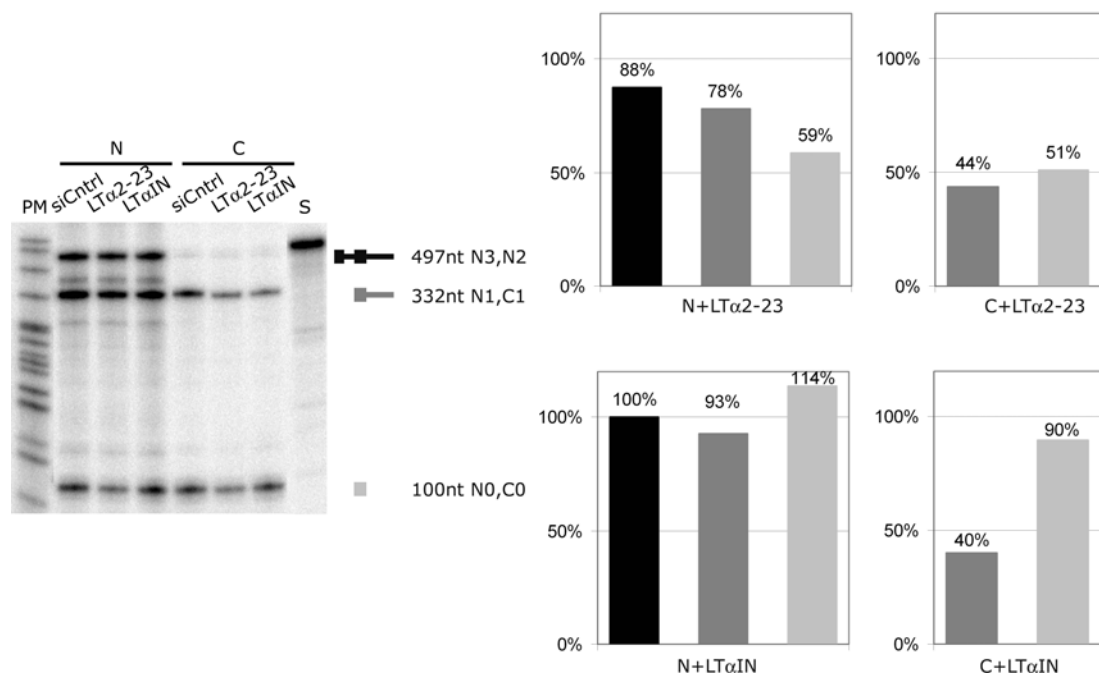


Figure 29: analyse des transcrits nucléaires et cytoplasmiques de lymphotoxine- α 16h après la transfection. La méthode est la même que celle utilisée dans la figure 27, sauf que les ARN sont extraits 16h après la transfection. L'ARN d'actine a été utilisé comme contrôle interne (non montré). Les signaux de chaque transcrit sont quantifiés et normalisés par rapport au contrôle interne. Les graphiques représentent le pourcentage d'ARN résiduel par rapport aux cellules ayant reçu le siARN contrôle. (haut:LT α 2-23, bas:LT α IN)

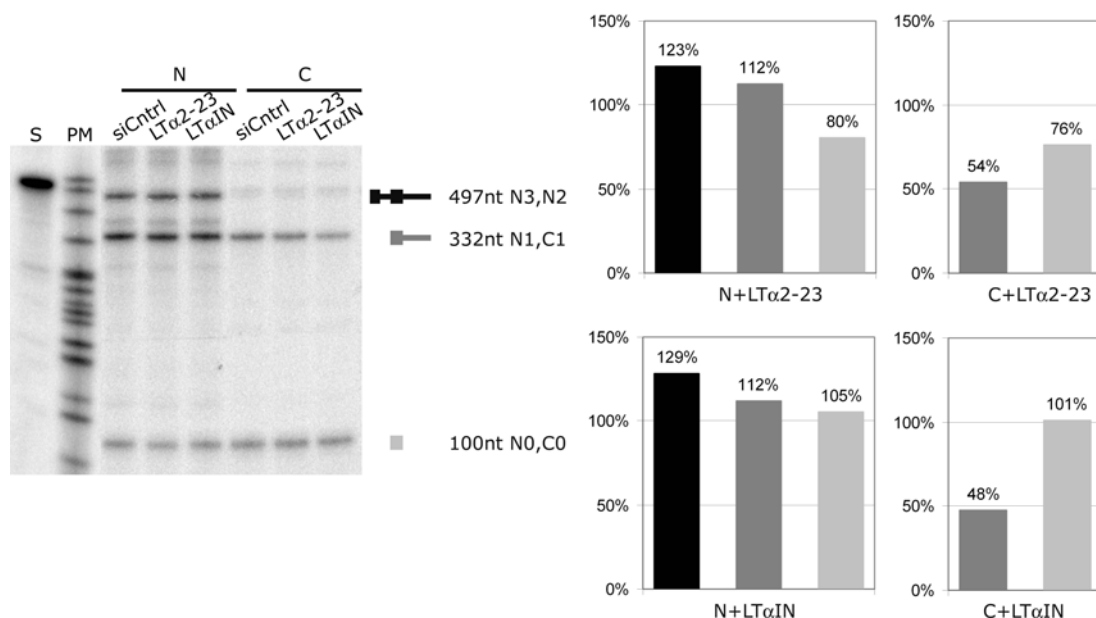


Figure 30: analyse des transcrits nucléaires et cytoplasmiques de lymphotoxine- α 30h après la transfection. La méthode est la même que celle utilisée dans la figure , sauf que les ARN sont extraits 30h après la transfection. L'ARN d'actine a été utilisé comme contrôle interne (non montré). Les signaux de chaque transcrit sont quantifiés et normalisés par rapport au contrôle interne. Les graphiques représentent le pourcentage d'ARN résiduel par rapport aux cellules ayant reçu le siARN contrôle. (haut:LT α 2-23, bas:LT α IN)

3. Evolution de l'effet des siARN sur l'accumulation des ARN nucléaires.

Lors de l'analyse des ARN nucléaires de lymphotoxine- α 24h après la transfection de divers siARN (cf. figure 27), seul LT α 2-23 a montré une activité nucléaire importante au niveau de l'accumulation des transcrits. Cependant, l'étude du siARN β Glo1 sur les transcrits nucléaires de β -globine indique que l'augmentation des transcrits primaires peut être observée lorsque la dégradation due à l'ARNi n'est plus à son maximum d'activité. J'ai donc quantifié les ARN nucléaires de lymphotoxine- α 16h et 30h après la transfection de LT α IN et LT α 2-23 afin, d'une part, de déterminer si LT α IN a une activité nucléaire qui était inobservable au temps 24h et, d'autre part, d'analyser la mise en place dans le noyau de l'effet de LT α 2-23.

16h après la transfection de LT α 2-23, la diminution des ARN matures cytoplasmiques (C0) est déjà à son maximum (- 49%, cf. figure 29) et le pool des ARN matures nucléaires (N0) est aussi réduit de 41%, ce qui indique que le siARN induit des diminutions de même ordre de grandeur dans le noyau et dans le cytoplasme à 16h et à 24h. Cependant, contrairement à ce qui est observé à 24 h, les autres espèces nucléaires (N1, N2 et N3) diminuent toutes légèrement (cf. figure 29).

Ce même siARN, 30h après transfection, a une activité plus faible dans le cytoplasme sur les ARNm matures C0 (- 24%, cf. figure 30). Là encore, les transcrits matures nucléaires diminuent de manière similaire (- 20 %). En revanche, l'accumulation des précurseurs N1, N2 et N3 augmente de 29% pour N2 et N3 et de 12% pour N1. Ces variations sont proches de celles observées 24h après la transfection de LT α 2-23. Ces données suggèrent qu'il existe un décalage entre la phase de dégradation et la phase d'accumulation des précurseurs.

La même étude a été effectuée pour le siARN LT α IN. A 16 h, il n'y a pas de modification des transcrits nucléaires de lymphotoxine- α , bien que son activité cytoplasmique soit quasiment maximale (-60% sur C1, cf. figure 29). 30h après transfection, l'efficacité de l'interférence sur les ARN matures cytoplasmiques C1 est moindre (-52%, cf. figure 30) mais les précurseurs s'accumulent : + 29% pour N2 et N3 et +12% pour N1. Ces données suggèrent que LT α IN, comme LT α 2-23, peut induire une accumulation des transcrits primaires de lymphotoxine- α après la phase maximale de dégradation.

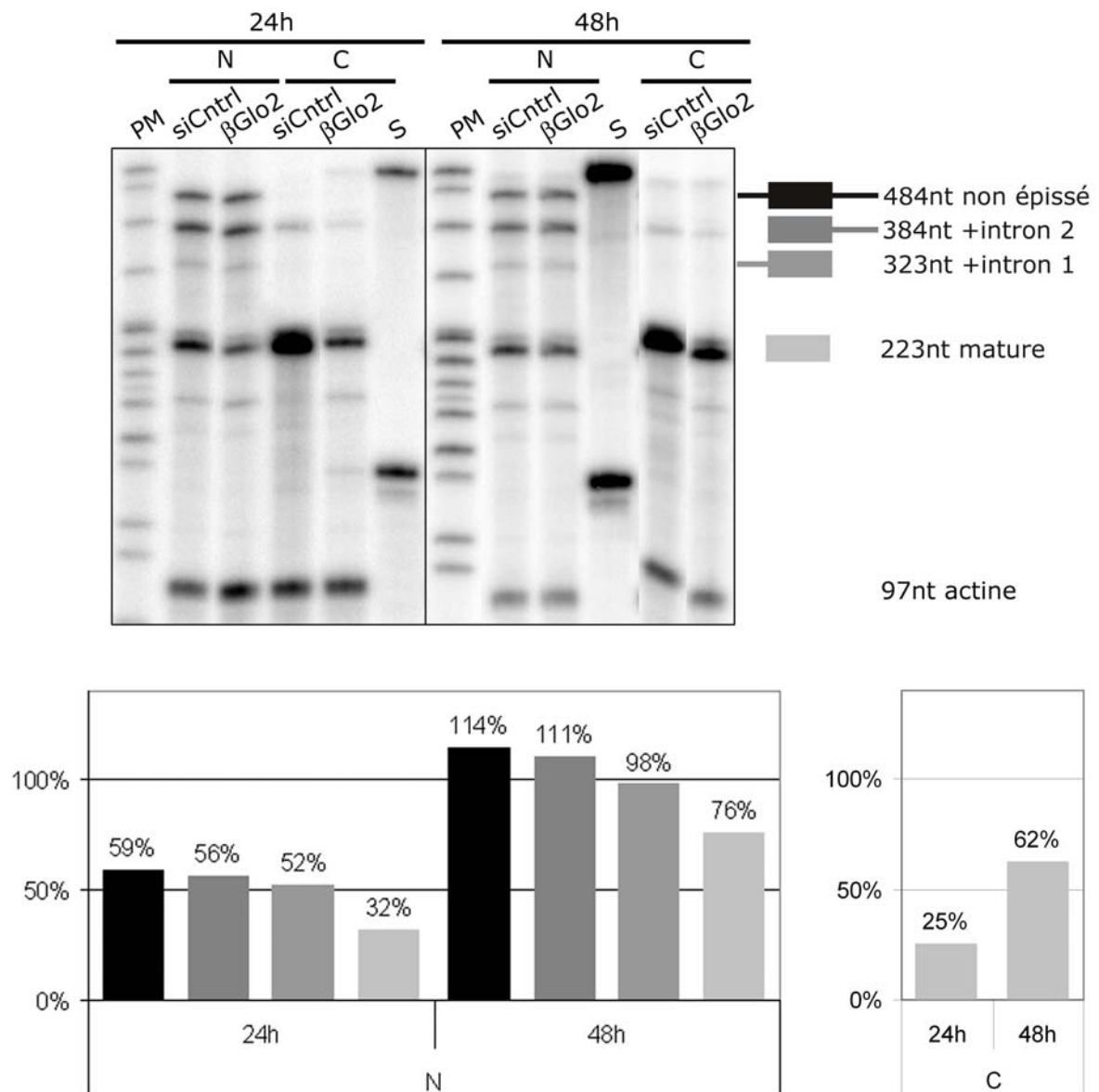


Figure 31: analyse des transcrits nucléaires et cytoplasmiques de β -globine 24h et 48h après la transfection. Les cellules tTA- β -glo sont transfectées avec 300 pmol de siARN contrôle ou β Glo2 puis 24h et 48h après, les ARN des fractions nucléaire et cytoplasmique sont extraits et analysés par cartographie à la RNase avec la sonde *gloMAP*. L'ARN d'actine est utilisé comme contrôle interne. Les signaux de chaque transcrit sont quantifiés et normalisés par rapport au contrôle interne. Les graphiques représentent le pourcentage d'ARN résiduel par rapport aux cellules ayant reçu le siARN contrôle.

4. L'accumulation des pré-messagers peut être observée sur un autre gène

Dans l'article, nous avons généralisé l'effet des siARN sur l'accumulation des pré-messagers grâce au modèle β -globine. Nous avons montré que β Glo1 induisait une diminution de tous les transcrits nucléaires 24h après la transfection, puis une accumulation de 60% des transcrits primaires et des intermédiaires de maturation 48h après la transfection. Ainsi, cette accumulation des précurseurs peut être observée sur un autre gène, mais avec une cinétique différente.

J'ai aussi analysé l'impact nucléaire du siARN β Glo2. 24h après la transfection de β Glo2, tous les ARN nucléaires de β -globine sont diminués (cf. figure 31): le pré-messager et les intermédiaires de maturation baissent de 50% environ, et il reste 32% d'ARN mature. Ce profil rappelle les résultats obtenus avec β Glo1 où il restait environ 70% des précurseurs et 20% des matures dans le noyau (cf. article) et montre que ce siARN peut aussi induire la diminution des transcrits nucléaires de β -globine.

A 48h après la transfection, les transcrits primaires sont augmentés de 14%, les transcrits avec l'intron 2 de 11 % et ceux qui contiennent l'intron 1 ne sont pas modifiés de manière significative (cf. figure 31). Si ces résultats ne permettent pas de conclure sur la capacité de β Glo2 à induire une augmentation de l'accumulation des précurseurs, ils sont néanmoins compatible avec une transition entre une phase précoce où les précurseurs sont dégradés dans le noyau et une phase plus tardive où ils pourraient s'accumuler à des niveaux plus élevés.

Cette analyse indique que tous les siARN n'ont pas la même capacité à induire une augmentation de la synthèse d'ARN, bien que dans le cas de β Glo2, son efficacité d'inhibition de l'expression y compris dans le noyau aux temps précoces soit proche de celle de β Glo1.

Tableau 8: bilan des accumulations à l'équilibre des transcrits nucléaires de lymphotoxine- α , 24h après la transfection de LT α 2-23.

transcrit nucléaire	accumulation à 24h
N3	160%
N2	120%
N1	110%
N0	60%

5. Discussion

a. La sensibilité des transcrits nucléaires à l'ARNi dépend de la cinétique de leur maturation

L'analyse de l'impact de LT α 2-23 sur les transcrits nucléaires de lymphotoxine- α montre que les siARN peuvent affecter de manière différentielle les accumulations à l'équilibre des ARN dans le compartiment nucléaire. La mesure des demi-vies des transcrits dans les cellules qui ont été transfectées avec LT α 2-23 permet d'expliquer ces différences de réponse.

D'une part, les ARN pré-messagers s'accumulent probablement en raison d'une augmentation de la synthèse d'ARN, ce qui provoque une hausse du flux de précurseurs de lymphotoxine- α . Dans le cas de LT α 2-23, l'augmentation visible est de 60%. D'autre part, l'analyse des transcrits qui contiennent l'intron 3 montre que le ralentissement de la vitesse d'épissage permet qu'ils soient efficacement dégradés par l'interférence. Ceci souligne l'importance de la compétition entre les réactions de maturation des transcrits (épissage et transport) et la réaction de coupure par RISC.

De fait, dans le cas des transcrits de la lymphotoxine- α , aucune dégradation des transcrits en cours de maturation n'a été observée (Audibert, Weil et al. 2002). En présence d'une interférence, une augmentation de la synthèse des transcrits primaires devrait donc se répercuter sur les autres espèces nucléaires aux conséquences près de cette interférence. La diminution progressive de cette augmentation au cours de la maturation est en accord avec un modèle simple où au fur et à mesure que les transcrits restent dans le noyau ils sont progressivement affectés par l'interférence.

Ainsi, l'importance du différentiel d'accumulation entre les ARNm matures nucléaires N0 (- 40 %) et leurs précurseurs directs N1 (+ 10 %) reflète-t-il directement le fait que la majorité des ARN N0 soit en fait stockée dans le noyau avec une demi-vie de l'ordre de 90 min. Ceci les rend accessibles à l'interférence dont la demi-vie est de 42 min. Il existe par ailleurs des ARN N0 en cours d'exportation, mais outre que ceux-ci constituent une population minoritaire, la demi-vie du transport de ces ARNm a été estimée à quelques minutes (Audibert, Weil et al. 2002), ce qui les rend immuns vis à vis de l'interférence, du moins tant que les cinétiques de coupure ne sont pas significativement plus rapides. L'absence d'effet sur les ARN en cours de transport est en accord avec le fait que, dans le cytoplasme,

les données cinétiques et d'accumulation n'indiquent pas de modification du flux de molécules.

Les précurseurs contenant l'intron 3 (N1) proviennent de l'épissage des ARN N2 dont l'accumulation est de 120% dans les cellules transfectées avec LT α 2-23 or ils s'accumulent à hauteur de 110% indiquant une légère réduction du flux de molécules. La majorité de ces molécules sont épissées pour former les N0 ($t_{1/2} \approx 8$ min) et les ARN N1 restant sont soit stockés avec une demi-vie longue ($t_{1/2} \approx 108$ min) soit exportés rapidement ($t_{1/2} \approx 4$ min). Donc la dégradation par ARNi qui a une demi-vie d'environ 36 min devrait réduire au tiers les N1 stockés et devrait faire diminuer faiblement les N1 épissés et stockés, ce qui est compatible avec la situation observée à l'équilibre.

L'importance de l'effet observé sur les précurseurs N2 est par contre inattendu au vu des données cinétiques (l'épissage des introns 1 et 2 intervient avec des demi-vies de 0, 4 et 1, 2 min, respectivement). Il conviendrait donc d'étendre ces données pour en analyser le mécanisme sous-jacent.

En ce qui concerne le siARN LT α IN, qui cible une séquence de l'intron 3, il induit une dégradation des ARN cytoplasmiques contenant cet intron (C1), mais pas de ces ARN lorsqu'ils sont nucléaires (N1) que cela soit à 16h, 24h, ou 48h après la transfection. Cette situation n'est pas très différente de celle de LT α 2-23 et peut s'expliquer par des considérations cinétiques. En effet, à partir de la diminution de l'expression de C1 (- 60%) on peut estimer que la demi-vie de ces transcrits sous interférence est de l'ordre de 80 min au lieu de 193 en son absence. Compte tenu du fait que la majorité des transcrits N1 est en cours d'épissage avec une demi-vie de 7 min, un tel niveau d'interférence ne peut avoir qu'un impact limité sur l'accumulation de ces transcrits et seule la petite population d'ARN N1 stockée dans le noyau constitue une cible potentielle pour ce niveau d'interférence. En conséquence, l'absence de diminution des N1 ne signifie pas que ce siARN n'est pas actif dans le noyau.

b. L'ARNi induit une accumulation plus ou moins tardive des pré-messagers

Parallèlement à la mise en évidence de la dégradation des ARN précurseurs et matures par LT α 2-23, nous avons observé que ce siARN induit une accumulation des ARN pré-messagers. Un deuxième siARN ciblant la lymphotoxine- α et l'inhibition de β -globine

avec β -Glo1 ont confirmé ces résultats et ont aussi montré que la cinétique de l'apparition de l'accumulation des pré-messagers diffère entre les siARN.

L'utilisation de β Glo1 pour induire la dégradation de l'ARN de β -globine a permis d'observer la réduction des ARN matures nucléaires et une forte accumulation des pré-messagers, ce dernier phénomène n'étant visible que 48h après la transfection. En effet, 24h après la transfection, les niveaux des pré-curseurs, comme des ARN matures diminuent dans le noyau. Ceci pourrait correspondre à une cinétique complexe de la synthèse des ARN messagers en présence d'une interférence avec d'abord une diminution, puis une augmentation, ou plus simplement au fait que le siARN β Glo1, ayant une cinétique de dégradation plus rapide ($t_{1/2} = 10$ min à 24 h, mesurée sur les ARN matures) que celle des siARN LT α , a un impact plus fort sur l'accumulation des pré-curseurs. Dans une telle hypothèse il faut envisager que l'accumulation des pré-curseurs qui peut être observée à 48 h est la résultante de deux composantes, une augmentation de la synthèse et une dégradation par l'interférence. Le décalage observé entre l'efficacité maximale de dégradation et l'augmentation des pré-curseurs peut donc s'expliquer à la fois par une différence intrinsèque entre la réponse au niveau de la dégradation et celle au niveau de la synthèse, mais aussi par le fait que lorsque l'activité de dégradation diminue l'augmentation des pré-curseurs devient plus visible.

Le siARN β Glo2 fait diminuer les ARNm matures nucléaires mais il n'induit pas d'accumulation significative des transcrits nucléaires 48h après transfection. Ce siARN présente des caractéristiques voisines mais néanmoins légèrement moins fortes que celles de β Glo1 en termes d'efficacité et de vitesse de dégradation. Il est donc possible que des analyses à différents temps entre 24 et 48 h permettraient de mettre en évidence une accumulation des pré-curseurs. C'est notamment le cas pour LT α IN qui induit une accumulation des pré-messagers seulement à 30h, où une augmentation de leur accumulation de 29% a été observée. Ce résultat illustre la nécessité d'analyser les variations des ARN nucléaires à différents temps pour mettre en évidence une augmentation des pré-curseurs et indique aussi qu'une diminution nette de la population nucléaire n'est pas nécessaire pour que leur accumulation ait lieu.

RESULTATS ET DISCUSSION

partie IV

**Etude de l'incidence de la traduction
d'un messenger sur sa dégradation
par l'ARNi**

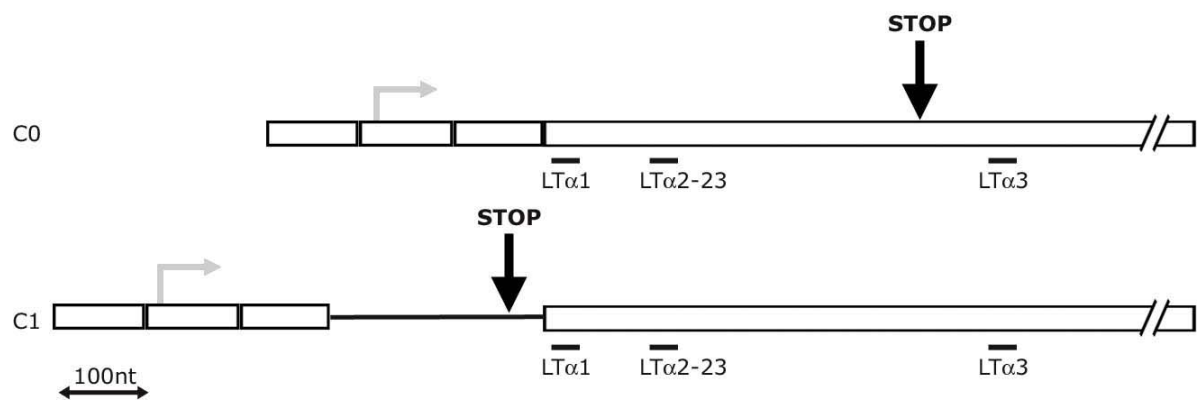


Figure 32: séquences codantes des deux messagers de la lymphotoxine- α . La représentation des transcrits C0 (en haut) et C1 (en bas) est la même que celle de la figure 3. La flèche grise représente la position du codon start et la flèche noire celle du codon stop.

partie IV : Etude de l'incidence de la traduction d'un messenger sur sa dégradation par l'ARNi

Lors de l'étude de la dégradation des ARN de lymphotoxine- α , nous avons observé que l'efficacité de la dégradation induite par LT α 1 diffère entre les deux transcrits cytoplasmiques: l'inhibition de l'expression est quatre fois plus importante pour les ARN avec l'intron 3 (-66%) que pour les ARN épissés (-15%, cf. figure 27A). Ce résultat met en évidence que l'efficacité d'un siARN ne dépend pas seulement de la séquence ciblée mais est aussi déterminée par son environnement au sein de la molécule d'ARN. Nous avons envisagé trois hypothèses qui pourraient rendre compte de cette différence d'efficacité sur une même cible : i) les deux ARNm n'ont pas la même stabilité au départ ce qui se traduirait par des sensibilités différentes à une même activité nucléasique, ii) les deux messagers diffèrent par l'organisation des régions codantes, une interaction entre traduction et interférence pourrait rendre compte de la différence d'efficacité puisque la séquence cible de LT α 1 est contenue dans l'ORF pour C0 et au-delà du codon stop dans C1 (cf. figure 32), iii) la séquence cible pourrait être masquée par le repliement 3d de l'ARN complètement épissé (C0) ce qui ne serait pas le cas sur l'ARNm contenant l'intron 3.

Si le fait que les ARN C1 soient plus stables que les ARN C0 en fait de meilleures cibles pour une nucléase qui aurait la même activité sur les deux messagers, l'amplitude de l'effet n'est pas compatible avec ce qui est observé. En effet les ARN C0 sont dégradés 2,4 fois plus rapidement que les ARN C1 (voir la section III, $t_{1/2}$ C1 = 193 min, $t_{1/2}$ C0 = 80 min). Si on prend en compte l'expression résiduelle de C1 (34%), on peut estimer l'inhibition de C0 qui devrait résulter d'une dégradation par l'ARNi qui aurait la même activité sur C0 et C1 (cf. annexe 2). Cette estimation prévoit qu'il devrait rester 55 % au lieu des 85% observés. De plus, dans cette hypothèse, le différentiel dans l'inhibition devrait être observé avec tous les siARN, ce qui n'est pas le cas. De plus les résultats obtenus avec les différents siARN suggèrent qu'il existe un lien entre la position du siARN à l'intérieur ou à l'extérieur de l'ORF et son efficacité. C'est pourquoi nous avons privilégié et tenté de démontrer qu'une interaction entre traduction et interférence était à l'origine de nos observations.

Lors de la mise en place de ce projet, les données sur l'interaction potentielle entre les machineries de traduction et de l'ARNi étaient peu nombreuses et ne permettaient pas de conclure sur l'existence d'une compétition ou d'une coopération entre les deux processus. Ainsi dans les oocytes de drosophiles, des ARNm quiescents résistent à l'interférence alors

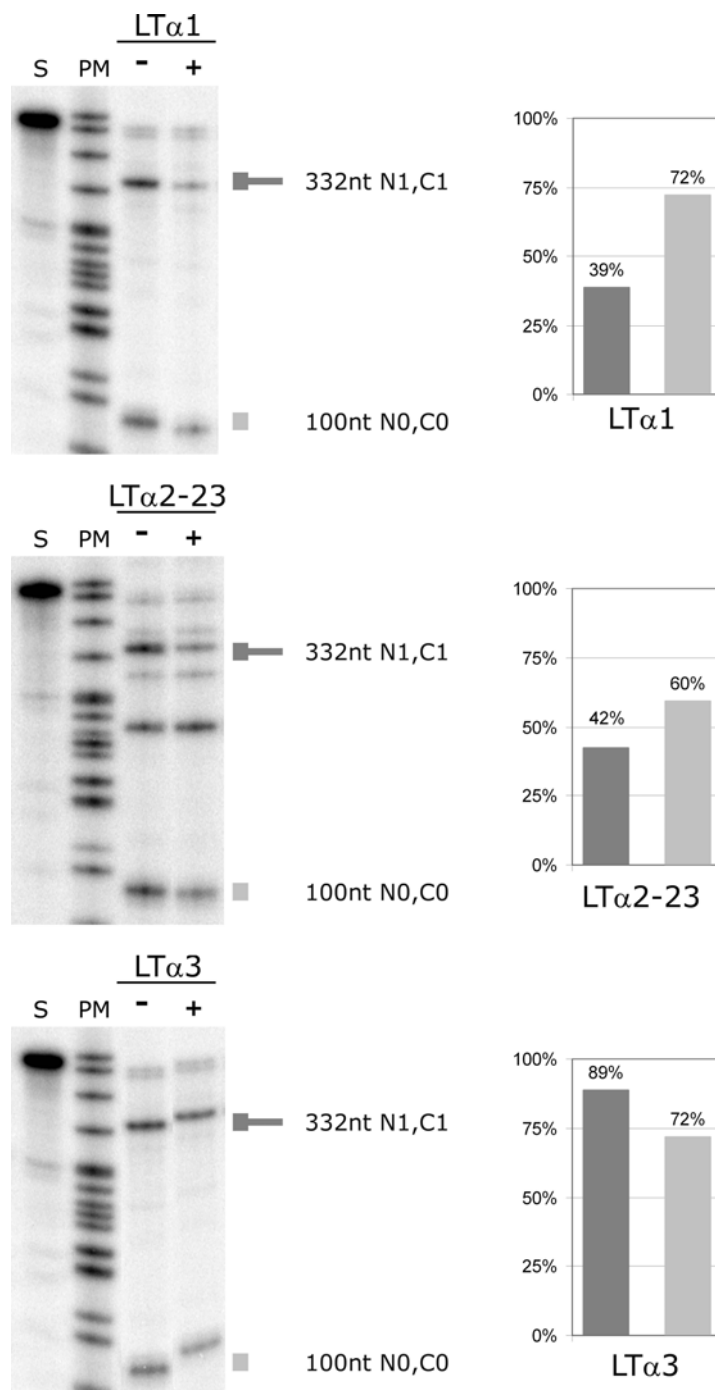


Figure 33: analyse de l'activité des siARN sur les deux messagers de la lymphotoxine- α . Les cellules tTA-LT- α ont été transfectées avec 375 pmol de LT α 1, LT α 2-23, LT α 3 ou avec un précipité de phosphate de calcium vide. 24h après, les ARN totaux sont extraits et analysés par cartographie à la RNase avec la sonde *LTaMAPb* (cf. figure 26). L'ARN d'actine est utilisé comme contrôle interne comme expliqué à la figure 28 (non montré). Les signaux sont quantifiés, normalisés par rapport à l'actine et le pourcentage d'ARN restant dans les cellules transfectées avec les siARN contre la lymphotoxine- α est calculé.

que les messagers en cours de traduction sont efficacement dégradés suggérant que la traduction pourrait être nécessaire à l'ARNi (Kennerdell, Yamaguchi et al. 2002). Au contraire, dans des lysats de drosophiles, le blocage de la traduction n'empêche pas l'activité de dégradation par ARNi (Zamore, Tuschl et al. 2000). Nous avons donc décidé d'analyser si la traduction de la séquence ciblée par un siARN a une incidence sur son efficacité de dégradation.

La deuxième partie de ces résultats présente le développement et l'utilisation d'un modèle cellulaire où la traduction du messenger de la lymphotoxine- α est régulée par le fer grâce au système IRE/IRP (élément de réponse au fer (iron response element) / protéine liant l'élément de réponse au fer (iron response binding protein)). Cependant des difficultés rencontrées dans la mise en œuvre de la régulation de la traduction par le fer ne nous ont pas permis de conclure à ce stade. En conséquence, nous n'avons pas pu conclure sur la contribution respective de la stabilité, de la traduction et de la structure 3d au différentiel de sensibilité des deux ARNm de LT α .

1. Le différentiel d'activité sur C0 et C1 est propre à chaque siARN ciblant l'exon 4 de la lymphotoxine- α

Afin de déterminer si la différence d'inhibition de C0 et C1 par LT α 1 est spécifique des transcrits ou du siARN, j'ai comparé l'impact de LT α 1, LT α 2-23 et LT α 3 sur les deux types d'ARN. J'ai transfecté les cellules tTA-LT- α avec 375 pmol de siARN et 24h après, j'ai extrait et analysé l'ARN total par cartographie à la RNase avec la sonde *LTaMAPb* (cf. figure 26). Les ARN d'actine ont été utilisés comme contrôle interne. Ces analyses portent sur de l'ARN total et ne font donc pas la distinction entre N1 et C1 ou N0 et C0, mais les ARNm cytoplasmiques sont très largement majoritaires (environ 90 % des ARN détectés), de plus, si les ARN nucléaires devaient introduire un biais il serait en faveur d'une moindre inhibition de N1/C1 puisqu'une grande partie des ARN N1 sont en cours d'épissage et échappent à l'interférence.

Après transfection de LT α 1, il reste 39% des messagers N1/C1 et 72% des NO/CO (cf. figure 33), ce qui confirme les résultats obtenus avec les ARN cytoplasmiques dans la partie III (cf. figure 27). LT α 2-23 qui cible une séquence située environ 100 nucléotides en aval du site de LT α 1 induit aussi une plus grande diminution des transcrits N1/C1 par rapport aux

N0/C0, mais cependant l'écart d'efficacité est plus faible car leurs accumulations respectives sont de 42% et 60% (cf. figure 33).

Au contraire, le siARN LT α 3 a une plus grande efficacité sur les messagers N0/C0 car leur accumulation est réduite à 72% tandis que celle de N1/C1 est de 89% (cf. figure 33). Les transcrits contenant l'intron 3 ne sont donc pas toujours plus sensibles que les matures à la dégradation par les siARN et par conséquent la plus grande stabilité de N0/C0 ne peut justifier à elle seule la différence d'inhibition entre les deux messagers.

Ces résultats mettent en évidence que l'écart de sensibilité des deux ARNm dépend du siARN utilisé: d'une part, LT α 1 et LT α 2-23 induisent une meilleure inhibition sur N1/C1 et, d'autre part, LT α 3 est plus efficace sur N0/C0. Or ces siARN diffèrent par la localisation de leur séquence cible par rapport au cadre ouvert de lecture. LT α 3 reconnaît une séquence qui est toujours en dehors de la séquence codante, tandis que la région correspondant à LT α 1 et LT α 2-23 est traduite dans les ARNm C0 et pas dans les ARNm C1. En conséquence, un lien fonctionnel entre traduction et interférence pourrait expliquer la différence de dégradation entre les deux messagers:

- dans les cas de LT α 1 et LT α 2-23, la traduction des régions cibles inhiberait la dégradation des messagers matures C0 par rapport aux messagers C1 où ces régions ne sont pas traduites,
- dans le cas de LT α 3, les efficacités sont peu différentes car la séquence cible n'est traduite ni dans C1, ni dans C0.

Afin de tester le rôle de la traduction, j'ai construit un modèle où la traduction des ARNm de lymphotoxine- α peut être modulée.

2. Développement d'une lignée exprimant la lymphotoxine- α dont la traduction est régulable par le fer

a. Mise au point d'une méthode pour détecter la lymphotoxine- α de souris

Pour développer un système qui permettrait de moduler la traduction de la lymphotoxine- α , il est nécessaire de pouvoir détecter cette protéine. J'ai donc mis au point un protocole de détection par immunofluorescence de la lymphotoxine- α . L'anticorps primaire est un anticorps monoclonal de hamster (AFB3) qui a été gracieusement donné par le Dr Jeff

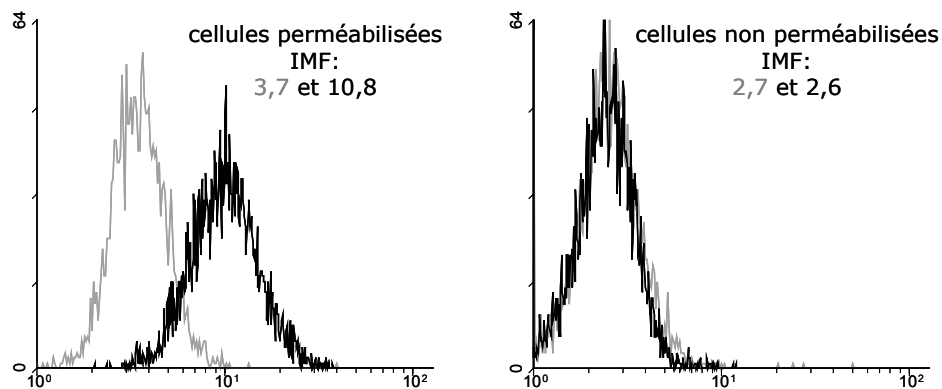


Figure 34: immunodétection de la lymphotoxine- α dans les cellules tTA-LT- α . Les cellules sont perméabilisées ou non, puis marquées avec l'anticorps AFB3. La détection se fait avec un anticorps secondaire fluorescent. La fluorescence est quantifiée par cytométrie en flux. Les histogrammes du nombre de cellules en fonction de leur intensité de fluorescence sont présentés. Trait gris: bruit de fond de l'anticorps secondaire. Trait noir: marquage avec l'anticorps AFB3. IMF: intensité moyenne de fluorescence.

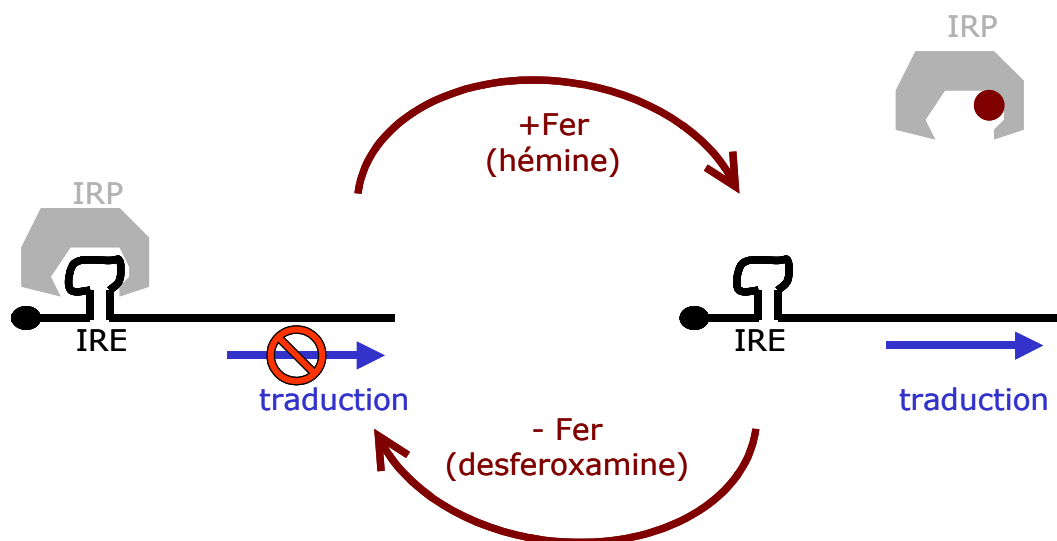


Figure 35: régulation de la traduction par le système IRE/IRP. L'IRE est une courte séquence qui a une conformation en tige-boucle. Lorsque la concentration en fer est faible, l'IRP se lie à l'IRE et empêche l'assemblage de la machinerie traductionnelle. La hausse de la concentration en fer induit le détachement de l'IRP, la tige-boucle IRE n'est plus stabilisée et l'ARN peut être traduit.

Browning (Biogen[®], Cambridge, USA) et qui reconnaît spécifiquement la lymphotoxine- α de souris (Browning, Sizing et al. 1997; Mackay, Bourdon et al. 1997) (cf. figure 36).

Dans les lymphocytes de souris, la lymphotoxine- α existe sous forme soluble et sous forme membranaire, cette dernière peut-être exposée à la surface de cellule ou être détectée au cours de la maturation intracellulaire de la protéine (Browning, Sizing et al. 1997). Comme le métabolisme de cette protéine dans la lignée tTA-LT- α n'est pas connu, j'ai marqué des cellules perméabilisées ou non afin de déterminer quelle méthode permettait d'avoir le meilleur signal. Les cellules tTA-LT- α sont marquées avec l'anticorps AFB3, puis celui-ci est détecté par un cocktail d'anticorps secondaires anti-hamster couplés au R-Phycoerythrine (BD Pharmingen[®]). Dans le cas où les cellules sont perméabilisées, elles sont d'abord fixées par un traitement au PAF 4%, puis perméabilisées dans du triton à 0,1%. L'immunofluorescence est ensuite détectée par cytométrie en flux.

Dans les cellules non perméabilisées, les profils de cytométrie montrent que la lymphotoxine- α n'est pas détectée au-dessus du bruit de fond de marquage du deuxième anticorps (cf. figure 34). En revanche, dans les cellules perméabilisées, le pic de fluorescence est décalé d'un facteur 3 par rapport au bruit de fond, et la majorité des cellules ont une expression détectable. L'anticorps AFB3 permet donc de détecter la protéine endocellulaire qui s'accumule à un niveau supérieur à celui de la membrane plasmique. Par la suite, la lymphotoxine- α a été détectée après perméabilisation des cellules par cytométrie en flux.

Afin d'augmenter le signal, nous avons traité les cellules pendant 4h avec de la bréfeldine A. Cet antibiotique bloque les voies de sécrétion des protéines et permet ainsi l'accumulation des protéines membranaires dans le réticulum endoplasmique. Cependant ce traitement n'ayant pas conduit à une augmentation du signal, la bréfeldine A n'a plus été utilisée.

b. Construction des clones stables

Pour réguler la traduction des messagers de la lymphotoxine- α , nous avons choisi d'utiliser le système IRE/IRP. L'IRE (Iron Response Element) est une courte séquence placée entre la coiffe et le site d'initiation de la traduction qui a une conformation en tige-boucle (cf. figure 35). Lorsque la concentration en fer est faible, l'IRP (Iron Regulatory Protein) se lie à l'IRE et empêche l'assemblage de la machinerie traductionnelle. La hausse de la concentration en fer induit le détachement de l'IRP, la tige- boucle IRE n'est plus stabilisée et

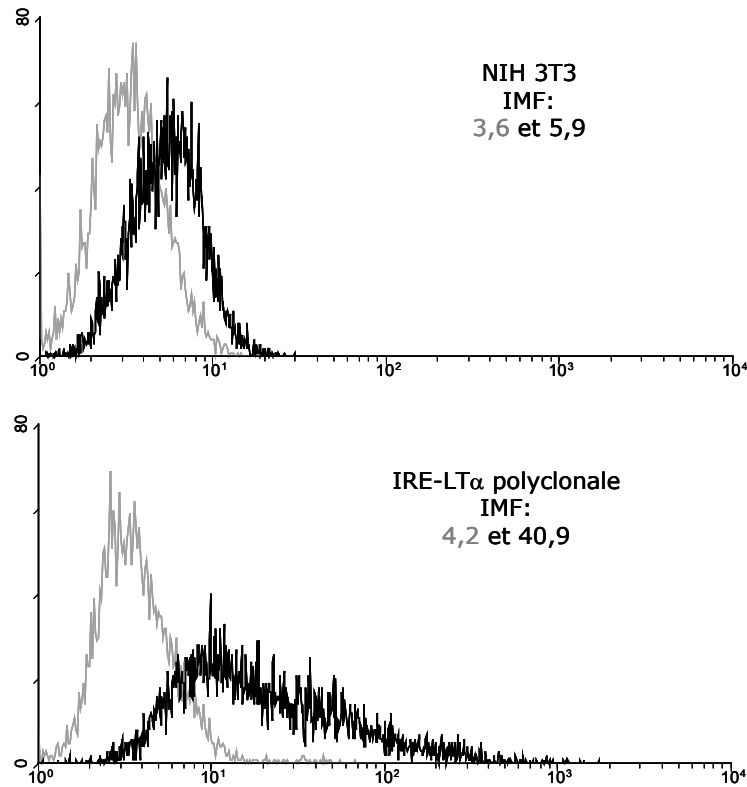


Figure 36: immunodétection spécifique de la lymphotoxine- α dans les cellules transfectées avec le vecteur IRE-LT α . Des cellules NIH 3T3 stablement transfectées avec le vecteur IRE-LT α ou non sont perméabilisées, puis marquées avec l'anticorps AFB3 et un cocktail de monoclonaux anti-hamster fluorescents. La fluorescence est quantifiée par cytométrie en flux. Trait gris: bruit de fond de l'anticorps secondaire. Trait noir: marquage avec l'anticorps AFB3. IMF: intensité moyenne de fluorescence.

l'ARN peut être traduit. Ce système participe à la régulation du métabolisme du fer, notamment en contrôlant la traduction de la ferritine (Hentze and Kuhn 1996; Menotti, Henderson et al. 1998).

Pour que le blocage de la traduction soit efficace, l'IRE doit être situé à moins de 60 nucléotides de la coiffe (Goossen and Hentze 1992). L'élément de régulation au fer de la ferritine humaine a donc été inséré à 28 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription de la lymphotoxine- α . La position de l'insert a été vérifiée par séquençage. La lignée tTA-LT- α que nous avons utilisée jusqu'à présent dérive d'une lignée NIH 3T3. Nous avons développé des clones de cellules NIH 3T3 exprimant stablement cette construction pour rester dans un système cellulaire homogène. Les cellules NIH 3T3 n'expriment pas le gène résident de la lymphotoxine- α et c'est donc uniquement l'expression des gènes transfectés sous le contrôle du promoteur CMV qui est détectée.

Le vecteur IRE-LT α a été cotransfecté avec un plasmide codant pour la résistance à la Généticine. Après 3 semaines de sélection en présence de 800 μ g/ml de Généticine, j'ai isolé 31 clones ainsi qu'une population polyclonale. J'ai donc immunomarcqué les transfectants stables et des cellules NIH 3T3 et comparé leurs profils de cytométrie. Dans les cellules NIH 3T3, le marquage avec l'anticorps AFB3 induit un faible décalage du pic de fluorescence indiquant probablement une fixation aspécifique (cf. figure 36). En revanche dans les cellules ayant intégré le vecteur IRE-LT α , la fluorescence s'étend sur une large gamme de valeurs et l'intensité moyenne est dix fois supérieure à celle du bruit de fond. Ces profils indiquent que la lymphotoxine- α est exprimée par les cellules transfectées en l'absence d'induction par le fer.

Afin de procéder au criblage de ces clones pour leur régulation au fer, il a d'abord fallu déterminer les conditions qui permettent de réguler l'activité du système IRE/IRP.

c. Définition des conditions permettant de contrôler l'activité du système IRE/IRP

La régulation de la traduction par le système IRE/IRP a été mise en évidence lors de l'étude de la ferritine, dont le métabolisme est lié à la concentration en fer du milieu de culture. Nous avons donc cherché à définir les modalités de traitement permettant d'induire ou d'éteindre la ferritine, pour ensuite appliquer ces conditions au criblage des clones IRE-LT α .

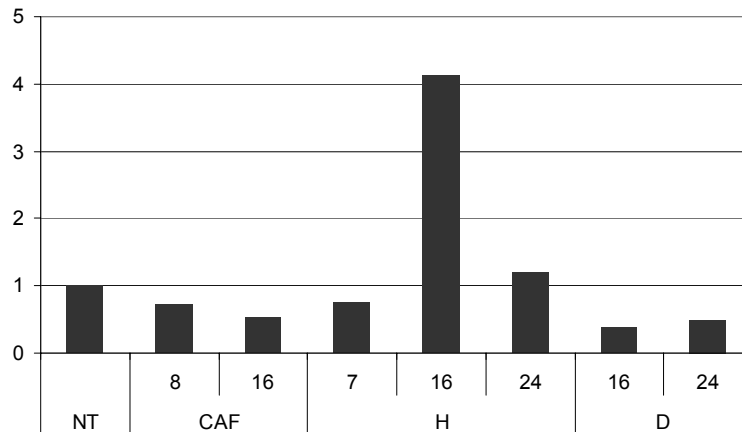


Figure 37: quantités relatives de ferritine dans le clone IRE-LTa 2H5 après traitement avec des chélateurs ou des donneurs de fer. Les cellules ont été cultivées en présence de citrate d'ammonium de fer III (CAF) ou d'hémine (H) ou de desferoxamine (D) ou dans des conditions normales (NT). Les chiffres indiquent la durée du traitement. La ferritine de ces cellules a été dosée, puis normalisée par rapport à la concentration en protéines de l'échantillon et les quantités relatives à l'échantillon non traité sont représentées.

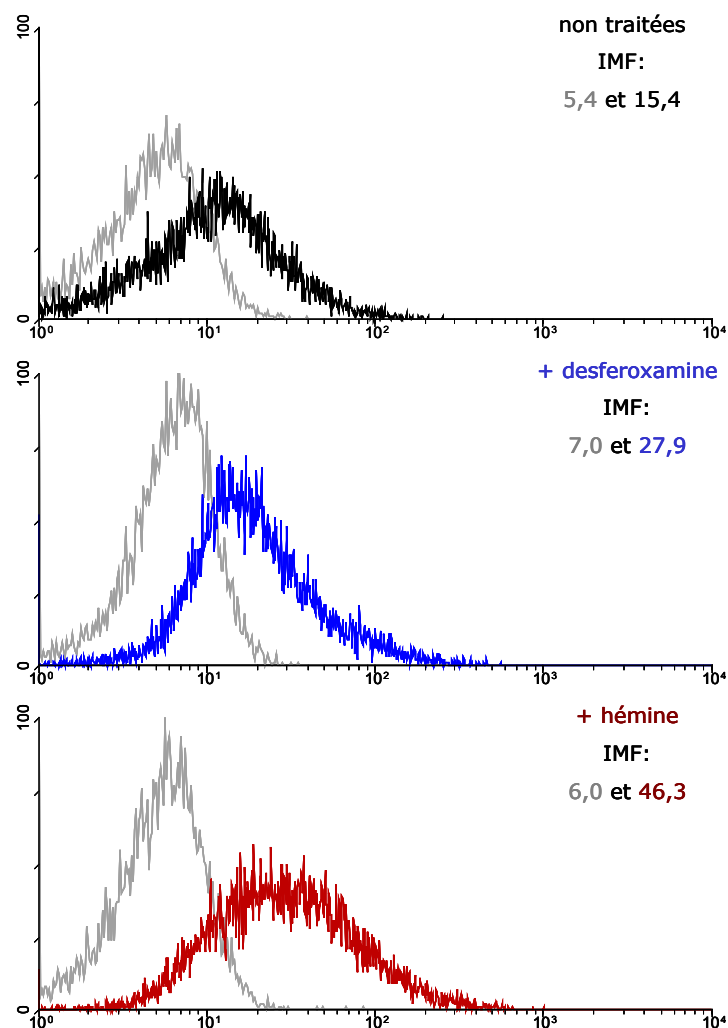


Figure 38: régulation de la protéine lymphotoxine- α du clone IRE-LT α 1A5. Les cellules sont traitées 16h avec la desferoxamine ou l'hémine, puis perméabilisées, marquées avec

l'anticorps AFB3 et un cocktail de monoclonaux anti-hamster fluorescents. La fluorescence est quantifiée par cytométrie en flux. Trait gris: bruit de fond de l'anticorps secondaire. Trait bleu ou rouge: marquage avec l'anticorps AFB3. IMF: intensité moyenne de fluorescence.

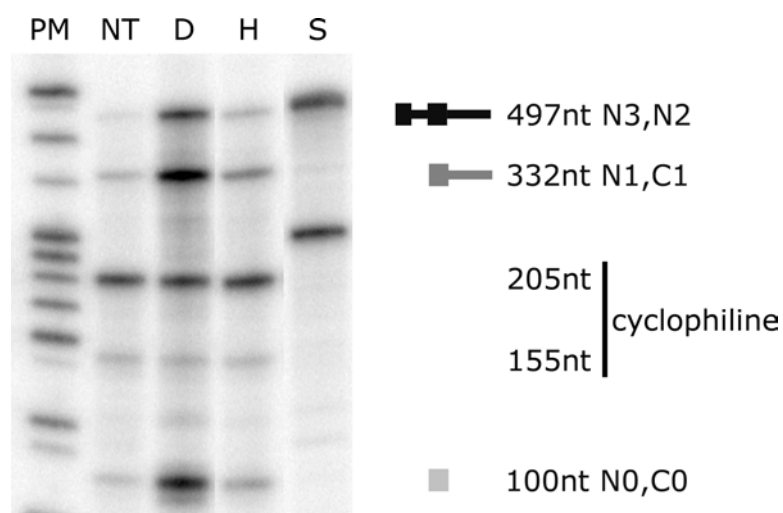
Pour épuiser le fer du milieu de culture, nous avons utilisé la desferoxamine (100 μ M) qui est un chélateur du fer pendant 16 et 24h. A l'opposé, pour supplémenter le milieu en fer, nous avons employé soit le citrate d'ammonium de fer III (60 μ g/ml) pendant 8 et 16h, soit l'hémine (50 μ M) pendant 7, 16 et 24h. Un des clones IRE-LT α (2H5) a été cultivé dans ces différentes conditions puis les protéines de ces cellules ont été extraites. La ferritine a été dosée au Centre de Recherche Biomédical Bichat-Beaujon (CRB3) grâce au Dr C. Beaumont, par un automate qui permet de quantifier la ferritine dans le sérum humain. Cet automate détecte la ferritine de souris et permet ainsi d'évaluer les quantités relatives de ferritine entre nos échantillons.

L'ajout de citrate d'ammonium de fer III ne permet pas d'augmenter la quantité de ferritine des cellules (cf. figure 37). En revanche un traitement de 16h avec l'hémine, et seulement dans ce cas, induit une augmentation d'un facteur quatre de la ferritine par rapport au niveau de base. Lorsque l'on traite les cellules avec le chélateur de fer durant 16h, la ferritine diminue de 2,5 fois. Il est donc possible de modifier de plus de dix fois le niveau d'expression de la ferritine si les cellules sont traitées en parallèle avec la desferoxamine et l'hémine, suggérant que ces conditions permettent de moduler l'activité du système IRE/IRP. Ces données montrent cependant que la régulation par le fer est assez difficile à mettre en évidence dans les cellules NIH 3T3, avec l'absence d'effet du citrate d'ammonium ferrique ou de l'hémine à 7 h.

d. Régulation de la lignée IRE-LT α 1A5

Huit clones IRE-LT α ont été criblés pour leur régulation par le fer. Les cellules ont été traitées pendant 16h avec 100 μ M de desferoxamine ou 50 μ M d'hémine, puis la lymphotoxine- α a été marquée par immunofluorescence et quantifiée par cytométrie. Au cours du criblage, la régulation s'est avérée peu reproductible avec plusieurs clones et nous avons recherché des clones dont la régulation est robuste.

A la suite de cette sélection, le clone 1A5 a été retenu car l'expression de la lymphotoxine- α y est inductible par le fer de façon reproductible. En effet les cellules IRE-LT α -1A5 qui ont été traitées avec l'hémine expriment en moyenne quatre fois plus de lymphotoxine- α que les cellules cultivées normalement (cf. figure 38). En revanche le



	NT	D	H
N2,N3	1	62	8
N1,C1	1	14	3
N0,C0	1	15	2

Figure 39: régulation de la l'ARN de lymphotoxine- α du clone IRE-LT α 1A5. Les cellules sont traitées 16h avec la desferoxamine ou l'hémine, puis les ARN sont analysés par cartographie à la RNase avec la sonde *LTaMAPb*. L'ARN de cyclophiline est utilisé comme contrôle interne. NT: cellules non traitées, D: desferoxamine, H: hémine, S: sondes, PM: poids moléculaire. Pour chaque transcrit, le signal normalisé rapporté à celui de l'échantillon non traité est indiqué dans le tableau.

traitement à la desferoxamine induit aussi une augmentation de l'expression par rapport aux cellules non traitées avec un doublement de l'intensité moyenne de fluorescence. Cette réponse à la desferoxamine est inattendue puisque la déplétion en fer diminue la quantité de ferritine (cf. figure 37).

Afin de déterminer si ces observations sur l'expression de la lymphotoxine- α reflètent une régulation au niveau traductionnel ou une modification de la synthèse de l'ARNm, j'ai réalisé une cartographie à la RNase avec l'ARN provenant des mêmes cellules. Le traitement à la desferoxamine multiplie par 62 la quantité des précurseurs N2 et N3, par 14 fois celle des messagers avec l'intron 3 et 15 fois celle des messagers complètement épissés (cf. figure 39). Cette forte accumulation de tous les transcrits de la lymphotoxine- α suggère que la transcription et la maturation ont été modifiées. Les ARN de cyclophiline ne sont pas affectés par la desferoxamine, indiquant que cette augmentation de l'expression n'affecte pas tous les gènes. En conclusion, dans les cellules qui ont été privées de fer, le niveau des messagers est 15 fois plus élevé tandis que la quantité de protéine a seulement doublé ce qui confirme que la traduction a bien été réprimée.

Dans les cellules qui ont été cultivées en présence d'hémine, les précurseurs N2 et N3 s'accumulent aussi mais d'un facteur 8 seulement (cf. figure 39). Les quantités de messagers N1/C1 triplent et de N0/C0 doublent, ce qui indique aussi que l'hémine modifie la transcription et la maturation des ARN. Cependant, l'expression au niveau protéique augmente d'un facteur 4, et donc l'hémine induit une légère augmentation de la traduction.

Néanmoins ces résultats montrent que dans ce clone, la régulation de l'expression de la lymphotoxine- α par le fer est aussi bien traductionnelle que transcriptionnelle. Cette double régulation n'est pas un artefact spécifique du clone 1A5 car elle a aussi été observée avec un autre clone IRE-LT α . Compte tenu que nous voulons étudier des effets d'assez faible amplitude sur le différentiel de sensibilité des ARN C0 et C1 aux siARN, l'existence de changements très importants du niveau d'expression de la lymphotoxine- α en réponse aux changements de niveaux du fer extracellulaire, ne permet pas d'exploiter ce modèle pour répondre à la question posée.

Pendant le développement de ce modèle cellulaire, l'équipe de J. Rossi a publié une étude de la dégradation par les siARN d'un messenger dont la traduction est contrôlée par ce même système IRE/IRP (Gu and Rossi 2005). Pour cette analyse, le vecteur codant pour

l'ARN rapporteur avait été transfecté dans des cellules humaines HEK 293, indiquant que ces cellules constituent un modèle d'étude approprié pour la régulation IRE/IRP. L'utilisation de cellules HEK 293 pourrait donc permettre de valider la régulation traductionnelle du vecteur IRE-LT α . D'autre part, notre construction utilise un promoteur CMV, tandis que dans celle de l'équipe de J. Rossi, la transcription est dépendante d'un promoteur U6, il resterait donc à savoir si dans ces cellules la manipulation du niveau de fer affecte ou non l'expression de notre vecteur. Il est en effet possible que le promoteur CMV, qui comprend des sites de fixation du facteur de transcription NF- κ B, soit particulièrement sensible au stress induit par la manipulation du niveau intracellulaire de fer.

3. Discussion

L'ARN de lymphotoxine- α existe sous deux formes : une forme longue et une forme courte, celle-ci résultant de l'épissage alternatif du troisième intron. Nous avons cherché à comprendre pourquoi la dégradation induite par un même siARN diffère entre les deux messagers. Trois hypothèses permettent d'expliquer ce phénomène:

- la différence de stabilité entre ces transcrits peut leur conférer des sensibilités différentes aux siARN,
- une compétition entre traduction et dégradation par ARNi pourrait inhiber la dégradation des transcrits où la séquence ciblée est traduite,
- la conformation 3d pourrait rendre les régions cibles inaccessibles dans l'un des deux messagers.

La première hypothèse repose sur un résultat de la partie III qui montre que les deux messagers diffèrent entre autre par leur stabilité qui est 2,4 fois plus élevée pour C1 par rapport à C0. Or si un siARN induit la même activité de dégradation sur les deux ARN, la déstabilisation sera plus importante pour l'ARN le plus stable et donc son extinction sera plus élevée. Cette différence de demi-vie pourrait donc contribuer à la plus grande inhibition de l'expression des ARNm C1. Cependant, l'étude des trois siARN ciblant la lymphotoxine- α montre que le différentiel d'inhibition entre C0 et C1 est propre à chaque siARN, ce qui implique que la différence des demi-vies de C0 et C1 n'est pas la seule cause de ce différentiel. Il est toutefois possible d'utiliser ces demi-vies et l'inhibition observée sur C1 ou C0 pour estimer la contribution des stabilités des deux messagers au différentiel d'expression résiduelle. D'après cette estimation (cf. annexe 2), la différence d'inhibition constatée avec

LT α 2-23 peut correspondre à une même activité de dégradation sur les deux messagers indiquant que dans ce cas, les demi-vies en seraient l'unique cause. Le cas de LT α 3 ne nécessite pas de calcul car il diminue plus l'expression de C0 que celle de C1 malgré la plus grande stabilité de C1, ce qui implique que l'activité de dégradation par ARNi sur C1 est réduite par rapport à celle sur C0. La situation de LT α 1 est plus complexe car la diminution de C0 qui résulterait de la même activité de dégradation qui agit sur C1 (-61%, cf figure 33) devrait être de -41% or elle n'est que de -28% (cf. figure 33 et annexe 2). Il apparaît donc que même si l'on prend en compte la différence de stabilité des messagers, l'activité de dégradation par LT α 1 sur C0 est toujours moins bonne que sur C1.

Donc les stabilités des messagers ne sont pas la seule raison aux différences de sensibilité des deux messagers de lymphotoxine- α et nous avons cherché à mettre en évidence un effet de la traduction sur l'efficacité de l'interférence. Pour cela nous avons développé un système cellulaire dans lequel la traduction de la lymphotoxine- α puisse être régulée par le fer. La caractérisation de ces cellules a mis en évidence que les traitements utilisés pour moduler la concentration en fer induisent une augmentation de l'accumulation des ARNm qui peut largement excéder la régulation traductionnelle. Ce système cellulaire n'est donc pas adapté à l'étude envisagée.

Dans le cadre de cette hypothèse sur un rôle de la traduction, nos résultats suggèrent qu'une séquence cible située dans une région traduite est moins sensible à l'interférence que si elle est à l'extérieur des régions traduites. Ainsi la traduction pourrait perturber l'activité de RISC par exemple en déplaçant les complexes présents sur l'ARN ou en rendant les régions traduites inaccessibles au complexe RISC.

Les données actuellement disponibles ne permettent pas de dégager une vision complète des interactions possibles entre traduction et interférence par l'ARN. En effet, chez la drosophile, les complexes RISC peuvent être purifiés à partir des fractions contenant les ribosomes et ils interagissent avec des facteurs de traduction comme les protéines ribosomiques L5 et L11 et l'ARNr 5S (Ishizuka, Siomi et al. 2002; Pham, Pellino et al. 2004). Chez le trypanosome, une partie des siARN sont cofractionnés avec les polyribosomes (Djikeng, Shi et al. 2003). Ces données biochimiques sont renforcées par l'observation in vivo de la résistance des messagers quiescents à l'ARNi dans les oocytes de drosophiles (Kennerdell, Yamaguchi et al. 2002). Ainsi, comme pour les micro ARN, il existe un couplage possible entre les complexes RISC à activité nucléase et les ribosomes.

Cependant d'autres résultats indiquent que la traduction n'est pas nécessaire au fonctionnement de RISC. Récemment deux groupes ont utilisé le système IRE/IRP pour créer des ARN rapporteurs dont la traduction est régulable (Gu and Rossi 2005; Sen, Wehrman et al. 2005). L'étude de ces vecteurs transfectés stablement et transitoirement montre que la dégradation induite par des siARN ou des shARN ne requiert pas la traduction du messenger. De plus dans ces deux analyses, l'inhibition de la traduction améliore la dégradation des messagers, suggérant une compétition entre les deux mécanismes. Toutefois, la comparaison a lieu alors entre des séquences cibles qui sont en cours de traduction ou non traduites et qui diffèrent notamment par leur localisation subcellulaire et leur couverture protéique. Tandis que dans notre cas, les deux messagers de la lymphotoxine- α permettent en plus d'analyser si sur une molécule qui est en cours de traduction, l'efficacité du complexe RISC dépend de la localisation des séquences cibles par rapport aux régions traduites.

Enfin, la conformation 3d des deux messagers pourrait aussi inhiber la dégradation par les siARN en rendant inaccessible les séquences cibles (Holen, Amarzguoui et al. 2002; Yoshinari, Miyagishi et al. 2004). La fiabilité encore limitée des méthodes de prédiction de repliement des molécules d'ARN rend difficile l'évaluation de l'impact de ce facteur.

Depuis la mise en évidence du mécanisme de l'ARNi, un des enjeux majeurs a été d'expliquer pourquoi les siARN ont des efficacités différentes. Certains des déterminants de l'efficacité ont été explicités comme l'asymétrie gouvernant l'intégration du brin guide dans RISC, la prépondérance de l'appariement des bases situées en 5' de ce brin avec la cible. Mais d'autres facteurs restent à découvrir.

L'étude des ARN de lymphotoxine- α a mis en évidence que l'efficacité ne dépendait par uniquement de la séquence propre du siARN mais aussi du transcrit contenant cette séquence cible. Ainsi l'interférence par l'ARN peut aussi dépendre de la stabilité du messenger cible, de la traduction de la séquence homologue au siARN et de la configuration 3d du messenger. La suite de notre étude devrait définir les importances relatives de ces facteurs.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont porté sur une étude cinétique de l'interférence par l'ARN dans des cellules de mammifères. Cette approche a permis d'acquérir des données sur l'activité nucléase du complexe RISC *in vivo* et de confirmer la présence de cette activité dans le noyau et d'en préciser les cibles. Elle a aussi permis de mettre en évidence une conséquence inattendue de l'interférence sur le métabolisme nucléaire des ARNm.

Les études cinétiques sur β -globine et, dans une moindre mesure, sur lymphotoxine- α ont permis de déterminer les vitesses de dégradation des messagers pour divers siARN. Les cinétiques de dégradation des ARNm dans le cytoplasme, à l'exception de la dégradation induite par β Glo3 à 16h qui n'a pas pu être modélisée, ont pu être décrites par des cinétiques de premier ordre. Une description par un phénomène d'ordre 1 indique que l'enzyme RISC est en excès par rapport à la cible. Il est possible que ceci ne soit pas le cas pour β Glo3 à 16h, ce qui pourrait être lié à la dégradation plus lente des ARNm avec β Glo3 et au fait que le profil de stabilité du siARN β Glo3 n'est pas favorable à l'incorporation du brin antisens dans le complexe RISC. Les demi-vies qui ont été mesurée s'étendent de la dizaine à la centaine de minutes. Pour une part ces différences d'activité des complexes RISC reflètent les efficacités d'inhibition des siARN suivant une formule efficacité d'inhibition = demi-vie sous interférence / demi-vie initiale. Dans le cas des siARN β Glo1 et β Glo2, une accélération de la cinétique de coupure est observée entre 16 h et 24 h sans que ceci soit associé à une plus grande inhibition de l'expression. Pour ces siARN particulièrement efficaces, ce découplage s'explique par le fait que l'expression résiduelle est principalement due aux ARNm qui échappent à l'interférence probablement du fait des cellules non transfectées ou qui ne parviennent pas à mettre en place l'interférence. Ainsi l'accélération de la coupure n'affecte telle que marginalement l'efficacité de l'inhibition.

Les demi-vies observées sont donc celles prédites par le modèle le plus simple de l'interférence, en définissant l'efficacité de l'inhibition par le rapport des demi-vies. Il n'en est pas moins vrai qu'elles sont longues par rapport à certains processus cellulaires, comme l'épissage ou le transport qui ont le plus souvent une demi-vie de l'ordre de la minute. De fait les demi-vies observées s'apparentent plus à celles mesurées pour les ARN messagers « instables » dans le cytoplasme (à travers les motifs AU riches) qu'à celles dues à l'action

d'une RNase en solution. L'observation que le mécanisme de dégradation des ARNm contenant des motifs AU dépend d'un miARN, est peut-être l'indication d'une similarité profonde entre les mécanismes de dégradation par les siARN et ceux du contrôle de la demi-vie des messagers « instables ». Etant donné la longue demi-vie des ARNm β -globine, les vitesses de dégradation induites par l'interférence ne sont pas limitantes. Il resterait à comprendre ce qu'il en est pour des ARNm de demi-vie naturelle beaucoup plus courte. De fait ceci revient à poser la question dans le cadre de messagers qui ont des motifs AU riches, et qui sont donc déjà impliqués dans une dégradation via un micro ARN (Calin, Dumitru et al. 2002; Jing, Huang et al. 2005). Il est possible que, dans ce contexte, il existe une coopération entre l'interférence et la déstabilisation par les motifs AU.

L'exploitation de nos résultats cinétiques est limitée par l'absence de données sur le nombre de complexes RISC actifs dans la cellule. Afin de quantifier les complexes RISC/brin guide formés par les siARN à différents temps après leur transfection, nous voulons utiliser des 2'-O-méthyl-oligonucléotides mimant les séquences cibles. Comme ces oligos ont la capacité de se lier de façon spécifique de séquence et de manière irréversible aux complexes RISC/brin guide, nous pourrions doser les complexes présents dans les lysats des cellules transfectées (Haley, Tang et al. 2003; Hutvagner, Simard et al. 2004; Meister, Landthaler et al. 2004). Une telle donnée permettrait d'aborder la question des efficacités relatives des complexes formés avec différents siARN, et de savoir si nos données reflètent des différences dues à la quantité de complexes ou à leurs caractéristiques enzymatiques. Ceci permettrait de progresser dans notre compréhension des déterminants de l'efficacité des siARN en prenant en compte les caractéristiques enzymatiques du complexe RISC formé plutôt que l'efficacité d'inhibition. De plus, le dosage des complexes RISC actifs est nécessaire pour comprendre l'accélération de la dégradation des messagers entre 16 h et 24 h après la transfection de β Glo1 et β Glo2. En effet, deux hypothèses peuvent être avancées pour cette observation : ou bien le nombre de complexes actifs augmente entre 16 h et 24 h et donc l'accélération de la coupure ne fait que refléter une augmentation dans l'excès de complexes RISC ou bien c'est l'activité intrinsèque du complexe RISC qui augmente, avec par exemple des modifications post-traductionnelles du complexe au fur et à mesure qu'il rencontre ses cibles. L'hypothèse d'une stabilisation du complexe par la présence de ses cibles a été évoquée par certains groupes mais n'a pas encore été démontrée.

L'étude de l'inhibition de l'expression des deux messagers de lymphotoxine- α ciblés par un même siARN a montré l'importance de l'environnement de la séquence cible au sein de la molécule d'ARN. Ceci pourrait refléter une interaction entre l'interférence et la traduction, ou des différences dans le repliement 3d des deux messagers. La traduction des ARNm n'est pas nécessaire pour leur dégradation induite par les siARN (Gu and Rossi 2005; Sen, Wehrman et al. 2005), cependant une compétition pour certains facteurs ou par des aspects stériques pourrait justifier la meilleure inhibition de l'expression des ARNm dont la traduction a été bloquée observée par (Gu and Rossi 2005). Des limitations dans notre approche expérimentale ne nous ont pas permis jusqu'à présent de trancher entre ces deux hypothèses. On peut remarquer que la question posée diffère quelque peu de celle qui a été abordée jusqu'à présent dans les études sur la traduction. En effet, au-delà du fait qu'un messenger non traduit est plus facilement accessible à l'interférence, nous souhaitons savoir si le long d'une molécule, une séquence cible est plus ou moins accessible en fonction du fait qu'elle est située ou non dans les régions traduites. Il s'agit donc d'un effet sur les régions couvertes par la traduction au sein d'une molécule.

Enfin, les siARN semblent être moins efficaces si la séquence ciblée se situe sur une jonction exon-exon qui résulte de l'épissage d'un intron. Cette moindre activité pourrait être due à la présence du complexe de la jonction exon-exon (Le Hir, Izaurralde et al. 2000) qui provoquerait un encombrement stérique. Avec les modèles cellulaires exprimant la β -globine avec ou sans l'intron 2, il est possible d'analyser l'efficacité de siARN ciblant des séquences plus ou moins distantes de cette jonction et ainsi d'exclure la région où l'efficacité des siARN est réduite par la cicatrice de l'épissage.

Notre étude met en évidence un double rôle des siARN dans le noyau. Tout d'abord, ils peuvent induire la dégradation des ARNm selon une cinétique semblable à celle de la dégradation dans le cytoplasme. Ceci implique non seulement la présence de complexes RISC (qu'ils soient ou non identiques à ceux du cytoplasme) mais aussi des composantes nécessaires à la dégradation des fragments générés par la coupure endonucléolytique. Sur les ARNm matures, nos données montrent que cette voie de dégradation est aussi efficace dans le noyau que dans le cytoplasme. Ceci est d'autant plus facile à observer que ces ARNm matures sont normalement stockés dans le noyau avec une demi-vie longue (du même ordre que dans le cytoplasme) (Weil, Boutain et al. 2000). Il en résulte que l'expression résiduelle sous interférence ne peut pas être simplement attribuée aux ARN nucléaires qui représentent souvent de l'ordre de 10% des ARN matures. Pour les autres transcrits nucléaires, l'efficacité

d'inhibition dépend d'une compétition cinétique entre l'interférence et les autres réactions qui affectent le transcrit ciblé comme l'épissage ou le transport. Or nos mesures des demi-vies des ARN sous interférence ont montré que celles-ci sont en général beaucoup plus longues que celle des réactions d'épissage et de transport ($t_{1/2}$ de l'ordre de la minute), et ne commençaient à s'en approcher que dans le cas des siARN β -globine à 24 h ($t_{1/2}$ de l'ordre de la dizaine de minutes). On peut d'ailleurs remarquer que c'est dans ce contexte que nous avons observé une diminution de l'accumulation des précurseurs. Si nos résultats sur les demi-vies induites par l'interférence sont généralisables à d'autres gènes et siARN, ils suggèrent que les introns - ou de manière plus générale les précurseurs nucléaires - ne constituent pas des cibles accessibles pour l'interférence. Les exceptions possibles étant soit des ARN pour lesquels une étape de la maturation est particulièrement lente soit un siARN qui aurait des caractéristiques cinétiques particulièrement rapides. Le ralentissement de l'épissage induit par l'arrêt de la transcription permet ainsi la conversion des ARN lymphotoxine- α qui contiennent l'intron 3 ($t_{1/2}$ de l'épissage de l'ordre de 8 min) d'une cible marginale en une cible éventuelle pour une interférence avec une demi-vie de l'ordre de 40 min. Cette compétition cinétique permet de rendre compte des résultats contradictoires sur l'impact de l'interférence dans le compartiment nucléaire. En effet, les données d'inhibition sur des ARN retenus dans le noyau sont en accord avec la présence d'une interférence dans le noyau, tandis que les observations sur une interférence spécifique d'une forme d'épissage illustre la difficulté de cibler les précurseurs.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une accumulation des précurseurs des ARN ciblés par les siARN. Les études cinétiques suggèrent que cette accumulation résulte d'une augmentation de la synthèse plutôt que d'un ralentissement de l'épissage. La cinétique et l'amplitude de cet effet dépendent du gène et du siARN. Ainsi dans le cas d'un siARN particulièrement efficace comme β Glo1, on observe d'abord une diminution des précurseurs à 24 h avant de pouvoir observer une augmentation à 48 h. Ceci suggère que pour de tels siARN les précurseurs puissent être la cible à la fois d'une augmentation de synthèse et d'une dégradation. De tels effets antagonistes rendent compte de l'absence de modification des flux de molécules exportées dans le cytoplasme que l'on peut constater dans le cas de la lymphotoxine- α , où une augmentation de synthèse pourrait compenser les pertes de transcrits dues à l'interférence dans le noyau, les deux phénomènes étant d'une amplitude modérée. Il serait important de démontrer plus directement qu'il existe une augmentation de la synthèse

des transcrits primaires. Outre que le phénomène peut tout aussi bien être post-transcriptionnel que transcriptionnel, par exemple par une augmentation de l'efficacité de polyadénylation, les variations observées sont trop faibles pour être étudiées par une mesure de la transcription par run-on. Nous développons actuellement une autre approche qui repose sur l'hypothèse que cet effet pourrait être observé sur un gène couplé à celui qui est ciblé par l'interférence. Nous avons construit un modèle cellulaire dans lequel un promoteur bidirectionnel (inductible par la tétracycline, « tet-on ») contrôle la transcription des ARN de la GFP et de la RFP (green fluorescent protein, red fluorescent protein). La séquence codant pour la β -globine a été fusionnée à la celle codant pour la GFP pour permettre l'utilisation des siARN que nous avons déjà caractérisés. Ainsi, si la dégradation induite par un siARN est accompagnée par une activation de la synthèse d'ARN, soit par un recyclage de facteurs impliqués dans la genèse des transcrits primaires, soit par une action sur le promoteur il est possible que cet effet soit observable à travers la production de la RFP dans ces cellules. La similitude entre nos observations et celles effectuées par (Muhlemann, Mock-Casagrande et al. 2001) dans le contexte de la dégradation induite par les codons non-sens suggère la possibilité qu'un rétrocontrôle de l'expression par son produit final soit une propriété générale de l'expression génétique chez les mammifères.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET MÉTHODES

partie I : Biologie cellulaire

1. 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.

Les cellules NIH 3T3 sont cultivées dans du DMEM (avec glucose et glutamine et sans pyruvate, Gibco BRL[®]) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

Pour les lignées tTA-LT-α et tTA-β-Glo, on ajoute 0,8 µg/ml de puromycine, 125 µg/ml d'hygromycine et 800 µg/ml de G418 au milieu précédent.

Pour les clones IRE-LTα, 800 µg/ml de G418 supplémentent le milieu des NIH 3T3.

2. Transfections

Pour les transfections au phosphate de calcium, les cellules sont ensemencées la veille à 5×10^5 /boîte de 85 mm. Au minimum une heure avant la transfection, le milieu est renouvelé. Les siARN sont dilués dans une solution de Tris 1mM pH 7,8 et d'EDTA 0,1 mM dans un volume final de 220µl. Puis sont ajoutés 30 µl de CaCl₂ à 2M et le mélange est agité. 250µl de HBS 2× (50mM HEPES, 280mM NaCl, 10mM KCl et 1,5 mM Na₂HPO₄, ajusté à pH 7,05 avec du NaOH) sont ajoutés doucement. La précipitation est déclenchée en créant par deux fois des bulles au fond du tube avec une micropipette. Après 20 min de pause, les 500 µl de précipité sont ajoutés dans la boîte. Pour les analyses à 24h ou plus après la transfection, le milieu est renouvelé 16h après l'ajout du précipité; sauf pour les fractionnements noyau/cytoplasme à 24h où le milieu n'est pas renouvelé.

Lors des expériences de cinétiques et de fractionnement noyau/cytoplasme, quand une même quantité de siARN est utilisée dans plusieurs boîtes, la copréciptation est faite pour

deux ou trois boîtes en une fois dans un seul microtube. Les quantités de réactifs sont alors doublées (microtube de 1,5 ml) ou triplées (microtube de 2 ml).

Lors de la transfection du siARN contre la kinésine Eg5, les transfections sont faites dans des boîtes de 35 mm. 10^5 cellules sont alorsensemencées la veille. Le volume final de siARN dilué est de 36,8 μ l auquel sont ajoutés 5,2 μ l de CaCl_2 et 42 μ l d'HBS 2x.

Les transfections à l'Oligofectamine (Invitrogen[®]) ont été faites dans des boîtes de 35 mmensemencées avec 10^5 cellules la veille. Le jour de la transfection, les siARN sont dilués dans 185 μ l de DMEM finaux et 3 μ l d'Oligofectamine sont mélangés avec 12 μ l de DMEM+SVF. Après cinq minutes de pause, les deux solutions sont mélangées doucement. Le milieu de culture est aspiré et remplacé par 800 μ l de DMEM+SVF. Après 15 min de pause, les 200 μ l de mélange sont ajoutés dans la boîte. Après 4h à 37°C, 500 μ l de DMEM+SVF sont ajoutés.

Pour les électroporations, les cellules sontensemencées la veille pour les amplifier. Le jour de la transfection, elles sont trypsinées et centrifugées à 200 g pendant 5 min à 4°C. Le culot de cellules est resuspendu dans du DMEM froid contenant 20 mM d'HEPES de manière à obtenir une concentration de $1,5 \times 10^6$ cellules pour 300 μ l. Dans chaque cuve à électroporation, on distribue 300 μ l de cellules et 4,5 μ l de siARN à 10 μ M. Quatre conditions d'électroporation ont été testées: 500 μ F et 300V ou 250 μ F et 300V ou 500 μ F et 350V ou 250 μ F et 350V. Les cellules sont remises en culture dans deux boîtes de 85 mm par cuve. Puis 2 à 3 h après, le milieu est renouvelé ce qui élimine les cellules non adhérentes.

3. Réactifs chimiques

La solution stock d'hémine est préparée à 1 mg/ml dans 0,1 N de NaOH (Hemin Chloride, Sigma[®]). Le citrate d'ammonium ferrique est conservé sous la forme d'une solution à 100 mg/ml dans de l'eau (Ammonium iron (III) citrate, Sigma[®]).

La desferoxamine est stockée en solution à 50 mg/ml (76 mM) dans de l'eau (Deferoxamine mesylate salt, Sigma[®]).

4. Analyse du cycle cellulaire

10^5 cellules au minimum sont trypsinées et centrifugées 5 min à 200 g et à 4°C. Le culot est repris dans 300 µl de PBS froid et 900 µl d'éthanol froid sont ajoutés, puis mélangés doucement. Le tout est placé à -20°C pendant un minimum de 12 heures afin de fixer les cellules. Après centrifugation, les cellules sont reprises dans 500 µl de PBS contenant 20 µg/ml de RNase A et 50 µl/ml d'iodure de propidium, puis incubées 30 min à 37°C. Les cellules marquées sont stockées à 4°C jusqu'à l'analyse en cytométrie.

5. Détection de la lymphotoxine- α par immunofluorescence

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. Si les cellules s'aggrègent, elles sont alors lavées une fois dans du PBS avec 8 mM d'EGTA.

Après aspiration de surnageant, 100 µl de paraformaldéhyde à 4% sont ajoutés au culot et après mélange, l'ensemble est incubé 15 min sur glace. 300 µl de PBS + 4% GS (sérum de chèvre) sont ajoutés et le tout est centrifugé à 10000 rpm pendant 15 s à 4°C. Le culot est lavé une deuxième fois avec 300 µl de PBS+4% GS.

Les cellules sont ensuite perméabilisées avec 100 µl de triton à 0,1% pendant 10 min sur glace. Après trois lavages avec 300 µl de PBS + 4% GS, les cellules sont marquées avec l'anticorps AFB3 dilué au 1/5000^e dans du PBS pendant 20 min sur glace.

Après 2 lavages au PBS+ 0,5% BSA, elles sont marquées avec l'anticorps secondaire dilué à 0,5 mg/ml dans du PBS (RPE conjugated mouse anti hamster IgG (cocktail) monoclonal antibody, BD Pharmingen) pendant 20 min sur glace.

Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS + 0,5% BSA froid puis analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur BD Bioscience ou EPICS ELITE Coulter).

partie II : Biologie moléculaire

1. Préparation des siARN

Les siARN sont synthétisés chimiquement par Dharmacon[®] selon l'option A1 qui fournit des oligos protégés et simple brin. 400 µl de tampon de déprotection, fourni par Dharmacon[®], sont ajoutés aux oligos lyophilisés. Après agitation, les oligos sont incubés à 60°C pendant 30 min puis à température ambiante pendant 5 min.

Les simples brins sont ensuite précipités par l'ajout de 40 µl d'acétate d'ammonium à 10 M et de 1,5 ml d'éthanol. Après 16h à -20°C, les oligos sont centrifugés à 14 000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le précipité lavé avec 200 µl d'éthanol à 95% froid puis resuspendu dans 100 µl d'eau. La quantité d'ARN est quantifiée par l'absorbance à 260 nm et un volume d'eau adéquate est ajouté pour que les oligos aient une concentration de 1 µg/µl.

L'hybridation du siARN est réalisée en mélangeant les deux brins complémentaires à 10 µM dans 500 µl de tampon d'hybridation (100 mM d'acétate de potassium, 30 mM d'HEPES-KOH pH 7, et 2 mM d'acétate de magnésium). Puis le mélange est incubé 2 min à 90°C, puis à 37°C pendant 1h. Les siARN sont conservés à -20°C.

Pour les dose réponses, les quantités de siARN utilisées sont les suivantes:

lignée	siARN	quantités (pmol, sauf si autre précisé)					
tTA-β-Glo	βGlo1	0	9,5	19	38	75	150
	βGlo2	0	3,7	15	38	150	375
	βGlo3	0	75	225	750	2,2 nmol	4,4 nmol
tTA-LT-α	LTαIN LTα1 LTα2-23 LTα3	0	3,7	7,5	75	375	750
3T3+I2 3T3-I2	βGlo3	0	7,5	37,5	75	375	750

2. Vecteurs et sondes

a. Construction du vecteur pCM2 IRE-LT α

Pour construire le vecteur IRE-LT α , nous avons inséré la séquence de l'IRE de la chaîne lourde de la ferritine humaine à 28 nucléotides en aval du site d'initiation de la transcription (Hentze, Rouault et al. 1987). Les deux brins de l'insert IRE ont été synthétisés chimiquement de manière à encadrer la séquence IRE par les extrémités cohésives des enzymes Hind III en 5' et Sal I en 3' (brin sens: 5'-GCTTTTTCCTGCTTCAACAGTGCTTGGACGGAACG-3' et brin antisens: 5'-TCGACGTTCCGTCCAAGCACTGTTGAAGCAGGAAAA-3'). Les deux brins ont été hybridés entre eux pour former l'insert IRE.

Le vecteur exprimant la lymphotoxine- α (pCM2 LTI123AT) contient les nucléotides 1203 à 3102 de sa séquence génomique (identifiant GenBank: 54830) qui sont insérés dans le plasmide pCM2 coupé par XbaI et EcoRI. Ce plasmide contient le promoteur CMV du singe et est décrit dans (Neel, Weil et al. 1993).

Ce plasmide pCM2 LTI123AT est digéré par Hind III et Sal I, ce qui le linéarise 28 nucléotides en aval du site d'initiation. La ligation entre l'insert IRE et le plasmide pCM2 LTI123AT linéarisé permet d'obtenir le vecteur pCM2 IRE-LT α . L'insertion a été vérifiée par digestion enzymatique et par séquençage.

b. Construction du plasmide pBt-Bglo.geno-.delHin2 pour détecter les transcrits de β -globine.

Pour détecter tous les transcrits nucléaires de la β -globine par cartographie à la RNase, nous avons construit une sonde qui s'hybride avec l'exon 2 et une partie des introns 1 et 3 et dont les fragments protégés migrent à des tailles différentes sur un gel de polyacrylamide à 5%.

Le vecteur pBt-Bglo.geno- contient les nucléotides 417 à 2030 de la séquence génomique dont l'identifiant GenBank est 165082. Ils ont été clonés au site XhoI du plasmide Bluescript. pBt-Bglo.geno- est digéré par Hinc II ce qui élimine les nucléotides 1081 à 2186 de la séquence de β -globine. Ce plasmide délété du fragment Hinc II est ensuite digéré avec Mse I. Parmi les fragments de digestion, celui de 657 nucléotides contient le promoteur de l'ARN polymérase T7 et permet de synthétiser un ARN antisens de 596 nucléotides. Cette sonde contient la séquence comprise entre les nucléotides 598 et 1086 de la β -globine.

c. Détection des ARN de β -globine

La sonde *cDNA_{glo}* est obtenue par transcription *in vitro* avec l'ARN polymérase T7 du plasmide Bluescript contenant le fragment Kpn/SacI de l'ADNc de β -globine (nucléotides 69 à 561, identifiant GenBank: V00879.1) et linéarisé par PvuII. Le fragment Kpn/SacI sert aussi de matrice pour synthétiser la sonde ADN *cDNA_{glo}ADN* par amorçage aléatoire.

La sonde *gloMAP* protège les nucléotides 598 à 1086 de l'ARN de β -globine (numéro d'accèsion GenBank: K03256). Elle est obtenue par la transcription *in vitro* du plasmide pBt-Bglo.geno-.delHin2 digéré par MseI décrit ci-dessus.

d. Détection des ARN de lymphotoxine- α

La sonde *cDNA_{lta}* reconnaît la séquence entre les nucléotides 2222 et 2741 l'ARN de lymphotoxine- α (identifiant GenBank: Y00467) et c'est une sonde ADN synthétisée par amorçage aléatoire.

La sonde *LTaMAPa* recouvre les nucléotides 1631 à 1967 de l'ARN de lymphotoxine- α (identifiant GenBank: Y00467) et la sonde *LTaMAPb* les nucléotides 1733 à 2226. Ces deux sondes sont obtenues par transcription *in vitro*.

e. Détection des ARN d'actine

Le plasmide pBact5 contient les nucléotides 1 à 590 (identifiant GenBank: M12481) clonés dans le plasmide Bluescript digéré par ClaI et PstI. Les ARN d'actine sont détectés par Northern blot avec la sonde *actineNB* issue de la transcription *in vitro* par la polymérase T3 de pBact5 digéré par BamHI. Dans les cartographies à la RNase, la sonde *actineCARTO* est transcrite par la polymérase T3 à partir de pBact5 linéarisé par BstYI et elle protège les nucléotides 495 à 593.

f. Détection des ARN de cyclophiline

Dans les cartographies à la RNase, les ARN de cyclophiline sont hybridés avec la sonde *cycloCARTO* qui provient de la transcription par l'ARN polymérase Sp6 du plasmide Psp65cyclo contenant les nucléotides 34 à 673 de l'ADNc de la cyclophiline murine (identifiant GenBank: X52803) qui a été linéarisé par NcoI. Elle reconnaît la séquence entre les nucléotides 468 et 673.

Pour les Northern blot, le plasmide est linéarisé par Hind III et transcrit par Sp6 pour donner *cycloNB* qui possède donc toute la séquence de l'insert de cyclophiline de Psp65cyclo.

3. Fractionnement noyau/cytoplasme

Pour chaque échantillon, les cellules de six boîtes de 85 mm sont utilisées. Elles sont placées sur de la glace et rincées avec 10 ml de PBS froid. Puis les cellules sont décollées avec un grattoir dans 5 ml de PBS froid et transférées dans un tube de 15 ml. Après centrifugation à 200 g à 4°C pendant 5 min, les cellules sont lavées avec 3 ml de PBS froid et recentrifugées.

Le culot est repris dans 500 µl de tampon de lyse froid (0,14 M NaCl, 10 mM Tris pH 8,4, 1,5 mM MgCl₂, 0,5% NP40, 10 mM EDTA) et le tout est transféré dans un microtube de 1,5 ml. Les cellules sont lysées 10 min sur la glace puis centrifugées à 550 x g à 4°C pendant 5min. Le surnageant, contenant les cytoplasmes, est transféré dans un tube de 15 ml contenant 2,5 ml de thiocyanate de guanidine 5,5M (cf. le paragraphe extraction d'ARN). Le culot est repris dans 300 µl de tampon de lyse froid et pipeté une trentaine de fois avec un cône jaune sur la glace. Après centrifugation, le surnageant est transféré dans le tube de thiocyanate de guanidine et le culot est resuspendu dans 200 µl de tampon de lyse froid.

Après une dernière centrifugation, le surnageant est ajouté dans le tube de thiocyanate de guanidine précédent et le culot, qui contient les noyaux, est repris dans 100 µl de tampon de lyse froid. Les noyaux sont alors transférés et lysés dans un tube de 15 ml contenant 2 ml de thiocyanate de guanidine 5,5M.

Les lysats sont ensuite ultra-centrifugés comme expliqués ci-dessous.

4. Extraction d'ARN

a. Par ultra-centrifugation

Les cellules d'une boîte de 85 mm sont lysées avec 2 ml de solution de thiocyanate de guanidine (thiocyanate de guanidine 5,5M, citrate de sodium 5mM pH7, 2-mercaptoéthanol 100mM, sarkosyl 0,5%). Ces lysats sont centrifugés sur un coussin de 1,5 ml de chlorure de césium (chlorure de césium 5,7 M, acétate de sodium 25mM pH 5,5) dans un rotor Beckman de type SW55 pendant 16h à 40 000 t/m à 20°C.

Le culot est lavé dans 1ml d'éthanol à 70% et repris dans 100 µl de tampon TE contenant 0,2% de SDS. Les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie à cette étape. Puis les ARN sont précipités avec 10 µl d'acétate de sodium à 2M (pH 5,5) et 220 µl d'éthanol. Les ARN sont ensuite repris dans de l'eau à 2 µg/µl et stockés à -20°C.

b. Avec le kit 'SV total RNA isolation system' de Promega[®]

Les cellules d'une boîte de 85 mm sont lysées avec 800 µl de solution dénaturante (thiocyanate de guanidine 4 M, citrate de sodium 25mM pH7, 2-β-mercaptoéthanol 100mM, sarkosyl 0,5%). 800 µl d'isopropanol à 100% sont ajoutés au lysat et après agitation, le mélange est placé à -20°C pendant 30 min au minimum, puis centrifugé 20 min à 4°C à vitesse maximale. Le surnageant est aspiré et le culot repris et fortement vortexé dans 175 µl de tampon de lyse 'SV RNA lysis buffer'. La suite de la purification suit le protocole fourni par Promega[®] et utilise une purification par affinité sur une colonne de silice. Les ARN sont élués avec 100 µl d'eau et quantifiés par spectrophotométrie. Ils sont ensuite précipités à l'éthanol et repris dans de l'eau comme expliqué pour la technique par ultra-centrifugation.

5. Analyse des ARN

a. Par Northern blot

L'électrophorèse de 4 µg d'ARN est faite dans un gel à 1,2% d'agarose-formaldéhyde (2mM phosphate, 0,1 mM EDTA, 7% formaldéhyde) dans du tampon phosphate (2mM phosphate, 0,1 mM EDTA). Ils sont ensuite transférés sur une membrane de nylon non chargée (Hybond N, Amersham) en tampon NH₄Ac à 7,5 M pendant 4 à 5 heures. Les ARN sont ensuite fixés sur la membrane par exposition aux UV.

Les membranes sont préhybridées pendant 1h au minimum dans du tampon de préhybridation (50% formamide désionisée, 5% SSPE, 5x Denhardt's, 0,5 mg/ml, 0,1% SDS) et l'hybridation se fait sur la nuit dans 5 à 8 ml de tampon d'hybridation (50% formamide désionisée, 5% SSPE, 1x Denhardt's, 0,1 mg/ml, 0,1% SDS). 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 déshybridations sont faites dans un litre de tampon TE bouillant contenant 0,1% de SDS.

b. Par cartographie à la RNase

L'hybridation est faite avec 8 µg d'ARN et 0,5 ng de sonde (*LTaMAPa*, *LTaMAPb*, *gloCARTO*) ou 1 ng (*cycloCARTO*) ou 2 ng (*actineCARTO*) dans 30 µl de solution d'hybridation (80% de formamide désionisée, 40mM de Pipes pH 6,7, 400mM NaCl, 1mM EDTA). Après une dénaturation de 10 min à 85°C, le mélange est incubé à 50°C pendant une nuit.

Les ARN sont ensuite digérés pendant 1 heure à 37°C dans 300 µl de solution de digestion (RNase A à 10 µg/ml, RNase T1 à 1000U/ml, 300mM NaCl, 10mM Tris HCl pH8, 5 mM EDTA), sauf pour les hybridations avec la sonde *gloCARTO* qui sont digérées à 4°C. La digestion est arrêtée par l'ajout de 20 µl de SDS 10% et 10 µl de protéinase K à 10 mg/ml. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 30 min.

Les protéines sont ensuite extraites par phénol/chloroforme (v/v) et les ARN précipités avec 1 µg d'ARNt et 2 volumes d'éthanol à -20°C pendant 30 min. Après centrifugation pendant 20 min à vitesse maximum à 4°C, les culots sont repris dans 4 µl de bleu de séquence, dénaturés 2 min à 90°C et migrés dans un gel dénaturant à 5% (5% polyacrylamide, 42% (p/v) urée et TBE 1x) dans du TBE 1x à 300V pendant 1h15. Le gel est ensuite séché et autoradiographié.

c. Marquage des sondes

Les sondes ADN sont marquées par amorçage aléatoire d'amorces en présence de 5 µl de dCTP radiomarké (50 µCi) avec le kit RadPrime DNA Labeling system (Invitrogen®) et elles sont purifiées sur colonne de Sephadex G75.

Les sondes ARN sont issues de la transcription *in vitro* des matrices linéarisées avec des activités spécifiques de 55×10^3 dpm/ng pour les sondes destinées aux cartographies et de 250×10^3 dpm/ng pour celles des 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%.

ANNEXES

ANNEXES

partie I : Annexe 1: profils des stabilités internes des siARN contre la β -globine

Le profil des stabilités internes des trois siARN ciblant la β -globine a été analysé sur l'interface de l'institut Wadsworth (<http://sfold.wadsworth.org/index.pl>). Les trois graphes représentent ces profils en fonction de la séquence du brin guide avec l'extrémité 5' en position 1. L'énergie libre ΔG est en ordonnée des graphes et la graduation est inversée donc les points situés en bas du graphe représentent des nucléotides moins stablement appariés par rapport à ceux représentés par des points en haut du graphe.

Le brin en antisens de la cible, donc le brin guide, de β Glo1 est moins stablement apparié à son brin complémentaire au niveau de l'extrémité 5' ($\Delta G \approx -6$ kcal/mol, cf. figure 1) qu'à l'extrémité 3' ($\Delta G \approx -11$ kcal/mol). Pour β Glo2, la différence de stabilité entre les deux extrémités est moins prononcée que pour β Glo1, car le ΔG est d'environ -10,5 kcal/mol en 5' et d'environ -12,5 kcal/mol en 3'. Les analyses statistiques sur un grand nombre de siARN fonctionnels et non fonctionnels ont montré qu'en moyenne, pour les siARN fonctionnels, les extrémités 5' avaient un ΔG plus élevé de 1 kcal/mol par rapport aux extrémités 3' (Khvorova, Reynolds et al. 2003). Donc pour β Glo1 et β Glo2, les profils de stabilité suggèrent que le brin guide sera plus incorporé dans RISC que le brin non-guide.

En revanche pour β Glo3, le différentiel est inversé car c'est l'extrémité 3' qui a une énergie libre de -8 kcal/mol alors que l'extrémité 5' a un ΔG de -10 kcal/mol, donc les nucléotides en 3' sont moins bien appariés qu'en 5' ce qui favoriserait l'incorporation du brin complémentaire qui est en orientation sens par rapport à la cible.

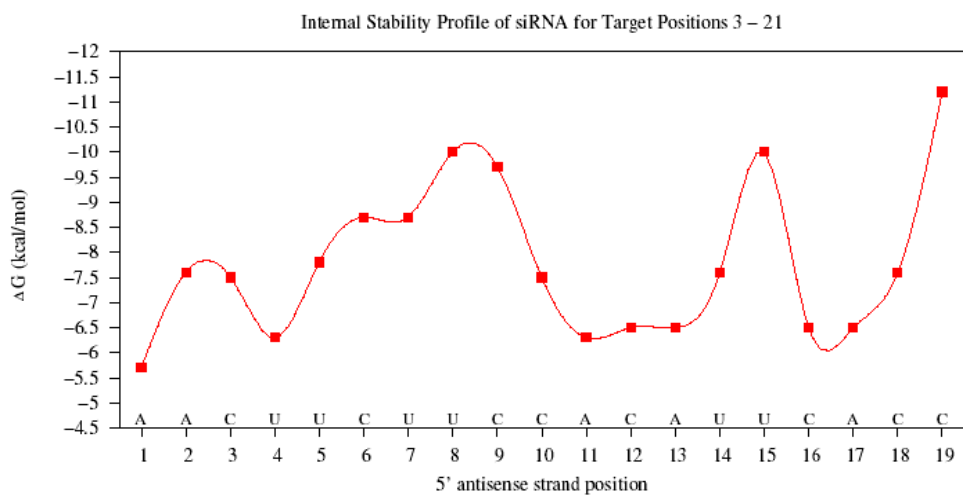


Figure 1: profil des stabilités internes pour β Glo1

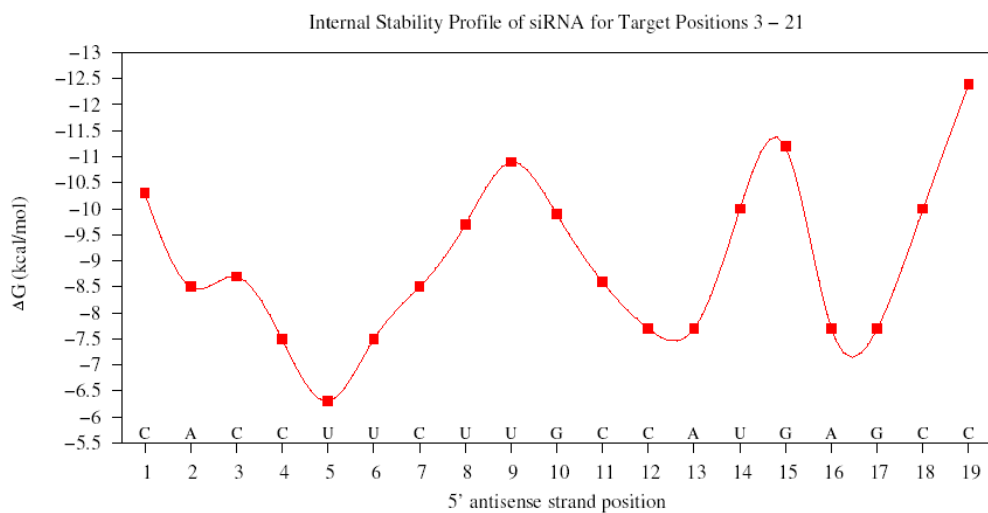


Figure 2: profil des stabilités internes pour β Glo2

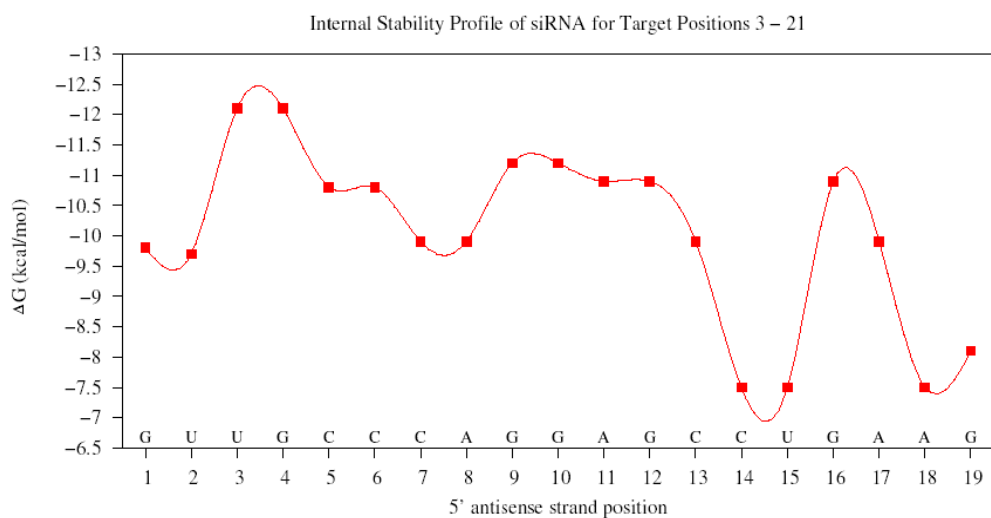


Figure 3: profil des stabilités internes pour β Glo3

partie III : Annexe 2: estimation de l'impact des demi-vies des messagers C1 et C0 sur leur inhibition par un siARN

Les demi-vies de C1 et C0 sont respectivement de 193 min et 80 min, ce qui signifie que C0 est dégradé 2,4 fois plus vite que C1. Si on note $k_{d\text{NORM}}^{C1}$ la constante de dégradation normale des ARN C1 et $k_{d\text{NORM}}^{C0}$ celle des ARN C0, alors:

$$k_{d\text{NORM}}^{C0} = 2,4 \times k_{d\text{NORM}}^{C1} \quad (1)$$

D'autre part, dans les cellules qui ont été transfectées avec le siARN LT α 1 à la figure 27, l'expression des ARN C1 est réduite à 34%, ce qui représente une augmentation de la dégradation des ARN C1 d'un facteur $100 / 34 = 2,9$ par rapport aux cellules témoins.

Si l'on suppose que la dégradation induite par l'interférence est indépendant de celle qui définit la demi-vie normale de l'ARN, alors dans ces cellules transfectées avec LT α 1, les ARN sont soumis à la dégradation normale, de constante $k_{d\text{NORM}}^{C1}$, et à la dégradation par ARNi, de constante $k_{d\text{ARNi}}^{C1}$, et la somme de ces paramètres donne la constante de dégradation globale des ARN C1. Comme la dégradation des ARN C1 est 2,9 fois plus importante dans ces cellules, la constante de dégradation globale est 2,9 fois plus élevée que la constante de dégradation normale, autrement dit:

$$\begin{aligned} k_{d\text{ARNi}}^{C1} + k_{d\text{NORM}}^{C1} &= 2,9 \times k_{d\text{NORM}}^{C1} \\ k_{d\text{ARNi}}^{C1} &= 1,9 \times k_{d\text{NORM}}^{C1} \quad (2) \end{aligned}$$

Comme on cherche à évaluer la dégradation de C0 qui résulterait de la même activité de dégradation par ARNi qui fait diminuer C1, on pose que

$$k_{d\text{ARNi}}^{C0} = k_{d\text{ARNi}}^{C1}$$

Donc d'après (1) et (2):

$$\begin{aligned} k_{d\text{ARNi}}^{C0} &= 1,9 \times k_{d\text{NORM}}^{C1} \\ k_{d\text{ARNi}}^{C0} &= 1,9 / 2,4 \times k_{d\text{NORM}}^{C0} \end{aligned}$$

Ainsi, si $k_{d\text{ARNi}}^{C0} = k_{d\text{ARNi}}^{C1}$, la dégradation des ARN C0 dans les cellules transfectées avec LT α 1 devrait être reliée par la relation suivante à la dégradation des ARN C0 dans les cellules témoins:

$$k_{d\text{ ARNi}}^{C0} + k_{d\text{ NORM}}^{C0} = ((1,9 / 2,4) + 1) \times k_{d\text{ NORM}}^{C0}$$

$$k_{d\text{ ARNi}}^{C0} + k_{d\text{ NORM}}^{C0} = 1,8 \times k_{d\text{ NORM}}^{C0}$$

Donc, si on se base sur l'expression résiduelle des ARN C1 et compte tenu des demi-vies de C0 et C1, la même activité de dégradation sur C1 et C0 dans les cellules transfectées avec LTα1 devrait augmenter la dégradation de C0 d'un facteur 1,8, ce qui se traduirait par un pourcentage résiduel de CO de $100 / 1,8 = 55\%$

Le même raisonnement peut être appliqué aux trois siARN LTα1, LTα2-23 et LTα3 afin d'estimer une expression résiduelle de CO si l'on suppose que la même interférence s'applique à C1 et C0 en plus de leur demi-vie normale. On peut voir dans le tableau 1 que cette hypothèse ne rend à peu près compte que d'une seule situation, celle de LTα2-23. En particulier la prédiction de l'inhibition de l'expression de C0 par LTα3 ne correspond pas à ce qui est observé. Comme ce siARN est en dehors des régions codantes pour les deux messagers, ceci illustre qu'en dehors de la traduction, d'autres paramètres doivent intervenir dans la sensibilité différentielle à la dégradation par RISC de C1 et C0. En particulier nous n'avons pas validé expérimentalement notre hypothèse de départ sur le fait que la dégradation normale de C1 et celle induite par interférence soient deux mécanismes indépendants que l'on doive traiter de manière additive. Alternativement, si la couverture protéique ou l'environnement cellulaire de C1 était responsable de sa plus grande demi-vie initiale, ceci pourrait tout aussi bien le protéger d'une dégradation induite par l'interférence. Dans ce cas, la différence de stabilité entre C1 et C0 pourrait conduire à la prédiction que, pour une même activité nucléase du complexe RISC, C0 soit plus accessible à la dégradation, ce qui est de fait le résultat observé pour LTα3. Dans cette hypothèse, les résultats obtenus avec LTα1 et LTα2-23 devraient être interprétés comme une encore plus grande sensibilité à ces siARN que celle proposée dans le texte.

Tableau 1: estimation de l'expression résiduelle de C0 à partir des accumulations de C1 et des demi-vies de C1 et C0 si les activités de dégradation par ARNi sont identiques pour C1 et C0.

¹ estimation de C0 faite avec le calcul détaillé précédemment.

² la comparaison de l'estimation avec la valeur expérimentale de C0 permet de déterminer si l'expression résiduelle réelle nécessite une activité de dégradation par interférence supérieure ou inférieure à celle qui dégrade C1.

		LT α 1		LT α 2-23		LT α 3
		figure 27	figure 33	figure 27	figure 33	figure 33
données	C1	34%	39%	36%	42%	89%
expérimentales	C0	85%	72%	50%	60%	72%
estimation de C0 ¹		55%	59%	59%	62,5%	95%
comparaison des activités de dégradation par ARNi ²		activité de dégradation sur C0 + faible que sur C1	activité de dégradation sur C0 + faible que sur C1	activité de dégradation sur C0 légèrement plus forte que sur C1	activité de dégradation sur C0 identique à celle sur C1	activité de dégradation sur C0 + forte que sur C1

BIBLIOGRAPHIE

- Amarzguioui, M., Holen, T., Babaie, E. and Prydz, H. (2003) Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res*, **31**, 589-595.
- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, **431**, 350-355.
- Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T. and Jewell, D. (2003) MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*, **13**, 807-818.
- Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajiho, H., Hoshino, S. and Katada, T. (2001) Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *Embo J*, **20**, 4684-4693.
- Aravin, A.A., Klenov, M.S., Vagin, V.V., Bantignies, F., Cavalli, G. and Gvozdev, V.A. (2004) Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line. *Mol Cell Biol*, **24**, 6742-6750.
- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J. and Tuschl, T. (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, **5**, 337-350.
- Aravin, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.V., Vagin, V.V., Rozovsky, Y.M. and Gvozdev, V.A. (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol*, **11**, 1017-1027.
- Astrom, J., Astrom, A. and Virtanen, A. (1992) Properties of a HeLa cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA. *J Biol Chem*, **267**, 18154-18159.
- Audibert, A., Weil, D. and Dautry, F. (2002) In vivo kinetics of mRNA splicing and transport in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 6706-6718.
- Aukerman, M.J. and Sakai, H. (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, **15**, 2730-2741.
- Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M. and Jacquier, A. (2004) Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol Cell*, **15**, 5-15.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R. and Pasquinelli, A.E. (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, **122**, 553-563.
- Baker, K.E. and Parker, R. (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 293-299.
- Bao, N., Lye, K.W. and Barton, M.K. (2004) MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell*, **7**, 653-662.
- Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
- Bartel, D.P. and Chen, C.Z. (2004) Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*, **5**, 396-400.
- Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R. and Bertrand, E. (2003) Human let-7 stem-loop

precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6593-6597.

Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature*, **431**, 356-363.

Baulcombe, D. (2005) RNA silencing. *Trends Biochem Sci*, **30**, 290-293.

Baulcombe, D.C. and Molnar, A. (2004) Crystal structure of p19--a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem Sci*, **29**, 279-281.

Belgrader, P., Cheng, J. and Maquat, L.E. (1993) Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 482-486.

Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R.H. and Cuppen, E. (2005) Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, **120**, 21-24.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**, 363-366.

Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V. and Hannon, G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, **35**, 215-217.

Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.Y., Hunter, C., Berardini, T.Z. and Poethig, R.S. (2003) HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development*, **130**, 1493-1504.

Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C. and Tollervey, D. (2000) Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell*, **102**, 765-775.

Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Beclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J.B., Crete, P., Chen, X. and Vaucheret, H. (2003) Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr Biol*, **13**, 843-848.

Brengues, M., Teixeira, D. and Parker, R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*, **310**, 486-489.

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

Brown, C.E. and Sachs, A.B. (1998) Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol Cell Biol*, **18**, 6548-6559.

Brown, J.T., Bai, X. and Johnson, A.W. (2000) The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA*, **6**, 449-457.

Browning, J.L., Sizing, I.D., Lawton, P., Bourdon, P.R., Rennert, P.D., Majeau, G.R., Ambrose, C.M., Hession, C., Miatkowski, K., Griffiths, D.A., Ngam-ek, A., Meier, W., Benjamin, C.D. and

Hochman, P.S. (1997) Characterization of lymphotoxin-alpha beta complexes on the surface of mouse lymphocytes. *J Immunol*, **159**, 3288-3298.

Cai, X., Hagedorn, C.H. and Cullen, B.R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, **10**, 1957-1966.

Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C.M. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15524-15529.

Cam, H.P., Sugiyama, T., Chen, E.S., Chen, X., FitzGerald, P.C. and Grewal, S.I. (2005) Comprehensive analysis of heterochromatin- and RNAi-mediated epigenetic control of the fission yeast genome. *Nat Genet*, **37**, 809-819.

Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q. and Hannon, G.J. (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, **16**, 2733-2742.

Carter, M.S., Daskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R.P., Sandstedt, S. and Wilkinson, M.F. (1995) A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J Biol Chem*, **270**, 28995-29003.

Caudy, A.A., Ketting, R.F., Hammond, S.M., Denli, A.M., Bathoorn, A.M., Tops, B.B., Silva, J.M., Myers, M.M., Hannon, G.J. and Plasterk, R.H. (2003) A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature*, **425**, 411-414.

Celotto, A.M. and Graveley, B.R. (2002) Exon-specific RNAi: a tool for dissecting the functional relevance of alternative splicing. *RNA*, **8**, 718-724.

Cerutti, L., Mian, N. and Bateman, A. (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci*, **25**, 481-482.

Chalker, D.L. and Yao, M.C. (2001) Nongenic, bidirectional transcription precedes and may promote developmental DNA deletion in *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev*, **15**, 1287-1298.

Chan, S.W., Zilberman, D., Xie, Z., Johansen, L.K., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science*, **303**, 1336.

Chang, S., Johnston, R.J., Jr., Frokjaer-Jensen, C., Lockery, S. and Hobert, O. (2004) MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode. *Nature*, **430**, 785-789.

Chang, S., Johnston, R.J., Jr. and Hobert, O. (2003) A transcriptional regulatory cascade that controls left/right asymmetry in chemosensory neurons of *C. elegans*. *Genes Dev*, **17**, 2123-2137.

Chapman, E.J., Prokhnovsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V. and Carrington, J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*,

18, 1179-1186.

Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Rajmakers, R., Pruijn, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M. and Karin, M. (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*, **107**, 451-464.

Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. and Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, **303**, 83-86.

Chen, J., Chiang, Y.C. and Denis, C.L. (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *Embo J*, **21**, 1414-1426.

Chen, X. (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, **303**, 2022-2025.

Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, **436**, 740-744.

Cheng, J. and Maquat, L.E. (1993) Nonsense codons can reduce the abundance of nuclear mRNA without affecting the abundance of pre-mRNA or the half-life of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol*, **13**, 1892-1902.

Chiu, Y.L. and Rana, T.M. (2002) RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell*, **10**, 549-561.

Cogoni, C. and Macino, G. (1999) Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, **399**, 166-169.

Coller, J. and Parker, R. (2004) Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem*, **73**, 861-890.

Coller, J.M., Gray, N.K. and Wickens, M.P. (1998) mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. *Genes Dev*, **12**, 3226-3235.

Dahlberg, J.E., Lund, E. and Goodwin, E.B. (2003) Nuclear translation: what is the evidence? *RNA*, **9**, 1-8.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**, 543-553.

Dalmay, T., Horsefield, R., Braunstein, T.H. and Baulcombe, D.C. (2001) SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Embo J*, **20**, 2069-2078.

DaRocha, W.D., Otsu, K., Teixeira, S.M. and Donelson, J.E. (2004) Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, **133**, 175-186.

Daugeron, M.C., Mauxion, F. and Seraphin, B. (2001) The yeast POP2 gene encodes a

nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2448-2455.

Davis, E., Caiment, F., Tordoir, X., Cavaille, J., Ferguson-Smith, A., Cockett, N., Georges, M. and Charlier, C. (2005) RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus. *Curr Biol*, **15**, 743-749.

Denis, C.L. and Chen, J. (2003) The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **73**, 221-250.

Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. and Hannon, G.J. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, **432**, 231-235.

Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., Shen, S. and Ullu, E. (2003) An siRNA ribonucleoprotein is found associated with polyribosomes in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, **9**, 802-808.

Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C. and Ullu, E. (2001) RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA*, **7**, 1522-1530.

Doench, J.G., Petersen, C.P. and Sharp, P.A. (2003) siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, **17**, 438-442.

Doench, J.G. and Sharp, P.A. (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, **18**, 504-511.

Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K. and Saigo, K. (2003) Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr Biol*, **13**, 41-46.

Du, Q., Thonberg, H., Wang, J., Wahlestedt, C. and Liang, Z. (2005) A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1671-1677.

Dunckley, T. and Parker, R. (1999) The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *Embo J*, **18**, 5411-5422.

Dunckley, T., Tucker, M. and Parker, R. (2001) Two related proteins, Edc1p and Edc2p, stimulate mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **157**, 27-37.

Dunoyer, P., Himber, C. and Voinnet, O. (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet*.

Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C. and Voinnet, O. (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, **16**, 1235-1250.

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

- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188-200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001c) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J*, **20**, 6877-6888.
- Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C. and Marks, D.S. (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*, **5**, R1.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. and Vaucheret, H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11650-11654.
- Filipowicz, W. (2005) RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*, **122**, 17-20.
- Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M. and Gill, S.S. (2000) A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*, **245**, 213-221.
- Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E. and Zamore, P.D. (2005) Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol*, **3**, e236.
- Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrierio, A.L., Parker, R. and Dietz, H.C. (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science*, **295**, 2258-2261.
- Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P. and Vaucheret, H. (2005) Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol*, **15**, 1494-1500.
- Goossen, B. and Hentze, M.W. (1992) Position is the critical determinant for function of iron-responsive elements as translational regulators. *Mol Cell Biol*, **12**, 1959-1966.
- Grad, Y., Aach, J., Hayes, G.D., Reinhart, B.J., Church, G.M., Ruvkun, G. and Kim, J. (2003) Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Mol Cell*, **11**, 1253-1263.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, **432**, 235-240.
- Griffiths-Jones, S. (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*, **32**, D109-111.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G. and Mello, C.C. (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, **106**, 23-34.
- Gu, S. and Rossi, J.J. (2005) Uncoupling of RNAi from active translation in mammalian cells.

RNA, **11**, 38-44.

Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A. and Filipowicz, W. (2005) TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep*, **6**, 961-967.

Haley, B., Tang, G. and Zamore, P.D. (2003) In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods*, **30**, 330-336.

Haley, B. and Zamore, P.D. (2004) Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 599-606.

Hall, I.M., Shankaranarayana, G.D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A. and Grewal, S.I. (2002) Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*, **297**, 2232-2237.

Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293-296.

Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. and Hannon, G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**, 1146-1150.

Han, M.H., Goud, S., Song, L. and Fedoroff, N. (2004) The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1093-1098.

Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.

Hannon, G.J. (2003) *RNAi: a guide to gene silencing*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Hannon, G.J. and Rossi, J.J. (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, **431**, 371-378.

Hansen, K.R., Burns, G., Mata, J., Volpe, T.A., Martienssen, R.A., Bahler, J. and Thon, G. (2005) Global effects on gene expression in fission yeast by silencing and RNA interference machineries. *Mol Cell Biol*, **25**, 590-601.

Hentze, M.W. and Kuhn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8175-8182.

Hentze, M.W., Rouault, T.A., Caughman, S.W., Dancis, A., Harford, J.B. and Klausner, R.D. (1987) A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6730-6734.

Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T. and Baulcombe, D.C. (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science*, **308**, 118-120.

- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R. and Jensen, T.H. (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature*, **413**, 538-542.
- Hilleren, P.J. and Parker, R. (2003) Cytoplasmic degradation of splice-defective pre-mRNAs and intermediates. *Mol Cell*, **12**, 1453-1465.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. and Voinnet, O. (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J*, **22**, 4523-4533.
- Hipfner, D.R., Weigmann, K. and Cohen, S.M. (2002) The bantam gene regulates Drosophila growth. *Genetics*, **161**, 1527-1537.
- Holen, T., Amarzguoui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E. and Prydz, H. (2002) Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1757-1766.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F. and Sharp, P.A. (2003) Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*, **5**, 351-358.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I. and Preiss, T. (2005) MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T. and Zamore, P.D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, **293**, 834-838.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C. and Zamore, P.D. (2004) Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol*, **2**, E98.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, **297**, 2056-2060.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Luhrmann, R. and Achsel, T. (2002) The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA*, **8**, 1489-1501.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G. and Maquat, L.E. (2001) Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*, **106**, 607-617.
- Ishizuka, A., Siomi, M.C. and Siomi, H. (2002) A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev*, **16**, 2497-2508.
- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. and Linsley, P.S. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, **21**, 635-637.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathiou, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J. and Chan, E.K. (2005) Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol*.

- Jia, S., Noma, K. and Grewal, S.I. (2004) RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins. *Science*, **304**, 1971-1976.
- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S.C., Gram, H. and Han, J. (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*, **120**, 623-634.
- Johnston, R.J. and Hobert, O. (2003) A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **426**, 845-849.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M. and Rajewsky, K. (2005) Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, **19**, 489-501.
- Kawasaki, H. and Taira, K. (2004) Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*, **431**, 211-217.
- Kennerdell, J.R., Yamaguchi, S. and Carthew, R.W. (2002) RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes Dev*, **16**, 1884-1889.
- Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G. and Plasterk, R.H. (1999) Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, **99**, 133-141.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209-216.
- Kim, D.H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S. and Rossi, J.J. (2005) Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*, **23**, 222-226.
- Kim, D.H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E. and Rossi, J.J. (2004) Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol*, **22**, 321-325.
- Kim, V.N. (2005) Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells*, **19**, 1-15.
- Kiriakidou, M., Nelson, P.T., Kouranov, A., Fitziev, P., Bouyioukos, C., Mourelatos, Z. and Hatzigeorgiou, A. (2004) A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev*, **18**, 1165-1178.
- Kisielow, M., Kleiner, S., Nagasawa, M., Faisal, A. and Nagamine, Y. (2002) Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA. *Biochem J*, **363**, 1-5.
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y. (2004) Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12753-12758.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, **294**, 853-858.

- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A. and Tuschl, T. (2003) New microRNAs from mouse and human. *RNA*, **9**, 175-179.
- LaGrandeur, T.E. and Parker, R. (1998) Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *Embo J*, **17**, 1487-1496.
- Lai, W.S., Kennington, E.A. and Blackshear, P.J. (2003) Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol Cell Biol*, **23**, 3798-3812.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D. and Burgyan, J. (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *Embo J*, **23**, 876-884.
- Landthaler, M., Yalcin, A. and Tuschl, T. (2004) The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*, **14**, 2162-2167.
- Langlois, M.A., Boniface, C., Wang, G., Alluin, J., Salvaterra, P.M., Puymirat, J., Rossi, J.J. and Lee, N.S. (2005) Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells. *J Biol Chem*, **280**, 16949-16954.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. and Bartel, D.P. (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 858-862.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E. and Moore, M.J. (2000) The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J*, **19**, 6860-6869.
- Lecellier, C.H. and Voinnet, O. (2004) RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunol Rev*, **198**, 285-303.
- Lee, R.C. and Ambros, V. (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**, 415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. and Kim, V.N. (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J*, **21**, 4663-4670.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W. (2004) Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, **117**, 69-81.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X. and Maquat, L.E. (2002) The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *Embo J*, **21**, 3536-3545.

- Lejeune, F., Li, X. and Maquat, L.E. (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol Cell*, **12**, 675-687.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Burge, C.B. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, **115**, 787-798.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, **433**, 769-773.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. and Sattler, M. (2003) Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, **426**, 465-469.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. and Sattler, M. (2004) Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 576-577.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. and Hannon, G.J. (2004a) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437-1441.
- Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., Parker, R. and Hannon, G.J. (2005a) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J. and Parker, R. (2005b) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, **7**, 719-723.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P. and Wang, X. (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science*, **301**, 1921-1925.
- Liu, Y., Mochizuki, K. and Gorovsky, M.A. (2004b) Histone H3 lysine 9 methylation is required for DNA elimination in developing macronuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1679-1684.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A. and Carrington, J.C. (2002a) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, **14**, 1605-1619.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (2002b) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, **297**, 2053-2056.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. and Kutay, U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, **303**, 95-98.
- Lykke-Andersen, J. (2002) Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol*, **22**, 8114-8121.
- Ma, J.B., Ye, K. and Patel, D.J. (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, **429**, 318-322.
- Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T. and Patel, D.J. (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, **434**, 666-670.

- Mackay, F., Bourdon, P.R., Griffiths, D.A., Lawton, P., Zafari, M., Sizing, I.D., Miatkowski, K., Ngam-ek, A., Benjamin, C.D., Hession, C., Ambrose, C.M., Meier, W. and Browning, J.L. (1997) Cytotoxic activities of recombinant soluble murine lymphotoxin-alpha and lymphotoxin-alpha beta complexes. *J Immunol*, **159**, 3299-3310.
- Makeyev, E.V. and Bamford, D.H. (2002) Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Mol Cell*, **10**, 1417-1427.
- Maquat, L.E. (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 89-99.
- Martienssen, R.A., Zaratiegui, M. and Goto, D.B. (2005) RNA interference and heterochromatin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Trends Genet*, **21**, 450-456.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. and Tuschl, T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, **110**, 563-574.
- Martinez, J., Ren, Y.G., Nilsson, P., Ehrenberg, M. and Virtanen, A. (2001) The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J Biol Chem*, **276**, 27923-27929.
- Martinez, J. and Tuschl, T. (2004) RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, **18**, 975-980.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2005) Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. *Cell*, **123**, 607-620.
- Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y. and Tuschl, T. (2004a) Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*, **10**, 544-550.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. and Tuschl, T. (2004b) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, **15**, 185-197.
- Meister, G. and Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, **431**, 343-349.
- Menotti, E., Henderson, B.R. and Kuhn, L.C. (1998) Translational regulation of mRNAs with distinct IRE sequences by iron regulatory proteins 1 and 2. *J Biol Chem*, **273**, 1821-1824.
- Meyer, E. and Garnier, O. (2002) Non-Mendelian inheritance and homology-dependent effects in ciliates. *Adv Genet*, **46**, 305-337.
- Mitchell, P. and Tollervey, D. (2003) An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol Cell*, **11**, 1405-1413.
- Mochizuki, K., Fine, N.A., Fujisawa, T. and Gorovsky, M.A. (2002) Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell*, **110**, 689-699.
- Mochizuki, K. and Gorovsky, M.A. (2004) Small RNAs in genome rearrangement in

Tetrahymena. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 181-187.

Moore, M.J. (2002) Nuclear RNA turnover. *Cell*, **108**, 431-434.

Morris, K.V., Chan, S.W., Jacobsen, S.E. and Looney, D.J. (2004) Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, **305**, 1289-1292.

Moser, M.J., Holley, W.R., Chatterjee, A. and Mian, I.S. (1997) The proofreading domain of Escherichia coli DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res*, **25**, 5110-5118.

Moss, E.G., Lee, R.C. and Ambros, V. (1997) The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C. elegans and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell*, **88**, 637-646.

Motamedi, M.R., Verdel, A., Colmenares, S.U., Gerber, S.A., Gygi, S.P. and Moazed, D. (2004) Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell*, **119**, 789-802.

Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*, **16**, 720-728.

Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A. and Vaucheret, H. (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, **101**, 533-542.

Muhlemann, O., Mock-Casagrande, C.S., Wang, J., Li, S., Custodio, N., Carmo-Fonseca, M., Wilkinson, M.F. and Moore, M.J. (2001) Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription. *Mol Cell*, **8**, 33-43.

Muhlrad, D. and Parker, R. (1994) Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature*, **370**, 578-581.

Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J.P., Rajmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C.S. and Wilusz, J. (2002) The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *Embo J*, **21**, 165-174.

Nagy, E. and Maquat, L.E. (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci*, **23**, 198-199.

Neel, H., Weil, D., Giansante, C. and Dautry, F. (1993) In vivo cooperation between introns during pre-mRNA processing. *Genes Dev*, **7**, 2194-2205.

Noma, K., Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Zofall, M., Jia, S., Moazed, D. and Grewal, S.I. (2004) RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nat Genet*, **36**, 1174-1180.

Nykanen, A., Haley, B. and Zamore, P.D. (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, **107**, 309-321.

- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. and Siomi, M.C. (2004) Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev*, **18**, 1655-1666.
- Olsen, P.H. and 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. *Dev Biol*, **216**, 671-680.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Nunes, P.C., Pontes, O. and Pikaard, C.S. (2005) Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell*, **120**, 613-622.
- Orban, T.I. and Izaurralde, E. (2005) Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*, **11**, 459-469.
- Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B.A., Gandhi, S.G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J.A. and Elgin, S.C. (2004) Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science*, **303**, 669-672.
- Papp, I., Mette, M.F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S.E., Ray, A., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A.J. (2003) Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol*, **132**, 1382-1390.
- Park, C.W., Chen, Z., Kren, B.T. and Steer, C.J. (2004) Double-stranded siRNA targeted to the huntingtin gene does not induce DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 275-280.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X. (2002) CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, **12**, 1484-1495.
- Parker, J.S., Roe, S.M. and Barford, D. (2004) Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *Embo J*, **23**, 4727-4737.
- Parker, J.S., Roe, S.M. and Barford, D. (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, **434**, 663-666.
- Parker, R. and Song, H. (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 121-127.
- Pebernard, S. and Iggo, R.D. (2004) Determinants of interferon-stimulated gene induction by RNAi vectors. *Differentiation*, **72**, 103-111.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H.L. and Poethig, R.S. (2004) SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **18**, 2368-2379.
- Persengiev, S.P., Zhu, X. and Green, M.R. (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*, **10**, 12-18.
- Pham, J.W., Pellino, J.L., Lee, Y.S., Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J. (2004) A Dicer-2-

dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, **117**, 83-94.

Pillai, R.S., Artus, C.G. and Filipowicz, W. (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA*, **10**, 1518-1525.

Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E. and Filipowicz, W. (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, **309**, 1573-1576.

Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.A., Lerbs-Mache, S., Colot, V. and Lagrange, T. (2005) Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **19**, 2030-2040.

Raijmakers, R., Schilders, G. and Pruijn, G.J. (2004) The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm. *Eur J Cell Biol*, **83**, 175-183.

Rajewsky, N. and Socci, N.D. (2004) Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol*, **267**, 529-535.

Rand, T.A., Ginalski, K., Grishin, N.V. and Wang, X. (2004) Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 14385-14389.

Rand, T.A., Petersen, S., Du, F. and Wang, X. (2005) Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell*, **123**, 621-629.

Ratcliff, F., Harrison, B.D. and Baulcombe, D.C. (1997) A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants. *Science*, **276**, 1558-1560.

Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D. and Izaurralde, E. (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, **11**, 1640-1647.

Reinhart, B.J. and Bartel, D.P. (2002) Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, **297**, 1831.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **403**, 901-906.

Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, **16**, 1616-1626.

Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. and Bartel, D.P. (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, **110**, 513-520.

Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 340-349.

- Robb, G.B., Brown, K.M., Khurana, J. and Rana, T.M. (2005) Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 133-137.
- Robinson, K.A. and Beverley, S.M. (2003) Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite Leishmania. *Mol Biochem Parasitol*, **128**, 217-228.
- Rocak, S. and Linder, P. (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 232-241.
- Roignant, J.Y., Carre, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J.A. and Antoniewski, C. (2003) Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*, **9**, 299-308.
- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H. and Siomi, M.C. (2005) Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol*, **3**, e235.
- Saxena, S., Jonsson, Z.O. and Dutta, A. (2003) Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem*, **278**, 44312-44319.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A. and Sanger, H.L. (1993a) RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. I. Purification and physical properties. *J Biol Chem*, **268**, 11851-11857.
- Schiebel, W., Haas, B., Marinkovic, S., Klanner, A. and Sanger, H.L. (1993b) RNA-directed RNA polymerase from tomato leaves. II. Catalytic in vitro properties. *J Biol Chem*, **268**, 11858-11867.
- Schramke, V. and Allshire, R. (2003) Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing. *Science*, **301**, 1069-1074.
- Schwartz, D., Decker, C.J. and Parker, R. (2003) The enhancer of decapping proteins, Edc1p and Edc2p, bind RNA and stimulate the activity of the decapping enzyme. *RNA*, **9**, 239-251.
- Schwartz, D.C. and Parker, R. (2000) mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*, **20**, 7933-7942.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199-208.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Haley, B. and Zamore, P.D. (2002) Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell*, **10**, 537-548.
- Schwarz, D.S., Tomari, Y. and Zamore, P.D. (2004) The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr Biol*, **14**, 787-791.
- Seggerson, K., Tang, L. and Moss, E.G. (2002) Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol*, **243**, 215-225.

- Seitz, H., Youngson, N., Lin, S.P., Dalbert, S., Paulsen, M., Bachellerie, J.P., Ferguson-Smith, A.C. and Cavaille, J. (2003) Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene. *Nat Genet*, **34**, 261-262.
- Sen, G.L. and Blau, H.M. (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, **7**, 633-636.
- Sen, G.L., Wehrman, T.S. and Blau, H.M. (2005) mRNA translation is not a prerequisite for small interfering RNA-mediated mRNA cleavage. *Differentiation*, **73**, 287-293.
- Sheth, U. and Parker, R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, **300**, 805-808.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. and Fire, A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, **107**, 465-476.
- Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P.S., Paddison, P.J., Hannon, G.J. and Cleary, M.A. (2005) Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol*, **23**, 227-231.
- Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000) The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*, **5**, 659-669.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. and Williams, B.R. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, **5**, 834-839.
- Smardon, A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N. and Maine, E.M. (2000) EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol*, **10**, 169-178.
- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*, **10**, 1026-1032.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. and Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**, 1434-1437.
- Sontheimer, E.J. (2005) Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 127-138.
- Sontheimer, E.J. and Carthew, R.W. (2005) Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, **122**, 9-12.
- Stark, A., Brennecke, J., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2003) Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol*, **1**, E60.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Steiger, M., Carr-Schmid, A., Schwartz, D.C., Kiledjian, M. and Parker, R. (2003) Analysis of

recombinant yeast decapping enzyme. *RNA*, **9**, 231-238.

Stevens, A. (1980) Purification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* exoribonuclease which yields 5'-mononucleotides by a 5' leads to 3' mode of hydrolysis. *J Biol Chem*, **255**, 3080-3085.

Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Moazed, D. and Grewal, S.I. (2005) RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 152-157.

Svoboda, P., Stein, P., Filipowicz, W. and Schultz, R.M. (2004) Lack of homologous sequence-specific DNA methylation in response to stable dsRNA expression in mouse oocytes. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3601-3606.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. and Mello, C.C. (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, **99**, 123-132.

Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H. and Mello, C.C. (2002) The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*, **109**, 861-871.

Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W. and Hobman, T.C. (2004) Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep*, **5**, 189-194.

Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. and Zamore, P.D. (2003) A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*, **17**, 49-63.

Taverna, S.D., Coyne, R.S. and Allis, C.D. (2002) Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell*, **110**, 701-711.

Telfer, A. and Poethig, R.S. (1998) HASTY: a gene that regulates the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **125**, 1889-1898.

Tharun, S. and Parker, R. (2001) Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol Cell*, **8**, 1075-1083.

Thore, S., Mauxion, F., Seraphin, B. and Suck, D. (2003) X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO Rep*, **4**, 1150-1155.

Tijsterman, M., Ketting, R.F. and Plasterk, R.H. (2002) The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet*, **36**, 489-519.

Till, D.D., Linz, B., Seago, J.E., Elgar, S.J., Marujo, P.E., Elias, M.L., Arraiano, C.M., McClellan, J.A., McCarthy, J.E. and Newbury, S.F. (1998) Identification and developmental expression of a 5'-3' exoribonuclease from *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev*, **79**, 51-55.

Tomari, Y., Du, T., Haley, B., Schwarz, D.S., Bennett, R., Cook, H.A., Koppetsch, B.S.,

- Theurkauf, W.E. and Zamore, P.D. (2004a) RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell*, **116**, 831-841.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N. and Zamore, P.D. (2004b) A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, **306**, 1377-1380.
- Tomari, Y. and Zamore, P.D. (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*, **19**, 517-529.
- Torchet, C., Bousquet-Antonelli, C., Milligan, L., Thompson, E., Kufel, J. and Tollervey, D. (2002) Processing of 3'-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Mol Cell*, **9**, 1285-1296.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D. and Parker, R. (2002) Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **21**, 1427-1436.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L. and Parker, R. (2001) The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, **104**, 377-386.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. and Sharp, P.A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, **13**, 3191-3197.
- Ullu, E., Tschudi, C. and Chakraborty, T. (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol*, **6**, 509-519.
- Vaistij, F.E., Jones, L. and Baulcombe, D.C. (2002) Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell*, **14**, 857-867.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E. and Seraphin, B. (2002) Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *Embo J*, **21**, 6915-6924.
- van Dijk, E., Le Hir, H. and Seraphin, B. (2003) DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12081-12086.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. and Parker, R. (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science*, **295**, 2262-2264.
- van Hoof, A., Staples, R.R., Baker, R.E. and Parker, R. (2000) Function of the ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Mol Cell Biol*, **20**, 8230-8243.
- Vastenhouw, N.L. and Plasterk, R.H. (2004) RNAi protects the *Caenorhabditis elegans* germline against transposition. *Trends Genet*, **20**, 314-319.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. and Bartel, D.P. (2004) The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev*, **18**, 1187-1197.
- Vazquez, F., Gascioli, V., Crete, P. and Vaucheret, H. (2004a) The nuclear dsRNA binding

protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr Biol*, **14**, 346-351.

Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gascioli, V., Mallory, A.C., Hilbert, J.L., Bartel, D.P. and Crete, P. (2004b) Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol Cell*, **16**, 69-79.

Viswanathan, P., Chen, J., Chiang, Y.C. and Denis, C.L. (2003) Identification of multiple RNA features that influence CCR4 deadenylation activity. *J Biol Chem*, **278**, 14949-14955.

Volpe, T., Schramke, V., Hamilton, G.L., White, S.A., Teng, G., Martienssen, R.A. and Allshire, R.C. (2003) RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res*, **11**, 137-146.

Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.

Wang, Z. and Kiledjian, M. (2001) Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell*, **107**, 751-762.

Weil, D., Boutain, S., Audibert, A. and 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., Garcon, L., Harper, M., Dumenil, D., Dautry, F. and Kress, M. (2002) Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *Biotechniques*, **33**, 1244-1248.

Wienholds, E. and Plasterk, R.H. (2005) MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*, **579**, 5911-5922.

Wightman, B., Ha, I. and 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.

Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F. and Weil, D. (2005) The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci*, **118**, 981-992.

Williams, B.R. (1997) Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans*, **25**, 509-513.

Wintersberger, U. (1990) Ribonucleases H of retroviral and cellular origin. *Pharmacol Ther*, **48**, 259-280.

Wu-Scharf, D., Jeong, B., Zhang, C. and Cerutti, H. (2000) Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science*, **290**, 1159-1162.

Wu, H., Xu, H., Miraglia, L.J. and Crooke, S.T. (2000) Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol Chem*, **275**, 36957-36965.

Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E.J., Golub, T.R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S. and

- Kellis, M. (2005a) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, **434**, 338-345.
- Xie, Z., Allen, E., Wilken, A. and Carrington, J.C. (2005b) DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12984-12989.
- Xie, Z., Fan, B., Chen, C. and Chen, Z. (2001) An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6516-6521.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. and Carrington, J.C. (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, **2**, E104.
- Xu, P., Vernooy, S.Y., Guo, M. and Hay, B.A. (2003) The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*, **13**, 790-795.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L. and Zhou, M.M. (2003) Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, **426**, 468-474.
- Yekta, S., Shih, I.H. and Bartel, D.P. (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, **304**, 594-596.
- Yi, R., Doehle, B.P., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. (2005) Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA*, **11**, 220-226.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, **17**, 3011-3016.
- Yoshinari, K., Miyagishi, M. and Taira, K. (2004) Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region. *Nucleic Acids Res*, **32**, 691-699.
- Yuan, Y.R., Pei, Y., Ma, J.B., Kuryavyy, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.Y., Dauter, Z., Tuschl, T. and Patel, D.J. (2005) Crystal Structure of *A. aeolicus* Argonaute, a Site-Specific DNA-Guided Endoribonuclease, Provides Insights into RISC-Mediated mRNA Cleavage. *Mol Cell*, **19**, 405-419.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2002) RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*, **8**, 855-860.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E. and Filipowicz, W. (2002) Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J*, **21**, 5875-5885.
- Zilberman, D., Cao, X. and Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716-719.

Zilberman, D., Cao, X., Johansen, L.K., Xie, Z., Carrington, J.C. and Jacobsen, S.E. (2004) Role of Arabidopsis ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol*, **14**, 1214-1220.