

Université de Montréal

MiR-16, un nouveau régulateur du transporteur de glucose dépendant de
l'insuline GLUT-4

par

Nour El-amine

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en pharmacologie

Décembre 2010

© Nour, El-amine, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
MiR-16, un nouveau régulateur du transporteur de glucose dépendant de
l'insuline GLUT-4

présenté par :
Nour El-amine

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Rousseau
Président-rapporteur
Dr Éric Thorin
Directeur de recherche
Dr Zhiguo Wang
Co-directeur de recherche
Dr Christian Beauséjour
Membre du Jury

Résumé

Les microARNs sont des petits ARNs non codants d'environ 22 nucléotides qui régulent négativement la traduction de l'ARN messager cible (ARNm) et ont donc des fonctions cellulaires. Le microARN-16 (miR-16) est connu pour ses effets antiprolifératifs. Nous avons observé que l'expression de miR-16 est diminuée dans les cellules endothéliales humaines sénescents et quiescentes en comparaison à des cellules prolifératives. Une analyse informatique des sites potentiels de liaison de miR-16 prévoit que GLUT-4, un transporteur du glucose insulino-dépendant, pourrait être une cible potentielle du miR-16. Nous avons donc testé l'hypothèse que miR-16 régule négativement le métabolisme du glucose cellulaire. Dans des HUVEC, l'inhibition de miR-16 endogène avec des anti-miRNA oligonucléotides (AMO) augmente les niveaux protéiques de GLUT-4 de $1,7 \pm 0,4$ fois ($p=0,0037$; $n=9$). Dans des souris nourries avec un régime alimentaire normal ou riche en graisse et en sucre, l'expression de GLUT-4 dans le muscle squelettique a tendance à corrélérer négativement avec les niveaux de miR-16 ($p=0,0998$, $r^2=0,3866$, $n=4$). Ces résultats suggèrent que miR-16 est un régulateur négatif de GLUT-4 et qu'il pourrait être impliqué dans la régulation du métabolisme cellulaire du glucose.

Mots clés : microARN, Glut-4, miR-16

Subventionné par les IRSC MOP14496

Abstract

MicroRNAs are small noncoding RNAs of approximately 22 nucleotides that negatively regulate translation of the target messenger RNA (mRNA) and therefore have cellular functions. MicroRNA-16 (miR-16) is known to display anti-proliferative effects. We observed that miR-16 was down-regulated in non-proliferative human senescent endothelial cells. Computational analysis of the potential binding sites of miR-16 predicted that GLUT-4, an insulin-dependent glucose transporter, is a potential target of miR-16. We therefore tested the hypothesis that miR-16 down-regulates cellular glucose metabolism. In HUVEC, inhibition of using anti-miRNA oligonucleotides (AMO) endogenous miR-16 up-regulated GLUT-4 protein levels $1,7 \pm 0,39$ folds ($p=0,0037$; $n=9$). In mice fed a regular or high fat diet, skeletal muscle expression of GLUT-4 tended to negatively correlate with miR-16 levels ($p=0,0998$, $r^2=0,3866$, $n=4$). These results suggest that miR-16 is a negative regulator of GLUT-4 and may be involved in the regulation of cellular glucose metabolism.

Key words : microRNA, Glut-4, miR-16

Supported by CIHR MOP14496.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xvii
1 Introduction	1
1.1. ARN non-codant et miRNAs	2
1.1.1. Biogenèse des miRNAs.....	2
1.1.2. Fonctions et modes d'action.....	4
1.1.3. Études <i>in silico</i>	4
1.1.4. Potentiels thérapeutiques.....	6
1.2. Rôle des miRNAs dans le développement cardiaque et les maladies cardiovasculaires	7
1.2.1. Cardiogenèse	7
1.2.2. Hypertrophie cardiaque.....	8
1.2.3. Apoptose et prolifération des cardiomyocytes.....	9
1.2.4. Arythmie cardiaque	10

1.2.5. Fibrose	10
1.2.6. Angiogenèse	13
1.3. Sénescence	15
1.3.1. Sénescence Réplivative vs SIPS.....	15
1.3.2. miRNAs impliqués dans la sénescence	16
1.4. Transport actif du glucose	17
1.4.1. Transporteurs de Glucose.....	18
1.4.2. miRNA et INSR	19
1.4.3. miRNA et IRS-1	20
1.4.4. miRNA et GLUT-4	20
1.4.5. Rôle des miRNAs dans le diabète	21
1.5. microRNA-16.....	22
1.5.1. Rôles connus de la famille de miR-15/107	23
1.5.1.1. miR-16 et division cellulaire	24
1.5.1.2. miR-16 dans le métabolisme et le stress cellulaire	24
1.5.1.3. miR-16 et angiogenèse	25
1.5.1.4. miR-16 et cancer	25
2 Raisonement et objectifs de l'étude	27
3 Matériel et Méthodes.....	29
3.1. Analyse <i>in silico</i>	29
3.2. Microarray	30
3.3. Culture cellulaire	33

3.4. Transfection.....	34
3.5. Essai viabilité	35
3.6. Extraction protéique	36
3.7. Immunobuvardage de type Western.....	37
3.8. Extraction des miRNA et ARN total.....	38
3.9. Transcription inverse (RT-PCR)	39
3.10. PCR en temps réelle quantitative (qPCR).....	40
3.11. Clonage moléculaire.....	44
3.11.1. Digestion du vecteur pmiR-Report-1	44
3.11.2. Réaction PCR 3'UTR GLUT-4.....	45
3.11.3. Réaction PCR 3'UTR-GLUT-4-muté	46
3.11.4. Ligation pmiR-Report et réaction PCR 3'UTR-GLUT-4 et 3'UTR- GLUT-4-muté.....	49
3.11.5. Migration des produits PCR sur gel d'agarose.....	50
3.11.6. Purification des bandes séparées par gel d'agarose	51
3.11.7. Transformation du pmiR-Report-3'UTR-GLUT-4 et 3'UTR- GLUT-4-muté.....	52
3.12. Essai luciférase	54
3.13. Souris.....	54
3.14. Analyse statistique.....	55
4 Résultats	56
4.1. Expression de mir-34a dans la sénescence.....	56

4.2. Microarray sur des hIMAEC prolifératives et sénescents	57
4.3. Analyse des cibles potentielles de miR-16.....	61
4.4. Effet de miR-16 sur GLUT-4 et INSR	62
4.5. Corrélation entre miR-16 et la glycémie de patients coronariens	68
4.6. Corrélation miR-16, GLUT-4 et glycémie souris WD et RD	70
5 Discussion	78
5.1. Microarray	78
5.2. Rôle possible de miR-16 dans la sénescence	79
5.3. Effet de miR-16 sur GLUT-4	79
5.4. Relation miR-16 et glycémie.....	81
5.4.1. miR-16 et glycémie des patients coronariens.....	82
5.4.2. miR-16, GLUT-4 et glycémie dans le muscle squelettique de souris	83
6 Conclusion.....	85
Références	87

Liste des figures

Figure 1. Biogenèse des miRNAs.

Figure 2 : Altération de l'expression des miRNAs impliqués dans les maladies reliés aux cardiomyocytes et fibroblastes

Figure 3. Altération de l'expression des miRNAs impliqués dans les maladies reliés au remodelage vasculaire et à l'angiogenèse.

Figure 4. Transport actif du glucose par le GLUT-4.

Figure 5. Séquence de la famille des miR-16.

Figure 6. Effet du traitement simultané au NACet hTERT sur les hIMAEC.

Figure 7. Représentation schématique de la méthodologie abordée pour le microarray.

Figure 8. Représentation schématique de la méthode de qPCR des miRNAs.

Figure 9. Cartographie du pMIR-REPORT de la compagnie Ambion.

Figure 10. Représentation schématique des trois réactions PCR 1, 2.

Figure 11. Niveaux d'expression du miR-34a dans des hIMAEC prolifératives et sénescents par qPCR

Figure 12. Niveaux d'expression du miR-34a dans des hIMAEC prolifératives et sénescents.

Figure 13. Expression des miRNAs dans les hIMAEC prolifératives comparée à celle des hIMAEC sénescents.

Figure 14. Niveaux d'expression du miR-16 dans les cellules endothéliales prolifératives et sénescents de patients coronariens.

Figure 15. Prédiction des sites de liaison potentiels du miR-16 par le logiciel TargetScan.

Figure 16. Niveaux d'expression protéique de GLUT-4 suite à l'inhibition du miR-16 dans des HUVEC.

Figure 17. Niveaux de miR-16 suite à l'inhibition du miR-16 dans des HUVEC.

Figure 18. Régression linéaire entre miR-16 et GLUT-4 dans des HUVEC.

Figure 19. Niveaux d'expression protéique de INSR suite à l'inhibition du miR-16 dans des HUVEC.

Figure 20. Relation entre la glycémie de patients coronariens et les niveaux d'expression relatifs de miR-16 dans des hIMAEC.

Figure 21. Niveaux glycémiqes de souris nourries par une diète western comparée à une diète normale.

Figure 22. Corrélation des niveaux de GLUT-4 protéiques avec la glycémie de souris nourries par une diète western et une diète normale.

Figure 23. Corrélation des niveaux d'INSR protéiques avec la glycémie de souris nourries par une diète western et une diète normale.

Figure 24. Expression de miR-16 dans les muscles squelettiques de souris RD et WD.

Figure 25. Corrélation entre l'expression de miR-16 et les niveaux protéiques de GLUT-4 et INSR dans le muscle squelettique de souris.

Liste des tableaux

Tableau I. Séquences d'amorces utilisées pour les réactions qPCR.

Tableau II. Séquences d'amorces utilisées pour les réactions PCR de clonage moléculaire.

Tableau III. Séquences des 3'UTR générés de clonage moléculaire.

Liste des abréviations

3'UTR : 3' untranslated region

ADNc : ADN complémentaire

AMO : anti-miRNA oligonucléotides

ARNm : ARN messenger

BCL2 : B-cell lymphome 2

BSA : bovine serum albumin

CCND1 : cyclin D1

CCNE1 : G1/S-specific cyclin E1

CDC25a : cell division cycle 25 homologues A

CLL : leucémie lymphocytaire chronique

ddH₂O : H₂O bi-distillé

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

EBM 2 : endothelial basal medium 2

EGTA: acide ethylene-glycol-bis (b-aminoéthylether)-N,N,N',N'-tétraacétique

eNOS : endothelial nitric oxide synthase

FBS : fetal bovine serum

FGF : fibroblast growth factor

FOXO1: forkhead box protein O1

GAPDH : glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase

GLUT-1 : glucose transporter-1

GLUT-4 : glucose transporter-4

HDAC4: histone deacétylase 4

HEK293 : Human Embryonic Kidney 293 cells

HIF-1 β : hypoxia-inducible facteur-1 β

hIMAEC : human internal mammary artery endothelial cells

HRP : horseradish peroxidase

HSP20: Heat-Shock Protein 20

hTERT : human telomerase

HUVEC : cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine

IGF2R : insulin growth factor 2 receptor

IL-6 : interleukine-6

IL-8 : interleukine-8

IMA : artère mammaire interne

INSR : insulin receptor

IRS-1 : insulin receptor substrat-1

KLF15 : krueppel-like factor 15

miRNA : microRNA

MHC: myosin heavy chain

NAC : N-Acétyle-Cystéine

NTC : no template control

PBS : phosphate buffered solution

PCR : polymerase chain reaction

PHD2: propyle hydroxylase 2

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinases

PI3KR2 : PI3K regulatory subunit 2

qPCR : quantitative real-time PCR

RT-PCR : reverse transcription PCR

scnRNA : small non coding RNA

SAPS: senescence-associated-secretory-phenotype

SIPS : stress induced premature senescence

SIRT1 : Sirtuine-1

SRF: serum response factor

TBST: tris buffered-saline tween

TP : température pièce

UV : Ultra-Violet

VCAM-1 : vascular cell adhesion protein 1

VEGF : vascular endothelial growth factor

RD : diète régulière

WD : diète western

Remerciements

Je souhaiterais remercier mon directeur de recherche Dr Éric Thorin. Dr Thorin m'a tendu la main quand ma confiance en moi n'existait presque plus, un attribut que je suis fier de présenter aujourd'hui, comme ma plus grande qualité. Ce que je retiens le plus de mon passage dans son laboratoire c'est que je n'ai jamais cessé d'apprendre tant au plan personnel que professionnel. Dr Thorin n'était pas juste un patron de travail, mais plutôt un mentor qui s'intéressait à développer ses étudiants et non seulement leurs projets de recherche. C'est quelqu'un qui a acquis tout le respect que je peux accorder à une personne.

J'aimerais également remercier mon codirecteur Dr Zhiguo Wang. Un pionnier dans le domaine des miRNAs, sa codirection était essentielle pour ma progression. Il avait toujours sa porte ouverte pour m'aider et j'en ai profité pour acquérir beaucoup de ses connaissances.

Dre Nathalie Trescases-Thorin est quelqu'un qui va certainement me manquer. La proximité de nos bureaux a fait en sorte que nous avons eu des discussions quotidiennes des plus intéressantes. Son aide autant grâce à sa vaste connaissance de sujets diversifiés et son organisation du laboratoire nous a facilité notre travail. Je pense que mon bench et bureau très organisés vont lui manquer, mais je suis sûr qu'il pourra vivre avec. Merci !

Je remercie, Mme Maya Mammarbachi, une personne sans qui je n'aurais jamais pu effectuer ce travail. C'était un guide durant toute ma maîtrise puisque je n'ai pas passé une journée sans lui poser une question. Mme Mammarbachi m'a non seulement aidé au niveau technique, mais aussi dans l'orientation de mon projet. Je n'ai pas eu la chance de collaborer avec d'autres étudiants, mais je pense que nous avons travaillé, elle et moi, comme une équipe à deux pour réussir ce projet.

Xiaobin Luo était ma référence quotidienne pour les miRNAs. Sans lui j'aurais été comme une personne sans boussole dans le désert. C'est un étudiant qui a fait un travail incroyable durant son doctorat et qui mérite toute la reconnaissance de ses pairs. Merci pour cette personne qui m'a appris toutes les bases du domaine des miRNAs, mais aussi les détails les plus complexes. C'est quelqu'un que j'apprécie énormément et avec qui j'ai développé une belle camaraderie qui ne s'arrêtera pas après ce travail.

J'aimerais également remercier tous les autres membres du laboratoire du Dr Wang qui m'ont accueilli comme un des leurs dans le laboratoire.

Pour continuer, j'aimerais remercier tous les étudiants et employés que j'ai côtoyés quotidiennement durant ma maîtrise. Quand j'ai commencé à travailler à l'ICM, je n'aurais jamais pensé développer autant de relations amicales. C'est cette ambiance spéciale à l'ICM qui me manquera tellement. Un remerciement

aussi aux membres du comité étudiants qui m'ont aidé à développer la vie étudiante durant mon passage.

Ce qui fait de notre laboratoire spécial, c'est l'amitié, l'honnêteté et l'éthique de travail qui existe entre nous les étudiants. J'aimerais donc remercier un par un tous les étudiants du Dr Thorin avec qui j'ai eu le plaisir de partager le même laboratoire :

Merci à Nada Farhat, l'encyclopédie biochimique et technique du laboratoire. C'est une vraie amie que j'ai eu la chance de connaître. Notre relation amicale n'a fait que grandir avec le temps. C'est une personne avec qui j'ai pu partager toutes mes confidences et qui était toujours prête à m'écouter et m'aider. Sur les plans techniques et pratiques, inutile d'expliquer le grand rôle qu'elle a joué dans mon développement. C'est une grande personne que je respecte énormément.

Merci à Albert Nguyen, un ami que je vais continuer de côtoyer malgré mon départ. Jamais je n'aurais cru rencontrer une personne qui partage tant de ressemblance avec moi, tant au niveau de la personnalité, de la manière de penser ou des intérêts personnels. C'est une personne qui a vraiment rendu le travail plus agréable, mais c'est aussi quelqu'un qui était prêt à suivre mon cheminement et qui a d'excellentes connaissances techniques qui m'ont certainement aidé.

Merci à François Leblond, un exemple à suivre dans le laboratoire. Son perfectionnisme, sa discipline et sa structuration le représentent le mieux. Ces caractéristiques sont des points que j'aimerais développer en moi durant mon doctorat et François est le modèle que je veux suivre. Il n'attend pas seulement qu'on lui demande de l'aide, mais il est toujours le premier à l'offrir. C'est agréable de voir comment une personne ayant tant de responsabilités peut accomplir autant et plus que tous les autres étudiants !

Merci à Virginie Bolduc, une personne qui a une éthique de travail irréprochable. Nos connaissances scientifiques ne se ressemblent pas, mais c'est surtout au niveau personnel qu'on a développé une belle complicité au travail. Virginie me fait réaliser à quel point notre groupe était différent, mais comment on s'est bien complété entre nous. Les heures tardives qu'on passait ensemble avec Albert et les multiples belles discussions qu'on a eues ont certainement été une motivation pour travailler plus fort.

Merci au Dre Annick Drouin, une personne très animée qui nous a beaucoup manqué. Nos heures de dîner n'étaient plus jamais les mêmes après son départ. C'était toujours agréable d'assister aux longues argumentations très fréquentes entre elle et Albert. Cela m'a fait plaisir de l'avoir connue pendant mon passage.

Merci à Carol Yu qui est arrivée récemment au laboratoire. J'aurais aimé l'avoir eu comme collègue pour une plus longue durée.

Merci à Shiva Safavi, qui est aussi arrivée dernièrement dans le laboratoire.

C'est une personne qui a apporté une nouvelle dynamique au laboratoire.

J'aimerais finalement remercier le président rapporteur, le Dr Guy Rousseau et le membre du jury, le Dr Christian Beauséjour, qui ont accepté de corriger ce mémoire.

1 Introduction

Le dogme central qui propose le transfert d'informations génétiques de l'ADN vers l'ARN pour former des protéines constitue toujours une base solide qui relie la médecine à la génétique. Mais les détails et exceptions de fonctionnement de ces trois composantes ne sont pas encore éclaircis. Un nouveau groupe d'ARN non-codant surnommé les microRNAs (miRNA) a été conservé durant l'évolution; ces miRNAs sont d'importants régulateurs de l'expression des gènes du génome (Boyd, 2008). Ils ont la capacité de réguler plusieurs gènes cibles en même temps, d'où l'importance qui leur a été accordée durant ces dernières années (Boyd, 2008). Les miRNAs agissent en inhibant la transcription de l'ARNm cible. Notre compréhension des miRNAs est encore primitive, mais les études montrent un rôle potentiel dans le développement humain, la différenciation cellulaire, l'adaptation à l'environnement, l'oncogenèse, le métabolisme cellulaire, la neurobiologie et l'interaction des cellules hôtes avec des pathogènes (Esau and Monia, 2007). Les miRNAs constituent un mécanisme de régulation post-transcriptionnel conservé à travers l'évolution, mécanisme qui ajoute un niveau de complexité dans le réseau de régulation génétique (Boyd, 2008; Esau and Monia, 2007).

1.1. ARN non-codant et miRNAs

Les études de séquençage d'ADN et du génome humain ont montré que 50% de l'ADN génomique est transcrit en ARN, dont 2% sont traduits en protéines alors que les 98% restants sont de l'ARN non-codant, de taille moyenne de 18 à 500 nucléotides (Zhang, 2008b). L'ARN non-codant de très petite taille constitue la classe de petits ARN non-codants (sncRNA) (Zhang, 2008b). Les miRNAs font partie de ces sncRNA (Zhang, 2008b). Le premier miRNA, lin-4, a été découvert en 1993. Ce miRNA n'a pas été reconnu comme une classe à part d'ARN non-codant, mais plutôt comme un artefact (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Ce n'est qu'au début des années 2000, lors de la découverte du miRNA let-7 que les miRNAs ont été reconnus comme des importants régulateurs biologiquement actifs (Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000). Depuis, on estime que le génome humain encode pour près de 1000 miRNAs (Bentwich et al., 2005). Ensemble, ces miRNAs régulent l'expression d'approximativement 30 % du génome humain (Lewis et al., 2005).

1.1.1. Biogenèse des miRNAs

Les miRNAs sont des ARNs simple brin dont la taille moyenne est de 21 à 22 nucléotides. Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II ou III dans le noyau sous forme de pri-miRNA (Borchert et al., 2006; Kim, 2005). Cette forme subit

deux étapes majeures de maturation (figure 1), la première dans le noyau par l'enzyme RNase III, Drosha, pour former le pré-miRNA. Ensuite, le pré-miRNA est transporté par RanGTP et Exportin 5 vers le cytoplasme. Puis, une deuxième maturation par une autre RNase III, le Dicer, génère une forme transitoire de miRNA doubles brins. Cette forme transitoire est recrutée sur un complexe associé au miRNA, le miRISC, qui inclut la protéine Argonaute. Ce complexe retient un des deux brins préférentiellement, et devient le miRNA mature. Le brin opposé est éliminé (Kim and Kim, 2007; Ruby et al., 2007; Zhang, 2008a).

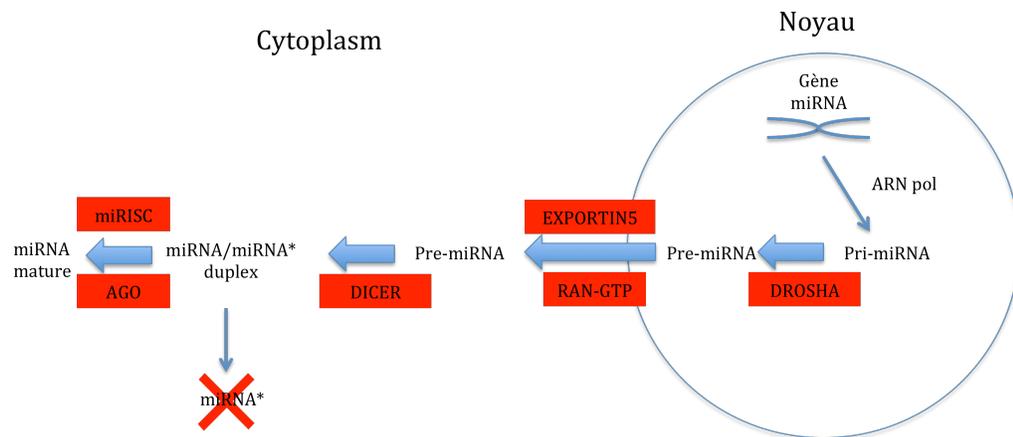


Figure 1. Biogenèse des miRNAs. Les miRNAs sont transcrits en pri-miRNA. Le pri-miRNA subit une première étape de maturation à travers le DROSHA pour devenir le pré-miRNA. Ce dernier est transporté vers le cytoplasme où il subira une deuxième étape de maturation par le DICER pour former le miRNA mature double brin. La séquence mature du miRNA sera recrutée sur l'ARNm cible par le complexe miRISC. Adapté de (Kim and Kim, 2007; Ruby et al., 2007).

1.1.2. Fonctions et modes d'action

Les miRNAs agissent en se liant sur des sites complémentaires d'ARNm pour inhiber l'expression génique selon deux manières: (1) les miRNAs qui se lient parfaitement à l'ARNm cible induisent une dégradation de l'ARNm. (2) Les miRNAs qui lient imparfaitement l'ARNm cible bloquent la traduction de l'ARNm sans toutefois dégrader ce dernier. Cette deuxième méthode est la plus fréquente et les mécanismes par lesquels les miRNAs inhibent cette traduction sont encore mal compris (Hutvagner and Zamore, 2002; Zeng et al., 2003; Zhang, 2008a). Une des particularités des miRNAs est de pouvoir réguler l'expression de plusieurs gènes dans une même cellule (Lim et al., 2005). D'autre part, plusieurs miRNAs peuvent réguler le même gène. Les miRNAs peuvent s'organiser en tandem et peuvent être groupés en "cluster" très proche dans le génome. Dans plusieurs cas, ces miRNAs ont des séquences très similaires et la cohorte de miRNAs peut réguler de manière additive un ou plusieurs ARNm (Ambros, 2004).

1.1.3. Études *in silico*

Chez les animaux la plupart des miRNAs ont des sites de liaisons qui ne sont pas parfaitement complémentaires. Pour cette raison, les prédictions de cibles potentielles de miRNAs, par le biais de logiciels de prédictions de miRNAs, sont basées sur plusieurs critères :

- La séquence de miRNA est complémentaire à une région qui se trouve dans le 3'UTR de l'ARNm (Doench and Sharp, 2004; Kim et al., 2006).
- La complémentarité entre les deux séquences doit être parfaite dans la région « seed » qui représente les nucléotides 2 à 8 de la terminaison 5' du miRNA.) (Doench and Sharp, 2004; Kim et al., 2006).
- Des appariements en dehors de cette région « seed » (c'est à dire dans le 3' du miRNA) sont aussi requis (Vella et al., 2004).
- Un appariement presque parfait dans la région 3' n'est pas suffisant sans un appariement parfait de la région « seed » (Ghosh et al., 2007).
- Les liaisons G:U « wobbles » peuvent jouer un rôle dans l'appariement (Brennecke et al., 2005; Doench and Sharp, 2004).
- Les coopérations de contrôle traductionnel d'un ARNm cible par plusieurs miRNAs, ainsi que le potentiel d'un miRNA à cibler plusieurs ARNm sont aussi pris en considération (Doench and Sharp, 2004; Ghosh et al., 2007).

1.1.4. Potentiels thérapeutiques

Malgré notre compréhension encore primitive des miRNAs, plusieurs études montrent que les miRNAs pourraient représenter une nouvelle classe pharmacologique, et ce, dans différents domaines thérapeutiques. Les différentes modulations thérapeutiques des miRNAs seraient basées sur des stratégies d'inhibition des miRNAs ou de remplacement des miRNAs (Esau and Monia, 2007). La technologie la plus efficace pour l'inhibition des miRNAs est l'utilisation d'anti-miRNA oligonucléotides (AMOs). Cette inhibition se fait par des appariements de type Watson-Crick entre les AMOs et son miRNA cible. Des modifications sur certains nucléotides sont essentielles pour la stabilité de l'AMO (Esau and Monia, 2007). Les AMOs sont beaucoup utilisés dans les expériences *in vitro* de culture cellulaire, mais ils représentent aussi un mode thérapeutique potentiel (Esau and Monia, 2007; Liu et al., 2008). L'effet inverse d'une inhibition est la surexpression de miRNAs; elle se fait principalement par deux méthodes : par transfection transitoire de miRNA double brins ou par l'utilisation d'un vecteur qui peut surexprimer un miRNA spécifique (Liu et al., 2008). Ainsi, dans un cas pathogène où un miRNA est faiblement exprimé cette technique permettrait de restaurer les niveaux basaux de miRNA. Les méthodes de transfert des AMOs seraient similaires à ceux des siRNAs, puisque les molécules sont de tailles et de natures très similaires (Liu et al., 2008). Le transfert des siRNAs locaux a déjà été réussi dans plusieurs organes comme les yeux et les poumons (Soifer et al., 2007). Le problème

majeur reste le transfert de ces molécules dans des cellules et tissus spécifiques, plutôt que dans un organe entier (Soifer et al., 2007).

1.2. Rôle des miRNAs dans le développement cardiaque et les maladies cardiovasculaires

Le cœur est le premier organe fonctionnel formé dans l'embryon et tous les évènements subséquents de la vie sont dépendants de sa contraction (Liu and Olson, 2010). Une étude de l'expression des miRNAs impliqués dans les maladies cardiovasculaires a montré que la majorité des 18 miRNAs les plus exprimés dans le cœur avaient des expressions altérées dans les maladies cardiaques chez des adultes (Small et al., 2010). Ceci démontre l'importance des miRNAs dans la régulation de l'expression des gènes modulateurs des maladies cardiovasculaires (Small et al., 2010).

1.2.1. Cardiogenèse

Des analyses systématiques de l'expression spatiotemporelle des miRNAs ont montré que plusieurs miRNAs sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la cardiogenèse durant des phases précoces de l'embryon (Catalucci et al., 2009; Latronico et al., 2007). Ainsi, miR-1, miR-133 jouent des rôles importants dans la prolifération et la différenciation musculaire (Catalucci et al., 2009; Chen et al., 2006). L'injection

de miR-1 ou de miR-133 dans des *Xenopus Laevis* à différents stades de développement embryonnaire, induit des changements drastiques dans le développement cardiaque de l'amphibien (Chen et al., 2006): aucun tissu cardiaque n'a pu être observé suite à l'injection de miR-1. En revanche, une injection de miR-133 induit une formation de tissus cardiaques, mais avec une formation très désorganisée (Chen et al., 2006). L'effet inhibiteur de miR-1 sur la myogenèse s'effectue en régulant l'histone deacétylase 4 (HDAC4). MiR-133 aiderait à la prolifération des myoblastes en inhibant le serum response factor (SRF) (Chen et al., 2006).

1.2.2. Hypertrophie cardiaque

Le cœur répond à des dommages chroniques et aigus par une croissance hypertrophique et une diminution de la contractilité cardiaque. Le miR-208a est requis pour le remodelage cardiaque hypertrophique en affectant la contractilité cardiaque (van Rooij et al., 2006). La contractilité cardiaque dépend des deux gènes myosin heavy chain (MHC) α et β qui sont régulés de manière opposée. Le gène MHC α encode pour le miR-208a. Lorsque miR-208a est surexprimé, il active indirectement l'expression du gène MHC β , ce qui diminue la contractilité (van Rooij and Olson, 2007). D'autre part, miR-133 est un régulateur négatif de l'hypertrophie puisqu'il inhibe le remodelage cardiaque (Care et al., 2007). Ce miR-133 agit en ciblant RhoA, une protéine échangeur

de GDP-GTP qui régule l'hypertrophie cardiaque, mais miR-133 cible aussi Cdc42 qui est une kinase impliquée dans l'hypertrophie (Care et al., 2007).

1.2.3. Apoptose et prolifération des cardiomyocytes.

Le cœur a une capacité limitée de régénération. Une perte excessive de cardiomyocytes après un infarctus du myocarde peut diminuer significativement la performance cardiaque (Small et al., 2010). La suppression du gène de miR-199a induit l'apoptose en conditions d'ischémie alors qu'il contribue aux effets bénéfiques du conditionnement préischémique et protège les cardiomyocytes contre les dommages ischémiques (Rane et al., 2009). La sous-expression de miR-199a est requise pour l'augmentation d'expression de sa cible directe le hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α (Rane et al., 2009). MiR-199a régule aussi Sirt-1 qui inhibe le propyle hydroxylase 2 (PHD2) inhibant à son tour HIF-1 α (Rane et al., 2009). L'expression de miR-320 est faible dans les cœurs ayant subi des dommages de reperfusion postischémique (Ren et al., 2009). La surexpression du miR-320 dans ces conditions conduit à une augmentation de la taille de l'infarctus ainsi qu'une augmentation des niveaux d'apoptose (Ren et al., 2009). MiR-320 agit en inhibant directement Heat-Shock Protein 20 (HSP20) qui est surexprimée dans les cœurs de souris suite à des conditions ischémiques (Ren et al., 2009; Small et al., 2010).

1.2.4. Arythmie cardiaque

Les arythmies cardiaques sont des perturbations électriques qui causent des battements cardiaques irréguliers. Les arythmies cardiaques constituent la cause principale de mort subite (Pan et al., 2010). Malgré l'absence de preuves cliniques de l'implication des miRNAs dans les arythmies cardiaques, des études montrent leurs implications dans des modèles animaux. Ainsi, la surexpression de miR-1 dans les cœurs de rats augmente les incidences d'arythmies (Yang et al., 2007). L'effet inverse est observé lorsque l'on inhibe miR-1 (Yang et al., 2007). Des études montrent que cet effet est dû à un remodelage électrophysiologique des canaux potassiques (Terentyev et al., 2009). Le miR-133 a aussi des effets de remodelage électrophysiologique. Une sous-expression de miR-133 est associée à une surexpression de deux canaux ioniques HCN2/HCN4 ce qui induit un développement d'arythmies qui sont observées dans des cas d'insuffisance cardiaque (Catalucci et al., 2009; Ivey et al., 2008; Yang et al., 2007).

1.2.5. Fibrose

Les miRNAs sont impliqués dans d'autres types cellulaires que les myocytes, dont les fibroblastes (figure 2). Les fibroblastes produisent la matrice extracellulaire de fibres de collagènes à l'entour des myocytes cardiaques. Suite à un stress pathologique ou un infarctus du myocarde, les fibroblastes sécrètent

des protéines de matrice extracellulaire de manière excessive et non proportionnelle (van Rooij et al., 2008a). Plusieurs études montrent que les miR-133, miR-21, miR-29 et miR-30 participent au remodelage de la matrice extracellulaire dans des cas de fibrose (Pan et al., 2010; van Rooij et al., 2008b). Par exemple, des expériences d'inactivation du gène du miR-29 *in vivo* augmentent les niveaux de collagène dans le cœur (Thum et al., 2008; van Rooij et al., 2008b). L'implication du miR-21 dans la fibrose a également été démontrée: une surexpression du miR-21 dans les fibroblastes augmente la survie de fibroblastes. De plus, l'inhibition du miR-21 chez des souris exposées à une surcharge de pression hémodynamique induit une diminution de l'expression des gènes qui sont très fortement exprimés durant la fibrose et qui codent pour les collagènes (Pan et al., 2010; Roy et al., 2009; Thum et al., 2008).

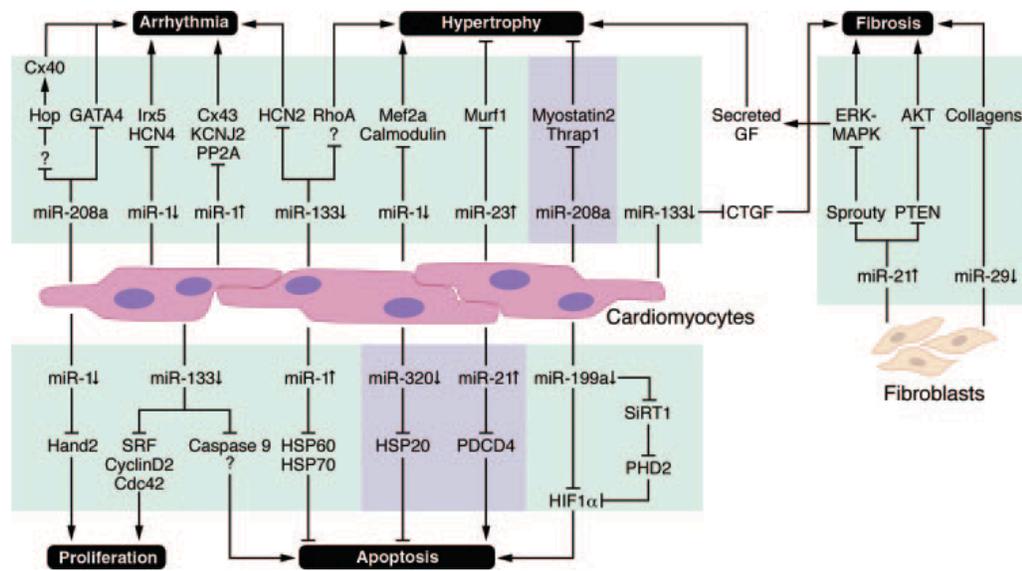


Figure 2 : Altération de l'expression des miRNAs impliqués dans les maladies reliées aux cardiomyocytes et fibroblastes (Small et al., 2010). AP-1 : activator protein 1; CDC42 : cell division cycle 42; CTGF: connective tissue growth factor; Cx43: connexin 43; Hand2: heart and neural crest derivatives expressed 2; HCN2: hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2; HIF1: hypoxia-inducible factor; Hop: homeodomain-only protein; Hsp: heat shock protein; Irx5: Iroquois homeobox protein 5; Kcnj2: potassium voltage-gated channel subfamily D member 2; Kcnj2: potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 2; MuRF 1: muscle RING-finger protein 1; PDCD4: programmed cell death 4; PHD2: prolyl hydroxylase 2; PP2A: B56a regulatory subunit of protein phosphatase 2a; PTEN: phosphatase and tensin homolog; RhoA: Ras homolog gene family, member A; Sirt1: sirtuin; SRF: serum response factor; and Thrap1: thyroid hormone receptor associated protein 1 (Small et al., 2010).

1.2.6. Angiogenèse

La néoangiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La néoangiogenèse joue un rôle essentiel dans le processus de réparation cardiaque suite à des dommages ischémiques. Dans le cas d'un infarctus du myocarde, la formation de néovaisseaux permet de restaurer le débit sanguin dans la zone ischémique (Kutryk and Stewart, 2003). Ce processus exige une signalisation par des facteurs angiogéniques comme le vascular endothelial growth factor (VEGF) et fibroblast growth factor (FGF) (Scheinowitz et al., 1997; Syed et al., 2004; van Rooij et al., 2008a).

Plusieurs miRNAs jouent un rôle dans l'angiogenèse tumorale comme le miR-296, miR378 et le cluster miR-17~92 (Figure 3). Au niveau endothélial, le rôle de miR-126, qui est spécifique à l'endothélium, est le plus étudié (Wang et al., 2008). L'élimination du miR-126 chez des souris provoque des hémorragies et une mortalité embryonnaire partielle, avec des défauts précoces de la formation des vaisseaux cérébraux et rétiniens. Les souris survivantes sont identiques aux souris contrôles suggérant que miR-126 est un important régulateur du développement, mais pas du maintien à l'âge adulte. Trois semaines post-infarctus, 70 % des souris sauvages (*wild-type*) ont survécu, alors que seulement 18 % des souris miR126^{-/-} ont survécu; cette mortalité précoce est liée à des défauts de vascularisation cardiaque avec rupture du ventricule (Wang et al., 2008). Parmi les cibles identifiées de miR-126, il y a "vascular cell adhesion protein 1" (VCAM-1) d'où le rôle de miR-126 dans

l'inflammation (Schmidt et al., 2007), sprouty-related, EVH1 domain containing 1 (Spred-1), un régulateur de la voie des MAP kinases (Fish et al., 2008) et PI3K regulatory subunit 2 (PIK3R2) (Wang et al., 2008). Plusieurs études d'angiogenèse se concentrent sur le rôle d'un autre miRNA spécifique de l'endothélium, le cluster miR-17~92. Ce miRNA contrôle l'angiogenèse ainsi que la réparation des tissus endommagés à la suite d'un infarctus du myocarde (Bonauer et al., 2009; Wang and Olson, 2009).

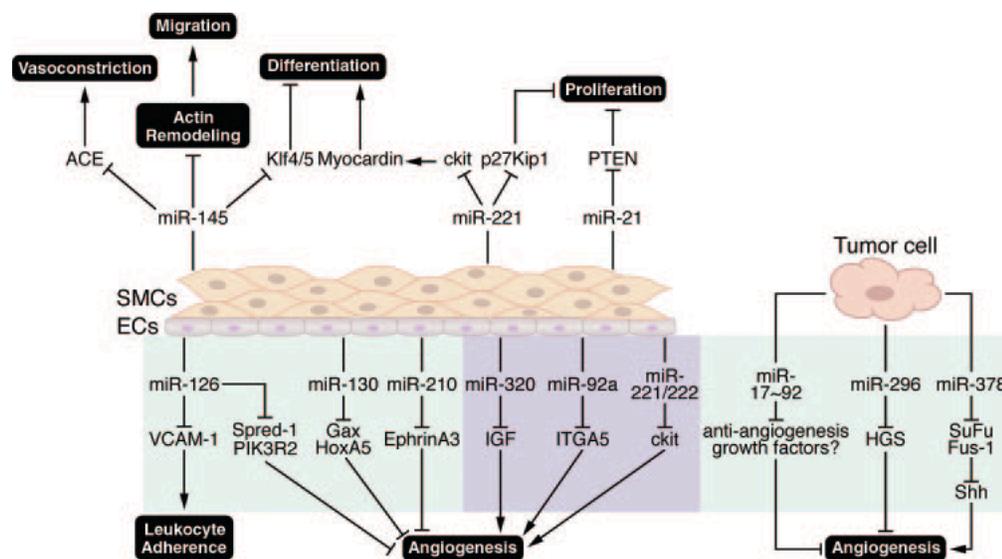


Figure 3. Altération de l'expression des miRNAs impliqués dans les maladies reliées au remodelage vasculaire et à l'angiogenèse. ACE: angiotensin converting enzyme; SuFu: suppressor of fused; Shh: sonic hedgehog; HGS: hepatocyte growth factor–regulated tyrosine kinase substrate; IGF: insulin-like growth factor; ITGA5: integrin-5; PIK3R2: phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2 (p85); PTEN: phosphatase and tensin homolog; Spred-1: sprouty-related EVH domain-containing protein-1; VCAM-1 (Small et al., 2010).

1.3. Sénescence

La sénescence est un arrêt de croissance cellulaire permanent dans lequel les cellules sont métaboliquement actives, mais incapables de se diviser (Kuilman et al., 2010). La sénescence a tout d'abord été remarquée lorsque des cellules primaires humaines (fibroblastes) extraites de tissus humains mis en culture n'arrivaient plus à proliférer (Hayflick and Moorhead, 1961; Kuilman et al., 2010). Ce phénomène cellulaire est causé par l'attrition progressive des télomères qui accompagne inévitablement la réplication cellulaire, mais la sénescence peut aussi être induite prématurément par un stress (Stress-induced-premature-senescence : SIPS), en absence de raccourcissement ou même de dysfonction télomérique (Kuilman et al., 2010).

1.3.1. Sénescence Répllicative vs SIPS

La sénescence répllicative est observée lorsque les cellules en culture (non cancéreuses ou génétiquement modifiées) *in vitro* ne se divisent plus et présentent des phénotypes qui accompagnent la sénescence: une morphologie large et plate, très vésiculaire, un arrêt de la synthèse d'ADN et une augmentation de la β -galactosidase acide associée à la sénescence. Ce dernier phénotype n'est pas observé dans toutes les formes de sénescence (Deng et al., 2008). Outre les phénotypes mentionnés, les cellules sénescents plusieurs changements dans leur sécrétome c'est ce qu'on appelle la senescence-

associated-secretory-phenotype (SAPS) (Coppe et al., 2008; Deng et al., 2008; Kuilman et al., 2010). La sénescence répliquative est largement causée par un raccourcissement des télomères, une structure protectrice de tous les chromosomes eucaryotes, raccourcissement qui accompagne la division cellulaire. Lorsque les télomères ont raccourci jusqu'à un niveau critique, les dommages à l'ADN engendrés poussent les cellules à entrer en sénescence. La télomérase (hTERT) est une enzyme qui allonge le télomère et protège les cellules contre les dommages à l'ADN (Deng et al., 2008; Kuilman et al., 2010). L'induction du SIPS est générée lors de l'utilisation *in vitro* de faibles doses non toxiques de différentes sources de stress comme les rayonnements UV, le peroxyde d'hydrogène, les agents chimiothérapeutiques et les rayonnements ionisants (Suzuki and Boothman, 2008). Le SIPS est induit à un stade plus précoce que la sénescence répliquative puisque l'attrition des télomères jusqu'au niveau critique n'est pas encore réalisée (Suzuki and Boothman, 2008).

1.3.2. miRNAs impliqués dans la sénescence

Plusieurs études s'intéressent à l'implication des miRNAs dans la sénescence cellulaire. Le miR-146 est surexprimé dans des cellules sénescents de fibroblastes humains comparés à des cellules quiescentes. Ce miRNA inhibe les modulateurs inflammatoires associés à la sénescence : interleukine 6 et 8 (IL-6 et IL-8) (Bhaumik et al., 2009). D'autre part, le miR-34a est surexprimé

dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) sénescence. Une surexpression de miR-34a induit la sénescence en inhibant la sirtuine 1 (SIRT-1) une déacétylase qui a comme cible le gène suppresseur de tumeur p53 (Ito et al., 2010; Yamakuchi and Lowenstein, 2009). Un autre miRNA agit de façon identique. La surexpression de miR-217 dans des HUVEC, des cellules endothéliales aortiques ainsi que des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines induit la sénescence prématurément. Ce miRNA inhibe SIRT-1 modulant ainsi l'expression de Forkhead box protein O1 (FoxO1) et la synthèse du monoxyde d'azote endothélial (eNOS ou NOS3). Une inhibition de miR-217 sur ces types cellulaires réduit les niveaux de sénescence et augmente les propriétés angiogéniques des cellules (Menghini et al., 2009). Une étude a évalué les changements d'expression des miRNAs lors de l'induction de SIPS dans des fibroblastes diploïdes et de trabéculum cornéoscléral humain. Cette étude montre que l'expression de 24 miRNAs est significativement changée. Parmi ces miRNAs, miR-16 est sous-exprimé dans les cellules sénescences (Li et al., 2009).

1.4. Transport actif du glucose

Le glucose est l'une des molécules biologiques les plus abondantes dans la nature. Au cours de l'évolution, les mécanismes cataboliques et anaboliques ont constamment évolué pour utiliser le glucose comme substrat (Thorens and

Mueckler, 2010). Les cellules ont besoin de transporteurs de glucose pour permettre l'entrée de glucose dans les cellules.

1.4.1. Transporteurs de Glucose

La famille des transporteurs de glucose comprend 14 membres. Ils sont surnommés SLC2A, mais le nom le plus couramment utilisé est GLUT (GLUT-1 à 14). La plupart des transporteurs de glucose catalysent un transfert facilité (dépendant de l'énergie) bidirectionnel de leurs substrats (Thorens and Mueckler, 2010). Parmi les transporteurs de glucose, GLUT-1 et GLUT-4 sont les plus étudiés. GLUT-1 est indépendant de l'insuline. Les mécanismes par lesquels il transporte le glucose ne sont encore pas bien élucidés. Le GLUT-4 est un transporteur de glucose dépendant de l'insuline. Une stimulation avec l'insuline active le récepteur à l'insuline (INSR), un homodimère de type tyrosine kinase. Cette activation initie une cascade de signalisation à travers la voie des phosphoinositol 3 kinase (PI3K) et du substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS-1) (Chiu and Cline, 2010). Cette cascade de signalisation engendre le transport de glucose par le trafic des GLUT-4 intracellulaires en trois étapes (Figure 4) : la ségrégation du GLUT-4 dans des vésicules, suivie par la migration de ces vésicules vers la membrane plasmique, et finalement la fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique (Brady et al., 1999). Une fois le GLUT-4 dans la membrane plasmique, il pourra transporter le glucose à l'intérieur de la cellule. Le GLUT-4 est prédominant, mais non

exclusivement, exprimé dans les tissus adipeux ainsi que dans les tissus musculaires squelettiques et cardiaques (Brady et al., 1999; Klip, 2009).

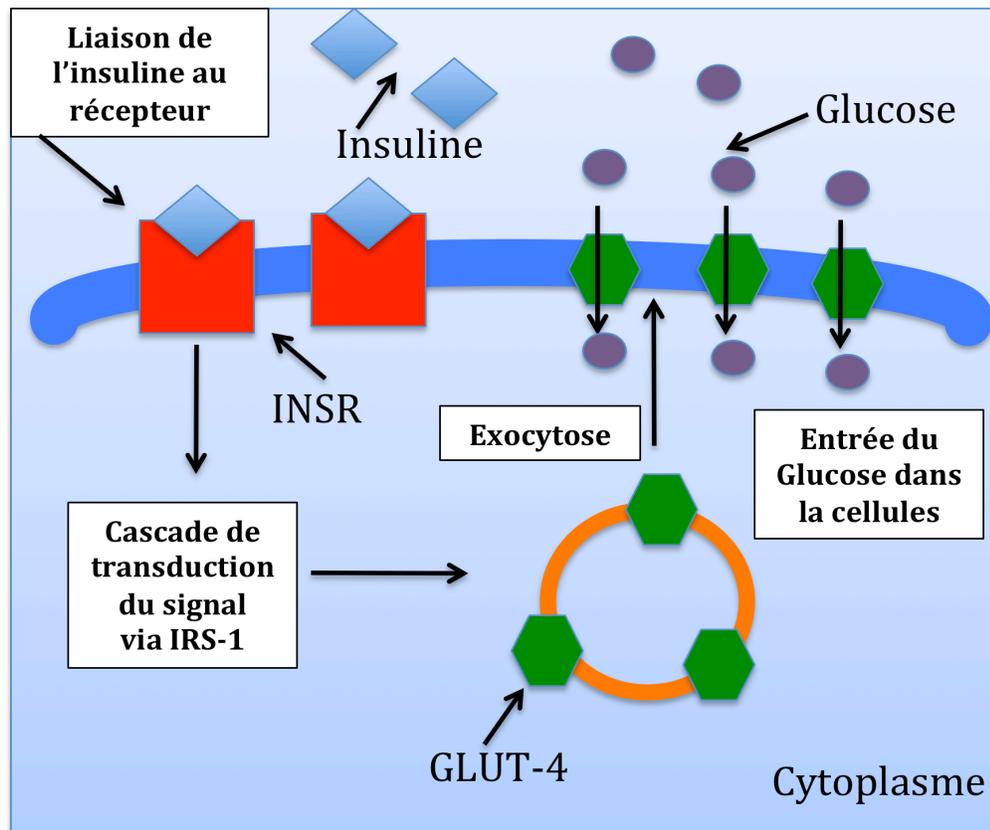


Figure 4. Transport actif du glucose par le GLUT-4. Suite à une stimulation par l'insuline, une cascade de signalisation traduit un signal qui permet aux vésicules sécrétrices de GLUT-4 de se localiser vers la membrane cytoplasmique où GLUT-4 permettra l'entrée de glucose dans les cellules.

1.4.2. miRNA et INSR

A ma connaissance, aucune étude à jour n'implique une corrélation directe ou indirecte entre les miRNAs et le récepteur à l'insuline.

1.4.3. miRNA et IRS-1

Contrairement au INSR, l'implication des miRNAs dans la régulation de IRS-1 est plus étudiée. IRS-1 est souvent surexprimé dans la plupart des cancers humains (Baserga, 2009). En effet, IRS-1 est une cible directe de miR-145, ce qui inhibe la croissance des cellules cancéreuses du colon (Shi et al., 2007). D'autre part, deux études montrent que le miR-126 inhibe IRS-1 également au niveau traductionnel (La Rocca et al., 2009; Zhang et al., 2008). Une troisième étude montre que miR-126 est sous-exprimé dans les cellules du cancer du sein et une surexpression de miR-126 inhibe la progression du cycle cellulaire de la phase G1/G0 à la phase S (Zhang et al., 2008). L'inactivation génique de IRS-1 mime les effets de miR-126 (Zhang et al., 2008). Cela suggère que l'effet de la surexpression de miR-126 sur l'arrêt du cycle cellulaire se fait par l'inhibition de IRS-1 (Zhang et al., 2008).

1.4.4. miRNA et GLUT-4

Deux études ont évalué l'implication des miRNAs dans la régulation du GLUT-4. Le miR-133 est impliqué dans le contrôle du métabolisme des myocytes cardiaques par la régulation l'expression de GLUT-4 en ciblant le Krueppel-like factor 15 (KLF15) (Horie et al., 2009). Le facteur de transcription KLF15 active le promoteur de GLUT-4 (Gray et al., 2002). Ainsi, une inhibition de KLF15 par miR-133 diminue les niveaux de GLUT-4. Outre

KLF15, plusieurs protéines ciblent GLUT-4 au niveau transcriptionnel, mais aucune régulation post-transcriptionnelle n'est encore connue. Le miR-223 régule l'expression de GLUT-4, mais en augmentant les niveaux de GLUT-4 et ultimement le transport de glucose des cardiomyocytes (Lu et al., 2010). Cette augmentation peut s'expliquer par l'inhibition d'une protéine inhibitrice de GLUT-4 (Lu et al., 2010). Ces miRNAs peuvent donc avoir des effets indirects sur le diabète.

1.4.5. Rôle des miRNAs dans le diabète

Le diabète mellitus est une maladie chronique caractérisée par une hyperglycémie causée par une déficience en expression d'insuline, par un problème du mécanisme d'action de l'insuline, ou les deux à la fois (2011). Il existe deux types de diabète: le diabète de type I causé par l'absence de sécrétion d'insuline, et le diabète de type 2 causé en partie par une résistance à l'insuline ainsi qu'une sécrétion inadéquate d'insuline compensatrice (Gutteridge, 1999). Ce dernier constitue la majorité des cas de diabète. Le diabète de type 2 est associé à un polymorphisme de type insertion/délétion ACAA dans le 3'UTR du « insulin growth factor 2 receptor » (IGF2R). Une étude montre que le miR-657 est un régulateur direct de IGF2R dans des cellules hépatiques HEP G2. La séquence complémentaire de ce miRNA se trouve dans la séquence contenant le polymorphisme ACAA, ce qui suggère que miR-657 est un régulateur potentiel du diabète de type 2 (Lv et al., 2008).

D'autre part, une étude a évalué l'expression de miRNA dans le plasma de patients diabétiques. Parmi les miRNAs dont l'expression change, le miRNA endothélial miR-126 diminue fortement chez les patients comparés aux sujets sains (Zampetaki et al., 2010). Ces résultats ont été reproduits dans un modèle de souris hyperglycémiques (Zampetaki et al., 2010). Contrairement au miR-126, le miR-503 est surexprimé dans le plasma de patients diabétiques ainsi que dans des cellules endothéliales en conditions hyperglycémiques (Caporali et al., 2011). Ce miRNA régule directement les gènes « G1/S-specific cyclin E1 » (CCNE1) et « cell division cycle homolog 25 A » (CDC25A) qui sont sous-exprimés dans les cellules endothéliales en conditions hyperglycémiques (Caporali et al., 2011).

1.5. microRNA-16

Le miRNA-16 est l'un des miRNAs les plus étudiés. Il fait partie de la famille des miR-15/107. Cette famille est constituée de 10 membres qui sont exprimés chez l'humain : miR-15a, miR-15b, miR-16, miR-103, et miR-107 sont exprimés chez tous les vertébrés tandis que miR-195, miR-424, miR-497, miR-503 et miR-646 ne sont exprimés que chez les mammifères. Ils ont tous une séquence conservée qui commence, du côté 5', du premier ou du deuxième nucléotide par AGCAGC (Finnerty et al., 2010) (Figure 5). Cette similarité entre les séquences des différents membres de la famille fait en sorte que plusieurs miRNAs peuvent avoir des cibles communes. Ils ont donc

probablement des rôles cellulaires semblables et complémentaires. En effet, leurs rôles dans différentes pathologies révèlent des similitudes avec différents membres de la famille (Finnerty et al., 2010).

	*	#
hsa-miR-107	AGCAGC	AUUGUACAGGGCUAUCA
hsa-miR-103	AGCAGC	AUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-15a	UAGCAGC	ACAUA AUGGUUUGUG
hsa-miR-15b	UAGCAGC	ACAUCAUGGUUUACA
hsa-miR-16	UAGCAGC	ACGUAAAUAUUGGCG
hsa-miR-195	UAGCAGC	ACAGAAAUAUUGGCC
hsa-miR-497	CAGCAGC	ACACUGUGGUUUGU
hsa-miR-503	UAGCAGC	GGGAACAGUUCUGCAG
hsa-miR-424	CAGCAGC	AAUUCAUGUUUUGAA
hsa-miR-646	AAGCAGC	UGCCUCUGAGGC

Figure 5. Séquence de la famille des miR-16. Tous ces miRNAs commencent (au premier ou deuxième nucléotide) avec une séquence conservée au 5' : AGCAGC (Finnerty et al., 2010).

1.5.1. Rôles connus de la famille de miR-15/107

La famille de miR-15/107 est impliquée dans plusieurs processus biologiques : la division cellulaire, le stress et le métabolisme cellulaire ainsi que l'angiogenèse (Finnerty et al., 2010). Ces miRNAs sont aussi impliqués dans plusieurs maladies : les cancers, les maladies neurodégénératives et les maladies cardiaques (Finnerty et al., 2010). MiR-16 est impliqué dans plusieurs

de ces processus. C'est un miRNA qui est reconnu pour son rôle antiprolifératif, mais qui a plusieurs autres fonctions cellulaires.

1.5.1.1. miR-16 et division cellulaire

Un groupe a démontré que miR-16 inhibe la croissance cellulaire ainsi que la progression du cycle cellulaire (Linsley et al., 2007). Cette étude montre que miR-16 module l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. MiR-16 agit en inhibant simultanément un groupe de gènes et c'est ce contrôle collectif qui induit un arrêt du cycle cellulaire (Linsley et al., 2007). L'inhibition individuelle de ces gènes n'a pas d'effet sur le cycle cellulaire (Linsley et al., 2007). L'effet du miR-16 observé pourrait ainsi être expliqué par un contrôle collectif et non individuel des gènes régulateurs du cycle cellulaire.

1.5.1.2. miR-16 dans le métabolisme et le stress cellulaire

L'implication du miR-16 dans le métabolisme cellulaire n'est pas encore bien connue. Une étude a évalué l'expression des microRNAs dans des cellules pancréatiques β suite à des changements de concentration de glucose. Parmi les miRNAs dont l'expression augmente suite à une stimulation avec le glucose, on retrouve ceux de la famille de miR-15/107 incluant miR-16 (Tang et al., 2009). Des perturbations du métabolisme peuvent causer un stress cellulaire, mais l'inverse est vrai aussi (Finnerty et al., 2010). Les niveaux de miR-16

augmentent suite à une irradiation UV. Cette induction des niveaux de miR-16 inhibe le gène CDC25a, un médiateur essentiel du point de contrôle de la phase G1-S et régule ainsi la prolifération cellulaire (Pothof et al., 2009).

1.5.1.3. miR-16 et angiogenèse

Le VEGF est l'un des facteurs de survie les plus importants des cellules endothéliales. Son rôle dans l'angiogenèse est essentiel. MiR-16 inhibe directement la traduction de VEGF en ciblant son ARNm (Karaa et al., 2009). Ceci devrait faire de miR-16 un régulateur direct de l'angiogenèse dans les cellules endothéliales, mais aucune étude ne montre cet effet physiologique. D'autres membres de la famille sont impliqués dans l'angiogenèse comme miR-107. Ce dernier est exprimé dans le cancer du côlon humain et il est transcriptionnellement régulé par le gène p53. Ce miRNA inhibe l'expression de « l'hypoxia-inducible factor-1 β » (HIF-1 β) et affecte la signalisation hypoxique, régulant ainsi la croissance tumorale du cancer du côlon dépendante de l'angiogenèse pathologique nécessaire à la demande métabolique de la tumeur (Finnerty et al., 2010; Yamakuchi et al., 2010)

1.5.1.4. miR-16 et cancer

MiR-16 est considéré comme un suppresseur de tumeur. Les effets cellulaires décrits précédemment sont en lien avec cette considération, mais

plusieurs autres études montrent que miR-16 est impliqué dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, l'activation de l'apoptose, la suppression de tumeur *in vitro* et *in vivo* (Aqeilan et al., 2010). Plus de 100 études ont exploré ces aspects du miR-16. Brièvement, voici les effets du miR-16 les plus pertinents.

La première évidence de l'implication du miR-16 dans le cancer est dans la leucémie lymphocytaire chronique (CLL). Plus de la moitié des cas ont une altération génétique homozygote ou hétérozygote de la région 13q14.3 de l'ADN (Chiorazzi et al., 2005). Cette observation suggère la présence de gènes suppresseurs de tumeurs dans cette région. Cette région de l'ADN code pour le miR-15/16. Des délétions des gènes de miR-15 et miR-16 sont associées à la CLL. Le miR-15/16 est aussi impliqué dans d'autres types de cancer comme le cancer de la prostate où le miR-15/16 est sous exprimés dans 80 % des tissus cancéreux de patients comparés à des tissus sains (Bonci et al., 2008). D'autre part, les miR-15/16 sont sous-exprimés dans les cellules d'adénomes pituitaires comparées à des cellules pituitaires normales (Bottoni et al., 2005). Des études ont par la suite cherché à trouver par quels mécanismes ce miRNA agit comme suppresseur de tumeur. Un oncogène B-cell lymphome 2 (BCL2) est surexprimé dans les cellules B de la CLL. Cette surexpression est corrélée avec la sous-expression des miR-15/16 dans ces mêmes cellules. MiR-16 agit en induisant l'apoptose en inhibant directement l'expression de BCL2 (Cimmino et al., 2005; Xia et al., 2008). MiR-15/16 cible aussi d'autres oncogènes comme la cycline D1 (CCND1) et le gène WNT3A (Bonci et al., 2008).

2 Raisonnement et objectifs de l'étude

MiR-16 est l'un des miRNAs les plus étudiés. Les divers effets de miR-16 décrits précédemment démontrent la complexité des miRNAs dans le fonctionnement cellulaire par la régulation d'une multitude de cibles directes et indirectes. Un des mécanismes régulés par les miRNAs est la sénescence, un arrêt irréversible de croissance cellulaire. Les cellules sénescents restent cependant métaboliquement actives et il a été démontré que la sénescence répliquative peut être induite par le glucose (Blazer et al., 2002; Stolzing et al., 2006). Nous avons observé que l'expression de miR-16 est diminuée dans les cellules endothéliales sénescents. Ainsi, une diminution de miR-16 dans les cellules sénescents pourrait représenter une tentative de compensation pour contrer la sénescence, qui mène ultimement à une diminution du métabolisme, en augmentant l'entrée de glucose dans les cellules. À ce jour, aucune étude ne montre l'implication de miR-16 dans la modulation du métabolisme cellulaire. Nous avons émis l'hypothèse que miR-16 régule le transport du glucose par la régulation de GLUT-4, un transporteur de glucose dépendant de l'insuline. Mon projet vise à étudier l'implication du miR-16 dans la régulation de l'expression de GLUT-4. D'autre part, j'ai étudié la corrélation existant entre l'expression de miR-16 dans des artères mammaires de patients coronariens et leur glycémie. Finalement, une relation entre la régulation de GLUT-4 par miR-16 et la

glycémie a été établie dans un modèle de souris soumises à une diète riche en calories.

Mon hypothèse de travail est que miR-16 est impliqué dans le métabolisme cellulaire par l'inhibition de l'expression protéique du transporteur de glucose dépendant de l'insuline, GLUT-4. Cette inhibition de l'expression de GLUT-4 par miR-16 diminue l'entrée de glucose dans les cellules et augmente ainsi la glycémie.

3 Matériel et Méthodes

3.1. Analyse *in silico*

Toutes les constructions et analyse du clonage moléculaire ainsi que le design d'amorces et l'analyse des données de séquençage ont été faits à l'aide du logiciel *clone manager suite*.

Les prédictions des sites de liaisons des miRNAs aux gènes cibles ont été faites à l'aide de quatre logiciels offerts en ligne :

- www.pictar.mdc-berlin.de
- www.targetscan.org
- www.mirbase.org
- www.microrna.org

Ce dernier est la référence pour l'obtention des séquences matures des miRNAs

3.2. Microarray

Pour mieux comprendre le principe et la méthodologie utilisés pour le microarray, voici une mise en contexte du sujet. Des résultats préliminaires du laboratoire ont montré que le traitement avec un antioxydant, le N-acétylcystéine (NAC) combiné à l'introduction de la télomérase (hTERT) dans des cellules endothéliales en culture d'artères mammaires internes de patients coronariens (hIMAEC, "human internal mammary artery endothelial cells") engendre l'immortalisation dans seulement la moitié (5/9) des cas. Pour l'autre moitié, les cellules ont arrêté de proliférer et sont entrées en sénescence (Figure 6).

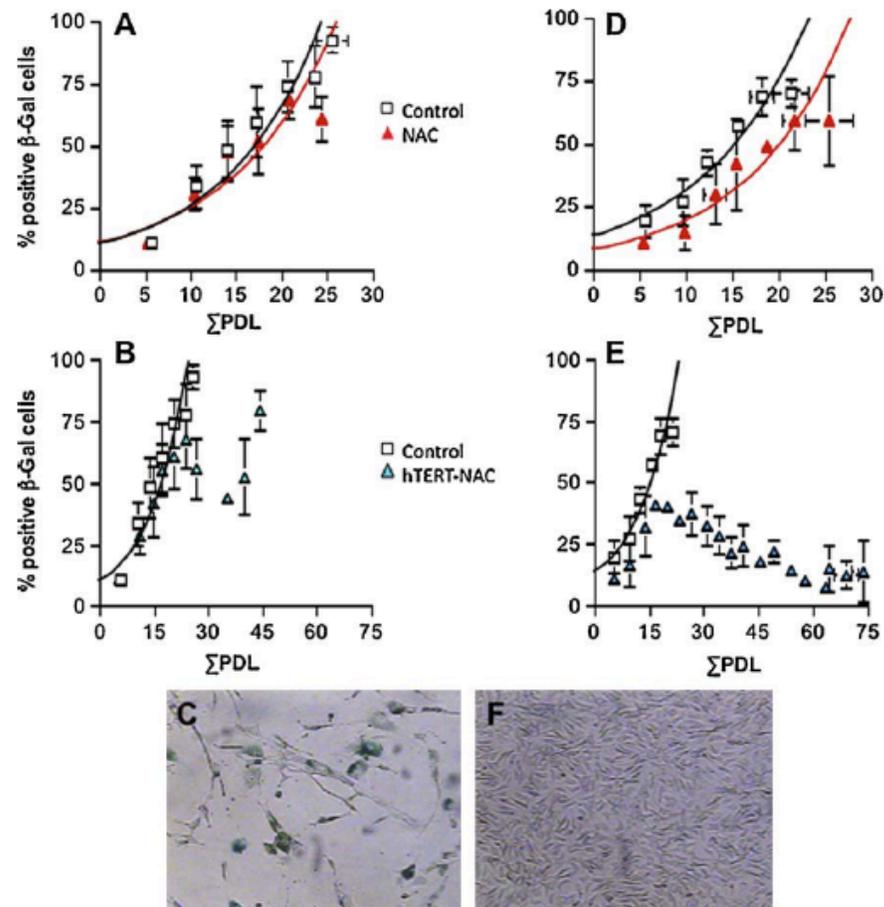


Figure 6. Effet du traitement simultané au NAC et hTERT sur les hMAEC. A, B et C: Cellules qui sont entrées en sénescence suite au traitement hTERT-NAC. D, E et F, cellules qui ont été immortalisées suite au traitement hTERT-NAC. A et D: Courbe temps dépendant de la moyenne (mean \pm SEM, $n=5$) des niveaux de sénescence dans les cellules traitées au NAC seulement. B et E: Courbe temps dépendant de la moyenne (mean \pm SEM, $n=5$) des niveaux de sénescence dans les cellules traitées au NAC et hTERT. C et F: Photos des deux groupes: cellules sénescents (B) contre cellules immortalisées (F) du marquage *sénescence-associated β -galactosidase* (Voghel et al., 2010).

Le but de l'expérience avec le microarray est de trouver des miRNAs exprimés différemment entre les deux groupes (sénescence ou immortalisé). Ainsi, nous avons effectué un microarray de miRNAs sur 3 échantillons de chaque groupe. Chaque échantillon provient d'un patient différent. Le microarray permet d'identifier l'expression de tous les miRNAs connus. La puce de microarray contient dans chaque puits des amorces spécifiques à chaque miRNA qui permettra d'amplifier et ainsi de quantifier le miRNA. Dans chaque puits sont ajoutés deux échantillons marqués différemment (Hy3 et Hy5). Le Hy5 représente la référence commune, c'est le même échantillon qui sera rajouté dans tous les puits de tous les échantillons. Cette référence commune est constituée d'une quantité égale de chacun des échantillons, elle sert donc de normalisateur. Le Hy3 représente les différents échantillons des deux groupes (Figure 7).

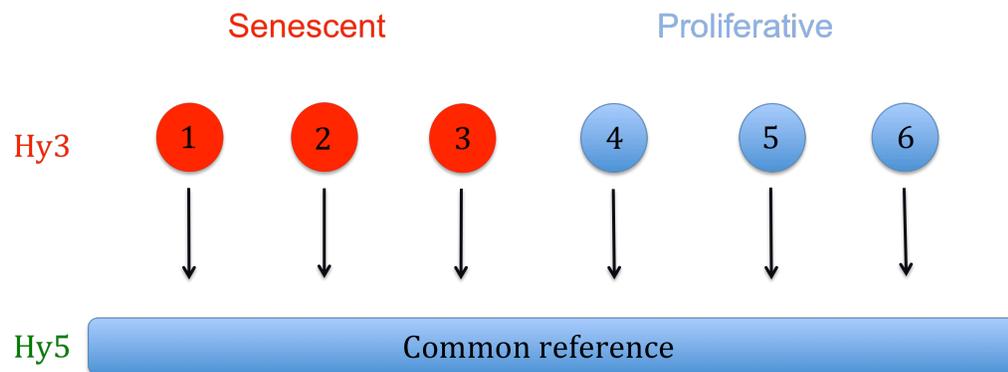


Figure 7. Représentation schématique de la méthodologie abordée pour le microarray. Représenté en rouge, les échantillons du groupe sénéscent de l'expérience hTERT-NAC sur les cellules endothéliales d'artères mammaires de patients coronariens. Représenté en bleu, les échantillons du groupe sénéscent de l'expérience hTERT-NAC sur les cellules endothéliales d'artères mammaires de patients coronariens. Common Reference : quantité égale des 6 échantillons utilisés pour le microarray. Cette méthodologie a été proposée par la compagnie Exiqon qui a effectué le microarray.

3.3. Culture cellulaire

Les cellules embryonnaires de rein (HEK 293, Invitrogen) ont été cultivées dans un incubateur à 37°C dans un mélange gazeux de 5% CO₂ / air en présence de milieu de culture DMEM auquel ont été rajoutés 1% pénicilline / streptomycine et 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Gibco). Les cellules ont été passées lorsque confluentes, par incubation à 37°C pendant 8 minutes avec la

trypsin-EDTA (Sigma). Les cellules HEK293 sont originaires d'une souche de cellules tumorales utilisées à des passages élevés.

Les cellules endothéliales de la veine ombilicale (HUVEC, Lonza) ont été cultivées dans un incubateur à 37°C dans un mélange gazeux de 5% CO₂ / air en présence dans leur milieu de culture spécifique EBM 2 (*Endothelial basal medium*, Lonza) additionné des facteurs de croissance endothéliaux (EGM 2, Lonza). Les cellules ont été passées lorsque confluentes par incubation à 37°C pendant 8 minutes avec la trypsin-EDTA pour HUVEC (Sigma). Les expériences sur les HUVEC ont été faites sur des cellules à passage 3 - 6 seulement. Les pétris utilisées pour les cellules endothéliales sont de type Cell+ (Sarstedt) pour une meilleure adhérence.

3.4. Transfection

La transfection des cellules HEK 293 et HUVEC s'est faite selon le même protocole avec optimisation de la transfection par Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Une fois que les cellules sont à 90% confluentes et sans sérum pendant 12 hrs dans une plaque à 6 puits, les cellules sont transfectées. Les quantités d'ARN ou ADN transfectées étaient les suivantes :

- miR-16 ou contrôle : 100 nM
- AMO-16 ou contrôle : 10 nM
- Vecteurs Firefly : 50 ng

- Vecteurs Renilla : 1 ng

L'ADN ou ARN est doucement mélangé avec 250 μ L de milieu opti-MEM (Invitrogen). Dans un autre tube, 5 μ L de l'agent Lipofectamine 2000 sont mélangés doucement avec 250 μ L du milieu opti-MEM, puis sont incubés à température pièce (TP) pendant 5 minutes. Les deux solutions sont ensuite mélangées et incubées à TP pendant 20 minutes. Le mélange est rajouté à 2 mL du milieu spécifique aux cellules. Les résultats présentés des transfections ont été obtenus après une incubation d'une durée de 24 heures.

3.5. Essai viabilité

Les cellules transfectées avec les mêmes conditions décrites précédemment ont été soumises à un essai de viabilité pour confirmer que les produits transfectés n'ont pas d'effets significatifs sur la mortalité. L'essai s'est fait avec le bleu de trypan. Les cellules ont été trypsinisées pendant 5 minutes à 37°C. On rajoute 1 mL de DMEM complet. Les cellules sont centrifugées à 250 g pendant 5 minutes. Le culot est lavé avec 1 mL de PBS et recentrifugé à 250 g pendant 5 minutes. On rajoute 1 mL de PBS et 50 μ L de bleu de trypan (0,01%). Les cellules qui seront colorées en bleu représentent les cellules mortes. Le ratio cellules bleu par rapport aux cellules non colorées est compté et représente le % de mortalité.

3.6. Extraction protéique

Les artères mammaires humaines sont directement reçues du bloc opératoire, lors du pontage coronarien du patient, et nettoyées (gras et muscle) dans un délai maximal de 15 minutes après réception de l'échantillon. Les artères sont immédiatement plongées dans l'azote liquide et conservées à -80°C . L'extraction protéique des artères mammaires humaines s'est faite par broyage à l'aide d'un pilon et d'un mortier (Coors), sur glace sèche et dans l'azote liquide. La poudre est ensuite homogénéisée avec un broyeur (Wheaton), puis incubée à 4°C pendant 15 minutes dans un tampon de lyse auquel on rajoute un mélange d'inhibiteurs de protéases fraîchement préparé (Protease Inhibitor Cocktail Kit, Thermo Scientific). La composition du tampon de lyse protéique est la suivante: Tris-HCl pH=7,5 50 mM, β -glycérophosphate 20 mM, fluorure de sodium 20 mM, EDTA 5 mM, EGTA 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, Triton 1% (v/v)). Les 15 minutes d'incubation permettent d'extraire les protéines totales: membranes plasmiques, cytoplasmiques et nucléaires. Le lysat est ensuite centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 10000 g, le surnageant est ensuite recueilli.

L'extraction protéique des cellules HUVEC et HEK 293 a été soumise aux mêmes tampons et conditions de lyse que l'extraction protéique des artères. Le milieu a d'abord été aspiré des puits de culture de 35 cm^2 , puis le tampon de lyse a été ajouté, le tout maintenu sur la glace pendant 15 minutes.

3.7. Immunobuvardage de type Western

La concentration de protéines totales a été quantifiée par la méthode de dosage Bradford (BioRad). Les échantillons protéiques (50 à 100 µg) ont été solubilisés dans un tampon Laemmli : 50 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 0,5 M de β -Mercaptoethanol, 2,5 % de SDS, 0,4 M de glucose, 1 mM d'EDTA et 0,05 % de bleu de bromophénol. Les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 4 minutes. Les protéines ont migré par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide dénaturant de 10% SDS-PAGE ou un gel dénaturant à gradient de 4-20% SDS-PAGE. Suite à cette migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (*Trans-Blot*, BioRad) à 100V pendant 90 minutes à 4°C. Les membranes ont été fixées deux fois pendant 10 minutes dans une solution de fixation: PBS (13,6 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄ pH=7,4), 0,05 glutaraldéhyde, 0,1% Tween, pH=7,4. Les membranes ont ensuite été lavées pendant 10 minutes avec du TBST: Trizma Base 25 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, pH=7,5. Les membranes ont ensuite été bloquées non spécifiquement par une incubation à TP dans une solution de TBST 0,1%, contenant du lait 5% (Carnation) ou bien dans une solution de TBST 0,1%, contenant de la BSA 5%. Le choix du type de blocage dépend de l'anticorps primaire. Suite à ce blocage, une incubation durant 16 heures à 4°C avec un anticorps primaire dilué avec le choix de TBST/Lait ou TBST/BSA est faite. Les anticorps primaires utilisés sont : INSR (dilution 1/1000, Cell Signaling), GLUT-4 (dilution 1/200, Chemicon) et GAPDH

(dilution 1/100000, Ambion). Deux lavages de 10 minutes à TP avec la solution de TBST 0,1% suivie d'un blocage de 10 minutes avec la solution de TBST/Lait ou TBST/BSA précèdent l'incubation avec l'anticorps secondaire adéquat couplé au HRP (*Horseradish Peroxidase*) dilué 1/10000 dans la solution de blocage pendant 2 heures à TP. Après cette incubation, 3 lavages de 5 minutes au TBST 0,1% précèdent la révélation des protéines. Les protéines ont été exposées à un agent chemiluminescent (PerkinElmer), puis révéle sur des films photosensibles (Kodak Film) suite à différents temps d'expositions.

La quantification des protéines a été faite par densité optique des bandes sur les films à l'aide du numériseur VersaDoc Imaging System 4000 ainsi que du logiciel Quantity One (BioRad).

3.8. Extraction des miRNA et ARN total

L'extraction de l'ARN s'est fait avec la trousse d'extraction mirVANA (Ambion) qui permet l'extraction de l'ARN total (miRNA et ARNm) selon le protocole décrit par le manuel d'instruction. Le broyage des artères s'est fait de la même manière que décrite dans l'extraction protéique. Brièvement, les cellules en culture ou poudre d'artères broyées sont lysées avec une quantité adéquate de tampon de lyse (Lysis/Binding Buffer, Ambion). Les cellules sont homogénéisées avec 1/10 de volume du tampon miRNA Homogenate Additive (Ambion). Une extraction organique avec du phénol-chloroforme acide a lieu

après cette homogénéisation. La phase aqueuse est extraite et on y rajoute 1,25 volume d'éthanol 100%. Le mélange est pipeté sur une colonne (Ambion) et 3 lavages sont effectués. L'élution se fait avec le tampon d'élution (Ambion) qui est préchauffé à 95°C. Le dosage de l'ARN des échantillons s'est fait à l'aide de l'appareil Nanodrop 2000. Les échantillons sont répartis en aliquots de 250 ng/tube et sont conservés à -80°C. Toute manipulation des ARNs se fait sur glace. Seuls les ARNs des échantillons du microarray ont été extraits avec la trousse d'extraction d'ARN Exiqon, la compagnie qui a effectué le microarray. Cette extraction a été faite selon le protocole du manuel d'instruction de la trousse.

3.9. Transcription inverse (RT-PCR)

La transcription inverse permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN cible à l'aide de l'enzyme ARN polymérase Reverse Transcriptase MMLV (RT-MMLV) (Invitrogen). La RT-PCR des miRNAs s'est faite différemment de celle des ARNm. Pour l'ARNm, une amplification non spécifique s'est faite par le rajout de PDN6 alors que la RT des miRNAs s'est faite spécifiquement à chaque miRNA cible en rajoutant une amorce RT6-miR-X. Deux cent cinquante ng d'ARN total sont mélangés avec 0,1 µM de PDN6, 1 µl de dNTP (10 mM) dilué dans un volume final de 13 µL avec de l'eau RNase/DNase free. Ce mélange est dénaturé 15 minutes à 65°C et incubé sur la glace pour 5 min. Quatre µL de tampon first strand 5X, 2 µL de DTT et 1

μL de RT-MMLV sont rajoutés à l'ARN dénaturé. Le mélange est ensuite soumis aux conditions de PCR suivantes : 10 minutes à 25°C , 60 minutes à 42°C et 5 minutes à 90°C . L'ADNc est conservé de façon stable à -20°C . La RT des miRNAs permet la formation de l'ADNc du miRNA avec une extension 5' qui permettra l'amplification en temps réel.

3.10. PCR en temps réelle quantitative (qPCR)

La quantification des miRNAs se fait par une technique basée sur l'émission fluorescente en utilisant le Syber Green (Invitrogen) qui se fixe aux molécules d'ADN double brin. L'amplification de l'ADNc signifie donc une augmentation du signal puisqu'il y a plus de Syber Green qui se fixent sur l'ADN. Le Syber Green se fixe non spécifiquement à l'ADN, mais seulement un gène est amplifié à la fois, l'augmentation du signal par rapport au bruit de fond représente l'amplification du gène cible à chaque cycle. Dilués dans $10\ \mu\text{L}$ d'eau, $12,5\ \text{ng}$ sont utilisés pour la réaction qPCR des miRNAs alors que $1,25\ \text{ng}$ sont utilisés pour celle du normalisateur GAPDH. La solution mère est constituée de $12,5\ \mu\text{L}$ de Syber Green, $2\ \mu\text{L}$ des amorces sens et anti-sens ($300\ \text{nM}$) et $0,25\ \mu\text{L}$ de ROX ($20\ \text{nM}$), mais aussi $0,25\ \mu\text{L}$ du short-miR-X-rev ($20\ \text{nM}$) pour les qPCRs des miRNAs seulement. Les réactions ont été faites en duplicatas. Le « No Template Control » (NTC) est utilisé comme contrôle négatif en remplaçant l'ADNc par de l'eau. Les réactions sont amplifiées dans une plaque à 96 puits dans l'appareil de MxPro3005P. Les protocoles

d'amplification ont été optimisés pour chaque miRNA pour obtenir les meilleurs résultats. Le protocole ne varie cependant qu'à une seule étape : 10 minutes à 95°C, 40 cycles de : 30 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C (cette température a été modifiée pour les différents miRNAs) et 1 minute à 72°C. Un cycle additionnel de 1 minute à 95°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 95°C permet d'obtenir la courbe de dissociation pour valider la présence d'un produit amplifié pur. Des courbes standard pour chaque gène amplifié permettent d'obtenir la quantité optimale d'ADNc à rajouter pour la quantification des échantillons par qPCR. Pour les qPCR des ARNm, les amorces sens et anti-sens rajoutés sont spécifiques à chaque gène. Pour les miRNAs, les amorces MP-fwd et MP-rev sont universelles. Comme décrite précédemment, la RT-PCR permet la formation d'une extension en 5'. Au début de la réaction de qPCR le short-miR-X-rev permet la formation d'une extension en 5'. Ces deux extensions sont nécessaires à la réaction de qPCR puisque les miRNAs sont trop petits pour être amplifiés. Les extensions contiennent des sites spécifiques aux amorces MP. La première réaction du qPCR formera un ADNc double brin avec deux extensions. Il faut donc limiter la quantité de short-miR-X-rev ajouté à la réaction pour éviter la formation d'un second produit. Le produit final de la réaction qPCR des miRNAs est séquencé pour valider la méthode développée par Sharbati-Tehrani, S et al. en 2008 et que j'ai mis au point avec l'appareil qPCR de notre laboratoire (Sharbati-Tehrani et al., 2008) (Figure 8).

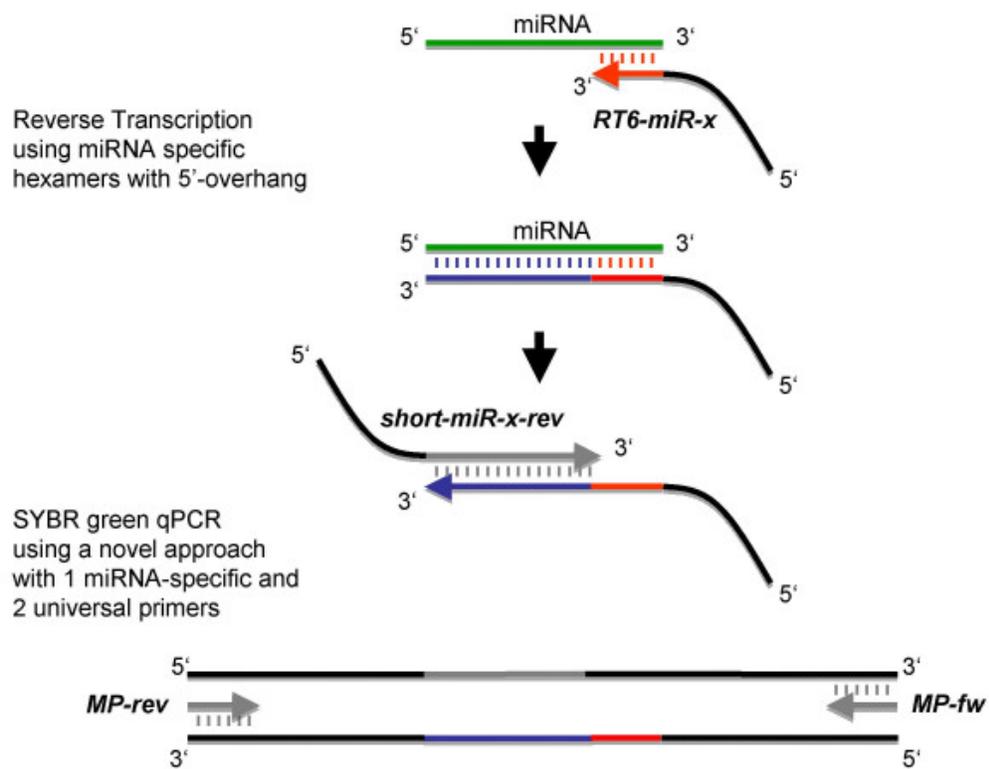


Figure 8. Représentation schématique de la méthode de qPCR des miRNAs. Par la réaction de RT-PCR, le miRNA est converti et allongé en ADNc en utilisant un oligonucléotide spécifique à chaque miRNA (RT6-miR-x) qui contient une extension au 5' et six bases complémentaires (rouge). La séquence d'ADNc (bleu) est détectée pour la première réaction de qPCR et elle est allongée par un oligonucléotide spécifique à chaque miRNA avec une extension 5' (short-miR-x-rev). L'amplification exponentielle est alors effectuée en utilisant deux amorces universelles (MP-fwd et MP-rev) (Sharbati-Tehrani et al., 2008).

Tableau I. Séquences d'amorces utilisées pour les réactions qPCR.

Amorce	Séquence 5' à 3'
RT6-mir-16	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT CGC CAA
Short mir-16- rev	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GTA GCA GCA CGT AAA TA
RT6-mir-34a	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT ACA ACC
Short mir-34a rev	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GTG GCA GTG TCT TAG CT
RT-6-mir- 1826	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT ATT GCG
Short mir- 1826-rev	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GAT TGA TCA TCG ACA CTT CGA A
RT-6-mir-100	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC GTG AGT GGT CAC AAG
Short mir-100	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG GGG AAC GGC GAA CCC GTA GAT CCG AA
Mp fwd	TGT CAG GCA ACC GTA TTC ACC
Mp rev	CGT CAG ATG TCC GAG TAG AGG
hGLUT-4 fwd	AGA CGA GAT GCC GTC GGG CT
hGLUT-4 rev	GGG AGC CAA GCA CCG CAG AG
GAPDH-fwd	TGA AGG TCG GAG TCA ACG GA
GAPDH-rev	CAT TGA TGA CAA GCT TCC CG

3.11. Clonage moléculaire

Pour procéder à l'essai luciférase il faut produire un vecteur rapporteur (pmiR-Report) qui contient une séquence du 3'UTR du GLUT-4 qui contient elle-même le site potentiel de liaison du miR-16. Cet insert possède près de 100 bases paires (bp).

3.11.1. Digestion du vecteur pmiR-Report-1

Nous avons un vecteur pmiR-Report (Figure 9) qui contient déjà un insert pour le site de liaison du miR-1. Pour pouvoir insérer l'insert du GLUT-4 qui sera produit, il faut digérer le vecteur pmiR-Report avec deux enzymes de restrictions (SacI et HindIII) qui permettront d'éliminer l'insert du site de miR-1. Vingt μL du vecteur pmiR-Report-1 mélangés avec 5 μL de BSA (1mg/ml) et 15 μL de ddH₂O sont digérés avec 5 μL (3 μL après 3 heures + 2 μL pour le restant de la réaction) d'enzyme SacI mélangés avec 5 μL de tampon SacI à 37°C pendant 6 heures. Pour inhiber la réaction enzymatique, il faut chauffer à 60°C pendant 20 minutes. Chaque enzyme de restriction à un tampon spécifique. Après les digestions, le produit subira une élimination du tampon par un filtre de microcon 30 (Millipore). Le produit sera dilué dans de l'eau pour ensuite être digéré avec le même protocole, mais avec l'enzyme de restriction HindIII et son tampon spécifique. Le produit final après les deux réactions de digestions sera purifié sur gel.

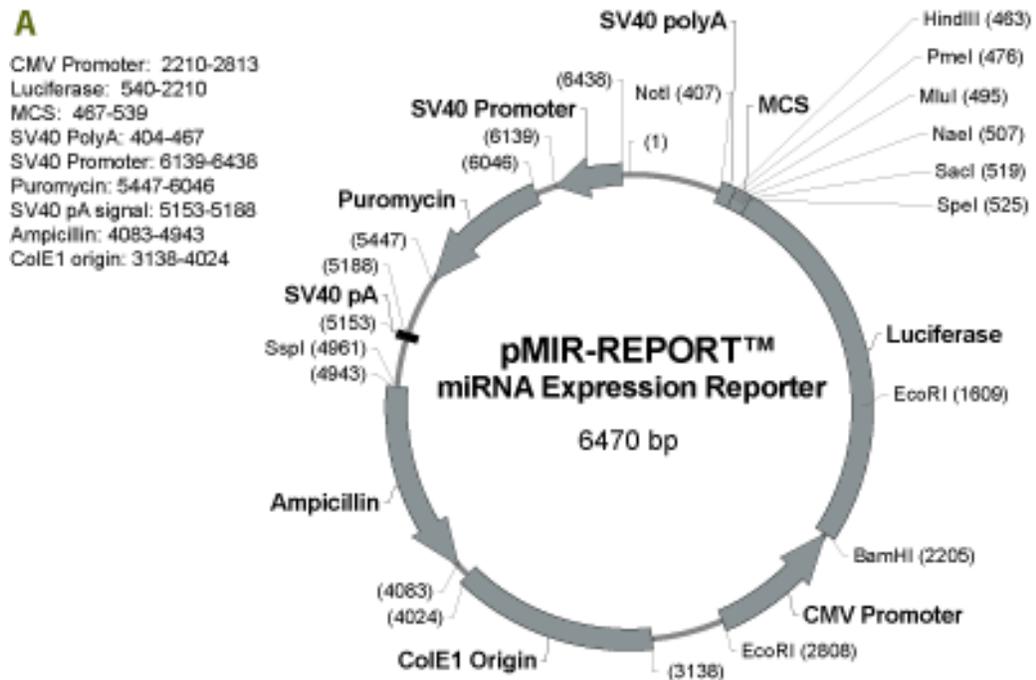


Figure 9. Cartographie du pMIR-REPORT de la compagnie Ambion. Cette figure a été adoptée du manuel d’instruction du vecteur acheté de la compagnie Ambion

3.11.2. Réaction PCR 3’UTR GLUT-4

Un clone contenant le 3’UTR du GLUT-4 a été utilisé pour produire la séquence 3’UTR-GLUT-4 de 100 bp désirée. Des amorces sens et anti-sens spécifiques à la séquence ciblée dans le 3’UTR du GLUT-4 ont été créés en leur insérant des séquences SacI (dans le sens) et HindIII (dans l’antisens). La PCR a été réalisée à l’aide de l’enzyme élongase (*Elongase Enzyme Mix*, Invitogen).

À 1 μL du clone GLUT-4 sont rajoutés 1 μL de 10 mM dNTP, 1 μL de 10 μM de l'amorce sens-SacI, 1 μL de 10 μM de l'amorce antisens-HindIII, 8 μL du tampon A (Invitrogen), 2 μL du tampon B (Invitrogen), 35 μL d'eau bi-distillée. Le protocole PCR utilisé est le suivant : 94°C pour 30 secondes puis amplification par 25 cycles de 30 secondes à 94°C suivis de 30 secondes à 52°C et finalement 60 secondes à 68°C. Le produit PCR est migré sur gel d'agarose puis la bande spécifique à la réaction est purifié (voir sections 3.10.5 et 3.10.6).

3.11.3. Réaction PCR 3'UTR-GLUT-4-muté

Le clone pmiR-GLUT-4-muté sert de contrôle négatif pour les expériences d'essai luciférase. Ce clone contient la même séquence que celle du pmiR-Report-3' UTR-GLUT-4, mais le site de liaison potentiel de miR-16 est supprimé. Pour réaliser cette réaction, 3 réactions PCR étaient nécessaires. La première (PCR1) est effectuée avec une amorce sens et deux antisens. L'amorce sens est identique à celle utilisée pour la PCR du 3'UTR-GLUT-4. Les deux autres amorces antisens se chevauchent permettant ainsi de surpasser le site de liaison du miR-16. La PCR2 est constituée d'une amorce sens qui chevauche la deuxième amorce de la PCR1 et l'amorce anti-sens est identique à celle utilisée pour le 3'UTR-GLUT-4. Ces deux PCR ont été réalisées à l'aide de l'enzyme élongase (*Elongase Enzyme Mix*, Invitrogen)

Pour la PCR1 : à 1 μ L de l'amorce sens-SacI sont ajoutés 1 μ L de 10 mM dNTP, 1 μ L de 10 μ M de l'amorce anti-sens-1, 1 μ L de 10 μ M de l'amorce antisens-2, 2 μ L du tampon A (Invitrogen), 5 μ L du tampon B (Invitrogen), 38 μ L d'eau bidistillée. Le protocole PCR utilisé est le suivant : 94°C pour 30 secondes puis amplification pendant 25 cycles par 30 secondes à 94°C suivis par 30 secondes à 50°C et finalement 60 secondes à 68°C. Le produit PCR est migré sur gel d'agarose puis la bande spécifique à la réaction est purifiée (voir sections 3.11.5 et 3.11.6).

Pour la PCR2 : à 1 μ L du clone pmiR-Report-GLUT-4 sont ajoutés 1 μ L de 10 mM dNTP, 1 μ L de 10 μ M de l'amorce sens-3, 1 μ L de 10 μ M de l'amorce antisens-HindIII, 2 μ L du tampon A (Invitrogen), 5 μ L du tampon B (Invitrogen), 38 μ L d'eau bi-distillée. Le protocole PCR utilisé est le suivant : 94°C pour 30 secondes puis amplification pendant 25 cycles de 30 secondes à 94°C suivis de 30 secondes à 50°C et finalement 60 secondes à 68°C. Le produit PCR est migré sur gel d'agarose puis la bande spécifique à la réaction est purifiée (voir sections 3.11.5 et 3.11.6).

Pour la PCR3 : à 2 μ L du produit de la PCR1 et 2 μ L du produit de la PCR2 sont ajoutés 1 μ L de 10 mM dNTP, 1 μ L de 10 μ M de l'amorce sens-SacI, 1 μ L de 10 μ M de l'amorce antisens, 5 μ L du tampon A (Invitrogen), 2 μ L du tampon B (Invitrogen), 38 μ L d'eau bidistillée. Le protocole PCR utilisé est le suivant : 94°C pour 30 secondes puis amplification pendant 25 cycles de 30 secondes à 94°C suivis de 30 secondes à 55°C et finalement 60 secondes à

68°C. Le produit PCR est migré sur gel d'agarose puis la bande spécifique à la réaction est purifiée (voir sections 3.11.5 et 3.11.6). Ce produit purifié est ensuite digéré avec les enzymes de restriction SacI et HindIII comme décrit dans la section 3.10.1. La nécessité de trois PCR était essentielle pour la réalisation du clone muté à cause de complications dans la conception des amorces. Voir la figure 10 pour une représentation schématique du concept de cette réaction PCR.

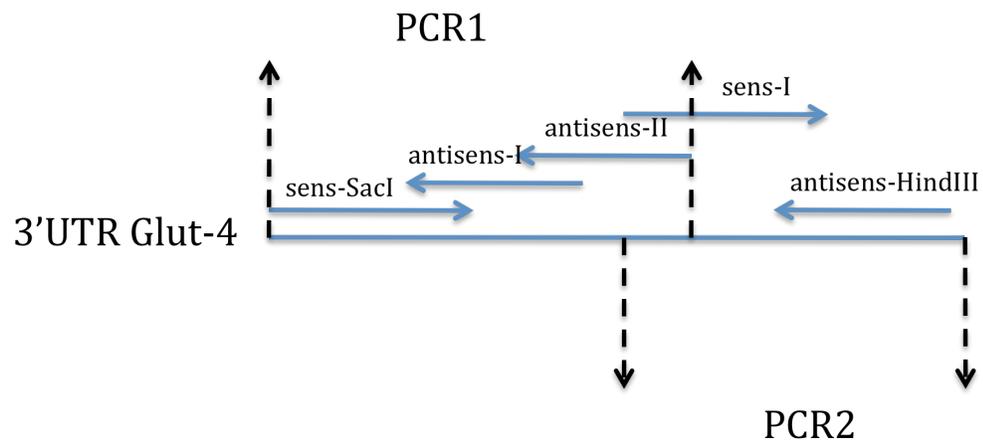


Figure 10. Représentation schématique des trois réactions PCR 1, 2. La PCR1 est réalisée à l'aide des amorces sens-SacI, antisens-I et antisens-II. La PCR2 est réalisée à l'aide des amorces sens-1 et antisens-HindIII. La PCR3 est réalisée avec les amorces sens-SacI et antisens-HindIII.

Tableau II. Séquences d'amorces utilisées pour les réactions PCR de clonage moléculaire.

Amorces	Séquence 5' à 3'
3'UTR-hGLUT-4- SacI	ATA GAG CTC CCC AGA CTC AGC TCC AGA AT
3'UTR-hGLUT-4- HindIII	AAG CTT GGA GTC CAA GGT GGT GGG AA
3'UTR-hGLUT-4- muté-antisens-I	GAG AAG GGG GAT TGG AGG GAA G
3'UTR-hGLUT-4- muté-antisens-II	CCT TCT CTG AAG AAG GAT TCT GGA GCT GAG T
3'UTR-hGLUT-4- muté-sens-I	CTC CAA TCC CCC TTC TCT GAA GAA GGA TTC TG

3.11.4. Ligation pmiR-Report et réaction PCR 3'UTR-GLUT-4 et 3'UTR-GLUT-4-muté

Les deux réactions PCR digérées vers SacI et HindIII sont insérées dans le vecteur digéré avec ces deux enzymes de restrictions. Pour ce faire, on ajoute à 2 μ L du produit PCR, 4 μ L du vecteur pmiR-Report digéré, 10 μ L du tampon de ligase (Invitrogen), 3 μ L d'eau bidistillée et 1 μ L de l'enzyme quick T4 ligase (Invitrogen). Ce mélange est incubé à TP pendant 10 minutes, suivie d'une inactivation instantanée à 4°C. Le produit PCR subira une transformation afin d'amplifier le vecteur produit par la technique de minirep (voir section 3.11.7).

Tableau III. Séquences des 3'UTR générés de clonage moléculaire. Les acides aminés en vert sont ceux qui ont été supprimés dans la séquence mutée.

Produit PCR	Séquence 5' à 3'
3'UTR-hGLUT-4	ATA GAG CTC CCC AGA CTC AGC TCC AGA ATA CCT TCT TCG CTG CTA GAG AAG GGG GAT TGG AGG GAA GAC AGG TCT AGA CTT TCT CAG TGG GAC AAA CCA GAG CAG AGA GCA GGA CAG GAG ACA AGA AAT CCA GTT TCC CAC CAC CTT GGA CTC CAA GCT T
3'UTR-hGLUT-4-muté	ATA GAG CTC CCC AGA CTC AGC TCC AGA ATC CTT CTT CAG AGA AGG GGG ATT GGA GGG AAG ACA GGT CTA GAC TTT CTC AGT GGG ACA AAC CAG AGC AGA GAG CAG GAC AGG AGA CAA GAA ATC CAG TTT CCC ACC ACC TTG GAC TCC AAG CTT

3.11.5. Migration des produits PCR sur gel d'agarose

La séparation des produits PCR se fait sur gel d'agarose. On ajoute au volume total de produit PCR (50 µL), 15 µL d'un tampon alourdissant formé de 60 % de glycérol, 60 mM d'EDTA (pH 8,0), 60 mM de Tris-base (pH 8,0) et 0,05 d'Orange G. Le tout est déposé sur un gel à 2% d'agarose, tampon TAE 1 X (40 mM de Tris-base, 1 mM de Na₂EDTA et 0,1% d'acide acétique glacial), 1µg/mL de bromure d'éthidium. Un marqueur de poids moléculaire de 100 bp à 2000 bp (Fermentas) est utilisé pour vérifier la taille du produit PCR obtenu. La migration se fait à un voltage de 85 V jusqu'à ce que les bandes soient bien séparées. L'analyse du gel est faite après une prise de photo du gel sur l'appareil GelDoc (BioRad) à l'aide du logiciel Quantity One (BioRad).

3.11.6. Purification des bandes séparées par gel d'agarose

Les bandes migrées sur gel d'agarose doivent par la suite être purifiées. Les bandes sont coupées à l'aide d'un rasoir sous la lampe UV (permet la visualisation des bandes sur le gel) et sont purifiées sur colonne avec la trousse QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Le protocole de purification est légèrement modifié par rapport à celui du manufacturier. La bande d'agarose est pesée et 6 volumes du tampon QG sont rajoutés. Le gel est ainsi dissout à 50°C pendant 15 minutes. Une fois que le gel complètement dissout, 1 volume d'isopropanol est ajouté. Le volume total est déposé sur la colonne Qiaquick (il ne faut pas rajouter des volumes équivalents à plus de 400 mg par colonne). Une centrifugation rapide permet de filtrer le tout dans la colonne. Le filtrat est jeté et la colonne est ensuite lavée avec 500 µL du tampon QG. La colonne est ensuite lavée avec 750 µL du tampon PE (le tampon est conservé sur la colonne pendant 10 minutes). Une centrifugation supplémentaire à vitesse maximale pendant 1 minute est requise pour sécher la colonne. La colonne est éluée avec 35 µL de tampon d'éluion. Pour évaluer la quantité d'ADN obtenu, 1/10 du volume total est migré sur gel d'agarose 2% en présence du marqueur de poids moléculaire. Les bandes du marqueur sont en quantités connues, permettant une comparaison avec l'échantillon et une estimation (en ng) de la quantité d'ADN isolée.

3.11.7. Transformation du pmiR-Report-3'UTR-GLUT-4 et 3'UTR-GLUT-4-muté

La quantité obtenue suite à la ligation n'est pas suffisante pour effectuer toutes nos expériences. Il est donc nécessaire d'amplifier les deux vecteurs créés, cette technique est appelée miniprep. Il faut transformer ces vecteurs dans des bactéries par le protocole suivant : on rajoute à 40 μ L de bactéries DH-5 α électrocompétentes sur glace. 1 μ L des vecteurs produit et on incube 30 minutes sur glace; pour incorporer les vecteurs dans la bactérie, un choc électrochimique instantané à 1500 V est effectué dans une cuvette irradiée aux UV à l'aide de l'appareil Electro Cell Manipulator 600 de la compagnie BTX. 960 μ L du milieu SOC (20 g/L de Bacto-tryptone, 5 g/L de Bacto-yeast extract et 0,5 g/L NaCl, pH 7,0) sont immédiatement rajoutés dans la cuvette; le mélange est transféré dans un tube pour être incubé pendant 1 h à 37 °C sous agitation. Cinquante μ L ou 350 μ L de ce mélange sont étalés dans deux pétris contenant du milieu de culture bactérien DYT-Agar (15 g/l de Bacto-tryptone, 10 g/l de Bacto-yeast extract et 5 g/L de NaCl, 15 g/L d'agar, 100 μ g/ml d'ampicilline, pH 7,0) et les pétris sont incubées à 37°C pendant 16 heures. Deux concentrations sont déposées sur les pétris pour s'assurer de ne pas remplir le pétri d'un surplus de colonies et ainsi de ne pas pouvoir n'en isoler qu'une, ou d'avoir trop peu de colonies et ainsi un nombre insuffisant de minipreps. Douze colonies sont sélectionnées et ré-amplifiées dans 15 mL/colonie de milieux DYT à 37°C pendant 16 heures sous agitation. Par la

suite, le milieu est centrifugé pendant 30 minutes à 1800 g pour extraire l'ADN plasmidique avec la trousse QIAprep Miniprep (Qiagen). Le protocole d'extraction est le suivant : 250 μ L du tampon P1 sont rajoutés au culot centrifugé et mélangé vigoureusement pour s'assurer que le culot soit complètement dissous; 250 μ L du tampon P2 sont rajoutés au mélange et une agitation douce par inversement est rapidement effectuée; 350 μ L du tampon N3 sont rajoutés et une agitation en crescendo par inversement à lieu; le tout est centrifugé à 10000 g pendant 5 minutes; le surnageant est déposé sur la colonne d'extraction (Qiagen) et centrifugé à 10000 g pendant 30 secondes; on se débarrasse du filtrat et la colonne est lavée deux fois, une première fois avec 500 μ L du tampon PB et une seconde fois avec 750 μ L du tampon PE. Une centrifugation supplémentaire à vitesse maximale pendant 1 minute est requise pour sécher la colonne. La colonne est éluée avec 50 μ L de tampon d'éluion. Pour vérifier que le vecteur qui a été amplifié est le bon vecteur, les vecteurs issus des 12 minipreps sont amplifiés par une réaction PCR Taq. Le protocole de cette réaction est le suivant : 2 μ L de buffer Mg 10X, 1 μ L de l'ADN, 0,6 μ L de MgCl₂, 0,4 μ L de 10 mM dNTP, 1 μ L à 10 μ M de l'amorce sens-SacI, 1 μ L à 10 μ M de l'amorce antisens-HindIII, 13,8 μ L ddH₂O ainsi que 0,2 μ L de l'enzyme Taq polymérase sont mélangés ensemble. Le protocole PCR utilisé est le suivant : 94°C pour 3 minutes, puis amplification pendant 25 cycles de 45 secondes à 94°C suivis par 30 secondes à 52°C et 90 secondes à 72°C, finalement une étape de 72°C pendant 10 minutes. Le produit PCR est migré sur gel d'agarose et une analyse de la taille des produits PCR est comparée à un

marqueur de poids moléculaire pour vérifier quels clones issus de la miniprep à la bonne taille.

3.12. Essai luciférase

Les essais luciférase ont été réalisés par la trousse *dual-luciferase assay* (Promega). Les cellules transfectées sont lysées avec un tampon de lyse PLB (Promega) pendant 15 minutes avec agitation délicate. Le surnageant est extrait et conservé à -80°C. La quantification luminescente est réalisée avec l'appareil Lumat LB 9507. À 5 µL du lysat, sont rajoutés 50 µL de l'agent LARII (Luciferase assay reagent II). La luminescence émise par le vecteur luciférase est mesurée. Puis, 50 µL de l'agent *Stop and Glo* sont ajoutés au mélange et une mesure de la luminescence émise par le vecteur TK-Renilla (contrôle interne) est prise.

3.13. Souris

Les souris utilisées étaient de souche C57BL/6 (Jackson Laboratories) et ont été soumises à une diète Western composée de 15,2 % de protéines, 42,7 % de glucides et 42 % de lipides comparées à des souris C57BL/6 soumises à une diète régulière composée de 24 % de protéines, 58 % de glucides et 18 % de lipides. Ces souris ont été nourries avec leurs diètes respectives dès l'âge de 3

mois, pendant une période de 3 mois. La composition des diètes utilisées a été établie par la compagnie Harlan Laboratories.

3.14. Analyse statistique

Les valeurs présentées dans la section des résultats représentent des moyennes \pm E.S.M. (erreur standard à la moyenne). Le « n » représente le nombre d'échantillons. Les résultats de microarray ont été analysés par le test *t* de student. Les résultats d'immunobuvardage de type Western, de qPCR, de luciférase et de viabilité ont été analysés par une ANOVA (unidirectionnelle) suivie d'un test de Bonferroni lorsque nécessaire ou par un test *t* de Student lorsqu'il s'agit d'une comparaison entre deux groupes. L'identification des résultats avec une * représente des moyennes ayant une valeur significativement différente par rapport au groupe contrôle avec un $p < 0,05$. Les résultats de corrélation entre miR-16 avec Glut-4 ou INSR, ainsi que la glycémie avec miR-16, Glut-4 ou INSR sont représentés par des graphiques de régression linéaire. Les valeurs de *p* ainsi que celles des r^2 de ces régressions sont données dans les légendes des graphiques concernés. La valeur de *p* est considérée significative si $p < 0,05$.

4 Résultats

4.1. Expression de miR-34a dans la sénescence

Afin de valider notre technique de quantification de l'expression des miRs, j'ai mesuré les niveaux de miR-34a dans des échantillons d'hIMAEC sénescents ou pas,, le miR34a ayant été rapporté comme étant augmenté dans la sénescence (Ito et al., 2010). La figure 11 confirme que le miR-34a est surexprimé dans les hIMAEC sénescents comparés à des cellules prolifératives.

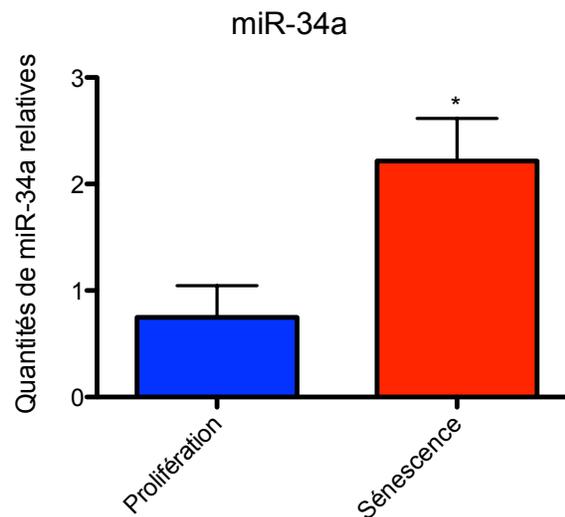


Figure 11. Niveaux d'expression du miR-34a dans des hIMAEC prolifératives et sénescents par qPCR. Les niveaux ont été mesurés par une technique de qPCR décrite précédemment. Le miR-34a est significativement surexprimé dans les hIMAEC sénescents (n=3). * : $p < 0,05$ par test t de Student.

4.2. Microarray sur des hMAEC prolifératives et sénescences

L'expérience sur les niveaux d'expression de miR-34a nous a permis de valider notre système expérimental qui a été utilisé pour le microarray. Les résultats du microarray montrent que miR-34a est légèrement surexprimé dans les échantillons de cellules sénescences, mais pas significativement et la différence n'était cependant pas aussi importante que celle observée par la technique de qPCR. Ce résultat n'est pas surprenant puisque la technique de qPCR est plus spécifique que celle de microarray.

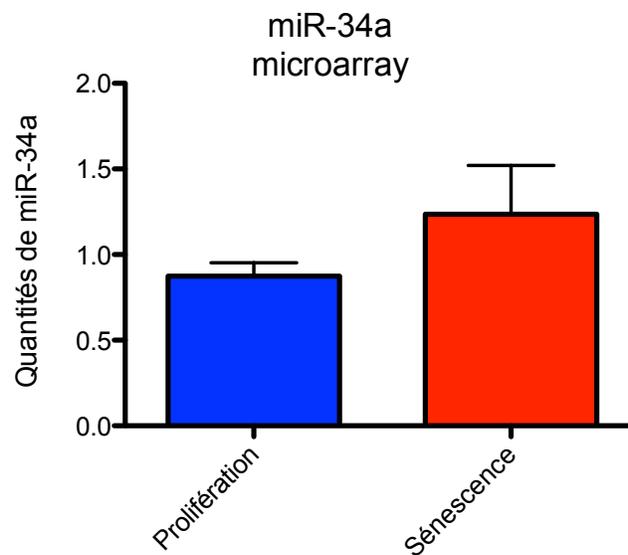


Figure 12. Niveaux d'expression du miR-34a dans des hMAEC prolifératives et sénescences mesurés par microarray. Le miR-34a n'est pas significativement surexprimé ($p = 0,2214$ par test t de Student) dans les hMAEC sénescences ($n=3$).

La figure 13 représente une section de « heatmap » des résultats obtenus par microarray. Parmi les 6 échantillons analysés par microarray, l'un d'entre eux est constitué de cellules endothéliales d'artère coronaire (A3). Cet échantillon a été soumis aux mêmes conditions tout au long de l'expérience (traitement par le NAC et infection à hTERT). Dans cet échantillon, l'expression des miRNAs est différente, pour la majorité des miRNAs, comparée aux autres échantillons. Ceci montre à quel point l'expression des miRNAs est spécifique à chaque artère (mammaire versus coronaire) à l'intérieur d'un même type cellulaire (cellules endothéliales). Les résultats du microarray montrent que 190 miRNAs sont exprimés dans les hIMAEC des 5 patients. Si l'on compare les hIMAEC sénescents aux hIMAEC prolifératives, l'expression de 22 miRNAs varie considérablement, mais seulement 3 de ces 22 miRNAs varient significativement : miR-16 ($p=0,0092$), miR-222 ($p=0,047$) et miR-1246 ($p=0,044$). À noter aussi que les miR-15a ($p=0,059$) et le miR-100 ($p=0,071$) ont tendance à varier entre les deux groupes. Les miR-15a et miR-16 qui sont encodés par le même gène et qui sont membres de la même famille ont des niveaux d'expression similaires et deux fois plus élevés dans les hIMAEC prolifératives que sénescents. La différence d'expression des miRNAs entre les deux groupes de cellules était la plus élevée pour le miR-16. De plus, miR-16 et miR-15a sont exprimés de façon similaire dans les deux conditions. L'expression du miR-16 dans l'échantillon A3 (artère coronaire) est cependant comparable avec l'expression du miR-16 dans les cellules hIMAEC sénescents.

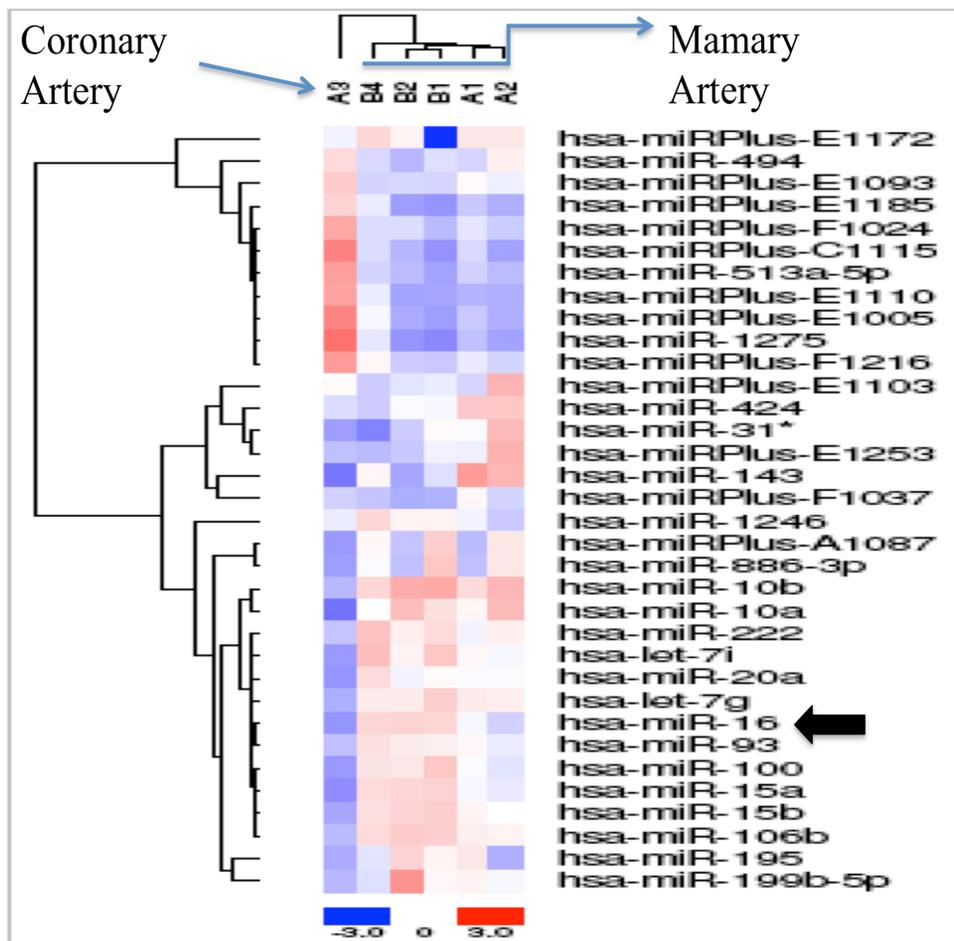


Figure 13. Expression des miRNAs dans les hMAEC prolifératives comparée à celle des hMAEC sénescents. Les échantillons A sont sénescents tandis que les B sont prolifératifs. L'échantillon A3 n'est pas une hMAEC mais des cellules endothéliales d'artère coronaire humaine. Les miRNAs représentés sont ceux qui ont des variations importantes, mais pas nécessairement significatives entre les deux groupes A et B. La couleur bleue signifie une sous-expression et la rouge une surexpression. MiR-16 semble différemment exprimé entre les groupes A et B.

La figure 14 représente l'expression de miR-16 dans ces deux groupes et on peut voir que miR-16 est deux fois plus exprimé dans les cellules endothéliales prolifératives que sénescents. Nous nous sommes intéressés à déterminer les cibles potentielles de miR-16.

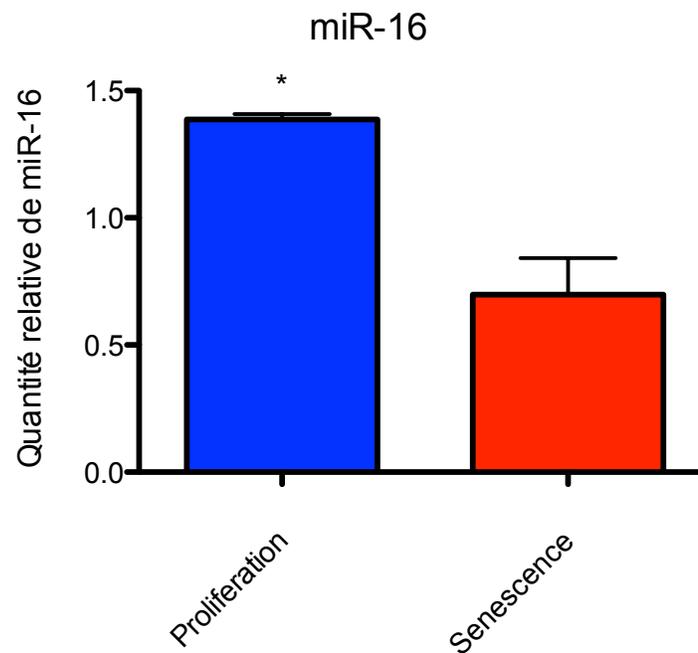


Figure 14. Niveaux d'expression du miR-16 dans les cellules endothéliales prolifératives et sénescents de patients coronariens. Les niveaux ont été mesurés par la technique de microarray décrite précédemment. MiR-16 est significativement sous-exprimé dans les hIMAEC sénescents. * : $p < 0,05$ par test t de Student.

4.3. Analyse des cibles potentielles de miR-16

L'analyse des sites potentiels de liaisons de miR-16 dans le génome humain par des logiciels de prédictions des cibles de miRNAs, suggère que 3 gènes, qui jouent des rôles critiques dans le transport de glucose dépendant de l'insuline, sont des cibles potentielles du miR-16 : GLUT-4, INSR et IRS-1 (figure 15). Tous les membres de la famille du miR-16 sont aussi des régulateurs potentiels de ces trois cibles, car les membres d'une même famille de miRNAs ont tous la même région d'ancrage. Le logiciel de prédiction donne des évaluations des niveaux de probabilité d'ancrage à ces sites de liaisons potentiels : plus le score est élevé plus il est probable que le miRNA soit un régulateur de l'expression de ces gènes. Les 3 cibles décrites ont eu des scores élevés. Nous nous sommes donc demandé si la baisse de miR-16 dans les hIMAEC sénescents pouvait s'expliquer par une régulation du métabolisme du transport du glucose cellulaire. Ceci pourrait concorder avec l'étude qui montre qu'une stimulation avec le glucose augmente les niveaux de miR-16 dans des cellules pancréatiques- β (Tang et al., 2009).

Position 315-321 of **Glut-4** 3' UTR: 5' ...CAGAAUACCUUCUUCGCUGCUAG..
 hsa-miR-16: 3' GCGGUUAUAAAUGCA- CGACGAU

Position 576-582 of **INSR** 3' UTR: 5' ...AAAUUGACCAAUAGC - - - UGCUGCUU...
 hsa-miR-16: 3' GCGGUUAUAAAUGCACGACGAU

Position 375-381 of **IRS1** 3' UTR: 5' ...AAGAUACAUUUCAUCUGCUGCUG...
 hsa-miR-16: 3' GCGGUUAUAAAUGC - ACGACGAU

Figure 15. Prédiction des sites potentiels de liaison du miR-16 par le logiciel TargetScan. Parmi les cibles potentielles de miR-16, 3 gènes sont impliqués dans le transport du glucose dépendant de l'insuline : GLUT-4, INSR et IRS-1.

4.4. Effet de miR-16 sur GLUT-4 et INSR

J'ai évalué l'effet de l'inhibition de miR-16 sur les niveaux protéiques de GLUT-4 dans des HUVEC. La figure 16 montre que l'inhibition de miR-16 par AMO-16 augmente les niveaux protéiques de GLUT-4 de 1,7 fois comparé aux contrôles négatifs (AMO-Scr et Lipo-H₂O). L'AMO-Scr est une séquence de taille similaire à l'AMO-16 et qui a été créée pour ne pas avoir de site potentiel de liaison sur les 3'UTR d'ARNm. Le deuxième contrôle négatif, le Lipo-H₂O, a subi les mêmes étapes de transfections qu'AMO-16, mais sans transfection d'AMO. Pour vérifier l'effet inhibiteur de l'AMO, j'ai mesuré les niveaux de miR-16 suite à ces transfections. Les niveaux de miR-16 endogènes

sont effectivement dégradés comparés au contrôle (Figure 17). De plus, j'ai évalué les niveaux de corrélation entre l'expression de miR-16 et l'expression protéique de GLUT-4 dans les groupes AMO-16 et AMO-Scr: il existe une corrélation négative entre les deux paramètres, suggérant qu'un niveau élevé de miR-16 est associé à une faible expression protéique de GLUT-4 ($p=0,0075$, $r^2=0,5669$) (figure 18). Ces résultats suggèrent que miR-16 pourrait potentiellement être un régulateur de GLUT-4. Notons que l'étude de l'effet d'inhibition de miR-16 sur les niveaux d'ARNm de GLUT-4 n'était pas faisable puisque les niveaux d'ARNm de GLUT-4 détectés par qPCR dans les HUVEC n'étaient pas assez élevés pour les comparer entre les groupes. Cette difficulté à évaluer les niveaux de GLUT-4 messenger dans les HUVEC a déjà été signalée par d'autres groupes (Mann et al., 2003). J'ai, par la suite, évalué l'effet d'inhibition de miR-16 sur le gène INSR.

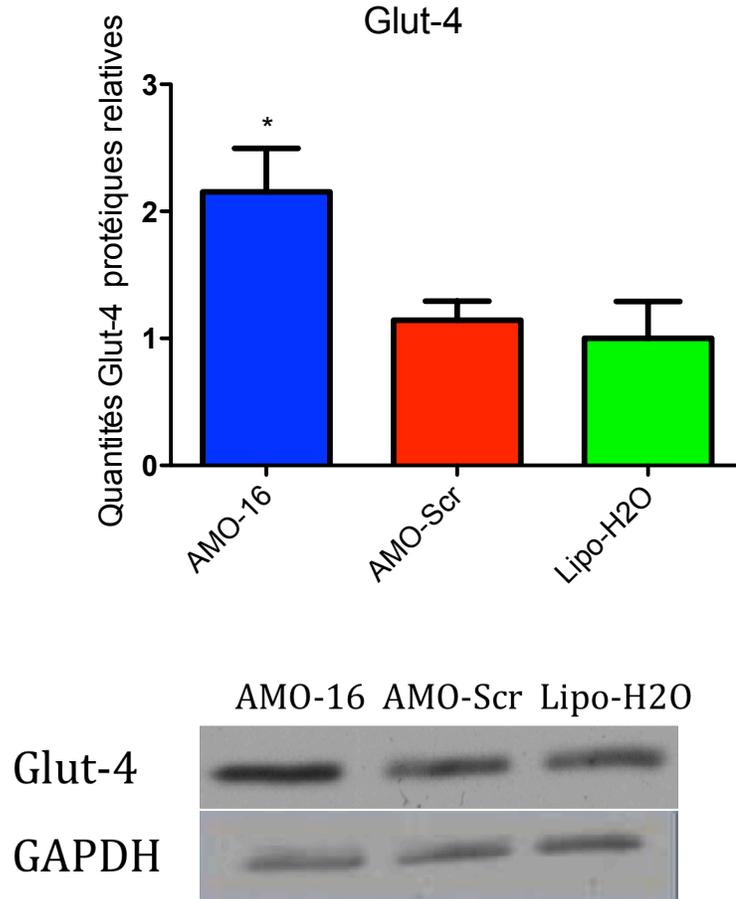


Figure 16. Niveaux d'expression protéique de GLUT-4 suite à l'inhibition du miR-16 dans des HUVEC. Dix nM d'AMO-16 et de AMO-Scr ont été transfectés pendant 24 heures. Les résultats ont été normalisés avec le GAPDH. Les niveaux de GLUT-4 sont augmentés de 1,6 fois comparés aux contrôles (n=8). *: $p < 0,05$ entre AMO-16 et AMO-Scr ainsi que AMO-16 et Lipo-H₂O.

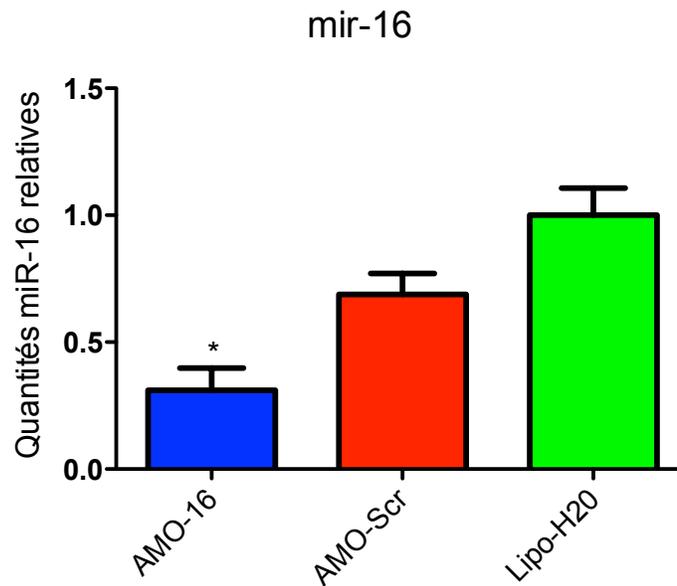


Figure 17. Niveaux de miR-16 suite à l'inhibition du miR-16 dans des HUVEC. Dix nM d'AMO-16 et de AMO-Scr ont été transfectés pendant 24 heures. Les résultats ont été normalisés avec le GAPDH. Les niveaux de miR-16 sont diminués, indiquant l'efficacité de la transfection (n=6). * : $p < 0,05$ comparé à AMO-Scr et Lipo-H₂O.

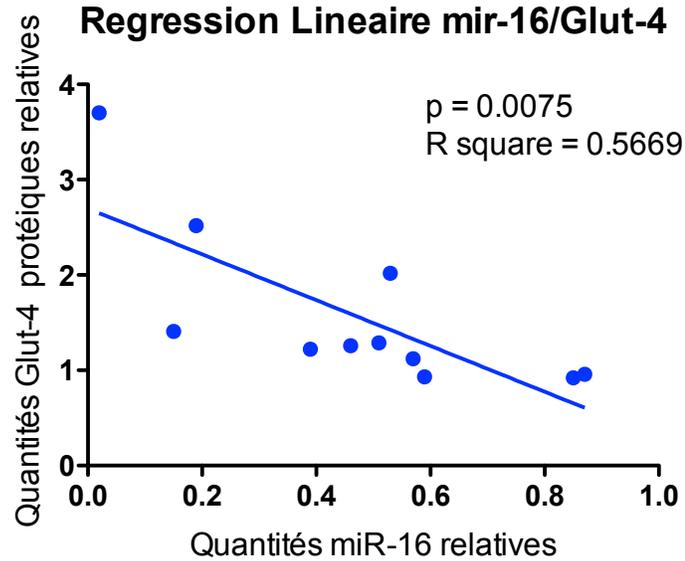


Figure 18. Régression linéaire entre miR-16 et GLUT-4 dans des HUVEC. Il existe une corrélation négative entre les niveaux de miR-16 et de GLUT-4 dans les HUVEC. Les données représentent deux différentes conditions expérimentales: transfections pendant 24 heures d'AMO-16 et d'AMO-Scr dans les HUVEC.

L'évaluation des niveaux d'INSR protéiques a été faite sur les mêmes échantillons que ceux ayant permis de faire l'évaluation de GLUT-4. Aucune différence n'a été observée entre les différents groupes AMO-16, AMO-Scr et Lipo-H₂O (Figure 18). Ceci suggère que l'effet inhibiteur de miR-16 sur les niveaux de GLUT-4 ne se fait pas via des changements protéiques d'INSR.

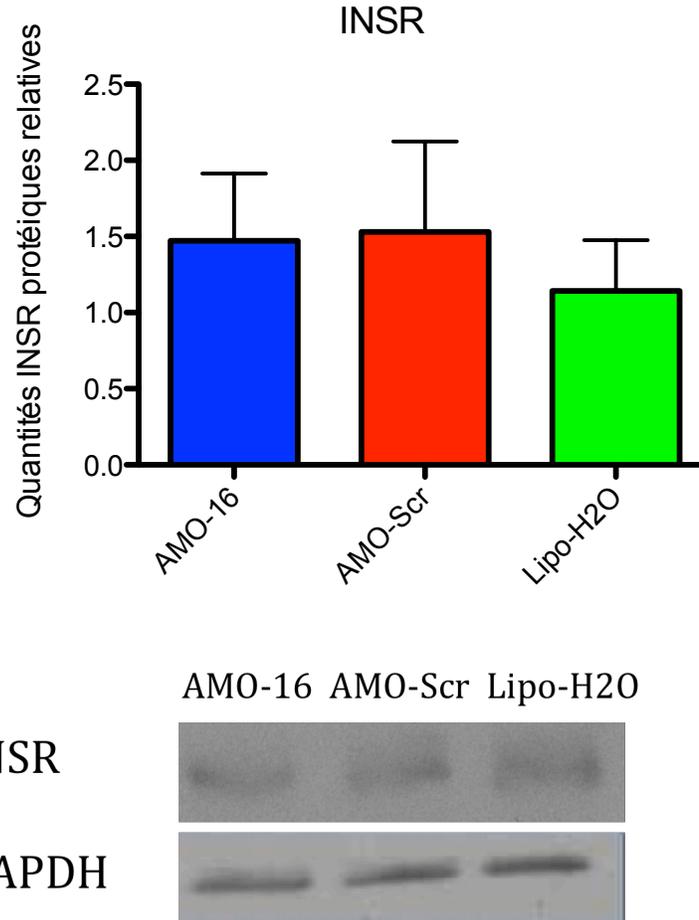
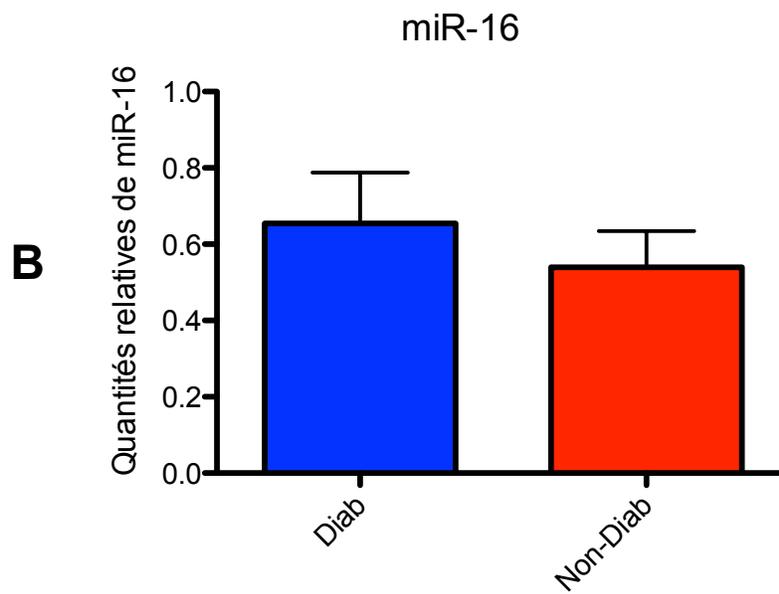
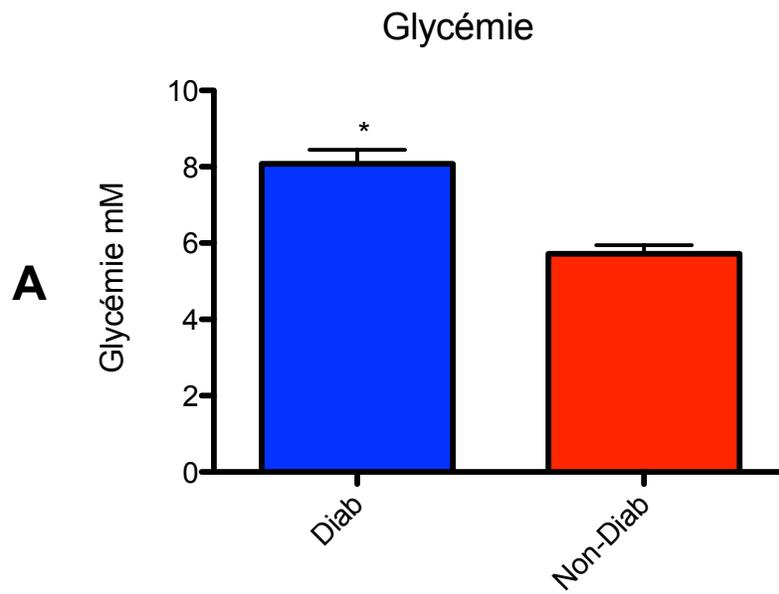


Figure 19. Niveaux d'expression protéique de INSR (récepteur à l'insuline) suite à l'inhibition du miR-16 dans des HUVEC. Dix nM d'AMO-16 et de AMO-Scr ont été transfectés pendant 24 heures. Les résultats ont été normalisés avec le GAPDH. Aucune différence n'est observée entre les différentes conditions (n=7).

4.5. Corrélation entre miR-16 et la glycémie de patients

coronariens

Afin de tester l'impact fonctionnel de miR-16 *in vivo*, j'ai évalué la relation entre les niveaux d'expression de miR-16 dans les artères mammaires et la glycémie de 22 patients coronariens. Ces expériences ont été faites sur des patients diabétiques ou pas qui n'avaient pas d'hyperglycémie (glycémie supérieure à 10 mM). Sans surprise, la glycémie des patients diabétiques est supérieure (différence significative de 2,3 mM en moyenne) (figure 20A). L'expression de miR-16 dans les artères mammaires de ces mêmes patients est en moyenne légèrement et non significativement plus élevée chez les patients diabétiques que non diabétiques (22% de différence) (figure 20B). Pour mieux évaluer cette différence, j'ai étudié la corrélation entre les niveaux de miR-16 et la glycémie des patients: il existe une tendance de corrélation positive ($p=0,1170$, $r^2=0,1465$) entre les niveaux de miR-16 et la glycémie des patients (figure 20 C).



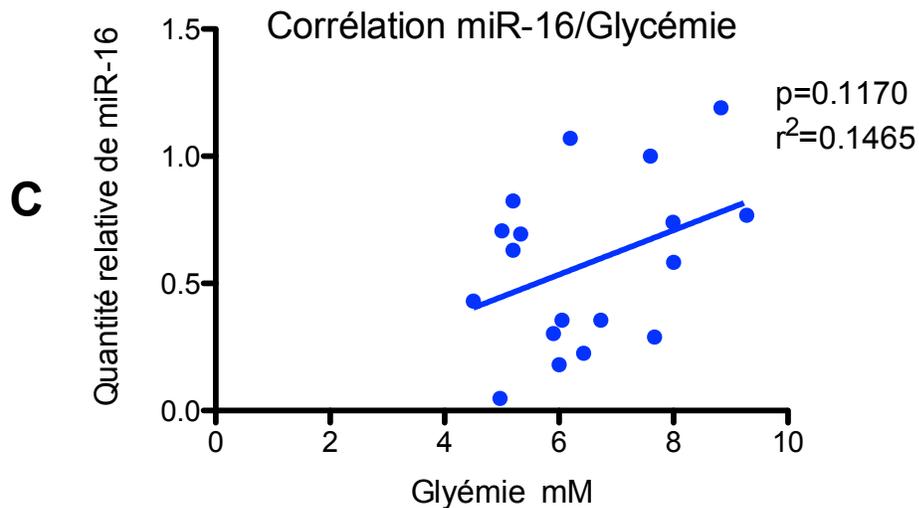


Figure 20. Relation entre la glycémie de patients coronariens et les niveaux d'expression relatifs de miR-16 dans des artères mammaires humaines. **A.** Glycémie (mM) des patients coronariens diabétiques (n=6) et non-diabétiques (n=12). La glycémie des patients diabétiques est significativement plus élevée que celle des patients non-diabétiques ($p<0,0001$). **B.** Niveaux d'expression relatifs du miR-16 chez des patients diabétiques et non-diabétiques. Les niveaux d'expression du miR-16 ne varient pas entre les patients diabétiques ou pas. **C.** Corrélation entre les niveaux d'expression de miR-16 et la glycémie des patients coronariens. Il y a une tendance, non significative, de corrélation positive ($p=0,1170$, $r^2=0,1465$) entre les deux paramètres (n=18).

4.6. Corrélation miR-16, GLUT-4 et glycémie souris WD et RD

Le GLUT-4 étant fortement exprimé dans les muscles squelettiques, nous avons étudié la corrélation de miR-16 et GLUT-4 dans le muscle

squelettique de souris qui ont été nourries selon deux diètes différentes, l'une standard (RD) et l'autre hypercalorique de type Western (WD). La diète Western a effectivement augmenté la glycémie des souris de 2,0 fois comparée aux souris soumises à la diète régulière (figure 21).

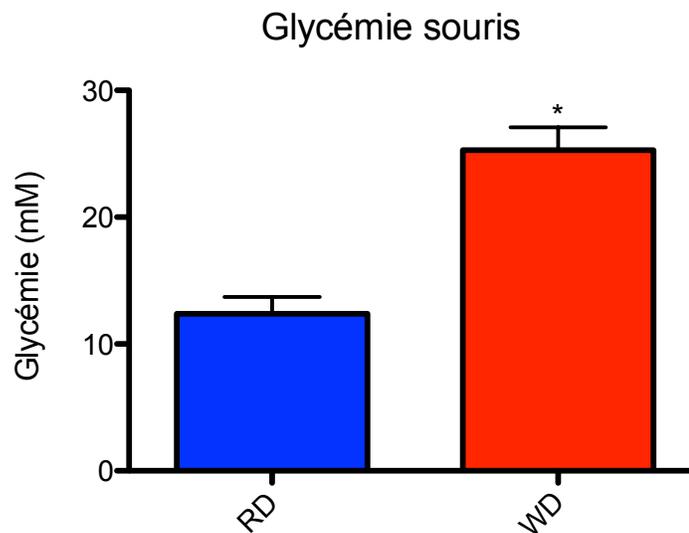
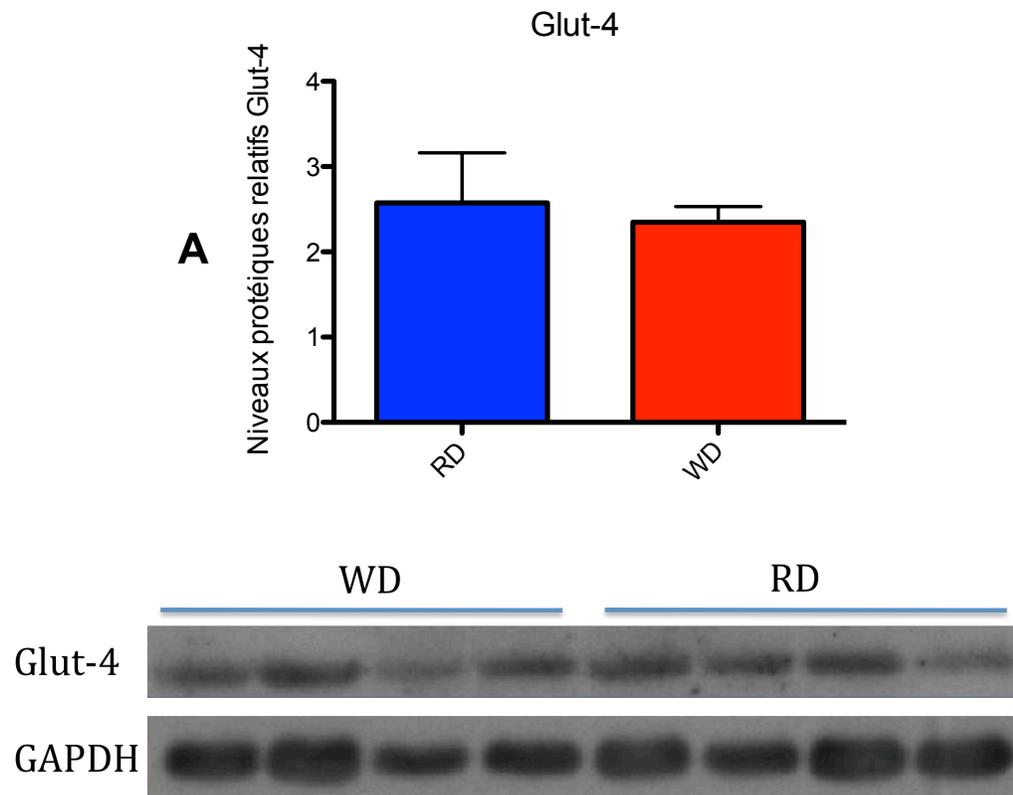


Figure 21. Glycémie de souris nourries selon une diète Western (WD) comparée à une diète normale (RD). La glycémie des souris WD est 2,0 fois plus élevée que celle des souris RD. * : $p < 0,05$ comparé à RD.

Nous avons évalué les niveaux de GLUT-4 et INSR protéiques entre ces deux groupes de souris. Aucune variation n'a été observée (figure 22A et figure 23A). Une légère tendance de corrélation existe entre l'expression de GLUT-4

et la glycémie. Par contre, aucune corrélation n'existe entre l'expression de INSR et la glycémie (figure 21B et figure 22B) n'a été observée.



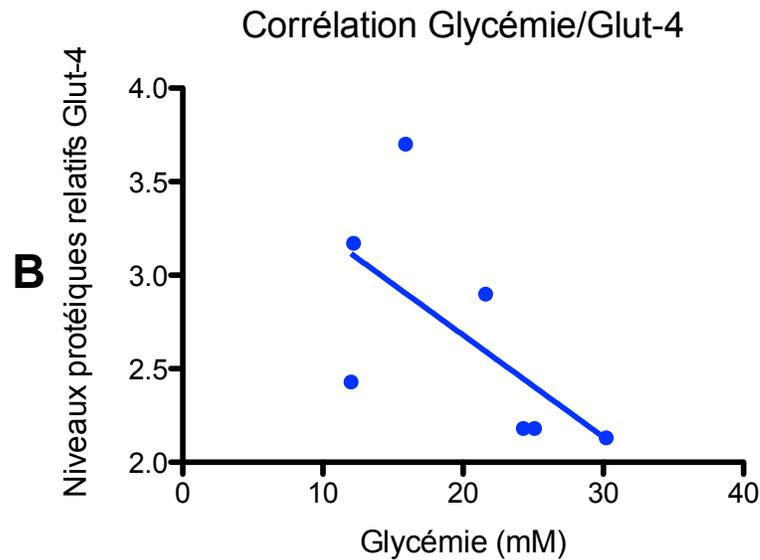
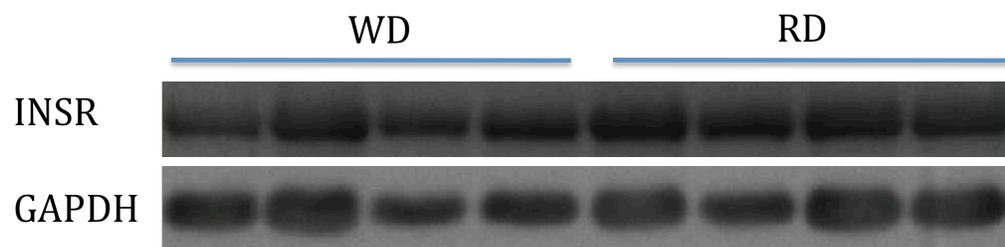
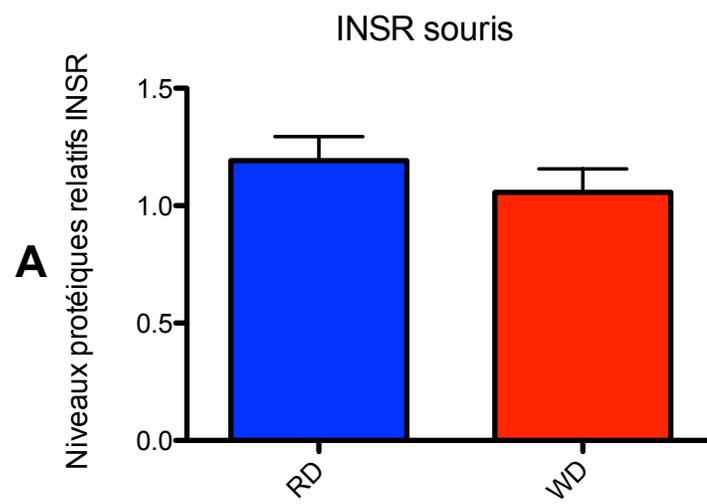


Figure 22. Corrélation des niveaux de GLUT-4 protéiques et la glycémie de souris nourries selon une diète Western ou une diète normale. **A.** Mesure des niveaux de GLUT-4 dans le muscle squelettique de souris nourries selon une diète Western comparée à une diète normale. Aucune différence significative n'est observée. **B.** Il y a une tendance, non significative, de corrélation négative entre les niveaux de GLUT-4 dans le muscle squelettique de souris et la glycémie des souris ($p=0,1301$, $r^2=0,3958$, $n=7$).



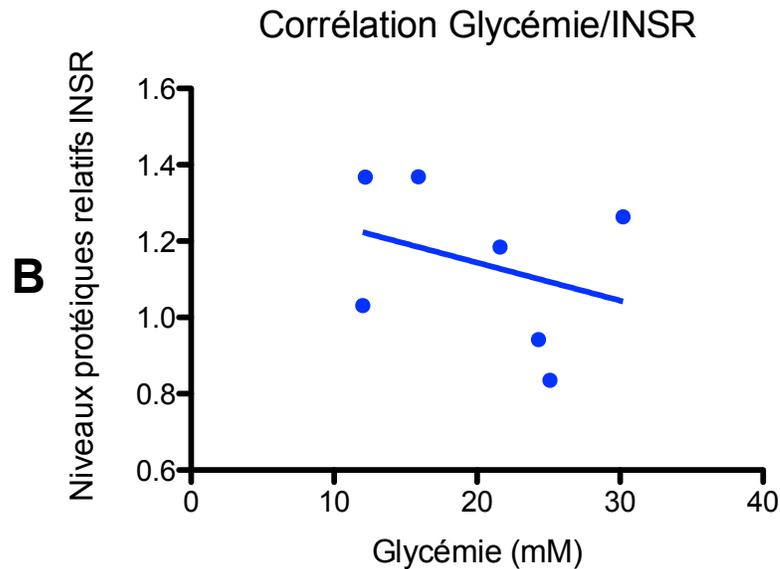


Figure 23. Absence de corrélation entre les niveaux d'INSR protéiques et la glycémie de souris nourries selon une diète Western ou une diète normale. **A.** Mesure des niveaux d'INSR dans le muscle squelettique de souris nourries selon une diète Western comparée à une diète normale. Aucune différence significative n'est observée. **B.** Absence de corrélation entre les niveaux d'expression d'INSR dans le muscle squelettique de souris et la glycémie de ces souris (n=7).

L'étude de l'expression de miR-16 dans ces deux groupes de souris ne montre aucune différence entre les groupes (figure 24A). Il n'y a pas de corrélation ($p=0,3299$) entre la glycémie et l'expression de miR-16 dans les muscles squelettiques des souris (figure 24B).

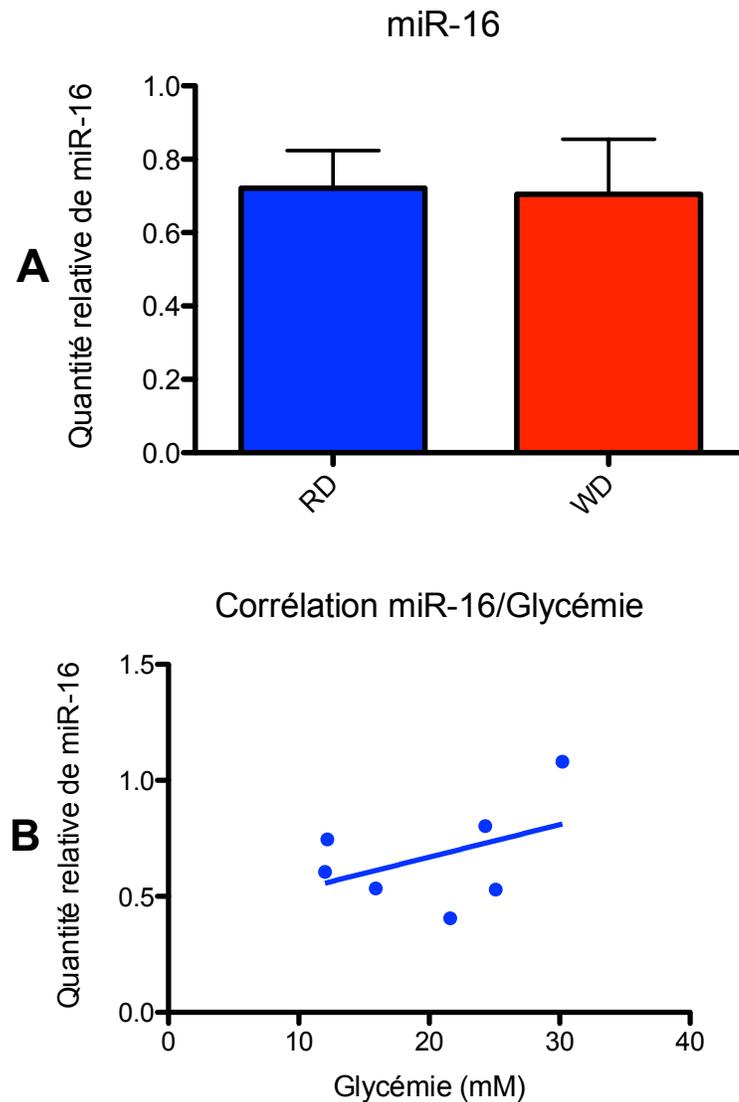


Figure 24. Expression de miR-16 dans les muscles squelettiques de souris RD et WD. **A.** Niveau d'expression de miR-16 dans les deux groupes RD et WD. Aucune différence n'est observée. **B.** Corrélation entre l'expression de miR-16 avec la glycémie de souris nourries selon une diète Western et une diète normale. La corrélation entre les deux paramètres n'est pas significative ($p=0,3299$, $r^2=0,1888$, $n=7$).

Nous avons finalement évalué les variations de miR-16 par rapport à GLUT-4. Il y a une tendance de corrélation négative entre les niveaux de miR-16 et GLUT-4 (en bleu, figure 25). Ce résultat concorde avec les données que nous avons observées sur les cellules en culture. En revanche, les niveaux d'INSR (en rouge, figure 25) ne corrént pas avec les niveaux de miR-16. Ce résultat suggère que GLUT-4, mais pas INSR, est une cible de miR-16.

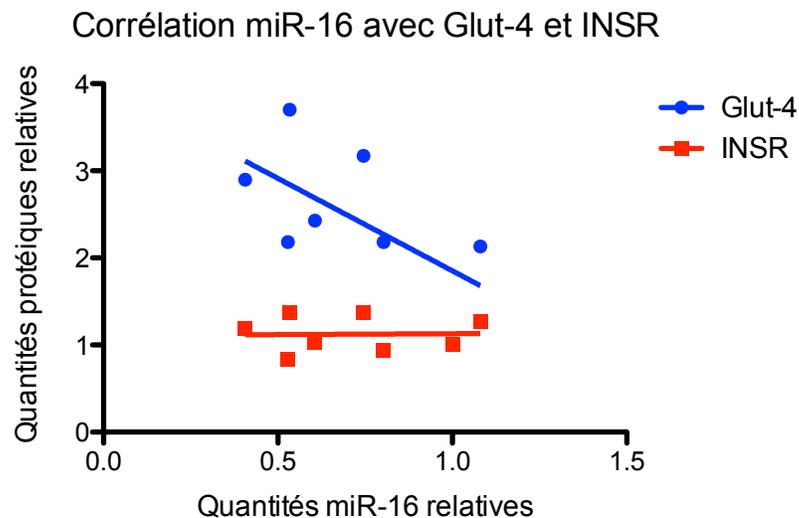


Figure 25. Corrélation entre l'expression de miR-16 et les niveaux protéiques de GLUT-4 (bleu) et d'INSR (rouge) dans le muscle squelettique de souris. Aucune corrélation n'est observée entre miR-16 et INSR des souris. Une tendance de corrélation négative entre miR-16 et GLUT-4 existe dans les souris nourries selon une diète Western ou une diète normale ($p=0,0998$, $r^2=0,3866$, $n=7$).

5 Discussion

5.1. Microarray

Le microarray permet d'obtenir beaucoup d'informations. Non seulement nous avons pu identifier des différences d'expression de miRNAs entre les hIMAEC sénescents et prolifératives, mais nous avons aussi estimé les niveaux d'expression de différents miRNAs. Le signal émis par un miRNA n'est pas quantitatif et il faut ainsi être prudent dans les comparaisons, mais des différences d'intensité de signal de plusieurs ordres de grandeur suggèrent une différence. Ainsi, parmi les miRNAs qui ont émis un signal très intense il y a les miR-100 et miR-1826. Les signaux émis par le miR-1826 étaient près de 350 fois plus élevés que la moyenne, mais insensibles à la sénescence et il est uniquement exprimé chez l'humain. J'ai confirmé que miR-1826 est fortement exprimé dans les cellules endothéliales par qPCR. MiR-100 était sous exprimé dans les cellules sénescents et il était également plus élevé de près 10 fois que la moyenne; je n'ai pas identifié de fonction physiologique dans les cellules endothéliales pour miR-100. Un autre point intéressant était la mise en évidence de la forte hétérogénéité d'expression des miRNAs entre les hIMAEC et les cellules endothéliales d'artère coronarienne (figure 13).

Mon travail s'est concentré sur miR-16 qui était sous-exprimé dans les cellules endothéliales sénescents en comparaison des cellules endothéliales prolifératives (figure 14).

5.2. Rôle possible de miR-16 dans la sénescence

J'ai tout d'abord recherché les cibles potentielles de miR-16 par l'intermédiaire des logiciels de prédictions et j'ai remarqué que INSR, IRS-1 et GLUT-4 étaient parmi les cibles potentielles. Mon premier objectif a donc été de vérifier si miR-16 régula l'expression de ces protéines et notamment GLUT-4. Je n'ai pas testé l'effet de miR-16 sur la sénescence directement. Il aurait été intéressant de voir si la surexpression de miR-16 diminuerait les niveaux de sénescence avec le temps. Ces études seraient donc une suite logique de mon projet actuel.

5.3. Effet de miR-16 sur GLUT-4

J'ai pu montrer que miR-16 est un régulateur post-transcriptionnel de GLUT-4 puisque l'inhibition de miR-16 a diminué les niveaux de GLUT-4 protéiques dans les cellules endothéliales (figure 16). Par contre, miR-16 n'a eu aucun effet sur les niveaux protéiques d'INSR (figure 17). De plus, il y a une corrélation négative entre les niveaux de miR-16 et GLUT-4 (figure 18). Sachant que les miRNAs agissent sur l'ARNm de leurs cibles, je me suis demandé si miR-16 avait un effet direct sur l'ARNm de GLUT-4. Les mécanismes par lesquels les miRNAs agissent sur leurs cibles ne sont pas bien élucidés. L'essai luciférase est le meilleur moyen actuel pour confirmer l'effet d'un miRNA sur sa cible et est considéré comme une preuve suffisante de

régulation directe d'un miRNA sur l'ARNm du gène cible s'il a été démontré que ce miRNA avait un effet sur les niveaux protéiques du gène cible. Afin de déterminer si miR-16 agit de manière directe ou indirecte sur GLUT-4, j'ai effectué un essai luciférase. Ainsi, j'ai inséré une séquence du 3'UTR de GLUT-4 qui contient le site potentiel de liaison de miR-16 dans un vecteur rapporteur de la *firefly* luciférase, le pMiR-Report. Si miR-16 régule directement GLUT-4, une surexpression du miR-16 devrait diminuer le niveau relatif de la luciférase en comparaison avec une condition contrôle. Comme contrôle positif, le miR-1 a été utilisé: un vecteur *firefly* luciférase identique à celui utilisé pour miR-16, mais avec une séquence spécifique régulée par miR-1 (pmiR-1). Ces résultats ne sont pas représentés dans ce travail mais ils ont été décrits dans la section Matériel et Méthodes. Les résultats devaient être normalisés avec un vecteur de la *Renilla* luciférase des problèmes techniques avec le capteur de luminescence à causer variations dans les valeurs de la *Renilla* luciférase. Les contrôles positifs ont également affiché ces variations. Les résultats non normalisés suggéraient que le miR-16 régule directement GLUT-4 mais ce résultat ne peut être validé sans normalisation ce qui explique la raison pourquoi je n'est pas afficher ces résultats. En plus de cette expérience, pour établir que miR-16 est un régulateur post-transcriptionnel de GLUT-4 il aurait été nécessaire de pouvoir observer une augmentation de l'activité de GLUT-4 dans les cellules en mettant en évidence l'augmentation de l'entrée de glucose dans les cellules suite à une sous-expression de miR-16. Cette expérience serait possible par un marquage du glucose qui permettrait de

suivre son entrée dans les cellules suite à une surexpression de miR-16. Cependant, cette expérience pourrait ne pas donner le résultat attendu puisque GLUT-4 est régulé par INSR pour être transporté vers la membrane cytoplasmique où il pourra transporter le glucose à l'intérieur de la cellule. Ainsi, une augmentation de l'expression de GLUT-4 sans son transfert vers la membrane serait en théorie sans conséquence métabolique. Il s'agit là encore d'une expérience importante à réaliser dans la suite de ce projet.

Enfin, il aurait été intéressant d'étudier l'effet de miR-16 sur des fonctions des cellules endothéliales. Ainsi, une surexpression de miR-16 pourrait diminuer la formation de tubules et ralentir le pouvoir de migration des cellules endothéliales en diminuant leurs capacités métaboliques.

5.4. Relation miR-16 et glycémie

À défaut d'une investigation des mécanismes cellulaires de miR-16, j'ai utilisé deux modèles différents afin de déterminer si miR-16, GLUT-4 et la glycémie pouvaient être liés. Dans un premier lieu, j'ai évalué dans les artères mammaires de patients coronariens la possibilité d'une relation entre les niveaux de miR-16 et la glycémie des patients. Dans un second lieu, j'ai évalué cette même relation dans les muscles squelettiques de souris ayant été soumises à deux diètes différentes.

5.4.1. miR-16 et glycémie des patients coronariens

L'étude sur l'expression de miR-16 dans les artères mammaires internes de patients coronariens montre qu'il n'y avait aucune différence significative entre les niveaux d'expression de miR-16 entre les patients diabétiques et non-diabétiques (figure 20). On a observé une légère surexpression de miR-16 (de 22%) chez les patients diabétiques, mais cette différence n'est pas assez marquée pour en tirer des conclusions (figure 20B). Il est important de noter que ces patients sont tous traités pour leur maladie coronarienne et leur glycémie est contrôlée. Chaque patient est un cas particulier et il est difficile d'obtenir des variations significatives avec un nombre de patients si restreint. Les patients diabétiques reçoivent des hypoglycémiantes qui pourraient affecter la glycémie sans modifier l'expression de miR-16. Avec ces limitations en tête, j'ai évalué la relation entre l'expression de miR-16 et la glycémie chez les patients diabétiques qui ont des glycémies contrôlées et en dessous du seuil considéré hyperglycémique. Une tendance de corrélation positive existe entre les niveaux de miR-16 la glycémie des patients (figure 20 C), tendance qui pourrait devenir significative si l'on augmentait le nombre de patients testés. Cette tendance est autant présente dans le groupe de patients diabétiques que dans le groupe de patients non-diabétiques lors qu'ils sont analysés séparément. Ce résultat nous semble très prometteur. On peut expliquer cette corrélation par le fait qu'une expression élevée de miR-16 pourrait diminuer les niveaux de GLUT-4, diminuant ainsi l'apport de glucose cellulaire et ainsi, augmenter la

glycémie. Il aurait été intéressant d'étudier la corrélation entre miR-16 et GLUT-4 dans les artères des patients coronariens. La taille des artères mammaires n'est pas toujours assez grande pour pouvoir en extraire à la fois les protéines et l'ARN. Les échantillons d'artères mammaires reçus du bloc opératoire contiennent aussi parfois des fragments de muscles squelettiques qui seraient assez gros pour en extraire l'ARN et les protéines. Les niveaux d'expression de GLUT-4 étant les plus élevés dans les muscles squelettiques, une analyse de la relation GLUT-4/glycémie/miR-16 serait probablement plus pertinente dans le muscle. A ce jour, ayant à ma disposition un nombre limité d'échantillons humains, j'ai fait en parallèle une étude chez des souris soumises à une diète normale (RD) ou riche en gras et en sucre dite de type « Western » (WD).

5.4.2. miR-16, GLUT-4 et glycémie dans le muscle squelettique de souris

La glycémie des souris soumises à une diète WD est significativement plus élevée que chez les souris RD (figure 21). Ceci représente un modèle de glycémie contrôlé qui nous permet de comparer miR-16, GLUT-4 et la glycémie. Nous avons choisi de comparer l'expression de GLUT-4 et miR-16 dans le muscle squelettique où l'expression de GLUT-4 est la plus importante. Les résultats attendus ont été confirmés avec cette étude. L'expression de

GLUT-4 tend à varier négativement avec celle de miR-16 (figure 25). Ceci confirme notre résultat précédent qui montre que l'expression de GLUT-4 protéique est inhibée par miR-16 dans les cellules en culture. Par la suite nous avons observé une légère tendance à une corrélation positive entre GLUT-4 et la glycémie (figure 22). Ce résultat est en accord avec le rôle physiologique de GLUT-4 qui permet l'entrée du glucose dans les cellules. Ainsi, une augmentation du transport de glucose dans le muscle squelettique diminue la glycémie. Pour appuyer mon hypothèse que miR-16 est potentiellement un régulateur de la glycémie en diminuant l'expression de GLUT-4, j'ai observé une légère corrélation positive entre eux, bien que celle-ci était non significative. La seule expérience qui pourrait confirmer cette hypothèse serait celle décrite précédemment, à savoir d'étudier les variations de transport du glucose marqué suite à une inhibition de l'expression de miR-16. Nos résultats obtenus avec les trois modèles utilisés (HUVEC, patients coronariens et souris) semblent concorder et renforcent l'intérêt de poursuivre ce travail.

6 Conclusion

Mon travail a mis en évidence l'existence d'un nouveau mécanisme de régulation du métabolisme par miR-16 à travers la régulation de l'expression de GLUT-4. L'étude par microarray était à la base de mon projet. Nous avons découvert que miR-16 est un régulateur des niveaux protéiques de GLUT-4, mais il reste à étudier l'impact de miR-16 sur le transport de glucose. Néanmoins, dans un modèle de souris hyperglycémique, j'ai observé que l'expression de miR-16 tendait à être positivement corrélée avec la glycémie, une tendance également observée dans les fragments d'IMA chez les patients coronariens. Dans le modèle de souris, il y a également une tendance à une corrélation négative entre miR-16 et GLUT-4, ce qui renforce la possibilité d'une régulation de GLUT-4 par miR-16.

En plus des études fonctionnelles qui restent à faire, nous n'avons pas répondu à la question de départ qui a initié ce projet : Mir-16 est sous-exprimé dans les cellules sénescents hIMAEC et il pourrait donc participer au processus de la sénescence. Les données du laboratoire montrent que l'immortalisation des hIMAEC n'est possible que chez la moitié des donneurs et notamment chez les donneurs dont le niveau d'expression de la SIRT-1 est élevé à la base (Voghel et al., 2010). Il serait intéressant d'étudier l'expression de miR-16 dans ces deux conditions et d'en étudier le rôle métabolique. Est-ce

que la faible expression de miR-16 a augmenté l'expression de GLUT-4 et créé un stress cellulaire par une augmentation de glucose cellulaire, stress reconnu pour initier la sénescence cellulaire ? Alternativement, est-ce que la faible expression de miR-16 est une tentative de compensation de la perte de fonction de la cellule entrant en sénescence ? Toutes ces questions restent en suspens et représentent la base d'un projet de recherche fascinant.

Références

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.

Anonymous (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34 Suppl 1, S62-69.

Aqeilan, R.I., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2010). miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ* 17, 215-220.

Baserga, R. (2009). The insulin receptor substrate-1: a biomarker for cancer? *Exp Cell Res* 315, 727-732.

Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., et al. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37, 766-770.

Bhaumik, D., Scott, G.K., Schokrpur, S., Patil, C.K., Orjalo, A.V., Rodier, F., Lithgow, G.J., and Campisi, J. (2009). MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany NY)* 1, 402-411.

Blazer, S., Khankin, E., Segev, Y., Ofir, R., Yalon-Hacohen, M., Kra-Oz, Z., Gottfried, Y., Larisch, S., and Skorecki, K.L. (2002). High glucose-induced replicative senescence: point of no return and effect of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 93-101.

Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., Fischer, A., Burchfield, J., Fox, H., Doebele, C., Ohtani, K., et al. (2009). MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 324, 1710-1713.

Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., D'Urso, L., Pagliuca, A., Biffoni, M., Labbaye, C., et al. (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 14, 1271-1277.

Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1097-1101.

Bottoni, A., Piccin, D., Tagliati, F., Luchin, A., Zatelli, M.C., and degli Uberti, E.C. (2005). miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 204, 280-285.

Boyd, S.D. (2008). Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Lab Invest* 88, 569-578.

Brady, M.J., Pessin, J.E., and Saltiel, A.R. (1999). Spatial Compartmentalization in the Regulation of Glucose Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol Metab* 10, 408-413.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3, e85.

Caporali, A., Meloni, M., Vollenkle, C., Bonci, D., Sala-Newby, G.B., Addis, R., Spinetti, G., Losa, S., Masson, R., Baker, A.H., et al. (2011). Deregulation of microRNA-503 Contributes to Diabetes Mellitus-Induced Impairment of Endothelial Function and Reparative Angiogenesis After Limb Ischemia. *Circulation* 123, 282-291.

Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M.L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N.D., et al. (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13, 613-618.

Catalucci, D., Gallo, P., and Condorelli, G. (2009). MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 402-408.

Chen, J.F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38, 228-233.

Chiorazzi, N., Rai, K.R., and Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352, 804-815.

Chiu, S.L., and Cline, H.T. (2010). Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev* 5, 7.

Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.

Coppe, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated

secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6, 2853-2868.

Deng, Y., Chan, S.S., and Chang, S. (2008). Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 8, 450-458.

Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504-511.

Esau, C.C., and Monia, B.P. (2007). Therapeutic potential for microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 101-114.

Finnerty, J.R., Wang, W.X., Hebert, S.S., Wilfred, B.R., Mao, G., and Nelson, P.T. (2010). The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J Mol Biol* 402, 491-509.

Fish, J.E., Santoro, M.M., Morton, S.U., Yu, S., Yeh, R.F., Wythe, J.D., Ivey, K.N., Bruneau, B.G., Stainier, D.Y., and Srivastava, D. (2008). miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 15, 272-284.

Ghosh, Z., Chakrabarti, J., and Mallick, B. (2007). miRNomics-The bioinformatics of microRNA genes. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 6-11.

Gray, S., Feinberg, M.W., Hull, S., Kuo, C.T., Watanabe, M., Sen-Banerjee, S., DePina, A., Haspel, R., and Jain, M.K. (2002). The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem* 277, 34322-34328.

Gutteridge, I.F. (1999). Diabetes mellitus: a brief history, epidemiology, definition and classification. *Clin Exp Optom* 82, 102-106.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.

Horie, T., Ono, K., Nishi, H., Iwanaga, Y., Nagao, K., Kinoshita, M., Kuwabara, Y., Takanabe, R., Hasegawa, K., Kita, T., et al. (2009). MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 389, 315-320.

Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.

Ito, T., Yagi, S., and Yamakuchi, M. (2010). MicroRNA-34a regulation of endothelial senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 398, 735-740.

Ivey, K.N., Muth, A., Arnold, J., King, F.W., Yeh, R.F., Fish, J.E., Hsiao, E.C., Schwartz, R.J., Conklin, B.R., Bernstein, H.S., et al. (2008). MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 219-229.

Karaa, Z.S., Iacovoni, J.S., Bastide, A., Lacazette, E., Touriol, C., and Prats, H. (2009). The VEGF IRESes are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16. *RNA* 15, 249-254.

Kim, S.K., Nam, J.W., Rhee, J.K., Lee, W.J., and Zhang, B.T. (2006). miTarget: microRNA target gene prediction using a support vector machine. *BMC Bioinformatics* 7, 411.

Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 376-385.

Kim, Y.K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 26, 775-783.

Klip, A. (2009). The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl Physiol Nutr Metab* 34, 481-487.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev* 24, 2463-2479.

Kutryk, M.J., and Stewart, D.J. (2003). Angiogenesis of the heart. *Microsc Res Tech* 60, 138-158.

La Rocca, G., Shi, B., Badin, M., De Angelis, T., Sepp-Lorenzino, L., and Baserga, R. (2009). Growth inhibition by microRNAs that target the insulin receptor substrate-1. *Cell Cycle* 8, 2255-2259.

Latronico, M.V., Catalucci, D., and Condorelli, G. (2007). Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ Res* 101, 1225-1236.

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.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.

Li, G., Luna, C., Qiu, J., Epstein, D.L., and Gonzalez, P. (2009). Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence. *Mech Ageing Dev* 130, 731-741.

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.

Linsley, P.S., Schelter, J., Burchard, J., Kibukawa, M., Martin, M.M., Bartz, S.R., Johnson, J.M., Cummins, J.M., Raymond, C.K., Dai, H., et al. (2007). Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 27, 2240-2252.

Liu, N., and Olson, E.N. (2010). MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell* 18, 510-525.

Liu, Z., Sall, A., and Yang, D. (2008). MicroRNA: An emerging therapeutic target and intervention tool. *Int J Mol Sci* 9, 978-999.

Lu, H., Buchan, R.J., and Cook, S.A. (2010). MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovasc Res* 86, 410-420.

Lv, K., Guo, Y., Zhang, Y., Wang, K., Jia, Y., and Sun, S. (2008). Allele-specific targeting of hsa-miR-657 to human IGF2R creates a potential mechanism underlying the association of ACAA-insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 374, 101-105.

Mann, G.E., Yudilevich, D.L., and Sobrevia, L. (2003). Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 83, 183-252.

Menghini, R., Casagrande, V., Cardellini, M., Martelli, E., Terrinoni, A., Amati, F., Vasa-Nicotera, M., Ippoliti, A., Novelli, G., Melino, G., et al. (2009). MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1. *Circulation* 120, 1524-1532.

Pan, Z.W., Lu, Y.J., and Yang, B.F. (2010). MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin* 31, 1-9.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Muller, P., et al. (2000).

Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.

Pothof, J., Verkaik, N.S., van, I.W., Wiemer, E.A., Ta, V.T., van der Horst, G.T., Jaspers, N.G., van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., and Persengiev, S.P. (2009). MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA-damage response. *EMBO J* 28, 2090-2099.

Rane, S., He, M., Sayed, D., Vashista, H., Malhotra, A., Sadoshima, J., Vatner, D.E., Vatner, S.F., and Abdellatif, M. (2009). Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res* 104, 879-886.

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.

Ren, X.P., Wu, J., Wang, X., Sartor, M.A., Qian, J., Jones, K., Nicolaou, P., Pritchard, T.J., and Fan, G.C. (2009). MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation* 119, 2357-2366.

Roy, S., Khanna, S., Hussain, S.R., Biswas, S., Azad, A., Rink, C., Gnyawali, S., Shilo, S., Nuovo, G.J., and Sen, C.K. (2009). MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res* 82, 21-29.

Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83-86.

Scheinowitz, M., Abramov, D., and Eldar, M. (1997). The role of insulin-like and basic fibroblast growth factors on ischemic and infarcted myocardium: a mini review. *Int J Cardiol* 59, 1-5.

Schmidt, M., Paes, K., De Maziere, A., Smyczek, T., Yang, S., Gray, A., French, D., Kasman, I., Klumperman, J., Rice, D.S., et al. (2007). EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. *Development* 134, 2913-2923.

Sharbati-Tehrani, S., Kutz-Lohroff, B., Bergbauer, R., Scholven, J., and Einspanier, R. (2008). miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for

the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample. *BMC Mol Biol* 9, 34.

Shi, B., Sepp-Lorenzino, L., Prisco, M., Linsley, P., deAngelis, T., and Baserga, R. (2007). Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. *J Biol Chem* 282, 32582-32590.

Small, E.M., Frost, R.J., and Olson, E.N. (2010). MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* 121, 1022-1032.

Soifer, H.S., Rossi, J.J., and Saetrom, P. (2007). MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol Ther* 15, 2070-2079.

Stolzing, A., Coleman, N., and Scutt, A. (2006). Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res* 9, 31-35.

Suzuki, M., and Boothman, D.A. (2008). Stress-induced premature senescence (SIPS)--influence of SIPS on radiotherapy. *J Radiat Res (Tokyo)* 49, 105-112.

Syed, I.S., Sanborn, T.A., and Rosengart, T.K. (2004). Therapeutic angiogenesis: a biologic bypass. *Cardiology* 101, 131-143.

Tang, X., Muniappan, L., Tang, G., and Ozcan, S. (2009). Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic β cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA* 15, 287-293.

Terentyev, D., Belevych, A.E., Terentyeva, R., Martin, M.M., Malana, G.E., Kuhn, D.E., Abdellatif, M., Feldman, D.S., Elton, T.S., and Gyorke, S. (2009). miR-1 overexpression enhances Ca^{2+} release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56alpha and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2. *Circ Res* 104, 514-521.

Thorens, B., and Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E141-145.

Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., et al. (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456, 980-984.

van Rooij, E., Marshall, W.S., and Olson, E.N. (2008a). Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res* 103, 919-928.

van Rooij, E., and Olson, E.N. (2007). MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 117, 2369-2376.

van Rooij, E., Sutherland, L.B., Liu, N., Williams, A.H., McAnally, J., Gerard, R.D., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18255-18260.

van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2008b). Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13027-13032.

Vella, M.C., Choi, E.Y., Lin, S.Y., Reinert, K., and Slack, F.J. (2004). The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the *lin-41* 3'UTR. *Genes Dev* 18, 132-137.

Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Mamarbachi, A.M., Villeneuve, L., Mallette, F.A., Ferbeyre, G., Farhat, N., Perrault, L.P., Carrier, M., and Thorin, E. (2010). Endogenous oxidative stress prevents telomerase-dependent immortalization of human endothelial cells. *Mech Ageing Dev* 131, 354-363.

Wang, S., Aurora, A.B., Johnson, B.A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J.A., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 15, 261-271.

Wang, S., and Olson, E.N. (2009). AngiomiRs--key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 19, 205-211.

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.

Xia, L., Zhang, D., Du, R., Pan, Y., Zhao, L., Sun, S., Hong, L., Liu, J., and Fan, D. (2008). miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. *Int J Cancer* 123, 372-379.

Yamakuchi, M., Lotterman, C.D., Bao, C., Hruban, R.H., Karim, B., Mendell, J.T., Huso, D., and Lowenstein, C.J. (2010). P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6334-6339.

Yamakuchi, M., and Lowenstein, C.J. (2009). MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle* 8, 712-715.

Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., et al. (2007). The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 13, 486-491.

Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., Mayr, A., Weger, S., Oberhollenzer, F., Bonora, E., et al. (2010). Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 107, 810-817.

Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B.R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9779-9784.

Zhang, C. (2008a). MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clin Sci (Lond)* 114, 699-706.

Zhang, C. (2008b). MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics* 33, 139-147.

Zhang, J., Du, Y.Y., Lin, Y.F., Chen, Y.T., Yang, L., Wang, H.J., and Ma, D. (2008). The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1. *Biochem Biophys Res Commun* 377, 136-140.

