



**Identification d'un complexe de dégradation des microARNs chez  
le nématode *Caenorhabditis elegans***

**Thèse**

**Gabriel Bossé**

**Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire  
Philosophiae doctor (Ph.D)**

Québec, Canada

© Gabriel Bossé, 2014



## Résumé

Présents chez tous les métazoaires, les microARNs jouent un rôle critique dans la régulation de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Ces courtes molécules d'ARN altèrent la production protéique en liant spécifiquement les régions non codantes des ARNm. Les microARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II (Pol II) sous forme d'un long transcrit primaire et vont passer par deux étapes de clivage successives pour former le microARN mature. Le microARN mature est pris en charge par une protéine Argonaute pour former le complexe effecteur de la voie, le miRISC. Chacune des étapes de la biogenèse des microARNs peut être régulée pour modifier la production globale ou spécifique des microARNs. Des études récentes ont démontré que la maturation et la stabilité des microARNs sont des facteurs importants pour conserver l'homéostasie cellulaire. De nombreuses évidences supportent qu'une altération du niveau cellulaire de ces petites molécules régulatrices contribue au développement et au maintien de diverses maladies, dont le cancer.

À ce jour, il existe peu de connaissance sur le contrôle de la maturation et de la stabilité de ces courts ARNs non codants. Les deux Argonautes, *alg-1* et *alg-2* impliqués dans la voie des microARNs chez le nématode *C. elegans* sont synthétiques létaux. Un criblage génétique chez *C. elegans* visant à identifier de nouveaux gènes synthétiques létaux avec *alg-2*, a permis d'identifier la protéine DCS-1 comme étant impliqué dans la voie des microARNs. Chez *C. elegans*, la perte de *dcs-1* affecte le niveau de plusieurs microARNs, affectant l'expression génique chez ces animaux. Des analyses biochimiques supportent que DCS-1 affecte l'activité d'une enzyme responsable de la dégradation des microARNs chez le nématode, et ce, de façon indépendante de son activité de dégradation de la coiffe des ARNm. De plus, dans l'optique d'identifier les membres du complexe de dégradation, une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier plusieurs candidats potentiels. Une analyse préliminaire de l'un de ces candidats a permis de démontrer que sa perte de fonction entraîne l'apparition de phénotype associé à une diminution de l'activité de la voie des microARNs et affecte le niveau de certains microARNs. Cette protéine, PPM-2, est une phosphatase et pourrait affecter le statut de phosphorylation d'une protéine importante pour la stabilité ou la dégradation des microARNs.

En conclusion, DCS-1 fait partie d'un complexe de dégradation des microARNs avec la protéine XRN-1. L'identification de ce nouveau complexe de dégradation permet de mieux comprendre les mécanismes responsables du contrôle de ces ARNs. Une meilleure connaissance des mécanismes régulant la production et la stabilité des microARNs pourrait mener au développement de nouvelles avenues thérapeutiques.



## Abstract

In all metazoans, microRNAs play a critical role in the regulation of genes implicated in cell proliferation and differentiation. These small non-coding RNAs form a silencing complex called miRISC and alter protein synthesis upon binding mRNA untranslated regions (UTRs). miRNAs are transcribed by RNA Pol II as a long transcript called the pri-miRNA. The pri-miRNA will go through two steps of cleavage to form the mature miRNA. This mature miRNA is then loaded onto an Argonaute protein to form the effector complex; the miRISC. Each step of miRNA biogenesis is tightly regulated. Recently, miRNA production and stability have been shown to be an important step in this pathway. Several proteins, such as p53, can modulate microRNA biogenesis and many other proteins are implicated in miRNA stabilization and degradation. A tight control of these regulatory RNA is essential since miRNA misregulation is associated with several diseases.

Here we identified the ortholog of human decapping enzyme DcpS (DCS-1) as an important regulator of miRNA level in *C. elegans* by forming a degradation complex with XRN-1, independently of its catalytic activity. In *C. elegans*, the loss of *dcs-1* affects the level of several microRNAs leading to a misregulation of their mRNA targets. Biochemical analysis, support that DCS-1 contributes to degradation of unbound microRNA, which is dependent on the 5' to 3' exonuclease XRN-1. In order to better understand the regulation of miRNAs, we sought to identify other members of this complex. An initial study of proteins identified by mass spectrometry revealed that the loss of *ppm-2* induces several developmental defects associated with the loss of miRNAs. As PPM-2 is a phosphatase, our results suggest that it could affect the stability of the degradation complex by targeting one of its components or the miRNA loading on the Argonaute protein.

In conclusion, our data support that DCS-1 is part of a degradation complex. Importantly, this study identified the first modulators of microRNA degradation in animals and proteins forming this complex are conserved in human suggesting that they could also be implicated in microRNA degradation in higher organisms. Since microRNA are misregulated in many human diseases, identification of factors modulating their stability could lead to new therapeutic approaches



# Table des matières

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>xv</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xxi</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>xxiii</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Biogénèse des microARNs</b> .....	<b>2</b>
1.1 Organisation génomique des microARNs.....	2
1.2 Transcription des microARNs .....	4
1.3 Biogénèse du transcrit primaire .....	5
1.4 Export du pre-miARN .....	9
1.5 Maturation du pre-miARN par Dicer.....	11
1.5 Formation du miRISC.....	14
1.6 Reconnaissance de la cible.....	26
1.7 Modulation de l'accessibilité au 3'UTR.....	31
1.8 Mode de régulation .....	32
1.9 Protéines recrutées par le miRISC.....	32
1.10 Mécanisme de régulation de la cible.....	36
1.11 Conclusion.....	40
1.12 Production de microARN non canonique .....	41
<b>2. Régulation de la biogénèse des microARNs</b> .....	<b>43</b>
2.1 Régulation transcriptionnelle .....	43
2.2 Régulation post-transcriptionnelle.....	45
<b>3. Importance biologique des microARNs</b> .....	<b>69</b>
3.1 Les microARNs et le développement.....	70
3.2. Les microARNs dans un contexte biologique.....	74
3.3 MicroARNs et maladies .....	81
<b>4. Objectif du doctorat</b> .....	<b>87</b>

<b>Chapitre 2 : A new twist in the microRNA pathway: Not Dicer but Argonaute is required for a microRNA production .....</b>	<b>89</b>
Avant propos .....	91
2.1 Article .....	93
2.2 References.....	99
<b>Chapitre 3 : The DeCapping Scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in <i>Caenorhabditis elegans</i> .....</b>	<b>101</b>
Avant Propos .....	103
Résumé .....	105
Abstract.....	107
3.1 INTRODUCTION.....	109
3.2 RESULTS.....	110
3.2.1 Mutations in <i>dcs-1</i> lead to precocious adult fate and enhanced repression of miRNA targets .....	110
3.2.2 Mutations in <i>dcs-1</i> lead to an increase of functional miRNA levels.....	113
3.2.3 DCS-1 is required for the degradation of miRNAs that are released from miRISC .	116
3.2.4 DCS-1 interacts with XRN-1 to form a miRNA degradation complex.....	118
3.3 DISCUSSION.....	121
3.5 EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	123
3.6 REFERENCES.....	124
3.7 ACKNOWLEDGMENTS .....	128
3.8 SUPPLEMENTAL INFORMATION.....	129
<b>Chapitre 4 : Identification d'une phosphatase impliquée dans la régulation de la stabilité des microARNs .....</b>	<b>143</b>
Avant propos .....	145
Résumé .....	147
4.1 Introduction .....	149
4.2 Objectif .....	150
4.3 Matériel et méthodes: .....	151
4.4 Résultats .....	155
4.4.1 Identification des interacteurs protéiques de DCS-1 .....	155
4.4.2 Caractérisation initiale des candidats (Réalisée par Guillaume Landry-Proulx).....	157
4.4.3 Impact de PPM-2 sur la voie des microARNs.....	161
4.4.4 Le mutant <i>ppm-2</i> affecte le niveau des microARNs.....	164
4.4.5 Quelle est la cible de PPM-2 ?.....	167
4.6 Conclusion.....	168
<b>Chapitre 5 : Discussion et Perspectives .....</b>	<b>171</b>
<b>5.1. Implication de DCS-1 dans le contrôle du niveau des microARNs.....</b>	<b>171</b>
5.1.1 Criblage génétique et identification du gène affecté .....	171
5.1.2 Impact de la perte de DCS-1 sur la voie des microARNs.....	175
5.1.3 Quel est le rôle de DCS-1 dans la voie des microARNs ? .....	179
5.1.4 Pourquoi DCS-1 est requis pour la voie des microARNs ? .....	181

<b>5.2 Identification et caractérisation d'un autre membre du complexe de dégradation</b>	<b>184</b>
<b>5.3 Conclusion générale</b>	<b>191</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>193</b>
<b>Annexe</b>	<b>227</b>



# Liste des figures

Chapitre 1	
Figure 1 : Organisation génomique des microARNs .....	4
Figure 2 : Structure d'un pri-miARN .....	6
Figure 3 : Structure du complexe Exportine5-microARN.....	10
Figure 4 : Structure de Dicer .....	12
Figure 5 : Schématisation de l'interaction entre Dicer et le pre-miARN.....	14
Figure 6 : Modèle de la formation du miRISC .....	18
Figure 7 : Arbre phylogénétique des Argonautes.....	20
Figure 8 : Structure d'un Argonaute et de miR-20a.....	22
Figure 9 : Structure de la protéine GW182.....	26
Figure 10 : Interaction entre le miRISC et un ARNm cible .....	28
Figure 11 : Sites de reconnaissance de la cible.....	29
Figure 12 : Régulation de la cible.....	36
Figure 13 : Facteurs influençant la maturation du pri-miARN.....	50
Figure 14 : Facteurs influençant la maturation du pre-miARN .....	60
Figure 15 : Modifications post-traductionnelles d'Ago2.....	63
Figure 16: microARNs durant le développement de <i>C. elegans</i> .....	71
Figure 17 : microARNs dans des boucles de régulation .....	76
Figure 18 : Boucle de régulation NF- $\kappa$ B et let-7 .....	77
Figure 19 : Exemple de l'interaction entre les microARNs et les facteurs de transcription.....	81
Chapitre 2	
Figure 20 : A Dicer independent miRNA .....	97
Chapitre 3	
Figure 20 : The loss of DCS-1 affects miRNA-mediated gene regulation and miRNA levels.....	112
Figure 21 : The loss of <i>dcs-1</i> function rescues let-7 mutant developmental defects by increasing mature let-7 miRNA levels .....	115
Figure 22 : DCS-1 is required for miRNA degradation .....	117
Figure 23 : DCS-1 and XRN-1 interacts to form a miRNA degradation complex .....	120
Figure 24 : S1 DCS-1 protein alignment .....	130
Figure 25 : S2 DCS-1 affects miRNA regulation .....	131
Figure 26 : S3 DCS-1 is affecting only the mature form .....	133
Figure 27 : S4 DCS-1 and XRN-1 expression .....	135
Chapitre 4	
Figure 29 : Identification des candidats.....	156
Figure 30 : Division des cellules de couture hypodermales .....	158
Figure 31 : <i>Alae</i> sauvage .....	159
Figure 32 : La perte de <i>ppm-2</i> affecte la formation des <i>alae</i> .....	160
Figure 33 : La perte de <i>ppm-2</i> affecte l'activité du microARN let-7 .....	162
Figure 34 : Cellules précurseurs de la vulve .....	163
Figure 35 : <i>ppm-2</i> affecte la régulation d'une cible endogène de la famille let-7.....	164
Figure 36 : Niveaux protéiques des composants de la voie des microARNs .....	165
Figure 37 : Le niveau des microARNs diminue dans un mutant <i>ppm-2</i> .....	166

Figure 38 : La perte de la phosphatase PPM-2 affecte la dégradation des microARNs.....	167
Figure 39 : miARNs liés à ALG-1 dans un mutant <i>ppm-2</i> .....	168
Chapitre 5	
Figure 40 : Schéma du criblage génétique.....	172
Figure 41 : Importance de DCS-1 pour la dégradation des microARNs.....	182
Figure 42 : Souche rapporteur de l'activité de <i>lcy-6</i> .....	186
Figure 43 : Schéma du test de relâchement des microARNs.....	190
Figure 44 : Résumé de mes travaux.....	192

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Expression du cluster miR-17-92 dans le cancer .....	83
Tableau 2 : List of unaffected miRNAs in <i>dcs-1</i> mutant .....	137
Tableau 3 : Candidats identifiés par spectrométrie de masse.....	157



## Liste des abréviations

A: adénine  
A : adénosine  
ADAR : Adenosine Deaminases Acting on RNA  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADNc: ADN complémentaire  
AGO : Argonaute  
AIN: ALG-1 INteracting protein  
AKT3 : RAC-gamma serine/threonine-protein kinase 3  
ALG : Ago Like Gene  
ALU : Arthrobacter LUteus  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARNm : ARN Messenger  
ARNt : ARN de transfert  
ARS2: Arsenite-ReSistance Protein 2  
ASEL: Antagonistic SEnsory Left  
ASER: Antagonistic SEnsory Righ  
ATP : Adenosine TriPhosphate  
BCDIN3D : BCDIN3 Domain containing  
BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2  
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor  
BIM : Bcl-2-like protein 11  
BMP : Bone Morphogenetic Proteins  
BRCA1 : BREast Cancer 1  
BSA : Bovine Serum Albumine  
CAF1: CCR4 Associated Factor 4  
CARD10 : CAspase Recruitment Domain-containing protein 10  
CBC : Cap Binding Complex  
Cbp20 : Cap binding protein 20  
CCR4: Carbon Catabolite Repression 4  
CDC27 : Cell Division Cycle protein 27  
CDK : Cyclin-Dependent Kinases  
C/EBP $\alpha$  : CCAAT Enhancer-Binding Protein  $\alpha$   
*C.elegans* : *Caenorhabditis elegans*  
CGH-1 : Conserved Germline Helicase 1  
ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine  
c-MYC : cellular-MYeloCytose  
COX : CycloOXygenase-2  
C-P4H(I): type I Collagen Prolyl-hydroxylase  
CrPV : Cricket Paralysis Virus  
D : Acide Aspartique  
DAF-12 : abnormal DAuer Formation 12  
DBD : DNA Dinding Domain

DCP: DeCapping protein  
DCS-1 : DeCapping Scavenger 1  
DDH : asp/asp/his  
DGCR8 : DiGeorge syndrome Critical Region gene 8  
DND1 : Dead eND 1  
*D. melanogaster* : *Drosophila melanogaster*  
DMNT1 : DNA (cytosine-5)-MethylTransferase 1  
dsRBD : Domaine de liaison à l'ARN double-brin  
dsRNA : double-stranded RNA  
DTT : DiThioThréitol  
E : Acide glutamique  
E2F : Eucaryote transcription Factor  
ECL : Enhanced ChemiLuminescence  
EDTA : Ethylene DiamineTetraAcetic acid  
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
eIF: eukaryotic translation Initiation Factor  
EMCV: EncephaloMyoCarditis Virus  
EMS : EthylMethaneSulfonate  
eRF3 : eukaryotic Release Factor 3  
ERK: Extracellular-signal-Regulated Kinase  
ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport  
Exp5 : Exportin5  
FAM : 6-carboxyfluorescein  
FT : Facteur de transcription  
FXR1: Fragile X mental Retardation syndrome-related protein 1  
GFP : Green Fluorescent Protein  
GLD-2: Defective in Germ Line Development 2  
GST : Glutathione S-Transferase  
GTP : Guanosine TriPhosphate  
GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthetase 3 $\beta$   
GW : Glycine/Tryptophane  
HA: HaemAgglutinin  
HAND2: Heart- And Neural crest Derivatives-expressed protein 2  
Hepes : 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic Acid  
HDAC: Histone DeACetylase  
HIF-1 $\alpha$  : Hypoxia-Inducible Factor  $\alpha$ - subunit  
His: Histidine  
HPat : Homologue of Pat1  
HMGA2: High-Mobility Group AT-hook 2  
hnRNP A1 : Heterogeneous nuclear RiboNucleProtein A1  
HOX : HomeobOX  
HRC: Heat Shock Cognate  
HRP : HorseRadish Peroxidase  
HSP : Heat Shock Protein

HuR: Human antigen R  
 HBL : HunchBack Like  
 hPNPase<sup>old35</sup> : Human PolyNucleotide Phosphorylase  
 I : Inosine  
 ID : IDentification  
 IL-6 : Interleukine 6  
 IMP-1 : Insulin-like growth factor mRNA binding-Protein  
 INF- $\beta$ : INerFéron beta  
 IP : ImmunoPrécipitation  
 IRES : Internal Ribosome Entry Site  
 IRX5 : IRoquois-class homeodomain protein 5  
 K : Lysine  
 KDa : kilo Dalton  
 KCl : Pottassium Chloride  
 KOH : Potassium hydroxide  
 KO: Knock-Out  
 KSRP: KH-type Splicing Regulatory Protein  
 L: leucine  
 LET : lethal  
 LIN: abnormal cell Lineage  
 lncRNA : Longs ARNs Non Codants  
 Loqs : Loquacious  
 LSY-6: Laterally SYmmetric 6  
 $\alpha$ -MHC: alpha-Myosin Heavy Chain  
 M : molaire  
 MAPKAPK2 : MAPK-Activated Protein Kinase 2  
 MCP1P1 : Monocyte Chemoattractant Protein1-Induced Protein1  
 MeCP2 : Methyl CpG binding Protein 2  
 MED13 : Mediator Complex Subunit 13  
 Mg<sup>2+</sup> : ion Magnésium  
 mg : milligramme  
 MgCl<sub>2</sub> :Magnésium chloride  
 MITF: Microphthalmia-associated Transcription Factor  
 mid : middle  
 miPDC : microRNA Precurseur Deposit Complex  
 miRISC : microRNA-Induced Silencing Complex  
 miR/ miRNA: microARN  
 miRLC : microRNA Risc Loading Complex  
 miRNP: micro-RiboNucleoProtein  
 MS12 : MuSashi RNA-binding protein 12  
 MYT1: MYelin Transcription factor 1  
 MYOD1 : MYOblast Determination protein 1  
 n: number  
 NFI-A : Nuclear Factor 1 A-type  
 NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor-kappa B

NF90/NF45 : Nuclear Factor 90/45  
ng : nanogramme  
NDP52 : Calcium-binding and coiled coil domain-containing protein 52  
NPC : Nuclear Protein Complex  
NOD-1: Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 1  
NOT1: Negative on Tata less 1  
Nup153 : Nucleoporin 153kDa  
NOT1 : Negative On Tata less 1  
NR1 : cytosolic NADPH-dependent flavin Reductase 1  
OCT4 : OCTamer-binding transcription factor 4  
OB : oligonucleotide/Oligosaccharide Binding ORF : Open Reading Frame  
Pasha : PARTner of DroSHA  
PAPD4 : PAP associated domain containing 4  
PABPC : Poly-A Binding protein C-terminal  
PABP : Poly-(A)-Binding Protein  
PACT : Protein activator of the interferon-induced protein kinase  
PAIP2 : PABP-Interacting Proteins 2  
PAM2 : PABPC-interacting Motif 2  
PAN3 : Poly A Nuclease  
Pol II : ARN polymérase II  
PARP : Poly-ADP-ribose  
PAZ : Piwi/Argonaute/Zwille  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
P-Bodies : Processing Bodies  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PHAX : PHosphorylated Adapter RNA eXport protein  
PIKR2 : Phospholinositol-3-Kinase Regulatory subunit 2  
piARNs : Piwi Interacting RNAs  
PIWI : P element-Induced Wimpy testes  
PKR: Protein Kinase RNA-activated  
PNK : PolyNucléotide Kinase  
PPM : : Protein Phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependent  
pri-miARN : transcrit primaire de microARN  
pre-miARN : précurseur de microARN  
PTBP1 :Polypyrimidine Tract Binding protein  
PTEN : Phosphatase and tensin homolog  
PTP1B L Protein Tyrosine Phosphatase 1B  
Pr. : professeur  
PUF : PUmilio Family  
PVDF : PolyVinyliDene Fluoride  
Q : glutamine  
R : Arginine  
ROS: Espèce Réactive d'Oxygène  
Ras : Rat Sarcoma  
RBM-3: RNA Binding Motif protein 3  
RDE-1: RNAi-DEfective 1  
RhoB : Ras homolog gene family, member B  
RIIID : RNase type III catalytic domaine  
RIG-1 : Retinoic acid-Inducible Gene 1

RISC : RNA-Induced Silencing Complex  
Rrp41: Ribosomal RNA-processing protein 41  
RT-PCR : Reverse-transcriptase PCR  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
SF2/ASF : Splicing Factor 2 / Alternative Splicing Factor  
siARN : small interfering ARN  
SMAD : Small body size and Mothers Against Decapentaplegic  
SNP : Simple Nucleotide Polymorphism  
SNAI2 : SNAI family zinc finger 2  
snoARNs : Small nucleolar RNAs  
Sprd1 : Sprouty-Related, EVH1 Domain-containing protein 1  
SRSF3 : Serine/arginine-Rich Splicing Factor 3  
SSC : Saline Sodium Citrate  
STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
stRNA, : small temporal RNA  
TAZ : Tafazzin  
TBS-T : Tris Buffer Salt-Tween  
TCA : TriChloroAcetate  
TDP-43 : TAR DNA-binding Protein-43  
Thrap1 :Thyroid Hormone Receptor Associated Protein 1  
TGF $\beta$ R2 : Transforming Growth Factor beta Receptor 2  
TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor beta  
TNRC6A : TriNucleotide Repeat-Containing gene 6A  
TRBP : Transactivating Response (TAR) RNA-Binding Protein  
ts : thermosensitive  
TRIM: TRIPartite Motif  
TUT: Terminal Uridyl Transferase Tudor-SN : Tudor Staphylococcal Nuclease  
U : uridine  
UBA : UBiquitin Associated like domain  
UTR : UnTranslated Region  
W : tryptophane  
WAGO : Worms ArGOnaute-specific group  
WT : Wild Type  
VAV-1 : mammalian VAV (oncogene) related  
XRN : eXoRiboNuclease  
XPO-1 : eXPortin 1  
YAP: Yes-Associated Protein



# Remerciements

Avant toute chose, je me dois de remercier le Dr. Simard pour m'avoir accueilli dans son équipe il y a maintenant plus de 7 ans. Beaucoup d'eau a coulé sous les ponts depuis cette époque et ce fut une expérience humaine et scientifique des plus enrichissantes. Je suis très reconnaissant de l'opportunité que j'ai eue de participer à plusieurs congrès à travers le monde me permettant ainsi de rencontrer des scientifiques de tous les horizons. Son support et son optimisme légendaire auront été fort appréciés tout au long de ces années.

En deuxième lieu, je désire remercier toute ma famille, de mes parents : Sylvain et Linda, mes frères et sœur Pierre, Miriam et Adam, à ma grand-mère Hélène. À défaut de tout comprendre, ils m'ont toujours supporté et ont toujours témoigné d'un grand intérêt pour mes travaux.

Un immense merci à ma fiancée Chelsea avec qui je partage tout. Merci pour ton aide lors de cette rédaction, pour ton soutien et ton enthousiasme ces deux dernières années... Ce n'est qu'un début !

Au moment d'écrire ces lignes, j'ai une pensée spéciale pour ma défunte tante Francine. Son combat, pendant plus de 8 ans, me rappelle pourquoi nous passons toutes ces heures dans un laboratoire et me motive à continuer à me donner cœur et âme dans ce que je fais.

Je dédie un merci particulier à tous les membres, présents et passés du laboratoire. Un merci spécial à Sandra et Guillaume, mes deux plus vieux acolytes. Parmi tous les anciens, je désire souligner ma mère scientifique, Évelyne, pour sa grande aide lors de mon arrivée, ainsi que Nellie et Berthier pour avoir fait du laboratoire un endroit fort divertissant. Une pensée également pour les anciens étudiants au doctorat Samir, Ifan et Alejandro. Finalement, merci aux étudiants actuels Oussama, Lucile, Pascale et Alexandra.

Merci à mes collaborateurs, particulièrement Stefan Rügger et Helge Grosshans pour les discussions et les échanges d'idées scientifiques. Merci à mes partenaires de congrès du laboratoire Duchaine. En ce moment j'ai également une pensée pour mes amis avec qui j'ai partagé mes années sur les bancs d'école, particulièrement My Garon et mon ancien acolyte Nicolas Prud'homme.

Je désire remercier également l'ensemble de la communauté du centre de recherche pour avoir créé un environnement stimulant et enrichissant. Les rencontres faites entre ces murs vont me rester longtemps en mémoire. Merci également au FRSQ et au CRSNG pour leur support financier au cours de mes études.

Finalement, je désire remercier mon comité de thèse. Les Dr Jacques Côté et Amine Nourani, non seulement pour avoir accepté de faire parti du jury, mais également pour le support tout au long de mon doctorat. Je désire également remercier l'autre membre du jury le Dr Thomas Duchaine. Je vais me souvenir longtemps de notre première rencontre au *C.elegans meeting 2009*. Lors de la soirée de clôture, tu m'avais dit et je cite: "Je te promets que la prochaine fois on va parler plus de science". Tu auras effectivement tenu promesse puisque notre rencontre suivante fut mon examen de prédoctorat. Alors merci de ton support, des discussions et de ton implication tout au long de mon doctorat.



## Avant-propos

Mon premier contact avec les courts ARNs non codants s'est produit au cours des mes études collégiales, lors de la lecture d'un article portant sur la découverte du ARNi et des microARNs parues dans la revue *Québec Science*. Malgré mes connaissances limitées en biologie moléculaire, je fus alors impressionné de voir que l'ARN n'avait pas seulement un rôle d'intermédiaire, mais pouvait également réguler directement l'expression protéique. À l'époque, j'étais loin de me douter que la lecture de cet article allait grandement influencer mon avenir. Au moment de débiter ma recherche de stage lors de mon baccalauréat en Biochimie, un chercheur et son champ de recherche sur la liste des scientifiques de l'Hôtel-Dieu ont attiré mon attention : Martin Simard (Étude de la voie des microARNs et du ARNi/ ARN non codant). J'ai alors postulé pour une position de stagiaire d'été, ce fut le seul poste pour lequel j'ai appliqué.

Le présent manuscrit représente les travaux réalisés dans le laboratoire du Dr. Simard au cours de ma maîtrise et de mon doctorat. Au cours de ce stage et de ma maîtrise, j'ai appris à manipuler le nématode *C. elegans* et à prendre avantage de sa force pour les études génétiques, afin d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la voie des microARNs. J'ai ensuite eu la chance de réaliser un passage accéléré au doctorat en continuant à travailler sur la caractérisation de l'implication de la protéine DCS-1 dans la voie des microARNs.

Au cours de mon doctorat, j'ai publié un article scientifique en tant que premier auteur en collaboration avec des membres du laboratoire (Alejandro Vasquez et Évelyne Rondeau), des membres des laboratoires du Dr. Helge Grosshans et du Dr. Victor Ambros. L'article, publié dans le journal *Molecular Cell* en 2013, est présenté dans le chapitre 3 et disponible dans sa version publiée en annexe.

***The decapping scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in *Caenorhabditis elegans****, *Gabriel D Bossé, Stefan Rügger, Maria C Ow, Alejandro Vasquez-Rifo, Evelyne L Rondeau, Victor R Ambros, Helge Grosshans, and Martin J Simard*

Au cours de mes études, j'ai également eu la chance de collaborer avec mon collègue Alejandro Vasquez sur son projet ce qui a mené à une publication dans le journal *PLoS Genetics* en 2013. Cet article est disponible en annexe 2.

**A New Role for the GARP Complex in MicroRNA-Mediated Gene Regulation**, *Alejandro Vasquez-Rifo, Gabriel D Bossé, Evelyne L Rondeau, Guillaume Jannot, Alexandra Dallaire, and Martin J Simard*

J'ai également eu l'opportunité d'avoir deux autres publications. La première, dont je suis le premier auteur a été publiée dans la revue *Cell Research* en 2010. Cette publication est une préface pour résumer les travaux innovateurs d'un autre groupe de recherche dans le domaine des microARNs. Pour la seconde, j'ai collaboré avec un stagiaire postdoctoral au laboratoire, Oussama Meziane, pour préparer un article afin de résumer et de présenter mon article sur DCS-1 pour la revue *Cell Cycle* en 2013. L'article dont je suis le premier auteur fera l'objet du Chapitre 2 de ce manuscrit. Ces deux articles sont également disponibles en annexe 3 et 4 respectivement.

**A new twist in the microRNA pathway : Not Dicer but Argonaute is required for a microRNA production.** *Gabriel D Bossé and Martin J. Simard*

**The decapping scavenger enzyme DCS-1 : A new modulator of miRNA turnover,** *Oussama Meziane, Gabriel D. Bossé, Martin J. Simard*

# Chapitre 1 : Introduction

## Avant-propos

L'acide ribonucléique (ARN) a longtemps été considéré comme un simple intermédiaire entre l'acide désoxyribonucléique (ADN) et les protéines. Par contre, l'idée que des molécules d'ARN puissent avoir un rôle dans la régulation de l'expression génique ne date pas d'hier. Une publication par *Britten et Davidson* en 1969, proposait l'existence d'un sous-groupe de gènes chez les animaux, appelé gènes maîtres, dont le rôle serait de réguler l'expression d'un autre groupe de gènes, appelé gènes producteurs. Dans cette même publication, ces auteurs ont émis une hypothèse, très audacieuse pour l'époque, selon laquelle le groupe des gènes maîtres pourrait être formé de molécules d'ARNs (O'Malley, 2010). Cette hypothèse ne reçut pas énormément d'appuis à l'époque. Ces nouvelles théories ne faisaient pas beaucoup de poids versus le dogme central de la biologie ou encore la théorie selon laquelle la majeure partie de l'ADN était des déchets, théorie que certains avaient d'ailleurs surnommée le "*selfish DNA*". Aussi, ces derniers considéraient les régions non codantes de l'ADN comme un parasite (Orgel and Crick, 1980).

Au cours de la décennie suivante, plusieurs études ont démontré l'existence d'ARN double brin dans le noyau, de même que l'existence d'ARN capable de supprimer la traduction. Les premiers long ARN non-codant, dont les précurseurs de microARNs, ont peut-être été identifiés il y a presque 40 ans, lorsque deux groupes ont détecté la présence de transcrits contenant une queue poly-A, sans posséder de séquences homologues aux ARNs messager (ARNm) (Mattick, 2003). Ces études ont ouvert la voie à un nouveau champ d'études en biologie moléculaire, mais ce n'est qu'en 1993 que le premier microARN fût identifié par le groupe du Dr. Victor Ambros (Lee et al., 1993).

Originellement appelé stRNA, pour *small temporal RNA*, ces courts ARNs non codants, furent renommés microARNs quelques années plus tard lors de l'identification d'un grand nombre de ces courts ARNs (Lagos-Quintana, 2001; Lau, 2001; Lee, 2001). Depuis la découverte des microARNs et de l'ARN interférence (ARNi), le monde des ARNs non codants régulateurs a littéralement explosé. À l'heure actuelle, plusieurs types d'ARNs non codants ont été identifiés: les microARNs, le ARNi exogène, le ARNi endogène, les piARNs, les long ARNs non codants et les ARNs circulaires (Sabin

et al., 2013). Ces différents types d'ARNs ont des caractéristiques et des mécanismes d'action différents, mais possèdent tous un rôle commun; celui de réguler l'expression génique. Les travaux présentés dans cette thèse, portent sur l'étude d'une de ces voies de régulation génique; les microARNs. Il est important de noter que l'introduction se concentrera sur la voie des microARNs chez les animaux. Bien que conservés chez la plante et d'autres organismes, la biogénèse et le mode d'action des microARNs sont fort différents chez ces organismes (Rogers and Chen, 2013).

## 1. Biogénèse des microARNs

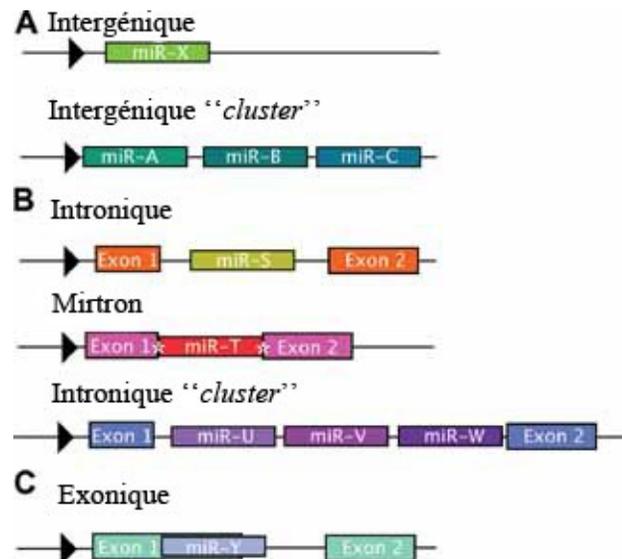
Les microARNs se retrouvent sous trois formes : deux formes précurseurs et la forme mature. La première forme précurseur, le transcrit primaire (pri-miARN) est produit par la transcription de la région génomique codante pour le microARN et sera clivé dans le noyau pour former la forme précurseur (pre-miARN). La forme pre-miARN est ensuite exportée dans le cytoplasme où une deuxième ronde de clivage va donner le microARN mature (miR) (Lee et al., 2002). Les microARNs seront ensuite pris en charge par une protéine Argonaute pour former le complexe effecteur de la voie. La première section de l'introduction portera sur la biogénèse des microARNs et leurs modes d'action.

### 1.1 Organisation génomique des microARNs

La plus récente mise à jour de la base de données miRBase a recensé 2588 microARNs chez l'humain et 434 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). Il est important de souligner que la fonction et l'importance de la majorité de ces microARNs ne sont pas connues. Les microARNs peuvent être codés dans la même unité de transcription qu'un ARNm ou encore être situés dans les régions intergéniques. Une étude parue en 2004 a révélé que chez les mammifères, environ 40 % des microARNs sont encodés dans les régions introniques codantes pour des protéines et 10 % dans des introns de long ARN non codant. Une certaine fraction des microARNs se retrouve également dans les exons (Rodriguez et al., 2004) (Figure 1). L'organisation génomique des microARNs varie entre les espèces. Par exemple, chez *C. elegans*, seulement 20 % sont localisés dans les introns et dans la même orientation que leurs gènes hôtes. Les analyses

génomiques de microARNs révèlent que les microARNs les plus conservés sont principalement situés dans les régions intergéniques (Berezikov, 2011). Un faible pourcentage de microARNs peuvent être encodés sur les deux brins opposés de l'ADN et sont produits par la transcription bidirectionnelle. Par exemple, le loci du microARN *iab-4* chez *Drosophila melanogaster* peut produire deux microARNs distincts qui ont des cibles et des fonctions différentes au cours du développement (Tyler et al., 2008).

Les microARNs intergéniques sont transcrits sous forme mono ou polycistronique. Les transcrits poly-cistroniques vont produire plusieurs pre-miARNs à partir d'un seul long transcrit primaire. Les microARNs produits à partir de ce type de transcrit forment un cluster. Chez le poisson zèbre, la souris et l'homme, il est estimé qu'entre 35 % et 50 % des microARNs se retrouvent dans des "clusters" (Olena and Patton, 2010). Environ la moitié des "clusters" identifiés codent pour des microARNs de la même famille, c'est-à-dire que ces microARNs possèdent la même séquence de reconnaissance à l'ARNm. Pour les autres clusters, l'analyse de réseau d'interaction protéique a révélée que les microARNs exprimés à partir d'un même cluster peuvent réguler des protéines appartenant à un même réseau d'interaction (Yuan et al., 2009). L'organisation des microARNs en cluster permet donc à la cellule d'exprimer des microARNs ayant des fonctions communes à partir d'un seul transcrit de départ.



## Figure 1 : Organisation génomique des microARNs

**A:** La majorité des microARNs sont localisés dans les régions intergénomiques **B:** Chez les mammifères, environ 40 % des microARNs sont encodés dans les régions introniques codantes pour des protéines et 10 % dans des introns de long ARN non codant. **C:** Une certaine fraction des microARNs se retrouve également dans les exons (Rodriguez et al., 2004). Chez le poisson zèbre, la souris et l'homme, il est estimé qu'entre 35 % et 50 % des microARNs se retrouvent dans des "clusters" (**A-B**) (Grimson et al., 2007; Olena and Patton, 2010). Figure modifiée de : (Olena and Patton, 2010).

Les microARNs possédant la même séquence de reconnaissance à leurs cibles sont regroupés en famille (Bartel, 2009). Le nombre de familles corrèle avec la complexité des organismes. Ainsi alors que seulement 10 % des microARNs de *C. elegans* appartiennent à une famille, ce nombre augmente à 38% chez la souris et 33 % chez l'humain. Une hypothèse pouvant expliquer cette accumulation, stipule que ces microARNs seraient apparus suite à la duplication de gènes au cours de l'évolution (Berezikov, 2011). Un exemple intéressant est celui des microARNs miR-148b et miR-152 qui possèdent la même séquence régulatrice, mais qui sont encodés dans des introns de gènes différents, plus précisément dans deux sous-unités d'un même récepteur membranaire (Olena and Patton, 2010; Rodriguez et al., 2004).

### 1.2 Transcription des microARNs

À l'inverse de la majorité des ARNs non codants tels que les ARNs de transfert et les snoARNs (*Small nucleolar RNAs*) qui sont traduits par l'ARN polymérase III (Pol III), les microARNs sont transcrits par l'ARN Polymérase II (Pol II) (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004a). Cette conclusion a été tirée suite à l'analyse de la structure du transcrite primaire. Des expériences d'affinité pour la protéine liant la coiffe des ARNm, eIF4E ont démontrées que ces transcrits possèdent une coiffe en 5' (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004a). Une expérience similaire consistant à enrichir les ARNs possédant une queue poly-A a permis de conclure que les pri-miARNs possèdent également une queue poly-A (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004a). Les pri-miARNs possèdent, donc les mêmes signatures que les ARNm. De plus, la transcription du transcrite primaire est sensible à l' *$\alpha$ -amanitin* qui inhibe principalement l'activité de Pol II (Bracht et al., 2004; Cai et al., 2004; Lee et al., 2004a).

Plusieurs expériences de précipitation de la chromatine ont également permis de détecter la présence de Pol II sur les régions codantes pour les microARNs (Lee et al., 2004a). Ceci étant dit, une faible proportion de microARNs qui se trouvent près d'éléments de reconnaissance ALU sont transcrits par Pol III (Borchert et al., 2006). Les éléments ALU agissent alors comme promoteur pour stimuler la production de ces microARNs.

Il existe également des microARNs non canoniques qui sont formés à partir des précurseurs d'ARN de transfert ou de snoARNs. Dans ces cas particuliers, leur transcription est également médiée par l'ARN polymérase III (Ha and Kim, 2014). La production de microARNs non canoniques sera discutée plus en détail à la fin de cette section.

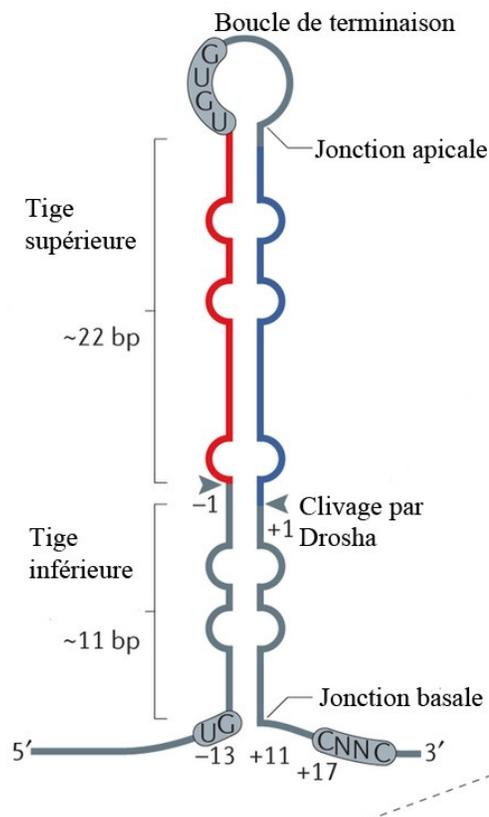
### 1.3 Biogénèse du transcrit primaire

#### *1.3.1 Le transcrit primaire et le complexe microprocesseur*

En général, les pri-miARNs sont des transcrits de plus de 1 kilobase (kb) consistant en une structure en tige-boucle de 33-35 paires de base (pb), ainsi que des extrémités simples brins en 5' et 3'. Le microARN mature se retrouve dans la partie supérieure de la structure en tige-boucle. La jonction entre les régions simples brins et la tige centrale est appelée la jonction basale alors que la jonction entre la tige et la boucle de terminaison est appelée la jonction apicale (Figure 2).

La première étape de maturation consiste à cliver ce transcrit pour former une forme précurseur d'environ 65 nucléotides possédant toujours la forme tige-boucle (Ha and Kim, 2014; Lee et al., 2003). La structure centrale des formes précurseurs possède plusieurs mésappariements entre les deux brins de la tige, qui seront reconnus par différentes protéines pour réguler la maturation des microARNs. Les premières expériences avec des extraits cellulaires ont démontré que la maturation des microARNs se déroulait en deux étapes à la fois nucléaires et cytoplasmiques, mais à ce moment, les enzymes responsables de cette maturation étaient encore inconnues (Lee et al., 2002).

Le premier indice obtenu permettant l'identification de cette enzyme a été révélé par l'analyse des extrémités du pre-miARN, puisque l'extrémité 3' possède deux nucléotides flottants, ce qui est une caractéristique du clivage par une RNase de type III. Les enzymes de la famille des RNases de type III sont des protéines avec une activité endonucléase spécifique à l'ARN double brin. Ces enzymes catalysent le clivage simultané des deux brins d'ARNs (Knight and Bass, 2001; Zamore, 2001). Chez l'humain, il y a trois protéines de type RNase III, une seule de ces protéines est localisée dans le noyau; Drosha. Il fut ensuite démontré que Drosha est l'enzyme responsable de la maturation des pri-miARNs. En absence de Drosha, les transcrits primaires s'accumulent et il n'y a pas de production de microARN mature (Lee et al., 2003).



**Figure 2 : Structure d'un pri-miARN**

Structure secondaire d'un transcrit primaire. Le pri-miARN adopte une structure en tige-boucle avec des extrémités simples brins en 5' et 3'. Le microARN mature (rouge) se retrouve dans la partie supérieure de la structure en tige-boucle. La jonction entre les régions simples brins et la tige centrale est appelée la jonction basale alors que la jonction entre la tige et la boucle de terminaison est appelée la jonction apicale. Certaines séquences situées dans les régions simples brins sont importantes pour la maturation des transcrits primaires (Auyeung et al., 2013). Figure modifiée de : (Ha and Kim, 2014).

Drosha est une protéine de 160 kDa (kilo Dalton) localisée au noyau et possède deux domaines catalytiques de type RNase III (RIIID) ainsi qu'un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD). Les deux domaines RIIID forment un dimère intra moléculaire pour former le domaine catalytique à l'interface des deux sites. Les deux domaines cliveront alors en 3' et 5' respectivement (Blaszczyk et al., 2001; Han et al., 2004; Lee et al., 2003; Zhang et al., 2004). Bien que le domaine dsRBD soit nécessaire à l'activité de Drosha (Han et al., 2004), il n'est pas suffisant pour lier efficacement le transcrit primaire. L'interaction entre Drosha et la protéine DGCR8 ou Pasha (*Partner of Drosha*) chez *C. elegans* et *D.melanogaster* est requise pour stabiliser son interaction avec le pri-miARN (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004). Les protéines Drosha et DGCR8 forment le complexe minimal requis pour la maturation des pri-miARNs. Il est appelé le microprocesseur. DGCR8 est une protéine de 90 kDa possédant deux sites dsRBD qui reconnaissent le transcrit primaire alors que son domaine C-terminale interagit avec le domaine central de Drosha (Han et al., 2004; Yeom et al., 2006). Il est intéressant de noter que la dimérisation de DGCR8, suite à son interaction avec l'hème, est nécessaire pour le clivage des transcrits primaires. Un mutant incapable de lier l'hème est toujours capable de reconnaître les pri-miARNs mais adopte une conformation différente, incompatible avec la maturation du microARN primaire (Faller et al., 2007).

### 1.3.2 Maturation du transcrit primaire

La précision du clivage de Drosha est primordiale puisque ce clivage est la première étape qui dicte la séquence finale des microARNs. Drosha clive spécifiquement à une distance de 11 nucléotides de la jonction basale et à 22 nucléotides de la boucle de terminaison (Han et al., 2006; Zeng et al., 2005). La protéine DGCR8 reconnaît à la fois les régions simples brins et doubles brins aux jonctions apicales et basales. La présence de DGCR8 permet ensuite le recrutement et le positionnement adéquat de Drosha. L'ajout d'un ou deux nucléotides dans les jonctions change la précision du clivage (Han et al., 2006; Ma et al., 2013). Malgré le fait que la boucle de terminaison n'est pas requise pour l'activité de Drosha, sa présence est tout de même nécessaire pour assurer un clivage efficace et précis du pri-miARN (Zeng and Cullen, 2005). La structure secondaire qu'adopte le transcrit primaire permet au complexe microprocesseur de se positionner correctement (Figure 2).

Des analyses biochimiques ont démontré qu'un pri-miARN est lié par deux dimères de la protéine DGCR8 à chaque extrémité de la tige-boucle. Le site de liaison à l'hème de DGCR8 interagit physiquement avec le pri-miARN. L'interaction interdimère de DGCR8 permet de mesurer précisément le transcrit primaire et de dicter la précision du clivage (Quick-Cleveland et al., 2014).

La structure secondaire des transcrits primaire n'est pas le seul facteur influençant l'efficacité et la précision du microprocesseur. Lorsqu'un pri-miARN provenant de *C. elegans* est exprimé dans des cellules humaines, il n'y a pas de production de microARN mature alors que sa structure secondaire est similaire à celle des pri-miARNs humains (Auyeung et al., 2013). La comparaison entre les séquences des pri-miARNs du nématode et de l'humain, a révélé la présence de séquences consensus importantes pour la maturation des pri-miARNs situées dans les régions simples brins du pri-miARNs (Figure 2). Les séquences, Uracile/Guanine (UG) et CNNC, sont situées dans la région basale et une troisième séquence, UGUG, dans la boucle de terminaison. On retrouve au moins l'un de ces motifs dans 79 % des transcrits primaires chez l'humain. Certaines protéines comme le facteur d'épissage SRSF3 reconnaissent spécifiquement le motif CNNC pour améliorer l'efficacité du microprocesseur. De façon intéressante, l'expression d'un pri-miARN de *C. elegans* dans lequel ces séquences ont été insérées, permet de rétablir la production de microARN matures dans les cellules humaines (Auyeung et al., 2013).

Comme certains microARNs sont situés dans les introns de gènes codants pour des protéines, les processus de transcription, d'épissage et de clivage du pri-miARN sont étroitement liés. Les premières études ont démontré que le clivage et l'épissage étaient indépendants l'un et l'autre, mais que l'épissage d'un intron codant pour un microARN est plus lent (Kim and Kim, 2007). Une autre étude a par la suite démontré que les pre-miARNs sont générés de façon co-transcriptionnelle. Le clivage par Drosha survient avant l'épissage, mais n'affecte pas l'accumulation de l'ARNm du gène hôte et pourrait même faciliter l'élimination de l'intron encodant le pri-miARN (Morlando et al., 2008). La protéine Drosha, ainsi que des transcrits primaires sont également retrouvés dans le supraspliceosome. La perte de fonction d'un composant de ce complexe; la spliceostatin A affecte la biogénèse des microARNs introniques (Agranat-Tamir et al., 2014; Gromak et al., 2013). Il est également intéressant de noter que Drosha est également impliquée dans l'épissage de certains introns d'ARNm qui ne contiennent pas de microARNs (Gromak et al., 2013; Havens et al., 2014).

## 1.4 Export du pre-miARN

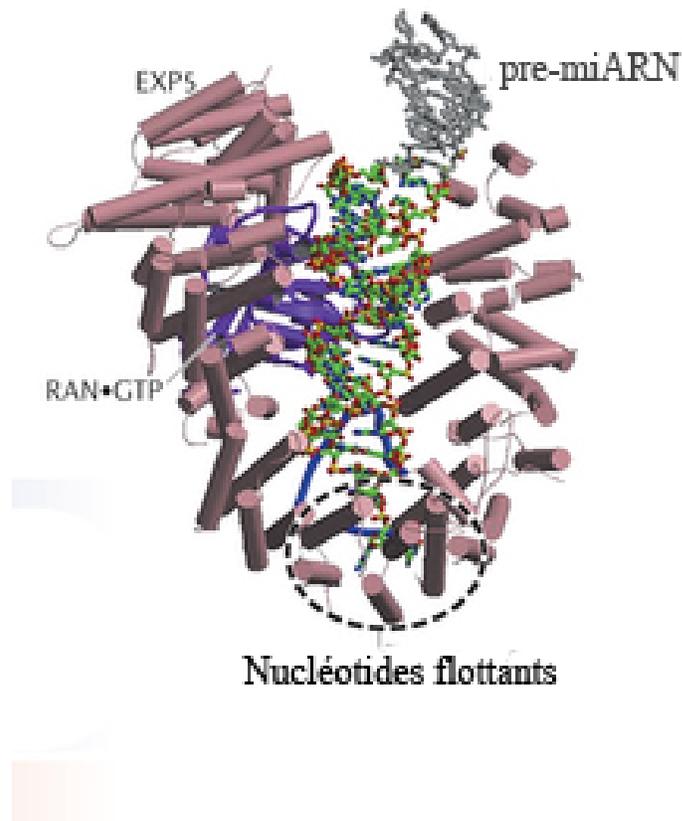
Après le clivage par le microprocesseur, le pre-miARN doit être exporté vers le cytoplasme pour subir la deuxième étape de maturation. Le noyau étant séparé du cytoplasme par l'enveloppe nucléaire, les molécules devant être transportées d'un compartiment à l'autre doivent passer par le transport nucléoplasmique. Selon la taille des molécules à transporter; il existe deux modèles pour le transport à travers l'enveloppe: le transport passif et le transport facilité. Dans le premier cas, les petites molécules de 20-40 kDa peuvent traverser l'enveloppe par diffusion passive. Les plus grosses molécules sont généralement liées par une protéine qui facilitera leur passage à travers les pores nucléaires, ce qui est souvent accompagné d'une dépense énergétique (Bohnsack et al., 2004).

La majorité du transport vers le cytoplasme est médié par la famille des Importin  $\beta$ . Les protéines de cette famille possèdent un site de liaison au RanGTP et peuvent circuler entre le cytoplasme et le noyau, en utilisant le GTP comme gradient pour contrôler leurs interactions avec le cargo. Dans le noyau, le niveau de GTP est plus élevé, permettant l'interaction entre le cargo et l'Importin. La forme RanGTP/Cargo/Importin est alors transloquée au cytoplasme où le GTP sera hydrolysé, permettant le relâchement du cargo et du RanGDP. L'Importin sera alors réintroduit dans le noyau, afin de permettre un nouveau cycle de transport (Bohnsack et al., 2004).

Les premiers indices suggérant que les pre-miARNs nécessitaient un transport facilité par les Importins, furent démontrées par l'injection de RanGAP dans le noyau. La présence de RanGAP aura pour effet de dépleter le RanGTP et ainsi bloquer le transport par les Importins. L'ajout de RanGAP dans le noyau bloque le transport des pre-miARNs vers le cytoplasme, démontrant ainsi l'implication de la famille Importin. Chez les vertébrés et *D. melanogaster*, la protéine responsable du transport des microARNs est l'Exportin5 (Exp5), encodée par le gène *xpo5*. En absence d'Exp5, les pre-miARNs sont bloqués dans le noyau et seront dégradés. Ces expériences ont également démontré que le transport des précurseurs est très rapide (Bohnsack et al., 2004; Elsebet Lund, 2004; Yi, 2003).

L'analyse cristallographique du complexe Exp5/RanGTP/pre-miARN, a démontré que le pre-miARN est positionné dans une structure en forme de mitaine, formée par Exp5 et RanGTP. L'Exp5 forme une structure en forme de tunnel qui interagit fortement avec les deux nucléotides flottants en 3' du

précurseur. L'extrémité 5' est également liée par le tunnel. Ainsi les extrémités sont protégées contre l'activité d'enzyme exonucléase (Okada et al., 2009) (Figure 3). En plus de son rôle dans le transport du précurseur, Exp5 est donc importante pour sa stabilité en le protégeant contre la dégradation, ce qui explique la dégradation rapide des pre-miARNs en son absence.



**Figure 3 : Structure du complexe Exportine5-microARN**

Structure de l'Exportin5 avec un pre-miARN. Exp5 forme une mitaine autour du pre-miARN et les extrémités 5' et 3' sont protégées par une structure en forme de tunnel (Okada et al., 2009).  
Figure modifiée de : (Ha and Kim, 2014).

Chez *C. elegans*, le gène codant pour Exp5 n'est pas conservé, le transport est alors médié par un autre membre de la famille exportin : XPO-1 (Bussing et al., 2010)). À l'instar d'Exp5, la perte de XPO-1 induit une diminution des microARNs matures et bloque les formes précurseurs dans le noyau. Chez *C. elegans*, les protéines liant la coiffe PHAX et CBC, qui sont importantes pour l'export

des ARNm, pourraient collaborer avec XPO-1 pour favoriser le transport des pre-miARNs (Bussing et al., 2010).

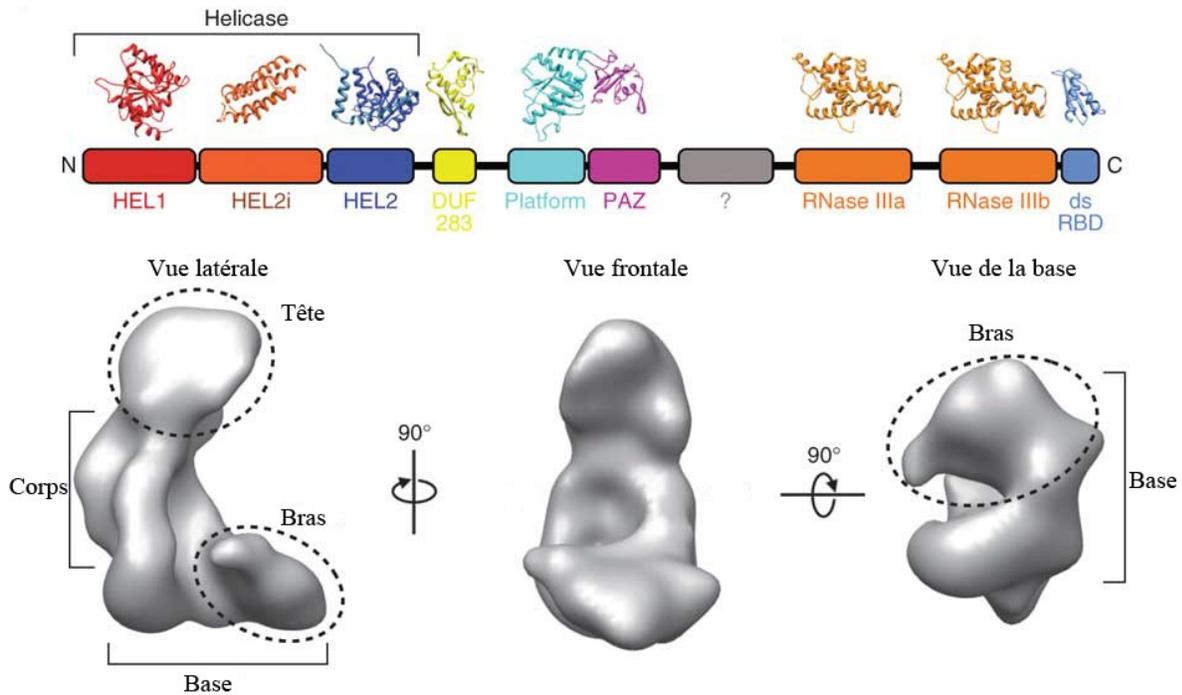
### 1.5 Maturation du pre-miARN par Dicer

Après l'export des précurseurs de microARNs dans le cytoplasme, ils seront pris en charge par la protéine Dicer qui est responsable de la deuxième étape de clivage. La protéine Dicer joue un rôle majeur dans la biogenèse des courts ARNs non codants chez les eucaryotes. Alors que chez *C. elegans* et les mammifères, il n'existe qu'une seule copie de Dicer, certaines espèces telles que *D. melanogaster* possèdent deux gènes codants pour Dicer. Ces deux protéines ont des fonctions différentes ; Dcr-1 est responsable de la production des microARNs alors que Dcr-2 est requise pour la production des siARNs (Lee et al., 2004b).

Avant d'être caractérisée dans la voie des microARNs, Dicer avait préalablement été identifiée comme l'enzyme responsable de générer les molécules d'ARN de 22 nucléotides à partir d'un long ARN double brin dans la voie de l'ARN interférence (ARNi) (Bernstein et al., 2001). Étant donné que les molécules d'ARN produites dans la voie du ARNi sont similaires aux microARNs, plusieurs groupes ont ensuite confirmé l'implication de Dicer dans la production des microARNs (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001).

Tout comme Drosha, Dicer est une RNase de type III, mais principalement cytoplasmique d'environ 200 kDa. Cette protéine est formée en N-terminale d'un domaine hélicase de type DExH/D, suivi d'un domaine DUF283, dont le rôle exact est pour l'instant inconnu. Dicer possède deux domaines RIIID, un domaine PAZ (*Piwi-Ago-Zwille*), un domaine ATPase et un domaine dsRBD en C-terminale (Figure 4). Tout comme Drosha, les deux domaines RIIID de Dicer forment un dimère intra molécule pour former le centre catalytique (Zhang et al., 2004). Le domaine PAZ est responsable de la liaison des extrémités du pre-miARN (Macrae et al., 2007; Zhang et al., 2004). Le domaine hélicase adopte une conformation similaire à l'hélicase de type RIG-1 et reconnaît la boucle de terminaison des précurseurs pour favoriser le recrutement spécifique des pre-miARNs (Tsutsumi et al., 2011). Le domaine hélicase permet de lier les régions simples brins présentent dans la boucle de terminaison et cette liaison est importante pour que Dicer adopte une conformation optimale pour la production de microARNs de taille adéquate (Tsutsumi et al., 2011). Des analyses cristallographiques ont révélé

que Dicer adopte une forme de L, avec le domaine PAZ formant la "tête" et les domaines catalytiques RIIID et le domaine hélicase formant respectivement le corps et la base de la structure tridimensionnelle de Dicer (Lau et al., 2012; Taylor et al., 2013) (Figure 4). La région entre le domaine PAZ et les domaines RIIID est fortement chargée positivement, ce qui facilite son interaction avec l'ARN et forme la règle moléculaire pour déterminer la longueur du court ARN produit (Wang et al., 2009). Une structure secondaire, en forme de boucle dans le premier domaine catalytique, est également importante pour déterminer la longueur des ARNs générés. Cette boucle permet de positionner correctement le domaine catalytique au site de clivage (Macrae et al., 2007; Taylor et al., 2013) (Figure 4).



**Figure 4 : Structure de Dicer**

Dicer est formé, en N-terminale, d'un domaine hélicase de type DExH/D (Rouge/Orange/Mauve), suivi d'un domaine DUF283 (Jaune). Dicer possède deux domaines RIIID (Orange), un domaine PAZ (*PIWI-AGO-ZWILLE*), (Rose) un domaine ATPase et un domaine dsRBD (Bleu). En C-terminale, Dicer adopte une forme de L, le domaine PAZ formant la "tête", les domaines catalytiques RIIID formant le corps et finalement le domaine hélicase formant la base (Lau et al., 2012). Figure modifiée de : (Lau et al., 2012).

La spécificité de Dicer, pour les molécules de pre-miARNs, provient de la présence des deux nucléotides flottants en 3' du précurseur et de sa boucle de terminaison. Le domaine PAZ possède deux poches d'interaction pour les extrémités 3' et 5' et son arrangement tridimensionnel fait en sorte que les deux sites peuvent être occupés en même temps, lorsque l'ARN possède deux nucléotides flottants en 3'. La liaison simultanée du phosphate en 5' du pre-miARN et des deux nucléotides flottants en 3', représente la structure optimale de Dicer (Park et al., 2011; Tian et al., 2014) (Figure 5).

La taille des produits générés par Dicer varie entre 21-25 nucléotides, selon l'espèce. Le clivage par la protéine Dicer doit être finement régulé, pour générer une seule espèce de microARNs. La production d'intermédiaires fera en sorte de générer des microARNs de séquences aléatoires, ce qui pourrait engendrer une régulation aberrante. La cellule a donc développé plusieurs règles moléculaires, permettant à Dicer de cliver au bon endroit. La règle générale qui dicte le site de clivage, est la distance avec l'extrémité 3'. Dicer mesure la distance à partir de l'extrémité 3' jusqu'à la région simple brin de la boucle terminale (Macrae et al., 2007; Tsutsumi et al., 2011). Chez les mammifères et la Drosophile, il existe également une règle de mesure à partir de l'extrémité 5'. Cette règle est utilisée pour certains pre-miARNs, dont l'extrémité 5' est thermodynamiquement instable. Le phosphate en position 5' est alors essentiel pour mesurer la distance avec le site de clivage (Park et al., 2011). Finalement, le tiers des pre-miARNs humains utilisent également une boucle formée par un mésappariement dans la tige du précurseur, pour mesurer efficacement le clivage. Dans ces transcrits, Dicer clive à une distance de deux nucléotides de ce mésappariement (Gu et al., 2012). La liaison des pre-miARNs sur Dicer entraîne un changement de conformation de la protéine. Dicer adopte alors une conformation plus ouverte, qui augmente l'activité de clivage (Taylor et al., 2013). De façon générale, Dicer clive à la base de la boucle de terminaison des pre-miARNs (Figure 5).

Après le clivage par Dicer, les microARNs sont alors pris en charge, par une protéine Argonaute pour former le complexe effecteur, appelé miRISC pour *miRNA-Induced Silencing Complex*. Tout comme Drosha, Dicer interagit avec des protéines possédant des domaines de liaison aux molécules d'ARNs doubles brins. L'interaction entre Dicer et ces protéines, par son domaine hélicase, permet de réguler l'efficacité et la précision du clivage de Dicer (Fukunaga et al., 2012; Kok et al., 2007; Wang et al., 2009). Le rôle joué par ces protéines sera discuté plus en détail dans la section 2 de l'introduction.

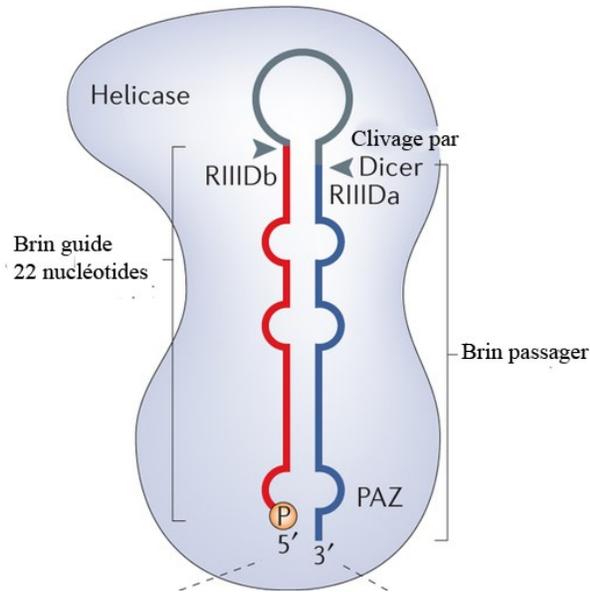


Figure 5 : Schématisation de l'interaction entre Dicer et le pre-miARN

Le domaine hélicase de Dicer reconnaît la boucle de terminaison des pre-miARNs (Tsutsumi et al., 2011). Le domaine PAZ lie les deux extrémités du précurseur (Macrae et al., 2006; Park et al., 2011; Tian et al., 2014). Dicer clive à la base de la boucle de terminaison (Zhang et al., 2004). Les sites catalytiques sont positionnés par la mesure de la distance avec les extrémités 3' et 5' (Berezikov et al., 2011; Macrae et al., 2007; Tsutsumi et al., 2011). Figure modifiée de : (Ha and Kim, 2014).

### 1.5 Formation du miRISC

Après le clivage par la protéine Dicer, les microARNs sont transférés à une protéine Argonaute qui va former le complexe effecteur de la voie des microARNs. Ce complexe est responsable de la reconnaissance et de la régulation des cibles des microARNs.

La formation du miRISC peut être divisé en deux étapes. Tout d'abord, le pre-miRISC est formé et consiste à la prise en charge du microARN double brin produit par Dicer. Par la suite, la séparation des deux brins va permettre la formation du miRISC comprenant le microARN mature (Kawamata and Tomari, 2010). Chez certains organismes, les protéines Argonautes responsables de la voie des microARNs et du ARNi sont différentes. Le choix de l'Argonaute est basé sur la présence de mésappariements centraux dans les duplexes de microARNs (Jannot et al., 2008; Steiner et al., 2007). Chez l'humain, toutes les protéines du groupe Ago peuvent prendre en charge les deux types de duplexes (Hutvagner and Simard, 2008). Les mécanismes responsables de la prise en charge des produits de Dicer et de la séparation des deux brins sont différents entre les voies des microARNs et de la voie du ARNi. Seuls les mécanismes pour les microARNs seront présentés dans cette introduction.

### 1.5.2 Prise en charge du microARN

Dans la voie des microARNs, le complexe pre-miRISC minimal est formé des protéines Dicer, Argonaute et les chaperonnes moléculaires Hsc70/Hsp90. Lorsque reconstitué *in vitro*, ce complexe est suffisant pour prendre en charge un duplexe d'ARN et produire un complexe RISC actif (Gregory et al., 2005; Macrae et al., 2008; Miyoshi et al., 2010). Le complexe contenant Dicer est considéré comme le complexe majoritaire pour la prise en charge des microARNs et est dénommé miRLC (*microRNA Risc Loading Complex*). La dynamique de l'assemblage de ce complexe *in vivo* demeure inconnue. Il est avancé que le duplexe de microARN serait transféré directement de Dicer à la protéine Argonaute au sein du miRLC (Kim and Kim, 2012; Maniataki and Mourelatos, 2005). Une étude récente a également démontré que certains pre-miARNs peuvent être directement pris en charge par les protéines Argonautes (Liu et al., 2012). La présence d'un uracile en 5' ainsi que des mésappariements dans le "seed" favorise la formation du miPDC (*microRNA Precursor Deposit Complex*). La signification biologique de ce complexe n'est pas connue, mais sa formation pourrait favoriser la biogenèse de ces microARNs (Liu et al., 2012). Récemment, l'existence d'un système de contrôle des pre-miARNs a été découvert (Liu et al., 2014). Ce système dépend de la prise en charge des pre-miARNs par le miPDC, des TUT4/7 de même que l'exosome lorsque les pre-miARNs doivent être dégradé. Ainsi, les pre-miARNs présentant certains défauts, tels que la perte du phosphate en 5', ou encore un nombre erroné de nucléotides à l'extrémité 3', sont pris en charge par ce système de surveillance, pour être soit réparés ou dégradés par l'exosome. Ce système permet de conserver uniquement les substrats adéquats de Dicer et une production optimale des microARNs (Liu et al., 2014).

La prise en charge des microARNs est dépendante de la présence d'ATP et des chaperonnes Hsc70/Hsp90 (Iwasaki et al., 2010; Miyoshi et al., 2010; Yoda et al., 2009). Le groupe du Dr. Tomari a émis l'hypothèse que la machinerie des chaperonnes stimule l'ouverture des protéines Argonautes de part l'hydrolyse d'ATP, pour faciliter la prise en charge des microARNs (Iwasaki et al., 2010). La présence de HSP90 est également importante pour l'interaction entre Ago2 et Dicer chez les mammifères (Tahbaz et al., 2004). Finalement, le transport vésiculaire et l'autophagie sont importants pour la formation du miRISC. L'élimination des complexes Dicer/Ago2 inactifs par l'autophagie, permet d'optimiser la formation de miRISC actifs (Gibbins et al., 2012). L'inhibition de l'autophagie diminue la prise en charge des microARNs par Ago2 et diminue le niveau des

microARNs. L'inhibition de la formation des vésicules par la déplétion de ESCRT réduit l'efficacité des microARNs et affecte la formation du miRISC (Faehnle et al., 2014; Gibbings et al., 2009; Lee et al., 2009). Finalement, la dégradation des protéines Dicer et Ago2 inactives par l'autophagie est nécessaire pour assurer une prise en charge efficace des microARNs (Gibbings et al., 2012).

### 1.5.2 Séparation des deux brins

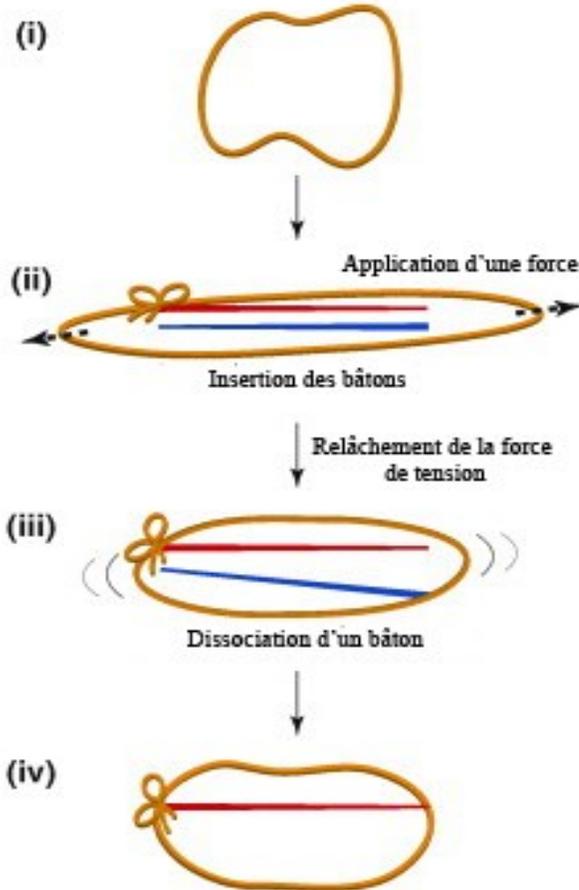
Après la prise en charge du duplexe de microARNs, la deuxième étape de formation du miRISC est la séparation et la sélection de l'un des brins du duplexe. Le duplexe pris en charge par la protéine Argonaute est composé d'un brin passager et du brin guide. Le brin passager fait référence au brin qui sera dégradé après séparation des deux brins produits par Dicer. Alors que le brin guide sera le microARN mature (Kawamata and Tomari, 2010). La sélection du brin guide n'est pas aléatoire, la règle de sélection est appelée la règle d'asymétrie. La sélection est basée sur la stabilité thermodynamique des bases 1 à 4 de chaque extrémité du duplexe. Le brin avec une extrémité 5' moins stable sera conservé et servira de brin guide (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Contrairement à l'étape de prise en charge, la séparation des brins est indépendante de la présence d'ATP ou de la présence des chaperonnes Hsc70/90 (Iwasaki et al., 2010; Liu et al., 2012; Yoda et al., 2009). Dans la voie de l'ARNi chez *D. melanogaster* et l'humain, les protéines Argonautes clivent le brin passager en position 11, qui sera ensuite dégradé (Kawamata and Tomari, 2010). Bien que l'activité catalytique des protéines Argonautes soit importantes pour la production des microARNs chez *C. elegans* (Bouasker and Simard, 2012) et de certains microARNs chez l'humain (Diederichs and Haber, 2007), pour la majorité des microARNs, le clivage du brin passager n'est pas requis pour la séparation des brins.

Cette information est supportée par le fait que les protéines Argonautes humaines Ago1-3 et 4 sont catalytiquement inactives, mais peuvent toujours former un complexe miRISC actif et compenser pour la perte d'Argo2. De plus, les duplexes de microARNs possèdent généralement des mésappariements en position centrale du duplexe (11-16), qui inhibe le clivage par les Argonautes (Kawamata et al., 2009; Liu et al., 2004; Meister et al., 2004; Yoda et al., 2009). Le mécanisme exact responsable de la séparation des deux brins est inconnu. Par contre il est connu que deux caractéristiques du duplexe sont importantes pour la séparation des brins; des mésappariements

dans la région "seed" et dans la région 3' du duplexe (Kawamata et al., 2009; Matranga et al., 2005; Yoda et al., 2009).

Encore une fois, le groupe du Dr. Tomari a élaboré un modèle de séparation des deux brins basé sur celui d'un élastique et de deux bâtons. Ce modèle suggère qu'une force doit être appliquée à l'élastique afin d'insérer les deux bâtons, l'un de ces bâtons est ensuite attaché à l'élastique. Le relâchement de la tension généré par l'application de la force entraîne la dissociation du bâton qui n'est pas attaché à l'élastique (Kawamata and Tomari, 2010). Ce modèle permet d'expliquer pourquoi l'ATP est important pour permettre la prise en charge du duplexe par l'Argonaute, alors qu'elle n'est pas nécessaire pour l'étape de séparation des brins. De plus, ce modèle permet également d'expliquer pourquoi la présence de mésappariements est importante. Puisqu'il est possible d'imaginer qu'une trop forte interaction entre les deux brins du duplexe interfère avec la dissociation du brin passager (Figure 7).

### Modèle de l'élastique et des deux bâtons



**Figure 6 : Modèle de la formation du miRISC**

Dans cette simplification de la formation du miRISC, l'Argonaute est représenté comme un élastique (i) et le duplexe de microARN avec deux bâtons de couleur rouge et bleu. La prise en charge des deux bâtons nécessite l'application d'une force et une dépense énergétique (ii). Le bâton rouge est attaché à l'élastique et la force est relâchée, causant la dissociation du bâton libre (bleu) (iii). Le complexe final comprend maintenant le bâton rouge fermement associé à l'élastique (Kawamata and Tomari, 2010). Figure modifiée de : (Kawamata and Tomari, 2010).

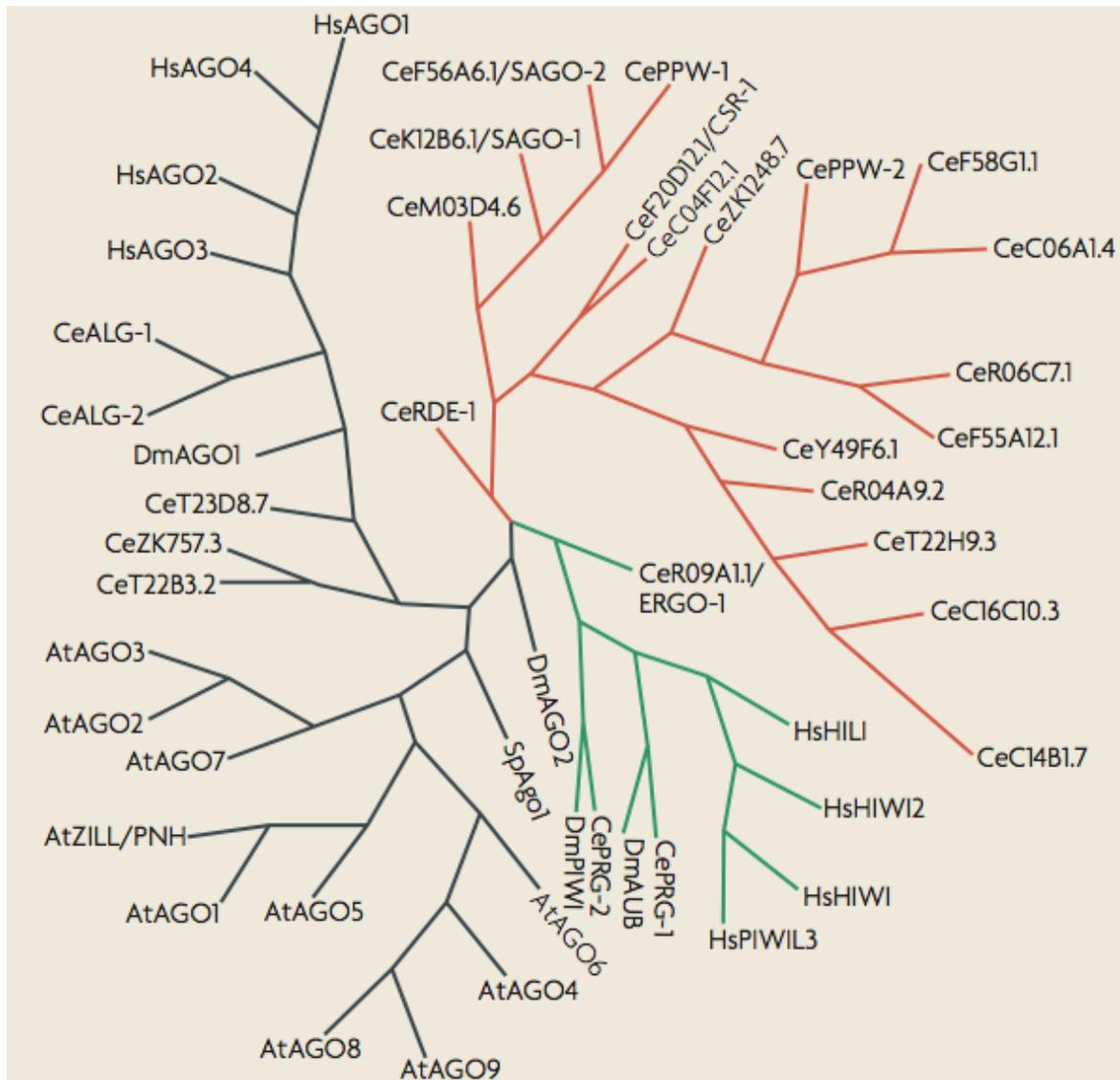
### 1.5.3 Les protéines Argonautes

Les protéines Argonautes forment le complexe effecteur associé à tous les courts ARN non codants (Hutvagner and Simard, 2008). Les Argonautes sont importantes pour toutes les étapes du développement d'un organisme, de la lignée germinale à la différenciation cellulaire (Meister, 2013). La première caractérisation d'une protéine Argonaute a été réalisée chez la plante, suite à l'identification d'un mutant affectant le développement des feuilles. Le gène affecté dans ce mutant fut nommé Ago en raison de la similarité de la forme des feuilles adopté par le mutant *ago-1* et une petite pieuvre nommée Argonaute (Bohmert et al., 1998).

Suite à la première observation de l'ARN interférence vers la fin des années 1990 (Fire et al., 1998), le groupe du Dr. Mello a réalisé un criblage génétique chez *C. elegans* afin de trouver des protéines essentielles pour l'ARNi. Ce criblage a permis de démontrer pour la première fois, l'importance d'une protéine Argonautes pour l'activité des courts ARNs non codants. La protéine RDE-1 (*RNAi-defective 1*) fut ainsi la première protéine identifiée ayant un rôle essentiel pour les mécanismes d'interférence à l'ARN (Tabara et al., 1999). Cette étude a mené ensuite à l'identification des premières protéines Argonautes impliquées dans la voie des microARNs : ALG-1/ALG-2 (*Argonaute like gene*) qui furent étudiées en raison de leurs homologies avec RDE-1 (Grishok et al., 2001). Les protéines Argonautes sont classées dans 3 groupes différents. Le premier groupe est celui des Argonaute-like, qui est appelé ainsi en raison de leur homologie avec la première Argonaute identifiée chez la plante. Les expériences menées chez les autres organismes ont confirmé l'importance de ces protéines dans l'ensemble des voies de régulation par les courts ARNs non codants. Chez l'humain, 4 Argonautes font partie de ce groupe; Ago2 (*Argonaute 2*) est impliquée à la fois dans les voies de l'ARNi et des microARNs alors que Ago1/3/4 sont seulement impliquées avec les microARNs (Hammond et al., 2001; Hutvagner and Simard, 2008; Liu et al., 2004; Meister et al., 2004; Okamura et al., 2004) (Figure 7).

Le deuxième groupe est composé des protéines PIWI (*P-Element induced wimpy testis*) qui sont exprimées dans la lignée germinale et impliquées dans la voie des piARNs. Le dernier groupe comprend les Argonautes spécifiques au nématode *C. elegans*, qui sont impliquées à la fois dans les voies de l'ARNs interférences endogènes et exogènes. Le nombre de protéines Argonautes varie selon les espèces. Chez l'homme on retrouve 8 gènes codants pour des Argonautes (4 Ago-like et 4

Piwi-like), alors que chez certains organismes, ces gènes ont été dupliqués. Par exemple, *C. elegans* possède 26 Argonautes (5 Ago-like, 3 Piwi-like et 18 autres Argonautes spécifiques au nématode) (Hutvagner and Simard, 2008; Meister, 2013) (Figure 7).

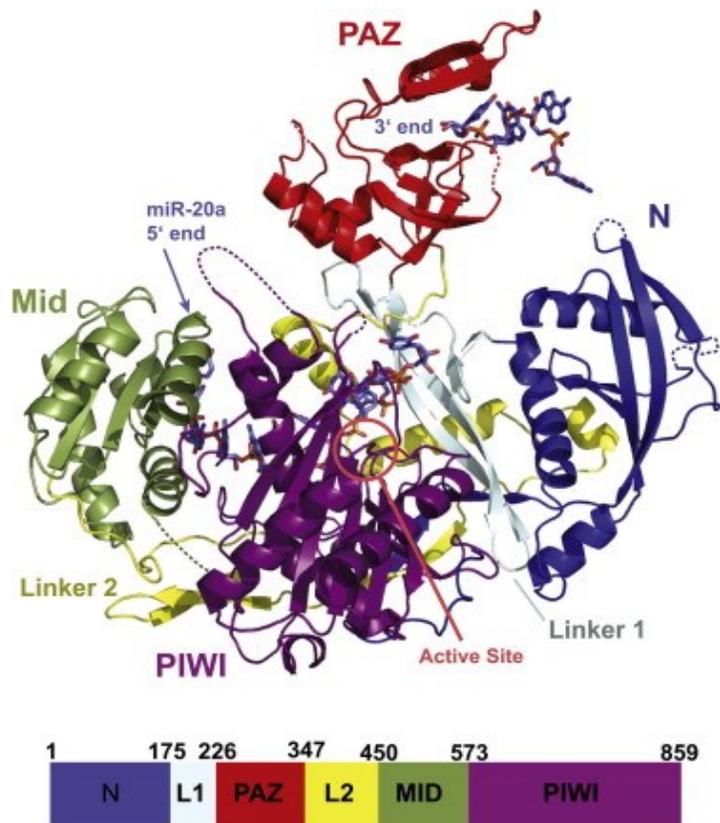


**Figure 7 : Arbre phylogénétique des Argonautes**

Arbre phylogénétique des protéines Argonautes. Les Argonautes en noir forment le premier groupe. Le groupe des PIWI est en vert et finalement le groupe des protéines spécifiques à *C. elegans* sont en rouge. Figure tirée de : (Hutvagner and Simard, 2008).

### *1.5.3.1 Structure des protéines Argonautes*

La structure des protéines Argonautes est très conservée, des procaryotes aux eucaryotes (Elkayam et al., 2012; Nakanishi et al., 2012; Schirle and Macrae, 2012; Yuan et al., 2005). Les Argonautes eucaryotes adoptent une structure formée de deux boucles. La première est formée par le domaine N-terminale et le domaine PAZ alors que la deuxième boucle en C-terminale est formée des domaines MID et PIWI (Meister, 2013). Les premières informations concernant la structure des protéines Argonautes ont été obtenues suite à l'étude de cristaux procaryotes. Plus récemment, l'obtention de cristaux de protéines humaines a confirmé les résultats obtenus chez les procaryotes. La boucle formée par les domaines MID et PIWI forme un canal où le court ARN est enchâssé et s'étend jusqu'au domaine PAZ (Figure 8) (Elkayam et al., 2012a; Nakanishi et al., 2012b; Schirle and Macrae, 2012b; Song et al., 2003; Wang et al., 2008c; Wang et al., 2008d). La structure des protéines Argonautes permet de positionner le court ARN, de façon à rendre accessible la région d'interaction entre le microARN et sa cible. L'interaction entre les protéines Argonautes et les microARNs permet de positionner la séquence seed du microARN pour les rendre disponible à interagir avec le site de reconnaissance de l'ARNm (Schirle et al., 2014). Pour la voie de l'ARN interférence, cette interaction permet de positionner les nucléotides 9-11 aux sites catalytiques de l'Argonaute, pour permettre le clivage de la cible lorsqu'il y a complémentarité parfaite. Dans le cas de la voie des microARNs, la présence de mésappariements entre les microARNs et leurs cibles empêche ce clivage (Elkayam et al., 2012; Nakanishi et al., 2012; Schirle and Macrae, 2012; Song et al., 2003; Wang et al., 2008c; Wang et al., 2008d).



**Figure 8 : Structure d'un Argonaute et de miR-20a**

Structure d'une protéine Argonaute en complexe avec le microARN miR-20a. Les domaines PAZ (Rouge) et N-terminale (Bleu) forment la première boucle de la protéine et le domaine PAZ lie l'extrémité 3' du microARN. Les domaines PIWI (mauve) et MID (Vert) forment la deuxième boucle. L'extrémité 5' du microARN est fermement ancrée dans le domaine MID (Elkayam et al., 2012).

### 1.5.3.2 Domaines des Argonautes

#### 1.5.3.2.1 Domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille)

Tout comme le domaine PAZ de Dicer, ce domaine est responsable de la liaison de l'extrémité 3' des courts ARNs. Le domaine PAZ forme une pochette d'interaction spécifique avec une plus grande affinité pour les molécules d'ARN avec une extrémité 3' flottante, telles que les extrémités générées par les RNase de type III (Dicer) (Lingel et al., 2003; Ma et al., 2004; Song et al., 2003; Yan et al., 2003). Le domaine PAZ adopte une conformation similaire au "OB fold". Ce type de conformation est présent dans une superfamille de protéines, impliquée dans plusieurs étapes de l'expression génique. Ces protéines sont impliquées dans la liaison de séquences simple brin d'ARN ou d'ADN

(Lingel et al., 2003; Song et al., 2003). La spécificité du domaine PAZ pour les molécules avec une extrémité 3'-hydroxyle simple brin lui permet de distinguer les produits de Dicer des produits de dégradation cellulaire (Hutvagner and Simard, 2008).

#### 1.5.3.2.2 *Domaine PIWI*

Le domaine PIWI possède l'activité catalytique des Argonautes et adopte une structure similaire au RNase H (Song et al., 2004). L'activité des Argonautes est conférée par une triade Acide Aspartique/Acide aspartique/Histidine (DDH) et un quatrième résidu serait important pour l'activité catalytique, pour former une tétrade (DEDH) (Liu et al., 2004; Nakanishi et al., 2012; Song et al., 2004; Wang et al., 2008c). Il est intéressant de noter que bien que quatre Argonautes soient exprimés chez l'humain, seul Ago2 est catalytiquement active. Ago1 et 4 ne possèdent pas la triade DDH alors que Ago3 possède cette triade, mais d'autres séquences dans la protéine la rend inactive (Hauptmann et al., 2013; Huntzinger and Izaurralde, 2011). La protéine Ago2 peut, donc agir dans la voie de l'interférence à l'ARN et des microARN, alors que les autres Argonautes, Ago1-3-4, sont spécifique à la voie des microARNs. Ces Argonautes sont également capables de bloquer la traduction et d'induire la dégradation des ARNm par les microARNs (Dueck et al., 2012; Ren et al., 2014; Wang et al., 2012).

Chez les animaux, l'activité de clivage n'est pas requise pour la régulation de la traduction. Par contre, cette activité est importante pour la biogenèse des microARNs. Chez *C. elegans*, l'expression de protéines Argonautes inactivent ne permet pas de rétablir totalement la perte de fonction des protéines ALG-1/2 (Bouasker and Simard, 2012). Ces animaux présentent d'importants problèmes de développement associés à une perte de fonction des microARNs. Dans ces animaux, le niveau de microARNs matures produits est fortement diminué et une forme intermédiaire plus courte qu'un pre-miARN est générée. Cette étude suggère que l'activité catalytique des Argonautes est impliquée dans la production de la forme mature chez *C. elegans* (Bouasker and Simard, 2012). Chez l'humain, certains précurseurs de microARNs sont également clivés par Ago2 dans le brin 3', pour générer une forme précurseur plus courte annotée ac-pre-miARN (Diederichs and Haber, 2007). Ce clivage n'affecte pas l'activité de Dicer, mais pourrait faciliter l'élimination de ce brin, lors de la formation du miRISC (Diederichs and Haber, 2007). Chez la souris, lorsque l'allèle sauvage d'Ago2 est remplacé

par une forme inactive, les souris meurent peu après la naissance, en raison d'une profonde anémie causée par la perte de la forme mature du microARN miR-451. La production de ce microARN est dépendante d'Ago2 et non de Dicer, il est intéressant de noter que cette particularité est également observé chez Zebrafish (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010). Malgré son importance pour la biogenèse de certains microARNs, l'activité catalytique d'Ago2 n'est pas nécessaire au développement des cellules lymphoïdes, ni pour l'érythropoïèse (O'Carroll et al., 2007).

Le domaine PIWI est également le domaine d'interaction avec les protéines GW182 (*répétitions de motifs glycine (G)- tryptophane (W)*), qui sont essentielles pour l'activité des microARNs et dont l'implication sera discutée plus loin (Behm-Ansmant et al., 2006). La résolution du crystal d'Ago2 a permis d'identifier deux sites de liaison au tryptophane dans le domaine PIWI qui pourraient être responsables de l'interaction avec les protéines GW182 (Schirle and Macrae, 2012).

#### *1.5.3.2.3 Domaine MID (Middle)*

Le domaine MID contient la poche d'interaction avec l'extrémité 5' des ARNs et interagit fortement avec le résidu phosphate en 5' des courts ARNs. Cette liaison entraîne une torsion du premier nucléotide, ce qui l'empêche d'interagir avec la cible (Elkayam et al., 2012). Ce domaine d'interaction se situe à la jonction des domaines MID et PIWI. Contrairement à la liaison entre le domaine PAZ et l'extrémité 3' du microARN, qui est déstabilisée par l'interaction avec la cible, l'interaction entre le domaine MID et l'extrémité 5' est très stable, le microARN étant fortement ancré dans la poche d'interaction (Boland et al., 2011; Boland et al., 2010; Ma et al., 2005). En raison de l'organisation des acide aminés formant cette poche d'interaction, les Argonautes ont une préférence pour les ARN débutant par un uracile (U) ou un adénine (A) (Frank et al., 2011).

#### *1.5.3.2.4 Domaine N-terminale.*

À ce jour, le domaine N-terminale est le domaine le moins bien caractérisé des protéines Argonautes. Une étude récente a démontré que la portion N-terminale n'est pas nécessaire pour la prise en charge du microARN, ni pour la liaison à la cible. Ce domaine est plutôt impliqué dans la séparation des deux brins après le clivage par Dicer. Après la prise en charge du court ARN, le

domaine N-terminale pourrait servir de levier pour faciliter la séparation des deux brins (Kwak and Tomari, 2012).

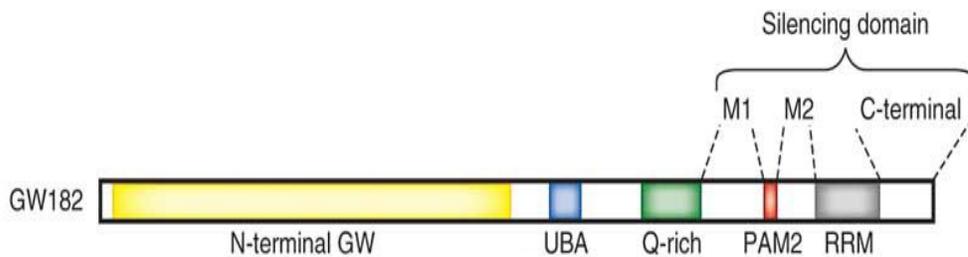
Ce domaine pourrait également être important pour l'activité catalytique des Argonautes. Chez l'humain, la protéine Ago3 est inactive malgré le fait que le domaine DDH soit présent. Une étude récente a démontré que les acides aminés en position 1-64 et 137-160 sont requis pour l'activité des Argonautes (Hauptmann et al., 2013). La production d'une protéine Ago3, recombinante avec les séquences d'Ago2, permet de rétablir l'activité catalytique d'Ago3 et à l'inverse, la protéine Ago2 avec les séquences du N-terminale d'Ago3, devient inactive (Hauptmann et al., 2013; Nakanishi et al., 2013).

#### 1.5.4 La protéine GW182

Les protéines GW182 sont nommées ainsi en raison de la présence d'un grand nombre de répétitions glycine (G) tryptophane (W) dans leurs séquences. Elles sont impliquées dans le miRISC et ce du *C. elegans* à l'homme. Ils forment une plateforme moléculaire pour recruter des facteurs importants pour la régulation traductionnelle. Le génome des mammifères code pour trois paralogues GW182; TNRC6A/B/C. De son côté, *C. elegans* contient deux protéines AIN-1/2. Finalement, les insectes comme *D. melanogaster* possèdent une seule protéine GW182 (dGW182) (Fabian and Sonenberg, 2012).

La perte de AIN-1/2 chez *C. elegans*, entraîne des défauts de développement similaires à la perte de fonction d'ALG-1 (Ding et al., 2005) et dans les autres organismes, la perte de fonction de GW182 abolit l'activité des microARNs (Liu et al., 2005a; Rehwinkel et al., 2005). Les protéines GW182 interagissent directement avec les protéines Argonautes et cette interaction est essentielle pour la voie des microARNs (Eulalio et al., 2008a; Liu et al., 2005a). GW182 est également responsable du recrutement des protéines Argonautes au P-bodies (Ding et al., 2005). Le rôle de plateforme de recrutement de GW182 a été démontré par des expériences où le recrutement artificiel de GW182, dans la région 3' non codante de certains ARNm, induit également la répression traductionnelle de façon Argonaute et microARN indépendante (Behm-Ansmant et al., 2006; Chen et al., 2009; Rehwinkel et al., 2005; Zipprich et al., 2009). Ces premières expériences ont mis en lumière la

capacité de GW182 de stimuler la dégradation des ARNm ainsi ciblés en recrutant les facteurs de déadénylation CCR4:NOT et les protéines décoiffant les ARNm: DCP1/DCP2 (Behm-Ansmant et al., 2006; Chekulaeva et al., 2009). Les différents domaines de GW182 contribuent à l'activité des microARNs (Chekulaeva et al., 2009). La portion N-terminale qui contient des répétitions GW est le domaine d'interaction avec les protéines Argonautes. L'interaction de GW182 et des Argonautes se fait par plusieurs de ces résidus tryptophanes qui interagissent avec le domaine PIWI des protéines Argonautes (Behm-Ansmant et al., 2006; Lazzaretti et al., 2009; Pfaff et al., 2013; Takimoto et al., 2009; Yao et al., 2011) (Figure 9). Alors que, la région C-terminale est suffisante pour inhiber la traduction et contient de nombreux domaines d'interaction pouvant servir de plateforme de recrutement. Cette région a d'ailleurs été rebaptisée le "silencing domain" (Eulalio et al., 2008a; Lazzaretti et al., 2009; Zipprich et al., 2009). Ce domaine comprend entre autres les sites d'interaction avec le complexe CCR4/NOT.



**Figure 9 : Structure de la protéine GW182**

Structure de la protéine GW182. La partie N-terminale (jaune) contient plusieurs répétitions GW et est le site d'interaction avec les protéines Argonautes (Behm-Ansmant et al., 2006; Lazzaretti et al., 2009; Pfaff et al., 2013; Takimoto et al., 2009; Yao et al., 2011). La région C-terminale également appelée *Silencing domain*, contient les domaines responsables de l'interaction et du recrutement des protéines de déadénylation, de dégradation de la coiffe. (Eulalio et al., 2008a; Lazzaretti et al., 2009; Zipprich et al., 2009). Figure modifiée de : (Fabian and Sonenberg, 2012)

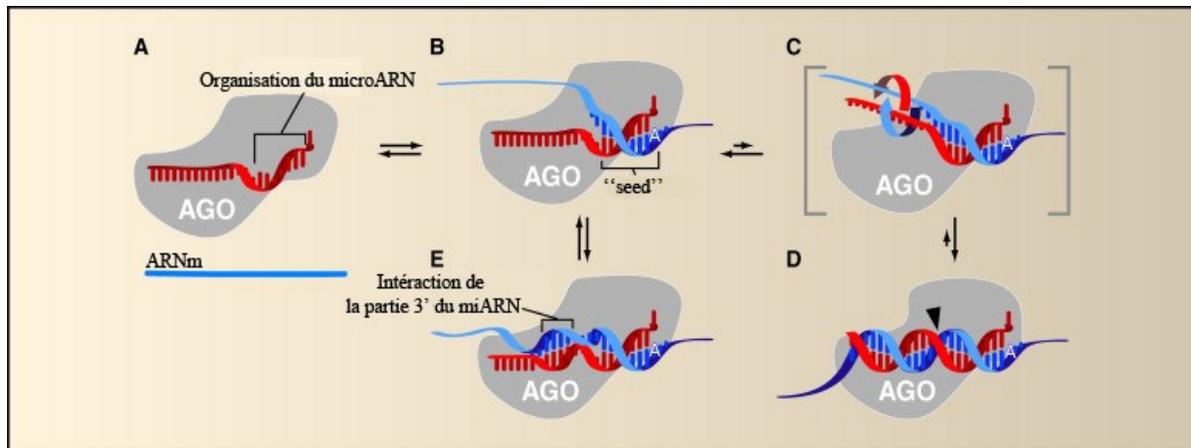
## 1.6 Reconnaissance de la cible

Après la formation du miRISC, le complexe va reconnaître certains ARNm spécifiquement pour réguler leurs traductions. Les différents composants du miRISC ont chacun une fonction essentielle pour cette régulation. Le microARN va permettre d'identifier les ARNm à cibler par complémentarité

de séquences, alors que les protéines Argonautes et GW182 vont servir de plate-forme de recrutement pour divers facteurs responsables de la régulation de la production protéique.

Avant de pouvoir reconnaître les ARNm à cibler, le miRISC doit être recruté aux ARNm. Cette étape a longtemps fait l'objet de nombreuses spéculations au fil des ans, mais une étude menée par mon collègue Guillaume Jannot, a révélé que les protéines Argonautes ALG-1 et Ago2 interagissent avec un composant du ribosome; RACK-1. Cette interaction pourrait permettre le recrutement du miRISC. Alors que la perte de RACK-1 affecte l'association entre le miRISC et les polysomes. En absence de RACK-1, l'activité des microARNs est fortement réduite (Jannot et al., 2011).

Chez les animaux, les sites de liaison aux microARNs se retrouvent principalement dans la région 3' non codante des ARNm. La complémentarité de séquences entre les microARNs et leurs cibles est imparfaite, une partie seulement du microARN interagit avec la cible. La région la plus importante se retrouve en 5' du microARN, plus précisément entre les positions 2 à 7. Cette séquence est appelée le "seed" (Lewis et al., 2003). Les nucléotides 2 à 8 d'un même microARN sont conservées au cours de l'évolution (Lim et al., 2003), mais le reste de la séquence du microARN n'est pas conservée (Lewis et al., 2005). L'introduction d'un mésappariement entre le miR et sa cible dans l'un de ces nucléotides réduit grandement le potentiel régulateur du microARN (Brennecke et al., 2005; Lewis et al., 2003). Les microARNs qui possèdent la même séquence "seed" sont regroupés en familles et ils ont le potentiel de réguler les mêmes ARNm (Bartel, 2009). La prise en charge du microARN par les protéines Argonautes induit un changement de conformation dans la protéine et permet de pré-arranger les nucléotides 2 à 8 en une forme d'hélice alpha. Cela favorise les interactions Watson-Crick avec l'ARNm. Ce réarrangement explique l'importance de cette région pour la reconnaissance de la cible. Lorsque la région 3' du microARN s'apparie également avec l'ARNm, l'extrémité 3' du microARN est relâchée par le domaine PAZ et le reste de la séquence du microARN peut ensuite compléter l'hélice alpha avec l'ARNm (Bartel, 2004, 2009; Ma et al., 2005) (Figure 9).



**Figure 10 : Interaction entre le miRISC et un ARNm cible**

**A** : La prise en charge du microARN (rouge), par les protéines Argonautes, (gris) induit un changement de conformation dans la protéine et permet de pré-arranger les nucléotides 2 à 8 en une forme d'hélice alpha

**B** : Cette conformation favorise l'interaction avec l'ARNm (bleu)

**C-D-E** : Lorsque la région 3' du microARN s'apparie également avec l'ARNm, l'extrémité 3' du microARN est relâchée par le domaine PAZ et le reste de la séquence du miR peut ensuite compléter l'hélice A avec l'ARNm (Bartel, 2009). Figure modifiée de : (Bartel, 2009)

Malgré le fait que l'appariement du "seed" soit suffisant pour réguler un ARNm, ce n'est pas la seule séquence importante pour la régulation par les microARNs. L'interaction entre la région 3' du microARN et sa cible n'est pas nécessaire, mais peut moduler la stabilité de l'interaction (Brennecke et al., 2005; Doench and Sharp, 2004). La force d'interaction dans la région 3' du microARN permet de modifier la régulation d'une cible par deux microARNs d'une même famille. Le microARN possédant une plus forte complémentarité en 3' aura un effet plus prononcé sur l'expression protéique (Brennecke et al., 2005). Une autre signature de l'interaction entre le microARN et sa cible est la présence d'une adénine adjacente au "seed" en position 1, ce qui est logique compte tenu du fait que les protéines Argonautes ont une préférence pour les courts ARN avec un U en 5' (Grimson et al., 2007).

Dans le même ordre d'idée, une forte interaction en 3' peut compenser un appariement imparfait du "seed". Par exemple, le site de reconnaissance du microARN let-7 sur sa cible *lin-41* présente un



**A-B-C** : La majorité des sites de reconnaissance de microARNs repose sur l'interaction des nucléotides 2-8 du microARN. Un A est souvent retrouvé en position 1 du miR (Lewis et al., 2003).

**D-E** : Les sites marginaux correspondent aux sites où seulement 6 nucléotides entre les positions 2-8 interagissent avec la cible (Bartel, 2009).

**F-G** : Les sites de reconnaissance atypiques sont caractérisés par une forte interaction dans la région 3' du microARN. L'interaction du seed n'est pas requise pour ces sites ((Fasanaro et al., 2012; Lal et al., 2009). Figure modifiée de (Bartel, 2009)

Plusieurs autres facteurs que les microARNs peuvent influencer la régulation de la production protéique. L'environnement de la région 3' non codante, la présence de plusieurs sites de microARNs, la compétition ou la collaboration avec des protéines liant les ARNm peuvent influencer la reconnaissance d'une cible.

L'analyse des séquences adjacentes aux sites de liaison des microARNs a révélé un enrichissement pour les nucléotides A et U. Cet enrichissement pourrait influencer la structure secondaire de l'ARNm et rendre le site de reconnaissance plus accessible pour le miRISC (Grimson et al., 2007).

L'hétérogénéité des régions 3' non codantes, entre deux types cellulaires, peut affecter la régulation par les microARNs (Majoros and Ohler, 2007). Une étude récente par le groupe du Dr. Bartel a permis de démontrer que la plupart des associations microARNs-cibles sont inchangées entre différentes lignées cellulaires (Nam et al., 2014). Par contre, la régulation de certaines cibles varie énormément selon le type cellulaire. Ces différences peuvent s'expliquer par l'expression d'ARNm avec différents isoformes de la région 3' non codante. Ces isoformes peuvent affecter le nombre de sites de reconnaissance pour les microARNs et la distance entre un de ces sites et la queue poly-A (Nam et al., 2014). Cette distance joue un rôle majeur dans l'efficacité de la régulation. Une plus grande distance avec la queue poly-A diminue l'activité des microARNs (Nam et al., 2014). De façon générale, les sites situés près des extrémités des régions 3' non codantes (UTR) démontrent une plus grande efficacité (Grimson et al., 2007; Majoros and Ohler, 2007).

La présence de plusieurs sites pour la reconnaissance des microARNs dans un même 3' UTR influence la régulation (Doench and Sharp, 2004). De plus, il a été démontré que la proximité de

différents sites de microARNs entraîne une collaboration entre ces sites, pour augmenter la répression traductionnelle (Wu et al., 2010a). La distance optimale entre deux sites pour favoriser la collaboration est de 8 à 40 nucléotides. Il peut s'agir de sites pour un même microARN comme pour la cible de *let-7*; *lin-41* chez *C. elegans* ou encore pour différents microARNs qui collaborent pour réguler une cible commune comme les microARNs miR-93 et miR-572 qui régulent p21 dans les cellules de mélanomes SK-Mel-147 (Grimson et al., 2007; Lai et al., 2012; Saetrom et al., 2007; Schmitz et al., 2014).

### 1.7 Modulation de l'accessibilité au 3'UTR

Les microARNs ne sont pas les seules molécules régulant l'expression post-transcriptionnelle en liant la région 3' non codante des ARNm. Selon le contexte cellulaire, la voie des microARNs doit collaborer ou compétitionner avec ces protéines pour avoir accès à leurs sites de reconnaissance. Parmi les protéines régulant la traduction en liant les régions non codantes des ARNm, les protéines PUF et HuR peuvent influencer la régulation par les microARNs (Adams et al., 2014; Galgano et al., 2008). Par exemple, chez *C. elegans*, la répression d'une cible de *let-7*; *hbl-1*, nécessite le recrutement de la protéine PUF-9 dans la région 3' non codante (Nolde et al., 2007). Le mécanisme exact de cette collaboration est inconnu, mais la liaison de PUF-9 est requise pour une répression optimale de *hbl-1*. La collaboration du miRISC et des protéines PUF n'est pas limitée au nématode. Chez l'humain, l'activation de PUM1 par les facteurs de croissance stimule son interaction avec la 3' non codante de l'ARNm de p27. Cette interaction induit un changement de conformation de l'ARNm et augmente l'accessibilité des sites pour les microARNs miR-221 et miR-222 (Kedde et al., 2010).

Un autre exemple de protéine liant les ARNm qui interagit avec la voie des microARNs est la protéine HuR. HuR reconnaît les régions AU riches, qui sont souvent enrichies à proximité des sites de reconnaissance des microARNs (Grimson et al., 2007). L'interaction de HuR avec un ARNm peut à la fois stimuler ou inhiber la répression par les microARNs. Dans certains contextes cellulaires, HuR est nécessaire pour la régulation de c-Myc et de RhoB par *let-7* et miR-19, respectivement (Glorian et al., 2011; Kim et al., 2009a), alors que dans les cellules d'hépatocarcinome humain, l'interaction avec certains ARNm empêche la liaison du miRISC à l'ARNm. Par exemple, miR-331 et miR-16 compétitionnent avec HuR pour la régulation de COX-2 (Adams et al., 2014; Epis et al., 2011; Höck et al., 2007; Jing et al., 2005). Finalement, la protéine Dnd1 (*Dead end 1*) est un compétiteur de la

voie des microARNs, car elle reconnaît des régions riches en U et bloque l'accessibilité de certaines cibles de microARNs (Kedde et al., 2007).

## 1.8 Mode de régulation

Comme mentionné préalablement, la séquence du miR dicte l'ARN messenger à réguler, mais les protéines qui forment le RISC sont les molécules effectrices de la voie des microARNs. Le recrutement des protéines Argonautes et de la protéine GW182 directement à un ARNm de façon indépendante des miARNs, est suffisant pour induire la répression traductionnelle de cet ARNm (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2008a; Kiriakidou et al., 2007; Pillai et al., 2004).

Les premières études sur la voie des microARNs ont démontré que les protéines formant le miRISC co-localisent dans des granules cellulaires appelées les P-Bodies (*Processing bodies*) (Liu et al., 2005a; Sen and Blau, 2005). Les P-Bodies sont des foci qui pourraient être impliqués dans la dégradation des ARNm ou permettre de les entreposer avant de les rendre disponibles pour la traduction. Les protéines dégradant les ARNm telles que XRN-1 et les protéines enlevant la coiffe DCP1/DCP2 sont également localisées aux P-Bodies. Les ARNm ciblés par les microARNs sont localisés dans ces granules cytoplasmiques (Pillai et al., 2005). La protéine GW182 avait été associée aux P-bodies avant son implication dans la voie des microARNs. En son absence, leur formation est affectée et la protéine Ago2 n'y est plus recrutée (Eystathiou et al., 2002; Eystathiou et al., 2003; Liu et al., 2005a; Liu et al., 2005b).

Il n'existe pas de consensus concernant la régulation par les microARNs. Selon la cible et le contexte cellulaire, les microARNs peuvent bloquer l'initiation, dégrader le peptide naissant ou encore causer la dégradation de l'ARNm. Ces différents mécanismes seront discutés dans les sections à venir, mais tout d'abord, les protéines recrutées par le miRISC afin de bloquer la production protéique seront présentées.

## 1.9 Protéines recrutées par le miRISC

Le miRISC peut donc être vu comme une plateforme de recrutement pour les facteurs responsables

de bloquer la traduction et de dégrader les ARNm ciblés par les microARNs. Voici donc une brève description de ces facteurs et de leurs rôles dans la voie des microARNs (Figure 12).

### 1.9.1 PABP (*Poly Adenosine Binding Protein*) :

La protéine PABP lie la queue poly-A des ARNm et interagit avec plusieurs protéines pour contrôler la traduction des ARNm et la stabilité des ARNm. Dans le contexte de la traduction, PABP interagit avec eIF4G et la protéine PAIP1, pour favoriser la circularisation de l'ARNm et activer la traduction. À l'inverse, l'interaction avec PAIP2 et le facteur de terminaison de la traduction eRF3 entraîne la dissociation de PABP de la queue poly-A et l'arrêt de la traduction (Fabian and Sonenberg, 2012).

Dans la voie des microARNs, PABP interagit avec le domaine PAM2 dans la région C-terminale de GW182 (Fabian et al., 2009; Huntzinger et al., 2010; Zekri et al., 2009) et cette interaction est conservée au cours de l'évolution, malgré le fait que la protéine homologue de GW182 chez *C. elegans* AIN-1 ne possède pas le domaine PAM2 (Kuzuoglu-Öztürk et al., 2012). L'impact de l'interaction de PABP et de GW182 sur la régulation par les microARNs fait l'objet de plusieurs spéculations. Dans un premier temps, sa liaison avec GW182 pourrait compétitionner avec son interaction avec eIF4G. Étant donné que l'importance de l'interaction entre PABP et eIF4G pour l'initiation de la traduction, cette compétition aura comme effet d'interférer avec l'initiation de la traduction et la circularisation de l'ARNm (Fabian et al., 2009; Zekri et al., 2009). De plus, il est également proposé que l'interaction avec PABP pourrait positionner le miRISC près de la queue poly-A et favoriser la dégradation des ARNm (Fabian and Sonenberg, 2012). Par contre, la perte de PABP dans certains systèmes tels que l'embryon du poisson-zèbre n'affecte pas la régulation par les microARNs (Mishima et al., 2012). De plus, la perte du domaine PAM2 de GW182 n'a pas d'effet marqué sur la régulation par les microARNs à la fois dans un système de cellule de *D. melanogaster* et dans des cellules HeLa (Chekulaeva et al., 2011; Zipprich et al., 2009). De plus, la surexpression de PABP, dans des cellules HEK293T, interfère avec la fonction de la voie des microARNs (Walters et al., 2010). L'une des explications de ces différentes observations, pourrait être que le rôle de PABP soit différent selon le modèle d'étude ainsi que selon le contexte cellulaire (Fabian et al., 2009) (Figure 12).

### 1.9.2 CCR4-NOT et PAN2-PAN3

L'un des effets de la voie des microARNs sur leurs cibles est la déadénylation. Le recrutement des complexes de déadénylation entraîne la dégradation de la queue poly-A des ARNm ciblés par les microARNs. La perte de la queue Poly-A peut déstabiliser ces ARNm et les rendre vulnérables à la dégradation. Cette déadénylation nécessite le recrutement du complexe CCR4-NOT et dans une moindre mesure le complexe PAN2-PAN3 (Behm-Ansmant et al., 2006; Piao et al., 2010). Tout comme l'interaction avec la protéine PABP, le recrutement des déadénylases est conservé au cours de l'évolution (Braun et al., 2011).

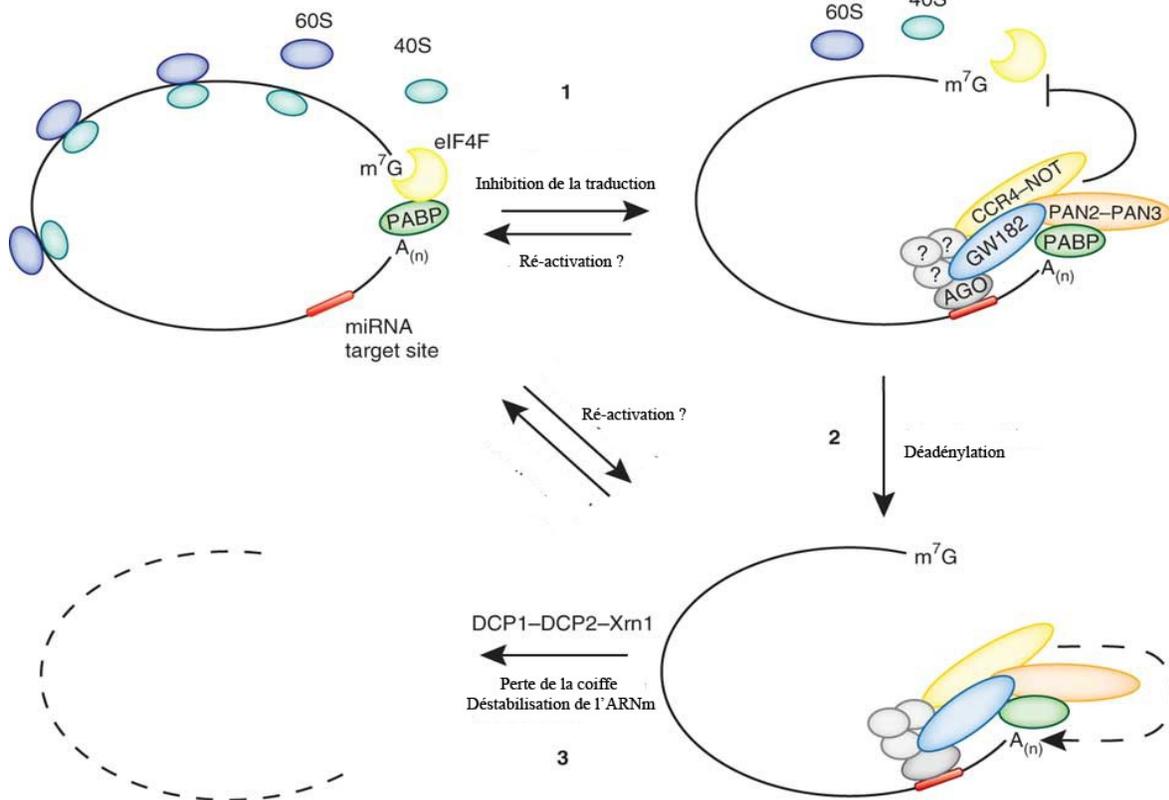
Chez l'homme, GW182 interagit directement avec la sous-unité CNOT1 du complexe CCR4-NOT1 qui va ensuite recruter les autres protéines du complexe dont CCR4 et l'enzyme responsable de la déadénylation, CAF-1. Le complexe PAN2-PAN3 quant à lui, peut interagir directement avec GW182 dans des domaines différents de CNOT1 ou peut également être recruté par l'intermédiaire de PABP (Braun et al., 2012; Fabian et al., 2011). Les résidus tryptophanes dans le "*silencing domain*" seraient responsables de l'interaction avec CCR4-NOT. Le recrutement de ces complexes provoque la déadénylation des cibles de microARNs et induisent une déstabilisation des ARNm. Il a également été suggéré que GW182 n'est pas seulement une plateforme de recrutement pour les complexes de déadénylation, mais pourrait également servir comme un co-activateur (Fabian et al., 2011). "*Le silencing domain*" de GW182 contient des régions qui stimulent l'activité du complexe CCR4-NOT1 (Huntzinger et al., 2012). En plus de la dégradation, le recrutement de CCR4-NOT1 entraîne la dissociation de PABP de l'ARNm ciblé par les microARNs (Zekri et al., 2013). Cette dissociation pourrait entraîner la dé-circularisation des ARNm et ainsi bloquer l'initiation de la traduction (Figure 12).

### 1.9.3 Dégradation de la coiffe des ARNm

Les microARNs peuvent causer une déstabilisation des ARNm, en enlevant la queue poly-A et certaines évidences démontrent que les facteurs impliqués pour enlever de la coiffe des ARNm, sont également recrutés aux ARNm ciblés par les microARNs (Behm-Ansmant et al., 2006). Les travaux de Nishihara et ses collaborateurs, ont démontré que les facteurs d'activation du clivage de la coiffe : DCP1, Me31B (aussi appelé DDX6/RCK/p54) et HPat, sont recrutés par le miRISC de façon

indépendante de la déadénylation. De plus, le clivage de la coiffe peut être réalisé même en présence de la queue poly-A, ce qui est suffisant pour rendre les ARNm vulnérables à l'action des enzymes de dégradation (Eulalio et al., 2007; Nishihara et al., 2013). Il est intéressant de noter que contrairement à la perte de la queue poly-A qui est réversible, la perte de la coiffe est terminale. Les enzymes responsables d'enlever la coiffe des ARNm, DCP1/DCP2, sont également localisées au P-Bodies et participent à la dégradation des ARNm ciblés par les microARNs (Behm-Ansmant et al., 2006) (Figure 12).

La protéine Me31B est nécessaire à l'activité du microARN let-7 dans les cellules HeLa. La déplétion de cette protéine affecte la localisation de Ago2 au P-Bodies et la capacité du miRISC de réguler les ARNm. Me31B est une ATP-dépendante DEAD box hélicase qui est connue pour être un répresseur de la traduction en affectant le complexe d'initiation (Chu and Rana, 2006). C'est également un activateur des protéines enlevant la coiffe, suggérant que Me31B pourrait être impliquée à plus d'un niveau dans la régulation par les microARNs (Chen et al., 2014; Eulalio et al., 2007). Des travaux récents ont démontré que Me31B est recrutée aux ARNm ciblés par les microARNs en interagissant avec CNOT1 et le complexe de déadénylation (Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014; Rouya et al., 2014) (Figure 12).



**Figure 12 : Régulation de la cible**

Cinétique de régulation par les microARNs.

**1 :** L'ARNm en cours de traduction adopte une forme circulaire par l'entremise d'eIF4E et de PABP

**2 :** Le miRISC reconnaît un site de reconnaissance par complémentarité de base entre le microARN et l'ARNm. Les protéines formant le miRISC recrutent des facteurs secondaires permettant de : **1.** bloquer l'initiation de la traduction et /ou **2.** stimuler la déadénylation de l'ARNm

**3 :** Les ARNm déadénylés pourront être dégradés suite à la dégradation de la coiffe

Figure modifiée de : (Fabian and Sonenberg, 2012)

Les différentes protéines présentées jusqu'à maintenant sont donc toutes recrutées à l'ARNm ciblé par un microARN et participent à l'inhibition de la traduction à différents niveaux. Maintenant que l'aspect moléculaire de la régulation par les microARNs a été présenté, la dernière partie de cette section portera sur les différentes conséquences du recrutement d'un microARN sur un ARNm.

## 1.10 Mécanisme de régulation de la cible

### 1.10.1. Inhibition de l'initiation

L'un des mécanismes utilisés par les microARNs pour bloquer la traduction est l'inhibition de l'initiation (Pillai et al., 2005; Wang et al., 2008a). Le recrutement des protéines AIN-1 et AIN-2 aux cibles de let-7 inhibe l'initiation de la traduction chez *C. elegans*, par un mécanisme encore inconnu (Ding and Grosshans, 2009). Dans des cellules HeLa, un ARNm ciblé par let-7 co-sédimente dans les fractions associées aux ribonucléotiques libres. Ces expériences ont également démontré que la coiffe des ARNm est nécessaire à l'inhibition par les microARNs. L'utilisation d'ARNm de certains virus qui ne nécessite pas d'étape d'initiation rend les ARNm insensibles à la présence de sites de reconnaissance de microARNs (Pillai et al., 2005). Différentes études ont ensuite reproduit ces résultats et suggèrent que la machinerie des microARNs interfère avec la formation du complexe d'initiation eIF4E, en partie puisque la surexpression d'eIF4E permet de bloquer l'inhibition de l'initiation (Nissan and Parker, 2008). Une étude récente a étudié l'impact de la régulation, par les microARNs, sur différents rapporteurs possédant des extrémités 5' provenant de différents virus. Selon la coiffe virale utilisée, les facteurs d'initiation de la traduction seront requis de façons variées. Par exemple, le motif du CrPV (*Cricket paralysis virus*) recrute directement la sous-unité 40S, alors que celui du EMCV (*Encephalomyocarditis virus*) nécessite tous les facteurs d'initiation, sauf eIF4E. L'étude de la régulation de ces différents rapporteurs a confirmé que la présence de la coiffe en 5' est nécessaire à la régulation par les microARNs, puisque seul le rapporteur avec la coiffe de EMCV est sensible aux microARNs. Des analyses plus détaillées ont révélé que le facteur d'initiation eIF4A2 est nécessaire, pour bloquer la traduction et que eIF4A2 interagit avec le complexe CCR4-NOT1 (Meijer et al., 2013). La perte de eIF4A2 empêche les microARNs de bloquer l'inhibition de l'initiation et de causer la dégradation de leurs cibles. Il est intéressant de noter que les ARNm possédant des sites de reconnaissance pour les microARNs en 3'UTR ont généralement des régions 5' UTR hautement structurées et que ces structures sont également importantes pour la répression par les microARNs (Gu et al., 2014; Meijer et al., 2013). Les ARNm qui ne présentent pas de structure secondaire en 5' sont insensibles à la régulation par les microARNs (Meijer et al., 2013).

### 1.10.2 Inhibition après l'initiation de la traduction

Les premières études sur les microARNs chez le nématode *C. elegans* suggéraient que le microARN *lin-4* affectait ses cibles *lin-14* et *lin-28* sans affecter leurs niveaux d'ARNm (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002). Dans plusieurs systèmes, les ARNm ciblés par les microARNs se retrouvent dans les mêmes fractions que les polysomes, lorsque sédimentés sur gradient de sucrose

(Maroney et al., 2006). Ces microARNs induiraient donc l'inhibition de la traduction après l'initiation. Dans ces modèles, ces ARNm font l'objet d'une traduction active, mais sans production de peptide final (Maroney et al., 2006). Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène. Dans un premier temps, les microARNs pourraient causer la dégradation rapide du peptide naissant. Par exemple, dans les cellules HeLa, le microARN let-7a régule l'expression de c-Myc, sans affecter le niveau de son ARNm. Un peptide naissant produit par l'ARNm de c-Myc est détectable, mais pas le peptide pleine longueur (Nottrott et al., 2006). Dans un deuxième cas, il a été proposé que les microARNs pourraient causer une dissociation précoce des polysomes, causant l'arrêt de la traduction (Petersen et al., 2006).

### 1.10.3 Dégradation de la cible

Chez *C. elegans*, les premières analyses des cibles de microARNs ont également révélé que pendant le développement, les microARNs let-7 et lin-4 entraînent la dégradation de leurs cibles dans leurs stades larvaires respectifs (Bagga et al., 2005). Pour le microARN lin-4, cette constatation est à l'opposé des études publiées quelques années auparavant. Les auteurs de l'étude publiée en 2005 mentionnent que la quantification des ARNm dans les études antérieures aurait pu être faussés par la présence de produits de dégradation (Bagga et al., 2005).

Dans le cas des embryons de poisson-zèbre, l'expression de miR-430 induit la déadénylation, suivie de la dégradation de ces cibles (Giraldez, 2006). Chez *D. melanogaster*, 60 % des cibles de microARNs sont également augmentées en absence des facteurs de déadénylation, ce qui suggère que la déadénylation et la dégradation des cibles de microARNs sont des étapes importantes pour la répression traductionnelle (Eulalio et al., 2008b). L'inhibition de la traduction et la dégradation des ARNm ciblés ne sont pas nécessairement liées, puisque les microARNs peuvent également dégrader leurs cibles en absence de traduction active (Eulalio et al., 2008b). Dans plusieurs organismes, l'enzyme XRN-1 est responsable de la dégradation des ARNm et la perte des structures protégeant les ARNm, telles que la coiffe et la queue poly-A, rend ceux-ci vulnérables à l'activité d'XRN-1 (Behm-Ansmant et al., 2006; Chen et al., 2009; Rehwinkel et al., 2005). La dégradation des ARNm ciblés par les microARNs est dépendante de la protéine XRN-1 et de l'exosome (Orban and Izaurralde, 2005).

La majorité des données démontrant une dégradation de la cible proviennent d'études réalisées avec des cibles de microARNs spécifiques ainsi des études du transcriptome. Ces études démontrent une diminution de l'abondance générale des ARNm ciblés en corrélation avec l'expression des microARNs (Beilharz et al., 2009; Guo et al., 2010). Les analyses à grande échelle comparant le niveau protéique et d'ARNm ciblé par les microARNs ont démontré que les changements dans l'abondance des protéines corrélaient généralement avec un changement dans la stabilité de l'ARNm (Baek et al., 2008). Dans des cellules en culture, la déplétion de facteurs importants de la voie tels que Dicer, Argonaute ou GW182 provoque l'augmentation des niveaux des cibles de microARNs (Huntzinger and Izaurralde, 2011; Schmitter et al., 2006).

La déadénylation n'est pas uniquement un signal de dégradation. Dans l'embryon de *C.elegans*, les ARNm déadénylés ne sont pas dégradés, mais sont plutôt conservés. La raison de cette conservation est pour le moment inconnue (Wu et al., 2010a).

#### *1.10.4 Mode de régulation contexte spécifique*

Le contexte cellulaire peut également moduler la formation du miRISC et l'activité des microARNs. La culture de cellules S2 de *D. melanogaster* en absence de sérum provoque la formation d'un miRISC qui ne contient pas GW182, mais plutôt la protéine Loqs-PB (*Loquacious*). Ce miRISC ne provoque pas de dégradation des cibles de microARNs, mais entraîne une forte inhibition de la traduction (Wu et al., 2013). De façon intéressante, Ago1 est capable de bloquer la traduction, même en absence de GW182, chez *D. melanogaster*. Les protéines impliqués dans cette inhibition n'ont pour le moment pas été caractérisées (Fukaya and Tomari, 2012).

Au cours de la différenciation musculaire, certains microARNs jouent un rôle sur la régulation de l'expression génique à l'intérieur des mitochondries. La différenciation des myoblastes en myotubes entraîne l'import d'Ago2 et du microARN miR-1 à l'intérieur de la mitochondrie. Une fois à l'intérieur, miR-1 cible des gènes importants pour la production d'énergie : NOD-1 et COX-1. Elle stimule la production protéique sans affecter le niveau d'ARNm. Il est intéressant de noter que GW182 est absent de ce complexe Ago2/miR-1. Le mécanisme par lequel miR-1 augmente la traduction n'est pas connu (Zhang et al., 2014).

Ce mécanisme d'activation de la production protéique par un microARN a également été démontré dans certains contextes cellulaires. Plus précisément, en absence de sérum dans les cellules HEK-293T et HeLa, miR-369-3 forme un complexe avec Ago2 et FXR1 pour stimuler la traduction d'un rapporteur possédant un site de reconnaissance pour ce microARN. Ce phénomène est également observé avec un ARNm endogène tel que la cible de let-7 : HMGA2. Dans ce cas, l'arrêt de la croissance cellulaire provoque la formation d'un complexe Ago2/FXR1/microARN, capable d'activer la production protéique. (Vasudevan et al., 2007). La protéine FXR1 est également impliquée dans l'activation de la traduction par un microARN chez *Xenopus laevis*. Dans les oocytes de *Xenopus laevis*, miR-16 cible l'ARNm de *myt1* avec un complexe formé d'une protéine Argonaute et de FXR1, ce qui active son expression. Cette activation de MYT1 est nécessaire pour maintenir l'état immature des oocytes (Mortensen et al., 2011).

Il est intéressant de noter que tous ces exemples ont un point commun : l'absence de GW182 et la formation d'un RISC spécifique. GW182 pourrait donc être impliquée principalement dans la dégradation de l'ARNm et en absence de GW182, les microARNs peuvent avoir des effets différents.

### 1.11 Conclusion

Le mécanisme d'inhibition de la traduction utilisé par les microARNs a fait l'objet de plusieurs débats au cours des dernières années. Il semble clair que les microARNs utilisent plusieurs mécanismes pour inhiber la production protéique. Il est également évident que la coiffe joue un rôle crucial dans l'activité des microARNs. Un ARNm sans coiffe n'est pas sensible aux microARNs et ces ARNm ne sont pas dégagés, alors que la queue poly-A n'est pas nécessaire à cette activité (Meijer et al., 2013; Nishihara et al., 2013; Pillai et al., 2005). L'action des microARNs pourrait également être graduelle, c'est-à-dire que l'inhibition de la traduction précéderait la dégradation de l'ARNm (Djuranovic et al., 2012). En effet, dans les embryons de Zebrafish, miR-430 régule l'expression de plusieurs ARNm maternels pour induire leurs dégradations six jours après fertilisation. Afin d'observer la cinétique de régulation par miR-430, le groupe du Dr. Giraldez a réalisé des expériences de profilage de ribosome, consistant à quantifier le nombre de ribosomes associés à un ARNm, quatre jours après fertilisation. L'analyse des fragments protégés par les ribosomes a révélé que miR-430 induit l'inhibition de l'initiation avant que des effets sur la stabilité ou la déadénylation de ces cibles ne soit observés (Bazzini et al., 2012). Cet effet n'est pas unique à l'embryon du poisson zèbre; une autre

étude décrit un phénomène similaire cette fois en utilisant les cellules S2 de Drosophile. Dans ce système, l'effet sur la production de la protéine est observé avant de détecter un changement significatif dans la stabilité de l'ARNm (Djuranovic et al., 2012).

L'inhibition de l'initiation et la dégradation de l'ARNm pourraient donc collaborer pour atteindre une répression maximale des cibles de microARNs. Chez *C.elegans*, les microARNs let-7 et lin-4 induisent à la fois l'inhibition de la traduction et la dégradation de leurs cibles (Bagga et al., 2005; Ding and Grosshans, 2009; Fukaya and Tomari, 2012) et chez la Drosophile, le miRISC formé par Ago1 et GW182 peut à la fois induire la dégradation de la cible et inhiber l'initiation de la traduction (Fukaya and Tomari, 2012).

Sans remettre en question la capacité des microARNs à bloquer la traduction, les études du transcriptome à grande échelle ont démontré que les microARNs stimulent principalement la déstabilisation et la dégradation de leurs cibles. La répression traductionnelle par les microARNs n'est pas suffisante pour entraîner un changement important dans la production protéique. Une étude récente du groupe du Dr. Bartel a analysé l'impact des microARNs dans plusieurs contextes biologiques et a confirmé que les microARNs agissent principalement en stimulant la dégradation de leurs cibles. Leurs analyses n'ont pas révélé d'étape d'inhibition de la traduction précédant la déstabilisation des ARNm (Baek et al., 2008; Eichhorn et al., 2014; Guo et al., 2010).

En conclusion, il est probable que ces mécanismes puissent varier selon le contexte cellulaire, le microARN ou encore le type cellulaire utilisé. Par contre les études récentes semblent démontrer que globalement, les microARNs causent la déstabilisation et la dégradation de leurs cibles. Il est également possible, qu'en réponse à certains stress ou sous certaines conditions, nécessitant la répression rapide et temporaire d'une protéine, que le mécanisme d'action soit différent qu'au cours du développement où la répression est permanente.

### 1.12 Production de microARN non canonique

En plus du sentier canonique de biogénèse des microARNs, il existe des voies alternatives qui peuvent être indépendantes de Drosha ou de Dicer. Ces voies alternatives produisent un ARN de 22 nucléotides qui sera pris en charge par le miRISC pour réguler l'expression génique tel un microARN

canonique. Bien que détectables et biologiquement actifs, les microARNs non-canonique ne représentent que 1 % des microARNs chez les vertébrés (Ha and Kim, 2014).

La première voie de production de microARN non canonique identifiée est celle des mitrons qui sont produits par la machinerie d'épissage. Ces microARNs sont produits de façon indépendante de Drosha et sont formés par l'épissage d'un intron qui se replie ensuite en une structure en tige-boucle. La structure adoptée par ces introns est similaire à celle d'un pre-miARN et les mitrons sont ensuite intégrés à la voie canonique des microARNs (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007).

Plusieurs autres miARNs produits de façon indépendante de Drosha ont été identifiés. Certains microARNs sont retrouvés dans les séquences d'autres ARNs non codants tels que les ARNs de transfert (*ARNt*), les petit ARN nucleolar (*snoARN*) ou encore les longs ARNs non codants (*lncRNA*) (Ender et al., 2008; Ha and Kim, 2014; Taft et al., 2009; Yang and Lai, 2011). Il existe également une forme de précurseur directement transcrit sous forme d'une courte séquence en tige-boucle (Xie et al., 2013). Ce transcrit possède une coiffe et est directement pris en charge par la protéine Dicer. Le microARN miR-320 est produit de cette façon. Contrairement à la voie canonique, ces précurseurs sont exportés par XPO-1 à l'aide des protéines liant la coiffe CBC et PHAX et seront ensuite pris en charge par Dicer. Un microARN est produit à partir du brin 3' de ces précurseurs sera ensuite intégré au RISC (Xie et al., 2013).

Finalement, dans les cellules HeLa, certains précurseurs de microARN possèdent un seul nucléotide flottant en 3' après le clivage par Drosha. Avant que ces précurseurs ne soient pris en charge par Dicer, un uracile sera ajouté sur l'extrémité 3'. Ces précurseurs, dont font partie certains membres de la famille let-7. Les enzymes de la famille des terminal uridylyl transferase (TUT), dont TUT4/7/2, sont les enzymes responsables de cette mono-uridylation qui est essentielle pour générer une extrémité 3' avec deux nucléotides flottants et favoriser la prise en charge par Dicer (Heo et al., 2012). Tous ces exemples sont des voies indépendantes de Drosha mais toujours dépendantes de Dicer. Il existe, tout de même un exemple d'un microARN dont la maturation est indépendante de Dicer; chez la souris, la perte de fonction de l'activité catalytique d'Ago2 entraîne la mort des nouveaux nés causée par une sévère une anémie. L'analyse de l'expression des microARNs dans ces souris a révélé qu'un microARN était fortement diminué, le microARN miR-451. La forme pre-

miR-451 est trop courte pour être efficacement clivée par Dicer, ce qui fait en sorte que le clivage du précurseur est réalisé par Ago2 et non Dicer (Cheloufi et al., 2010). Il est intéressant de noter que cette maturation du miR-451 est conservée entre différentes espèces puisqu'il la maturation de *miR-451* chez le poisson zèbre est également Dicer indépendante (Cifuentes et al., 2010).

## **2. Régulation de la biogénèse des microARNs**

Tout comme l'ensemble des gènes dans le génome, les microARNs peuvent être contrôlés de façon transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. La majorité des microARNs étant transcrits par l'ARN polymérase Pol II (Lee et al., 2004a), leur expression est régulées par les mêmes mécanismes que l'expression des gènes codant pour les protéines. Alors que, la régulation post-transcriptionnelle des microARNs permet aux organismes de réguler le niveau des microARNs, selon le contexte cellulaire, en modulant l'activité des protéines importantes pour la maturation des microARNs ou encore en modifiant directement la stabilité du microARN.

### **2.1 Régulation transcriptionnelle**

La régulation de la transcription des microARNs diffère selon le contexte génomique où se trouve la séquence codante pour le microARN.

Les microARNs présents dans les régions intergéniques ont leurs propres régions promotrices, alors que les microARNs introniques sont généralement sous le contrôle du promoteur du gène hôte et leurs expressions corrèlent généralement avec celui-ci. Certaines études ont démontré qu'entre 26 et 35 % des microARNs présents dans les régions codantes pour des protéines peuvent également posséder leurs propres promoteurs. Dans ces cas particuliers, il y a alors une faible corrélation entre l'expression des microARNs et du gène hôte (Corcoran et al., 2009; Oszolak et al., 2008). Les microARNs intergéniques, possédant leurs propres promoteurs, sont sujets à la régulation par les facteurs de transcription. L'architecture de ces promoteurs est similaire à celle retrouvée dans les régions promotrices des régions codantes pour des protéines. Parmi ces éléments, on retrouve les îlots CpG ou les boîtes TATA et la régulation des ces promoteurs est dépendante des modifications de la chromatine (Oszolak et al., 2008; Zhou et al., 2005). Les microARNs sont donc sujets à la même régulation transcriptionnelle qu'un gène codant pour une protéine. Par exemple, certains

promoteurs de microARNs sont méthylés par la protéine DNMT1 et leur expression peut être induite ou inhibée par la perte de DNMT1 (Han et al., 2007).

Les microARNs qui sont espacés par moins de 50kb dans le génome ont une expression fortement corrélée et ils sont transcrits sous forme polycistronique (Baskerville and Bartel, 2005; Han et al., 2007; Ozsolak et al., 2008). Certaines études de phylogénétique des microARNs suggèrent que les microARNs possédant leurs propres promoteurs ont une plus grande conservation entre espèces. De même, certains microARNs situés loin du site d'initiation de leurs gènes hôtes, pourraient avoir évolué pour adopter leur propre région promotrice située plus près (Berezikov, 2011; Monteys et al., 2010; Ozsolak et al., 2008).

Les motifs de liaison pour les facteurs de transcriptions, retrouvés dans la région promotrices de plusieurs microARNs permettent de réguler spécifiquement leur expression. Par exemples, plusieurs facteurs de transcription dérégulé dans les cellules cancéreuses utilisent ces régions pour inhiber la transcription des microARNs. Ainsi, les éléments E-Box présents dans le promoteur de plusieurs microARNs sont reconnus par le facteur de transcription MITF dans les mélanomes (Ozsolak et al., 2008). De même, une diminution généralisée des microARNs causée par l'oncogène c-Myc est une signature de plusieurs lignées cancéreuses (Chang et al., 2008). Les microARNs peuvent également être activés par des facteurs de transcription en réponse aux changements cellulaires. Par exemple, une fois activée, la protéine p53 induit la transcription de miR-34 et de la famille miR-107 et ces microARNs participent alors à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'activation des voies apoptotiques (He et al., 2007a). Finalement, lors de la différenciation des cellules musculaires, le facteur de transcription MYOD1 stimule l'expression du microARN miR-1 dans les myoblastes différenciés (Chen et al., 2006). L'expression de miR-1 participe à la différenciation des cellules musculaires en régulant HDAC4 qui est un répresseur de la transcription de plusieurs gènes musculaires. Plus récemment, il a également été montré que miR-1 stimule la production d'ATP par les mitochondries dans les cellules différenciées (Chen et al., 2006; Koutsoulidou et al., 2011; Rao et al., 2006; Zhang et al., 2014).

Une étude chez *C. elegans* a permis de démontrer l'importance de la régulation transcriptionnelle des microARNs. Des lignées transgéniques, exprimant la protéine GFP (Green fluorescent protein)

sous le contrôle des régions promotrices de 61 microARNs et de 9 opérons ont été générées (Martinez et al., 2008). Pour la majorité des microARNs testés, les séquences promotrices étaient suffisantes pour conférer une expression tissu spécifique au GFP. L'expression spatio-temporelle du GFP avait une corrélation parfaite dans 65 % des cas alors que 28% présentaient une corrélation partielle, lorsque comparée avec l'expression des microARNs matures. L'absence de corrélation totale peut s'expliquer par la régulation post-transcriptionnelle des microARNs (Martinez et al., 2008). Les promoteurs de plusieurs microARNs tels que *let-7* et *lin-4* sont suffisants pour conférer une expression dynamique associée aux transitions entre les stades larvaires (Perales et al., 2014).

Toujours chez *C. elegans*, la protéine LIN-42 a récemment été identifiée comme un régulateur négatif de l'expression de plusieurs microARNs. Son mécanisme d'action est pour l'instant indéterminé, mais des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont permis de détecter LIN-42 aux régions régulatrices de plusieurs microARNs. Jusqu'à 33 % des microARNs pourraient être contrôlés transcriptionnellement par LIN-42 au stade larvaire L4 et ce chiffre passe à 95% dans les embryons (Perales et al., 2014; Van Wynsberghe et al., 2014).

## 2.2 Régulation post-transcriptionnelle

Bien que la régulation transcriptionnelle soit une étape importante pour le contrôle de l'expression des microARNs, la comparaison du niveau des formes précurseurs et matures de certains microARNs a démontrée que plusieurs microARNs font l'objet d'une régulation post-transcriptionnelle. De plus, les formes matures de certains microARNs issues d'un même transcrit polycistronique peuvent présenter d'importantes différences d'expression (Thomson et al., 2006).

La cellule a développé différents mécanismes afin de moduler la biogenèse des microARNs. D'une part, les protéines importantes pour la maturation des microARNs peuvent être modifiées de façon post-traductionnelle en réponse à différents contextes cellulaires. Il existe également plusieurs exemples de protéines qui peuvent lier les formes précurseurs de certains microARNs et moduler leurs biogénèses de façon spécifique. Malgré le fait que la régulation transcriptionnelle de ces protéines soit importante pour la biogénèse des microARNs, ce sujet ne sera pas traité dans cette thèse.

### 2.2.1 Régulation de Droscha/DGCR8

Les protéines, qui régulent l'activité du microprocesseur, peuvent être divisées en deux groupes. Le premier comprend les protéines qui régulent directement les protéines Droscha et DGCR8 et qui auront un effet global sur la voie des microARNs. Le deuxième groupe est formé des facteurs qui reconnaissent directement certains transcrits primaires et affectent spécifiquement la maturation de ces microARNs. Les mécanismes de régulation du premier groupe seront présentés dans un premier temps (Figure 13).

#### 2.2.1.1 Régulation directe du microprocesseur

Tout d'abord, le complexe Droscha/DGCR8 forme une boucle d'autorégulation. Le microprocesseur reconnaît une structure en tige-boucle dans la région 5' de l'ARNm de DGCR8. Le complexe va cliver cette structure et empêcher la production de DGCR8. De plus, la perte de DGCR8 entraîne la dégradation de Droscha, ce qui indique que l'interaction avec DGCR8 permet de stabiliser Droscha. Ces mécanismes d'autorégulation du microprocesseur permettent de conserver l'homéostasie cellulaire et sont conservés au cours de l'évolution (Han et al., 2009) (Figure 13).

Ces deux protéines sont également sujettes à diverses modifications post-traductionnelles qui influencent leurs activités, leurs localisations ou la stabilité du complexe Droscha/DGCR8. La phosphorylation joue un rôle important pour le contrôle de l'activité de ce complexe. La localisation de Droscha au noyau requiert la phosphorylation des sérines 300 et 302 par GSK3 $\beta$  (Tang et al., 2011; Tang et al., 2010). Alors que, la voie MapKinase, par l'intermédiaire de la protéine ERK phosphoryle DGCR8 sur plusieurs résidus pour le stabiliser, ce qui aura pour effet de stimuler la production de microARNs et la prolifération cellulaire (Herbert et al., 2013). L'acétylation joue également un rôle important dans le contrôle de ces protéines. L'acétylation de Droscha dans sa portion N-terminale bloque la formation de poly-ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Tang et al., 2013). À l'inverse, la désacétylation de certaines lysines de DGCR8 par HDAC1 augmente son affinité pour les transcrits primaires et la production de microARNs (Wada et al., 2012).

Ces protéines font également l'objet d'une régulation tissu spécifique. Par exemple, dans les neurones au repos, la protéine MeCP2 lie DGCR8, empêchant son interaction avec Drosha. L'activation des neurones par le calcium entraîne une déphosphorylation de MeCP2, ce qui relâche DGCR8 et permet de rétablir la production de microARNs. Ce mécanisme est impliqué dans la croissance dendritique qui nécessite l'activité de certains microARNs, dont miR-134 (Cheng et al., 2014; Wada et al., 2012).

### 2.2.1.2 Régulation de l'activité du microprocesseur

En réponse à différents stimuli ou selon le contexte cellulaire, plusieurs protéines interagissent avec les microARNs primaires pour moduler leur biogénèse en modifiant l'activité du microprocesseur. Ces modes de régulation spécifiques à certains microARNs permettent à la cellule d'ajuster rapidement le niveau d'un microARN en particulier (Figure 13).

Parmi ces protéines, les hélicases p68 et p72 sont d'importants modulateurs de l'activité du microprocesseur. Ces hélicases forment un complexe avec Drosha et peuvent entraîner un changement de conformation dans le transcrit primaire, permettant un clivage plus efficace. Il est estimé que la production du tiers des microARNs chez la souris serait dépendante de p68 et p72. Le motif CNNC dans la région basale du pri-miARN est reconnu par p72 (Fukuda et al., 2007; Mori et al., 2014). La régulation de la biogénèse des microARNs par plusieurs voies métaboliques implique aussi ces deux protéines. Par exemple, les voies activées par le TGF- et le BMP augmentent la production de miR-21, un modulateur important de la différenciation des cellules musculaires lisses. Pour ce faire, BMP active les protéines SMAD qui interagissent avec la protéine p68 pour activer spécifiquement la production de certains microARNs (Davis et al., 2008; Davis et al., 2010). La protéine p68 est également impliquée dans la voie de réponse de p53. Lorsque la protéine p53 est activée, suite à l'accumulation des dommages à l'ADN, p68 et p53 forment un complexe qui stimule le clivage du transcrit primaire de plusieurs microARNs dont : miR-16-1, miR-143 et miR-206. Ces microARNs pourraient supporter la fonction de p53 dans l'inhibition de la croissance cellulaire. Il est également intéressant de noter que des formes mutantes de p53 retrouvées dans certaines tumeurs affectent l'interaction de p53 avec le microprocesseur et diminuent la production de ces microARNs

(Suzuki, Yamagata et al. 2009). Finalement, le suppresseur de tumeur BRCA1 est un régulateur positif de l'expression de plusieurs microARNs: miR-16-1, miR-145, miR-34a et let-7. De façon intéressante, ces microARNs sont connus pour être sous exprimés dans plusieurs cancers et certains d'entre eux sont également activés par d'autres gènes suppresseurs de tumeur tel que p53 (Lu et al., 2005; Osaki et al., 2008). BRCA1 stimule l'activité de Drosha en liant directement certains microARNs primaires et peut également interagir avec p68 (Kawai and Amano, 2012). Certains microARNs possèdent également la séquence de reconnaissance de la protéine SMAD. La liaison de SMAD permet de faciliter le recrutement de Drosha sur les microARNs primaires en réponse à l'activation des voies TGF- $\beta$  et BMP (Davis et al., 2008).

Étant donné que les formes pri-miARNs et pre-miARNs possèdent des séquences communes, certaines protéines reconnaissent les deux formes. C'est le cas de la protéine TDP-43 qui interagit directement avec certains transcrits primaires pour faciliter le recrutement du microprocesseur. TDP-43 peut également lier les formes précurseurs de microARNs dans le cytoplasme et stimuler le clivage par l'enzyme Dicer (Kawahara and Mieda-Sato, 2012).

La biogénèse des transcrits primaires a également été associée avec des composants du complexe de liaison à la coiffe des ARNs, plus précisément à la protéine ARS2. ARS2 et certains composants du CBC, dont Cbp20 coopèrent pour stabiliser les transcrits primaires.

L'interaction entre Drosha et ARS2 est nécessaire pour la stabilité et la biogénèse des transcrits primaires et l'importance de cette interaction est conservée de la drosophile à l'humain. ARS-2 est principalement requis pour la production des microARNs dans des cellules en prolifération. La perte d'ARS-2 n'a aucun effet sur la biogénèse dans les cellules quiescente (Gruber et al., 2009; Sabin et al., 2009).

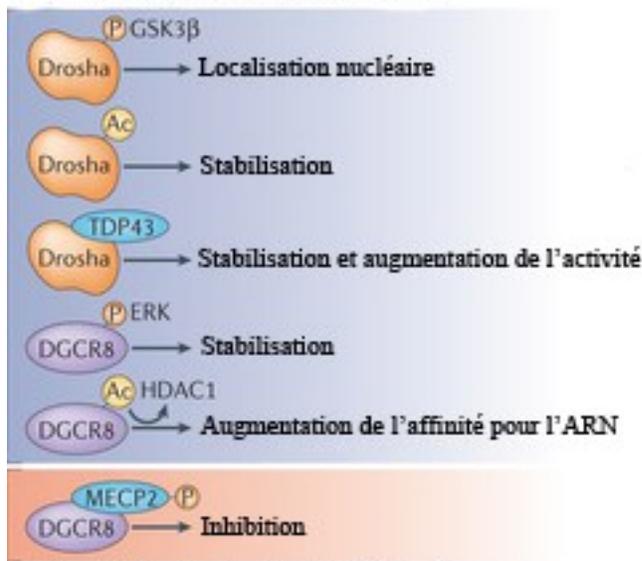
Étant donné que Drosha est associée à des complexes d'épissage et que le clivage du transcrit primaire est associé à la transcription active (Kim and Kim, 2007; Morlando et al., 2008), il n'est pas surprenant que des facteurs d'épissage tel que SF2/ASF régulent l'expression des microARNs. SF2/ASF stimule le clivage de Drosha en liant directement certains microARNs. Les microARNs miR-

7, miR-29b, miR-221 et miR-222 sont spécifiquement reconnus grâce à un motif CGGACAC retrouvé à la base de la tige-boucle. (Wu et al., 2010b).

Les exemples présentés jusqu'à maintenant portaient sur des régulateurs positifs de l'activité du microprocesseur. Plusieurs protéines ont également un effet négatif sur la biogénèse des pri-miARNs. La famille de protéines NF90/NF45 fait parti de ce groupe de régulateurs négatifs, leur surexpression cause une accumulation de microARNs primaires et une diminution des microARNs matures. Le complexe NF90/NF45 s'associe directement à certains transcrits primaires pour bloquer la liaison du microprocesseur. De façon intéressante, ces protéines sont surexprimées dans certains cancers et la perte de NF90 dans une lignée cellulaire rénale (HEK293T) entraîne une augmentation de la forme mature du microARN let-7 et inhibe la croissance cellulaire (Sakamoto et al., 2009). Un autre exemple est celui du récepteur de l'œstrogène  $\alpha$  qui est un régulateur négatif de la production de microARNs lorsqu'il est lié par l'œstradiol. L'effet de l'ER- $\alpha$  est dépendant de la présence de p68/p72 et entraîne une dissociation du microprocesseur et du transcrit primaire (Macias et al., 2009).

Certains microARNs présentent d'importantes différences entre l'expression du transcrit primaire et la production de microARNs matures. La forme mature du microARN miR-7 est exprimée presque exclusivement dans les cellules neuronales et pancréatiques alors que le transcrit primaire est présent dans tous les tissus humains. En comparant deux lignées cellulaires différentes, il a été démontré que les protéines HuR et MS12 coopèrent pour stabiliser la structure du transcrit primaire, ce qui bloque l'activité de la protéine Drosha. Cette activité est impliquée dans la différenciation neuronale, puisque la différenciation de cellule SH-SY5Y (lignée cellulaire isolée à partir de la moelle osseuse) entraîne l'expression de plusieurs marqueurs neuronaux et coïncide avec une diminution de HuR et de MS12 et une augmentation de miR-7 dans ces neurones (Choudhury et al., 2013).

## Régulation de Drosha et DGCR8



## Régulation de l'activité de Drosha

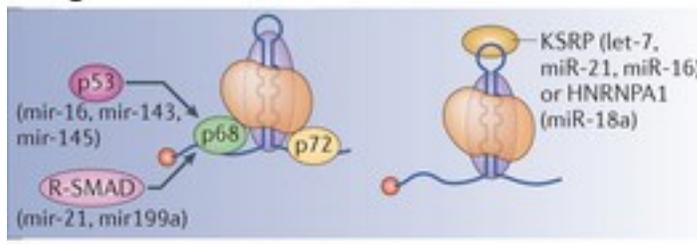


Figure 13 : Facteurs influençant la maturation du pri-miARN

Les facteurs modifiant l'activité du microprocesseur peuvent être classés en deux catégories (Ha and Kim, 2014):

- Les facteurs qui régulent directement les protéines Drosha et DGCR8
- Les facteurs qui régulent l'activité du microprocesseur

Modifié de : (Ha and Kim, 2014)

### 2.2.1.3 Reconnaissance de la boucle du transcrit primaire

La boucle des transcrits primaires possède des séquences spécifiques et peut être reconnue par différentes protéines. Il est estimé que 14 % des transcrits primaires possèdent une séquence hautement conservée dans leurs boucles de terminaison. La conservation de ces séquences suggère qu'elles sont importantes pour le contrôle de la maturation des transcrits primaires, ce qui a été confirmé par l'utilisation d'oligos complémentaires pour bloquer l'accès à la boucle de terminaison dans des cellules en culture, ce qui diminue la production de microARNs. La plupart des

protéines liant ces séquences ne sont pas connues, mais certains exemples ont été décrits dans la littérature (Michlewski et al., 2008).

L'une des premières protéines associées à la reconnaissance d'élément de régulation dans la boucle des transcrits primaires fut la protéine KSRP qui reconnaît de courtes séquences riches en résidu G. La liaison de KSRP permet de faciliter le clivage à la fois des pri-miARNs et des pre-miARNs. Lorsque l'on compare les microARNs affectés par KSRP, on remarque que ces microARNs sont impliqués dans la régulation de la prolifération, l'apoptose ou encore dans l'arrêt du cycle cellulaire. Parmi ces microARNs on peut noter let-7 qui a des fonctions antiproliférative ainsi que miR-16 qui est impliqué dans l'induction de l'apoptose (Cimmino et al., 2005; Trabucchi et al., 2010; Trabucchi et al., 2009).

La protéine hnRNP A1, qui est impliquée dans plusieurs aspects du métabolisme des ARNs (Jean-Philippe et al., 2013), reconnaît spécifiquement la boucle de terminaison du pri-miR-18a. Cette reconnaissance entraîne un changement dans la conformation du transcrit primaire et permet un meilleur clivage par Drosha (Guil and Cáceres, 2007; Michlewski and Cáceres, 2010). L'une des particularités du pri-miR-18a provient du fait qu'il fait partie du cluster miR-17-92, c'est donc dire que le transcrit primaire contient plusieurs séquences de microARNs. hnRNA A1 reconnaît spécifiquement miR-18a sans affecter la maturation des autres microARNs du cluster, la raison exacte de la régulation spécifique de miR-18a demeure pour le moment inconnue.

La fonction de hnRNP A1 est différente selon le microARN étudié. Dans le cas du microARN let-7, hnRNP A1 compétitionne avec la protéine KSRP pour la liaison avec la tige boucle. La liaison de hnRNPA1 change la conformation de la boucle et agit comme régulateur négatif de let-7 (Michlewski and Cáceres, 2010).

Le facteur inhibant la production de microARNs le plus étudié est la protéine LIN-28. Le rôle de LIN-28 dans la régulation des microARNs est conservé du nématode à l'humain. LIN-28 reconnaît une séquence spécifique dans la boucle de terminaison des formes précurseurs du microARN let-7. La liaison de LIN-28 inhibe la production de let-7 à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Dans les cellules souches embryonnaires de souris, l'isoforme LIN-28B interagit avec la forme primaire de let-

7 pour bloquer le clivage par Drosha. Chez *C. elegans*, LIN-28 peut lier le transcrit primaire de let-7 de façon co-transcriptionnelle pour bloquer Drosha (Piskounova et al., 2011; Van Wynsberghe et al., 2011). Le mécanisme d'action de LIN-28 dans le cytoplasme sera décrit dans la section 2.2.6.

#### *2.2.1.4 Autres facteurs influençant la biogénèse du microARN primaire*

En plus des facteurs qui affectent la liaison de Drosha au pri-miARN, certaines protéines peuvent affecter directement la séquence du transcrit, ces protéines sont les enzymes ADAR (*Adenosine deaminases acting on RNA*). Les enzymes ADAR convertissent les adénosine en inosines dans les ARNs double brin. Ces protéines éditent certaines adénines spécifiquement et ces modifications peuvent entraîner d'importantes conséquences pour l'expression protéique, de part l'incorporation d'acides aminés différents puisque l'inosine est reconnue comme une guanosine lors de la traduction. Comme les formes précurseurs des microARNs adoptent des structures doubles-brins, les enzymes ADAR modifient également la séquence de certains microARNs. L'effet de cette édition peut être multiple. Tout d'abord, si l'édition est située dans la région du "seed", elle aura comme conséquence d'interférer avec la liaison du microARN et de sa cible. Dans d'autres cas, l'édition aura un effet direct sur la maturation des pri-miARNs (Luciano et al., 2004). C'est le cas pour le microARN miR-142, dont l'édition de la séquence du pri-miR-142 à certaines positions précises de la tige-boucle inhibe le clivage par Drosha. Les transcrits ainsi édités sont ensuite reconnus et dégradés par la protéine TSN qui dégrade spécifiquement les ARNs double brin contenant des inosines (Yang et al., 2005). Certaines études suggèrent que 16% des transcrits primaires pourraient être édités chez l'humain, mais l'impact de cette édition sur la maturation ou l'activité de ces microARNs reste à déterminer (Kawahara et al., 2008). De façon intéressante, les enzymes ADAR peuvent également inhiber la production de microARNs, indépendamment de leurs activités d'édition. En effet, chez *D. melanogaster*, l'expression d'une forme inactive de l'enzyme bloque l'activité de Drosha (Heale et al., 2009).

Finalement, au-delà de la régulation protéique, la production des microARNs dans le noyau peut également être modulée par d'autres ARNs non codants. Une étude récente a démontré qu'un long ARN non codant bloque l'interaction entre DGCR8 et un transcrit primaire (Liz et al., 2014). Le lncRNA T-UCR Uc283+A forme une interaction directe ARN-ARN avec une région conservée dans le transcrit primaire de miR-295, empêchant la liaison du microprocesseur. Cet ARN est encodé dans

une région ultraconservée qui est associée à certains cancers. L'implication de cette régulation dans les cellules cancéreuses reste encore à déterminer (Liz et al., 2014).

Chez *C. elegans*, la production du microARN let-7 forme une boucle d'autorégulation positive. Un site de liaison pour la forme mature de let-7 est présent dans le transcrit primaire. Au cours du développement, ce site est reconnu par un complexe ALG-1/let-7 pour stimuler l'activité de Drosha (Zisoulis et al., 2012).

### 2.2.2 Régulation de l'export des précurseurs de microARNs

Après le clivage par Drosha, les précurseurs de microARNs nécessitent un transport actif pour être exportés vers le cytoplasme. Cet export est dépendant du niveau et de l'activité de la protéine Exportin5 et des changements dans le niveau de cette protéine affectent la synthèse des microARNs de façon globale.

Le niveau d'expression d'Exportine5 est régulé selon le contexte cellulaire. Dans les cellules en prolifération active, le niveau d'Exportin5 est augmenté, ce qui entraîne une augmentation des microARNs. À l'opposé, la perte d'Exportine5 affecte la progression du cycle cellulaire et entraîne une augmentation de cellules en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Iwasaki et al., 2013). L'expression d'Exportin5 peut également être régulée en réponse aux stress cellulaires. L'activation de la réponse aux dommages à l'ADN module le transport de l'Exportine5 vers le cytoplasme. Après leur activation, les protéines ATM-AKT phosphorylent la protéine du nucléopore, Nup153, entraînant une augmentation de l'interaction entre Exportine5 et le nucléopore. Cette augmentation aura pour effet de stimuler son transport vers le cytoplasme. Puisque les précurseurs de microARNs sont liés à l'Exportin5, l'activation d'ATM entraîne une augmentation de 25 % des microARNs, sans affecter leur transcription. Il est intéressant de noter que plusieurs microARNs affectés tels que miR-16 sont impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN (Wan et al., 2013).

Tel que mentionné au préalable, les cellules cancéreuses présentent généralement une diminution globale des microARNs. Les lignées de tumeur de colon HCT-15 et DLD-1 portent une mutation dans le gène codant pour l'Exportin5, produisant une protéine tronquée. Cette mutation inhibe la formation du complexe pre-miARN/XPO-5/Ran-GTP et bloque l'export vers le cytoplasme. La ré-introduction d'une copie sauvage d'Exportin-5 dans ces cellules permet de rétablir la production de microARNs et

inhibe la prolifération et la division des cellules tumorales, témoignant de l'importance du contrôle de l'export des microARNs (Melo et al., 2010).

### 2.2.3 Régulation de DICER

Alors que chez certaines espèces comme *D. melanogaster*, il y a plusieurs Dicer, chez l'homme il n'y a qu'une seule copie de la protéine Dicer. La régulation de l'activité de Dicer est donc un point majeur pour assurer la bonne production de ces ARNs. Des études *in vitro* ont démontré que la protéine Dicer seule est capable de cliver les pre-miARNs. Par contre, *in vivo* plusieurs protéines interagissent avec Dicer pour augmenter son efficacité et sa précision (Ha and Kim, 2014). Les enzymes de type RNase III interagissent souvent avec des protéines liant l'ARN double brin, au même titre que Drosha et DGCR8.

Chez la Drosophile, l'enzyme Dicer impliquée dans la voie des microARNs, DCR-1 interagit avec la protéine Loqs (*Loquacious*) qui contient trois régions dsRBDs. L'interaction entre DCR-1 et Loqs est requise pour la biogenèse de la plupart des microARNs. Loqs permet de stimuler et stabiliser Dicer. La perte de Loqs entraîne une accumulation de pre-miARNs (Förstemann et al., 2005; Saito et al., 2005). *D. melanogaster* possède plusieurs isoformes des protéines Loqs et certains de ces isoformes affectent spécifiquement certains groupes de microARNs (Fukunaga et al., 2012).

De façon similaire, la protéine Dicer humaine interagit avec une protéine contenant des domaines de liaison à l'ARN double brin TRBP, qui contient également trois domaines dsRBDs. La protéine TRBP est requise pour stabiliser Dicer (Chendrimada et al., 2005) Malgré l'importance de l'interaction entre Dicer et TRBP, les souris "*knock-out*" (K.O.) pour TRBP sont viables, alors que les souris Dicer<sup>-/-</sup> sont embryonniques létales (Chendrimada et al., 2005). Il existe donc chez la souris un facteur redondant permettant à la protéine Dicer d'être fonctionnelle et ce facteur pourrait être la protéine PACT (Chendrimada et al., 2005). PACT est également une protéine à motif dsRBD pouvant former un complexe avec Dicer. Son mécanisme d'action exact n'est pas connu, mais la perte de cette protéine entraîne des défauts dans l'accumulation de la forme mature de certains microARNs (Lee et al., 2006). Il est intéressant de noter que TRBP et PACT n'affectent pas les mêmes microARNs et qu'une comparaison *in vitro* des complexes Dicer/TRBP et PACT/Dicer a démontré des activités différentes pour un même précurseur (Lee et al., 2013). D'autres analyses *in vitro* du complexe Dicer/TRBP ont

démonstré que TRBP influence la cinétique d'activité de Dicer et régule la longueur du microARN mature produit. La liaison de TRBP pourrait entraîner des changements de conformation dans Dicer et faciliter l'interaction avec les pre-miARNs (Taylor et al., 2013). La structure secondaire des précurseurs fait en sorte que l'interaction avec TRBP n'a pas la même influence sur le clivage de tous les précurseurs (Lee and Doudna, 2012). Une étude de *Fukunaga et al* combinant les protéines de *D. melanogaster* et les cellules humaines a confirmé que la liaison de Loqs/TRBP permet d'assurer un clivage de 22 nucléotides pour certains microARNs et qu'en absence des ces protéines, des produits de clivage de 20 ou 21 nucléotides sont détectés. Cette étude *in vivo* confirme que Loqs/TRBP influencent plus fortement certains microARNs selon la structure secondaire de leurs précurseurs. Les mésappariements présent dans la tige des pre-miARNs influencent la nécessité de recruter Loqs/TRBP. En plus de la stabilisation de Dicer, l'interaction entre Dicer et ces protéines est donc essentielle pour assurer la production du bon microARN mature. La production de microARNs plus courts ou de la mauvaise séquences change leurs spécificités et va faire en sorte de diminuer l'efficacité de la voie des microARNs (Fukunaga et al., 2012) (Figure 14).

La protéine RBM-3 est une autre protéine qui stimule l'association entre Dicer et les pre-miARNs. RBM-3 est une chaperonne pour les ARNm et stimule leur traduction et sont expression est augmentée en condition de stress et d'hypoxie. Le mécanisme exact par lequel RBM-3 stimule l'interaction entre Dicer et les pre-miARNs, n'est pas connu. Par contre, l'augmentation du niveau de plusieurs microARNs en conditions hypoxiques est dépendante de RBM-3, ce qui suggère que RBM-3 serait un important régulateur de la voie des microARNs en réponse à certains stress (Pilotte et al., 2011) (Figure 14).

À l'instar de Drosha, l'activité de Dicer peut être régulée par des modifications post-traductionnelles sur ses cofacteurs. L'expression d'une forme phospho-mimique de TRBP est suffisante pour stabiliser Dicer et augmenter la production des microARNs. La phosphorylation de TRBP est une étape importante dans la réponse cellulaire aux signaux mitogènes passant par la voie MAPK/ERK. ERK phosphoryle TRBP pour augmenter la production de plusieurs microARNs dont miR-17, miR-20a et miR-92a, favorisant ainsi la prolifération et la survie cellulaire (Paroo et al., 2009).

Tel que discuté dans les sections précédentes, les cellules cancéreuses portent souvent des mutations affectant les différentes étapes de la biogenèse des microARNs et l'étape du clivage du précurseur n'en fait pas exception. Le gène codant pour TRBP, *tarbp2*, est muté dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Ces mutations causent une diminution de TRBP et entraînent une déstabilisation de Dicer de même qu'une réduction de la production de microARNs matures. L'expression de TRBP ou la surexpression de Dicer dans ces lignées est suffisante pour rétablir la production des microARNs et réduire la croissance des cellules cancéreuses ainsi qu la formation de tumeur (Melo et al., 2009). De façon intéressante, l'enzyme Dicer est également mutée dans plusieurs lignées cancéreuses. Il est intéressant de noter que plusieurs de ces mutations se retrouvent dans un des domaines RIIID, affectant l'activité de Dicer. Cet aspect est traité dans une revue de la littérature publiée récemment (Foulkes et al., 2014).

Comme plusieurs voies métaboliques, la voie des microARNs forme des boucles d'autorégulations négatives. Ainsi, le microARN let-7 et l'enzyme Dicer forment l'une de ces boucles. En comparant l'expression de Dicer et de let-7 dans plusieurs lignées cellulaires, le groupe du Dr. Takahashi a détecté que les niveaux de Dicer et de let-7 sont inversement corrélés. L'analyse de la région 3' non codante (UTR) de Dicer a permis de détecter la présence de sites de liaison pour let-7. La régulation de let-7 affecte alors la production de l'ensemble des microARNs (Forman et al., 2008; Tokumaru et al., 2008) (Figure 14). Cette boucle de régulation est mise en évidence dans la régulation des microARNs par le contact cellule-cellule. À forte densité cellulaire, il y a une accumulation des pre-miARNs et une diminution des microARNs matures. Parmi les voies métaboliques sensibles à l'inhibition de contact, on peut noter les protéines de la famille Hippo. Les protéines effectrices de cette voie, TAZ et YAP, sont régulées par le contact cellule-cellule et la déplétion de ces facteurs a le même effet sur la voie des microARNs qu'une densité cellulaire élevée. L'étude de ces protéines a révélé que la voie Hippo inhibe la traduction de Dicer de part une augmentation du microARN let-7 et pourrait également affecter la régulation de let-7 par Lin-28. La régulation de Dicer par let-7 entraîne donc une diminution généralisée des microARNs matures lorsque les mécanismes d'inhibition de contact sont activés (Chaulk et al., 2014) (Figure 14).

Tel que mentionné préalablement, les cellules cancéreuses entraînent une diminution globale des microARNs, par exemple l'oncogène c-Myc inhibe la transcription de plusieurs microARNs (Chang et

al., 2008). Tandis que dans le cytoplasme, l'enzyme MCPIP1 est activée au cours de la réponse inflammatoire et entraîne la dégradation de l'ARNm de plusieurs cytokines et chemokines spécifiques. Récemment, il a également été démontré que MCPIP1 reconnaît également les précurseurs de microARN et catalyse le clivage de la boucle de ces pre-miARNs. Ce clivage inhibe l'activité de Dicer et entraîne la dégradation des précurseurs. L'induction de MCPIP1 par la réponse inflammatoire entraîne donc une dégradation généralisée des pre-miARNs. De façon intéressante, MCPIP1 est surexprimée dans plusieurs cancers, suggérant que MCPIP1 pourrait jouer un rôle dans la baisse du niveau des microARNs matures observée dans plusieurs cancers (Suzuki et al., 2011) (Figure 14).

#### *2.2.4 Facteurs reconnaissant directement le précurseur*

Tout comme le transcrit primaire, la forme pre-miARN peut également faire l'objet d'une régulation spécifique à certains microARNs.

Certains mécanismes qui affectent l'activité du microprocesseur régulent également Dicer, comme par exemple les enzymes ADAR. L'édition du pre-miR-151 inhibe son clivage par Dicer. Chez la souris, la forme éditée est principalement retrouvée dans le cerveau où la presque totalité des pre-miR-151 est éditée, bloquant ainsi la production de microARN mature (Kawahara et al., 2007). ADAR1 peut également former un complexe avec Dicer pour stimuler son clivage et augmenter la prise en charge des microARNs par le miRISC de façon similaire à TRBP. L'inhibition de ADAR dans des cellules en cultures cause une réduction de 30 à 40 % des microARNs matures alors que la perte de TRBP entraîne une diminution entre 40-60% des microARNs. De plus, dans l'analyse des microARNs dans les embryons de souris *ADAR1<sup>-/-</sup>* a révélé une diminution globale des microARNs matures (Koscianska et al., 2011; Ota et al., 2013). Ces résultats suggèrent que ADAR1 est un composant important du complexe Dicer, au même titre que TRBP.

La méthylation de l'ADN et des histones jouent un rôle crucial dans la régulation transcriptionnelle (Robertson, 2005), mais la méthylation peut également réguler des mécanismes post-transcriptionnels (Motorin and Helm, 2011). L'une des familles de méthyltransferases, dont l'activité était inconnue jusqu'à tout récemment, est celle de BCDIN3D. La caractérisation de cette famille a

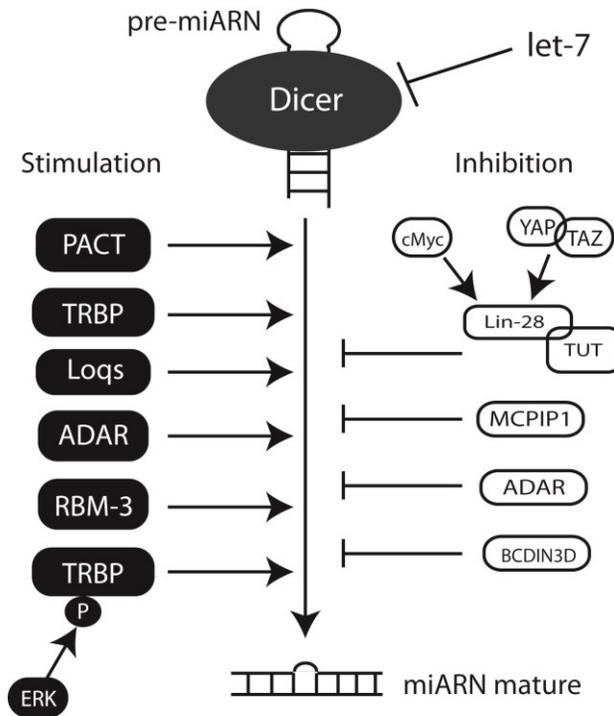
révélé que ces enzymes ont une préférence accrue pour l'ARN au lieu de l'ADN et que l'un des substrats de BCDIN3D est le précurseur de miR-145. BCDIN3D ajoute un groupement méthyle en position 5' du pre-miARN ce qui bloque la prise en charge par Dicer. Le contexte cellulaire exact menant à la méthylation des microARNs n'est pas connu, mais dans le cancer du sein, BCDIN3D est considéré comme un gène signature de l'agressivité des tumeurs. De plus, certains microARNs affectés par BCDIN3D comme miR-145 et miR-23b sont impliqués dans l'inhibition de l'invasion cellulaire. BCDIN3D pourrait donc influencer la capacité métastatique des cellules cancéreuses de part la régulation de certains microARNs (Xhemalce et al., 2012) (Figure 14).

De nombreuses études ont démontré que le microARN let-7 est régulé de façon post-transcriptionnelle au cours du développement chez les animaux. Dans l'embryon de souris, l'expression du pri-let-7 est élevée dès le stade des cellules souches embryonnaires (ES) jusqu'au jour 14.5 après fertilisation, alors que la forme mature n'est détectée qu'à partir du jour 10.5 après fertilisation (Thomson et al., 2006). Dans le même ordre d'idée, chez *C. elegans*, la forme pri-let-7 est détectée dans les stades larvaires L1 et L2 alors que le microARN mature n'est pas détecté avant les stades L3/L4. Ces différences entre la transcription du gène let-7 et l'expression de la forme mature démontrent l'importance de la régulation post-transcriptionnelle de ce microARN. La protéine responsable de cette régulation est LIN-28. En plus de son rôle dans la régulation du transcrit primaire, LIN-28 reconnaît la boucle de terminaison du pre-let-7 et bloque sa biogenèse (Newman et al., 2008; Viswanathan et al., 2008) (Figure 14).

LIN-28 recrute des protéines TUT; TUT4, TUT7 ou PUP-2 (*Poly(U) polymerase*) chez *C. elegans*. Ces enzymes vont ajouter une queue poly-U sur le pre-let-7, bloquant ainsi l'activité de Dicer et induisant sa dégradation (Hagan et al., 2009; Heo et al., 2008; Heo et al., 2009; Lehrbach et al., 2009). L'enzyme exo ribonucléase 3'-5' DISL32 reconnaît cette queue poly-U et dégrade la forme poly-uridylée du pre-let-7 (Ustianenko et al., 2013). D'autres microARNs possèdent également le motif GGAG, reconnu par LIN-28, suggérant que son action sur les microARNs pourrait être plus large que let-7. D'ailleurs, trois autres microARNs, miR-107, miR-143 et miR-200c, sont également la cible de Lin-28 (Heo et al., 2008). Les isoformes LIN-28A et LIN-28B de la souris ne régulent pas la production de *let-7* par les mêmes mécanismes puisque contrairement à LIN-28A, LIN-28B est

principalement nucléaire et son inhibition de *let-7* est indépendante des TUT. Lin-28B bloque plutôt l'activité du microprocesseur sur le transcrit primaire (Piskounova et al., 2011).

La régulation de *let-7* par LIN-28 est également l'un des seuls modes de régulation post-transcriptionnelle d'un microARN ayant un rôle établi *in vivo*. LIN-28 est un facteur important pour le maintien de l'état non-différencié des cellules souches. L'inhibition de la production de *let-7* et la stimulation de la traduction de OCT4 font partie des mécanismes employés par LIN-28 pour maintenir l'état pluripotent de ces cellules. Dans les cellules souches embryonnaires, la biogénèse de *let-7* est bloquée par LIN-28 et leur différenciation entraîne une diminution de LIN-28 et une augmentation de *let-7* (Rybak et al., 2008; Viswanathan et al., 2008). Ce mécanisme de régulation forme également une boucle de régulation négative, puisque des sites de liaison pour *let-7* sont présents dans la région 3' non codante de l'ARNm codant pour LIN-28. L'expression de *let-7* va donc contribuer à la diminution de LIN-28 dans les cellules différenciées (Rybak et al., 2008). La perte de LIN-28, chez *C. elegans*, entraîne d'importants défauts développementaux associés à une dérégulation de la voie des microARNs et une expression précoce du microARN *let-7* (Lehrbach et al., 2009; Moss et al., 1997). Comme plusieurs voies biologiques importantes pour le développement, l'axe LIN-28/*let-7* est modulé dans plusieurs cancers. Le facteur de transcription c-Myc induit l'expression de LIN-28 ce qui inhibe la production de *let-7* et contribue à l'augmentation de la prolifération cellulaire dans les cellules cancéreuses. (Chang et al., 2009). D'autres voies de signalisations importantes telle que celle de NF- $\kappa$ B bloque la maturation de *let-7* en activant également LIN-28 (Viswanathan and Daley, 2010). Ces exemples démontrent l'importance de cette boucle de régulation dans le contrôle du développement, de la croissance et de la prolifération cellulaire.



**Figure 14 : Facteurs influençant la maturation du pre-miARN**

De nombreux facteurs influencent l'activité ou la précision de l'enzyme Dicer. Les protéines de gauche (noir) représentent les régulateurs positifs de l'activité de Dicer. Les protéines de droite (blanche) sont les régulateurs négatifs de Dicer.

### 2.2.5 Régulation du miRISC

Le complexe effecteur de la voie des microARNs, le miRISC, est composé principalement de trois molécules: la protéine Argonaute, la protéine GW182 et un microARN. La section qui suit porte sur la régulation de l'activité ou du niveau d'expression de ces facteurs. La régulation des protéines Argonautes est particulièrement importante puisque qu'elles sont considérées comme le facteur limitant de la voie des microARNs (Lund et al., 2011). La surexpression d'Ago dans les cellules humaines stabilise les microARNs et inversement, la perte d'Argonaute entraîne la perte des microARNs (Diederichs and Haber, 2007; O'Carroll et al., 2007). Il est important de noter également que les protéines Argonautes sont également impliquées dans le clivage de certains précurseurs. En absence d'Ago2 chez l'humain ou d'ALG-1/ALG-2 chez *C. elegans*, l'expression de protéines inactives entraîne l'accumulation de la forme précurseur de certains microARNs et la formation d'un intermédiaire de clivage (Bouasker and Simard, 2012; Diederichs and Haber, 2007).

L'activité du miRISC est régulée par les protéines de la famille TRIM-NHL. Chez la souris TRIM-32 augmente l'efficacité du miRISC de part son interaction avec Ago1 (Schwamborn et al., 2009). Chez *C. elegans*, la protéine NHL-2 (*domain containing*) stimule également l'activité du miRISC. Le mécanisme d'action de ces deux protéines demeure pour le moment inconnu, il est suggéré que NHL-2 pourrait servir de plateforme pour recruter la protéine CGH-1, qui est une protéine impliquée dans la dégradation des ARNm (Hammell et al., 2009). Finalement, chez *D. melanogaster*, la protéine Mei-P26 pourrait bloquer la formation du RISC pour contrôler la prolifération cellulaire (Neumüller et al., 2008).

### 2.2.5.1 Régulation des protéines Argonautes

#### 2.2.5.1.1 Modifications post-traductionnelles des Argonautes

Les protéines Argonautes sont régulées par de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces modifications permettent à la cellule de moduler rapidement l'activité des Argonautes selon le contexte cellulaire.

Différentes études ont démontré que les conditions hypoxiques ont d'importants effets sur la régulation des Argonautes. L'hydroxylation est une des modifications post-traductionnelles importantes dans la réponse hypoxique. Par exemple, l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$  régule sa dégradation (Kaelin, 2005). En ce qui concerne la voie des microARNs, la Prolyl 4-hydroxylation d'Ago2 par l'enzyme C-P4H(I) stabilise Ago2 et augmente sa localisation dans les P bodies. La stabilisation et la délocalisation d'Ago2 stimulent aussi son interaction avec Hsp90 et augmentent l'activité du complexe miRISC. Cette modification contribue à la régulation de la traduction, en condition de faibles concentrations d'oxygène (Qi et al., 2008; Wu et al., 2011) (Figure 15). En revanche, dans d'autres lignées cellulaires, l'hypoxie a un effet négatif sur l'activité des Argonautes. Dans les cellules HeLa, le EGFR phosphoryle Ago2 sur la tyrosine 393. Cette phosphorylation provoque la dissociation d'Ago2 et de Dicer ayant pour conséquence une réduction de la biogénèse des microARNs. La phosphorylation de la Tyr393 est importante pour bloquer l'apoptose et augmenter l'invasion cellulaire en condition hypoxique. Une analyse bioinformatique a révélé qu'une expression plus élevée d'Ago2 phosphorylée sur la Tyr393 corrèle avec un faible pourcentage de

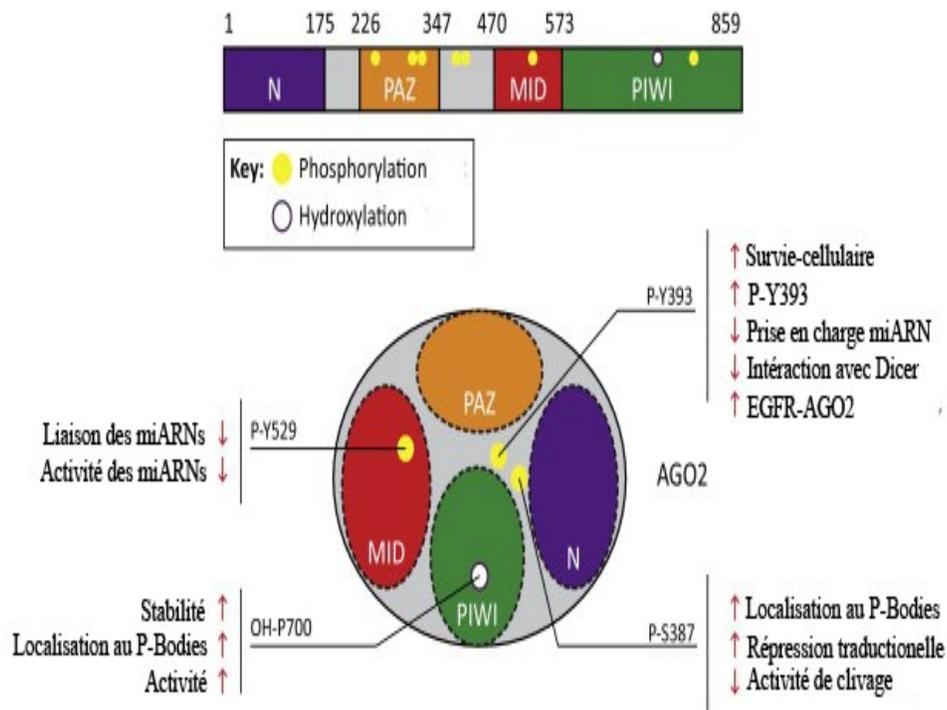
survie chez les patients atteints du cancer du sein (Shen et al., 2013) (Figure 15). Cette phosphorylation est également importante pour l'induction de la sénescence prématurée induite par l'oncogène Ras. L'augmentation des espèces réactives d'oxygène (ROS) suite à l'activation de Ras, cause l'inactivation du gène PTP1B. En condition normale, PTP1B est requis pour déphosphorer le résidu Tyr393 d'Ago2. L'inactivation de PTP1B bloque la prise en charge des microARNs par Ago2 et cause une sur-expression du gène p21 qui est normalement régulé par le cluster de microARN *miR17-92* (Mogilyansky and Rigoutsos, 2013). L'augmentation de p21 participe à l'activation de la sénescence induite par RAS (Yang et al., 2014).

Sous différentes conditions de stress (stress oxydatif, température etc.), les protéines Argonautes humaines sont sujettes à la poly(ADP-ribosylation par une protéine de la famille PARP. L'ajout de PARP inhibe l'activité du miRISC et permet l'expression de protéines de réponse au stress (Leung et al., 2011). La PARylation de l'Argonaute est également impliquée dans la réponse immunitaire suite à une infection virale. Dans ce cas, l'ajout de PARP permet l'expression de gènes stimulés par les interférons (ISG) qui sont normalement régulés par les microARNs. L'expression des ces gènes permet aux cellules de combattre l'infection virale et d'empêcher la production de virus (Jee and Lai, 2014) (Figure 15).

Dans le même ordre d'idée, le stress causé par l'exposition à l'arsenite modifie l'interaction entre Ago2 et les ARNm. L'exposition à l'arsenite augmente l'interaction entre les ARNm et Ago2. Par contre, certains ARNm, qui sont préférentiellement traduits en condition de stress sont plutôt relâchés par Ago2. La stabilisation d'interaction entre les ARNm et les Ago2 n'est pas causée par l'augmentation de certains microARNs et pourraient être contrôlée par des modifications post-traductionnelles (Karginov and Hannon, 2013).

Toujours chez l'humain, les kinases MAPKAPK2 et AKT3 phosphorylent Ago2 sur l'acide aminé Sérine 387 (Ser387) ce qui résulte en une augmentation de sa localisation dans les P-Bodies et de son interaction avec la protéine GW182. Ces effets causent une augmentation de la répression traductionnelle (Horman et al., 2013; Zeng et al., 2008) (Figure 15).

Enfin, la phosphorylation de la Tyrosine 529 (Tyr529) qui se trouve dans la poche d'interaction avec l'extrémité 5' des microARNs, affecte l'interaction entre les microARNs et Ago2. Cette réduction entraîne une diminution de la répression des cibles de microARNs. Bien que la kinase et les conditions cellulaires impliquées dans cette phosphorylation soient inconnues, la diminution de la prise en charge du microARN mature a un fort impact sur l'activité du complexe RISC (Rüdel et al., 2010) (Figure 15).



**Figure 15 : Modifications post-traductionnelles d'Ago2**

Les modifications post-traductionnelles modifient l'activité et la localisation des protéines Argonautes. La phosphorylation des résidus Y529 et Y593 diminue l'activité de la voie des microARNs et la prise en charge des microARNs par l'Argonaute (Rüdel et al., 2010) (Shen et al., 2013). Alors que la phosphorylation du résidu S387 et l'hydroxylation de la P700 augmentent la localisation aux P-Bodies et l'activité des microARNs. (Horman et al., 2013; Zeng et al., 2008) (Qi et al., 2008; Wu et al., 2011). Figure modifiée de : (Jee and Lai, 2014)

## 2.2.5.2 Recyclage des protéines Argonautes

La dégradation des protéines Argonautes est médiée par les voies de dégradation protéiques classiques: le protéasome et l'autophagie. L'activation des cellules T s'accompagne d'importants changements protéiques et induit une diminution globale des microARNs. Cette diminution est causée par l'ubiquitynylation et la dégradation d'Ago2 par le protéasome. (Bronevetsky et al., 2013). Dans les cellules HeLa, l'autophagie est responsable de la dégradation des protéines Dicer et Ago2 inactives; c'est-à-dire qui ne sont pas liées aux microARNs. La protéine recrute Dicer et Ago2 aux autophagosomes. L'autophagie est nécessaire au bon fonctionnement de la voie des microARNs puisque l'inhibition de l'autophagie diminue l'interaction entre les microARNs et Ago2 et affecte la régulation traductionnelle par les microARNs. L'accumulation de complexe Dicer/Ago inactif diminue l'efficacité de la voie des microARNs (Gibbins et al., 2012).

Tel que mentionné au préalable, l'abondance des protéines Argonautes et des microARNs sont étroitement liés. Deux études de Smibert et collaborateur et de Martinez et Gregory ont démontré que l'abondance des microARNs influence également le niveau d'Ago2 chez l'humain et de Ago1 chez la Drosophile. Une diminution des microARNs entraîne une diminution d'Ago2 et alors que ce dernier est rétabli par la réintroduction de microARNs exogènes. La liaison des microARNs permet de stabiliser Ago2 et de la protéger contre la dégradation. Par contre, ces deux études diffèrent concernant le mécanisme responsable de la dégradation d'Ago2. L'étude de Smibert et collaborateur suggère que le système ubiquitine/protéasome est responsable de la dégradation d'Ago1 et d'Ago2 alors que l'étude du groupe de *Martinez et Gregory* démontre que la diminution d'Ago2 est spécifiquement bloquée lorsque l'autophagie est inactive (Martinez and Gregory, 2013) (Smibert et al., 2013). Le mécanisme de dégradation des protéines Argonautes pourrait varier selon les types cellulaires ou encore les signaux responsables de cette dégradation.

#### 2.2.5.2 Régulation de GW182

La famille de protéines GW182 interagit avec les protéines Argonautes et forme une plateforme de recrutement pour des protéines impliquées dans la dégradation des ARNm ou pour bloquer l'initiation de la traduction. Chez l'humain, les protéines GW182 sont ciblées par l'enzyme E3 ligase TRIM65 qui catalyse l'ajout d'ubiquitine et la dégradation de GW182. L'augmentation de l'activité de TRIM65 empêche la répression des cibles du microARN let-7. Sous certaines conditions, l'ubiquitynation de GW182 par TRIM65 permet donc de moduler la répression de la traduction par les microARNs (Li et

al., 2014). La protéine GW182 est également associée au transport vésiculaire. L'ubiquitynation de GW182 est un signal de recrutement pour les vésicules et le complexe ESCRT. Le recrutement de GW182 aux vésicules fait en sorte que des microARNs et la protéine Ago2 sont également retrouvés dans ces vésicules. La perte de composante du complexe ESCRT entraîne des défauts dans l'activité des microARNs. Le prise en charge de GW182 par ESCRT pourrait être importante pour assurer son recyclage et le bon fonctionnement de la voie des microARNs (Gibbins et al., 2009). Le lien entre le transport vésiculaire et GW182 est bien établi. Chez, *C. elegans*, les membres du complexe GARP; VPS-52 et VPS-53 sont également impliqués dans le recyclage des protéines AIN-1 et AIN-2. Le complexe GARP est impliqué dans le transport rétrograde qui permet le recyclage de certaines protéines. Les mutants pour les composants de ce complexe démontrent une diminution de l'activité des microARNs et une diminution du niveau protéique d'AIN-1 et AIN-2. Ce complexe pourrait donc être important pour recycler les protéines GW182 et leur permettre de retourner former de nouveaux miRISC. En son absence, les protéines GW182 seraient plutôt dégradées (Vasquez-Rifo et al., 2013).

### *2.2.8 Régulation de la stabilité de la forme mature*

Au-delà de la modification de l'activité ou de la stabilité des protéines effectrices de la biogenèse des microARNs, la forme mature peut également subir des modifications pouvant affecter sa stabilité. Au cours du développement et de la prolifération cellulaire, le niveau des microARNs varie et certains microARNs doivent être rapidement dégradés selon l'étape du cycle cellulaire, les facteurs environnementaux ou le passage de différentes étapes lors du développement (Rüegger and Groschans, 2012). La cellule a donc développé des mécanismes lui permettant de moduler rapidement la stabilité de certains microARNs.

Le microARN miR-122 est hautement exprimé dans les hépatocytes où il régule le métabolisme du cholestérol et des acides gras. Plusieurs espèces de miR-122 sont retrouvées dans le foie, variant de 21 à 23 nucléotides. La forme de 23 nucléotides possède une adénosine supplémentaire en 3' qui n'est pas retrouvée dans la séquence du pre-miR-122. La protéine GLD-2 catalyse l'ajout de cette adénosine, ce qui stabilise miR-122. La déplétion de GLD-2 dans le foie de souris transgénique entraîne une diminution de miR-122 et une augmentation de ces cibles. Les auteurs de l'étude suggèrent que les autres formes identifiées pourraient être des intermédiaires de dégradation.

L'ajout de cette adénosine est donc important pour protéger miR-122 de la dégradation. De plus, l'action de GLD-2 pourrait ne pas se limiter à miR-122 puisque cette enzyme ne possède pas de spécificité de substrat (Kato et al., 2009).

L'utilisation des techniques de séquençage à haut débit a démontré que plusieurs microARNs présentent des modifications en 3'; principalement l'ajout d'une adénosine ou d'un uracile et ce dans plusieurs lignées cellulaires différentes. Le nucléotide transférase PAPD4 est responsable de la modification de plusieurs de ces microARNs. Bien que la signification biologique de ces modifications reste à déterminer, le niveau des microARNs modifiés ne change pas en absence de PAPD4, mais leurs capacités à réguler leur cible et leurs interactions avec les protéines Argonautes sont diminuées. Étant donné la préférence des Argonautes pour un U ou un A en 5' du microARN, cette modification pourrait permettre une meilleure prise en charge de ces microARNs par les Argonautes (Burroughs et al., 2010; Frank et al., 2011). Ces résultats sont différents de ceux obtenus pour miR-122 dans le foie, ce qui suggère que l'effet de la modification des microARNs pourrait être microARN et contexte cellulaire spécifique.

La protéine QKI est un suppresseur de tumeur dans les glioblastomas multiformes TCGA (GBM) et lie les ARNs dont la transcription est activée directement par p53. La délétion de QKI dans différentes lignées cellulaires entraîne une diminution de la forme mature de miR-20a, sans affecter ses formes précurseurs ni les autres microARNs issus du même cluster. Après son activation par p53, QKI interagit avec la forme mature de miR-20a, ayant pour effet de la stabiliser. Cette stabilisation de miR-20a est impliquée dans l'activité suppresseur de tumeur de QKI dans les GBM, puisque qu'il régule l'expression de TGF $\beta$ R2 dont l'expression est nécessaire pour la prolifération de ces cellules tumorales. (Chen et al., 2012).

La stabilité et le temps de demi-vie des microARNs sont pour l'instant deux domaines obscurs puisque peu d'études se sont intéressés à ces paramètres. Pour l'instant, quelques études se sont intéressé à la stabilité des microARNs suite à l'activation de certaines voies métaboliques ou encore en bloquant la production de miR de *novo*.

La voie de INF- $\beta$  induit la dégradation de certains microARNs matures par l'intermédiaire de l'enzyme hPNPase<sup>old35</sup>. Cette enzyme avait préalablement été impliquée dans la dégradation de l'ARNm de c-Myc et de certains ARNs non codants (Sarkar et al., 2003). Dans les cellules de mélanome HO-1, le traitement de l'INF- $\beta$  active hPNPase<sup>old35</sup> qui dégrade spécifiquement certains microARNs tels que : miR-221, miR-222 et mir-106b. Les microARNs affectés par hPNPase<sup>old35</sup> sont impliqués dans la progression tumorale. Par exemple, *miR-221* est augmenté dans plusieurs types de cancer, dont les mélanomes, et régule certains gènes importants tels que p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup> (Fornari et al., 2008; le Sage et al., 2007). La surexpression de miR-221 dans ces cellules les protège contre l'inhibition de la croissance cellulaire induite par l'INF- $\beta$ . La dégradation spécifique de certains microARNs est requise pour assurer une réponse optimale à l'INF- $\beta$  (Das et al., 2010).

Dans les cellules HEK293T, le niveau de 95 % des microARNs ne varie pas de façon significative après 8 heures de traitements avec l'actinomycine D, qui bloque l'activité de Pol II. Parmi le 5 % restant, le niveau du microARN miR-378 diminue de plus de 50 % après 8 heures de traitement. Dans l'espoir de déterminer les enzymes responsables de cette instabilité, le groupe du Dr. Kiledjian a déplété plusieurs exo ribonucléases susceptibles de dégrader les microARNs. Cette expérience a révélé que les enzymes Rrp41 et XRN-1 sont en partie responsables de cette instabilité. Afin de déterminer si l'instabilité de miR-378 est médiée en *cis*, les auteurs ont réalisé plusieurs mutations dans sa séquence et ont observé une stabilisation de ce miR lorsque la région en 3' est mutée. Cette donnée est fort intéressante puisque la liaison du complexe RISC avec la cible entraîne un changement de conformation de l'Argonaute, qui relâche l'extrémité 3' du microARN (Bartel, 2009). La région 3' serait plus accessible pour les exo nucléases et serait importante pour dicter la stabilité d'un microARN (Bail et al., 2010).

Dans les autres organismes, il existe très peu d'information concernant les mécanismes de dégradation ou de recyclage des microARNs. Chez *C. elegans*, les enzymes 5'-3' exo ribonucléase XRN-1 et XRN-2 dégradent une fraction de microARNs après qu'ils aient été relâchés par les miRISC. La perte de ces enzymes entraîne l'accumulation de plusieurs microARNs, sans affecter leurs formes précurseurs (Chatterjee et al., 2011; Chatterjee and Grosshans, 2009).

L'interaction entre le microARN et sa cible peut également modifier la stabilité du miR. Chez *C. elegans*, la présence d'une cible pour un microARN a pour effet de stabiliser ce microARN. Ce phénomène a été démontré par l'utilisation d'une souche de *C. elegans* portant une mutation dans le "seed" de let-7. Cette mutation empêche let-7 de réguler correctement l'expression de ses cibles et entraîne sa dégradation. L'expression d'un transgène portant des sites de reconnaissance pour la forme mutée de let-7 a pour effet de la stabiliser et de bloquer sa dégradation. Le même phénomène est observé lorsque des transgènes portant des cibles pour les brins passagers de certains microARNs sont exprimés. Ces brins passagers sont alors stabilisés. La protection du microARN par sa cible protège ce microARN contre l'action des enzymes de dégradation XRN-1 et XRN-2 (Chatterjee et al., 2011).

Le microARN let-7 est un microARN qui agit comme un suppresseur de tumeur, de part la régulation de certaines de ces cibles telles que Ras ou Hmga2. Le microARN let-7 est sous régulé dans plusieurs cancers et la réintroduction de let-7 dans des modèles murins de cancer du poumon est suffisante pour diminuer la taille de la tumeur (Trang et al., 2010). Les cellules cancéreuses ont développé plusieurs mécanismes afin de diminuer les niveaux de let-7, dont l'activation de LIN-28. Les cellules tumorales de cancer du sein avancé ont développé un moyen unique de bloquer la production de let-7; la cellule utilise un autre microARN pour dégrader let-7. Le microARN miR-107 qui est marqueur de pronostic de cancer agressif peut lier directement let-7 et former un complexe microARN-microARN. Cette interaction entraîne la dégradation de let-7. L'interaction entre ces deux microARNs entraîne la formation d'une structure secondaire centrale en forme de boucle qui est nécessaire pour la déstabilisation de let-7. L'utilisation de modèle murin de cancer du sein a révélé que la surexpression de miR-107 dans la tumeur stimule la croissance tumorale et des métastases. Ces effets sont principalement causés par l'augmentation de l'expression des cibles de let-7 telles que Ras et Hmga2 (Chen et al., 2011).

Un concept novateur et très récent propose également que dans certains cas bien particuliers, le pre-miARN pourrait compétitionner avec le microARN mature pour l'accessibilité à certaines cibles. L'ARNm du gène E2f6 est ciblé par le microARN miR-151-5p et la particularité de cette cible est la présence d'un site pour le brin passager (miR-151-3p) situé à 9 paires de bases du site pour le brin guide. En raison de la présence de ces deux sites, la forme pre-miR-151 peut également lier le 3'

UTR de E2f6. Des essais *in vitro* ont révélé que la liaison du pre-miR-251 bloque l'accès au site de reconnaissance pour la forme mature et empêche ainsi la régulation de E2f6. L'analyse de tissus de souris a démontré qu'une forte expression de E2f6 corrèle avec une plus forte expression de pre-miR-151 dans les cellules quiescentes. La compétition avec le pre-miR-151 n'affecte pas la régulation d'autres cibles de miR-151 qui ne possèdent pas simultanément des sites complémentaires pour les deux brins. De façon intéressante, cette particularité du précurseur de miR-151 ne serait pas unique. Selon les résultats obtenues par une analyse bioinformatique, un total de 138 précurseurs de microARNs pourrait également compétitionner avec la forme mature pour la régulation de leurs cibles. La régulation de l'ARNm de SNAI2 par miR-124 serait également sujette à la compétition avec le pre-miR-124 (Roy-Chaudhuri et al., 2014). D'autres études seront nécessaires pour valider la compétition pour les microARNs identifiés par bioinformatique et pour déterminer la conséquence biologique de cette régulation.

### **3. Importance biologique des microARNs**

La dernière section a démontré que plusieurs voies biologiques peuvent réguler l'expression et la production des microARNs. La régulation de certains microARNs dans certaines conditions comme les dommages à l'ADN, témoigne de l'importance de ces courts ARNs pour l'homéostasie cellulaire. De plus, les premiers microARNs furent identifiés chez *C. elegans* lors de criblages visant à identifier des gènes importants pour le développement. Ces études ont mené à l'identification des deux microARNs pionniers : lin-4 et let-7. Comme son nom l'indique, la perte du microARN let-7 est létale au passage au stade adulte, alors que la mutation de lin-4 entraîne d'importants défauts de développement dans les stades larvaires plus précoces (Olsen and Ambros, 1999; Reinhart et al., 2000; Wightman et al., 1993). Par contre, la perte de fonction de la majorité des microARNs n'entraîne pas de défaut majeur ni chez *C. elegans*, ni chez la souris (Alvarez-Saavedra and Horvitz, 2010; Ebert and Sharp, 2012; Miska et al., 2007). Cette absence de phénotype a amené son lot de questions sur l'impact réel des microARNs, sur le développement et l'homéostasie cellulaire. Différentes études ont par la suite démontré l'importance de plusieurs microARNs au sein d'importantes voies métaboliques, telles que : la réponse au stress, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la survie cellulaire (Ebert and Sharp, 2012). La dernière section de l'introduction portera sur le rôle des microARNs au cours du développement, sur leurs importances dans certaines voies métaboliques et sur l'impact de certains microARNs sur les maladies.

### 3.1 Les microARNs et le développement

La première fonction identifiée pour un microARN était de contrôler les transitions développementales. De façon intéressante, des analyses d'expression génique globale ont révélé que l'expression des microARNs et de leurs cibles est généralement mutuellement exclusive dans les tissus différenciés (Ebert and Sharp, 2012). L'importance des microARNs a rapidement été mise en évidence puisque la déplétion des protéines essentielles à la voie des microARNs (Dicer, Argonaute, microprocesseur) est embryoniquement létale et ce du nématode à la souris (Bernstein et al., 2003; Grishok et al., 2001; Liu et al., 2004).

Tel que mentionné préalablement, les premiers microARNs ont été identifiés chez *C. elegans* suite à la caractérisation de mutants présentant d'importants défauts lors du développement post-embryonnaire. C'est à dire que le phénotype associé à la perte de ces microARNs a été connu dès l'identification du microARN. Après son développement embryonnaire, le nématode *C. elegans* passe par quatre stades larvaires (L1 à L4) avant d'atteindre le stade adulte. Le passage au stade adulte s'accompagne de la formation de la vulve, le début de la production d'embryons et la fin du développement (Figure 16) (Resnick et al., 2010).

À tout seigneur tout honneur, le premier microARN observé, le microARN *lin-4*, régule les premières étapes du développement larvaire. Au cours de ces stades, *lin-4* régule l'expression des protéines LIN-14 et LIN-28 (Lee, 2001; Moss et al., 1997; Wightman et al., 1993). Ces protéines sont fortement exprimées au tout début des stades larvaires L1 et L2 et leur inhibition par *lin-4* permet d'établir le passage au stade larvaire suivant. La mutation de ce microARN cause un gain de fonction de LIN-14 et de LIN-28, ce qui entraîne la répétition de programmes biologiques associés au stade L1/L2. Les conséquences de la perte de *lin-4* se répercutent tout au long du développement. Par exemple, les structures adultes (formation de la vulve, ponte des œufs) sont absentes dans ce mutant (Chalfie et al., 1981; Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) (Figure 16).

Le deuxième microARN identifié, *let-7*, est plutôt impliqué dans le contrôle de la transition entre le dernier stade larvaire et le stade adulte. Au stade L4, *let-7* inhibe l'expression des protéines LIN-41 et HBL-1, qui sont des régulateurs négatifs du facteur de transcription LIN-29. L'expression de LIN-29 permet d'inhiber les processus spécifiques au stade L4 et d'enclencher ceux du stade adulte

(Grosshans et al., 2005; Johnson et al., 2005; Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000; Vella et al., 2004). Chez *C. elegans*, trois autres microARNs possèdent la même séquence régulatrice que *let-7* et forment donc la famille *let-7* : miR-48/84/241 (Lau, 2001; Lim, 2003). Ces trois microARNs collaborent pour inhiber l'expression de *hbl-1* dans les stades plus précoces du développement (Abbott et al., 2005) (Figure16).

La famille *let-7* est également importante pour la régulation de l'homologue de la protéine RAS chez *C. elegans*; la protéine LET-60. L'expression de cette protéine doit être finement régulée pour contrôler la formation de la vulve. Les membres de la famille *let-7* permettent de limiter l'expression de *let-60* aux cellules qui formeront la vulve (Grosshans et al. 2005, Johnson et al, 2005). Parmi les autres cibles de cette famille, on peut noter la protéine DAF-12 (*abnormal Dauer formation*) dont la perte de fonction permet de rétablir certains phénotypes associés à un mutant *let-7* (Grosshans et al., 2005).

De façon intéressante, les homologues de *lin-41* et de *let-60* chez la souris et l'humain sont également ciblés par *let-7* (Johnson et al., 2005; Rybak et al., 2009). De même, ce microARN est important pour contrôler le développement chez *D. melanogaster* (Resnick et al., 2010).

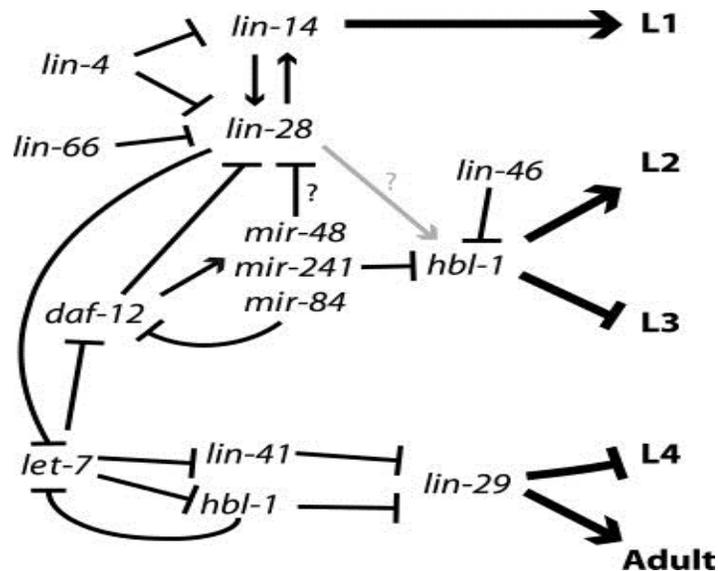


Figure 16: microARNs durant le développement de *C. elegans*

Plusieurs microARNs régulent le développement du nématode *C. elegans*. Le microARN *lin-4* est impliqué dans les premières étapes du développement en régulant l'expression des protéines LIN-14 et LIN-28 (Lee, 2001; Moss et al., 1997; Wightman et al., 1993). Alors que, les microARNs de la famille *let-7* sont impliqués plus tardivement et collaborent pour réguler plusieurs protéines dont: HBL-1, DAF-12, LIN-41 (Abbott et al., 2005; Grosshans et al., 2005; Johnson et al., 2005; Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000; Vella et al., 2004)

Parmi les autres microARNs importants pour le développement, le premier microARN identifié jouant un rôle dans le développement neuronal a été le microARN *Isy-6* (*Laterally symmetric*). Celui-ci est responsable de l'établissement de l'asymétrie droite/gauche des neurones chemosenseurs ASE. *Isy-6* est spécifiquement exprimé dans la neurone de gauche (ASEL) et bloque la production du chémorécepteur GCY-5 (Johnston and Hobert, 2003). En absence de *Isy-6*, cette asymétrie est perdue, ce qui fait en sorte que les deux neurones formés auront les caractéristiques du neurone de droite (ASER).

Finalement, la famille de miR-35-41 est presque exclusivement exprimée dans la lignée germinale et dans les embryons (Lau 2001). Les animaux mutés pour cette famille sont embryoniquement létaux et stériles (Alvarez-Saavedra and Horvitz, 2010; Lau, 2001). Ces microARNs ciblent plusieurs protéines qui contrôlent la fécondité des animaux et les premières étapes du développement embryonnaire (McJunkin and Ambros, 2014; Wu et al., 2010a).

La première étude, portant sur le rôle précis d'un microARN chez les mammifères, est parue en 2004, dans la revue *Science* (Chen et al., 2004). Dans cette étude, le groupe du Dr. Bartel a démontré l'importance de miR-181 dans l'hématopoïèse. Chez la souris, l'expression de miR-181 dans les cellules progénitrices hématopoïétiques augmente la différenciation en lymphocytes B et diminue la production de lymphocytes T (Chen et al., 2004). D'autres études ont par la suite confirmé l'importance de ce microARN dans l'activité des lymphocytes T. miR-181 affecte plusieurs phosphatases et permet de contrôler la sensibilité des lymphocytes à différents antigènes (Li et al., 2007).

Au cours du développement, la différenciation et la spécification de plusieurs tissus impliquent les microARNs. Dans le tissu neuronal, les microARNs miR-124 et miR-9 sont exprimés spécifiquement dans les neurones matures et sont importants pour l'acquisition et le maintien de l'identité neuronale (Stefani and Slack, 2008). Dans les neurones matures, miR-124 régule l'expression d'un inhibiteur de l'épissage neuronal; PTBP1. Dans les cellules non différenciées, PTPBP1 est impliqué dans l'épissage alternatif et cause l'exclusion de certains exons. Son inhibition dans les neurones matures permet l'inclusion de ces exons, qui sont spécifiques au tissu neuronal et coïncide avec l'expression de la protéine PTBP2 (Makeyev et al., 2007).

La formation des tissus musculaires matures, tels que le muscle cardiaque est une étape clé dans l'embryogenèse et plusieurs microARNs sont enrichis dans les myocytes. La délétion de Dicer uniquement dans le muscle cardiaque, provoque des crises cardiaques chez ces embryons et bloque le développement du muscle ventriculaire. L'un des microARNs fortement exprimés dans les cellules musculaires matures de *D. melanogaster* à l'humain est le microARN miR-1. L'expression de miR-1 entraîne la différenciation des myoblastes en cellule musculaire et inhibe la prolifération. Ces effets sont en partie causés par la régulation de gènes importants pour la différenciation musculaire: les facteurs de transcription HAND2 et IRX5 (Stefani and Slack, 2008). Les souris *miR-1<sup>-/-</sup>* présentent un taux de mortalité de 50 % et plusieurs défauts cardiaques (Park et al., 2010).

Finalement, le dernier exemple qui sera présenté est celui du cluster miR-17-92 qui est surexprimé dans plusieurs cancers (Mogilyansky and Rigoutsos, 2013). Ce cluster est essentiel chez la souris et la perte de ces microARNs est létale, peu de temps après la naissance. Ces souris sont plus petites et présentent d'importants défauts dans la formation des poumons et du cœur. D'autres études ont également impliqué ces microARNs dans l'hématopoïèse et la survie des lymphocytes B (Mogilyansky and Rigoutsos, 2013).

Seuls certains microARNs ont été présentés, mais plusieurs autres microARNs jouent des rôles importants au cours du développement des métazoaires (Park et al., 2010; Stefani and Slack, 2008). Par contre, la fonction de la majorité des microARNs reste à déterminer et à l'instar de la famille let-7 chez *C. elegans*, plusieurs microARNs pourraient collaborer pour affecter la même transition

développementale. La caractérisation de ces microARNs nécessitera de plus amples études et pourrait nécessiter l'étude de mutants pour plusieurs microARNs, pour révéler un phénotype.

### 3.2. Les microARNs dans un contexte biologique

Alors que la perte de certains microARNs tels que let-7 et lin-4 entraîne d'importants défauts de développement, la perte de la majorité des microARNs chez les animaux n'a pas d'effet marquant sur l'organisme (Alvarez-Saavedra and Horvitz, 2010; Miska et al., 2007; Park et al., 2010). Dans le même ordre d'idée, généralement un seul microARN n'affecte pas le niveau d'une protéine cible de façon drastique (Baek et al., 2008). Par contre, l'analyse de l'impact d'un seul microARN sur le niveau de sa cible ne permet pas d'apprécier l'impact réel des microARNs dans un contexte biologique complexe.

Plusieurs indices témoignent de l'importance des microARNs. Cette voie de régulation est très conservée au cours de l'évolution et plusieurs études suggèrent que les microARNs contribuent à la solidité des voies métaboliques. La solidité des voies métaboliques est la capacité d'une voie de maintenir sa fonction en dépit de certaines fluctuations internes ou externes (Kitano, 2004). Trois observations témoignent de l'importance de la voie des microARNs. Ainsi, les gènes exprimés de façon tissu spécifique ont des régions 3' non codantes plus longues (UTR), avec plus de sites de reconnaissance de microARNs. De plus, l'expression des microARNs s'intensifie et se diversifie au cours du développement embryonnaire. Finalement, la diversité du répertoire des microARNs chez les animaux a augmenté de concert avec la complexité des organismes (Ebert and Sharp, 2012; Heimberg et al., 2008; Lee et al., 2007; Stark et al., 2005; Thomson et al., 2006).

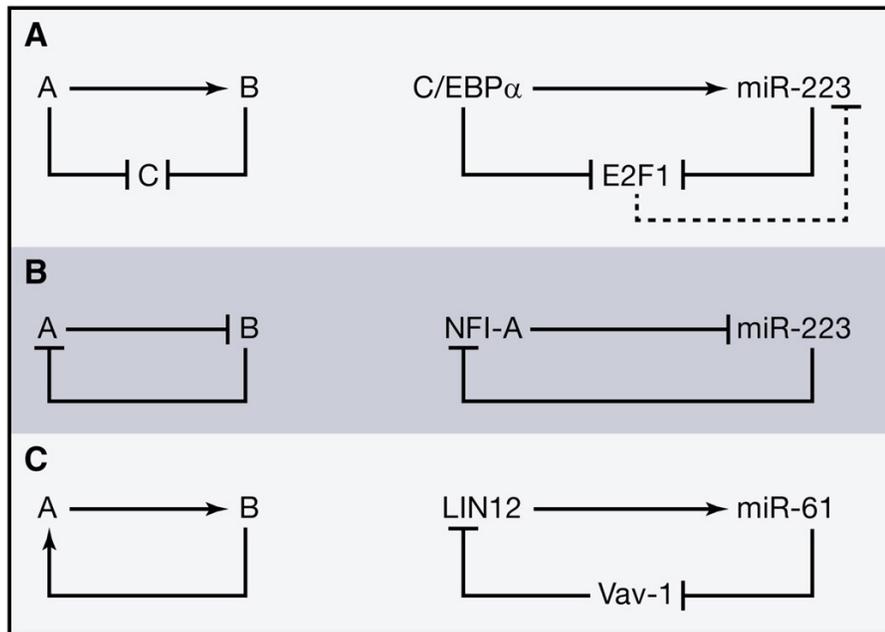
La prochaine partie de l'introduction se divisera en trois parties qui porteront sur l'implication des microARNs dans un contexte biologique, de leur importance dans différentes voies biologiques et finalement du rôle des microARNs dans certaines pathologies.

Au cours de la différenciation cellulaire et du développement, plusieurs voies biologiques fonctionnent sous forme de boucle de régulation, ce qui fait en sorte que la cellule se différencie de façon permanente (Freeman, 2000). Plusieurs microARNs font partie de ces boucles de régulation. Tout d'abord, le premier exemple est celui d'une boucle positive cohérente, dans laquelle le

partenaire A inhibe le partenaire C et active le composant B qui régule négativement également le composant C. Ce type de boucle permet de compenser pour la perte du composant A ou B pour assurer l'inhibition du composant C. L'un des exemples de ce type de boucle est la régulation du facteur de transcription E2F1 durant la granulopoïèse, lequel est régulé négativement par le C/EBP $\alpha$ . L'inhibition de E2F1 par C/EBP $\alpha$  provoque l'arrêt du cycle cellulaire et de la prolifération des cellules myéloïdes ce qui entraîne la différenciation en granulocytes. Afin d'assurer l'inhibition complète de l'expression de E2F1, C/EBP $\alpha$  active également la production de miR-223 qui, à son tour, régule négativement E2F1 (Pulikkan et al., 2010) (Figure 17).

Ce même microARN fait également partie d'une boucle de régulation négative. Lors de la différenciation des granulocytes, l'expression de miR-223 est inhibée par le facteur de transcription NFI-A dans les précurseurs myéloïdes non différenciés, alors que l'augmentation de l'expression de miR-223 dans les cellules différenciées inhibe la traduction de NFI-A. Lors de la différenciation, C/EBP $\alpha$  compétitionne avec NFI-A pour le promoteur de *miR-223* et active sa transcription (Fazi et al., 2005) (Figure 17).

Certains microARNs participent au renforcement de décisions développementales au sein de boucles de régulation positives. Par exemple, chez *C. elegans* la formation de la vulve au stade adulte nécessite une forte expression du récepteur transmembranaire LIN-12 (homologue de la protéine Notch). Dans les cellules précurseurs de la vulve, LIN-12 active directement l'expression de miR-61. L'une des cibles de ce miR est le régulateur négatif de LIN-12; VAV-1. Dans cette boucle positive, le microARN sert de contrôle additionnel pour permettre à la cellule de s'assurer que la protéine LIN-12 soit fortement exprimée (Yoo and Greenwald, 2005) (Figure 17).



**Figure 17 : microARNs dans des boucles de régulation**

Exemple de microARNs dans des boucles de régulation.

A: Boucle positive cohérente. C/EBPα inhibe E2F1 et active miR-223 qui est également un régulateur négatif de E2F1 (Pulikkan et al., 2010).

B: Boucle de régulation négative. NFI-A inhibe l'expression de miR-223 qui lui-même est un régulateur négatif de NFI-A (Fazi et al., 2005).

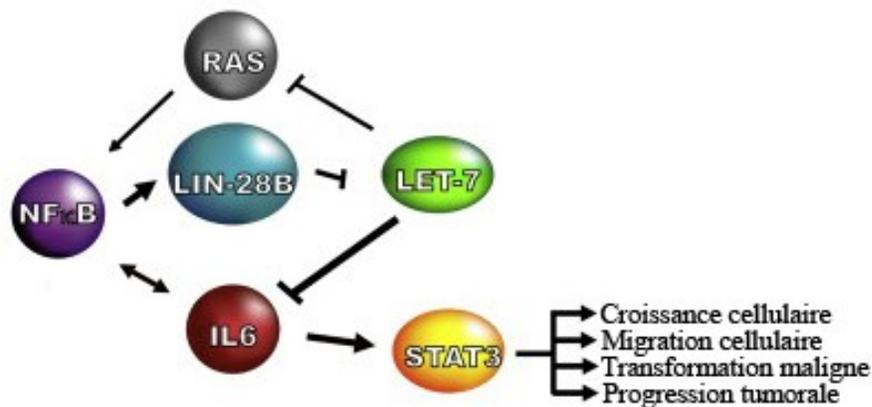
C: Boucle de renforcement positive. LIN-12 active miR-61 qui inhibe l'expression du régulateur négatif de LIN-12 (Yoo and Greenwald, 2005).

Figure modifiée de : (Ebert and Sharp, 2012)

La présence de microARNs dans ces boucles de régulation, leur permet de contrôler la décision cellulaire de différencier à plusieurs niveaux. De telles boucles de régulation entre cellules précurseurs et différenciées permettent de conserver la différenciation et d'éviter de retourner à un état précurseur. Ces mêmes boucles sont souvent dérégulées dans le cancer, ce qui permet aux cellules cancéreuses de retourner à un état de prolifération active, comme c'est le cas dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA) où la protéine C/EBPα est souvent mutée (Pulikkan et al., 2010).

L'une des boucles de régulation impliquant le microARN let-7 a d'importantes répercussions sur la réponse à l'inflammation et sur la progression tumorale. Dans les cellules épithéliales, lors de la réponse inflammatoire, l'activation de NF-κB (*Nuclear factor-kappa B*) induit la transcription d'IL-6 (*Interleukine 6*) et active le régulateur négatif de let-7, LIN-28b. L'inhibition de let-7 permet l'expression de deux cibles de let-7 impliquées dans cette boucle: IL-6 et RAS. L'expression de RAS

stimule davantage NF-κB et ainsi de suite. L'inhibition de let-7 permet donc d'amplifier davantage le signal en aval de NF-κB. L'expression de IL-6 permet d'activer le facteur de transcription STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*), qui va induire l'expression de gènes importants pour la croissance et la motilité cellulaire. En absence d'inflammation, l'état inactif de NF-κB et l'expression du microARN let-7 permettent de s'assurer que cette voie est inactive, pour empêcher la croissance cellulaire aberrante. Il est intéressant de noter que cette boucle est affectée dans certains types de cancer où le microARN let-7 est souvent sous exprimé, faisant en sorte que cette voie est constitutivement active dans ces cellules (Iliopoulos et al., 2009) (Figure 18).



**Figure 18 : Boucle de régulation NF-κB et let-7**

Exemple de boucle de régulation impliquant un microARN. L'activation de NF-κB (mauve) induit active IL-6 (Rouge) et LIN-28B (Bleu). L'activation de LIN-28B va inhiber la production du microARN let-7 (Vert). La cible de let-7 RAS (Gris) est alors exprimée et permet de stimuler d'avantage NF-κB. Suite à son activation IL-6 va stimuler STAT3 et permettre l'expression de gènes stimulant la croissance et la migration cellulaire (Iliopoulos et al., 2009). Figure tirée de : (Iliopoulos et al., 2009)

Ce dernier exemple démontre également que pour avoir un effet biologique important, les microARNs peuvent cibler plusieurs protéines d'une même voie signalétique ou d'un même complexe protéique. Ainsi, la diminution, même modeste, de plusieurs de ces composants entraînera une réduction du signal. Lors de la progression du cycle cellulaire, le microARN miR-16 contrôle la transition G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> vers la phase S. miR-16 cible plusieurs protéines requises pour bloquer les cellules en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>: CDK6, CARD10 et CDC27. La diminution de l'un de ces facteurs par ARNi (ARN

interférence) n'est pas suffisante pour arrêter le cycle, mais la combinaison de l'ensemble des cibles de miR-16 permet de rétablir le phénotype associé à l'expression de miR-16 (Linsley et al., 2007).

La présence des microARNs dans ces boucles de régulation et la régulation de plusieurs protéines de la même voie biologique, peuvent donc expliquer comment les microARNs régulent l'homéostasie cellulaire, sans affecter radicalement l'expression protéique. Lorsque combinée à la régulation par les autres protéines de la même voie, la modulation, même limitée, d'une cible peu avoir un effet physiologique important.

Par contre, l'analyse de la fonction d'un seul microARN à la fois, ne permet pas d'apprécier la collaboration entre microARNs d'une même famille ou encore de différents microARNs, pour la régulation d'une cible commune. Tout d'abord, plusieurs microARNs sont regroupés en familles, c'est-à-dire que plusieurs microARNs différents possèdent la même séquence de reconnaissance pour un ARNm. Ces microARNs peuvent alors cibler les mêmes ARNm, ce qui permet d'amplifier et de potentialiser leurs activités. Par exemple, chez *C. elegans*, les membres de la famille let-7 ; miR-48, miR-241 et miR-84 n'ont pas de phénotype majeur lorsque mutés individuellement. Par contre, la perte de fonction simultanée de ces trois microARNs entraîne d'importants défauts au cours du développement larvaire (Abbott et al., 2005).

Dans le même ordre d'idée, un même ARNm peut posséder plusieurs sites de reconnaissance pour un microARN ou encore pour plusieurs microARNs différents. Par exemple, l'ARNm de *lin-41* contient plusieurs sites de liaison au microARN let-7 qui pourront collaborer entre eux pour s'assurer de réguler efficacement sa traduction (Vella et al., 2004). Lorsque ces sites sont séparés de 10 à 40 nucléotides, les microARNs peuvent coopérer pour augmenter l'efficacité de la répression. Dans ces conditions, plusieurs microARNs peuvent être requis pour s'assurer de la régulation optimale d'une cible (Bartel, 2009; Ebert and Sharp, 2012).

Un autre facteur influençant l'analyse des phénotypes de la perte de fonction des microARNs en laboratoire, est l'absence de stress pour les organismes. Les conditions standards de laboratoire font en sorte de minimiser les facteurs de stress tels que l'exposition à des pathogènes, la fluctuation de température ou le manque de nutriments. Ces conditions ne reflètent pas nécessairement les

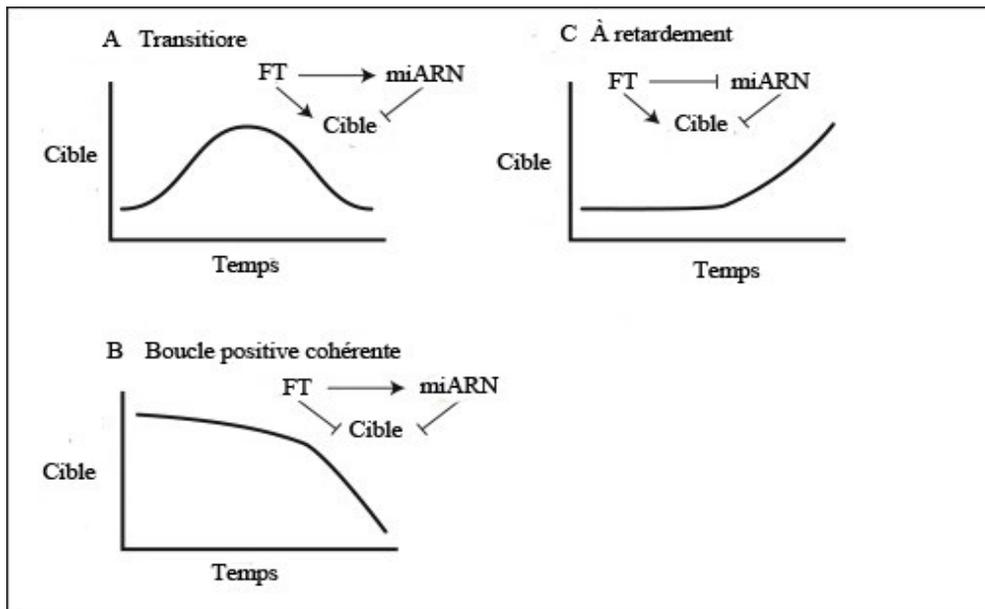
conditions de vie d'un organisme dans la nature. À l'extérieur du laboratoire, les nématodes, les souris ou encore les cellules de notre corps font face à plusieurs stress qui nécessitent différentes réponses cellulaires et qui vont grandement influencer le développement et la survie de ces organismes. C'est ainsi que l'analyse de plusieurs microARNs en condition de stress cellulaire a permis de révéler des défauts d'adaptation et de développement, qui n'apparaissent pas dans des conditions standard de laboratoire. Chez la souris, la délétion du microARN spécifique au muscle cardiaque miR-208 n'entraîne pas de phénotype en condition normale, mais en cas de stress, il n'y a pas de remodelage du muscle cardiaque (van Rooij et al., 2007).

Dans le même ordre d'idée, l'utilisation du mutant pour *alg-1* chez *C.elegans* permet d'étudier la perte de fonction des différents microARNs dans une condition sensibilisée. Pour 25 microARNs dont la perte de fonction du microARN seul ne présente pas de phénotype, l'utilisation de cette souche sensibilisée permet d'observer l'apparition de divers phénotypes, allant de la létalité, au problème de formation de la lignée germinale et aux problèmes de développement. La fonction de ces microARNs a donc pu être révélée seulement lorsque la voie des microARNs était déjà affaiblie par la perte de l'Argonaute ALG-1. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque certains microARNs ont été mutés en combinaison avec la perte de fonction de plusieurs gènes importants pour la régulation de la chromatine (Brenner et al., 2010).

En conclusion, l'analyse de la perte d'un seul microARN à la fois et dans des conditions optimales pour les modèles d'études ne permettent pas d'apprécier l'impact réel de cette voie de régulation génique. Par contre, les microARNs ajoutent une voie supplémentaire aux voies biologiques préalablement identifiées pour contrôler la production protéique. L'une des questions venant à l'esprit est, pourquoi avoir développé et conservé ce mécanisme de régulation post-transcriptionnel ? Les microARNs possèdent certains avantages en comparaison avec les voies protéiques classiques. Tout d'abord, puisque les microARNs peuvent agir plus tard dans les étapes de production protéiques, ils peuvent donc compenser pour des fluctuations dans la transcription ou l'épissage pour s'assurer que le niveau protéique demeure constant. Cette caractéristique fait en sorte que la voie des microARNs peut être d'agir comme un tampon cellulaire. Entre les cellules identiques d'un même organe, le niveau de protéines ou d'ARNm, à un moment donné est variable d'une cellule à l'autre ceci peut s'expliquer par des différences dans la liaison du promoteur par un facteur de transcription,

la cinétique de dégradation de l'ARNm ou de la protéine ou enfin la vitesse de traduction. L'un des rôles suggérés des microARNs serait de contrôler cette fluctuation en faisant en sorte de réguler les ARNm aberrants et de s'assurer que la production protéique soit la même peu importe la fluctuation des transcrits. Toujours dans cette idée, plusieurs microARNs forment des boucles de régulation négatives avec des facteurs de transcription, comme MeCP2 qui induit la transcription du miR-132 via BDNF dans les neurones. miR-132 va ensuite réguler l'expression de MeCP2 pour s'assurer de conserver l'homéostasie cellulaire, puisqu'une dérégulation de ce facteur de transcription cause des problèmes neurologiques (Klein et al., 2007) (Figure 19). Dans un cas comme celui-ci, une trop grande activité du facteur de transcription va entraîner une plus grande production du microARN, qui va ensuite diminuer la production de ce facteur de transcription, ce qui permet de maintenir une activité optimale du facteur de transcription.

En résumé, les microARNs participent au maintien de l'homéostasie cellulaire de multiples façons. La présence de microARNs dans plusieurs boucles de régulation au cours du développement permet de stabiliser les voies biologiques et permet également aux microARNs d'agir comme tampon cellulaire. Les avantages pour la cellule d'utiliser les microARNs sont multiples, tel que mentionné plus tôt, les microARNs peuvent corriger les fluctuations transcriptionnelles, d'épissage ou d'export d'ARNm. De plus, il a été démontré que les microARNs peuvent agir dans certains compartiments cellulaires spécifiques, par exemple, dans les neurones, les microARNs peuvent réguler l'expression de gènes spécifiquement au niveau des synapses (Carrel and Firestein, 2009). Puisque l'élément central de la voie est une molécule d'ARN et non protéique, l'utilisation de la voie des microARNs pour réguler la production protéique demande moins d'énergie à la cellule (Mehta et al., 2008). Finalement, la production de microARNs peut être rapidement modulée à différentes étapes de leurs biogenèses que ce soit pour réguler l'expression d'un seul microARN ou pour avoir un effet plus global sur la voie.



**Figure 19 : Exemple de l'interaction entre les microARNs et les facteurs de transcription**

Exemple du rôle joué par certains microARNs en relation avec les facteurs de transcriptions (FT). **A:** Un facteur de transcription peut activer la cible et le microARN dans un cas où l'expression de la cible doit être temporaire. **B:** Boucle de régulation positive cohérente, le FT qui inhibe l'expression de la cible active, le régulateur négatif de cette même cible. **C:** Le facteur de transcription peut inhiber la production du microARN qui régule la cible activée par le FT. Figure modifiée de : (Leung and Sharp, 2010)

### 3.3 MicroARNs et maladies

Puisque les microARNs sont importants pour le contrôle du développement chez les animaux et participent à de nombreuses voies importantes pour l'homéostasie cellulaire, une dérégulation de la voie des microARNs est impliquée dans le développement de nombreuses pathologies.

#### 3.3.1 *microARNs et cancer*

Dans les cellules cancéreuses, plusieurs voies métaboliques normalement inactives dans les cellules différenciées sont suractivées. Les microARNs ont suscité de l'intérêt pour la recherche sur le cancer dès leur identification, puisque les défauts associés à la perte des deux premiers microARNs identifiés, lin-4 et let-7, ressemblent à des défauts associés aux cellules cancéreuses. La perte de

fonctions de ces microARNs cause la répétition de programmes de division de stades précoces au cours du développement et entraîne des divisions cellulaires supplémentaires chez l'adulte (Lee et al., 1993; Mendell and Olson, 2012; Reinhart et al., 2000).

Plusieurs études ont rapidement analysé l'expression des microARNs dans les tumeurs, pour démontrer que l'expression de ces ARNs est dérégulée dans les cellules cancéreuses (Chang et al., 2008). Par exemple, dans les cellules du lymphome de Burkitt's, le facteur de transcription c-Myc reconnaît des séquences régulatrices dans les régions promotrices de plusieurs microARNs, entraînant une répression globale de l'expression des microARNs. La réexpression de certains de ces microARNs, dont miR-34a, miR-150, miR-195/197 et miR-15a/16-1 permette de supprimer les propriétés tumorales de cellules de lymphome (Chang et al., 2008).

Puisque certains microARNs contrôlent la prolifération, le cycle cellulaire ou encore la survie cellulaire, l'expression de certains microARNs spécifiques est dérégulée dans le cancer. Chez l'humain, la famille let-7 est sous exprimée dans plusieurs cancers: du poumon, du sein, le mélanome, de la prostate et ovarien. Tel que mentionné plus haut, la boucle de régulation entre let-7 et IL-6 est souvent affecté dans certains types de cancer. La stimulation de l'activité de STAT3 et combinée à la répression de let-7 collabore pour augmenter l'expression de cibles de let-7 dont les oncogènes c-Myc, RAS et HMGA2 (Boyerinas et al., 2010).

La protéine p53 est reconnue comme le gardien du génome et comme le gène dont la fonction est la protéine la plus affectée dans l'ensemble des cancers (Vogelstein et al., 2000). La famille miR-34 est un composant important de la voie signalétique de p53. Après son activation, p53 stimule directement la transcription de miR-34a, qui peut ensuite affecter ces cibles : BCL-2 et les CDK4/6). La régulation de ces protéines permet de causer l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que dans l'activation de l'apoptose causée par l'activation de la voie p53. Il est intéressant de noter que miR-34a est muté dans plusieurs types de cancer (He et al., 2007a; He et al., 2007b). De façon intéressante, l'injection des microARNs let-7, miR-34a permet d'inhiber la croissance tumorale et stimule l'apoptose dans des modèles murins de Non Small cell lung cancer (NSCLC). Ceci a été démontré par une réduction de 60% de la taille des tumeurs suite à l'injection de ces microARNs (Trang et al., 2010; Trang et al., 2011). Cet effet anticancéreux n'est pas spécifique à ces deux microARNs. L'expression de miR-26a

dans un modèle de cancer du foie et de miR-34a ou miR-143/145 dans un modèle de cancer pancréatique inhibe la prolifération de cellules tumorales et cause une réduction de la taille des tumeurs (Kota et al., 2009; Pramanik et al., 2011).

Les microARNs peuvent également agir comme oncogènes. Contrairement à la majorité des microARNs, l'expression de la famille des microARNs miR-17-92 est activée par l'oncogène c-Myc. Les cibles de ces microARNs sont variées, mais de façon générale, la surexpression de ces microARNs stimule la progression (p21), la survie cellulaire (BIM et PTEN) et l'angiogénèse (Mogilyansky and Rigoutsos, 2013) (Tableau 1). En revanche, dans les lymphomes induits par c-Myc, la délétion de ce cluster induit l'apoptose (He et al., 2005; Mogilyansky and Rigoutsos, 2013). Un autre exemple de microARNs oncogènes; la surexpression de miR-155 et miR-21 est suffisante pour initier la formation de lymphomes chez la souris (Mendell and Olson, 2012).

**Tableau 1 : Expression du cluster miR-17-92 dans le cancer**

MiRNA	Normal skeletal formation/Feingold syndrome	Lung and heart development	B-cell development	T-cell development	B-cell lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma	B-cell CLL	MLL-rearrangements	AML t (8:21)	AML t (15;17)	T-cell lymphoma	T-cell ALL	Multiple myeloma	Retinoblastoma	Colorectal cancer	Head and neck cancer	Pancreatic cancer	Breast cancer	Ovarian cancer	Lung cancer	Renal cancer	Hepatocellular carcinoma	Osteosarcoma	Gastric cancer	Nasopharyngeal cancer	Urothelial cancer
miR-17	!	!	!	!	↑	↑	↑	↑	↓		↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑		
miR-18a	!	!			↑	↑	↑				↑				↑	↑	↑	↑				↑	↑		↑	↑
miR-19a	!	!			↑	↑	↑				↑				↑	↑	↑	↑				↑	↑	↑		
miR-20a	!	!			↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑			
miR-19b-1	!	!	!	!	↑	↑	↑				↑	↑			↑	↑	↑	↑				↑	↑			
miR-92a-1	!	!			↑	↑	↑		↓		↑		↑		↑	↑	↑	↑				↑	↑			
miR-106a								↑																		
miR-106b								↑										↑					↑			
miR-18b																		↑								
miR-93																							↑			
miR-25																							↑			

Les microARNs exprimés par le cluster miR-17-92 sont sur-exprimés dans plusieurs cellules cancéreuses. Ce tableau indique le niveau d'expression de ces microARNs au cours du développement et de la tumorigénèse. Les flèches rouges indiquent une augmentation du niveau du niveau du microARNs dans ces cellules cancéreuses, les flèches vertes indiquent une diminution et finalement les ! indiquent l'expression de ces microARNs dans les tissus normaux (Mogilyansky and Rigoutsos, 2013).

Un autre concept intéressant concernant la régulation des microARNs dans les maladies est celui de l'hétérogénéité des 3'UTR. Il est estimé que la majorité des gènes humains possèdent des signaux de poly-adenylation alternatifs et que 50 % des gènes produisent des ARNm avec des 3'UTR variants qui ont été confirmés par séquençage. L'expression d'ARNm avec des sites de poly-adenylation alternatif change radicalement l'architecture du 3' UTR et affecte la régulation des microARNs et des protéines liant le 3' UTR (Mayr and Bartel, 2009). La protéine HMGA2 est exprimée principalement dans les cellules non différenciées dans l'embryon ainsi que dans plusieurs tumeurs. Dans un grand nombre de ces tumeurs, une translocation chromosomique cause la perte d'une partie du gène et remplace la région 3'UTR par la séquence d'un autre gène. HMGA2 est normalement régulée par let-7. La substitution de la région 3' non codante fait en sorte que HMGA2 devient insensible à let-7 et cause une surexpression de la protéine (Mayr et al., 2007).

Cette étude a ouvert la porte à une deuxième publication du même groupe, où un total de 23 gènes ont été sélectionnés pour leurs importances dans la tumorigénèse ainsi que du fait que ces gènes sont prédits pour être des cibles de microARNs. Parmi les gènes exprimés dans la lignée cellulaire utilisée, neuf d'entre eux présentaient plusieurs isoformes de leurs ARNm. L'expression d'isoformes présentant des 3'UTR plus courts était associée à une plus grande transformation des cellules cancéreuses. Une analyse détaillée a révélé que ces isoformes sont plus stables et mènent à une plus grande production de protéines. L'expression d'ARNm avec un 3' UTR plus court pour les gènes Cyclin D2 et IMP-1 qui sont surexprimés dans plusieurs cancers, est suffisante pour stimuler la croissance cellulaire. L'expression de ces 3'UTR courts permet à certains oncogènes d'échapper à la régulation par les microARNs et contribue à la diminution globale de l'activité des microARNs dans les cellules cancéreuses (Mayr and Bartel, 2009).

Au-delà des microARNs eux-mêmes, les protéines importantes pour cette voie sont également affectées dans plusieurs types de cancer. Alors que la modulation directe de certains microARNs est spécifique, l'effet sur les protéines telles que Drosha, Argonaute et Dicer entraîne une perturbation globale des microARNs. Plusieurs études ont démontré qu'une faible expression de Drosha et Dicer est associée à une diminution de la survie. En plus, dans un modèle de cancer du poumon chez la

souris, la perte d'un allèle de Dicer est suffisante pour réduire la survie globale de ces animaux (Karube et al., 2005; Merritt et al., 2008).

Par contre, l'effet des protéines Argonautes dépend du contexte cellulaire. Dans les mélanomes, l'expression de Ago2 est plus faible dans les mélanomes primaires et les métastases, alors que dans les tumeurs du cancer du sein et du colon, une augmentation de l'expression d'Ago2 est associée à des cancers plus agressifs (Li et al., 2010; Voller et al., 2013).

Les facteurs modulant la biogenèse des microARNs sont également impliqués dans la dérégulation des microARNs dans certaines tumeurs. C'est le cas du régulateur négatif du microARN let-7; LIN-28 a une activité oncogénique dans certains tissus ainsi que plusieurs protéines influençant l'activité du microprocesseur tel que p-68/p72, SMAD (Adams et al., 2014). Les cellules cancéreuses ont développé plusieurs mécanismes leur permettant de réguler l'expression de certains microARNs ou de l'ensemble de la voie.

En conclusion, la production et l'activité des microARNs sont modulées durant la progression tumorale et la modulation de certains microARNs est nécessaire pour faciliter la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. À l'heure actuelle, le patron d'expression des microARNs représente un bon outil diagnostique pour évaluer la progression tumorale et le pronostic (Calin and Croce, 2006).

### *3.3.2 microARNs et autres maladies*

Les microARNs ont été plus étudiés dans le cancer, mais ce n'est pas la seule pathologie impliquant une dérégulation de cette voie. Notamment on retrouve miR-29, miR-208 et miR-126 qui sont impliqués dans des maladies cardiovasculaires.

L'analyse de l'expression des microARNs dans plusieurs maladies cardio-vasculaires a révélé une signature d'expression des microARNs dans des problèmes tels que les crises cardiaques et la cardiomyopathie, mais également au cours de l'angiogénèse (Mendell and Olson, 2012). Parmi ces microARNs, le miR-29 influence la production de la matrice extracellulaire et le dépôt de collagène au niveau des ventricules, influençant la rigidité de ces derniers. Des problèmes dans la rigidité des

ventricules peuvent entraîner l'arythmie cardiaque (Boon et al., 2011). Ce même microARN pourrait également être impliqué dans la maladie d'Alzheimer, car une diminution de miR-29 est observée dans le cerveau de patients atteints de la maladie (Delay et al., 2012).

Le microARN miR-208 n'est pas requis pour la formation ni pour le fonctionnement du cœur, mais est un acteur important du remodelage du muscle cardiaque, en réponse à différents stress cardiaques. L'exposition à différentes formes de stress cardiaque telles que l'hypertension ou la chimiothérapie entraîne un remodelage du cœur qui affecte l'activité de pompe et à long terme, peut culminer à des infarctus. Ces stress entraînent l'expression du gène  $\alpha$ -MHC dont l'un des introns code pour miR-208. L'induction de ce microARN, suite au stress cardiaque inhibe l'expression de facteurs de transcription, dont Thrap1/MED13. Cette inhibition permet alors l'expression de la protéine  $\beta$ -MHC laquelle est nécessaire pour le remodelage du muscle cardiaque. Deux expériences ont permis de démontrer l'importance de miR-208 dans le remodelage du cœur, lors de l'exposition au stress. Tout d'abord, les souris *miR-208<sup>-/-</sup>*, ne sont pas sensibles aux stress cardiaques alors que l'injection d'inhibiteur de miR-208 dans le muscle cardiaque permet de retarder les problèmes cardiaques associés au stress (Callis et al., 2009; van Rooij et al., 2007).

D'autres microARNs tels que miR-126 sont importants pour le développement des vaisseaux sanguins. Les souris K.O. pour miR-126 ont de vaisseaux fragiles et une incapacité à en former de nouveaux suite à une blessure. Les problèmes d'angiogénèse sont en partie causés par l'activation constante des cibles de miR-126 : Spred1 et PIKR2 qui sont des régulateurs négatifs des voies pro-angiogéniques MAPK/ERK et PI3K/Akt (Fish et al., 2008; Kuhnert et al., 2008; Wang et al., 2008b).

Outre les maladies cardio-vasculaires, les microARNs ont été associés aux maladies du système nerveux central, tel que l'Alzheimer (Delay et al., 2012) ou encore des troubles du métabolisme comme le diabète de type II. Les souris déficientes pour le microARN miR-375 présentent d'importants défauts de prolifération des cellules  $\beta$  du pancréas entraînant des problèmes de résistance à l'insuline, ce qui mène au développement du diabète (Poy et al., 2009).

Ces quelques exemples ne représentent qu'une fraction des microARNs associés à différentes maladies. L'implication des microARNs dans le développement et la persistance de plusieurs

maladies est maintenant bien établie. Plusieurs études démontrent également que les microARNs pourraient être utilisés pour servir de bio marqueur ou encore pour classer les différents types de tumeurs et leur agressivité (Mendell and Olson, 2012). Étant donné l'importance de certains microARNs, en particulier dans le contrôle de la progression de certaines maladies, ceux-ci font l'objet de plusieurs études thérapeutiques. L'injection de molécules inhibant les microARNs oncogéniques telles que la famille miR-17-92 ou encore l'utilisation de microARNs synthétiques (mimique) pourraient compenser pour la perte d'expression de microARNs ayant un effet bénéfique sur la pathologie (Mendell and Olson, 2012)

## 4. Objectif du doctorat

L'objectif général de mon doctorat était l'identification et la caractérisation de nouveaux facteurs impliqués dans la voie des microARNs. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour identifier de tels facteurs. L'une de ces techniques, les criblages génétiques, sont une excellente façon de découvrir des facteurs insoupçonnés qui peuvent se révéler être très importantes pour diverses fonctions biologiques. Ce type de criblage permet également de trouver des protéines qui ne sont pas essentielles pour la fonction d'une voie, mais qui peuvent avoir d'importants effets sur son activité. Mes travaux de doctorat sont divisés en deux parties principales.

### Objectif 1

Chez le nématode *C. elegans*, les deux Argonautes *alg-1* et *alg-2* sont synthétiques létaux (Grishok et al., 2001). Deux gènes sont dits synthétiques létaux lorsque la mutation d'un seul gène est viable alors que la mutation des deux en même temps est létale. Dans le cas d'*alg-1* et *alg-2*, le double mutant meurt au cours de l'embryogenèse (Vasquez-Rifo et al., 2012).

Afin d'identifier des interacteurs potentiels de la voie des microARNs, un criblage génétique a été réalisé pour identifier d'autres gènes synthétiques létaux avec *alg-2*. Notre hypothèse était que les partenaires génétiques d'*alg-2*, ainsi identifiés, seraient également impliqués dans la voie des microARNs. Les différents candidats isolés lors du criblage furent ensuite classés en groupes de complémentation. Le premier objectif de mon doctorat était l'identification et la caractérisation du

gène affecté dans l'un des groupes de complémentation. Les travaux de cet objectif sont présentés dans le chapitre 3.

## **Objectif 2**

Mes travaux réalisés lors de l'objectif 1, m'ont permis d'identifier une protéine impliquée dans la dégradation des microARNs; DCS-1. Or, à l'heure actuelle, les connaissances sur les protéines impliquées dans la dégradation sont limitées à quelques enzymes chez différents organismes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dégradation des microARNs chez le nématode *C. elegans*, j'ai identifié les interacteurs protéiques de la protéine DCS-1. Le deuxième objectif de mon doctorat était de caractériser les partenaires protéiques de DCS-1 et d'évaluer leur implication dans la voie des microARNs. Les travaux réalisés pour cet aspect seront présentés au chapitre 4.

## **Chapitre 2 : A new twist in the microRNA pathway: Not Dicer but Argonaute is required for a microRNA production**

*Gabriel D. Bossé and Martin J. Simard<sup>1</sup>*

Laval University Cancer Research Centre, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Quebec City, Québec  
G1R 2J6, Canada

1: Email: [Martin.Simard@crhdq.ulaval.ca](mailto:Martin.Simard@crhdq.ulaval.ca)



## **Avant propos**

Ce chapitre porte sur l'article de type "*Research Highlight*", publié dans le journal *Cell Research* en 2010 et intitulé : **A new twist in the microRNA pathway: Not Dicer but Argonaute is required for a microRNA production.**

Au début de l'année 2010, deux papiers furent publiés simultanément dans les revues *Science* et *Nature*, à propos d'un microARN dont la production était totalement indépendante de Dicer. Les éditeurs du journal *Cell Research* ont contacté le Dr. Simard afin d'écrire un court article pour présenter la publication parue dans la revue *Nature*. Cette publication résume les travaux de l'équipe du Dr. G. Hannon et les met en perspective selon la littérature de l'époque. L'intérêt d'écrire cet article pour présenter cette publication vient du fait que c'était la première fois qu'il était démontré qu'un microARN n'avait pas besoin de Dicer pour être produit, mais plutôt de la protéine Ago2. Ces résultats étaient novateurs et d'une grande importance dans le domaine des courts ARNs non codants.

Cette publication fut écrite en étroite collaboration avec mon directeur de recherche Dr. Martin Simard. J'ai également réalisé la figure accompagnant ce papier.



## 2.1 Article

Found in all metazoans, microRNAs or miRNAs are small non-coding RNA of ~22 nucleotides in length that completely reshaped our understanding of gene regulation. This new class of gene regulator is mostly transcribed by the RNA polymerase II producing a long stem-loop structure, called primary- or pri-miRNA, that will first be processed in the cell nucleus by a multiprotein complex called microprocessor to generate a shorter RNA structure called precursor- or pre-miRNA. The precisely processed pre-miRNA will next be exported into the cytoplasm by Exportin 5 and loaded onto another processing machine containing the ribonuclease III enzyme Dicer, an Argonaute protein and other accessory cellular factors (Figure 1A; [(Winter et al., 2009)]). Dicer will mediate the cleavage of the pre-miRNA to form the mature miRNA that will then be bound by the Argonaute protein to form, with most likely other cellular factors, the effector silencing complex or RISC able to modulate protein expression upon binding by sequence complementarity to specific region of 3' untranslated region (UTR) of mRNA to alter protein synthesis.

In animals, some Argonaute proteins can cleave RNA molecules while others have lost their catalytic activity and participated in a gene regulatory mechanism that does not require RNA cleavage (Hutvagner and Simard, 2008). This family of proteins possesses four structural domains: the N-terminus, PAZ, MID and PIWI domains. The PAZ domain is implicated in the binding of single-stranded RNA while the PIWI domain confers the endonucleolytic activity of Argonaute proteins and requires coordination of divalent cations by Aspartate-Aspartate-Histidine (DDH) motif residues for catalysis. Interestingly, all four Argonautes found in mammals can form a functional RISC but only Ago2 displays an endonuclease activity [(Liu et al., 2004; Meister et al., 2004)



The discovery of a new class of small RNAs in mammal oocytes [(Tam et al., 2008)] and embryonic stem cells [(Babiarz et al., 2008)] that have the potential to cleave complementary RNA sequences has provided part of the reason why Ago2 has conserved its enzymatic activity. However, the deletion of Ago2 does not only lead to sterile animals but lethality is observed during gestation [(Alisch et al., 2007; Liu et al., 2004; Morita et al., 2007)] strongly suggesting a role for Ago2 outside the female germline.

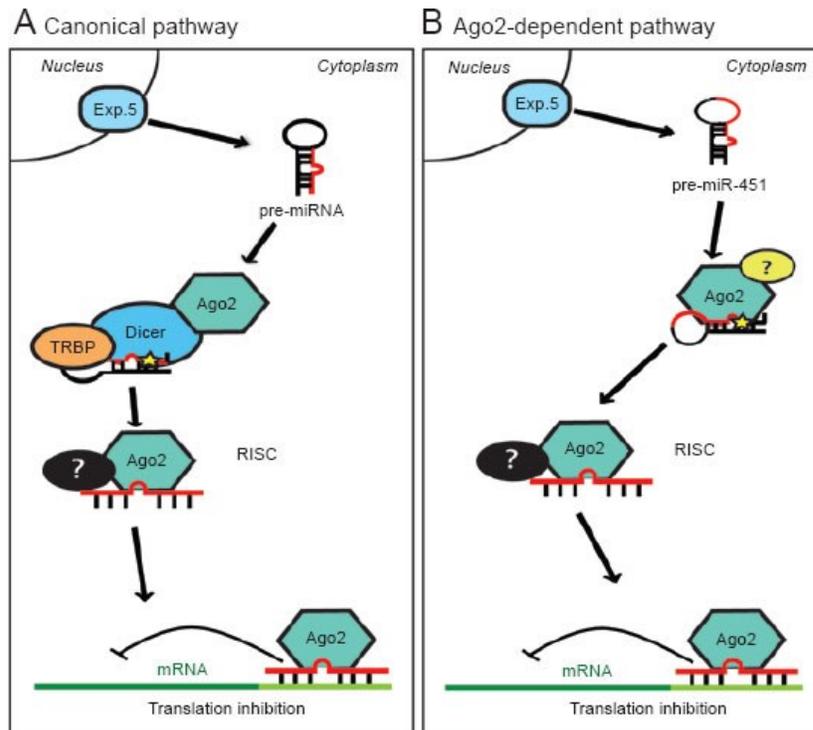
In order to understand the catalytic function of Ago2 in animals, the Hannon's group generated a mouse in which they replaced the endogenous allele by a catalytically inactive Ago2 carrying mutation in the DDH motif (Ago2<sup>ADH</sup>) (Cheloufi et al., 2010). They observed that the animal undergoes a normal embryogenesis but died within a few hours after birth and displayed severe sign of anemia. These embryos have an important reduction in red blood cell cause by a defect in the maturation of erythroid cells. These results represent the first evidence that the catalytic domain of Ago2 is essential for the survival of mammals.

To next determine the molecular phenotypes of Ago2<sup>ADH</sup> mice, Cheloufi and colleagues performed deep sequencing analysis of short RNAs in the liver, one of the organ contributing to erythroid cells maturation in fetus. Among all the miRNAs expressed in these tissues, they surprisingly observed that only one miRNA in normal fetal liver, miR-451, is strongly decreased in mice carrying catalytically inefficient Ago2. Since the expression of the precursor miRNA form of miR-451 was not affected, the authors concluded that the mutation of Ago2 most likely impact the maturation of *miR-451*. A careful analysis of the miR-451 precursor and mature RNA structure reveals significant differences between miR-451 and others miRNAs. At first, they noted that the pre-miR-451 is shorter by 17 nucleotides than most of pre-miRNA making this molecule unlikely a Dicer substrate since this enzyme cannot

efficiently recognize and process short pre-miRNA efficiently[10]. Second, they also observed that the mature miR-451 includes the sequence of the loop region and expand into the complementary strand of the precursor. The authors concluded from these findings that the biogenesis of miR-451 must be unusual and most likely not inferring Dicer to process the precursor structure and produce mature miRNA.

To further test this hypothesis, the authors used embryonic stem cells carrying a conditional Dicer allele. Using that system, they observed that the production of mature miR-451 was not affected by the absence of Dicer whereas the loss-of-function of Dicer causes a strong decrease of others miRNA levels. To confirm this observation, the authors performed an *in vitro* assay to measure the efficiency of a recombinant Dicer protein to process pre-miRNA into mature miRNA. While a pre-*let-7* RNA molecule was effectively process into a mature miRNA form, recombinant Dicer was unable to generate the mature miR-451 from its precursor. These results clearly indicate that the biogenesis of the miRNA miR-451 is Dicer independent and in contrast to other miRNAs, the Argonaute protein Ago2 could be implicated in the biogenesis of this miRNA.

To confirm this hypothesis, the authors performed a thorough analysis of the small RNAs species sequenced from the Ago2<sup>ADH</sup> animal fetal liver. They observed a significant accumulation of the pre-*miR-451* and confirmed the absence of mature *miR-451* in Ago2<sup>ADH</sup> samples. The immunoprecipitation of the Ago2 complex from a fetal liver homogenate of the transgenic animal revealed that pre-miR-451 can bind to the mutated Argonaute. Finally, *in vitro* assays using both wild-type and catalytically inactive affinity purified Ago2 proteins confirm that Ago2 can successfully process the pre-miR-451 to generate miR-451 and this miRNA is also able to be loaded onto Ago2 to form the RISC complex.



**Figure 20 : A Dicer independent miRNA**

**A. Canonical microRNA biogenesis.** In mammals, the pre-miRNA is loaded onto a multiprotein complex consisting minimally of Dicer, Tar RNA Binding Protein (TRBP) and Ago2. The RNase III enzyme Dicer processes the precursor by cleaving the stem-loop to produce the mature miRNA. Ago2 bind this miRNA to form the RISC complex to target specific mRNA. **B. Ago2-dependent microRNA biogenesis.** For miR-451, the precursor is loaded directly onto Ago2, and this Argonaute cleaves the precursor RNA of this miRNA. The mature miR-451 is bound by Ago2 to form the RISC complex that targets erythropoietic-specific mRNAs.

The recent work of Cheloufi and colleagues represents an important breakthrough in the understanding of the catalytically competent Argonaute Ago2 and thus in the miRNA biogenesis in animals. Beside of clearly demonstrating the biological relevance of Argonaute cleavage in the

maturation of miRNAs as previously proposed [11-14], this study represents the first evidence of a miRNA maturation that is independent of Dicer. This unexpected miRNA biogenesis seems to be conserved among species as recently reported in Zebrafish by Cifuentes and colleagues [15]. The implication of Ago2 in the processing of pre-miRNA provides interesting evidence of the importance of the endonuclease activity of this Argonaute. It will be next interesting to know how many animal miRNAs require Ago2 to be produced. Since the cleavage of pre-miR-451 by Ago2 should generate a 30 nucleotides long RNA specie, it will be of great interest to understand how this miRNA precursor can be trimmed precisely to generate a 21-23 nucleotides long functional miRNA. To conclude, this exciting work is yet another example that clearly illustrates that we should be extremely cautious of making “general” rule in biology; especially in a fast pacing field like the miRNA mediated silencing.

## 2.2 References

Alisch, R.S., Jin, P., Epstein, M., Caspary, T., and Warren, S.T. (2007). Argonaute2 is essential for mammalian gastrulation and proper mesoderm formation. *PLoS Genet* 3, e227.

Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* 22, 2773-2785.

Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 22-32.

Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197.

Morita, S., Horii, T., Kimura, M., Goto, Y., Ochiya, T., and Hatada, I. (2007). One Argonaute family member, Eif2c2 (*Ago2*), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics* 89, 687-696.

Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M., *et al.* (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453, 534-538.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11, 228-234.



# **Chapitre 3 : The DeCapping Scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in *Caenorhabditis elegans***

Gabriel D. Bossé<sup>1</sup>, Stefan Ruegger<sup>2,3</sup>, Maria C. Ow<sup>4</sup>, Alejandro Vasquez-Rifo<sup>1</sup>, Evelyne L. Rondeau<sup>1</sup>, Victor R. Ambros<sup>4</sup>, Helge Großhans<sup>2</sup> and Martin J. Simard<sup>1</sup>.

1 : Laval University Cancer Research Centre, Oncology-Hôtel-Dieu de Québec (CHU de Québec), Quebec City, Québec G1R 2J6, Canada

2: Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Maulbeerstrasse 66, CH-4058 Basel, Switzerland.

3 : University of Basel, Petersplatz 1, CH-4003 Basel, Switzerland

4Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts 01605, USA

Corresponding Author:

Email: [Martin.Simard@crhdq.ulaval.ca](mailto:Martin.Simard@crhdq.ulaval.ca)

Running Title: DCS-1 is important for microRNA turnover



## Avant Propos

Le chapitre 3 décrit ma publication en tant que premier auteur : **The DeCapping Scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in *Caenorhabditis elegans*** publiée en avril 2013, dans le journal scientifique *Molecular Cell*. Cette publication représente l'aboutissement de mes travaux réalisés de mon stage d'été jusqu'à mon doctorat.

Avant mon arrivée au laboratoire, une ancienne étudiante, Évelyne Rondeau, avait mis au point un criblage, afin d'identifier des gènes synthétiques létaux avec le gène *alg-2*. Évelyne fut également ma superviseuse lors de mon arrivée au laboratoire et m'a enseigné les rudiments de *C. elegans* ainsi que les bases de la génétique. Lors de mon stage, j'ai fait des tests de complémentation afin de classer les différents candidats obtenus par le criblage, dans 6 groupes de complémentation distincts. Ma première année de maîtrise a été consacrée à identifier le gène affecté pour l'un de ces groupes. J'ai eu la chance de pouvoir compter sur la collaboration d'un étudiant au doctorat, Alejandro Vasquez, qui possédait une vaste expérience dans la génétique du nématode *C. elegans*. Cette partie du projet centrée sur l'utilisation de la technique de la cartographie par SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) a nécessité plusieurs mois de travail, menant en 2009 à l'identification de *dcs-1* comme étant le gène affecté dans ce groupe de complémentation. Au cours de la dernière année de ma maîtrise et des premières années de mon doctorat, j'ai donc caractérisé le rôle de DCS-1 dans la voie des microARNs. J'ai réalisé la presque totalité des expériences présentées dans cette publication, les expériences ont été conçues par moi-même en étroite collaboration avec le Dr. Martin Simard.

La quantification des microARNs présentés à la figure 21 a été réalisée par une stagiaire postdoctorale du laboratoire du Dr. Victor Ambros. Au moment de réaliser cette expérience nous ne disposions pas du matériel nécessaire pour mesurer efficacement l'expression de centaines de microARNs par PCR quantitatif en temps réel. Stefan Rügger et le Dr. Helge Grosshans ont apporté contribué à la correction du manuscrit tout en étant impliqués dans les échanges d'idées sur le projet. Le laboratoire du Dr. Helge Grosshans a également fourni l'anticorps pour la protéine XRN-1. Finalement, la liste d'auteurs est incomplète et un oubli important a été fait. La professionnelle de

recherche de notre laboratoire Sandra Piquet a réalisé le clonage qui a permis d'exprimer une copie de DCS-1 couplé à l'étiquette HA-. Cette protéine a été utilisée pour l'immunoprécipitation du complexe de dégradation.

## Résumé

Présents chez tous les métazoaires, les microARNs jouent un rôle critique dans la régulation de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Ces courtes molécules d'ARN altèrent la production protéique en liant spécifiquement les régions non codantes des ARNm. Des études récentes ont démontré que la maturation et la stabilité des microARNs sont des facteurs importants pour conserver l'homéostasie cellulaire. De nombreuses évidences supportent qu'une altération du niveau cellulaire de ces petites molécules régulatrices contribue au développement et au maintien de diverses maladies, dont le cancer. Nous avons identifié chez *C. elegans* une nouvelle protéine affectant la régulation des microARNs : DCS-1.

Chez *C. elegans*, la perte de DCS-1 affecte le niveau de plusieurs microARNs, affectant l'expression génique chez ces animaux. La perte de DCS-1 provoque l'accumulation de la forme mature de microARNs. Cette accumulation est causée par une diminution de l'efficacité de la dégradation des microARNs. Des analyses biochimiques supportent que DCS-1 affecte l'activité des enzymes responsables de la dégradation des microARNs chez le nématode de façon indépendante de son activité "decapping". Nos résultats démontrent que DCS-1 fait partie d'un complexe protéique impliqué dans la dégradation des microARNs. La conservation de cette protéine laisse présager que le rôle de DCS-1 pourrait être important pour le contrôle de la voie des microARNs chez l'humain.



## Abstract

In metazoans, microRNAs play a critical role in the post-transcriptional regulation of genes required for cell proliferation and differentiation. MicroRNAs themselves are regulated by a multitude of mechanisms influencing their transcription and post-transcriptional maturation. However, there is only sparse knowledge on pathways regulating the mature, functional form of a microRNA. Here, we uncover the implication of the decapping scavenger protein DCS-1 in the control of microRNA turnover. In *Caenorhabditis elegans*, mutations in *dcs-1* increase the levels of functional microRNAs. We demonstrate that DCS-1 interacts with the exonuclease XRN-1 *in vivo* and *in vitro*, that this interaction promotes microRNA degradation and thus without the requirement of its decapping scavenger activity, establishing independence of these two processes. Our findings thus indicate that DCS-1 is part of a degradation complex that performs microRNA turnover in animals.

## HIGHLIGHTS

- The loss of the *dcs-1* gene leads to an accumulation of functional miRNAs
- DCS-1 interacts with XRN-1 to promote miRNA degradation
- The role DCS-1 in miRNA turnover is independent of its decapping scavenger activity
- DCS-1 is a constituent of a complex important for miRNA turnover in animals



### 3.1 INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are ~22 nucleotide long non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level by binding to partially complementary sequences of target mRNAs (Ebert and Sharp, 2012). miRNA genes are mostly transcribed by RNA polymerase II to yield a primary miRNA transcript (pri-miRNA). The pri-miRNA undergoes processing by a multiprotein complex known as the microprocessor, to produce an intermediate called the precursor miRNA (pre-miRNA). After nuclear export, the pre-miRNA is cleaved by Dicer resulting in the mature miRNA. Subsequently, mature miRNAs are bound by an Argonaute protein to form the core of a multisubunit effector complex termed miRISC (miRNA-induced silencing complex) (Kim et al., 2009b; Krol et al., 2010). miRISC binds to partially complementary sequences found typically in the 3' untranslated region (3'UTR) of mRNAs, leading to their translational repression and/or degradation (Huntzinger and Izaurralde, 2011; Pasquinelli, 2012).

miRNA-mediated gene regulation is involved in diverse biological functions, including the control of development in metazoans (Ebert and Sharp, 2012) as well as cellular pathways such as DNA damage and stress responses (Hu and Gatti, 2011); (Leung and Sharp, 2010). Notably, miRNAs are dysregulated in many diseases, such as cancer (Esteller, 2011; Mendell and Olson, 2012). Thus, it is essential for a cell to tightly control miRNA biogenesis and turnover.

Like other RNA Polymerase II-transcribed genes, miRNA loci are subject to widespread transcriptional regulation. Additionally, the different biogenesis steps are controlled by cellular factors that either modulate the activity of processing factors or bind miRNA precursor molecules to interfere

with the processing of a subset of miRNAs (reviewed in (Bajan and Hutvagner, 2011; Krol et al., 2010; Newman et al., 2011). More recently, evidence has emerged that miRNA decay pathways contribute to the control of miRNA levels (Kai and Pasquinelli, 2010). In particular, the small RNA degrading nucleases (SDNs) mediate 3'-to-5' turnover of miRNAs in plants ((Ramachandran and Chen, 2008) and the exoribonucleases XRN-1 and XRN-2 function in 5'-to-3' miRNA degradation in *C. elegans* (Chatterjee et al., 2011; Chatterjee and Grosshans, 2009).

In this study, we identify the DeCapping Scavenger enzyme 1 (DCS-1, also known as DcpS) as a new player in the *C. elegans* miRNA turnover pathway. Our data reveal that DCS-1 stimulates XRN-1-mediated miRNA degradation through a physical interaction and that this process is independent of the decapping scavenger activity previously assigned to DCS-1.

## 3.2 RESULTS

### 3.2.1 Mutations in *dcs-1* lead to precocious adult fate and enhanced repression of miRNA targets

In order to discover new factors implicated in the miRNA pathway, we performed a genetic screen for genes that interact synthetically with *alg-2*, one of the two *C. elegans* Argonautes that functions in the miRNA pathway (Grishok et al., 2001). The rationale of the screen was based on the observation that an *alg-2* mutant (*alg-2(ok304)*) is viable whereas the combined loss of *alg-2* and its paralog *alg-1* results in lethality (Vasquez-Rifo et al., 2012). We generated an *alg-2(ok304)* strain that carries an extrachromosomal array expressing wild-type *alg-2* and a GFP marker. Since *alg-2* is not required for viability, the array is lost stochastically from this strain. Following chemical mutagenesis, we screened for animals that remained GFP positive, indicating a potential requirement for the array, and thus *alg-*

2, for survival. Among the six complementation groups isolated from this screen, we characterize here one group of two mutant alleles, *qbc2* and *qbc3*, that were lesions in the *dcs-1* gene (Figure 25).

The *dcs-1* gene encodes the decapping scavenger enzyme, which has been shown to hydrolyze the residual cap structure that results from 3'-to-5' decay of mRNAs by the exosome (Cohen et al., 2004; Liu et al., 2002). Whereas *alg-2(ok304); dcs-1(qbc3)* double mutant animals arrested in development as early as embryos post-fertilization (data not shown), *dcs-1(qbc3)* single mutant embryos developed normally. However, in contrast to wild-type animals, animals carrying lesions in the *dcs-1* gene displayed *alae* structures at the larval L4 stage, one developmental stage earlier than wild-type (Figure 21A; the developmental stage was confirmed by examining the vulval and gonad morphology (Figure 26A)). Re-establishing the expression of wild-type *dcs-1* using a transgenic array rescued the precocious formation of the *alae* (Figure 21A), confirming that this developmental phenotype is caused by the mutation in the *dcs-1* gene.

LIN-41 is an important regulator of the L4-to-adult developmental transition in *C. elegans*. During the L4-stage, *lin-41* mRNA levels are repressed by the let-7 miRNA allowing developmental progression (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). Similar to what we observe for *dcs-1*, *lin-41* loss-of-function alleles cause precocious formation of *alae* (Slack et al., 2000). To test whether *dcs-1(qbc3)* leads to misregulation of *lin-41*, a GFP reporter under the control of the *lin-41* 3'UTR was used. Consistent with the fact that the let-7 miRNA is only expressed during late larval stages (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000), we found, that in wild-type worms the GFP signal was present in L2-stage but decreased in adult animals. Although the signal was comparable for wild-type and *dcs-1(qbc3)* animals at the L2 stage, repression appeared enhanced in adults *dcs-1* mutant animals relative to wild-type (Figure 21B). This effect was accompanied by significantly decreased endogenous *lin-41*

mRNA levels in *dcs-1(qbc3)* relative to wild-type adult animals (Figure 26B). Notably, the effect on the *lin-41* mRNA level also suggest that the role *dcs-1* in this process does not involve the decapping scavenger activity, since its loss lead to an increase of overall mRNA levels (Liu and Kiledjian, 2005). Thus, our data indicate that the precocious *alae* observed in *dcs-1* mutant animals are a consequence of precocious down regulation of *lin-41*.

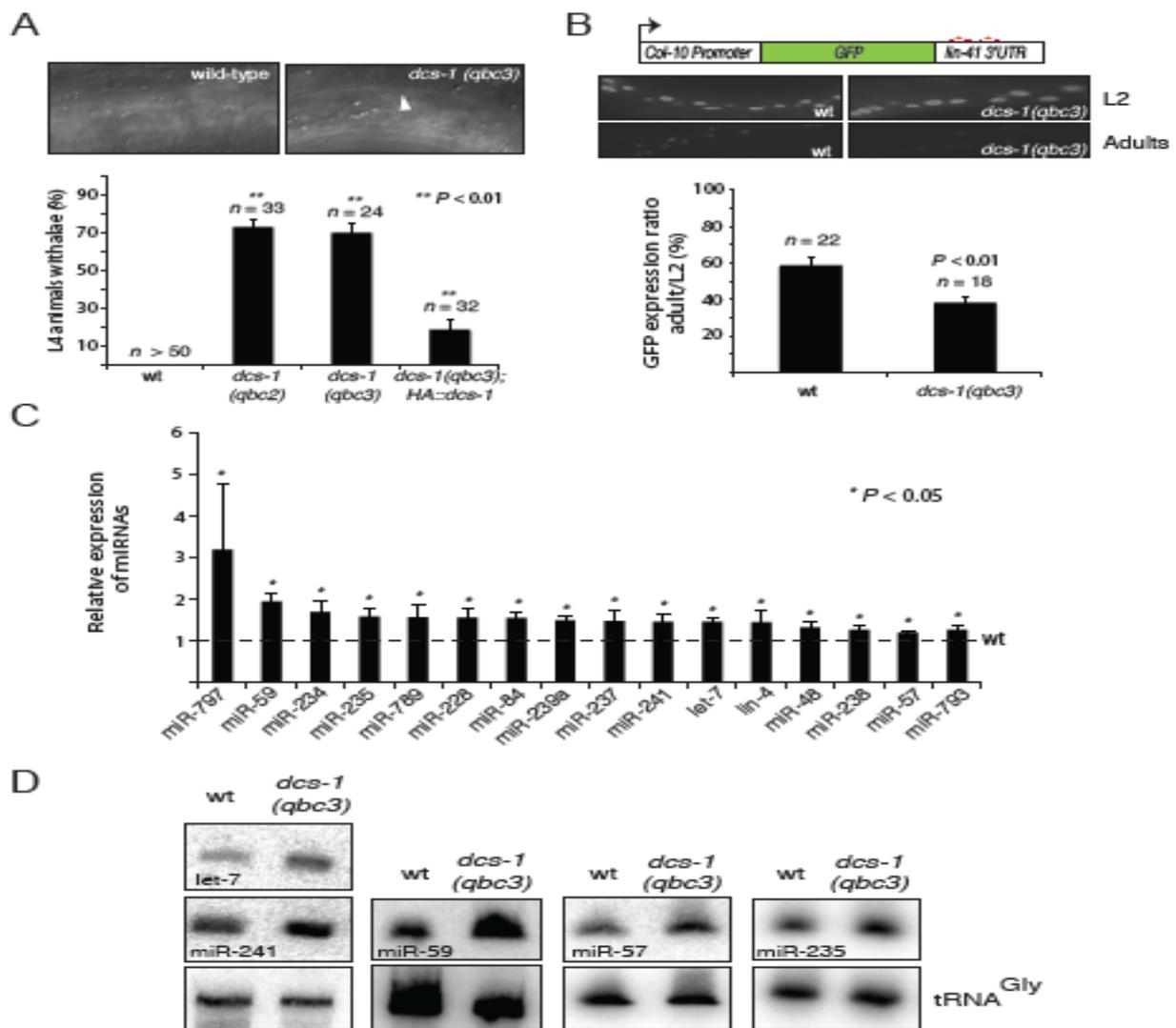


Figure 21 : The loss of DCS-1 affects miRNA-mediated gene regulation and miRNA levels

(A) *Alae* are produced precociously in *dcs-1* animals. L4 animals were precisely staged by observing vulval and gonad formation by Nomarski optics (Figure S2A) and the percentage (%) of animals with precocious *alae* (white arrow; right picture) was scored. Magnification is x 1,000. (B) To study *lin-41* regulation *in vivo*, we monitored the expression of Green Fluorescent Protein (GFP) under the control of a hypodermis specific *col-10* promoter and the *lin-41* 3' UTR containing the *let-7* miRNA binding sites (red; diagram). GFP is expressed during early larvae stages (L2) and downregulated when animals reach young adulthood (Adults). Young adult *dcs-1(qbc3)* animals repressed the miRNA-sensitive reporter more strongly than wild-type animals (Middle). Quantification of GFP in adults relative to L2 stage animals. The quantification of the GFP signal was performed by measuring the mean of the GFP detected in five different cells for each animal (Below). The magnification of all pictures is x 1,000. The number of animals (*n*) scored are indicated in parenthesis (A-B). (C-D) miRNAs levels of are increased in the *dcs-1* mutant. (C) The level of miRNAs found in *dcs-1(qbc3)* young adult animals were measured by quantitative reverse-transcription-PCR (TaqMan Assay) and compared with the levels found in wild-type animals (wt; 1). TaqMan assays for the small nucleolar RNAs sn2343 was used as the normalization control. The error bars represent the 95% confidence interval of three independent experiments. *P* values were obtained using normalized delta delta  $C_t$  values. Normalized delta delta  $C_t$  values were obtained by subtracting the mean of delta delta  $C_t$  from all experiments. (D) The levels of significantly increased miRNAs (*let-7*, *miR-57*, *miR-59*, *miR-235* and *miR-241*) in *dcs-1* mutant were detected by Northern blot hybridization of RNA samples purified from young adult animals. tRNA<sup>Gly</sup> was used as loading control.

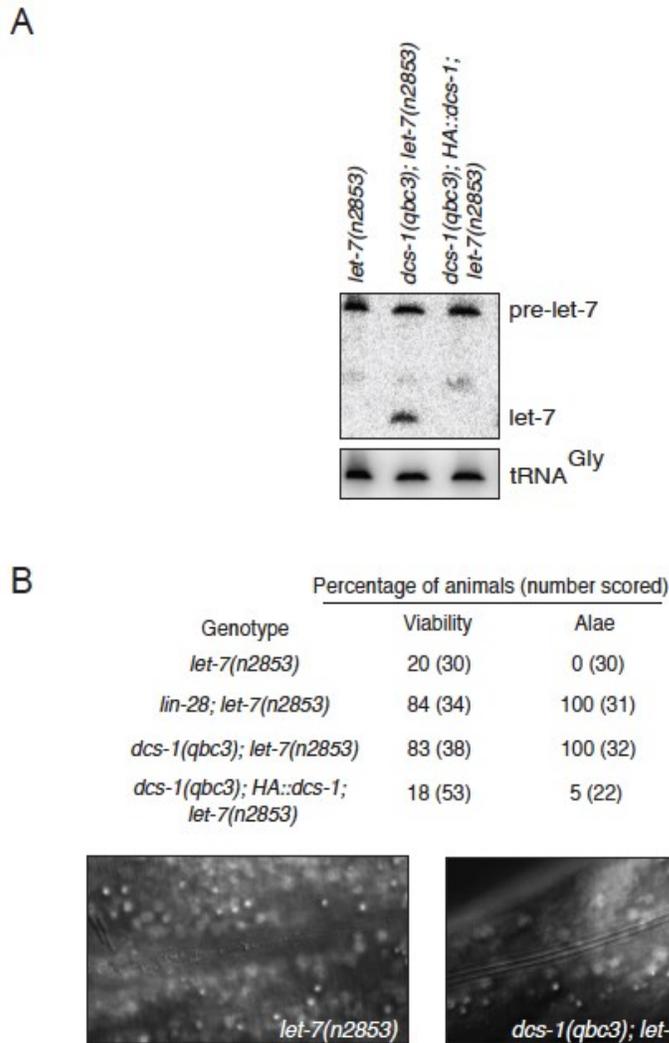
### 3.2.2 Mutations in *dcs-1* lead to an increase of functional miRNA levels

A possible explanation for the robust repression of a miRNA-targeted gene such as *lin-41* in *dcs-1* mutants is that the loss of *dcs-1* increases the levels of functional miRISC. To test this hypothesis, we monitored the level of two core constituents of miRISC, namely miRNAs and the Argonaute protein ALG-1 (Hutvagner et al., 2004). Whereas *ALG-1* mRNA and protein levels were unaltered in *dcs-1(qbc3)* (Figure 26C-D), the levels of 16 out of 97 tested miRNAs, including *let-7*, were significantly increased relative to wild-type (Figure 21C-D). It remains to be shown what the common feature is

that qualifies the miRNAs that change as DCS-1 targets since many miRNAs are not affected by the loss of *dcs-1* (Table 2).

To determine whether the elevated miRNA levels are due to enhanced miRNA transcription or processing, we examined the levels of let-7 miRNA precursors and did not detect any significant change in the level of pre-let-7 and pri-let-7 molecules between wild-type and *dcs-1(qbc3)* animals (Figure 27A-B). We conclude that the increase in mature let-7 is not a consequence of increased transcription, enhanced stability of the pri- or pre-miRNA molecules or enhanced processing which is consistent with a function for *dcs-1* that is not related to the decapping scavenger activity, but instead reflects an effect on the stability of mature miRNA molecules.

To obtain further evidence that the miRNAs that accumulate in *dcs-1* animals are functional, we investigated *let-7(n2853)* mutant animals. This point mutation in the mature let-7 miRNA causes reduced *let-7* levels, as well as temperature-sensitive *alae* defects and lethality due to vulval bursting (Reinhart et al., 2000). Similar to wild-type, the *let-7* RNA was significantly increased during the development of *dcs-1(qbc3); let-7(n2853)* animals (Figure 27C), with no significant changes in the pre-let-7 RNA levels (Figure 20A). Moreover, this increase in let-7 levels coincided with suppression of both the lethality and *alae* defects of *let-7(n2853)* animals to an extent comparable to that seen with *lin-28* knock-out, a conserved negative regulator of let-7 production (Figure 20B; (Lehrbach et al., 2009). We conclude that the loss of *dcs-1* leads to accumulation of functional miRNAs in animals.



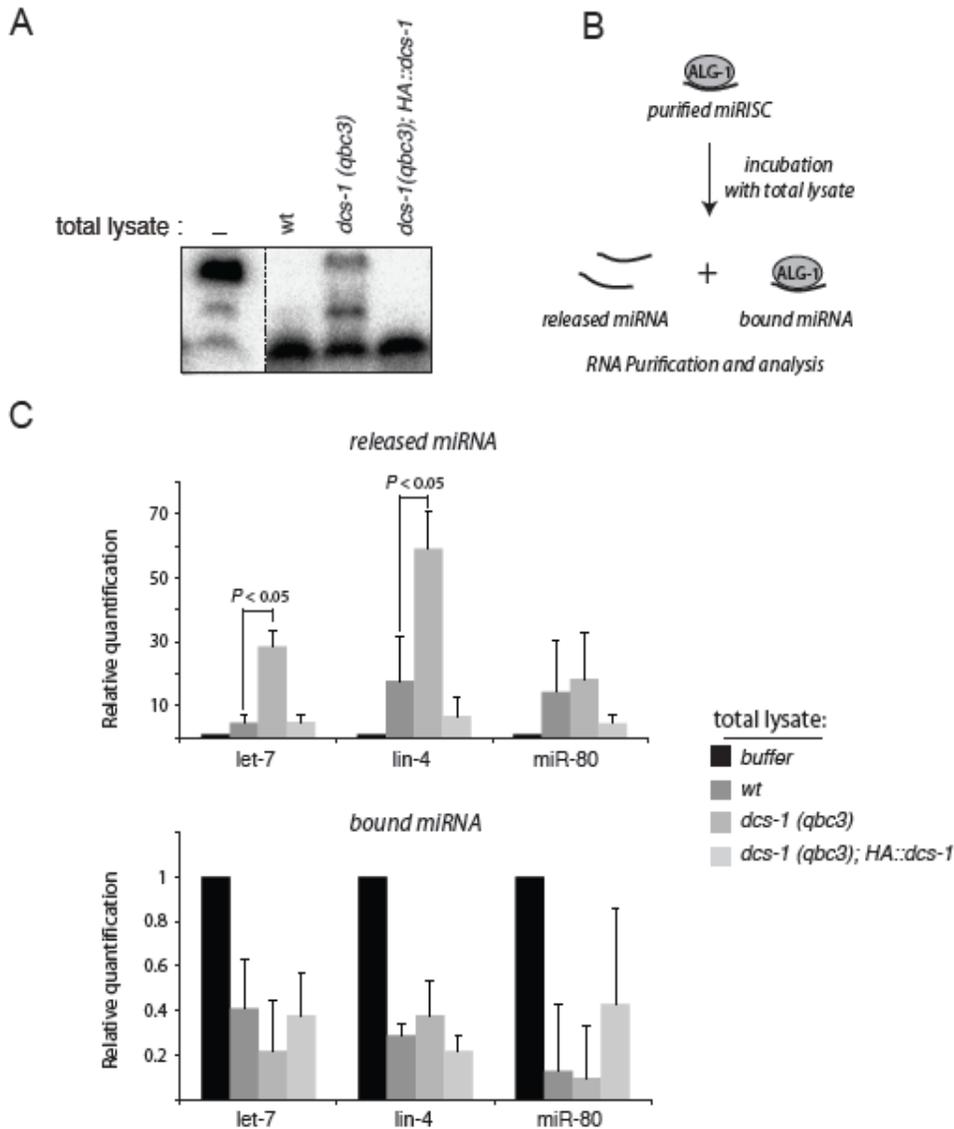
**Figure 22 : The loss of *dcs-1* function rescues *let-7* mutant developmental defects by increasing mature *let-7* miRNA levels**

(A) Detection by Northern blotting of *let-7* molecules in various genetic backgrounds of young adult animals. The detection of tRNA<sup>Gly</sup> by Northern hybridization acted as loading control. (B) Viability and complete adult *alae* were scored at 20°C on young adult animals in the genetic background listed. The number of animals scored are indicated in parenthesis.

### 3.2.3 DCS-1 is required for the degradation of miRNAs that are released from miRISC

Because our observations argue against a role of DCS-1 in miRNA transcription or biogenesis, we next sought to evaluate a potential role of DCS-1 in miRNA degradation. To this end, we performed miRNA degradation assays by incubating radiolabeled synthetic miRNA molecules with total worm lysates, as described previously (Chatterjee and Grosshans, 2009). While we observed complete degradation of synthetic let-7 after incubation with lysates prepared from wild-type animals, degradation was severely impaired in lysates prepared from *dcs-1(qbc3)* mutant animals (Figures 23A and 27D). This effect was specific because lysate from *dcs-1(qbc3)* animals that expressed a *dcs-1* transgene restored decay (Figure 23A). We conclude that DCS-1 is required for efficient miRNA degradation *in vitro*.

To further characterize the function of DCS-1 in miRNA degradation, we performed a miRNA release assay. In this assay, miRISC is first purified by immunoprecipitation of endogenous ALG-1, and then incubated with a miRNA-depleted worm lysate (by treating the extract with micrococcal nuclease). Subsequently, the miRNA molecules that remain associated with, or are released from, miRISC are quantified (Chatterjee and Grosshans, 2009). Incubation of miRISC with wild-type lysate led to efficient release of miRNAs, and this was unchanged when *dcs-1* mutant lysate was used (Figure 23C). However whereas wild-type lysate caused substantial degradation of the released miRNAs, which thus was detectable in only small amounts in the supernatant, *dcs-1(qbc3)* lysate caused a significant accumulation in the supernatant of let-7 and lin-4 (Figure 23C). By contrast, miR-80, a miRNA that is not affected by the loss of *dcs-1* (Table 2), did not accumulate in the supernatant either (Figure 23C). These data suggest that DCS-1 is important for the degradation of some miRNAs released from the miRISC.



**Figure 23 : DCS-1 is required for miRNA degradation**

(A) Degradation assays of a 5'-P<sup>32</sup> 21nt long RNA incubated for 15 minutes with total worm lysates produced from wild-type (wt), *dcs-1(qbc3)* mutant and *dcs-1(qbc3)* rescued with a HA::*dcs-1* transgene (HA::*dcs-1*) animals. Dashed lines indicate that unrelated lanes have been removed between samples. (B) Schematic of the miRNA release assay. (C) The miRISC purified by immunoprecipitation of endogenous ALG-1 was incubated with micrococcal nuclease-treated worm lysate and the *let-7*, *lin-4* and *miR-80* miRNAs that are released into the supernatant (top panel) or remains associated with ALG-1 complexes (bottom panel) were quantified by quantitative reverse-transcription-PCR (TaqMan Assay). The error bars represent the 95% confidence interval of three independent experiments. *P* values were obtained using a two-sided Student's test with the normalized C<sub>t</sub> values.

### 3.2.4 DCS-1 interacts with XRN-1 to form a miRNA degradation complex

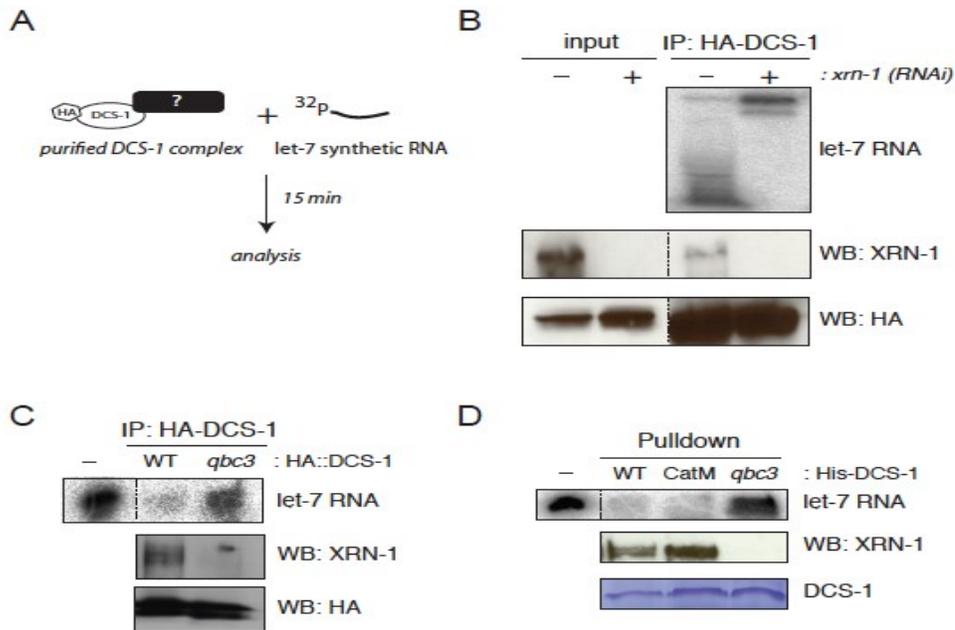
Since our previous results did not rule out the possibility that DCS-1 affected miRNA turnover indirectly, we immunoprecipitated HA-tagged DCS-1 complexes from rescued *dcs-1(qbc3)* animals and performed a miRNA degradation assay (Figure 24A). As previously observed with total lysates, the purified DCS-1 complex efficiently degraded exogenously supplied radiolabeled miRNA (Figure 24B). This confirms that miRNA degrading activity is associated with DCS-1.

The DCS-1 protein has dinucleoside triphosphate hydrolase activity, which allows it to remove the m7G cap from capped oligonucleotides, but is not known to degrade oligoribonucleotides themselves (Cohen et al., 2004). Hence, we hypothesized that a co-purifying RNase could endow DCS-1 immunoprecipitates with miRNA degrading activity. XRN-1 and XRN-2 appeared suitable candidates as these two 5'-to-3' exonucleases are associated with miRNA degradation in *C. elegans* (Chatterjee et al., 2011; Chatterjee and Grosshans, 2009). Because DCS-1 (Lall et al., 2005), and GFP-tagged XRN-1 but not XRN-2 are localized in the cytoplasm (Figure 28A-B), we investigated whether the DCS-1 purified complex contained the XRN-1 protein. Using an antibody specific to endogenous XRN-1 (SR & HG, unpublished data), we found that the functional HA::DCS-1 fusion protein did contain endogenous XRN-1 (Figure 24B).

To confirm that this interaction was functionally relevant for decay, we purified DCS-1 complexes from animals depleted for XRN-1 by RNAi and observed that miRNA degradation was lost (Figure 24B). Moreover, when we introduced a HA::*dcs-1* transgene carrying the L32P missense mutation found in *dcs-1(qbc3)* animals (Figure 23), both, the interaction with XRN-1 as well as the miRNA

degrading activity of the immunopurified DCS-1 was lost (Figure 24C). We conclude that XRN-1 is the catalytic engine driving miRNA turnover in the DCS-1 complex.

Finally, to determine whether the decapping scavenger activity of DCS-1 participates in miRNA degradation and to verify that the *qbc3* mutation affects binding to XRN-1, we performed pulldown experiments with recombinant wild-type, catalytically inactive (CatM) and *qbc3* mutant DCS-1 proteins (Figure 25). Whereas the wild-type and catalytically inactive DCS-1 interacted with XRN-1 and retain the degradation activity in the complex, the interaction as well as the degradation activity was lost with DCS-1 *qbc3* protein (Figure 24D). We therefore conclude that the implication of DCS-1 in miRNA turnover is uncoupled from its decapping scavenger activity. Because we did not observe any changes in *xrn-1* mRNA and protein levels in *dcs-1(qbc3)* animals (Figure 28C-D), our data support the notion that an interaction with DCS-1 promotes the enzymatic activity of XRN-1, rather than DCS-1 stabilizing XRN-1. Altogether, we conclude that DCS-1 and XRN-1 form an enzymatic complex that performs miRNA degradation in *C. elegans*.



**Figure 24 : DCS-1 and XRN-1 interacts to form a miRNA degradation complex**

(A) Schematic of the immunoprecipitation assay. (B) Transgenic animals are first exposed to either control (-) or *xrn-1* (+) dsRNA-expressing bacteria for 38 hrs followed by total protein extraction and HA::DCS-1 complex purification with beads coupled with anti-HA monoclonal antibody. Inputs represent 10% of the total protein lysate used for the immunoprecipitation (bottom panels). Dashed lines indicate that unrelated lanes have been removed between samples. (C) Same as (B) with transgenic lines expressing either wild-type (WT) HA-tagged DCS-1 or HA-DCS-1 with the point mutation found in *dcs-1(qbc3)* allele (*qbc3*). In both cases, the detection of HA::DCS-1 and XRN-1 was achieved by Western blotting. The minus (-) lane represents the amount of 5'-P<sup>32</sup> *let-7* RNA used for the assay. (D) The point mutation in DCS-1 abrogates the XRN-1 interaction and the exonuclease activity. Beads coupled with His tagged recombinant wild-type (WT), mutated in the catalytic Histidine triad (CatM) or mutated at the leucine residue 32 to proline (*qbc3*) DCS-1 protein were incubated with worm total protein extracts. Each DCS-1 purified complex were then incubated with the 5'-P<sup>32</sup> 21nt long *let-7* RNA incubated for 15 minutes. The minus (-) lane represents the amount of radiolabeled *let-7* RNA used for the assay. Coomassie staining monitored His-DCS-1 proteins and Western blotting was used to detect XRN-1 association.

### 3.3 DISCUSSION

Overall, our observations demonstrate that the interaction between DCS-1 and XRN-1 promotes the degradation of miRNAs. Consistent with this notion, the orthologous *S. cerevisiae* proteins Dcs1p and Xrn1p have recently been shown to interact, and Dcs1p is essential for Xrn1p enzymatic activity *in vitro* and, at least in the presence of a nonfermentable carbon source, *in vivo* (Sinturel et al., 2012). Strikingly, Sinturel and colleagues further observed that the stimulation of Xrn1p by Dcs1p did not require Dcs1p catalytic activity. Similarly, our *in vitro* results indicate that the catalytic activity of *C. elegans* DCS-1 is dispensable for XRN-1 interaction and stimulation. Therefore our data demonstrate that in addition to its previously characterized role in the degradation of the cap structure of mRNAs (Cohen et al., 2004; Liu et al., 2002; Wang and Kiledjian, 2001), DCS-1 contributes to miRNA turnover in animals by promoting the exonuclease activity of XRN-1 on miRNAs.

Currently, it is unknown how miRNAs are released from the miRISC for degradation by the DCS-1/XRN-1 complex. Recent crystal structures of yeast and human Argonautes showed that the 5' end of the small RNA is embedded within the Mid domain of the protein (Elkayam et al., 2012; Nakanishi et al., 2012; Schirle and Macrae, 2012) and thus most likely not accessible to the 5'-to-3' exonuclease complex. Our observation that DCS-1 does not promote miRNA release *in vitro*, but facilitates degradation of the released miRNA, is indeed consistent with the notion that DCS-1 and XRN-1 act after the release step, once the miRNA 5' end has become available. *In vivo*, our analysis clearly indicates that not only miRNA levels, but also miRNA activity are increased in *dcs-1* mutant animals, which suggests that miRNA will, at least in part, be retained on Argonaute. It therefore seems possible that the release of the miRNA from the Argonaute protein is driven by a dedicated

factor that itself needs to unload the miRNA onto the DCS-1/XRN-1 complex to promote further rounds of release.

Our finding that *dcs-1* loss-of-function mutations are embryonic lethal when combined with loss of the Argonaute *alg-2* in embryos, but promote miRNA accumulation in the presence of *alg-2* is puzzling, since this finding suggests that DCS-1 can have both positive and negative effects on miRNA activity. However, it seems possible that impaired miRNA decay alone might account for both phenotypes. In our recent effort to characterize *alg-1* and *alg-2*, we observed that while nearly all *C. elegans* miRNAs are associated with both Argonaute proteins, a small subset of miRNAs remains specifically interacting with ALG-1 or ALG-2 (Vasquez-Rifo et al., 2012). Therefore, if loss of *alg-2* leads to increased competition among miRNAs for access to ALG-1, overaccumulation of selected miRNAs by loss of DCS-1 could further compromise Argonaute loading of a subset of miRNAs. If these include miRNAs essential for embryonic viability, synthetic lethality might result. Future work on the function of DCS-1 during embryogenesis may help us to confirm or refute this idea.

Our data, along with previous observations, support that the level of miRNAs in *C. elegans* must be carefully controlled to enable precisely timed developmental transitions in animal development. Loss or excess of miRNAs can severely impair developmental timing, leading to heterochronic phenotypes, e.g., animals that adopt adult cell fates prematurely or not at all (Resnick et al., 2010). The fact that DCS-1 expression is developmentally regulated in *C. elegans* (Kwasnicka et al., 2003; Figure 28E), suggested that modulating DCS-1 levels may represent an efficient way to regulate XRN-1 activity and thus, rapidly turning over miRNAs at a specific point during development. This timely controlled expression of DCS-1 may also explain why some miRNAs are less sensitive to the loss of *dcs-1* function in animals. We speculate that the role of DCS-1 in miRNAs turnover would be

more prominent during important developmental switches where animals undergo significant changes in genes expression, such as the initial steps of embryogenesis and at the larvae-adult transition (Kaufman and Miska, 2010).

### **3.5 EXPERIMENTAL PROCEDURES**

#### *Nematode methods*

*C. elegans* strains were grown under standard conditions (Brenner, 1974). Animal transgenic lines were produced by microinjections, as described in (Mello and Fire, 1995). All worm culture was performed at 20°C unless otherwise noted.

#### *Synthetic lethal forward screen*

A population of 500,000 *ALG-2(ok304)Ex[ALG-2;sur-5::GFP]* animals was mutagenized with 50 mM of ethylmethanesulfonate (EMS) for 4 hours. A total of four GFP positive F2 animals per F1 were isolated from 1,000 GFP positive F1. We screened the F3 population from 1,556 F2 to obtain six unlinked mutations.

#### *Total worm lysate preparation*

Populations of synchronized animals were harvested at the adult stage. Harvested animals were homogenized in ice-cold lysis buffer (100 mM Potassium Acetate, 30 mM Hepes-KOH [pH 7.4], 2mM Magnesium Acetate, 1 mM DDT, 0.5% [v/v] Triton X-100, 2% [v/v] SUPERaseIn (Ambion) and Mini Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (1 tablet/10 ml solution) (Roche)). The homogenized

extract was clarified by centrifugation at 13,817 X *g* for 10 min at 4°C and the protein concentrations of the different samples were normalized using Dc protein Assay (Bio-Rad).

#### *DCS-1 protein purification*

HA-tagged DCS-1 wild-type and mutant proteins were expressed and purified as reported in (Cohen et al., 2004).

#### *Pulldown assays*

Purified recombinant DCS-1 proteins were first incubated with total worm protein lysate for 1h at 4°C followed by purification on a Talon affinity column (Clontech). Purified DCS-1 complexes were washed three times with lysis buffer and proteins associated with DCS-1 were identified by Western blotting.

#### *MicroRNA degradation assays*

Assays were performed as described previously in (Chatterjee and Grosshans, 2009).

### **3.6 REFERENCES**

- Bajan, S., and Hutvagner, G. (2011). Another "loophole" in miRNA processing. *Mol Cell* 44, 345-347.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Chatterjee, S., Fasler, M., Bussing, I., and Grosshans, H. (2011). Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. *Dev Cell* 20, 388-396.
- Chatterjee, S., and Grosshans, H. (2009). Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 461, 546-549.

Cohen, L.S., Mikhli, C., Friedman, C., Jankowska-Anyszka, M., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., and Davis, R.E. (2004). Nematode m<sup>7</sup>GpppG and m<sup>3</sup>(2,2,7)GpppG decapping: activities in *Ascaris* embryos and characterization of *C. elegans* scavenger DcpS. *RNA* 10, 1609-1624.

Ebert, M.S., and Sharp, P.A. (2012). Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* 149, 515-524.

Elkayam, E., Kuhn, C.D., Tocilj, A., Haase, A.D., Greene, E.M., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2012). The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell* 150, 100-110.

Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 12, 861-874.

Fay, D.S., Keenan, S., and Han, M. (2002). *fzr-1* and *lin-35/Rb* function redundantly to control cell proliferation in *C. elegans* as revealed by a nonbiased synthetic screen. *Genes Dev* 16, 503-517.

Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23-34.

Hu, H., and Gatti, R.A. (2011). MicroRNAs: new players in the DNA damage response. *J Mol Cell Biol* 3, 151-158.

Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12, 99-110.

Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2, E98.

Ji, L., and Chen, X. (2012). Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Res* 22, 624-636.

Kai, Z.S., and Pasquinelli, A.E. (2010). MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 17, 5-10.

- Kaufman, E.J., and Miska, E.A. (2010). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Semin Cell Dev Biol* 21, 728-737.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 126-139.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.
- Kwasnicka, D.A., Krakowiak, A., Thacker, C., Brenner, C., and Vincent, S.R. (2003). Coordinate expression of NADPH-dependent flavin reductase, Fre-1, and Hint-related 7meGMP-directed hydrolase, DCS-1. *J Biol Chem* 278, 39051-39058.
- Lall, S., Piano, F., and Davis, R.E. (2005). *Caenorhabditis elegans* decapping proteins: localization and functional analysis of Dcp1, Dcp2, and DcpS during embryogenesis. *Mol Biol Cell* 16, 5880-5890.
- Lehrbach, N.J., Armisen, J., Lightfoot, H.L., Murfitt, K.J., Bugaut, A., Balasubramanian, S., and Miska, E.A. (2009). LIN-28 and the poly(U) polymerase PUP-2 regulate *let-7* microRNA processing in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1016-1020.
- Leung, A.K., and Sharp, P.A. (2010). MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell* 40, 205-215.
- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X., and Kiledjian, M. (2002). The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J* 21, 4699-4708.
- Liu, H., and Kiledjian, M. (2005). Scavenger decapping activity facilitates 5' to 3' mRNA decay. *Mol Cell Biol* 25, 9764-9772.
- Mello, C., and Fire, A. (1995). DNA transformation. *Methods in Cell Biology* 48, 451-482.
- Mendell, J.T., and Olson, E.N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 148, 1172-1187.

Nakanishi, K., Weinberg, D.E., Bartel, D.P., and Patel, D.J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* 486, 368-374.

Newman, M.A., Mani, V., and Hammond, S.M. (2011). Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification. *RNA* 17, 1795-1803.

Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 13, 271-282.

Ramachandran, V., and Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science* 321, 1490-1492.

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.

Resnick, T.D., McCulloch, K.A., and Rougvie, A.E. (2010). miRNAs give worms the time of their lives: small RNAs and temporal control in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn* 239, 1477-1489.

Ruegger, S., and Grosshans, H. (2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem Sci* 37, 436-446.

Schirle, N.T., and MacRae, I.J. (2012). The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 336, 1037-1040.

Sinturel, F., Brechemier-Baey, D., Kiledjian, M., Condon, C., and Benard, L. (2012). Activation of 5'-3' exoribonuclease Xrn1 by cofactor Dcs1 is essential for mitochondrial function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8264-8269.

Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5, 659-669.

Vasquez-Rifo, A., Jannot, G., Armisen, J., Labouesse, M., Bukhari, S.I., Rondeau, E.L., Miska, E.A., and Simard, M.J. (2012). Developmental characterization of the microRNA-specific *C. elegans* Argonautes *ALG-1* and *ALG-2*. PLoS One 7, e33750.

Wang, Z., and Kiledjian, M. (2001). Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. Cell 107, 751-762.

### **3.7 ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Dr. Julie Claycomb, Dr. Gyorgy Hutvagner and members of our laboratories for comments on the manuscript. We also like to thank Eric Paquet for statistical support and Dr. Martin Bisailon for reagents and advices. Some nematode strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR). G.D.B. was a recipient of a Fonds de Recherche en Santé du Québec Scholarship and now is a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Graham-Bell Scholar. S.R. gratefully acknowledges his Boehringer Ingelheim Fonds PhD fellowship. Work in the lab of M.J.S has been funded by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Work in the lab of H.G. is funded by grants from the European Research Council (miRTurn; ERC 2419845), the Swiss National Science Foundation (SNF 31003A\_127052), and Friedrich Miescher Institute, which is supported by the Novartis Research Foundation. Contributions of VA and MO were supported by funding from the US NIH grant (R01 GM24028). M.J.S. is a Junior 2 scholar from Fonds de Recherche du Québec en Santé.

GDB and MJS conceived and designed nearly all experiments. SR and HG conceived and designed the XRN-1/-2 localization experiments and contributed tools. MCO and VRA conceived and designed the TaqMan miRNA profiling. ELR performed the screen. AVR contributed to the identification of mutant alleles from the screen. GDB, SR and MCO performed the experiments. GDB, SR, MCO, VRA, HG and MJS analyzed the data and wrote the paper.

### **3.8 SUPPLEMENTAL INFORMATION**

- Figure S1, related to Figures 1 and 4
- Figure S2, related to Figure 1
- Figure S3, related to Figures 1, 2 and 3
- Figure S4, related to Figure 4
- Table S1, related to Figures 1 and 3

```

DCS-1 M-----KRIAD EELVREERA EESTQKW----- 22
DCPS  MADAAPQLGKRKRELDVEEAHAAST EEK EAGVGNGTCA 38

DCS-1 -----LQDAKFQ EILGADSSHKSLFV-----LLSHPD 49
DCPS  PVRLPFGFRLQKVLRESARDK IIFLHGKVNEASGDGD 76

          qbc3 L32P
DCS-1  GSQGI LLANKSPFSEEKSDIEKLLATAQLQEISRNDIF 87
DCPS  GEDAVVILEKTPFQVEQV-AQLLTGSP ELQLQFSNDIY 113

          qbc2 64frameshift
DCS-1  GSYNIEIDPKLNLLKSQLIYPINDRLIAKYRQEEKFVI 125
DCPS  STYHLFPPRQLNDVKTTVVYPATEKHLQKYLRQDLRLI 151

DCS-1  RETPELYETVTRPYIEKYQLNLNWVYNCLEKRSEVDKI 163
DCPS  RETGDDYRNITLPHLESQSLSIQWVYNI LDKKA EADRI 189

DCS-1  VFEDPDNENGFVLLQDIKWDGKTLENLYVLAICHRRHGL 201
DCPS  VFENPDP SDGFVLI PDLKWNQQQLDDLYLIAICHRRGI 227

DCS-1  KSVRDLTGDDL EMLYNMRDKSLEA INQKYGLKTDQIKC 239
DCPS  RSLRDLTPEHLP LLRNILHQGQEA ILQRYRMKGDHLRV 265

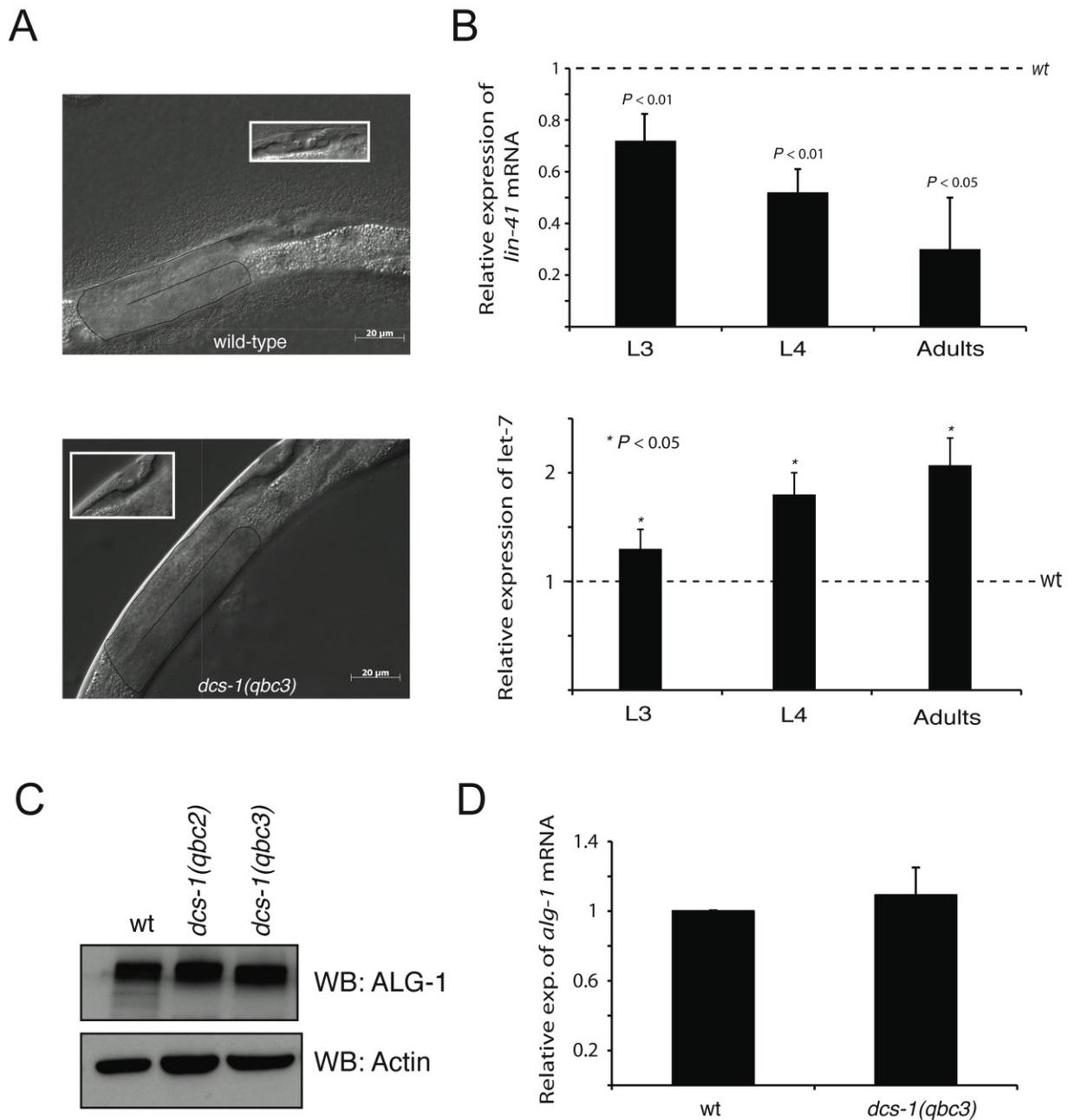
          A A A CatM
DCS-1  YFHYQPSFYHLHVHF INLKYDAPASTTMSA ILLDDVIN 277
DCPS  YLHYLP SYYHLHVHF TALGFEAPGSGVERAHL LAEVI E 303

          Catalytic domain
DCS-1  NLELNPEHYKKSTLTFTRKNGDKLMEMFREA LKN- 311
DCPS  NLECDPRHYQQRTLTFALRADDPLLKLLQEAQQSA 338

```

**Figure 25 : S1 DCS-1 protein alignment**

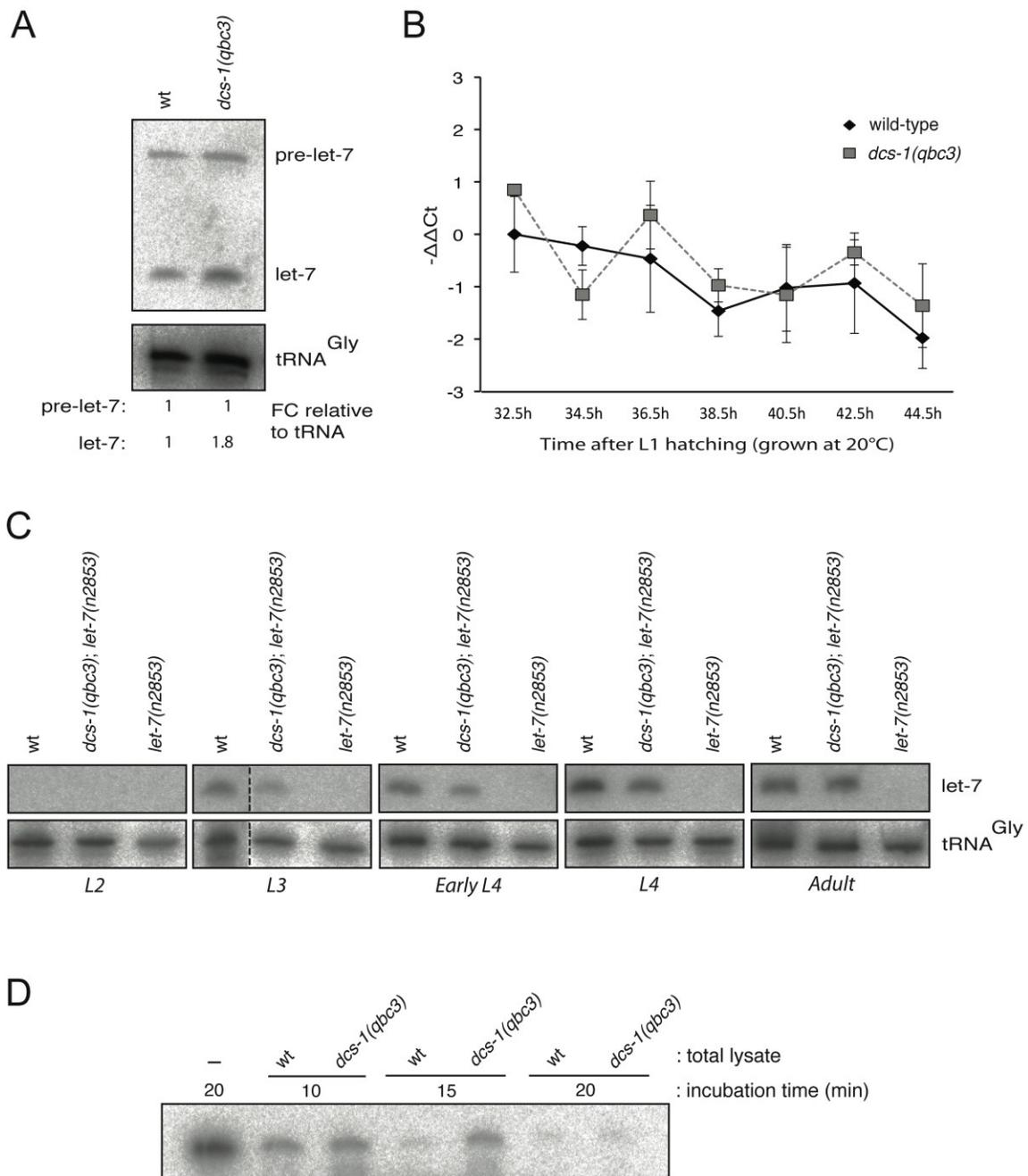
**Figure S1.** The amino acid sequence alignment between DCS-1 and its human homolog DcpS (41% identity and 67% similarity). The mutations in the two alleles (*qbc2* and *qbc3*) isolated from the screen are indicated. The *qbc2* allele represents a frame shift at position 64 (underlined in orange) that leads to Stop codon after 21 amino acids and the *qbc3* allele is a substitution of the leucine residue at position 32 for a proline (underlined in dark blue). To generate the catalytic dead DCS-1 variant (CatM), the three Histidines within the HIT motif (boxed sequence) were mutated for three Alanines (underlined in light blue).



**Figure 26 : S2 DCS-1 affects miRNA regulation**

**Figure S2.** (A) Vulva and gonad development are not affected in *dcs-1(qbc3)* animals. Representative Nomarski pictures of L4 stage animals. Magnification is x 400. (B) The level of a *let-7* target mRNA (*lin-41*) is decreased while the level of *let-7* is increased in *dcs-1(qbc3)* animals. The *lin-41* mRNA and *let-7* level were measured by quantitative reverse-transcription PCR (TaqMan Assay) in L3, L4 and adult-staged animals and compared with the level found in wild-type animals (wt; 1). The *act-1* mRNA and *sn2841* RNA were used as

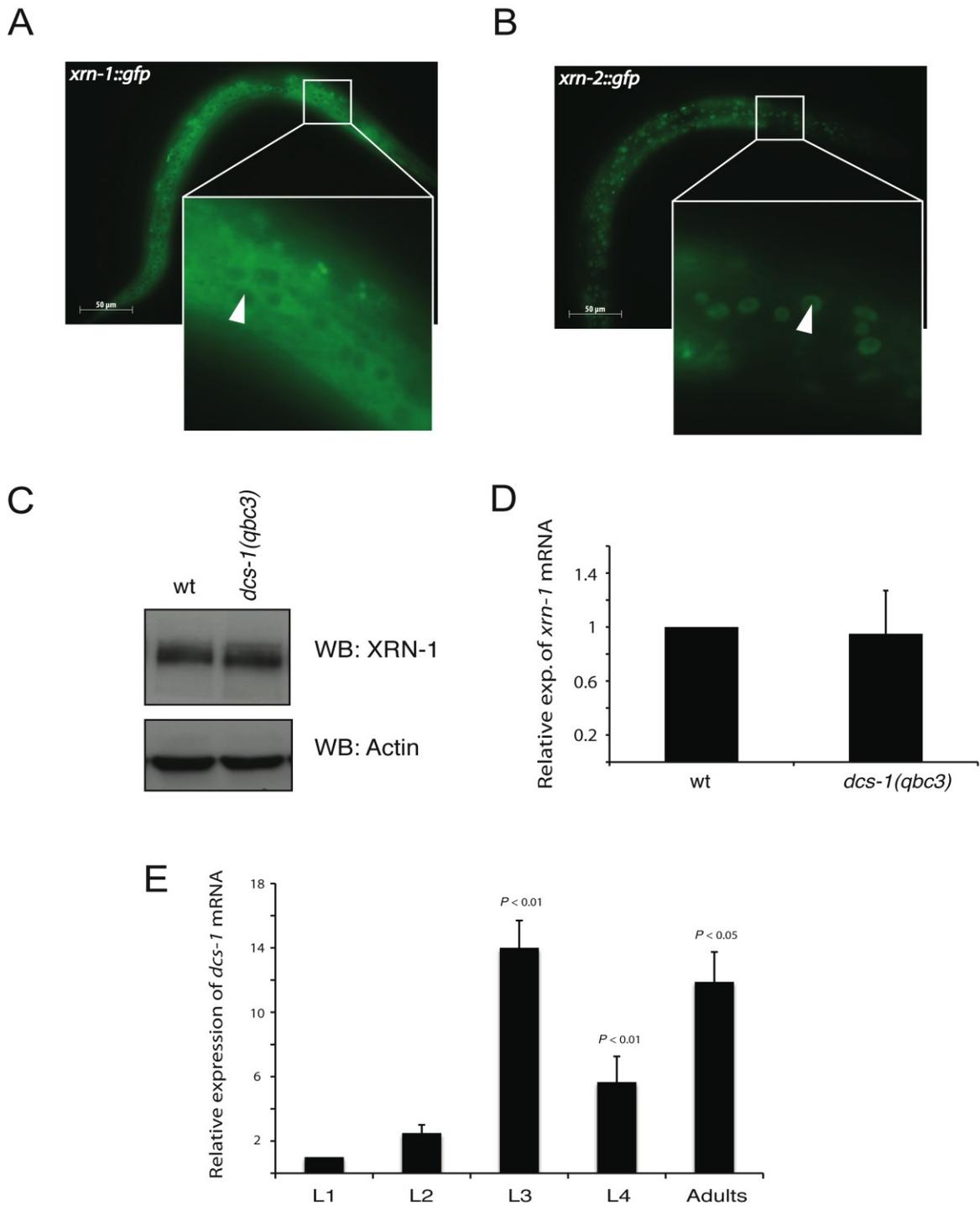
control RNAs for *lin-41* and *let-7* measurements, respectively. The error bars represent 95 % confidence interval of three independent experiments. *P* values were obtained using a two-sided Student's test with the normalized  $C_t$  values. (C-D) ALG-1 protein and mRNA levels are not affected by the alteration of *dcs-1*. (C) Whole worm protein extracts from wild-type (wt), *dcs-1(qbc2)* and *dcs-1(qbc3)* young adult animals were analyzed by Western blotting. The ACT-1 protein level was used as loading control. (D) ALG-1 mRNA level was measured by quantitative reverse-transcription PCR (TaqMan Assay) in *dcs-1(qbc3)* young adult animals and compared with the levels found in wild-type animals (wt; 1). *act-1* mRNA was used as control RNA. The error bars represent 95 % confidence interval of three independent experiments. *P* values were obtained using a two-sided Student's test with the normalized  $C_t$  values.



**Figure 27 : S3 DCS-1 is affecting only the mature form**

**Figure S3.** (A) Detection by Northern blot hybridization of *let-7* and *let-7* precursor molecules from total RNA samples purified from *dcs-1(qbc3)* and wild-type (wt) young adult animals. The detection of the tRNA<sup>Gly</sup> acted as loading control. Quantification of primary and precursor *let-7* molecules relative to the control RNA are shown. (B) Time course analysis of the primary *let-7* mRNA level. Three

independent population of L1 staged wild-type (wt) and *dcs-1(qbc3)* animals were grown at 20°C and collected at the time point indicated. The level of primary let-7 in each sample was measured by quantitative reverse-transcription PCR (TaqMan Assay). The *act-2* mRNA was used as control RNA. The error bars represent 95 % confidence interval of three independent experiments. The minus delta delta C<sub>t</sub> values were obtained by first subtracting the pri-let-7 C<sub>t</sub> from the *act-2* C<sub>t</sub> (our normalizer) and further subtracting the delta C<sub>t</sub> value of wild type at 32.5 hours. (C) The detection of the let-7 miRNA level by Northern blotting during animal development. tRNA<sup>Gly</sup> was used as a loading control. Dashed lines in the L3 stage panel indicate that wild-type (wt) sample was run at the same time but onto a different gel than the others samples. (D) Degradation assays of a 5'-P<sup>32</sup> 21nt long RNA incubated for 10, 15 and 20 minutes with total worm lysates produced from wild-type (wt) and *dcs-1(qbc3)* mutant. The minus (-) lane represents the amount of 5'-P<sup>32</sup> let-7 RNA used for the assay.



**Figure 28 : S4 DCS-1 and XRN-1 expression**

**Figure S4.** (A-B) XRN-1 is cytoplasmic and XRN-2 is nuclear. Live imaging of worms expressing *gfp* tagged transgenes of *xrn-1* (A) or *xrn-2* (B) reveals cytoplasmic localization for *xrn-1* and nuclear

localization for *xrn-2*. The arrowheads point to nuclei. (C-D) XRN-1 protein and mRNA levels are not affected by the alteration of *dcs-1*. (C) Detection of XRN-1 protein by Western blotting from whole worm protein extracts from wild-type (wt) and *dcs-1(qbc3)* young adult animals. The detection of ACT-1 protein level was used as loading control. (D) The *xrn-1* mRNA level was measured by quantitative reverse-transcription PCR (TaqMan Assay) in young adult animals and compared with the level found in wild-type animals (wt; 1). The *act-1* mRNA was used as control RNA. The error bars represent 95 % confidence interval of three independent experiments. *P* values were obtained using a two-sided Student's test with the normalized  $C_t$  values. (E) The expression of *dcs-1* is modulated during animal development. The *dcs-1* mRNA level was measured by quantitative reverse-transcription PCR (TaqMan Assay) in L1, L2, L3, L4 and adult-staged animals and compared with the level of the *dcs-1* mRNA found at the L1 stage. The *act-1* mRNA was used as control RNA. The error bars represent 95 % confidence interval of three independent experiments. *P* values were obtained using a two-side Student's test with the normalized  $C_t$  values.

**Tableau 2 : List of unaffected miRNAs in *dcs-1* mutant**

Not significantly changing microRNAs (72 total)

microRNA	Fold change	p Value	microRNA	Fold change	p Value
mir-243	2.89	0.40	mir-82	1.02	0.73
mir-788	2.31	0.06	mir-56	1.00	0.97
mir-46	1.92	0.23	mir-44	0.97	0.70
mir-254	1.74	0.25	mir-246	0.97	0.49
mir-248	1.66	0.16	mir-53	0.95	0.54
mir-798	1.60	0.22	mir-794	0.94	0.91
mir-786	1.59	0.42	mir-80	0.93	0.44
mir-358	1.59	0.20	mir-239b	0.92	0.89
mir-76	1.57	0.10	mir-52	0.91	0.43
mir-124	1.55	0.67	mir-359	0.89	0.87
mir-244	1.47	0.07	mir-73	0.88	0.35
mir-259	1.47	0.13	mir-67	0.87	0.27
mir-357	1.46	0.17	mir-61	0.85	0.07
mir-230	1.35	0.07	mir-71	0.83	0.15
mir-795	1.29	0.19	mir-250	0.80	0.08
mir-245	1.27	0.20	mir-247	0.79	0.50
mir-1	1.25	0.06	mir-792	0.76	0.16
mir-49	1.25	0.35	mir-799	0.76	0.51
mir-90	1.25	0.09	mir-231	0.76	0.16
mir-79	1.25	0.48	mir-796	0.72	0.47
mir-232	1.23	0.11	mir-74	0.70	0.13
mir-86	1.20	0.07	mir-70	0.69	0.13
mir-253	1.20	0.17	mir-51	0.65	0.05
mir-83	1.20	0.24	mir-43	0.48	0.10
mir-62	1.19	0.32	mir-38	0.28	0.06
mir-2	1.18	0.16	mir-41	0.25	0.08
mir-34	1.16	0.12			
mir-60	1.15	0.07			
mir-50	1.13	0.11			
mir-63	1.12	0.49			
mir-229	1.12	0.20			
			<u>Down regulated microRNAs (9 total)</u>		
microRNA	Fold Change	p Value	microRNA	Fold Change	p Value
mir-240	1.12	0.07	mir-77	0.79	0.04
mir-81	1.12	0.09	mir-75	0.79	0.02
mir-236	1.10	0.38	mir-47	0.69	0.04
mir-87	1.09	0.45			

mir-85	1.09	0.19	mir-35	0.43	0.04
mir-233	1.09	0.10	mir-39	0.34	0.01
mir-66	1.09	0.51	mir-36	0.34	0.01
mir-252	1.08	0.20	mir-42	0.33	0.03
mir-72	1.08	0.15	mir-37	0.32	0.001
mir-58	1.08	0.13	mir-40	0.20	0.01
mir-45	1.08	0.14			
mir-65	1.04	0.61			
mir-54	1.02	0.67			
mir-55	1.02	0.65			
mir-64	1.02	0.77			

A list microRNAs either not affected or downregulated in *dcs-1* mutant. *P* values were obtained using normalized delta delta  $C_t$  values. Normalized delta delta  $C_t$  values were obtained by subtracting the mean of delta delta  $C_t$  from all three experiments.

## SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *C. elegans* strains

*C. elegans* strains used are: Wild-type N2; MJS11: *ALG-2(ok304) Ex[gfp::ALG-2, sur-5p::gfp]; dcs-1(qbc2); dcs-1(qbc3); lin-28(n719); let-7(n2853)*; 612.5: *col-10p::GFP::lin-41 3'UTR*; MJS76: *dcs-1(qbc3)ln[dcs-1p::ha::dcs-1::unc-54 3'UTR; pRF4]* and; MJS77: *dcs-1(qbc3)ln[dcs-1p::ha::dcs-1L32P::unc-54 3'UTR; pRF4]*.

### *Microscopy*

Normarski images were collected using a Zeiss AxioCam HRm digital camera mounted on a Zeiss Axio Imager M1 microscope. The picture was analyzed with Axiovision 4.8 software.

### *Total RNA extraction*

The total RNA from around 300,000 worms resuspended in TRI Reagent (Sigma) was extracted by repetitive flash-freeze followed by quantification.

### *Quantitative real-time PCR*

Quantitative RT-PCR analyses were performed with 100ng of total RNA using either TaqMan Gene Expression Assay kit (Life Technologies) for detecting the primary *let-7* RNA molecule and *lin-41*, *ALG-1*, *act-1* and *act-2* mRNAs or SRBR green ROX mix (Invitrogen) for detecting *xrn-1* and *tba-1* mRNAs following manufacturers procedures. Quantitative RT-PCR analyses of *let-7*, *lin-4* microRNAs and *sn2841* (small nucleolar RNA; endogenous control) were performed with 10 ng of total RNA using TaqMan microRNA Assay kit (Life Technologies) following manufacturer procedures. Specific

assays for *let-7* (Assay ID: 000377), *lin-4* (Assay ID: 000258), *sn2841* (Assay ID: 001759) and *sn2343* (Assay ID: 001760) were purchased from Life Technologies.

The multiplexing microRNA profiling was performed with 5 ng of total RNA prepared from adult wild-type and *dcs-1(qbc3)* animals following procedures, as previously described in (Martinez et al., 2008).

#### *Northern blotting*

Northern hybridizations were performed as described by ((Drinnenberg et al., 2009)) with the only modification that we used Genescreen plus membrane (Perkin Elmer). Signals were revealed with FLA-5100 Phosphoimager (Fujifilm) using Fujifilm screens and visualized and quantified with ImageGauge 4.1 (Fujifilm). DNA probes were designed and radiolabeled using the Starfire system (IDT) and  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP (Perkin Elmer).

#### *Preparation of the radiolabeled let-7 RNA*

The 5' radio-labeling of synthetic mature miRNAs was performed with PNK and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. All RNAs were gel purified prior used.

#### *MicroRNA release assay*

ALG-1 immunoprecipitation was performed as described in (Vasquez-Rifo et al., 2012). The microRNA release assays were performed as in (Chatterjee and Grosshans, 2009). After incubation, total RNA molecules from the supernatant and the beads were extracted and detected by quantitative reverse-transcription PCR (TaqMan Assay).

#### *Protein Immunoprecipitation*

Immunoprecipitation of HA::DCS-1 containing protein complexes was performed by first pre-clearing whole worm lysate with 20 µl of normal rat-IgG AC (Santa Cruz Biotechnology) for 1 mg of total protein during 60 minutes at 4°C. The cleared extract was then incubated with 15 µl of HA monoclonal antibody covalently linked to Protein G Agarose beads (Roche) for 1 hour at 4°C. Beads were then washed three times with ice-cold lysis buffer.

#### *Western Blot analysis*

To detect XRN-1 or HA-tagged DCS-1, the beads were boiled for 10 minutes in 20 µl of SDS loading buffer (10 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% [w/v] SDS, 100 mM DDT and 10% [v/v] glycerol) and proteins were resolved on gradient (4% to 20 %) Criterion™ precast gel (Biorad) and transferred to Hybond-ECL membranes (Amersham Biosciences). Membranes were incubated overnight at 4°C with either antibody: (i) Mouse monoclonal to HA [12CA5] (Roche) diluted 1:3,000; or (ii) Rabbit polyclonal to XRN-1 protein (Q4886) diluted 1:2,000. Antibodies were diluted in PBST-5% milk solution (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl [pH 7.4], and 5% [w/v] dried milk). The membrane was incubated for 1 hour at room temperature with HRP-conjugated secondary antibody in PBST and then visualized by Western Lightening ECL Kit (Perkin Elmer).

#### *List of oligonucleotides*

-Starfire DNA probes

*let-7* : aactatacaacctactaccta

miR-57 : acacacagctcgatctacaggta

miR-59 : catcatcctgataaacgattcga

miR-235 : tcaggccggggagagtgaata

miR-241 : tcatttctcgactaccta

tRNA<sup>Gly</sup>: gcttgaaggcatccatgctgaccatt

-For quantitative Real-time PCR

To detect *xrn-1* by SYBR green:

Foward: ccgctggttgtaaggatgt

Reverse: ctccatttcttgcggagag

To detect *tba-1* by SYBR green:

Foward: gtacactccactgatctctgctgacaag

Reverse: ctctgtacaagaggcaaacagccatg

Custom Taqman probes for *pri-let-7*, *lin-41*, *ALG-1*, *act-1* and *act-2* are available upon request.

#### SUPPLEMENTARY REFERENCES

Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R., and Bartel, D.P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science* 326, 544-550.

Martinez, N.J., Ow, M.C., Barrasa, M.I., Hammell, M., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Roth, F.P., Ambros, V.R., and Walhout, A.J. (2008). A *C. elegans* genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes Dev* 22, 2535-2549.

# **Chapitre 4 : Identification d'une phosphatase impliquée dans la régulation de la stabilité des microARNs**

*Gabriel D. Bossé, Lucile Fressigné, Guillaume Landry-Proulx, Sandra Piquet et Martin J. Simard*



## **Avant propos**

Bien que la voie des microARNs ait fait l'objet de plusieurs études, de nombreuses étapes de la biogenèse demeurent incomprises. La dégradation ou le recyclage des microARNs en font partie.

La découverte que DCS-1 forme un complexe de dégradation avec l'enzyme XRN-1 fait en sorte que DCS-1 est le premier modulateur de la dégradation des miARNs à avoir été identifié chez les animaux. L'identification du complexe de dégradation chez *C. elegans* nous plaçait dans une position enviable pour tenter de pousser la caractérisation de ce complexe plus loin.

Les outils développés lors de cette étude, nous permettaient d'identifier d'autres facteurs impliqués dans ce complexe de dégradation. L'immunoprécipitation de la protéine DCS-1 et l'identification de ces interacteurs par spectrométrie de masse nous ont permis d'établir une liste de candidats intéressants, pouvant être impliqués dans ce complexe. Ce chapitre porte sur mes travaux réalisés depuis la publication de mon article en 2013 et concerne la caractérisation de l'un de ces candidats. Certains des travaux présentés dans ce chapitre ont été faits en collaboration avec une nouvelle étudiante au doctorat dans le laboratoire; Lucile Fressigné ainsi qu'avec un stagiaire d'été sous ma supervision, Guillaume Landry-Proulx.



## Résumé

Chez tous les métazoaires, les microARNs jouent un rôle critique dans la régulation de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Ces courts ARNs non codants forment le complexe miRISC et affectent la production protéique, en liant des séquences spécifiques dans les régions non traduites des ARNm. Des études récentes ont démontré que la stabilité et le contrôle de la biogenèse des microARNs sont des étapes importantes pour l'activité de cette voie de régulation. Plusieurs protéines telles que p53 peuvent moduler la biogenèse des microARNs et plusieurs autres protéines ont été impliquées dans le contrôle de la stabilité et de la dégradation des microARNs. Un contrôle serré de ces ARNs non codants est important puisque la dérégulation des microARNs est associée à plusieurs maladies, dont le cancer.

Une étude réalisée préalablement dans le laboratoire a permis d'identifier la protéine DCS-1 comme un important régulateur du niveau des microARNs chez *C. elegans*, en formant un complexe de dégradation avec l'enzyme XRN-1. Afin de mieux comprendre la régulation de la dégradation des microARNs, nous avons décidé d'identifier d'autres membres du complexe de dégradation par spectrométrie de masse. L'analyse d'un mutant de l'une des protéines identifiées a révélé que la perte de fonction de *ppm-2* entraîne plusieurs phénotypes associés à une perte des microARNs et que *ppm-2* interagit génétiquement avec les membres de la famille *let-7* en augmentant les défauts associés à la perte de fonction de ces microARNs. La perte de *ppm-2* entraîne une diminution de plusieurs microARNs. Nos résultats suggèrent que le complexe de dégradation pourrait être plus stable et entraîner une plus grande dégradation des microARNs. PPM-2 étant une phosphatase, nous en sommes présentement à identifier la protéine dont la phosphorylation est stabilisée en absence de *ppm-2*.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la phosphorylation d'une protéine importante pour le contrôle du niveau des microARNs matures affecte l'activité ou les interactions de cette protéine et que la stabilisation de cette phosphorylation entraîne une déstabilisation des microARNs matures.



## 4.1 Introduction

Certains microARNs importants pour établir la transition entre deux stades de développement ou encore deux étapes du cycle cellulaire doivent être rapidement éliminés lorsque cette transition est complétée. Ainsi, plusieurs microARNs présentent une expression dynamique et maintes études ont démontré que certains d'entre eux font l'objet d'une dégradation spécifique en réponse aux changements de l'environnement cellulaire ou au fil de la progression du développement (Rüegger and Grosshans, 2012). Il est également connu qu'une dérégulation des microARNs est associée à plusieurs maladies, comme le cancer. Il est donc essentiel pour une cellule de contrôler leur production ainsi que leurs dégradations (Mendell and Olson, 2012).

Les différentes étapes de la biogenèse des microARNs ont été étudiées intensivement au cours des dernières années, de telle sorte que plusieurs protéines régulant la maturation des microARNs ont été caractérisées (Ha and Kim, 2014). Par contre, les mécanismes impliqués dans le recyclage et/ou la dégradation des facteurs formant le miRISC sont encore nébuleux. Certaines évidences suggèrent que les composantes du RISC seraient recyclées grâce à l'autophagie, au transport vésiculaire ou encore le protéasome (Bronevetsky et al., 2013; Gibbings et al., 2012; Gibbings et al., 2013; Vasquez-Rifo et al., 2013), alors que les microARNs seraient dégradés par des exonucéases (Rüegger and Grosshans, 2012). Par contre, ces mécanismes affectent les composants du miRISC après la dissociation de ce dernier, mais on ne connaît pas comment celui-ci est dissocié.

De plus, la liaison des microARNs aux protéines Argonautes est très stable. Le relâchement du microARN doit être stimulé, que ce soit par le recrutement d'une autre protéine ou encore par un changement dans l'état des modifications post-traductionnelles de l'Argonaute. Ce relâchement est nécessaire pour rendre le microARN accessible aux enzymes de dégradation, puisqu'il est connu que l'interaction avec les protéines Argonautes protège les microARNs (Chatterjee et al., 2011; De et al., 2013). De façon similaire, les différentes études portant sur l'interaction entre les microARNs et leurs cibles ont démontré que les sites de reconnaissance de microARNs ne stimulent pas leurs dissociation et ont plutôt un effet protecteur sur les microARNs (Ameres et al., 2010; Chatterjee et al., 2011; De et al., 2013). La dissociation entre le microARN et sa cible doit donc être stimulée par un facteur encore inconnu pour le moment.

Ensuite, même lorsque les microARNs sont relâchés, les règles gouvernant leur dégradation sont pour le moment un mystère. Les études concernant la dégradation des microARNs chez *C. elegans* ont révélé que seule une fraction des microARNs sont sensibles à la perte des composants du complexe de dégradation (Bosse et al., 2013; Chatterjee et al., 2011; Chatterjee and Grosshans, 2009). Il est possible que ces enzymes pourraient avoir une certaine spécificité pour certains microARNs. Cependant, il est connu que l'interaction avec la cible ainsi que l'extrémité 3' du microARN influence la disponibilité pour les enzymes de dégradation (Bail et al., 2010). Ces deux paramètres pourraient influencer la sensibilité des différents microARNs au complexe de dégradation.

Finalement, la dynamique de formation du complexe et son recrutement aux microARNs restent encore à déterminer.

En résumé, il y a encore de nombreuses étapes nébuleuses dans la régulation de la stabilité des microARNs matures. De plus amples études sur les facteurs impliqués dans la dégradation de ces ARNs pourraient permettre d'apporter certaines réponses à ces questions.

## **4.2 Objectif**

Notre objectif principal pour ce projet était d'étudier la régulation du complexe de dégradation des microARNs chez le nématode *C. elegans*. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'identification et la caractérisation de partenaires protéiques de DCS-1 nous permettraient de mieux comprendre le fonctionnement et la régulation de ce complexe.

### 4.3 Matériel et méthodes:

*Souches de C. elegans utilisées :*

Sauvage N2; *let-7(n2853)*; 611.2: *col-10p::GFP::lin-41 3'UTR*; MJS76: *dcs-1(qbc3)ln[dcs-1p::ha::dcs-1::unc-54 3'UTR; pRF4]* and; MJS77: *dcs-1(qbc3)ln[dcs-1p::ha::dcs-1L32P::unc-54 3'UTR; pRF4]*; *ppm-2(VC2153)*; *hecd1(RB1319)*; *let-60(n1046)*, VT944

*Séparation des protéines immunoprécipitées*

Après immunoprécipitation des protéines HA::DCS-1(Wt) et HA::DCS-1(L32P), les billes ont été bouillies pendant 10 minutes dans 20 µl de tampon de charge SDS (10 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% [w/v] SDS, 100 mM DDT et 10% [v/v] glycerol). Les protéines ont été séparées par gel SDS page, le gel a ensuite été coloré avec le SYPRO (BIO-RAD) en suivant le protocole du manufacturier. Les bandes ont été révélées à l'aide d'une lampe ultraviolet (U.V.) avant d'être découpées et être envoyées pour l'analyse en spectrométrie de masse.

*Spectrométrie de masse*

Les échantillons ont été traités et analysés par la **plate-forme protéomique** du Centre de génomique de Québec situé au centre de recherche du CHU de Québec

*Microscopie*

Les images Normarski ont été collectées avec la caméra digitale Zeiss AxioCam montée sur un microscope Zeiss Axio Imager M1. Les images ont été analysées avec le logiciel Axiovision 4.8.

*Extraction d'ARN total*

L'ARN total a été extrait d'environ 300 000 vers resuspendu dans du TRI Reagent (Sigma) par des cycles de congélation rapide suivie d'une décongélation. L'ARN obtenu a été resuspendue dans de l'eau et quantifié.

### *Analyse Northern*

L'analyse Northern a été réalisée tel que décrits dans Drinnenber et al 2009 avec l'utilisation de la membrane Genescreen plus (Perkin Elmer). La détection a été réalisée avec l'appareil FLA-5100 Phosphoimager (Fuji film) à l'aide d'écrans Fujifilm. Les images ont été obtenues et analysées avec le logiciel ImageGauge 4.1 (fujifilm). Les sondes d'ADN ont été mises au point et radiomarquées avec le système Starfire IDT et de l'alpha ATP P32 (Perkin Elmer)

### *Préparation du microARN let-7 radiomarké*

Le radiomarquage en 5' du microARN synthétique a été réalisé avec l'enzyme PNK (NEB) et [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Perkin Elmer). Les ARNs ont été purifiés sur gel avant l'utilisation.

### *Immunoprécipitation de protéine*

L'immunoprécipitation de HA::DCS-1 a été réalisée en incubant un extrait protéique total de *C. elegans* 20  $\mu$ l d'IgG de rat AC (Santa Cruz Biotechnology) pour 1 mg de protéine totale pendant 60 minutes à 4°C afin d'éliminer les interactions non spécifiques. Après élimination des IgGs de rat normal, l'extrait a ensuite été incubé avec 15  $\mu$ l d'anticorps HA couplé à des billes Protéine G (roche) pendant 60 min à 4°C. Les billes étaient ensuite lavées 3 fois avec du tampon d'extraction froid.

### *Immunobuvardage de type western*

Pour détecter XRN-1, HA::DCS-1, les billes ont été bouillies pendant 10 minutes dans 20  $\mu$ l de tampon de charge SDS (10 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% [w/v] SDS, 100 mM DDT et 10% [v/v] glycerol) et les protéines ont été séparées sur un gel gradient (4% to 20 %) Criterion™ precast gel (Biorad) et transférées sur membrane Hybond-ECL (Amersham Biosciences). Les membranes ont été incubées à 4°C avec l'anticorps correspondant: (i) Souris monoclonale pour HA [12CA5] (Roche) dilué 1:3000; ou (ii) monoclonale de lapin pour la protéine XRN-1 dilué à 1:2000. Les anticorps ont été dilués dans une solution de 5 % de lait dans du PBST ( (137 mM NaCl, 10 mM phosphate, 2.7 mM KCl [pH 7.4], et 5% [w/v] lait en poudre). La membrane a été incubée pendant une heure à température de la pièce avec un anticorps secondaire conjugué avec le HRP dans du PBST et visualisé avec le Western Lightning ECL Kit (Perkin Elmer).

Pour la détection d'ALG-1, XRN-1 et de DCS-1 dans le mutant *ppm-2*, 75  $\mu$ g d'extrait protéique total a été bouilli pendant 10 minutes avec le même tampon de charge. Les étapes suivantes pour le

protocole sont les mêmes. Les anticorps utilisés pour ALG-1 : anticorps de lapin dilué 1:3000 et pour DCS-1 : anticorps de rat dilué 1:1000.

Liste d'oligo nucléotides utilisés

-Sonde d'ADN Starfire pour Northern Blot

*let-7* : aactatacaacctactaccta

*lin-4* : tcacacttgaggctcagga

miR-241 : attgtctctcacgtgcttcac

miR-59 : cccgcatattagacgtatcgac

miR-90 : cggcttcaacgacgatcaac

miR-48 : acatccaccagcctagccgca

tRNA Gly: gcttgaaggcatccatgctgaccatt

### *Manipulation de C. elegans*

Les souches de *C. elegans* ont été cultivées selon les conditions standard (Brenner, 1974), à 20°C.

### *Interférence à l'ARN*

Une fraction de l'ADN complémentaire du gène d'intérêt a été insérée dans un plasmide contenant des promoteurs pour l'enzyme T7 à chaque extrémité de la séquence clonée. Les plasmides sont ensuite introduits dans une souche bactérienne produisant l'enzyme T7. L'activation de l'enzyme entraîne la production d'ARNs double brin complémentaires au gène d'intérêt. Les nématodes sont ensuite nourris à l'aide de ces bactéries et l'ARNs double brin sera absorbés.

### *Préparation d'extrait protéique total*

Des populations d'animaux synchronisées ont été récoltées au stade adulte. Les animaux récoltés ont été homogénéisés dans du tampon d'extraction froid (100 mM Potassium Acetate, 30 mM Hepes-KOH [pH 7.4], 2mM Magnesium Acetate, 1 mM DDT, 0.5% [v/v] Triton X-100, 2% [v/v] SUPERaseln (Ambion) et Mini Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (1 pastille/5 ml de solution) (Roche)). L'extrait homogène a été clarifié par une centrifugation à 13 817g pendant 10 minutes à 4°C et la concentration des protéines a été calculée avec le Dc protein Assay (Bio-Rad).

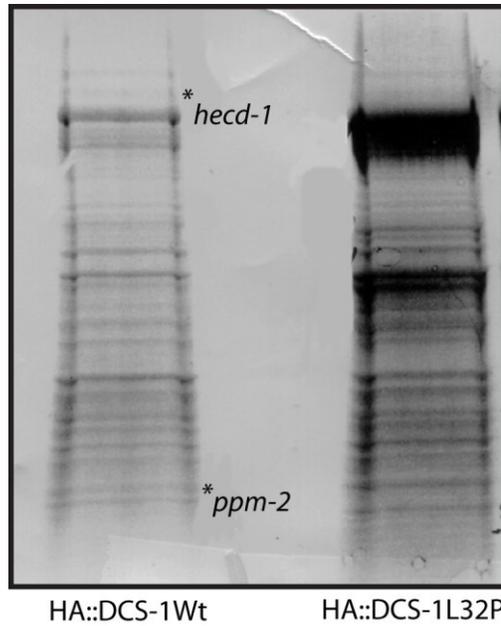
### *Dégradation des microARNs*

Les essais de dégradation ont été réalisés selon le protocole de (Chatterjee and Grosshans, 2009).

## 4.4 Résultats

### 4.4.1 Identification des interacteurs protéiques de DCS-1

Afin d'identifier des protéines pouvant être impliquées dans le complexe de dégradation, nous avons décidé de purifier les protéines associées à DCS-1. Dans l'étude présentée au chapitre 3, nous avons démontré que la substitution d'un seul acide aminé en position 32 de la protéine DCS-1 (L32P) abolit son interaction avec XRN-1 et empêche la formation du complexe de dégradation (Bosse et al., 2013). Afin d'augmenter nos chances d'identifier des protéines impliquées dans ce complexe, nous avons immunoprécipité la protéine DCS-1 sauvage et également la protéine mutante L32P. Après séparation des protéines immunoprécipitées sur gel et comparaison du patron de bandes, celles se retrouvant uniquement dans le puits correspondant à la protéine sauvage furent envoyées pour l'analyse en spectrométrie de masse (Figure 29). En sélectionnant les bandes présentes seulement lorsque le complexe de dégradation est formé, la probabilité que les protéines identifiées soient impliquées dans la voie des microARNs devrait être plus élevée. Une liste de candidats potentiels fut établie à partir de l'analyse de protéomique. Les candidats possédant des activités de modification post-traductionnelle tels que les kinases ou encore ceux impliqués dans la dégradation protéique ou associés à la dégradation des ARNm, furent sélectionnés (Tableau 3).



**Figure 29 : Indentification des candidats**

Les protéines associées à HA::DCS-1 Wt et à L32P ont été séparées sur un gel *SDS-Page*. Le gel a par la suite été coloré au *Sypro* pour révéler les protéines interagissant avec les deux formes de DCS-1. Les bandes spécifiques à la protéine sauvage ont été excisées et envoyées pour analyse en spectrométrie de masse. Les bandes marquées d'une étoile (\*) correspondent à HECD-1 et PPM-2.

**Tableau 3 : Candidats identifiés par spectrométrie de masse**

<i>C. elegans</i>	Fonction	Humain	Fonction	<i>C. elegans</i>	Fonction	Humain	Fonction
RPT-6	Sous-unité 26 S du protéasome	PSMC5	Sous-unité régulatrice Du protéasome 26S	PYP-1	pyrophosphatase inorganique	PPA1	pyrophosphatase inorganique
C14C10.5	N.A.	PSME4	Isoforme 1 du complexe activateur du protéasome 4	RPN-8	Régulateur du protéasome	PSMD7	Sous-unité régulatrice du protéasome 26S
MRCK-1	sérine/thréonine-kinase	CDC42BPA	Isoforme 3 de la Sérine/thréonine-protéine kinase MRCK alpha	STI-1	heat shock chaperones/ Interaction DAF-16/ HSP-70/90	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1
RPN-9	Sous-unité non ATPase du subunit proteasome 19S	PSMD13	HSPC027	C31C9.3 (fboxa-167)	Protéine F-box A	-	-
PPH-6	Protéine phosphatase	PPP6C	Isoforme 1 de la sous-unité catalytique de la Sérine/thréonine-protéine phosphatase 6	LMP-1	Protéine associé à la membrane des lysosomes	CD68	Protéine associée au lysosome
R151.2	-	PRPS1	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	PPM-2	Protein Phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent	PP1A	Isoforme 2 Alpha-2 de la Protein phosphatase 1A
GSP-1	GLC7 (yeast Glc Seven) like Phosphatase	PPP1CB	Sérine/thréonine-protéine phosphatase PP1-beta	HECTD-1	ubiquitin ligase homologue	HECTD-1	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1
				F46H5.3	-	CKM	Creatine kinase M-type

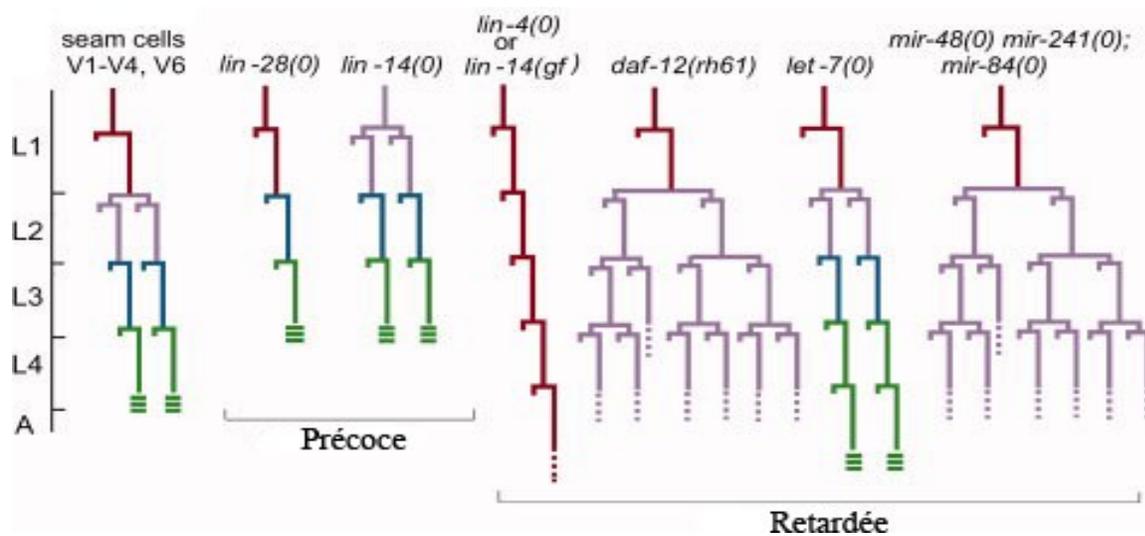
#### 4.4.2 Caractérisation initiale des candidats (Réalisée par Guillaume Landry-Proulx)

La liste initiale des candidats intéressants en comprenait 16. Afin d'éliminer les candidats moins intéressants, nous avons établi d'étudier les phénotypes associés à la perte de fonction de ces protéines afin de déterminer les candidats les plus pertinents pour l'étude de la voie des microARNs.

Lorsque disponibles, les mutants pour ces protéines furent obtenus par l'intermédiaire du *The Caenorhabditis Genetics Center (CGC)* alors que pour les autres candidats, la technique de l'interférence à l'ARN fut utilisée pour inhiber l'expression protéique.

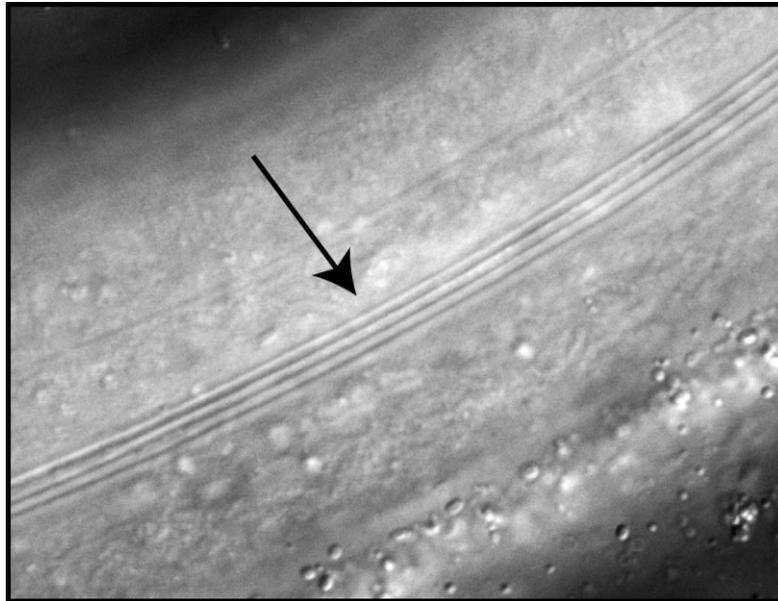
Afin de déterminer si ces candidats sont impliqués dans la voie des microARNs, nous avons mesuré

un phénotype associé à un mauvais fonctionnement de cette voie. Nous avons, donc observé la formation d'une structure de collagène appelée les *alae* qui est formée par les cellules de coutures hypodermiques, spécifiquement lors du passage au stade adulte. Ces cellules de coutures ont un programme de développement post-embryonnaire et vont subir des rondes de divisions successives au cours de chaque stade larvaire. Ces divisions se termineront par la sortie du cycle cellulaire, la fusion des cellules et la production des *alae* à la fin du stade larvaire L4 (Figure 30-31). Le programme de développement de ces cellules est contrôlé par des microARNs tels que : *lin-4* et les membres de la famille *let-7* (Resnick et al., 2010). Lorsque le programme de division et de différenciation de ces cellules hypodermiques est affecté, des malformations dans les *alae* peuvent être observées. Ces malformations peuvent causer des bris physiques dans la structure, mais également affecter le stade larvaire où les *alae* sont formées. Par exemple, les *alae* sont formées de façon précoce dans un mutant *dcs-1* (Figure 20).



**Figure 30 : Division des cellules de couture hypodermiques**

Les cellules de couture hypodermiques (seam cells) ont des divisions successives dans chaque stade larvaire (L1 à L4), pour mener à la formation des *alae* au stade adulte (A). La perte de fonction des cibles de microARNs entraîne l'apparition d'*alae* de façon précoce (Section de gauche) alors que la perte de fonction des microARNs entraîne la formation retardée des *alae* (Section de droite) (Resnick et al., 2010). Modifié de : (Grimson et al., 2007; Resnick et al., 2010).



**Figure 31 : Alae sauvage**

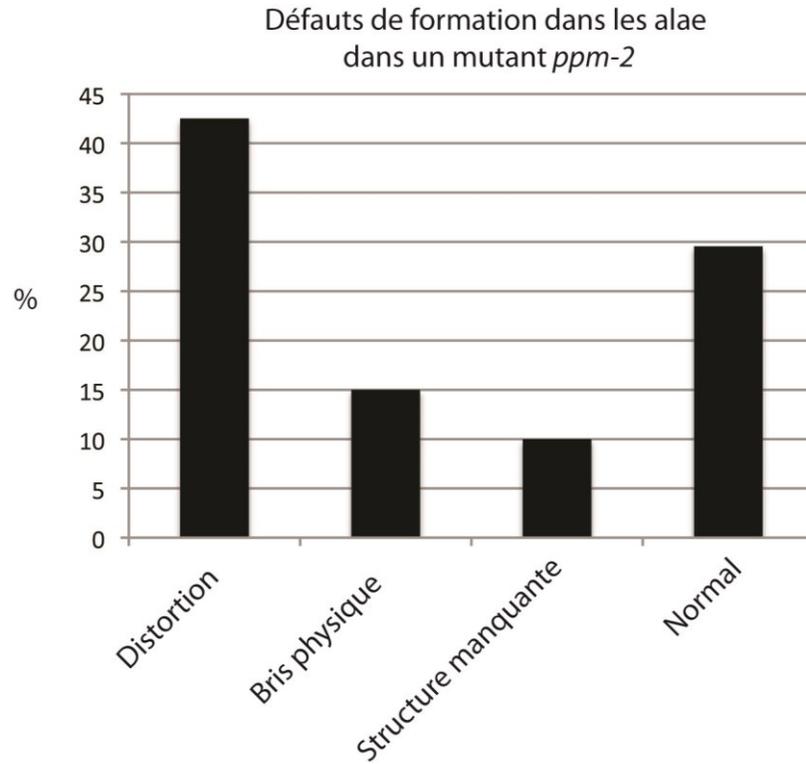
Structure des *alae* au stade jeune adulte pour un nématode de la souche sauvage

L'analyse de la formation des *alae* dans les différentes souches mutantes, nous a permis d'identifier les deux gènes les plus intéressants : *hecd-1* et *ppm-2*. La suite de ce chapitre se concentrera sur *ppm-2*, alors que la caractérisation de *hecd-1* sera réalisée par l'étudiante au doctorat Lucile Fressigné.

La protéine PPM-2 est une sérine/thréonine phosphatase homologue à PP1A chez l'humain. Sa fonction chez le nématode est pour le moment inconnue. Dans le but d'étudier l'implication de PPM-2 dans la voie des microARNs, nous avons utilisé une souche portant une délétion dans *ppm-2* (VC2153), qui est considérée comme un mutant nul.

Contrairement au mutant *dcs-1*, les *alae* sont formées au bon stade dans le mutant *ppm-2*, mais 45 % des animaux présentent d'importantes distorsions dans la structure, environ 15 % des animaux présentent des bris physiques et dans environ 10 % des animaux l'une des *alae* est manquante (Figure 32).

A



B

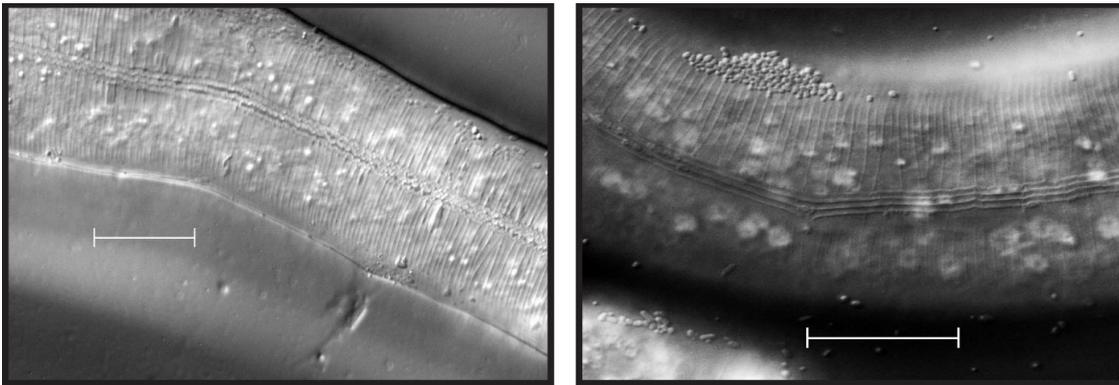


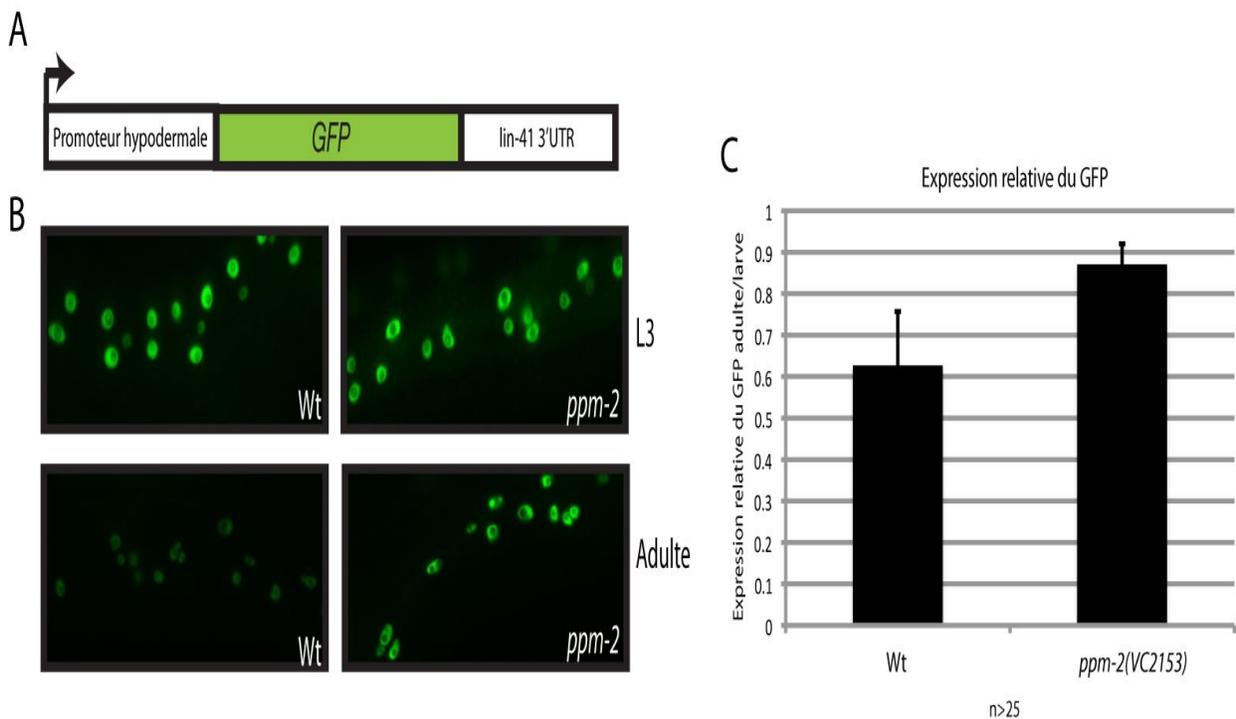
Figure 32 : La perte de *ppm-2* affecte la formation des *alae*

A: Pourcentage (%) de vers affectés pour les différents défauts observés dans les *alae* d'un mutant *ppm-2*. (n) représente le nombre d'animaux observés (n>30).

B: Image représentative des défauts. L'image de gauche représente un exemple de la distorsion des *alae*. L'image de droite correspond à un bris physique dans la structure. Grossissement de 400 X

#### 4.4.3 Impact de PPM-2 sur la voie des microARNs

Chez *C. elegans*, la protéine LIN-41 est un important régulateur de la transition entre le stade larvaire L4 et le stade adulte. Au cours du stade L4, la traduction de l'ARNm de *lin-41* est réprimée par le microARN let-7, ce qui permet la progression du développement (Figure 16) (Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000). Afin de tester la régulation de l'ARNm de *lin-41* et, du même coup, l'activité du microARN let-7 dans un mutant *ppm-2*, nous avons utilisé une souche exprimant la protéine GFP dans les cellules hypodermales sous le contrôle de la région 3' non codante de *lin-41*. La région 3'UTR de *lin-41* contient deux sites de liaison à let-7 (Vella et al., 2004). Puisque let-7 n'est pas exprimé dans les premiers stades larvaires, la protéine GFP est fortement exprimée dans les stades L2-L3. L'expression de let-7 au stade larvaire L4 entraîne une diminution de l'expression du GFP observable dans les jeunes adultes. Lorsque comparée à la souche sauvage, la perte de fonction de *ppm-2* n'affecte pas l'expression du GFP dans le stade L3, alors que l'expression du GFP est plus élevée au stade adulte. Ce résultat suggère que la régulation de *lin-41* par le microARN let-7 est diminuée dans le mutant *ppm-2* (Figure 33).



### Figure 33 : La perte de *ppm-2* affecte l'activité du microARN *let-7*

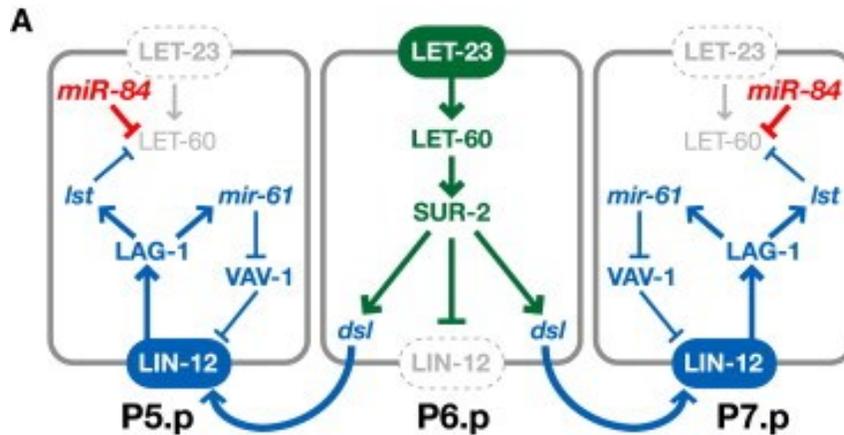
**A:** Pour étudier la régulation *lin-41*, nous avons mesuré l'expression de la protéine GFP sous le contrôle d'un promoteur hypodermique et de la région 3' UTR de *lin-41*.

**B:** Dans le stade larvaire L3, le GFP est fortement exprimé. L'expression de *let-7* dans les stades plus tardifs entraîne la diminution de l'expression du GFP. Les jeunes adultes *ppm-2*(VC2153) ne répriment pas autant l'expression du GFP que la souche sauvage.

**C:** La quantification du GFP a été réalisée en mesurant l'expression relative du GFP dans 5 cellules par animal. L'expression du GFP au stade adulte a été rapportée sur l'expression au stade L3. (n) représente le nombre d'animaux analysés. La quantification du GFP confirme que l'expression du GFP est plus élevée dans un mutant *ppm-2*. (*P value*<0,05).

Nous avons ensuite décidé de regarder la régulation d'une cible endogène de la famille *let-7*, de part l'étude de la régulation de la protéine LET-60 au cours la formation de la vulve.

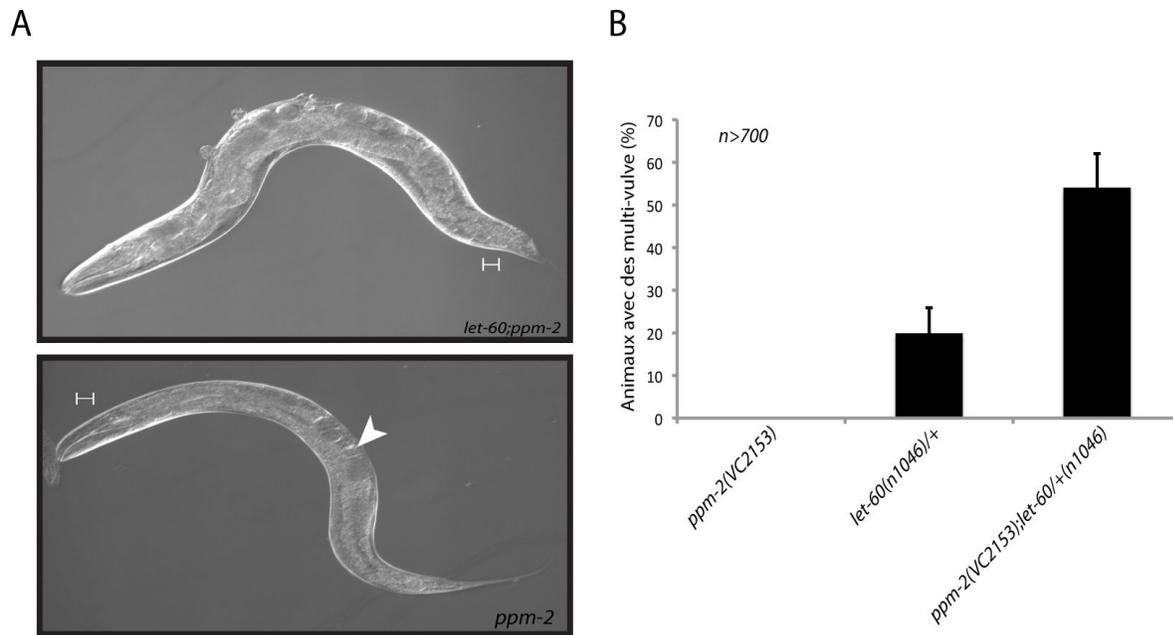
Au cours du développement de la vulve, les cellules précurseurs de la vulve (VPC) reçoivent des signaux de la part des cellules somatiques des gonades pour stimuler la formation de la vulve. Une partie seulement des VPC forment la vulve alors que les autres adoptent une structure épidermale. Les signaux d'activation de la formation de la vulve passent par un homologue de la protéine RAS ; LET-60. Une augmentation de l'activité de LET-60 induit la différenciation en cellule de la vulve et une suractivation de cette protéine entraîne la formation de plusieurs pseudo-vulves ; phénotype appelé multivulva ou *MUV* (Beitel et al., 1990; Han et al., 1990). Les membres de la famille *let-7* sont des régulateurs négatifs de la protéine LET-60 et leur activité est nécessaire afin de diminuer l'activité de LET-60 dans les VPC n'étant pas destinées à la formation de la vulve (Johnson et al., 2005) (Figure 34). Afin d'étudier la régulation de *let-60* par la famille *let-7*, nous avons utilisé une souche présentant un gain de fonction de LET-60 (*let-60*(n1046)). Cette mutation présente une faible production de multivulve dans une condition hétérozygote (Hammell et al., 2009; Vasquez-Rifo et al., 2013). Lorsque combiné à des mutations affectant l'activité de la voie des microARNs, le nombre de pseudo-vulves formées augmente dû à une diminution de l'efficacité de la famille *let-7* pour réguler l'expression de *let-60* dans les cellules ne devant pas se différencier en vulve.



**Figure 34 : Cellules précurseurs de la vulve**

Au cours du développement de la vulve, les cellules précurseurs de la vulve (VPC) reçoivent des signaux de la part des cellules somatiques des gonades pour stimuler la formation de la vulve. Une partie seulement des VPC forment la vulve alors que les autres adoptent une structure épidermale. Les signaux d'activation de la formation de la vulve passent par un homologue de la protéine RAS ; LET-60 (Beitel et al., 1990; Han et al., 1990). Les microARNs de la famille let-7 (rouge) régulent l'expression de *let-60* dans les cellules ne devant pas former la vulve (Johnson et al., 2005). Figure modifiée de (Hammell et al., 2009)

La perte de *ppm-2* dans la souche *let-60(n1046)/+* augmente le nombre de vers présentant le phénotype *MUV*, le faisant passer de 20 % pour la souche *let-60(n1046)/+* à environ 55 % pour le double mutant. Il est important de noter qu'il n'y a pas formation de multivulve dans un mutant *ppm-2* seul. Ce résultat suggère que *ppm-2* affecte la régulation de la protéine LET-60 et selon les autres résultats, probablement en affectant les microARNs de la famille let-7 (Figure 35).



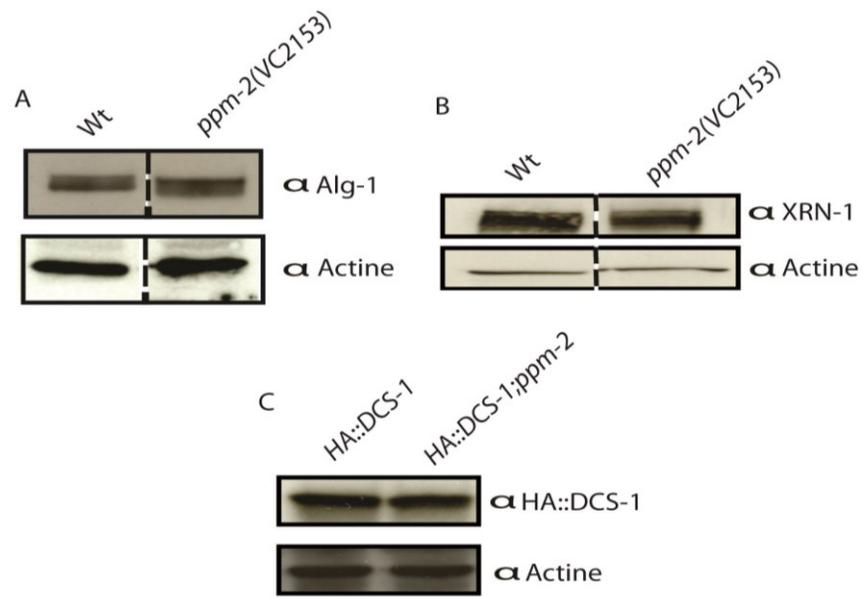
**Figure 35 : *ppm-2* affecte la régulation d'une cible endogène de la famille *let-7***

**A:** Les double-mutants *let-60(n1046)/+;ppm-2* présentent le phénotype multivulve (MUV), alors que le mutant *ppm-2* seul ne produit qu'une seule vulve.

**B:** Le pourcentage (%) d'animaux avec le phénotype MUV pour les différentes souches testées. (*n*) représente le nombre d'animaux observés.

#### 4.4.4 Le mutant *ppm-2* affecte le niveau des microARNs

Les résultats obtenus avec le mutant *ppm-2* suggèrent que l'activité de la voie des microARNs est diminuée lorsque cette protéine est absente. Cette diminution pourrait être causée par une diminution des niveaux de protéines importantes pour cette voie ou encore par une diminution du niveau des microARNs. Dans le but de tester ces deux possibilités, nous avons mesuré le niveau protéique des protéines ALG-1, XRN-1 et DCS-1 dans un mutant *ppm-2*. Par contre, nous n'avons pas détecté de différence significative dans le niveau protéique de ces facteurs (Figure 36). Cependant, des analyses par Northern blot, nous ont permis de détecter la diminution de plusieurs microARNs, dont les microARNs de la famille *let-7* (Figure 37).



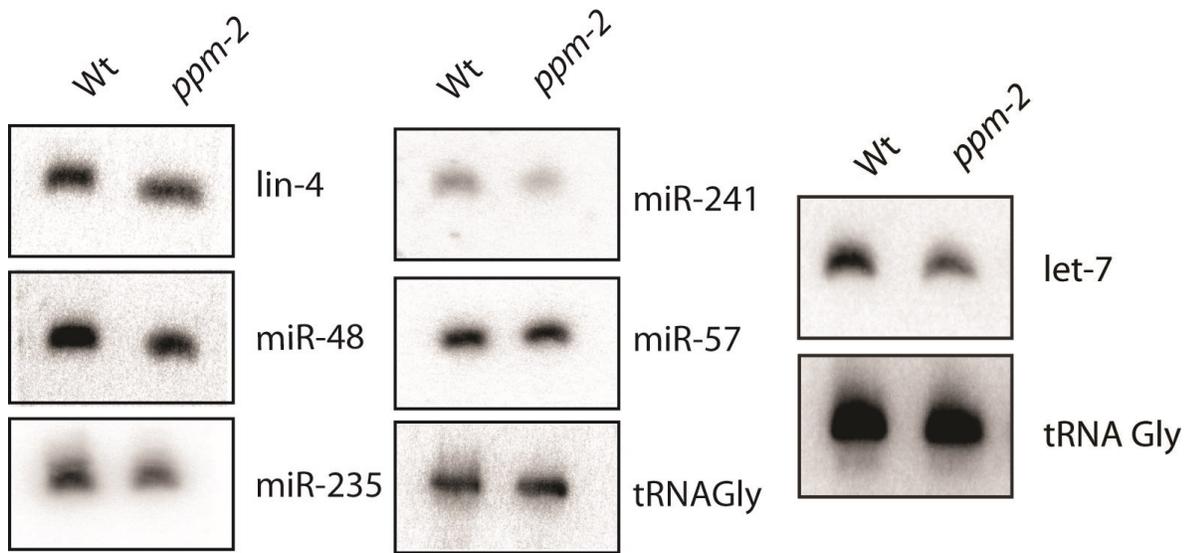
**Figure 36 : Niveaux protéiques des composants de la voie des microARNs**

Les niveaux protéiques des protéines influençant le niveau des microARNs ne sont pas affectés dans un mutant *ppm-2*. L'actine sert de contrôle de la quantité de protéines déposée.

**A :** Niveau de la protéine de ALG-1

**B :** Niveau de XRN-1

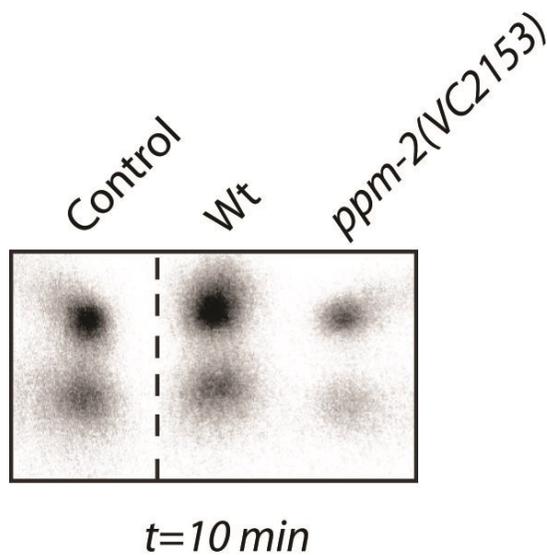
**C :** Niveau de HA::DCS-1



**Figure 37 : Le niveau des microARNs diminue dans un mutant *ppm-2***

Le niveau des plusieurs microARNs est diminué dans un mutant *ppm-2*. Les microARNs ont été détectés par analyse Northern Blot. L'ARN de transfert pour la glycine (tRNAGly) sert de contrôle de quantité d'ARN déposé.

Puisque nous avons détecté une diminution du niveau des microARNs et que PPM-2 est un interacteur potentiel de la protéine DCS-1, nous avons voulu déterminer si la perte de *ppm-2* affecte la dégradation des microARNs. Un essai de dégradation a donc été réalisé en incubant un microARN synthétique radiomarqué (*let-7*) dans un extrait protéique de *C. elegans*, suivi d'une migration sur gel. L'incubation de cette sonde dans un extrait d'une souche sauvage entraîne sa dégradation complète alors que cette sonde n'est pas complètement dégradée après incubation dans un extrait d'une souche mutante pour la protéine DCS-1 (Figure 23). Puisque le mutant *ppm-2* présente une diminution du niveau de certains microARNs, les paramètres de la dégradation furent légèrement modifiés pour trouver une condition où la sonde radiomarquée n'est pas complètement dégradée dans un extrait de souche sauvage. Pour ce faire, j'ai réduit le temps d'incubation avec l'extrait protéique ainsi que la température d'incubation. Dans ces nouvelles conditions, lorsque le microARN synthétique est incubé dans un extrait mutant pour *ppm-2*, la dégradation est plus rapide, en comparaison avec un extrait sauvage.



**Figure 38 : La perte de la phosphatase PPM-2 affecte la dégradation des microARNs**

L'incubation d'un microARN let-7 radiomarqué dans un extrait protéique cause sa dégradation. Dans un extrait de souche sauvage, l'incubation de cet ARN pendant 10 minutes à 15 °C produit une dégradation partielle. L'incubation dans un extrait mutant pour *ppm-2* cause une dégradation plus rapide de l'ARN.

#### 4.4.5 Quelle est la cible de PPM-2 ?

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant suggèrent que la perte de la protéine PPM-2 diminue l'activité de la voie des microARNs, en raison de la diminution du niveau des microARNs. L'essai de dégradation démontre que la dégradation est plus rapide dans un extrait protéique sans PPM-2. Ces effets pourraient être causés par deux facteurs. Dans un premier temps, la perte de *ppm-2* pourrait stabiliser le complexe de dégradation et augmenter son activité. Par contre, malgré plusieurs tentatives, des essais de dégradation avec un complexe purifié n'a pas démontré d'activité plus grande en absence de *ppm-2* (Donnée non montrée). De plus, nous n'avons pas été en mesure de détecter de phosphorylation sur les protéines DCS-1 ou XRN-1. C'est pourquoi nous avons décidé d'explorer d'autres avenues pour expliquer les phénotypes observés.

La deuxième possibilité pourrait être que la phosphorylation de la protéine ALG-1 affecte la prise en charge ou encore le relâchement des microARNs. Pour vérifier cette hypothèse, les microARNs let-

7, lin-4 et miR-241\* liés à ALG-1 ont été quantifiés, suite à une immunoprécipitation de la protéine dans des extraits sauvages et mutants pour la protéine PPM-2. Des résultats préliminaires suggèrent que les microARNs pourraient lier plus fortement la protéine ALG-1 dans un mutant *ppm-2* (Figure 39). Cette augmentation des microARNs pourrait être causée par un problème de relâchement et d'autres expériences seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

\* Le résultat pour miR-241 n'est pas significatif, mais la même tendance est observée.

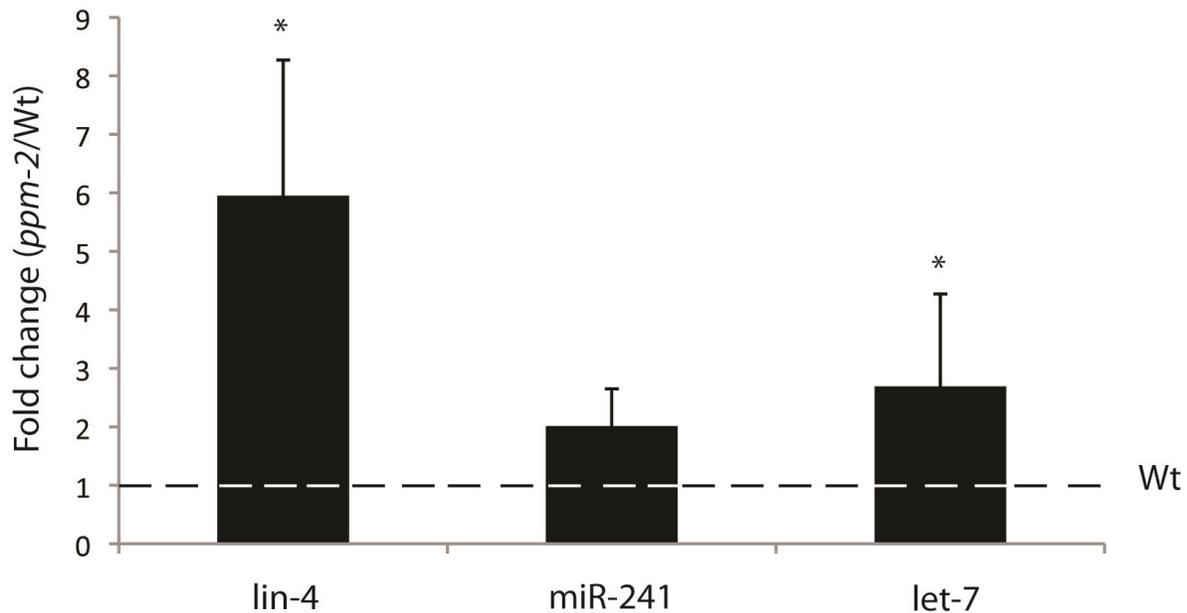


Figure 39 : miARNs liés à ALG-1 dans un mutant *ppm-2*

Les microARNs liés à ALG-1 isolés à partir d'une immunoprécipitation d'ALG-1 en présence ou en absence de PPM-2. Les microARNs ont été quantifiés par PCR en temps réel. Les microARNs lin-4 et let-7 sont plus fortement associés à ALG-1 dans un mutant *ppm-2* (\*)  $p$ -value < 0,05.

## 4.6 Conclusion

L'immunoprécipitation de DCS-1 a permis d'identifier un candidat intéressant qui pourrait être impliqué dans la régulation de la stabilité des microARNs. L'analyse du mutant *ppm-2* a révélé que la régulation par des microARNs est moins efficace lorsque cette protéine est mutée. De plus, le niveau

de plusieurs microARNs diminue dans ce mutant. L'analyse des microARNs liés à ALG-1 a révélé que lin-4, let-7 et miR-241 interagissent plus fortement avec cet Argonaute. Ce résultat suggère que la prise en charge ou encore le relâchement des microARNs pourraient être affectés en absence de la protéine PPM-2. Il est connu que la phosphorylation des Argonautes peut moduler leur activité et l'interaction avec le microARN (Jee and Lai, 2014). Dans les prochaines semaines, nous allons tenter de déterminer l'état de phosphorylation d'AGL-1 en absence de PPM-2 ainsi que de déterminer comment l'interaction entre les microARNs et ALG-1 est affectée. Il est possible que les microARNs soient prisonniers de l'Argonaute, ce qui pourrait affecter la production des microARNs. Les microARNs nouvellement produits ne pourront pas être pris en charge par un Argonaute et seront dégradés. Les résultats de ce chapitre seront discutés plus en détail dans la section discussion du chapitre 5.



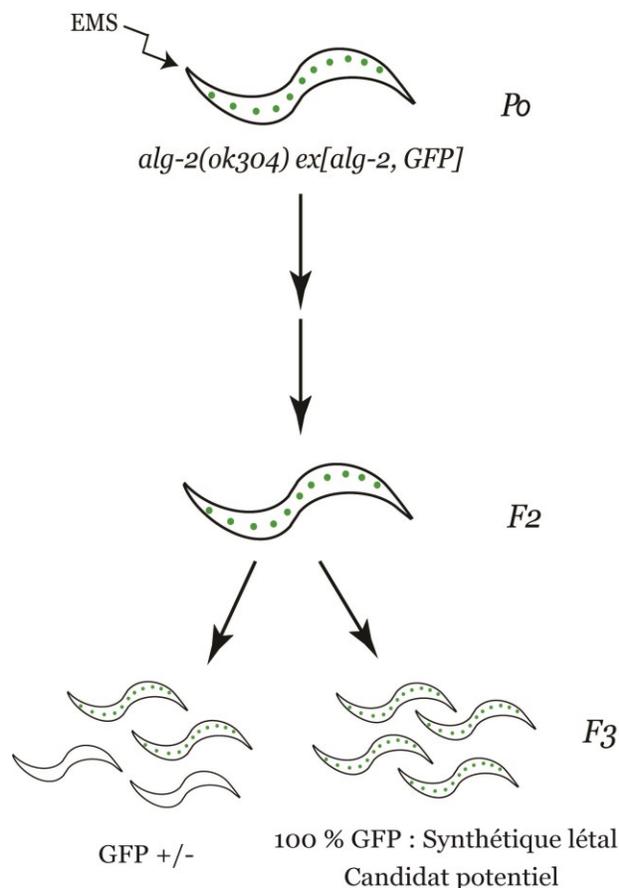
## Chapitre 5 : Discussion et Perspectives

### 5.1. Implication de DCS-1 dans le contrôle du niveau des microARNs

#### 5.1.1 Criblage génétique et identification du gène affecté

Le projet, sur lequel j'ai travaillé dès mon arrivée au laboratoire, avait déjà été mis en place. Il avait pour but d'identifier de nouveaux interacteurs génétiques des protéines Argonautes chez *C. elegans*, en utilisant une approche de génétique directe. Les gènes codants pour les Argonautes de la voie des microARNs chez *C. elegans* sont dits synthétiques létaux. Les mutants *alg-1* et *alg-2* individuels sont viables alors que le double mutant est embryoniquement létal (Abbott et al., 2005; Grishok et al., 2001; Vasquez-Rifo et al., 2012). Un criblage génétique a été conçu pour identifier d'autres gènes synthétiques létaux avec *alg-2*. Pour ce faire, une population de vers fut traitée avec l'agent chimique EMS qui génère des mutations ponctuelles dans le génome. La souche utilisée pour le criblage était mutante pour *alg-2* et possédait également un transgène extrachromosomique codant pour une copie sauvage d'*alg-2* couplée à la protéine GFP (Green Fluorescent Protein). Il est important de noter que chez *C. elegans* un transgène non intégré ne sera pas transmis aux générations suivantes de façon mendélienne, mais bien de façon aléatoire. La transmission du transgène et donc de la copie sauvage d'*alg-2* est confirmée par l'expression du GFP.

Après la mutagenèse de la souche *alg-2(ok304)Ex[alg::GFP]*, les générations suivantes ont ensuite été analysées pour identifier les populations où la totalité des animaux exprimaient le GFP. Puisque le criblage avait pour but d'identifier les gènes synthétiques létaux avec *alg-2*, l'expression de la forme sauvage d'*alg-2* couplée au GFP sera nécessaire pour la survie des mutants synthétiques létaux avec *alg-2*. Les vers n'ayant pas reçu la copie sauvage mourront au cours de l'embryogenèse. Ainsi, la présence d'un mélange d'animaux GFP positifs et négatifs au sein d'une même population nous indiquait que ces mutants ne nécessitaient pas l'expression de la copie sauvage d'*alg-2* pour survivre. Ces mutants ne furent pas considérés pour la suite de l'analyse.



**Figure 40 : Schéma du criblage génétique**

Schéma du criblage génétique. La souche initiale ( $P_0$ ) a été traitée avec l'agent mutagène EMS. Les générations suivantes ( $F_2/F_3$ ) ont été analysées pour trouver des populations dont tous les vers exprimaient le GFP

Un total de 11 candidats ont été isolés à partir de ce criblage. Des tests de complémentation ont ensuite été réalisés pour déterminer le nombre de gènes différents affectés dans ces candidats. Ces tests nous ont permis de classer ces candidats en 5 groupes de complémentation distincts. À l'heure actuelle, seulement deux groupes de complémentation ont été analysés et ont mené à la caractérisation de *dcs-1* et de *vps-52* (Bosse et al., 2013; Vasquez-Rifo et al., 2013). Étant donné que le criblage était basé sur la synthétique létalité avec le gène *alg-2*, l'un des groupes de complémentation devrait logiquement porter une mutation sur le gène *alg-1*. Pour l'instant, nous n'avons pas identifié un tel candidat, mais trois groupes de complémentation sont toujours à étudier. Des expériences préliminaires suggèrent que l'un des groupes de complémentation porte une mutation sur le chromosome X, qui code également pour *alg-1*.

Après la classification initiale des candidats en groupes de complémentation, j'ai ensuite procédé à l'identification de la mutation portée par l'un de ces groupes qui comprenait deux allèles différents.

Diverses techniques génétiques, principalement la technique du SNP (*Simple Nucleotide Polymorphism*), ont été utilisées pour déterminer le gène affecté. Après confirmation par séquençage, nous avons pu déterminer que le gène pour ce groupe codait pour la protéine DCS-1.

La fonction de DCS-1 sera discutée plus en profondeur dans la deuxième partie de cette discussion. Mais en somme, nos résultats ont démontré que DCS-1 agit comme un modulateur négatif de la voie des microARNs. Cette conclusion peut paraître surprenante puisque la conception du criblage favorisait plutôt l'identification d'un modulateur positif de la voie. Parce que la perte d'*alg-2* affaiblit la voie des microARNs, on peut s'attendre à ce que la perte d'un modulateur positif aggrave cet état, alors qu'un modulateur négatif devrait l'améliorer. Malgré tout, plusieurs facteurs peuvent expliquer l'identification d'un régulateur négatif.

Tout d'abord, la mort des embryons doubles mutants *alg-2; dcs-1* pourrait être causée par une fonction indépendante de l'activité de dégradation. Tout simplement, Il est possible que la perte de la protéine ALG-2 cause une sensibilisation de l'embryon et que la perte subséquente de DCS-1 soit fatale.

Une autre hypothèse à prendre en considération est le fait que le niveau des membres de la famille miR-35 à miR-41, qui est essentielle pour les premières étapes de l'embryogénèse chez *C. elegans*, est diminué dans un mutant *dcs-1* (Tableau 2). Les animaux mutés pour ces microARNs sont stériles et embryoniques létaux (Alvarez-Saavedra and Horvitz, 2010). Il est alors possible d'imaginer que la perte consécutive de la protéine ALG-2 et la forte diminution de ces microARNs dans un mutant *dcs-1* soit suffisantes pour entraîner la mort des embryons.

Il est également possible que les défauts de dégradation des microARNs observés dans un mutant *dcs-1* soient responsables de la mort des embryons doubles mutants. La perte d'*alg-2* fait en sorte que ALG-1 doit prendre en charge l'ensemble des microARNs dans l'embryon, ce qui pourrait entraîner une plus grande compétition entre les différents microARNs pour la liaison avec ALG-1. Lorsque cette compétition est combinée avec l'accumulation de certains microARNs, causée par la perte de *dcs-1*, il pourrait y avoir des problèmes dans la prise en charge et entraîner la perte de certains microARNs essentiels au développement embryonnaire.

L'analyse des embryons mutants pour *dcs-1* et *alg-2* a révélé que les embryons cessent de se développer quelques minutes après fécondation (donnée non montrée). À ce stade de l'embryogénèse, la production protéique et le développement de l'embryon dépendent uniquement des ARNm maternels qui ont été déposés dans l'embryon. Il n'existe pour le moment pas beaucoup d'information concernant l'activité de la voie des microARNs dans la lignée germinale ou encore dans les étapes précoces du développement embryonnaire. Par contre, les travaux de mon collègue Syed Irfan Bukhari ont démontré que la voie des microARNs et les protéines Argonautes ALG-1 et ALG-2 est importantes pour contrôler la prolifération et la production des cellules germinales (Bukhari et al., 2012). Une analyse par *microarray* a révélé que le niveau des ARNm des cibles de microARNs sont diminué en absence d'ALG-1 dans la lignée germinale, ce qui est à l'opposé des cellules somatiques (données non publiées de Syed Irfan Bukhari) (Schmitter et al., 2006).

À l'heure actuelle, ma collègue Alexandra Dallaire est en train de poursuivre l'étude de l'activité des microARNs dans la lignée germinale. Une des hypothèses de son projet est que les microARNs pourraient être impliqués dans le triage des ARNm à être déposé dans l'embryon. Selon cette hypothèse, il est possible que la perte de DCS-1, combinée à celle d'ALG-2, affecte ce triage. En absence de DCS-1, l'augmentation de certains microARNs pourrait affecter la sélection des ARNm à conserver et entraîner un déséquilibre dans les ARNm transférés aux embryons et ultimement mener à la mort embryonnaire.

En résumé, plusieurs facteurs peuvent expliquer la mort des embryons doubles mutants pour *alg-2* et *dcs-1*. Avant de pouvoir déterminer les causes exactes de cette létalité, il sera impératif de mieux connaître comment fonctionne la voie des microARNs dans la lignée germinale. Les travaux de ma collègue Alexandra Dallaire devraient permettre de répondre à cette question. Elle étudie présentement la régulation par les microARNs dans les cellules germinales, à l'aide de différents rapporteurs de l'activité des microARNs.

Des études plus approfondies sur le rôle de DCS-1 dans la lignée germinale seront également nécessaires pour tenter d'expliquer ce phénotype puisqu'il est possible que l'activité de DCS-1 soit différente que dans les cellules somatiques. Une analyse plus poussée des embryons doubles

mutants *dcs-1;alg-2*, comme la quantification des microARNs, des ARNm et des protéines de la voie des microARNs pourrait permettre de déterminer précisément la cause de la mort embryonnaire. Il serait également intéressant de mesurer les microARNs associés à la protéine ALG-1 dans ces conditions. Ces expériences devraient nous indiquer quelles sont la ou les causes de cette synthétique létalité.

### 5.1.2 Impact de la perte de DCS-1 sur la voie des microARNs

Le criblage ayant démontré que *dcs-1* interagit génétiquement avec *alg-2*, notre objectif était alors de déterminer si DCS-1 était également impliqué dans la voie des microARNs. Tout d'abord, nous avons étudié les phénotypes associés à la perte de fonction de *dcs-1* afin de les comparer à ceux observés pour des mutants de la voie des microARNs.

Le premier phénotype analysé fut la formation d'une structure de collagène qui est formée spécifiquement au stade adulte et est appelée les *alae*. Cette structure est formée par la fusion des cellules de couture hypodermales (Seam cell). Ces cellules, au nombre de 16 au stade adulte, passent par plusieurs rondes de division à chaque stade larvaire et fusionnent au stade adulte pour former les *alae*. La division et la fusion de ces cellules sont contrôlées par les microARNs. Un défaut dans la voie des microARNs peut entraîner des problèmes lors de la division ou de la fusion de ces cellules menant à une mauvaise formation des *alae* (Resnick et al., 2010) (Figure 30).

L'analyse de la formation des *alae* dans un mutant *dcs-1* a révélé que cette structure est produite de façon précoce. Ce phénotype est également observé lorsque le régulateur négatif de *let-7*; *lin-28* est muté (Figure 21) (Lehrbach et al., 2009). Ce résultat suggère que la perte de *dcs-1* entraîne la mise en place précoce de processus spécifiques au stade adulte.

La régulation de *lin-41* par *let-7* est une étape critique pour le passage au stade adulte. Nous avons donc mesuré la régulation de *lin-41* *in vivo* à l'aide d'un rapporteur GFP sous le contrôle de la région 3' non codante de *lin-41* ainsi que le niveau d'ARNm endogène de *lin-41* par PCR quantitatif en temps réel. Ces deux expériences ont démontré que la perte de *dcs-1* entraîne une régulation plus prononcée de *lin-41* ainsi qu'une diminution du niveau de son ARNm (Figure 21 et 26).

Parmi les causes pouvant causer cette régulation aberrante, une accumulation du microARN let-7 pourrait expliquer les phénotypes observés dans le mutant *dcs-1* (Johnson et al., 2003; Resnick et al., 2010). Nous avons donc mesuré l'expression du microARN let-7 et confirmé son augmentation dans un mutant *dcs-1*. La perte de DCS-1 entraîne donc la stabilisation du microARN let-7. Ces résultats démontraient également que ces microARNs accumulés étaient actifs (Figure 21). De plus, la perte de *dcs-1* rétablit le phénotype de la perte de fonction du microARN let-7 dans un mutant où la forme mature de ce microARN est déstabilisée (Figure 22) (Chatterjee et al., 2011). En somme, le mutant *dcs-1* présente une expression précoce de processus spécifique au stade adulte. Cette expression précoce pourrait être causée par une régulation aberrante de la cible de let-7; *lin-41*. Cette régulation est causée par une accumulation de microARNs actifs.

Par la suite, en collaboration avec le Dr. Victor Ambros, nous avons mesuré le niveau de 107 microARNs afin de déterminer si le mutant *dcs-1* affecte certains microARNs spécifiquement ou encore l'ensemble des microARNs. Les résultats de cette analyse démontrent qu'environ 20 % des microARNs sont augmentés par la perte de la protéine DCS-1. L'activité de DCS-1 semble donc être spécifique à certains microARNs (Figure 21 et Tableau 2). Il peut sembler surprenant que seulement 20 % des microARNs soient affectés, mais la perte des enzymes responsables de la dégradation des microARNs chez *C. elegans*, XRN-1 et XRN-2, affecte également une fraction seulement des microARNs (Chatterjee et al., 2011; Chatterjee and Grosshans, 2009).

Au-delà de la spécificité de DCS-1, plusieurs facteurs pourraient expliquer ce pourcentage. Tout d'abord, l'ARN utilisé pour la quantification provenait d'une population de jeunes adultes, c'est-à-dire que parmi les microARNs mesurés, plusieurs sont peu ou pas exprimés à ce stade du développement. Ces microARNs apparaîtront donc comme n'étant pas affectés dans notre quantification. Lorsque l'on regarde les valeurs d'expression du PCR quantitatif en temps réel (ct), 16 % des microARNs testés ne sont pas détectables. Si l'on enlève ces microARNs de l'analyse, le pourcentage des microARNs qui sont augmentés en absence de DCS-1 est maintenant de 25 %. Ensuite, l'analyse d'une population mixte ou encore de populations à différents stades larvaires nous donnerait probablement une liste de microARNs affectés différents, ainsi qu'une meilleure appréciation des microARNs dégradés par le complexe de dégradation. De plus, ce ne sont pas tous

les microARNs qui doivent faire l'objet d'une dégradation rapide pour contrôler leurs niveaux. Certains microARNs qui sont essentiels pour permettre le passage entre différents stades larvaires pourraient faire l'objet d'une dégradation plus importante, alors que des microARNs dont l'expression est plus constante pourraient être moins sensibles. Par exemple, dans le cas du microARN *let-7* qui est essentiel pour le contrôle du passage au stade adulte, on peut supposer qu'une grande quantité de *let-7* est nécessaire au stade L4 et que les molécules de *let-7* excédentaires doivent être éliminées lorsque la transition vers le stade adulte sera complétée.

Parmi les autres possibilités, les études réalisées dans les cellules humaines ont démontré que plusieurs enzymes différentes semblent être responsables de la dégradation de microARNs dans les différentes lignées cellulaires. Même si chez *C.elegans* le complexe formé par XRN-1 et DCS-1 semble être un complexe majeur pour la dégradation des microARNs, on ne peut pas éliminer l'hypothèse que d'autres enzymes soient responsables de la dégradation de certains microARNs.

Par la suite, l'interaction entre le microARN et sa cible influence le relâchement des microARNs par les protéines Argonautes. Une étude du groupe du Dr. Helge Grosshans suggère que l'interaction entre le microARN et sa cible peut le protéger contre la dégradation (Chatterjee et al., 2011). L'interaction des microARNs avec les protéines Argonautes est très stable et le relâchement du microARN est nécessaire pour le rendre accessible aux enzymes de dégradation (Chatterjee et al., 2011; De et al., 2013). Les différentes études portant sur le relâchement des microARNs ont démontré que les sites de reconnaissance de microARNs ne stimulent pas leur relâchement et les protège plutôt (Ameres et al., 2010; De et al., 2013). Les mésappariements en 5' du microARN favorisent le relâchement alors que les mésappariements en 3' le bloquent et stabilisent l'interaction avec Ago2 (De et al., 2013). Puisque l'interaction entre le microARN et sa cible influence son relâchement, donc son accessibilité au complexe de dégradation, certains microARNs seront plus ou moins sensible à la perte d'activité de ce complexe. Le manque d'information concernant la majorité des cibles des microARNs chez *C. elegans* nous empêche de faire une étude approfondie de l'appariement des microARNs affectés par DCS-1 et de leurs cibles.

L'étude de la stabilité des microARNs dans les cellules HEK-293T a révélé que la dégradation de miR-378 était très rapide. Afin de déterminer si l'instabilité de miR-378 est médiée en *cis*, les auteurs

ont réalisé plusieurs mutations dans la séquence de miR-378 et ont observé une stabilisation de ce miR lorsque la région en 3' est mutée (Bail et al., 2010). Cette donnée est fort intéressante puisque la liaison du complexe RISC avec la cible entraîne un changement de conformation de l'Argonaute qui relâche l'extrémité 3' du microARN (Bartel, 2009). La région 3' serait donc plus accessible pour les exonucléases et pourrait dicter la stabilité du microARN (Bail et al., 2010). La région 3' des microARNs pourrait donc être un important facteur qui pourrait expliquer la sensibilité des microARNs à la perte de fonction du complexe de dégradation.

Finalement, il est également possible que le complexe de dégradation possède une certaine spécificité pour des microARNs en particulier. Une étude plus approfondie de la stabilité des microARNs au cours du temps en présence et en absence du complexe de dégradation permettrait de déterminer avec plus de précision les microARNs sensibles à l'activité de ce complexe. Cette liste de microARNs pourrait servir afin de déterminer si ces microARNs ont des points communs.

Lorsqu'on analyse de plus près ces données, on remarque que l'augmentation du niveau de microARNs n'est pas drastique. Même que, pour la majeure partie des microARNs, le niveau n'est augmenté que de deux fois. Lorsque pris individuellement, il est fort probable que de doubler la quantité d'un seul microARN ne soit pas suffisant pour affecter le développement du nématode. On doit considérer principalement, qu'il est également connu que la perte de fonction de la majorité des microARNs ne cause pas de phénotype observable (Kaufman and Miska, 2010; Miska et al., 2007). Par contre, lorsque mise dans un contexte global, l'accumulation de plusieurs microARNs de la même famille ou encore l'accumulation de plusieurs microARNs régulant des protéines impliquées ayant des fonctions communes aura un fort impact sur plusieurs sentiers biologiques et ultimement sur le développement d'un organisme.

Dans un mutant *dcs-1*, on peut penser que la combinaison des 25 % de microARNs affectés serait responsable des phénotypes observés. Par exemple, les membres de la famille *let-7* ; miR-48, miR-241, miR-84 et *let-7* se retrouvent tous parmi les microARNs dont le niveau est augmenté dans un mutant *dcs-1*. Or, ces microARNs sont très importants pour contrôler le développement chez *C. elegans* (Abbott et al., 2005; Johnson et al., 2005; Reinhart et al., 2000; Slack et al., 2000) et

l'accumulation de ces microARNs pourrait expliquer certains des phénotypes observés tels que la formation d'*alae* précoce et la régulation aberrante de *lin-41* (Johnson et al., 2003).

### 5.1.3 Quel est le rôle de DCS-1 dans la voie des microARNs ?

L'augmentation de l'abondance des microARNs peut avoir plusieurs causes: une augmentation de la biogenèse, une augmentation du niveau des protéines Argonautes, une stabilisation de l'interaction entre les Argonautes et les microARNs ou encore un défaut dans la dégradation des microARNs. Afin d'éliminer certaines possibilités, nous avons quantifié les formes précurseurs du microARN *let-7* ainsi que la protéine et l'ARNm de la protéine ALG-1. Nous n'avons pas observé de différence significative pour les formes précurseurs de *let-7* entre la souche sauvage et mutante pour *dcs-1* (Figure 27). De façon similaire, le niveau protéique d'ALG - 1 et de son ARNm ne sont pas affectés dans un mutant *dcs-1* (Figure 26). Ces résultats nous ont permis d'éliminer les hypothèses d'un défaut dans la biogenèse et de la stabilisation des Argonautes.

Afin de discriminer parmi les deux hypothèses restantes, nous avons utilisé une approche expérimentale nous permettant de mesurer à la fois le relâchement du microARN par la protéine Argonaute ainsi que la dégradation des microARNs relâchés. Pour ce faire, le miRISC a été purifié à partir d'extrait protéique de la souche sauvage. Le complexe purifié a ensuite été incubé dans un deuxième extrait protéique afin de stimuler le relâchement des microARNs et leur dégradation. Les microARNs toujours liés à ALG-1 et ceux relâchés dans le surnageant ont été quantifiés par PCR quantitatif en temps réel (Figures 24). Cette expérience nous a donné plusieurs informations importantes. Tout d'abord, en absence d'extrait protéique, la liaison entre les protéines Argonautes et le microARN est très stable, ce qui avait déjà été observé dans d'autres organismes (Boland et al., 2011; Boland et al., 2010; Ma et al., 2005). Par la suite, l'incubation dans un extrait mutant pour *dcs-1* n'affecte pas le relâchement des microARNs. Par contre, on observe une accumulation des microARNs relâchés, ce qui suggère un défaut dans la dégradation des microARNs. Un test de dégradation où un microARN synthétique radiomarqué est incubé dans un extrait protéique avant d'être résolu sur gel a confirmé que le mutant *dcs-1* présente un problème dans la dégradation des microARNs.

La protéine DCS-1 ne possède pas de domaine de liaison à l'ARN et son activité catalytique est spécifique pour la coiffe des ARNm et plus particulièrement pour des substrats m7G avec moins de 10 nucléotides liés à la coiffe (Cohen et al., 2004). De plus, nous avons confirmé que la protéine recombinante DCS-1 ne présente aucune activité de dégradation après incubation avec un microARN radiomarqué, même si un essai de dégradation de la coiffe a confirmé que la protéine recombinante produite était active. Nous avons donc émis l'hypothèse que la protéine DCS-1 fait partie d'un complexe de dégradation où elle pourrait moduler l'activité catalytique d'une autre enzyme. L'immunoprécipitation de DCS-1 suivie d'un essai de dégradation a confirmé que le complexe DCS-1 possède une activité de dégradation (Figure 24). Chez *C. elegans*, il n'y a que deux enzymes qui ont déjà été impliquées dans la dégradation des microARNs, XRN-1 et XRN-2. Comme DCS-1 et XRN-1 sont cytoplasmiques, alors que XRN-2 est nucléaire (Figure 26), nous avons donc porté notre attention sur l'enzyme XRN-1. L'importance de XRN-1 dans le complexe de DCS-1 a ensuite été confirmée. XRN-1 forme un complexe avec DCS-1 et sa présence est nécessaire à l'activité de dégradation de ce complexe (Figure 25).

Une question récurrente qui nous était adressée concernait l'implication possible de l'activité catalytique de DCS-1 dans la voie des microARNs. Afin de répondre à cette question, nous avons injecté une forme inactive de DCS-1 (CatM) dans des nématodes, mais pour une raison inconnue, nous n'avons jamais été capables d'obtenir une souche exprimant la forme mutée. L'hypothèse est que la forme inactive agit comme un dominant négatif et que sa présence est létale. Pour contourner le problème, nous avons généré des protéines recombinantes portant les mutations dans le domaine catalytique (CatM), mais également une protéine portant une des mutations isolées dans le criblage, une substitution d'acide aminé (L32P) (Figure 26). Puis, j'ai incubé ces recombinantes dans un extrait protéique pour ensuite les purifier, analyser les protéines associées et mesurer l'activité de dégradation du complexe formé. Dans ces conditions, la protéine DCS-1(CatM) est toujours capable de former un complexe de dégradation actif avec XRN-1, ce qui confirme que l'activité de DCS-1 sur les microARNs est indépendante de sa capacité à enlever la coiffe des ARNm. De plus, l'incubation avec la protéine recombinante DCS-1(L32P) empêche la formation du complexe de dégradation. Ce résultat est intéressant puisque la perte du complexe de dégradation peut expliquer les défauts de développement et l'accumulation de microARN observés pour les mutants *dcs-1*.

Le mécanisme exact par lequel DCS-1 influence l'activité d'XRN-1 est pour le moment inconnu. Il est intéressant de noter que chez la levure, l'homologue de DCS-1 (Dcs1p) stimule l'activité de Xrn1p en augmentant son affinité pour l'ARN (Sinturel et al., 2012). Il est alors possible d'imaginer que DCS-1 stimule l'activité de XRN-1 chez *C. elegans* de la même façon. Avant de déterminer l'effet de DCS-1 sur XRN-1, il serait important de démontrer dans un premier temps que ces deux protéines interagissent directement par une expérience de *GST pull-down* à l'aide de protéines recombinantes. Par la suite, l'affinité de XRN-1 pour l'ARN pourrait être mesurée en incubant une protéine recombinante XRN-1 inactive avec de l'ARN en présence ou en absence de DCS-1 pour finir par un essai de retard sur gel.

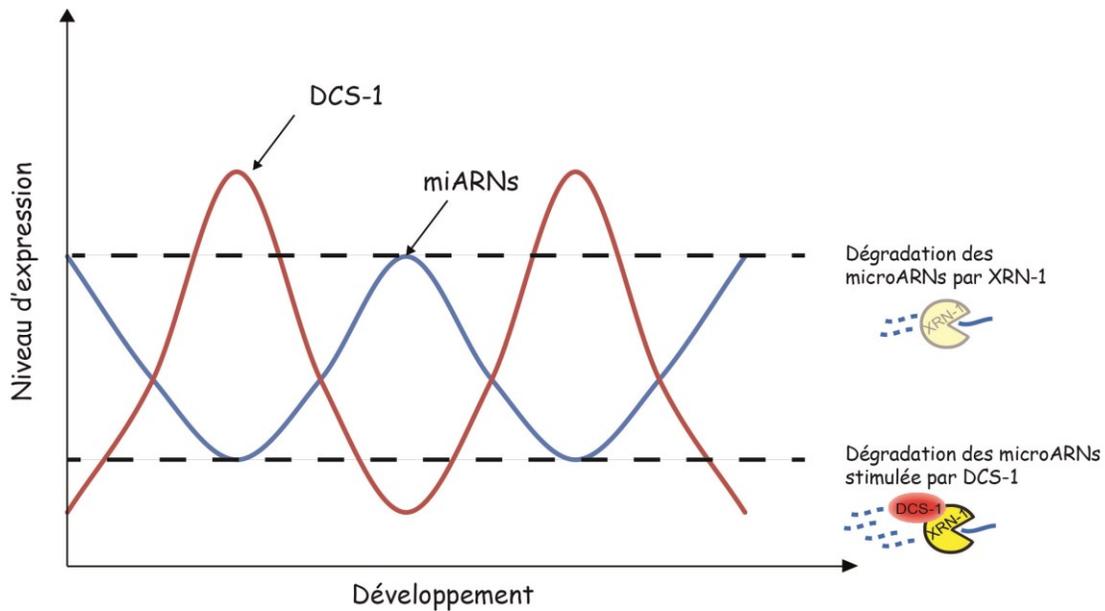
#### 5.1.4 Pourquoi DCS-1 est requis pour la voie des microARNs ?

D'une part, l'expression de plusieurs microARNs est fortement régulée au cours du développement et une mauvaise régulation des microARNs peut mener à d'importants défauts de développement (Martinez et al., 2008; Resnick et al., 2010). Ensuite, l'expression de DCS-1 est également régulée au cours du développement du nématode (Kwasnicka et al., 2003). De plus, lorsque l'essai de dégradation dans un extrait protéique mutant pour *dcs-1* a été répété avec un temps d'incubation plus long, il a été possible d'observer une dégradation complète du microARN, ce qui démontre qu'il ne s'agit pas de la perte totale de l'activité de dégradation mais plutôt d'une diminution de son efficacité (Figure 28).

Lorsque l'on prend en considération ces éléments, on peut imaginer que l'expression de DCS-1 pourrait être corrélée avec une plus grande nécessité de dégrader certains microARNs. L'activité de DCS-1 dans la dégradation des microARNs serait ainsi plus importante durant des étapes cruciales de développement au cours desquels les animaux subissent d'importantes modulations dans l'expression génique telles que le début de l'embryogenèse et dans la transition larve-adulte. La présence de DCS-1 pourrait alors stimuler l'activité de XRN-1 et permettre la progression du développement. En d'autres temps, la protéine XRN-1 pourrait être minimale et être suffisante pour dégrader les microARNs.

Au cours de ces étapes du développement, le complexe de dégradation pourrait être important pour

éliminer les microARNs qui ne sont plus utiles, c'est-à-dire après la régulation de leurs cibles. À l'heure actuelle, il n'existe aucune évidence qui démontre que les microARNs sont recyclés. C'est pour cette raison que nous supposons que le complexe de dégradation pourrait être important pour dégrader ces microARNs et éviter qu'ils ne soient accessibles de nouveau, pour être pris en charge par un nouveau miRISC. La diminution de l'activité de ce complexe entraînerait, donc, l'accumulation de microARNs "déchets" et leur retour dans la voie active.



**Figure 41 : Importance de DCS-1 pour la dégradation des microARNs**

Puisque DCS-1 (Trait rouge) est également régulé de façon temporelle, son expression pourrait être requise lorsque la quantité de microARNs à dégrader est plus élevée (Trait bleu). En absence de DCS-1, le complexe de dégradation est moins efficace. Figure modifiée de : (Meziane et al., 2013)

Puisque la stimulation de l'activité de XRN-1 par DCS-1 est conservée de la levure au nématode, il est permis d'imaginer qu'elle pourrait également être conservée chez l'humain. À l'heure actuelle, l'implication de l'homologue de DCS-1 (DcpS), chez l'humain, est toujours sous étude par mon collègue Oussama Meziane PhD. Bien que ces protéines soient bien conservées, il existe plusieurs différences importantes, entre les deux organismes qui pourraient affecter l'implication de DcpS dans la voie des microARNs. Tout d'abord, chez *C. elegans*, DCS-1 est retrouvé uniquement dans le cytoplasme, alors que chez les mammifères, DcpS possède un signal d'import nucléaire et sa localisation est principalement nucléaire (Kwasnicka et al., 2003). Les travaux de mon collègue Dr.

Meziane suggèrent que la fraction cytoplasmique de DCS-1 pourrait avoir un rôle différent de celle nucléaire. Le rôle de la protéine XRN-1 dans la dégradation des microARNs chez l'humain est également incertain. Il n'existe qu'un seul exemple dans la littérature où une différence dans la stabilité d'un microARN a été observée suite à l'inhibition d'XRN-1 (Bail et al., 2010). Au moment d'écrire ce manuscrit, les travaux de mon collègue suggèrent que la protéine DcpS est également impliquée dans la dégradation des microARNs, dans les cellules HEK293T. Par contre, pour le moment, il n'a pas été possible de détecter une interaction entre DCS-1 et XRN-1.

Il existe également d'importantes différences entre les deux modèles d'études qui rendent l'étude de la dégradation des microARNs plus ardue dans les cellules en culture. L'utilisation d'un organisme tel que *C. elegans* permet d'étudier l'implication d'une protéine dans plusieurs contextes développementaux différents où l'expression génique et celles des microARNs doivent être finement régulées entre les différents stades. La majorité des études des microARNs chez l'humain ont été réalisées avec des cellules en culture. Or, ce modèle d'études ne permet pas de récapituler les transitions développementales. Il peut, donc s'avérer plus dur de trouver des conditions expérimentales où une dégradation importante des microARNs est nécessaire.

Sans être un modèle parfait, l'étude de la différenciation des cellules souches pourrait être une alternative à l'utilisation d'animaux en développement. Certains microARNs ont également montré d'importantes modulations au cours du cycle cellulaire, alors, il serait intéressant de tester l'implication de DCS-1 ou XRN-1 dans des ces conditions (Rüegger and Grosshans, 2012).

La protéine DcpS semble avoir un rôle important pour le contrôle de l'homéostasie cellulaire. Une analyse bio-informatique réalisée par Éric Paquet, un bio-informaticien au centre de recherche, a révélé que la protéine DCS-1 est l'une des protéines les plus affectées dans différents types de cancer du foie. De plus, l'inhibition de DCS-1 à l'aide d'une drogue dans la maladie de l'amyotrophie spinale (SMA) permet d'améliorer les symptômes associés à cette pathologie (Gogliotti et al., 2013; Van Meerbeke et al., 2013). Bien que l'implication de DCS-1 dans le cancer ou dans le SMA ne soit pas connue, nous savons que les microARNs sont dérégulés et impliqués dans la progression de ces maladies (Callegari et al., 2014; Haramati et al., 2010). Si l'implication de DcpS dans la dégradation des microARNs chez les mammifères se confirme, il sera intéressant de tester l'implication de cette

activité dans le développement de ces pathologies. La perte de fonction de l'homologue de SMN-1 chez *C. elegans* entraîne également des problèmes de locomotions et une réduction de la survie (Briese et al., 2009; Dimitriadi et al., 2010; Haramati et al., 2010; Miguel-Aliaga et al., 1999; Sleight et al., 2011). Il pourrait, donc être intéressant de déterminer si la perte de fonction de DCS-1 peut également améliorer le phénotype de ces animaux.

Il est intéressant également de noter que ce n'est pas la première démonstration du fait que DCS-1 peut moduler l'activité d'une autre protéine. Dans les cellules HEK293T, l'homologue de DCS-1 (DcpS) interagit avec NR1 (*Cytosolic NADPH-dependent flavin reductase*) et bloque la production d'espèces réactives d'oxygène par NR1 et stimule la survie cellulaire (Kwasnicka-Crawford and Vincent, 2005).

Cet exemple, ainsi que mes travaux démontrent que le rôle de DCS-1 dans la cellule ne se résume pas à enlever la coiffe des ARNm. DCS-1 pourrait être impliqué dans plusieurs sentiers biologiques et affecter l'activité de plusieurs autres protéines.

## **5.2 Identification et caractérisation d'un autre membre du complexe de dégradation**

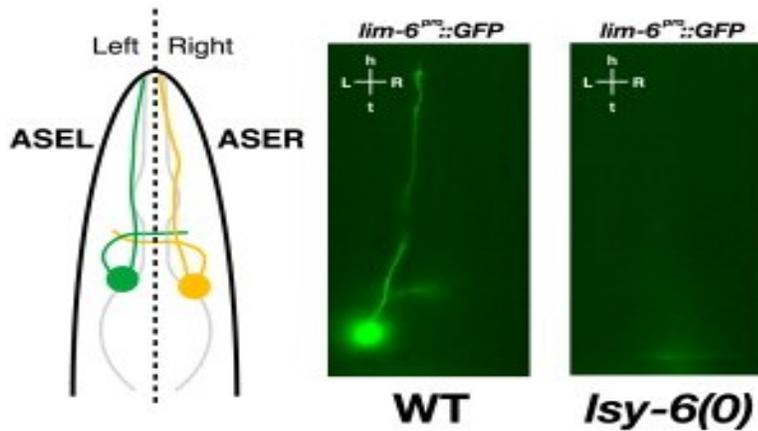
L'étude de la dégradation des microARNs est un domaine très récent. Dans les différents organismes, seules certaines enzymes responsables de la dégradation des microARNs ont été identifiées et un seul modulateur est actuellement connu (Bosse et al., 2013; Rüegger and Grosshans, 2012).

Étant donné que DCS-1 et XRN-1 forment un complexe de dégradation, nous avons décidé de purifier ce complexe et d'identifier les protéines qui y sont associées, dans l'optique que ces protéines soient également importantes pour ce complexe. Une liste des candidats potentiels les plus intéressants a ensuite été générée à partir de l'analyse de protéomique. Ces candidats ont été sélectionnés en raison de leur implication connue dans les voies de régulation post-traductionnelle. Parmi ces candidats, on retrouve donc des kinases, des protéines impliquées dans la dégradation protéique, des phosphatases ou encore des protéines impliquées dans la dégradation des ARNm

(Tableaux 3). Nous avons décidé d'établir ces critères en raison du fait qu'un changement dans le niveau protéique d'un des composants du complexe ou encore la variation de ses modifications post-traductionnelles pourrait affecter la formation, le recrutement ou le recyclage du complexe de dégradation. Cependant, il est évident que cette façon de faire ait pu causer l'exclusion d'une protéine qui se serait avérée très importante dans la régulation des microARNs.

L'analyse des phénotypes associés à la perte de fonction de ces candidats, a permis de choisir la phosphatase PPM-2 comme le candidat le plus intéressant à étudier. PPM-2 a été sélectionnée en raison des défauts observés dans la formation des *alae*. De plus, contrairement à DCS-1, ce mutant ne forme pas d'*alae* de façon précoce. Les défauts affectent principalement l'intégrité physique des *alae*. Ce premier résultat nous suggérait que la fonction de PPM-2 serait opposée à celle de DCS-1 (Figure 32). Des analyses plus poussées nous ont révélé que le mutant *ppm-2* affecte la régulation par les microARNs de la famille *let-7*. La perte de *ppm-2* affecte la régulation des cibles de la famille *let-7* ; *let-60* et *lin-41* (Figures 33 et 36).

Les expériences réalisées jusqu'à maintenant se concentrent en grande partie sur la régulation par les membres de la famille *let-7*. L'utilisation d'un rapporteur pour un autre microARN sera importante pour déterminer si l'impact de la perte de fonction de PPM-2, sur l'activité des microARNsm est spécifique à la famille *let-7* ou si cet effet est général. Pour ce faire, l'activité du microARN *Isy-6* sera étudiée. Ce microARN participe à l'établissement de la spécialisation de deux neurones symétriques bilatéraux ASEL et ASER (Johnston and Hobert, 2003). *Isy-6* est exprimé spécifiquement dans le neurone ASEL où il régule l'expression du facteur de transcription COG-1. En absence de *Isy-6*, l'expression de COG-1 dans l'ASEL abolit la spécialisation et deux neurones ASER sont formés. Une souche exprimant la protéine GFP sous le contrôle du promoteur *lim-6* sera utilisée. *lim-6* est exprimé spécifiquement dans la cellule ASEL. En absence de *Isy-6*, la GFP ne sera pas exprimée, puisque l'expression de COG-1 empêche la transcription de *lim-6* (Figure 42) (Hammell et al., 2009; Vasquez-Rifo et al., 2013). Ce rapporteur sera introduit dans la souche mutante pour *ppm-2* et l'expression du GFP permettra d'évaluée l'impact de la perte de *ppm-2* sur l'activité de *Isy-6*. On peut s'attendre à ce que la perte de *ppm-2* cause une réduction de l'activité de *Isy-6* et la perte de l'expression du GFP.



**Figure 42 : Souche rapporteur de l'activité de *Isy-6***

En condition sauvage (Wt), l'expression de *Isy-6* dans le neurone ASEL inhibe l'expression de COG-1. Ce facteur de transcription est un inhibiteur de la transcription de *lim-6*. L'expression de *Isy-6* va donc permettre l'expression du GFP dans ce neurone sous le contrôle du promoteur de *lim-6*. Dans un mutant *Isy-6* (0), l'expression de COG-1 va bloquer l'expression du GFP et aucune fluorescence ne sera détectée (Johnston and Hobert, 2003). Figure modifiée de : (Hammell et al., 2009)

Puisque l'activité de ces microARNs semble être réduite dans un mutant *ppm-2*, nous avons décidé de quantifier le niveau des microARNs. Cette quantification a révélé que plusieurs microARNs, dont *let-7*, sont diminués en absence de *ppm-2* (Figure 37). La quantification des protéines importantes pour la stabilité des microARNs a démontré que le niveau des protéines DCS-1, ALG-1 et XRN-1 ne change pas en absence de *ppm-2*. Puisque PPM-2 a été identifié comme un interacteur potentiel de la protéine DCS-1, nous avons réalisé un essai de dégradation pour déterminer si cette activité était également affectée dans le mutant *ppm-2*. Contrairement à la perte de la protéine DCS-1 qui cause une stabilisation de l'ARN dans cet essai (Figure 23), l'absence de PPM-2 entraîne une dégradation plus rapide de cet ARN (Figure 37).

Comme PPM-2 est une phosphatase, notre hypothèse est que PPM-2 est impliqué dans la déphosphorylation d'une protéine importante pour la dégradation ou la stabilité des microARNs. La stabilisation d'une phosphorylation en absence de *ppm-2* pourrait mener à la stabilisation d'un complexe ou encore à une modification de l'activité de cette protéine. Le changement de phosphorylation de ces protéines pourrait également avoir un fort impact sur la localisation cellulaire

ou sur les partenaires d'interaction de ces protéines.

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant suggèrent que PPM-2 affecte la stabilité des microARNs. Par contre, ils ne permettent pas de déterminer avec précision la protéine pouvant être affectée par PPM-2. En ce moment, nous avons trois candidats potentiels en raison de leur importance pour contrôler la stabilité des microARNs: DCS-1, ALG-1 et XRN-1. Chez *C. elegans*, l'état de phosphorylation de ces protéines est peu ou pas connu.

Tout d'abord, puisque PPM-2 est un interacteur potentiel du complexe de dégradation, nous avons émis l'hypothèse que DCS-1 ou XRN-1 puisse être la cible de PPM-2. L'état de phosphorylation de XRN-1 et de DCS-1 pourrait affecter l'activité du complexe ou encore stabiliser l'interaction entre ces deux protéines. La déphosphorylation d'une de ces protéines par *ppm-2* pourrait alors être importante pour dissocier DCS-1 et XRN-1 et ainsi mettre fin à la dégradation.

Une analyse préliminaire des sites phosphorylés connus pour les homologues de ces deux protéines chez les mammifères, a démontré que seul DCS-1 possède des sites de phosphorylation conservés entre l'humain et *C. elegans*. En collaboration avec le Dr. Nicolas Bisson, nous avons tenté de détecter la présence de résidus phosphorylés dans la protéine DCS-1 par spectrométrie de masse. Pour le moment, nous n'avons pas été en mesure de détecter aucun signe de phosphorylation sur cette protéine. Par contre, plusieurs éléments peuvent compliquer la détection; la phosphorylation pourrait être retrouvée uniquement dans certains tissus ou encore lors de certaines phases du développement. De plus, si une fraction seulement de DCS-1 est phosphorylée, les chances de détecter ces peptides par spectrométrie de masse sont minces.

D'autres résultats mettent en doute l'hypothèse que DCS-1 ou XRN-1 soit la cible de PPM-2. Lorsque le complexe immunoprécipité est utilisé pour un essai de dégradation tel que réalisé pour le manuscrit de DCS-1 (Figure 24), aucune différence dans l'activité du complexe n'est observée entre un mutant *ppm-2* et la souche sauvage. L'activité du complexe de dégradation ne semble donc pas être affectée par la perte de PPM-2.

En parallèle, j'ai travaillé sur une autre hypothèse selon laquelle PPM-2 pourrait affecter l'état de

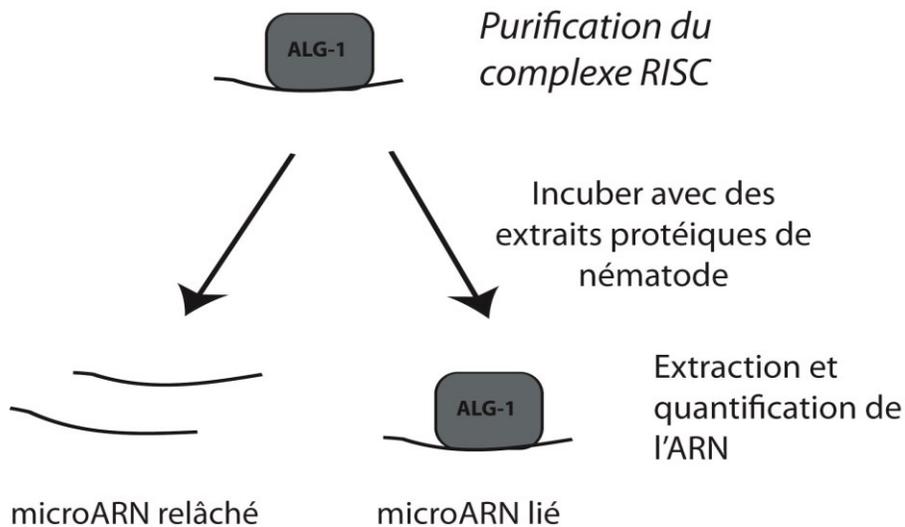
phosphorylation d'une des protéines Argonautes. Tel que mentionné dans l'introduction, chez l'humain, l'état de phosphorylation des Argonautes peut influencer leurs interactions avec Dicer, la liaison au microARN et leurs localisation (Jee and Lai, 2014). Un défaut dans la prise en charge du microARN ou encore dans le relâchement pourrait expliquer les phénotypes observés jusqu'à maintenant. Par exemple, la phosphorylation de la tyrosine 529 de Ago2 diminue la prise en charge des microARNs et entraîne une diminution de la répression des cibles de microARNs (Rüdel et al., 2010). Il est également connu que la liaison par les protéines Argonautes protège les microARNs contre l'action des enzymes de dégradation. Un problème d'interaction entre les microARNs et les Argonautes pourrait causer ces phénotypes (Ameres et al., 2010; De et al., 2013).

Bien que l'état de phosphorylation d'ALG-1 ne soit pas encore clairement établi chez *C. elegans*, la comparaison des séquences protéiques d'ALG-1 et de Ago2 pour déterminer si certains des sites de phosphorylation identifiés chez l'humain sont conservés, révèle qu'un seul site de phosphorylation est conservé entre les deux espèces. Il s'agit de la phosphorylation de la tyrosine en position 529 d'Ago2. Dans le cas qui nous intéresse, la protéine PPM-2 est phosphatase spécifique pour les résidus sérine/thréonine. La phosphorylation de cette tyrosine ne devrait donc pas être responsable des phénotypes observés dans le mutant *ppm-2*. Une collaboration avec le laboratoire du Dr. Meister nous encourage à étudier la phosphorylation d'ALG-1 plus en profondeur. Les travaux du groupe du Dr. Meister ont permis de mettre en évidence plusieurs nouveaux sites de phosphorylation sur Ago2. Parmi ces sites, un groupe de 5 sérines est fort intéressant puisque la mutation de ces sérines en acides glutamiques abolit complètement l'interaction entre la protéine Argonaute et les microARNs. Ces sérines sont également conservées dans la protéine ALG-1. De plus, ma collègue Sandra Piquet a récemment identifié plusieurs autres sites de phosphorylation sur la protéine ALG-1, dont certains correspondent aux sites identifiés par le groupe du Dr. Meister comme étant important dans l'interaction avec les microARNs. La valeur biologique de ces phosphorylations sera étudiée par Sandra Piquet. Ces résultats témoignent de l'importance de l'état de phosphorylation des protéines Argonautes pour réguler leurs interactions avec les microARNs.

Afin de tester l'hypothèse que l'activité des protéines Argonautes serait affectée dans un mutant *ppm-2*, la protéine ALG-1 a été immunoprécipité en présence et en absence de la protéine PPM-2. Une extraction d'ARNs, suivie d'une quantification des ARNs lié à ALG-1, a révélé que les

microARNs semblent interagir plus fortement avec ALG-1, lorsque la protéine PPM-2 est absente (Figure 39). Ce résultat est très intéressant, puisqu'il pourrait permettre d'expliquer les résultats obtenus jusqu'à maintenant. Une stabilisation de l'interaction entre le microARN et l'Argonaute ou encore un problème de relâchement pourra affecter le niveau global des microARNs. L'accélération de la dégradation observée dans un mutant *ppm-2* pourrait également être expliquée par ce problème de relâchement. Il est possible que dans cet essai, une portion des microARNs synthétiques puissent être protégés par les Argonautes présents dans l'extrait protéique. Par contre, si les Argonautes présents dans un mutant *ppm-2* sont déjà occupés par des microARNs endogènes, les microARNs synthétiques ne pourront pas être protégés par l'Argonaute et seront dégradés plus rapidement. Un phénomène similaire pourrait se produire *in vivo*. Si les microARNs restent liés aux protéines Argonautes au lieu d'être relâchés, les nouveaux microARNs produits par Dicer ne pourront pas être transférés à l'Argonaute et seront alors dégradés plus rapidement. Le relâchement des microARNs pourrait également être une étape importante pour permettre le recyclage du miRISC. Le blocage de ce relâchement pourrait entraîner l'accumulation de protéines ALG-1 inactives. Il est d'ailleurs connu que la dissociation entre le microARN et les protéines Argonautes permet à la protéine de devenir accessible pour prendre en charge un nouvel ARN (De et al., 2013).

Afin de mesurer le relâchement par les protéines Argonautes, le test de relâchement réalisé dans la section sur DCS-1 (Figure 23) sera répété avec un extrait muté pour *ppm-2*. Ce test nous permettra de mesurer le relâchement des microARNs par ALG-1 (Figure 42).



**Figure 43 : Schéma du test de relâchement des microARNs**

Le miRISC purifié à partir d'un extrait protéique d'une souche sauvage est incubé dans un second extrait protéique. Cette incubation stimule le relâchement des microARNs. Les microARNs ainsi relâchés et les microARNs toujours liés à l'Argonaute seront quantifiés. Un problème de relâchement entraînera une stabilisation des microARNs liés à ALG-1.

Afin de déterminer si l'état de phosphorylation d'ALG-1 est différent en absence de *ppm-2*, nous avons utilisé diverses techniques telles que des anticorps spécifiques phospho-sérines ou phospho-thréonines, ainsi que des analyses de spectrométrie de masse. À plus long terme, si un site de phosphorylation est identifié, le résidu sera muté pour un acide glutamique afin de générer une protéine constitutivement phosphorylée et ainsi confirmer l'importance de cette phosphorylation. Des études *in vitro* à l'aide de protéines recombinantes ou encore la génération de lignée *in vivo* pourra permettre de confirmer les résultats obtenus avec le mutant *ppm-2*.

Il est également possible que PPM-2 affecte une autre protéine, qui pourrait stimuler le relâchement des microARNs, laquelle n'est pas connue pour le moment. Dans ce cas, des analyses de protéomique plus poussées pourraient permettre de l'identifier. Par exemple, par l'utilisation de techniques d'enrichissement de phosphopeptides suivie d'une analyse par spectrométrie de masse à partir d'extrait protéique sauvage et mutant pour *ppm-2*. La comparaison entre les souches sauvages et mutantes pourrait nous permettre d'identifier la protéine dont la phosphorylation est

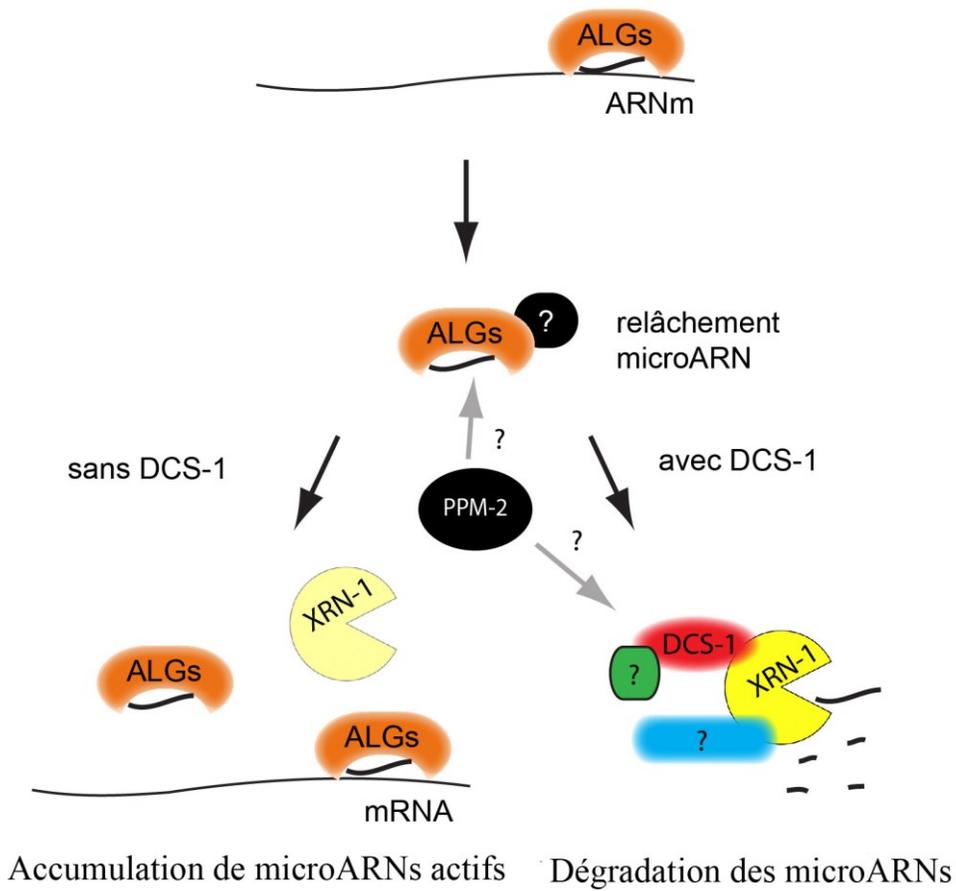
stabilisée dans un mutant *ppm-2*.

### 5.3 Conclusion générale

La découverte des microARNs il y a maintenant plus de 20 ans a révolutionné le domaine de la recherche sur la régulation de l'expression génique. Ces courtes molécules d'ARN, présentes chez tous les métazoaires, jouent un rôle primordial dans le développement et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les protéines essentielles à cette voie ont rapidement été identifiées et leur importance pour le développement et la santé des organismes n'est plus à présenter.

Au cours des dernières années, les travaux de scientifiques tel que le Dr. Simard ont permis de mettre en évidence le rôle joué par des protéines accessoires à cette voie de régulation. Ces protéines ne sont pas essentielles pour le fonctionnement de la voie des microARNs, mais elles permettent une activité optimale de celle-ci. Dans notre laboratoire, ces protéines ont été identifiées à partir de différents types de criblages en allant du criblage double hybride (RACK-1) à un criblage génétique classique (DCS-1 et VPS-52). L'identification de ces protéines démontre l'importance et l'utilité de ce type de méthode non biaisé qui permet d'identifier de nouveaux facteurs insoupçonnés. Peu de gens auraient pu prédire que des protéines telles que DCS-1 et VPS-52 puissent avoir un rôle à jouer dans la voie des microARNs. Au fil des ans, beaucoup de groupes de recherches ont porté leur attention sur le fonctionnement de la voie, mais ce n'est que plus récemment que la question de la régulation de la voie a réellement pris son envol.

Les travaux réalisés lors de mon doctorat ont permis de mettre en lumière l'existence d'un complexe de dégradation dans le nématode *C. elegans* et d'identifier une nouvelle fonction pour la protéine DCS-1. De façon plus importante encore, DCS-1 est le premier modulateur de l'activité d'une enzyme, impliqué dans la dégradation des microARNs à avoir été caractérisé. Mes plus récents travaux sur la phosphatase PPM-2 indiquent que cette phosphatase serait également la régulation de la stabilité des microARNs. Bien que préliminaires, ces résultats suggèrent que PPM-2 pourrait jouer un rôle important dans la voie des microARNs. En somme, mes travaux ont permis de mieux comprendre comment les microARNs sont dégradés dans la cellule et ouvrent la porte à de nouveaux projets pour tenter de comprendre la régulation et le fonctionnement de ce complexe.



**Figure 44 : Résumé de mes travaux**

Résumé de mes travaux de recherche. En absence de DCS-1, l'activité de XRN-1 est diminuée et les microARNs s'accumulent. Ces microARNs peuvent retourner dans la voie des microARNs actifs. La protéine PPM-2 pourrait être importante pour réguler l'activité d'une protéine essentielle à la régulation de la stabilité des microARNs.

# Bibliographie

Abbott, A., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E.A., Lau, N., Bartel, D.P., Horvitz, H., and Ambros, V.R. (2005). The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell* 9, 403-414.

Adams, B.D., Kasinski, A.L., and Slack, F.J. (2014). Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer. *Current biology* : CB 24, R762-R776.

Agranat-Tamir, L., Shomron, N., Sperling, J., and Sperling, R. (2014). Interplay between pre-mRNA splicing and microRNA biogenesis within the supraspliceosome. *Nucleic Acids Research* 42, 4640-4651.

Alisch, R.S., Jin, P., Epstein, M., Caspary, T., and Warren, S.T. (2007). Argonaute2 is essential for mammalian gastrulation and proper mesoderm formation. *PLoS Genet* 3, e227.

Alvarez-Saavedra, E., and Horvitz, H.R. (2010). Many Families of *C. elegans* MicroRNAs Are Not Essential for Development or Viability. *Current biology* : CB 20, 367-373.

Ameres, S.L., Horwich, M.D., Hung, J.-H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science (New York, NY)* 328, 1534-1539.

Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., and Bartel, D.P. (2013). Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell* 152, 844-858.

Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* 22, 2773-2785.

Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P., and Bartel, D.P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64-71.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553-563.

Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L.A., Hart, R.P., and Kiledjian, M. (2010). Differential regulation of microRNA stability. *RNA (New York, NY)* 16, 1032-1039.

Bajan, S., and Hutvagner, G. (2011). Another "loophole" in miRNA processing. *Mol Cell* 44, 345-347.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Review Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281-297.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.

Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA (New York, NY)* 11, 241-247.

Bazzini, A.A., Lee, M.T., and Giraldez, A.J. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science (New York, NY)* 336, 233-237.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* 20, 1885-1898.

Beilharz, T.H., Humphreys, D.T., Clancy, J.L., Thermann, R., Martin, D.I.K., Hentze, M.W., and Preiss, T. (2009). microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. *136*, 926-938.

Beitel, G.J., Clark, S.G., and Horvitz, H.R. (1990). *Caenorhabditis elegans* ras gene let-60 acts as a switch in the pathway of vulval induction. *Nature* 348, 503-509.

Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics* 12, 846-860.

Berezikov, E., Robine, N., Samsonova, A., Westholm, J.O., Naqvi, A., Hung, J.-H., Okamura, K., Dai, Q., Bortolamiol-Becet, D., Martin, R., *et al.* (2011). Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence. *Genome research* 21, 203-215.

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

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

Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunenko, M., Routzahn, K.M., Waugh, D.S., Court, D.L., and Ji, X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure* 9, 1225-1236.

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

Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, NY)* 10, 185-191.

Boland, A., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2011). Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 10466-10471.

- Boland, A., Tritschler, F., Heimstädt, S., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2010). Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO reports* *11*, 522-527.
- Boon, R.A., Seeger, T., Heydt, S., Fischer, A., Hergenreider, E., Horrevoets, A.J., Vinciguerra, M., Rosenthal, N., Sciacca, S., Pilato, M., *et al.* (2011). MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circulation research* *109*, 1115-1119.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural and molecular biology* *13*, 1097-1101.
- Bosse, G.D., Ruegger, S., Ow, M.C., Vasquez-Rifo, A., Rondeau, E.L., Ambros, V.R., Grosshans, H., and Simard, M.J. (2013). The decapping scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular cell* *50*, 281-287.
- Bouasker, S., and Simard, M.J. (2012). The slicing activity of miRNA-specific Argonautes is essential for the miRNA pathway in *C. elegans*. *Nucleic Acids Research* *40*, 10452-10462.
- Boyerinas, B., Park, S.M., Hau, A., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-related cancer* *17*, F19-36.
- Bracht, J., Hunter, S., Eachus, R., Weeks, P., and Pasquinelli, A.E. (2004). Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA (New York, NY)* *10*, 1586-1594.
- Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylation Complexes to miRNA Targets. *Molecular and cellular biology* *44*, 120-133.
- Braun, J.E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.-T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., and Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature structural and molecular biology* *19*, 1324-1331.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology* *3*, e85.
- Brenner, J.L., Jasiewicz, K.L., Fahley, A.F., Kemp, B.J., and Abbott, A.L. (2010). Loss of Individual MicroRNAs Causes Mutant Phenotypes in Sensitized Genetic Backgrounds in *C. elegans*. *Current biology : CB* *20*, 1321-1325.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71-94.
- Briese, M., Esmaeili, B., Fraboulet, S., Burt, E.C., Christodoulou, S., Towers, P.R., Davies, K.E., and Sattelle, D.B. (2009). Deletion of *smn-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. *Hum Mol Genet* *18*, 97-104.
- Bronevetsky, Y., Villarino, A.V., Eisle, C.J., Barbeau, R., Barczak, A.J., Heinz, G.A., Kremmer, E., Heissmeyer, V., Mcmanus, M.T., Erle, D.J., *et al.* (2013). T cell activation induces proteasomal degradation of

Argonaute and rapid remodeling of the microRNA repertoire. *The Journal of experimental medicine* 210, 417-432.

Bukhari, S.I., Vasquez-Rifo, A., Gagne, D., Paquet, E.R., Zetka, M., Robert, C., Masson, J.Y., and Simard, M.J. (2012). The microRNA pathway controls germ cell proliferation and differentiation in *C. elegans*. *Cell research* 22, 1034-1045.

Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J.L., Tomaru, Y., Nishibu, T., Ukekawa, R., Funakoshi, T., Kurokawa, T., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., *et al.* (2010). A comprehensive survey of animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. *Genome research* 20, 1398-1410.

Bussing, I., Yang, J.S., Lai, E.C., and Grosshans, H. (2010). The nuclear export receptor XPO-1 supports primary miRNA processing in *C. elegans* and *Drosophila*. *EMBO J* 29, 1830-1839.

Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, NY)* 10, 1957-1966.

Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer* 6, 857-866.

Callegari, E., Gramantieri, L., Domenicali, M., D'Abundo, L., Sabbioni, S., and Negrini, M. (2014). MicroRNAs in liver cancer: a model for investigating pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Cell death and differentiation*.

Callis, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.P., Chen, J.F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., *et al.* (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of clinical investigation* 119, 2772-2786.

Carrel, D., and Firestein, B.L. (2009). MicroRNA-mediated regulation of synaptic palmitoylation: shrinking fat spines. *Nat Cell Biol* 11, 681-682.

Chalfie, M., Horvitz, H.R., and Sulston, J.E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell* 24, 59-69.

Chang, T.-C., Yu, D., Lee, Y.-S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature genetics* 40, 43-50.

Chang, T.-C., Zeitels, L., Hwang, H.-W., Chivukula, R.R., Wentzel, E., Dews, M., Jung, J., Gao, P., Dang, C., Beer, M., *et al.* (2009). Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Chatterjee, S., Fasler, M., Büssing, I., and Grosshans, H. (2011). Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. *Developmental Cell* 20, 388-396.

- Chatterjee, S., and Grosshans, H. (2009). Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 461, 546-549.
- Chaulk, S.G., Lattanzi, V.J., Hiemer, S.E., Fahlman, R.P., and Varelas, X. (2014). The Hippo Pathway Effectors TAZ/YAP Regulate Dicer Expression and MicroRNA Biogenesis through Let-7. *The Journal of biological chemistry* 289, 1886-1891.
- Chekulaeva, M., Filipowicz, W., and Parker, R. (2009). Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *RNA (New York, NY)* 15, 794-803.
- Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J.T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nature structural and molecular biology* 18, 1218-1226.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584-589.
- Chen, A.J., Paik, J.H., Zhang, H., Shukla, S.A., Mortensen, R., Hu, J., Ying, H., Hu, B., Hurt, J., Farny, N., *et al.* (2012). STAR RNA-binding protein Quaking suppresses cancer via stabilization of specific miRNA. *Genes & development* 26, 1459-1472.
- Chen, C., Zheng, D., Xia, Z., and Shyu, A.-B. (2009). Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nature structural & molecular biology*.
- Chen, C.-Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science (New York, NY)* 303, 83-86.
- 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.
- Chen, P.S., Su, J.L., Cha, S.T., Tarn, W.Y., Wang, M.Y., Hsu, H.C., Lin, M.T., Chu, C.Y., Hua, K.T., Chen, C.N., *et al.* (2011). miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* 121, 3442-3455.
- Chen, Y., Boland, A., Kuzuoglu-Öztürk, D., Bawankar, P., Loh, B., Chang, C.-T., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2014). A DDX6-CNOT1 Complex and W-Binding Pockets in CNOT9 Reveal Direct Links between miRNA Target Recognition and Silencing. *Molecular cell* 54, 737-750.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
- Cheng, T.-L., Wang, Z., Liao, Q., Zhu, Y., Zhou, W.-H., Xu, W., and Qiu, Z. (2014). MeCP2 suppresses nuclear microRNA processing and dendritic growth by regulating the DGCR8/Drosha complex. *Developmental Cell* 28, 547-560.

Choudhury, N.R., de Lima Alves, F., de Andres-Aguayo, L., Graf, T., Caceres, J.F., Rappsilber, J., and Michlewski, G. (2013). Tissue-specific control of brain-enriched miR-7 biogenesis. *Genes & development* 27, 24-38.

Chu, C.-Y., and Rana, T.M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS biology* 4, e210.

Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., *et al.* (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328, 1694-1698.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13944-13949.

Cohen, L.S., Mikhli, C., Friedman, C., Jankowska-Anyszka, M., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., and Davis, R.E. (2004). Nematode m7GpppG and m3(2,2,7)GpppG decapping: activities in *Ascaris* embryos and characterization of *C. elegans* scavenger DcpS. *RNA (New York, NY)* 10, 1609-1624.

Corcoran, D.L., Pandit, K.V., Gordon, B., Bhattacharjee, A., Kaminski, N., and Benos, P.V. (2009). Features of Mammalian microRNA Promoters Emerge from Polymerase II Chromatin Immunoprecipitation Data. *PLoS ONE* 4, e5279.

Das, S.K., Sokhi, U.K., Bhutia, S.K., Azab, B., Su, Z.-Z., Sarkar, D., and Fisher, P.B. (2010). Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11948-11953.

Davis, B., Hilyard, A., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*.

Davis, B.N., Hilyard, A.C., Nguyen, P.H., Lagna, G., and Hata, A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Molecular and cellular biology* 39, 373-384.

De, N., Young, L., Lau, P.-W., Meisner, N.-C., Morrissey, D.V., and Macrae, I.J. (2013). Highly Complementary Target RNAs Promote Release of Guide RNAs from Human Argonaute2. *Molecular and cellular biology* 50, 344-355.

Delay, C., Mandemakers, W., and Hébert, S.S. (2012). MicroRNAs in Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease* 46, 285-290.

Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.

Diederichs, S., and Haber, D.A. (2007). Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression. *Cell* 131, 1097-1108.

- Dimitriadi, M., Sleight, J.N., Walker, A., Chang, H.C., Sen, A., Kalloo, G., Harris, J., Barsby, T., Walsh, M.B., Satterlee, J.S., *et al.* (2010). Conserved genes act as modifiers of invertebrate SMN loss of function defects. *PLoS genetics* 6, e1001172.
- Ding, L., Spencer, A., Morita, K., and Han, M. (2005). The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Molecular and cellular biology* 19, 437-447.
- Ding, X.C., and Grosshans, H. (2009). Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *The EMBO journal* 28, 213-222.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., and Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237-240.
- Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development* 18, 504-511.
- Drienenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R., and Bartel, D.P. (2009). RNAi in budding yeast. *Science* 326, 544-550.
- Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., and Meister, G. (2012). microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res* 40, 9850-9862.
- Ebert, M.S., and Sharp, P.A. (2012). Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes. *Cell* 149, 515-524.
- Eichhorn, S.W., Guo, H., McGeary, S.E., Rodriguez-Mias, R.A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S.H., Ghoshal, K., Villen, J., and Bartel, D.P. (2014). mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues. *Molecular cell*.
- Elkayam, E., Kuhn, C.-D., Tocilj, A., Haase, A.D., Greene, E.M., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2012). The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* 150, 100-110.
- Elsebet Lund, S.G., Angelo Calado, James E. Dahlberg, Ulrike Kutay (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science (New York, NY)* 303, 95-98.
- Ender, C., Krek, A., Friedländer, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Molecular and cellular biology* 32, 519-528.
- Epis, M.R., Barker, A., Giles, K.M., Beveridge, D.J., and Leedman, P.J. (2011). The RNA-binding protein HuR opposes the repression of ERBB-2 gene expression by microRNA miR-331-3p in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 286, 41442-41454.
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 12, 861-874.

Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008a). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature structural & molecular biology* 15, 346-353.

Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2008b). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* (New York, NY).

Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S.F., Doerks, T., Dorner, S., Bork, P., Boutros, M., and Izaurralde, E. (2007). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes & development* 21, 2558-2570.

Eystathioy, T., Chan, E.K., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Griffith, K., and Fritzler, M.J. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell* 13, 1338-1351.

Eystathioy, T., Jakymiw, A., Chan, E.K., Seraphin, B., Cougot, N., and Fritzler, M.J. (2003). The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *Rna* 9, 1171-1173.

Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., *et al.* (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nature structural & molecular biology*.

Fabian, M.R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V., Rivas, F.V., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J.A., *et al.* (2009). Mammalian miRNA RISC Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP-Dependent Deadenylation. *Molecular cell* 35, 868-880.

Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology* 19, 586-593.

Faehnle, C.R., Walleshauser, J., and Joshua-Tor, L. (2014). Mechanism of Dis3l2 substrate recognition in the Lin28--let-7 pathway. *Nature*, 1-16.

Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J.A., and Guo, F. (2007). Heme is involved in microRNA processing. *Nature structural & molecular biology* 14, 23-29.

Fasanaro, P., Romani, S., Voellenkle, C., Maimone, B., Capogrossi, M.C., and Martelli, F. (2012). ROD1 is a seedless target gene of hypoxia-induced miR-210. *PLoS One* 7, e44651.

Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M.L., Nervi, C., and Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 123, 819-831.

Fire, A.Z., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

- 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.
- Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Coller, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14879-14884.
- Fornari, F., Gramantieri, L., Ferracin, M., Veronese, A., Sabbioni, S., Calin, G.A., Grazi, G.L., Giovannini, C., Croce, C.M., Bolondi, L., *et al.* (2008). MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27, 5651-5661.
- Förstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E., and Zamore, P.D. (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS biology* 3, e236.
- Foulkes, W.D., Priest, J.R., and Duchaine, T.F. (2014). DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nature reviews. Cancer* 14, 662-672.
- Frank, F., Fabian, M.R., Stepinski, J., Jemielity, J., Darzynkiewicz, E., Sonenberg, N., and Nagar, B. (2011). Structural analysis of 5'-mRNA-cap interactions with the human AGO2 MID domain. *EMBO reports* 12, 415-420.
- Freeman, M. (2000). Feedback control of intercellular signalling in development. *Nature* 408, 313-319.
- Fukaya, T., and Tomari, Y. (2012). MicroRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in drosophila. *Molecular cell* 48, 825-836.
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., *et al.* (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nature cell biology* 9, 604-611.
- Fukunaga, R., Han, B.W., Hung, J.-H., Xu, J., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2012). Dicer Partner Proteins Tune the Length of Mature miRNAs in Flies and Mammals. *Cell* 151, 533-546.
- Galgano, A., Forrer, M., Jaskiewicz, L., Kanitz, A., Zavolan, M., and Gerber, A.P. (2008). Comparative Analysis of mRNA Targets for Human PUF-Family Proteins Suggests Extensive Interaction with the miRNA Regulatory System. *PLoS ONE* 3, e3164.
- Gibbings, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P., and Voinnet, O. (2012). Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nature cell biology*, 1-12.
- Gibbings, D., Mostowy, S., and Voinnet, O. (2013). Autophagy selectively regulates miRNA homeostasis. *Autophagy* 9, 781-783.

Gibbings, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology* 11, 1143-1149.

Giraldez, A.J. (2006). Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs. *Science (New York, NY)* 312, 75-79.

Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J.S., Favre, G., and Vagner, S. (2011). HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 18, 1692-1701.

Gogliotti, R.G., Cardona, H., Singh, J., Bail, S., Emery, C., Kuntz, N., Jorgensen, M., Durens, M., Xia, B., Barlow, C., *et al.* (2013). The DcpS inhibitor RG3039 improves survival, function and motor unit pathologies in two SMA mouse models. *Human molecular genetics* 22, 4084-4101.

Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640.

Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.

Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular and cellular biology* 27, 91-105.

Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A.Z., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23-34.

Gromak, N., Dienstbier, M., Macias, S., Plass, M., Eyraes, E., Cáceres, J.F., and Proudfoot, N.J. (2013). Drosha Regulates Gene Expression Independently of RNA Cleavage Function. *CellReports* 5, 1499-1510.

Grosshans, H., Johnson, T., Reinert, K.L., Gerstein, M., and Slack, F.J. (2005). The temporal patterning microRNA let-7 regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Developmental Cell* 8, 321-330.

Gruber, J.J., Zatechka, D.S., Sabin, L.R., Yong, J., Lum, J.J., Kong, M., Zong, W.-X., Zhang, Z., Lau, C.-K., Rawlings, J., *et al.* (2009). Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell* 138, 328-339.

Gu, S., Jin, L., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, F., Valdmanis, P.N., and Kay, M.A. (2012). The Loop Position of shRNAs and Pre-miRNAs Is Critical for the Accuracy of Dicer Processing In Vivo. *Cell* 151, 900-911.

Gu, W., Xu, Y., Xie, X., Wang, T., Ko, J.-H., and Zhou, T. (2014). The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. *RNA (New York, NY)*.

- Guil, S., and Cáceres, J.F. (2007). The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nature structural & molecular biology* 14, 591-596.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-840.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. Nature Publishing Group, 1-16.
- Hagan, J.P., Piskounova, E., and Gregory, R.I. (2009). Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nature structural & molecular biology* 16, 1021-1025.
- Hammell, C.M., Lubin, I., Boag, P.R., Blackwell, T.K., and Ambros, V. (2009). nhl-2 Modulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 136, 926-938.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science (New York, NY)* 293, 1146-1150.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development* 18, 3016-3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.
- Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.-K., Yeom, K.-H., Yang, W.-Y., Haussler, D., Blelloch, R., and Kim, V.N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* 136, 75-84.
- Han, L., Witmer, P.D., Casey, E., Valle, D., and Sukumar, S. (2007). DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther* 6, 1284-1288.
- Han, M., Aroian, R.V., and Sternberg, P.W. (1990). The let-60 locus controls the switch between vulval and nonvulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 126, 899-913.
- Haramati, S., Chapnik, E., Sztainberg, Y., Eilam, R., Zwang, R., Gershoni, N., McGlenn, E., Heiser, P.W., Wills, A.M., Wirguin, I., *et al.* (2010). miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 13111-13116.
- Hauptmann, J., Dueck, A., Harlander, S., Pfaff, J., Merkl, R., and Meister, G. (2013). Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. *Nature structural & molecular biology* 20, 814-817.
- Havens, M.A., Reich, A.A., and Hastings, M.L. (2014). Drosha Promotes Splicing of a Pre-microRNA-like Alternative Exon. *PLoS genetics* 10, e1004312.

He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., *et al.* (2007a). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.

He, L., He, X., Lowe, S.W., and Hannon, G.J. (2007b). microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nature reviews Cancer* 7, 819-822.

He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., *et al.* (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833.

Heale, B.S.E., Keegan, L.P., McGurk, L., Michlewski, G., Brindle, J., Stanton, C.M., Cáceres, J.F., and O'Connell, M.A. (2009). Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNA pathways. *The EMBO journal* 28, 3145-3156.

Heimberg, A.M., Sempere, L.F., Moy, V.N., Donoghue, P.C., and Peterson, K.J. (2008). MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2946-2950.

Heo, I., Ha, M., Lim, J., Yoon, M.J., Park, J.E., Kwon, S.C., Chang, H., and Kim, V.N. (2012). Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell* 151, 521-532.

Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., and Kim, V.N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Molecular and cellular biology* 32, 276-284.

Heo, I., Joo, C., Kim, Y.-K., Ha, M., Yoon, M.-J., Cho, J., Yeom, K.-H., Han, J., and Kim, V.N. (2009). TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* 138, 696-708.

Herbert, K.M., Pimienta, G., DeGregorio, S.J., Alexandrov, A., and Steitz, J.A. (2013). Phosphorylation of DGCR8 Increases Its Intracellular Stability and Induces a Progrowth miRNA Profile. *CellReports* 5, 1070-1081.

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

Horman, S.R., Janas, M.M., Litterst, C., Wang, B., Macrae, I.J., Sever, M.J., Morrissey, D.V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., *et al.* (2013). Akt-Mediated Phosphorylation of Argonaute 2 Downregulates Cleavage and Upregulates Translational Repression of MicroRNA Targets. *Molecular and cellular biology*.

Hu, H., and Gatti, R.A. (2011). MicroRNAs: new players in the DNA damage response. *J Mol Cell Biol* 3, 151-158.

Huntzinger, E., Braun, J.E., Heimstädt, S., Zekri, L., and Izaurralde, E. (2010). Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *The EMBO journal*.

- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 12, 99-110.
- Huntzinger, E., Kuzuoglu-Öztürk, D., Braun, J.E., Eulalio, A., Wohlbold, L., and Izaurralde, E. (2012). The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Research*.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834.
- Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 22-32.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* 2, E98.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., and Struhl, K. (2009). An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 139, 693-706.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., and Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Molecular and cellular biology* 30, 292-299.
- Iwasaki, Y.W., Kiga, K., Kayo, H., Fukuda-Yuzawa, Y., Weise, J., Inada, T., Tomita, M., Ishihama, Y., and Fukao, T. (2013). Global microRNA elevation by inducible Exportin 5 regulates cell cycle entry. *RNA (New York, NY)* 19, 490-497.
- Jannot, G., Bajan, S., Giguere, N.J., Bouasker, S., Banville, I.H., Piquet, S., Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2011). The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans. *EMBO Rep* 12, 581-586.
- Jannot, G., Boisvert, M.E., Banville, I.H., and Simard, M.J. (2008). Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*. *Rna* 14, 829-835.
- Jean-Philippe, J., Paz, S., and Caputi, M. (2013). hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *International journal of molecular sciences* 14, 18999-19024.
- Jee, D., and Lai, E.C. (2014). Alteration of miRNA activity via context-specific modifications of Argonaute proteins. *Trends in cell biology*, 1-8.
- Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., Di Padova, F., Lin, S.C., Gram, H., and Han, J. (2005). Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120, 623-634.

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

Johnson, S.M., Lin, S.Y., and Slack, F.J. (2003). The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Dev Biol* 259, 364-379.

Johnston, R.J., and Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 426, 845-849.

Kaelin, W.G., Jr. (2005). The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochemical and biophysical research communications* 338, 627-638.

Kai, Z.S., and Pasquinelli, A.E. (2010). MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 17, 5-10.

Karginov, F.V., and Hannon, G.J. (2013). Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates. *Genes & development* 27, 1624-1632.

Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., *et al.* (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer science* 96, 111-115.

Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S.-I., Baba, T., and Suzuki, T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes & development* 23, 433-438.

Kaufman, E.J., and Miska, E.A. (2010). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in cell & developmental biology* 21, 728-737.

Kawahara, Y., Megraw, M.S., Kreider, E., Iizasa, H., Valente, L., Hatzigeorgiou, A.G., and Nishikura, K. (2008). Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Research* 36, 5270-5280.

Kawahara, Y., and Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 3347-3352.

Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Chendrimada, T.P., Shiekhattar, R., and Nishikura, K. (2007). RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO reports* 8, 763-769.

Kawai, S., and Amano, A. (2012). BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *The Journal of Cell Biology* 197, 201-208.

Kawamata, T., Seitz, H., and Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nature structural & molecular biology*.

- Kawamata, T., and Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in biochemical sciences* 35, 368-376.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Vrielink, J.A.F.O., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Ørom, U.A., *et al.* (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 131, 1273-1286.
- Kedde, M., van Kouwenhove, M., Zwart, W., Oude Vrielink, J.A., Elkon, R., and Agami, R. (2010). A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility. *Nat Cell Biol* 12, 1014-1020.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H.A. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development* 15, 2654-2659.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
- Kim, M.Y., Hur, J., and Jeong, S. (2009a). Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells. *BMB reports* 42, 125-130.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009b). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 126-139.
- Kim, Y., and Kim, V.N. (2012). MicroRNA factory: RISC assembly from precursor microRNAs. *Molecular and cellular biology* 46, 384-386.
- Kim, Y.-K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal* 26, 775-783.
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinak, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141-1151.
- Kitano, H. (2004). Biological robustness. *Nature reviews. Genetics* 5, 826-837.
- Klein, M.E., Liroy, D.T., Ma, L., Impey, S., Mandel, G., and Goodman, R.H. (2007). Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nature neuroscience* 10, 1513-1514.
- Knight, S.W., and Bass, B.L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293, 2269-2271.
- Kok, K.H., Ng, M.-H.J., Ching, Y.-P., and Jin, D.-Y. (2007). Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *The Journal of biological chemistry* 282, 17649-17657.
- Koscianska, E., Starega-Roslan, J., and Krzyzosiak, W.J. (2011). The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors. *PLoS One* 6, e28548.

- Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., *et al.* (2009). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137, 1005-1017.
- Koutsoulidou, A., Mastroiannopoulos, N.P., Furling, D., Uney, J.B., and Phylactou, L.A. (2011). Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC developmental biology* 11, 34.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research* 42, D68-73.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.
- Kuhnert, F., Mancuso, M.R., Hampton, J., Stankunas, K., Asano, T., Chen, C.Z., and Kuo, C.J. (2008). Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126. *Development* 135, 3989-3993.
- Kuzuoglu-Öztürk, D., Huntzinger, E., Schmidt, S., and Izaurralde, E. (2012). The *Caenorhabditis elegans* GW182 protein AIN-1 interacts with PAB-1 and subunits of the PAN2-PAN3 and CCR4-NOT deadenylase complexes. *Nucleic Acids Research* 40, 5651-5665.
- Kwak, P.B., and Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature structural & molecular biology* 19, 145-151.
- Kwasnicka, D.A., Krakowiak, A., Thacker, C., Brenner, C., and Vincent, S.R. (2003). Coordinate expression of NADPH-dependent flavin reductase, Fre-1, and Hint-related 7meGMP-directed hydrolase, DCS-1. *The Journal of biological chemistry* 278, 39051-39058.
- Kwasnicka-Crawford, D.A., and Vincent, S.R. (2005). Role of a novel dual flavin reductase (NR1) and an associated histidine triad protein (DCS-1) in menadione-induced cytotoxicity. *Biochemical and biophysical research communications* 336, 565-571.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, Reinhart, Lendeckel, Winfried, Tuschl, Thomas (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science (New York, NY)* 294, 853-858.
- Lai, X., Schmitz, U., Gupta, S.K., Bhattacharya, A., Kunz, M., Wolkenhauer, O., and Vera, J. (2012). Computational analysis of target hub gene repression regulated by multiple and cooperative miRNAs. *Nucleic Acids Res* 40, 8818-8834.
- Lal, A., Navarro, F., Maher, C.A., Maliszewski, L.E., Yan, N., O'Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D.M., Tsai, P., Hofmann, O., *et al.* (2009). miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Molecular cell* 35, 610-625.
- Lall, S., Piano, F., and Davis, R.E. (2005). *Caenorhabditis elegans* decapping proteins: localization and functional analysis of Dcp1, Dcp2, and DcpS during embryogenesis. *Mol Biol Cell* 16, 5880-5890.

- Landthaler, M., Yalcin, A., and Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Current biology : CB* 14, 2162-2167.
- Lau, N.C. (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)* 294, 858-862.
- Lau, P.-W., Guiley, K.Z., De, N., Potter, C.S., Carragher, B., and Macrae, I.J. (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nature structural & molecular biology* 19, 436-440.
- Lazzaretti, D., Tournier, I., and Izaurralde, E. (2009). The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA (New York, NY)* 15, 1059-1066.
- le Sage, C., Nagel, R., Egan, D.A., Schrier, M., Mesman, E., Mangiola, A., Anile, C., Maira, G., Mercatelli, N., Ciafre, S.A., *et al.* (2007). Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J* 26, 3699-3708.
- Lee, C.-T., Risom, T., and Strauss, W.M. (2007). Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA and cell biology* 26, 209-218.
- Lee, H.Y., and Doudna, J.A. (2012). TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA (New York, NY)* 18, 2012-2019.
- Lee, H.Y., Zhou, K., Smith, A.M., Noland, C.L., and Doudna, J.A. (2013). Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Research* 41, 6568-6576.
- Lee, R.C., Ambros, V R (2001). An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)* 294, 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R., and Ambros, V.R. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO journal* 25, 522-532.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal* 21, 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004a). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal* 23, 4051-4060.

- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W. (2004b). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69-81.
- Lee, Y.S., Pressman, S., Andress, A.P., Kim, K., White, J.L., Cassidy, J.J., Li, X., Lubell, K., Lim do, H., Cho, I.S., *et al.* (2009). Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol* 11, 1150-1156.
- Lehrbach, N., Armisen, J., Lightfoot, H., Murfitt, K., Bugaut, A., Balasubramanian, S., and Miska, E.A. (2009). LIN-28 and the poly(U) polymerase PUP-2 regulate let-7 microRNA processing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature structural & molecular biology*.
- Leung, A.K., and Sharp, P.A. (2010). MicroRNA functions in stress responses. *Mol Cell* 40, 205-215.
- Leung, A.K., Vyas, S., Rood, J.E., Bhutkar, A., Sharp, P.A., and Chang, P. (2011). Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Molecular cell* 42, 489-499.
- 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.
- Lewis, B.P., Shih, I.-H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
- Li, L., Yu, C., Gao, H., and Li, Y. (2010). Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer. *BMC cancer* 10, 38.
- Li, Q.J., Chau, J., Ebert, P.J., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., *et al.* (2007). miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 129, 147-161.
- Li, S., Wang, L., Fu, B., Berman, M.A., Diallo, A., and Dorf, M.E. (2014). TRIM65 regulates microRNA activity by ubiquitination of TNRC6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 6970-6975.
- Lim, L.P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development* 17, 991-1008.
- Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science (New York, NY)* 299, 1540.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426, 465-469.
- 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, H., and Kiledjian, M. (2005). Scavenger decapping activity facilitates 5' to 3' mRNA decay. *Mol Cell Biol* 25, 9764-9772.

- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X., and Kiledjian, M. (2002). The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J* 21, 4699-4708.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science (New York, NY)* 305, 1437-1441.
- Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., Parker, R., and Hannon, G.J. (2005a). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature cell biology* 7, 1261-1266.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005b). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology* 7, 719-723.
- Liu, X., Jin, D.-Y., McManus, M.T., and Mourelatos, Z. (2012). Precursor MicroRNA-Programmed Silencing Complex Assembly Pathways in Mammals. *Molecular cell* 46, 507-517.
- Liu, X., Zheng, Q., Vrettos, N., Maragkakis, M., Alexiou, P., Gregory, B.D., and Mourelatos, Z. (2014). A MicroRNA Precursor Surveillance System in Quality Control of MicroRNA Synthesis. *Molecular cell* 55, 868-879.
- Liz, J., Portela, A., Soler, M., Gómez, A., Ling, H., Michlewski, G., Calin, G.A., Guil, S., and Esteller, M. (2014). Regulation of pri-miRNA Processing by a Long Noncoding RNA Transcribed from an Ultraconserved Region. *Molecular cell*, 1-10.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature cell biology* 435, 834-838.
- Luciano, D.J., Mirsky, H., Vendetti, N.J., and Maas, S. (2004). RNA editing of a miRNA precursor. *RNA (New York, NY)* 10, 1174-1177.
- Lund, E., Sheets, M.D., Imboden, S.B., and Dahlberg, J.E. (2011). Limiting Ago protein restricts RNAi and microRNA biogenesis during early development in *Xenopus laevis*. *Genes & development* 25, 1121-1131.
- Ma, H., Wu, Y., Choi, J.-G., and Wu, H. (2013). Lower and upper stem-single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 20687-20692.
- Ma, J.-B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318-322.
- Ma, J.-B., Yuan, Y.-R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 434, 666-670.

Macias, S., Michlewski, G., and Cáceres, J.F. (2009). Hormonal regulation of microRNA biogenesis. *Molecular and cellular biology* 36, 172-173.

Macrae, I.J., Li, F., Zhou, K., Cande, W.Z., and Doudna, J.A. (2006). Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 73-80.

Macrae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 512-517.

Macrae, I.J., Zhou, K., and Doudna, J.A. (2007). Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer. *Nature structural & molecular biology* 14, 934-940.

Majoros, W.H., and Ohler, U. (2007). Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. *BMC Genomics* 8, 152.

Makeyev, E.V., Zhang, J., Carrasco, M.A., and Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Molecular cell* 27, 435-448.

Maniatakis, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & development* 19, 2979-2990.

Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature structural & molecular biology* 13, 1102-1107.

Martinez, N.J., and Gregory, R.I. (2013). Argonaute2 expression is post-transcriptionally coupled to microRNA abundance. *RNA (New York, NY)*.

Martinez, N.J., Ow, M.C., Reece-Hoyes, J.S., Barrasa, M.I., Ambros, V.R., and Walhout, A.J. (2008). Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity-Supp. Data. *Genome research* 18, 2005-2015.

Mathys, H., Basquin, J., Ozgur, S., Czarnocki-Cieciura, M., Bonneau, F., Aartse, A., Dziembowski, A., Nowotny, M., Conti, E., and Filipowicz, W. (2014). Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression. *Molecular cell* 54, 751-765.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620.

Mattick, J.S. (2003). Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays* 25, 930-939.

Mayr, C., and Bartel, D.P. (2009). Widespread shortening of 3' UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138, 673-684.

Mayr, C., Hemann, M.T., and Bartel, D.P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science (New York, NY)* 315, 1576-1579.

McJunkin, K., and Ambros, V. (2014). The Embryonic mir-35 Family of MicroRNAs Promotes Multiple Aspects of Fecundity in *C. elegans*. *G3*.

Mehta, P., Goyal, S., and Wingreen, N.S. (2008). A quantitative comparison of sRNA-based and protein-based gene regulation. *Molecular systems biology* 4, 221.

Meijer, H.A., Kong, Y.W., Lu, W.T., Wilczynska, A., Spriggs, R.V., Robinson, S.W., Godfrey, J.D., Willis, A.E., and Bushell, M. (2013). Translational Repression and eIF4A2 Activity Are Critical for MicroRNA-Mediated Gene Regulation. *Science (New York, NY)* 340, 82-85.

Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular and cellular biology* 15, 185-197.

Mello, C., and Fire, A. (1995). DNA transformation. *Methods in Cell Biology* 48, 451-482.

Melo, S.A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., *et al.* (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer cell* 18, 303-315.

Melo, S.A., Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., *et al.* (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nature genetics* 41, 365-370.

Mendell, J.T., and Olson, E.N. (2012). MicroRNAs in Stress Signaling and Human Disease. *Cell* 148, 1172-1187.

Merritt, W.M., Lin, Y.G., Han, L.Y., Kamat, A.A., Spannuth, W.A., Schmandt, R., Urbauer, D., Pennacchio, L.A., Cheng, J.F., Nick, A.M., *et al.* (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 359, 2641-2650.

Meziane, O., Bosse, G.D., and Simard, M.J. (2013). The decapping scavenger enzyme DCS-1: a new modulator of miRNA turnover. *Cell cycle* 12, 2715-2716.

Michlewski, G., and Cáceres, J.F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nature structural & molecular biology* 17, 1011-1018.

Michlewski, G., Guil, S., Semple, C.A., and Cáceres, J.F. (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Molecular and cellular biology* 32, 383-393.

- Miguel-Aliaga, I., Culetto, E., Walker, D.S., Baylis, H.A., Sattelle, D.B., and Davies, K.E. (1999). The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum Mol Genet* 8, 2133-2143.
- Mishima, Y., Fukao, A., Kishimoto, T., Sakamoto, H., Fujiwara, T., and Inoue, K. (2012). Translational inhibition by deadenylation-independent mechanisms is central to microRNA-mediated silencing in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1104-1109.
- Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Abbott, A.L., Lau, N.C., Hellman, A.B., McGonagle, S.M., Bartel, D.P., Ambros, V.R., and Horvitz, H.R. (2007). Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS genetics* 3, e215.
- Miyoshi, T., Takeuchi, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2010). A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nature structural & molecular biology*.
- Mogilyansky, E., and Rigoutsos, I. (2013). The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell death and differentiation* 20, 1603-1614.
- Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA (New York, NY)* 16, 495-505.
- Mori, M., Triboulet, R., Mohseni, M., Schlegelmilch, K., Shrestha, K., Camargo, F.D., and Gregory, R.I. (2014). Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent miRNA biogenesis to cancer. *Cell* 156, 893-906.
- Morita, S., Horii, T., Kimura, M., Goto, Y., Ochiya, T., and Hatada, I. (2007). One Argonaute family member, Eif2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics* 89, 687-696.
- Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., and Proudfoot, N.J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nature structural & molecular biology*.
- Mortensen, R.D., Serra, M., Steitz, J.A., and Vasudevan, S. (2011). Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 8281-8286.
- Moss, E.G., Lee, R.C., and Ambros, V. (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell* 88, 637-646.
- Motorin, Y., and Helm, M. (2011). RNA nucleotide methylation. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 2, 611-631.
- Nakanishi, K., Ascano, M., Gogakos, T., Ishibe-Murakami, S., Serganov, A.A., Briskin, D., Morozov, P., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2013). Eukaryote-Specific Insertion Elements Control Human ARGONAUTE Slicer Activity. *CellReports* 3, 1893-1900.

- Nakanishi, K., Weinberg, D.E., Bartel, D.P., and Patel, D.J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* 486, 368-374.
- Nam, J.-W., Rissland, O.S., Koppstein, D., Abreu-Goodger, C., Jan, C.H., Agarwal, V., Yildirim, M.A., Rodriguez, A., and Bartel, D.P. (2014). Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. *Molecular and cellular biology* 53, 1031-1043.
- Neumüller, R.A., Betschinger, J., Fischer, A., Bushati, N., Poernbacher, I., Mechtler, K., Cohen, S.M., and Knoblich, J.A. (2008). Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the *Drosophila* ovarian stem cell lineage. *Nature* 454, 241-245.
- Newman, M.A., Mani, V., and Hammond, S.M. (2011). Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification. *RNA* 17, 1795-1803.
- Newman, M.A., Thomson, J.M., and Hammond, S.M. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA (New York, NY)* 14, 1539-1549.
- Nishihara, T., Zekri, L., Braun, J.E., and Izaurralde, E. (2013). miRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation. *Nucleic Acids Research* 41, 8692-8705.
- Nissan, T., and Parker, R. (2008). Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition. *14*, 1480-1491.
- Nolde, M.J., Saka, N., Reinert, K.L., and Slack, F.J. (2007). The *Caenorhabditis elegans* pumilio homolog, puf-9, is required for the 3' UTR-mediated repression of the let-7 microRNA target gene, hbl-1. *Developmental Biology* 305, 551-563.
- Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature structural & molecular biology* 13, 1108-1114.
- O'Carroll, D., Mecklenbrauker, I., Das, P.P., Santana, A., Koenig, U., Enright, A.J., Miska, E.A., and Tarakhovskiy, A. (2007). A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes & development* 21, 1999-2004.
- O'Malley, B.W. (2010). Masters of the genome. 1-1.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery. *Science (New York, NY)* 326, 1275-1279.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130, 89-100.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & development* 18, 1655-1666.

Olena, A.F., and Patton, J.G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *Journal of cellular physiology* 222, 540-545.

Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology* 216, 671-680.

Orban, T.I., and Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA (New York, NY)* 11, 459-469.

Orgel, L.E., and Crick, F.H. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284, 604-607.

Osaki, M., Takeshita, F., and Ochiya, T. (2008). MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 13, 658-670.

Ota, H., Sakurai, M., Gupta, R., Valente, L., Wulff, B.-E., Ariyoshi, K., Iizasa, H., Davuluri, R.V., and Nishikura, K. (2013). ADAR1 Forms a Complex with Dicer to Promote MicroRNA Processing and RNA-Induced Gene Silencing. *Cell* 153, 575-589.

Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development* 22, 3172-3183.

Park, C.Y., Choi, Y.S., and McManus, M.T. (2010). Analysis of microRNA knockouts in mice. *Hum Mol Genet* 19, R169-175.

Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D.K., Chang, H., Jee, D., Patel, D.J., and Kim, V.N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 475, 201-205.

Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the Human MicroRNA-Generating Complex Mediates MAPK/Erk Signaling. *Cell* 139, 112-122.

Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 13, 271-282.

Perales, R., King, D.M., Aguirre-Chen, C., and Hammell, C.M. (2014). LIN-42, the *Caenorhabditis elegans* PERIOD homolog, Negatively Regulates MicroRNA Transcription. *PLoS genetics* 10, e1004486.

Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Molecular cell* 21, 533-542.

Pfaff, J., Hennig, J., Herzog, F., Aebersold, R., Sattler, M., Niessing, D., and Meister, G. (2013). Structural features of Argonaute-GW182 protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E3770-3779.

- Piao, X., Zhang, X., Wu, L., and Belasco, J.G. (2010). CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Molecular and cellular biology* 30, 1486-1494.
- Pillai, R.S., Artus, C.G., and Filipowicz, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA (New York, NY)* 10, 1518-1525.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science (New York, NY)* 309, 1573-1576.
- Pilotte, J., Dupont-Versteegden, E.E., and Vanderklish, P.W. (2011). Widespread regulation of miRNA biogenesis at the Dicer step by the cold-inducible RNA-binding protein, RBM3. *PLoS One* 6, e28446.
- Piskounova, E., Polytaichou, C., Thornton, J.E., LaPierre, R.J., Pothoulakis, C., Hagan, J.P., Iliopoulos, D., and Gregory, R.I. (2011). Lin28A and Lin28B Inhibit let-7 MicroRNA Biogenesis by Distinct Mechanisms. *Cell* 147, 1066-1079.
- Poy, M.N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., Zavolan, M., and Stoffel, M. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5813-5818.
- Pramanik, D., Campbell, N.R., Karikari, C., Chivukula, R., Kent, O.A., Mendell, J.T., and Maitra, A. (2011). Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Molecular cancer therapeutics* 10, 1470-1480.
- Pulikkan, J.A., Dengler, V., Peramangalam, P.S., Peer Zada, A.A., Muller-Tidow, C., Bohlander, S.K., Tenen, D.G., and Behre, G. (2010). Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* 115, 1768-1778.
- Qi, H.H., Ongusaha, P.P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S.W., Peng, J., and Shi, Y. (2008). Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* 455, 421-424.
- Quick-Cleveland, J., Jacob, J.P., Weitz, S.H., Shoffner, G., Senturia, R., and Guo, F. (2014). The DGCR8 RNA-Binding Heme Domain Recognizes Primary MicroRNAs by Clamping the Hairpin. *CellReports*, 1-12.
- Ramachandran, V., and Chen, X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science* 321, 1490-1492.
- Rao, P.K., Kumar, R.M., Farkhondeh, M., Baskerville, S., and Lodish, H.F. (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 8721-8726.
- Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA (New York, NY)* 11, 1640-1647.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M.A., 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, G., Xie, M., Zhang, S., Vinovskis, C., Chen, X., and Yu, B. (2014). Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylyates 5' RNA fragments generated by AGO1 cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 6365-6370.

Resnick, T.D., McCulloch, K.A., and Rougvie, A.E. (2010). miRNAs give worms the time of their lives: Small RNAs and temporal control in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, NA-NA*.

Robertson, K.D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature reviews. Genetics* *6*, 597-610.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* *14*, 1902-1910.

Rogers, K., and Chen, X. (2013). Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *The Plant cell*.

Rouya, C., Siddiqui, N., Morita, M., Duchaine, T.F., Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2014). Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA (New York, NY)* *20*, 1398-1409.

Roy-Chaudhuri, B., Valdmanis, P.N., Zhang, Y., Wang, Q., Luo, Q.-J., and Kay, M.A. (2014). Regulation of microRNA-mediated gene silencing by microRNA precursors. *Nature structural & molecular biology*, 1-10.

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

Rüdel, S., Wang, Y., Lenobel, R., Körner, R., Hsiao, H.-H., Urlaub, H., Patel, D., and Meister, G. (2010). Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic Acids Research*.

Rüegger, S., and Grosshans, H. (2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends in biochemical sciences* *37*, 436-446.

Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E.A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D., and Wulczyn, F.G. (2009). The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nature cell biology* *11*, 1411-1420.

Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature cell biology* *10*, 987-993.

Sabin, L.R., Delás, M.J., and Hannon, G.J. (2013). Dogma derailed: the many influences of RNA on the genome. *Molecular and cellular biology* *49*, 783-794.

Sabin, L.R., Zhou, R., Gruber, J.J., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., Lau, C.-K., Thompson, C.B., and Cherry, S. (2009). *Ars2* regulates both miRNA- and siRNA- dependent silencing and suppresses RNA virus infection in *Drosophila*. *Cell* 138, 340-351.

Saetrom, P., Heale, B.S.E., Snove, O., Aagaard, L., Alluin, J., and Rossi, J.J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Research* 35, 2333-2342.

Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2005). Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS biology* 3, e235.

Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., Hatano, E., Fukushima, A., Taniguchi, T., and Agata, Y. (2009). The NF90-NF45 Complex Functions as a Negative Regulator in the MicroRNA Processing Pathway. *Molecular and cellular biology* 29, 3754-3769.

Sarkar, D., Leszczyniecka, M., Kang, D.C., Lebedeva, I.V., Valerie, K., Dhar, S., Pandita, T.K., and Fisher, P.B. (2003). Down-regulation of *Myc* as a potential target for growth arrest induced by human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35) in human melanoma cells. *J Biol Chem* 278, 24542-24551.

Schirle, N.T., and Macrae, I.J. (2012). The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science (New York, NY)* 336, 1037.

Schirle, N.T., Sheu-Gruttadauria, J., and MacRae, I.J. (2014). Gene regulation. Structural basis for microRNA targeting. *Science* 346, 608-613.

Schmitter, D., Filkowski, J., Sewer, A., Pillai, R.S., Oakeley, E.J., Zavolan, M., Svoboda, P., and Filipowicz, W. (2006). Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *34*, 4801-4815.

Schmitz, U., Lai, X., Winter, F., Wolkenhauer, O., Vera, J., and Gupta, S.K. (2014). Cooperative gene regulation by microRNA pairs and their identification using a computational workflow. *Nucleic Acids Research* 42, 7539-7552.

Schwamborn, J.C., Berezikov, E., and Knoblich, J.A. (2009). The TRIM-NHL Protein TRIM32 Activates MicroRNAs and Prevents Self-Renewal in Mouse Neural Progenitors. *Cell* 136, 913-925.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.

Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Developmental Biology* 243, 215-225.

Sen, G.L., and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature cell biology* 7, 633-636.

Shen, J., Xia, W., Khotskaya, Y.B., Huo, L., Nakanishi, K., Lim, S.-O., Du, Y., Wang, Y., Chang, W.-C., Chen, C.-H., *et al.* (2013). EGFR modulates microRNA maturation in response to hypoxia through phosphorylation of AGO2. *Nature* 497, 383-387.

Shin, C., Nam, J.-W., Farh, K.K.-H., Chiang, H.R., Shkumatava, A., and Bartel, D.P. (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Molecular and cellular biology* 38, 789-802.

Sinturel, F., Bréchemier-Baey, D., Kiledjian, M., Condon, C., and Bénard, L. (2012). Activation of 5'-3' exoribonuclease Xrn1 by cofactor Dcs1 is essential for mitochondrial function in yeast. *PNAS* 109, 8264-8269.

Slack, F.J., Basson, M.A., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor. *Molecular and cellular biology* 5, 659-669.

Sleigh, J.N., Buckingham, S.D., Esmaeili, B., Viswanathan, M., Cuppen, E., Westlund, B.M., and Sattelle, D.B. (2011). A novel *Caenorhabditis elegans* allele, *smn-1(cb131)*, mimicking a mild form of spinal muscular atrophy, provides a convenient drug screening platform highlighting new and pre-approved compounds. *Hum Mol Genet* 20, 245-260.

Smibert, P., Yang, J.-S., Azzam, G., Liu, J.-L., and Lai, E.C. (2013). Homeostatic control of Argonaute stability by microRNA availability. *Nature structural & molecular biology*.

Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10, 1026-1032.

Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science (New York, NY)* 305, 1434-1437.

Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3' UTR evolution. *Cell* 123, 1133-1146.

Stefani, G., and Slack, F.J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 219-230.

Steiner, F.A., Hoogstrate, S.W., Okihara, K.L., Thijssen, K.L., Ketting, R.F., Plasterk, R.H.A., and Sijen, T. (2007). Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nature structural & molecular biology* 14, 927-933.

Suzuki, H.I., Arase, M., Matsuyama, H., Choi, Y.L., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2011). MCP1P1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. *Molecular cell* 44, 424-436.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A.Z., and Mello, C.C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123-132.

- Taft, R.J., Glazov, E.A., Lassmann, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., and Mattick, J.S. (2009). Small RNAs derived from snoRNAs. *RNA (New York, NY)* 15, 1233-1240.
- Tahbaz, N., Kolb, F.A., Zhang, H., Jaronczyk, K., Filipowicz, W., and Hobman, T.C. (2004). Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep* 5, 189-194.
- Takimoto, K., Wakiyama, M., and Yokoyama, S. (2009). Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA (New York, NY)* 15, 1078-1089.
- Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M., *et al.* (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453, 534-538.
- Tang, X., Li, M., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2011). Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) phosphorylates the RNAase III enzyme Drosha at S300 and S302. *PLoS ONE* 6, e20391.
- Tang, X., Wen, S., Zheng, D., Tucker, L., Cao, L., Pantazatos, D., Moss, S.F., and Ramratnam, B. (2013). Acetylation of Drosha on the N-Terminus Inhibits Its Degradation by Ubiquitination. *PLoS ONE* 8, e72503.
- Tang, X., Zhang, Y., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2010). Phosphorylation of the RNase III enzyme Drosha at Serine300 or Serine302 is required for its nuclear localization. *Nucleic Acids Research* 38, 6610-6619.
- Taylor, D.W., Ma, E., Shigematsu, H., Cianfrocco, M.A., Noland, C.L., Nagayama, K., Nogales, E., Doudna, J.A., and Wang, H.-W. (2013). Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nature structural & molecular biology* 20, 662-670.
- Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T., and Hammond, S.M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & development* 20, 2202-2207.
- Tian, Y., Simanshu, D.K., Ma, J.-B., Park, J.-E., Heo, I., Kim, V.N., and Patel, D.J. (2014). A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer. *Molecular cell* 53, 606-616.
- Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M., and Takahashi, T. (2008). let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis* 29, 2073-2077.
- Trabucchi, M., Briata, P., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2010). KSRP promotes the maturation of a group of miRNA precursors. *Advances in experimental medicine and biology* 700, 36-42.
- Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A.D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 459, 1010-1014.

Trang, P., Medina, P.P., Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Homer, R., Brown, D., Bader, A.G., Weidhaas, J.B., *et al.* (2010). Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 29, 1580-1587.

Trang, P., Wiggins, J.F., Daige, C.L., Cho, C., Omotola, M., Brown, D., Weidhaas, J.B., Bader, A.G., and Slack, F.J. (2011). Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19, 1116-1122.

Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H., and Tomari, Y. (2011). Recognition of the pre-miRNA structure by Drosophila Dicer-1. *Nature structural & molecular biology* 18, 1153-1158.

Tyler, D.M., Okamura, K., Chung, W.-J., Hagen, J.W., Berezikov, E., Hannon, G.J., and Lai, E.C. (2008). Functionally distinct regulatory RNAs generated by bidirectional transcription and processing of microRNA loci. *Genes & development* 22, 26-36.

Ustianenko, D., Hrossova, D., Potesil, D., Chalupnikova, K., Hrazdilova, K., Pachernik, J., Cetkovska, K., Uldrijan, S., Zdrahal, Z., and Vanacova, S. (2013). Mammalian DIS3L2 exoribonuclease targets the uridylated precursors of let-7 miRNAs. *RNA (New York, NY)* 19, 1632-1638.

Van Meerbeke, J.P., Gibbs, R.M., Plasterer, H.L., Miao, W., Feng, Z., Lin, M.-Y., Rucki, A.A., Wee, C.D., Xia, B., Sharma, S., *et al.* (2013). The DcpS inhibitor RG3039 improves motor function in SMA mice. *Human molecular genetics* 22, 4074-4083.

van Rooij, E., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J., and Olson, E.N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316, 575-579.

Van Wynsberghe, P.M., Finnegan, E.F., Stark, T., Angelus, E.P., Homan, K.E., Yeo, G.W., and Pasquinelli, A.E. (2014). The Period protein homolog LIN-42 negatively regulates microRNA biogenesis in *C. elegans*. *Developmental Biology* 390, 126-135.

Van Wynsberghe, P.M., Kai, Z.S., Massirer, K.B., Burton, V.H., Yeo, G.W., and Pasquinelli, A.E. (2011). LIN-28 co-transcriptionally binds primary let-7 to regulate miRNA maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Nature structural & molecular biology* 18, 302-308.

Vasquez-Rifo, A., Bosse, G.D., Rondeau, E.L., Jannot, G., Dallaire, A., and Simard, M.J. (2013). A new role for the GARP complex in microRNA-mediated gene regulation. *PLoS genetics* 9, e1003961.

Vasquez-Rifo, A., Jannot, G., Armisen, J., Labouesse, M., Bukhari, S.I., Rondeau, E.L., Miska, E.A., and Simard, M.J. (2012). Developmental characterization of the microRNA-specific *C. elegans* Argonautes alg-1 and alg-2. *PLoS One* 7, e33750.

Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science (New York, NY)* 318, 1931-1934.

- Vella, M.C., Choi, E.-Y., Lin, S.Y., Reinert, K.L., 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 & development* *18*, 132-137.
- Viswanathan, S.R., and Daley, G.Q. (2010). Lin28: A MicroRNA Regulator with a Macro Role. *Cell* *140*, 445-449.
- Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective Blockade of MicroRNA Processing by Lin28. *Science (New York, NY)* *320*, 97.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* *408*, 307-310.
- Voller, D., Reinders, J., Meister, G., and Bosserhoff, A.K. (2013). Strong reduction of AGO2 expression in melanoma and cellular consequences. *British journal of cancer* *109*, 3116-3124.
- Wada, T., Kikuchi, J., and Furukawa, Y. (2012). Histone deacetylase 1 enhances microRNA processing via deacetylation of DGCR8. *EMBO reports* *13*, 142-149.
- Walters, R.W., Bradrick, S.S., and Gromeier, M. (2010). Poly(A)-binding protein modulates mRNA susceptibility to cap-dependent miRNA-mediated repression. *RNA (New York, NY)* *16*, 239-250.
- Wan, G., Zhang, X., Langley, R.R., Liu, Y., Hu, X., Han, C., Peng, G., Ellis, L.M., Jones, S.N., and Lu, X. (2013). DNA-Damage-Induced Nuclear Export of Precursor MicroRNAs Is Regulated by the ATM-AKT Pathway. *CellReports* *3*, 2100-2112.
- Wang, B., Yanez, A., and Novina, C.D. (2008a). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 5343-5348.
- Wang, D., Zhang, Z., O'Loughlin, E., Lee, T., Houel, S., O'Carroll, D., Tarakhovskiy, A., Ahn, N.G., and Yi, R. (2012). Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes & development* *26*, 693-704.
- Wang, H.-W., Noland, C., Siridechadilok, B., Taylor, D.W., Ma, E., Felderer, K., Doudna, J.A., and Nogales, E. (2009). Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nature structural & molecular biology* *16*, 1148-1153.
- 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. (2008b). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* *15*, 261-271.
- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2008c). Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* *456*, 921-926.
- Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2008d). Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* *456*, 209-213.

- Wang, Z., and Kiledjian, M. (2001). Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107, 751-762.
- 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.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology* 11, 228-234.
- Wu, C., So, J., Davis-Dusenbery, B.N., Qi, H.H., Bloch, D.B., Shi, Y., Lagna, G., and Hata, A. (2011). Hypoxia potentiates microRNA-mediated gene silencing through posttranslational modification of Argonaute2. *Molecular and cellular biology* 31, 4760-4774.
- Wu, E., Thivierge, C., Flamand, M., Mathonnet, G., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J., Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Duchaine, T.F. (2010a). Pervasive and Cooperative Deadenylation of 3'UTRs by Embryonic MicroRNA Families. *Molecular cell* 40, 558-570.
- Wu, H., Sun, S., Tu, K., Gao, Y., Xie, B., Krainer, A.R., and Zhu, J. (2010b). A Splicing-Independent Function of SF2/ASF in MicroRNA Processing. *Molecular cell* 38, 67-77.
- Wu, P.-H., Isaji, M., and Carthew, R.W. (2013). Functionally diverse microRNA effector complexes are regulated by extracellular signaling. *Molecular and cellular biology* 52, 113-123.
- Xhemalce, B., Robson, S.C., and Kouzarides, T. (2012). Human RNA Methyltransferase BCDIN3D Regulates MicroRNA Processing. *Cell* 151, 278-288.
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.-D., Yartseva, V., Šestan, N., and Steitz, J.A. (2013). Mammalian 5' Cap-Capped MicroRNA Precursors that Generate a Single MicroRNA. *Cell* 155, 1568-1580.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., and Zhou, M.-M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426, 469-474.
- Yang, J.-S., and Lai, E.C. (2011). Alternative miRNA Biogenesis Pathways and the Interpretation of Core miRNA Pathway Mutants. *Molecular cell* 43, 892-903.
- Yang, M., Haase, A.D., Huang, F.K., Coulis, G., Rivera, K.D., Dickinson, B.C., Chang, C.J., Pappin, D.J., Neubert, T.A., Hannon, G.J., *et al.* (2014). Dephosphorylation of Tyrosine 393 in Argonaute 2 by Protein Tyrosine Phosphatase 1B Regulates Gene Silencing in Oncogenic RAS-Induced Senescence. *Molecular cell* 55, 782-790.
- Yang, W., Chendrimada, T.P., Wang, Q., Higuchi, M., Seeburg, P.H., Shiekhattar, R., and Nishikura, K. (2005). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nature structural & molecular biology* 13, 13-21.

- Yao, B., Li, S., Lian, S.L., Fritzler, M.J., and Chan, E.K. (2011). Mapping of Ago2-GW182 functional interactions. *Methods in molecular biology* 725, 45-62.
- Yeom, K.-H., Lee, Y., Han, J., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Research* 34, 4622-4629.
- Yi, R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development* 17, 3011-3016.
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y. (2009). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature structural & molecular biology*.
- Yoo, A.S., and Greenwald, I. (2005). LIN-12/Notch activation leads to microRNA-mediated down-regulation of Vav in *C. elegans*. *Science* 310, 1330-1333.
- Yuan, X., Liu, C., Yang, P., He, S., Liao, Q., Kang, S., and Zhao, Y. (2009). Clustered microRNAs coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Systems Biology* 3, 65.
- Yuan, Y.-R., Pei, Y., Ma, J.-B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.-Y., Dauter, Z., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Molecular and cellular biology* 19, 405-419.
- Zamore, P.D. (2001). Thirty-three years later, a glimpse at the ribonuclease III active site. *Molecular cell* 8, 1158-1160.
- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstädt, S., and Izaurralde, E. (2009). The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Molecular and cellular biology* 29, 6220-6231.
- Zekri, L., Kuzuoglu-Öztürk, D., and Izaurralde, E. (2013). GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *The EMBO journal*.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* 280, 27595-27603.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., and Graves, P.R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *The Biochemical journal* 413, 429-436.
- Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B.R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 24, 138-148.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57-68.

Zhang, X., Zuo, X., Yang, B., Li, Z., Xue, Y., Zhou, Y., Huang, J., Zhao, X., Zhou, J., Yan, Y., *et al.* (2014). MicroRNA Directly Enhances Mitochondrial Translation during Muscle Differentiation. *Cell* 158, 607-619.

Zhou, X., Ruan, J., Wang, G., and Zhang, W. (2005). Characterization and Identification of MicroRNA Promoters in Four Model Species. *PLoS computational biology preprint*, e37.

Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA (New York, NY)* 15, 781-793.

Zisoulis, D.G., Kai, Z.S., Chang, R.K., and Pasquinelli, A.E. (2012). Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute. *Nature* 486, 541-544.

## Annexe

Annexe 1 :

**The decapping scavenger enzyme DCS-1 controls microRNA levels in *Caenorhabditis elegans***  
**Bossé, G. D., Rüegger, S., Ow, M. C., Vasquez-Rifo, A., Rondeau, E. L., Ambros, V. R., et al.**  
(2013). *Molecular Cell*, 50(2), 281–287. doi:10.1016/j.molcel.2013.02.023

Lien : [http://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765\(13\)00179-2](http://www.cell.com/molecular-cell/abstract/S1097-2765(13)00179-2)

Annexe 2 :

**A New Role for the GARP Complex in MicroRNA-Mediated Gene Regulation.** Vasquez-Rifo, A.,  
**Bossé, G. D., Rondeau, E. L., Jannot, G., Dallaire, A., & Simard, M. J.** (2013). *PLoS Genetics*, 9(11),  
e1003961. doi:10.1371/journal.pgen.1003961

Cette étude de mon collègue Alejandro Vasquez a démontré l'implication de la protéine VPS-52 et du complexe GARP dans la voie des microARNs. La protéine VPS-52 a été identifiée à partir du même criblage génétique que DCS-1. Pour cette publication, j'ai contribué à la formation des groupes de complémentation des candidats issus du criblage, j'ai également réalisé les expériences d'analyse Northern (Fig 5A-C) ainsi que certaines expériences du processus de révision ( Fig S4 et S5)

Lien : <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1003961>

Annexe 3 :

**A new twist in the microRNA pathway: Not Dicer but Argonaute is required for a microRNA production.** Bossé, G. D., & Simard, M. J. (2010). *Cell Research*, 20(7), 735–737.  
doi:10.1038/cr.2010.83

Cette publication a été conçue et écrite en collaboration avec le Dr. Martin Simard

Lien : <http://www.nature.com/cr/journal/v20/n7/full/cr201083a.html>

Annexe 4 :

**The decapping scavenger enzyme DCS-1: A new modulator of miRNA turnover.** *Meziane, O., Bossé, G. D., & Simard, M. J. (2013). Cell Cycle (Georgetown, Tex), 12(17), 2715–2716. doi:10.4161/cc.26076*

J'ai contribué à la conception et à l'écriture de cette publication

Lien : [http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.26076#.VJQ4\\_AxFA](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cc.26076#.VJQ4_AxFA)