



**Caractérisation du rôle de deux interacteurs
moléculaires du complexe de dégradation des
microARN dans la régulation des courts ARN non
codants chez le nématode *C. elegans***

Thèse

Lucile Fressigne

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

Québec, Canada

© Lucile Fressigne, 2018

**Caractérisation du rôle de deux interacteurs
moléculaires du complexe de dégradation des
microARN dans la régulation des courts ARN non
codants chez le nématode *C. elegans***

Thèse

Lucile Fressigné

Sous la direction de :

Martin Simard, directeur de recherche

Résumé

Les courts ARN non codants tels que les microARN, les piARN et les siARN sont de petites molécules d'ARN de 20 à 30 nucléotides de long qui sont très bien conservées au cours de l'évolution. Elles s'associent à des protéines Argonautes afin de former un complexe effecteur appelé RISC (*RNA induced silencing complex*). Ces courtes séquences, ne codant pour aucune protéine, agissent comme de puissants régulateurs de l'expression des gènes. De nombreuses évidences supportent qu'une dérégulation du niveau d'expression de ces courts ARN non codants contribue au développement et au maintien de nombreuses pathologies telles que le cancer. De ce fait, il est essentiel pour la cellule de contrôler la stabilité des courts ARN non codants. Le contrôle de la maturation et de la stabilité de ces courts ARN non codants sont des mécanismes peu connus. L'objectif principal de mon doctorat a donc été de mieux comprendre comment le niveau des courts ARN non codants est contrôlé.

Afin d'étudier plus en détail comment le niveau des microARN est régulé, nous avons identifié la phosphatase PPM-2 (PP2C α chez l'humain) et l'E3 ubiquitine ligase HECD-1 (HectD1 chez l'humain) comme étant de nouveaux interacteurs du complexe de dégradation des microARN. Nous avons utilisé des approches de génétique et de biologie moléculaire chez le nématode *C. elegans*, pour étudier le rôle de la perte de fonction de *ppm-2* et *d'hecd-1* dans la voie des courts ARN non codants.

Nos travaux ont montré que la perte de fonction de *ppm-2* induit des défauts développementaux qui sont associés à des défauts de la voie des microARN. De plus, l'absence de *ppm-2* exacerbe les phénotypes développementaux observés dans des animaux où la voie des microARN est altérée. De manière intéressante, chez le mutant *ppm-2*, nous avons constaté que d'autres voies de courts ARN non codants, telles que la voie des piARN et celle de l'endosiARN nucléaire, sont affectées. Du point de vue moléculaire, nous avons observé une déstabilisation du niveau d'expression de plusieurs protéines Argonautes dans le mutant *ppm-2*. En effet, ces dernières sont envoyées à la dégradation par la voie du protéasome seulement chez des animaux mutés pour *ppm-2*. Concernant l'étude de HECD-1, nous avons remarqué que la perte de fonction de cette ubiquitine ligase entraînait une diminution de la progéniture et une létalité embryonnaire attribuable à des défauts dans la

gamétogénèse. De plus, nous avons observé une accumulation de miARN fonctionnels chez des animaux mutés pour *hecd-1*. L'ubiquitine ligase HECD-1 pourrait être impliquée dans la transcription ou la dégradation des miARN.

En conclusion, nos résultats suggèrent que PPM-2 permet de contrôler la stabilité des protéines Argonautes en les dirigeant dans une voie alternative de dégradation et que l'ubiquitine ligase HECD-1 pourrait être impliquée dans la régulation des miARN en modulant leur transcription ou leur dégradation. Mes travaux de doctorat nous ont permis de mettre en lumière un nouveau modulateur des courts ARN non codants, PPM-2, qui agit via le contrôle de la régulation des Argonautes. Les avancées de la recherche dans le domaine des courts ARN non codants pourra permettre le développement de nouvelles thérapies.

Abstract

Small non-coding RNAs, like microRNAs, piRNAs or siRNAs, are small RNA molecules, 20 to 30 nucleotides long that are conserved during evolution. They form an induced silencing complex (RISC) in association with Argonaute proteins to regulate gene expression. Small non-coding RNAs are involved in the regulation of genes implicated in cell proliferation, differentiation and development. Many evidences support that deregulation of the expression level of those small non-coding RNAs contribute to the development of pathologies such as cancer. It is therefore essential for cells to control small non-coding RNA stability. The control of maturation and stability of those small molecules are poorly understood. The main objective of my doctorate was to better understand how the stability of small non-coding RNAs is controlled.

In order to study in more detail how miRNAs are regulated, we identified two factors involved in miRNA turnover in *C. elegans*. We found that the phosphatase PPM-2 (PP2C α in human) and the E3 ubiquitin ligase HECD-1 (HectD1 in human) are new components of the miRNA degradation complex. Using the power of the nematode *C. elegans* and molecular biology, we characterized the role of the loss of function of PPM-2 and HECD-1 in small non-coding RNA pathways.

Loss of this phosphatase induces developmental defects which are associated with a defect in the miRNA pathway. Genetically, the phosphatase mutant exacerbates the phenotypes that are observed in animals where the miRNA pathway is affected. Interestingly, we further observed that the loss of the phosphatase affects other small non-coding RNA pathways like the piRNA and the siRNA pathways. At the molecular level, we observed a decrease in the expression level of many Argonaute proteins in phosphatase mutant animals. Upon blocking proteasomal degradation with MG132, we noticed that Argonaute proteins are sent to proteasomal degradation in phosphatase mutant animals. Concerning HECD-1, we noticed that the loss of function of the E3 ubiquitin ligase leads to the decrease of progeny and embryonic lethality due to defects in gametogenesis. Moreover, we observed an accumulation of functional miRNAs. This protein can be implicated in transcription or turnover of miRNAs.

In conclusion, our data suggest that PPM-2 controls the stability of Argonaute proteins by sending them through an alternative degradation pathway and that HECD-1 could be implicated in miRNA regulation by modulating their transcription or degradation. My doctoral work helped to highlight a new modulator of small non-coding RNAs, PPM-2, which acts through the regulation of Argonaute protein. A better understanding of the mechanisms controlling the stability and the function of these strong regulators will be useful to develop new therapies.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xviii
Avant-propos.....	xx
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. La biogénèse des ARN courts non codants chez les animaux.....	3
1.1.1. Résumé.....	3
1.1.2. La voie de biogénèse des microARN.....	3
1.1.3. Les PIWI-interacting RNA ou piARN.....	9
1.1.4. La voie de biogénèse des siARN endogènes.....	14
1.1.5. Conclusion.....	16
1.1.6. Remerciements.....	17
1.1.7. Liens d'intérêt.....	17
1.1.8. Summary.....	17
1.1.9. Biogenesis of small non-coding RNAs in animals.....	18
1.2. Le mode d'action des courts ARN non codants.....	18
1.2.1 Le mode d'action des miARN.....	18
1.2.2 Le mode d'action des piARN.....	28
1.2.3 Le mode d'action des siARN.....	31
1.2.4 Le mode d'action des 22G-ARN chez <i>C. elegans</i>	34
1.3. Régulation de la biogénèse des courts ARN.....	35
1.3.1. Régulation transcriptionnelle des courts ARN.....	36
1.3.2. Régulation post-transcriptionnelle des courts ARN.....	37
1.4. Régulation des protéines Argonautes.....	48
1.4.1. Structure des protéines Argonautes.....	50
1.4.2. Régulation des protéines Argonautes.....	53
1.5. Le nématode <i>C. elegans</i> comme modèle d'étude.....	56
1.5.1. Description.....	56

1.5.2. Génétique	58
1.6. Objectif du doctorat	59
Chapitre 2: PPM-2 regulates small RNA function by stabilizing Argonaute proteins in <i>C. elegans</i>	61
Avant-propos	61
2.1. Résumé	62
2.2. Abstract.....	63
2.3. Introduction	63
2.4. Results	65
2.4.1. <i>ppm-2</i> is implicated in the regulation of the miRNA pathway.....	65
2.4.3. The loss of <i>ppm-2</i> does not affect miRNA level but promotes ALG-1 degradation through the proteasome	71
2.4.4. PRG-1 and NRDE-3 Argonaute proteins are degraded by the proteasome in <i>ppm-2</i> mutant animals	72
2.4.5. <i>ppm-2</i> is required for nuclear RNAi.....	74
2.4.6. <i>ppm-2</i> is important for the 21U piRNA pathway.....	75
2.5. Discussion.....	77
2.6. Experimental procedures.....	78
2.7. Acknowledgements.....	81
2.8. Supplemental information	82
Chapitre 3 : HECD-1, une ubiquitine ligase importante pour la voie des miARNs	85
Avant-propos	86
3.1. Résumé	86
3.2. Introduction	87
3.3. Matériel et Méthodes.....	88
3.4. Résultats.....	90
3.4.1. Identification de protéines qui interagissent avec le complexe DCS-1\XRN-1.....	90
3.4.2. Sélection d'HECD-1 comme étant un interacteur intéressant impliqué dans la voie des miARN.....	91
3.4.3. Caractérisation de la souche mutante <i>hecd-1(ok1437)</i>	93
3.4.4. Analyse génétique du rôle de <i>hecd-1</i> dans la voie des miARN	98
3.4.5. La souche mutante <i>hecd-1(ok1437)</i> affecte le niveau des miARN	100
3.5. Conclusion et perspectives	101
Chapitre 4 : Discussion et Perspectives	104
4.1. Implication de la phosphatase PPM-2 dans la régulation des courts ARN non codants	104

4.1.1. PPM-2, un interacteur du complexe de dégradation	104
4.1.2. Implication de la perte de fonction de <i>ppm-2</i> dans la voie des miARN.....	106
4.1.3. Implication de la perte de fonction de <i>ppm-2</i> dans la voie des piARN et siARN....	109
4.1.4. Rôle de <i>ppm-2</i> dans la voie des courts ARN non codants.....	111
4.1.5. Détermination du substrat de PPM-2	116
4.2. Caractérisation de la protéine HECD-1.....	123
Conclusion générale	126
Bibliographies :	129
Annexes.....	158

Liste des figures

Figure 1 : La famille des ARN	2
Figure 2 : Structure des formes primaire, précurseur et mature du miARN.....	6
Figure 3 : Voie de biogénèse des miARN	8
Figure 4 : Voie de biogénèse des piARN chez <i>D. melanogaster</i>	12
Figure 5 : Voie de biogénèse des piARN et siARN chez <i>C. elegans</i>	15
Figure 6 : Résumé graphique des voies de biogénèse des ARN courts non codants chez <i>C. elegans</i>	17
Figure 7 : Types de site de reconnaissance des miARN	20
Figure 8 : Inhibition de l'initiation de la traduction par les miARN.....	24
Figure 9 : Trois mécanismes utilisés par les miARN pour réprimer l'expression des gènes	28
Figure 10 : Mécanismes utilisés par les piARN et les siARN pour réprimer l'expression des gènes	33
Figure 11 : Modèle de répression transgénérationnelle dans la lignée germinale de <i>C. elegans</i>	35
Figure 12 : Facteurs influençant la régulation des miARN primaires.....	41
Figure 13 : Arbre phylogénétique des Argonautes	49
Figure 14 : Les domaines et la structure d'une protéine Argonaute	52
Figure 15 : Résumé des sites spécifiques de modifications post-traductionnelles sur AGO2	55
Figure 16 : Cycle de vie du nématode <i>C. elegans</i>	58
Figure 17 : <i>ppm-2</i> is implicated in the microRNA pathway	67
Figure 18 : <i>ppm-2</i> is implicated in the regulation of let-7 miRNA family	70
Figure 19 : <i>ppm-2</i> does not affect miRNA expression level	71
Figure 20 : PPM-2 is implicated in the regulation of ALG-1	72
Figure 21 : PPM-2 is implicated in the regulation of PRG-1 and NRDE-3 Argonaute proteins	73
Figure 22 : <i>ppm-2</i> affects the function of nuclear RNAi	75
Figure 23 : <i>ppm-2</i> is implicated in the piRNA pathway	76
Figure 24 : PPM-2 is not implicated in the regulation of the miRNA <i>lsy-6</i>	82
Figure 25 : PPM-2 does not affect miRNA expression level	83
Figure 26 : PPM-2 is not implicated in the regulation of Argonaute proteins of the siRNA pathway	83
Figure 27 : PPM-2 prevents the proteasomal degradation of Argonaute proteins.....	84
Figure 28 : Identification des interacteurs de DCS-1.....	90
Figure 29 : La perte de <i>hecd-1</i> affecte la structure des alae.....	92
Figure 30 : La perte de fonction de <i>hecd-1</i> diminue la taille de la progéniture et affecte le développement embryonnaire à 20°C.....	94
Figure 31 : La perte de fonction de <i>hecd-1</i> diminue la taille de la progéniture et affecte le développement embryonnaire à 15°C.....	95
Figure 32 : Schéma représentant le développement embryonnaire chez <i>C. elegans</i>	96
Figure 33 : Photos représentant le développement embryonnaire d'embryons mutés pour <i>hecd-1</i> ..	97
Figure 34 : Synergie entre <i>hecd-1</i> et <i>alg-1</i>	98
Figure 35 : Étude du double mutant <i>hecd-1;alg-2</i>	99
Figure 36 : La perte de fonction de <i>hecd-1</i> rétablit la régulation médiée par le miARN let-7	100
Figure 37 : Le niveau des miARN augmente dans un mutant <i>hecd-1</i>	101
Figure 38 : La voie de l'ubiquitination	102
Figure 39 : Quantification par séquençage à haut débit des siARN.....	110
Figure 40 : Quantification de ALG-2 chez des animaux mutés pour <i>ppm-2</i>	111
Figure 41 : Niveau d'expression de PPM-2 au cours du développement de <i>C. elegans</i>	112
Figure 42 : Analyse de l'ubiquitination de ALG-1 en absence de <i>ppm-2</i>	114
Figure 43 : Révélation de protéines phosphorylées par coloration au Pro-Q Diamond	119
Figure 44 : Le mutant catalytique de <i>ppm-2</i> présente une synergie avec let-7.....	120

Figure 45 : Co-immunoprécipitation entre PPM-2, TFG-1 ET ALG-1	122
Figure 46 : Résumé de mes travaux de recherche.....	128

Liste des tableaux

Tableau 1 : Candidats identifiés par spectrométrie de masse.....	90
--	----

Liste des abréviations

A	Adénine
ac-pré-miR	« Ago2-cleaved precursor miRNA »
ADAR	« Adenosine Deaminases Acting on RNA »
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AGO	Argonaute
AIN	« ALG-1 INteracting protein »
AKT	« RAC-alpha serine/threonine-protein kinase »
ALG	« Argonaute like gene »
ANKRD-52	« ANKYrin Repeat Domain 52 »
APC/C	« Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome »
Armi	« Armitage »
ARN	Acide RiboNucléique
ARNi	Interférence à l'ARN
ARNlnc	Long ARN non codant
ARNm	ARN Messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNsn	court ARN nucléolaire
ARNt	ARN de transfert
ASEL	« Antagonistic SEnsory Left »
ASER	« Antagonistic SEnsory Right »
ATM	« Ataxia Telangiectasia Mutated »
ATP	Adenosine TriPhosphate
AU	« Arbitrary Units »
Aub	Aubergine
BRCA1	« BREast CAncer 1 »
CAF-1	« CCR4 Associated Factor 4 »
CCR4	« Carbon Catabolite Repression 4 »
CD2BP2	« CD2 antigen cytoplasmic tail-Binding Protein 2 »
Cel	<i>C. elegans</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ChiP	« Chromatin ImmunoPrecipitation »
Chp1	« CHromodomain Protein 1 »
COG	« Component of Oligomeric Golgi complex 1 »
COPII	« COat Protein complex II »
C-P4H	« Collagen Prolyl 4-Hydroxylase »
CSNK1A1	« CaSeiN Kinase 1 alpha 1 »
CSR-1	« Chromosome Segregation and RNAi deficient 1 »
D	Acide aspartique
DCP	« DeCapping Protein »
DcpS	« Scavenger mRNA-Decapping enzyme »
DCR-1	« Dicer 1 »
DCS-1	« DeCapping Scavenger 1 »
DDH	Motif aspartate-aspartate-histidine
DEDH	Motif aspartate-glutamate-aspartate-histidine
DGCR8	« DiGeorge syndrome Critical Region gene 8 »
diARNs	« DNA DSB-derived siRNAs »
DLK-1	« Dual Leucine zipper-bearing Kinase 1 »

D. melanogaster

DNMT3L
dPRMT5
E
EGFR
eIF4G
ERGO-1
ERI-1
ERK
FKBP
G
GARP
GFP
GSK3 β
GTP
GW182
H
HDAC1
HECT
HEN-1
HENN-1
hnRNPA1
HP1
HPat
HRDE-1
HSP
HuR
H3K9
I
kDa
KSRP
LET
LIN
LIR
Loqs
LSY-6
MAEL
MAPK
MAPKKK
MCPIP1
MECP2
Mg²⁺
miARN
MID
miRISC
MITF
MitoPLD
MIWI2
mM
Mn²⁺
Muv

Drosophila melanogaster

« DNA cytosine-5-MethylTransferase 3-Like »
« drosophila homologue of PRotein MethylTransferase 5 »
Acide glutamique
« Epidermal Growth Factor Receptor »
« eukaryotic translation Initiation Factor 4G »
« Endogenous-RNAi deficient arGOnaute 1 »
« 3'-5' ExoRIBonuclease 1 »
« Extracellular signal-Regulated Kinase »
« FK506 Binding Protein »
Glycine
« Golgi Associated Retrograde Protein »
« Green Fluorescent Protein »
« Glycogen Synthetase Kinase 3 β »
« Guanosine TriPhosphate »
Protéine avec répétition de motifs glycine et tryptophane
Histidine
« Histone DeACetylase 1 »
« Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus »
« HUA ENhancer 1 »
« HEN of Nematode 1 »
« Heterogenous nuclear RiboNucleoProtein A1 »
« Heterochromatin Protein 1 »
« Homologue of Pat1 »
« Heritable RNAi DEficient 1 »
« Heat Shock Protein »
« Human antigen R »
« lysine 9 of histone 3 »
Inosine
« kilo Dalton »
« KH-type Splicing Regulatory Protein »
« LEThal »
« abnormal cell LINEage »
« LIN-Related »
« Loquacious »
« Laterally SYmmetric 6 »
« MAELstom »
« Mitogen-Activated Protein Kinase »
« Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase »
« Monocyte Chemotactic Protein-1-Induced Protein 1 »
« MEthyl-CpG-binding protein 2 »
Ion Magnésium
microARN
« MIDDLE »
« microRNA-Induced Silencing Complex »
« Microphthalmia-associated Transcription Factor »
« Mitochondrial PhosphoLiPase D »
« Mouse pIWI-related gene 2 »
« milliMolaire »
Ion Manganèse
« Multivulva »

MVBs	« MultiVesicular Bodies »
NDP52	« Nuclear Dot Protein 52 kDa »
NHL-2	« NCL-1/HT2A/LIN-41 »
NOT	« Negative on Tata less »
NRDE	« Nuclear RNAi-DEfective »
OB fold	« Oligonucleotide/Oligosaccharide binding fold protein »
OH	« Hydroxyle »
P	« Phosphate »
PABP	« Poly Adenosine Binding Protein »
PACT	« Protein Activator of the interferon-induced protein kinase »
PAIP1	« PABP-interacting protein 1 »
PAM2	« PABPC-interacting Motif 2 »
PAN	« Poly A Nuclease »
Pasha	« PArtner of DroSHa »
PAZ	« Piwi Argonaute Zwillle »
P-bodies	« Processing bodies »
piARNs	« Piwi-Interacting ARNs »
PID-1	« piRNA-Induced silencing Defective 1 »
PIPK1 γ 90	« Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase type 1 γ 90 »
piRISC	« piRNA-Induced Silencing Complex »
PIWI	« P-element Induced Wimpy testis »
PNPase ^{old-35}	« PolyNucleotide Phosphorylase »
Pol II	« ARN Polymerase II »
PPM-2	« Probable Protein Phosphatase 2 »
PPP6C	« Protein Phosphatase 6 Catalytic subunit »
PRDE-1	« piRNA silencing DEfective 1 »
pré-miR	précurseur de miARN
pré-miRISC	précurseur de miRISC
PRG	« Piwi-Related gene »
pri-miR	miARN primaire
PTP1B	« Protein Tyrosine Phosphatase 1B »
PUF	« PUmilio Family »
RACK-1	« Receptor of Activated protein C Kinase 1 »
Ran-GTP	« RAS-related Nuclear protein- Guanosine TriPhosphate »
RBM3	« RNA Binding Motif protein 3 »
RDE-1	« RNAi-DEfective 1 »
RdRP	« RNA-dependent RNA polymerases »
RFP	« Red Fluorescent Protein »
RING	« Really Interesting New Gene »
RISC	« Induced Silencing Complex »
RITS	« RNAi-Induced Transcriptional gene Silencing »
RNase H	« RiboNucleAse H »
Rrp41	« RNase PH »
RT-PCR	« Reverse-Transcriptase PCR »
SAGO-1	« Synthetic secondary siRNA-deficient ArGOnaute mutant 1 »
SERBP-1/PAI-RBP1	« Plasminogen Activator Inhibitor 1 RNA-Binding Protein 1 »
siARNs	« Small Interfering ARNs »
siRISC	« siRNA-Induced Silencing Complex »
SMAD	« Small body size and Mothers Against Decapentaplegic »
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SUMO	« Small Ubiquitin-like MODifier »

Tas3	« Targeting complex Subunit 3 »
TBK-1	« Tank-Bndng Kinase 1 »
Tc	« <i>C. elegans</i> Transposon »
TDMD	« Target RNA-Directed miRNA Degradation »
TDP43	« TAR DNA-binding Protein 43 »
TEG-1	« Tumorous Enhancer of <i>glp-1 (gf)</i> »
TFG-1	« TRK-Fused Gene 1 »
TNRC6	« TriNucleotide Repeat-Containing gene 6 »
TOFU	« Twenty-One-u Fouled Ups »
TRBP	« Transactivating Response (TAR) RNA-Binding Protein »
TRIM	« TRiPartite Motif »
ts	« thermosensitive »
TSN	« Tudor-SN »
TUT	« Terminal UridylTransferase »
U	Uracile
UPF1	« RNA helicase and ATPase »
UPR	« Unfolded Protein Response »
UPS	« Ubiquitin-Proteasome System »
UTR	« UnTranslated Region »
VIG-1	« Vasa Intronic Gene 1 »
VPS-52	« Vacuolar Protein Sorting-associated Protein 52 Homolog »
W	Tryptophane
WAGO	« Worm ArGOnaute-specific group »
XPO	« eXPORTin »
XRN	« eXoRiboNuclease »
21U-RNA	« 21 nucleotide long RNA with a 5' uridine »
22G-RNA	« 22 nucleotide long RNA with a 5' guanosine »
26G-RNA	« 26 nucleotide long RNA with a 5' guanosine »

À mes grands-parents...

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Martin Simard, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, il y a un peu moins de quatre ans. Grâce au Dr. Martin Simard, j'ai pu découvrir le merveilleux modèle d'étude qu'est le nématode *C. elegans* et ai pu murir mon projet de carrière. Il a toujours été présent et disponible lorsque j'en ai eu besoin tout en me laissant mener mes recherches avec une grande liberté. Ses conseils m'ont permis de développer un esprit critique et d'acquérir des connaissances scientifiques solides. Je suis très reconnaissante de l'opportunité que j'ai eu de participer à plusieurs congrès internationaux. Je le remercie, tout particulièrement, pour avoir été compréhensif à certains moments de ma thèse. Son humour, ses talents de danseur et sa bonne humeur auront été fort bénéfiques et stimulants à mes quatre années de doctorat. Je ressors grandie de cette expérience.*

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres, passés et présents, du laboratoire. Chacune de ces personnes m'aura apporté un petit quelque chose d'une manière ou d'une autre. Je remercie particulièrement Gabriel Bossé qui a été mon mentor à mes débuts au laboratoire et avec qui j'ai dégusté ma première poutine. Merci au Dr Oussama Meziane qui m'a pris sous son aile quand je suis arrivée au laboratoire et avec qui j'ai eu de nombreuses discussions en tout genre. Merci à Guillaume et Sandra et leur sens du partage même pour ce qui est de partager une gastro. Merci à François, pour sa patience et sa gentillesse, pour m'avoir aidé dans mes travaux et d'avoir partagé certaines de mes frustrations. Merci à Pierre-Luc, mon stagiaire, ou plutôt, la personne avec qui j'étais couplée, qui m'a fait vivre une expérience très formatrice de mentorat et avec qui j'ai passé de bons moments. Merci à Pierre-Marc et ses histoires, toutes plus farfelues les unes que les autres. Merci à Lili d'être Lili. Thanks Dr Pavan Kakumani for making me eat spicy food. Merci à Alexandra pour tes conseils culinaires et tes cadeaux toujours très originaux. Je remercie spécialement ma voisine de bureau et mon amie, Pascale, avec qui j'organisais tout type d'activités et qui m'a fait découvrir le Nouveau Brunswick. Finalement, une pensée pour Bryan, Miguel et Anisha.

Je désire remercier également l'ensemble de la communauté du centre de recherche pour avoir créé un environnement stimulant et enrichissant. De nombreuses rencontres faites au

sein de cet établissement se seront transformées en amitié. Notamment, je voudrai remercier les « Meuhs » pour leur soutien aussi bien scientifique que culinaire.

Mais tout ceci n'aurait pas été possible sans le soutien inconditionnel de ma famille. Un immense merci à mes parents qui ont toujours accepté mes choix et qui m'ont toujours accompagné, de loin ou de près, dans chacune de mes expériences de vie. Merci pour tout. Un grand merci à mes frères, Quentin et Renan, et mes belle-sœurs, Cécile et Marina, pour m'avoir fait découvrir, à trois reprises, l'extraordinaire expérience d'être « Tata Lulu ». Je tiens également à remercier mon grand-père qui m'a toujours poussé à dépasser mes limites. Je voudrai également remercier ma belle-famille pour m'avoir accueilli à bras ouvert dans leur famille et avec qui j'ai passé d'incroyables moments au chalet. Je remercie tout particulièrement mon conjoint Alex avec qui je partage tout. Merci pour ta patience, ta gentillesse, ta folie, ta simplicité et ton soutien. Notre aventure ne fait que commencer...

Enfin, je désire remercier l'ensemble des membres du jury, à savoir Dr Derrick Gibbings, Dr Nicolas Bisson, Dr Amine Nourani et Dr Martin Simard d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Avant-propos

Les travaux présentés dans cette thèse sont le résultat de trois ans et demi d'études effectuées au sein du laboratoire du Dr Martin Simard. Au cours de mon doctorat, j'ai appris à manipuler le nématode *C. elegans* et à tirer profit de ce puissant modèle animal pour les études génétiques.

Mon projet principal de doctorat, faisant l'objet du chapitre 2, a été de caractériser l'implication de la phosphatase PPM-2 dans la régulation des courts ARNs non codants. Ce projet a donné naissance à un article qui est en préparation pour une soumission dans le journal *Current Biology* (Lucile Fressigné, François Houle, Gabriel D. Bossé, Lichao Li, Vincent Ferreira-Bourque, Weifeng Gu and Martin J. Simard. (*PPM-2 regulates small RNA function by stabilizing Argonaute proteins in C. elegans*).

J'ai également eu le privilège de participer au projet de Chris Wang du laboratoire du Dr Dave Hansen en contribuant à l'article publié dans le journal *Nucleic Acids Research* en 2016.

TEG-1 CD2BP2 controls miRNA levels by regulating miRISC stability in C. elegans and human cells, Chris Wang, Pratyush Gupta, Lucile Fressigné, Gabriel D. Bossé, Xin Wang, Martin J. Simard and Dave Hansen.

Au cours de mon doctorat, j'ai également eu la chance de collaborer avec mon collègue, Miguel Quévillon Huberdeau, sur son projet réalisé en collaboration avec le laboratoire du Dr Gunter Meister. Ceci a mené à une publication dans le journal *The EMBO Journal* en 2017.

Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for microRNA-guided gene silencing in vivo, Miguel Quévillon Huberdeau, Daniela M. Zeitler, Judith Hauptmann, Astrid Bruckmann, Lucile Fressigné, Johannes Danner, Sandra Piquet, Nicholas Strieder, Julia C. Engelmann, Guillaume Jannot, Rainer Deutzmann, Martin J. Simard and Gunter Meister.

A la fin de mon doctorat, j'ai également eu l'opportunité de rédiger un article de revue. Ce dernier est publié dans le journal scientifique francophone *Médecine Sciences* (Lucile Fressigné et Martin J. Simard. *La biogénèse des courts ARNs non codants chez les animaux*).

Chapitre 1 : Introduction

D'après le dogme central de la biologie moléculaire établi en 1958 par Francis Crick et James Watson, l'acide ribonucléique (ARN) était connu comme étant un simple intermédiaire entre l'acide désoxyribonucléique (ADN), support de l'information génétique, et les protéines. Cette forme intermédiaire correspond à l'ARN messenger (ARNm) et représente le seul type d'ARN codant pour des protéines (Figure 1). Dans la même décennie, plusieurs chercheurs ont commencé à s'intéresser à la taille du génome (la valeur C) et à la complexité du développement propre à chaque espèce (Mirsky and Ris 1951). Est alors apparu le paradoxe de la valeur C stipulant qu'il n'existe pas de relation entre la complexité d'un organisme et la taille de son génome (Thomas 1971).

C'est avec la découverte de l'ADN non codant pour des protéines, aussi appelé « junk DNA », et la mise en évidence du rôle de ces séquences non codantes dans la régulation de l'expression des gènes, qu'une explication au paradoxe de la valeur C a pu être donnée. En effet, la complexité d'un organisme a été montrée comme étant reliée à la quantité et la diversité de séquences non codantes qu'il contient (Taft and Mattick 2003). De manière intéressante, il a été estimé que 99% des ARN totaux, chez les mammifères, sont des ARN non codants pour des protéines (Palazzo and Lee 2015).

Déjà, en 1969, Britten et Davidson avaient émis l'hypothèse que des ARN pouvaient réguler l'expression d'un groupe de gènes (Britten and Davidson 1969). Mais c'est dans le début des années 1990 que les premières études de régulation génique par des ARN non codants ont été menées. Ce nouveau domaine de recherche a d'abord été décrit comme étant médié par des longs ARN non codants (ARNlnc) (Brockdorff et al. 1992) (Figure 1). Ces derniers sont définis comme ayant une taille supérieure à 200 nucléotides et ne codant pas pour des protéines. Puis sont apparus les courts ARN non codants caractérisés par une taille comprise entre 20 et 30 nucléotides (Figure 1). En 1993, le premier type de court ARN non codant, un microARN (miRNA), fut découvert par le groupe du Dr Victor Ambros chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Lee et al. 1993). C'est ainsi que le miARN lin-4 a été

montré comme régulant la traduction de lin-14, un ARN messager (ARNm) via une interaction ARN – ARN (Wightman et al. 1993; Lee et al. 1993).

Depuis, l'étude des courts ARN non codants n'a pas cessé de susciter la curiosité de nombreux chercheurs. A l'heure actuelle, il en existe deux grandes familles : la famille des ARN non codants de traduction, constitués des ARN ribosomiaux (ARNr) et des ARN de transfert (ARNt) et celle des ARN de régulation. Ces derniers, suivant leur taille, sont regroupés en deux sous-familles: les longs et les courts ARN non codants. Parmi les courts ARN non codants, il existe les miARN, les piARN (*Piwi-interacting ARNs*) et les siARN (*small interfering ARN*) (Choudhuri 2010). (Figure 1). Bien que ces trois types de courts ARN non codants aient des mécanismes d'action différents, ils sont tous capables de réguler l'expression des gènes. De plus, de nombreuses études montrent qu'ils sont impliqués dans divers processus biologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaires, le développement et l'apoptose. Finalement, les miARN ainsi que les piARN sont aussi utilisés comme biomarqueurs en tant qu'outils diagnostique et prédictif.

Les travaux présentés dans cette introduction portent sur l'étude de ces trois voies de régulation génique chez les animaux bien que certains de ces courts ARN non codants soient conservés chez la plante (Borges and Martienssen 2015).

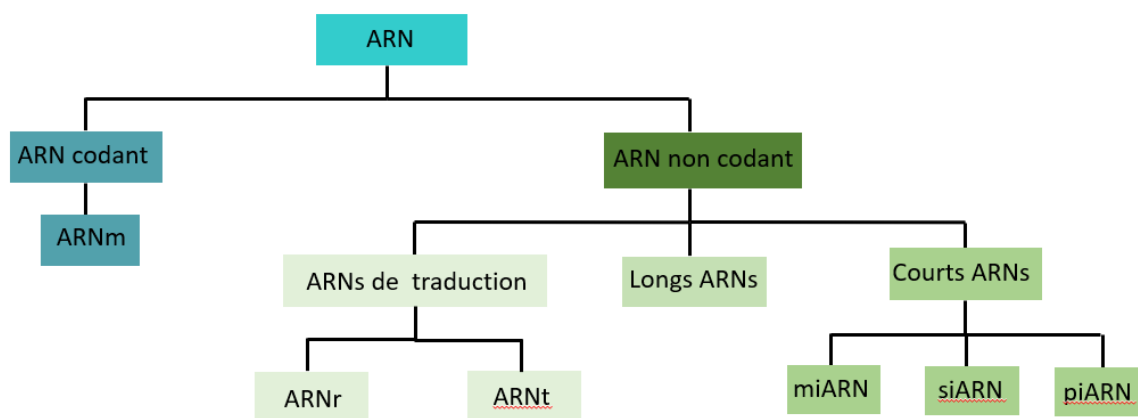


Figure 1 : La famille des ARN

ARNm: ARN messager; ARNr: ARN ribosomal; ARNt: ARN de tranfert; miARN: micro ARN; siARN: petit ARN interférent; piARN: ARN interagissant avec les protéines Piwi.

1.1. La biogénèse des ARN courts non codants chez les animaux

Les voies de biogénèse des courts ARNs non codants sont spécifiques à chaque type de courts ARNs et à chaque espèce. Cette information fait l'objet d'une revue, écrite par moi-même et mon directeur de recherche Martin Simard, qui a été publiée dans Médecine/Sciences.

1.1.1. Résumé

Ces dernières années, la découverte des ARN courts non codants a ouvert un tout nouveau champ de la biologie moléculaire. En effet, ces petites séquences, ne codant pour aucunes protéines, agissent comme de puissants régulateurs de l'expression des gènes. Il existe différents types d'ARN courts non codants, les mieux caractérisés étant les microARN, les piARN (*Piwi-interacting* ARN) et les siARN (*small interfering* ARN). Du fait de leur importante fonction d'ajustement dans la régulation des gènes et dans l'expression du génome, une mauvaise régulation du niveau d'expression de ces courts ARN peut entraîner l'apparition de nombreuses pathologies. Cette revue se concentre sur la biogénèse de ces ARN courts non codants chez les animaux.

1.1.2. La voie de biogénèse des microARN

Les microARN (miARN), d'une longueur de 21 à 23 nucléotides, représentent la famille d'ARN courts non codants la mieux caractérisée. C'est en 1993 que le premier miARN, *lin-4*, a été découvert chez le nématode *Caenorhabditis elegans* par le groupe de Victor Ambros (Lee et al. 1993). Depuis, ils ont été décrits comme étant bien conservés au cours de l'évolution, des plantes jusqu'à l'homme, suggérant une fonction biologique importante. Les miARN régulent l'expression génique en se liant à la région 3' non-traduite (3'UTR ou *3'untranslated region*) des ARN messagers (ARNm) (Romero, et al. 2012). De nombreuses études montrent qu'ils sont impliqués dans divers processus biologiques comme le développement et la différenciation cellulaire. C'est pourquoi une mauvaise régulation de leur niveau d'expression peut entraîner différentes pathologies telles que le cancer.

1.1.2.1. Organisation génomique des miARN

Les miARN de différentes espèces sont répertoriés dans une base de données en ligne appelée miRBase^{www.mirbase.org}, un outil puissant et complet permettant d'étudier la génomique des miARN. Chez l'homme, 54 % des miARN sont produits à partir de régions intergéniques, les miARN restants sont codés dans les régions introniques des gènes codant une protéine (de Rie et al. 2017). Chez *C. elegans* et la drosophile, respectivement seulement 15 % et 39 % des miARN, sont produits à partir de régions introniques (Griffiths-Jones et al. 2008).

Les miARN peuvent être transcrits sous forme mono ou poly-cistronique. Les transcrits poly-cistroniques produisent plusieurs miARN à partir d'un seul transcrit formant ainsi un groupe de miARN. Chez *C. elegans*, la souris et l'homme, la majorité de ces ARN courts non codants sont retrouvés isolés et non en groupe. Le plus souvent ces groupes codent des miARN faisant partie de la même famille, ce qui signifie qu'ils possèdent la même séquence clé de reconnaissance à l'ARNm appelée « *seed region* ».

1.1.2.2. Transcription des miARN

La première étape dans la production des miARN est la transcription du miARN primaire (ou pri-miR) dans le noyau. Ces pri-miR, de plus de 1 kilobase, sont majoritairement transcrits par l'ARN polymérase II en une structure en forme de tige-boucle (ou épingle à cheveux) présentant des extrémités simple brin en 5' et 3' (Figure 2A). La jonction entre les extrémités simples brins et la tige centrale du pri-miR est appelée *région basale*.

Des études à large échelle de génomique et de bioinformatique ont permis de localiser les sites d'initiation de la transcription, communément appelés TSS (*transcription start site*), des miARN chez les mammifères. L'une des premières études réalisées afin de définir les frontières génomiques des transcrits primaires de miARN, a permis de localiser les TSS jusqu'à une distance de 2 000 paires de bases en amont des miARN intergéniques (Saini et al. 2007). Une étude de cartographie des nucléosomes a dévoilé les promoteurs de 175 miARN et a démontré que plus d'un tiers des miARN localisés dans les régions introniques, avaient un TSS différent de celui du gène hôte (Ozsolak et al. 2008). Il est maintenant établi que les sites d'initiation de la transcription peuvent se retrouver à une distance pouvant aller jusqu'à 40 kilobases en amont des régions de précurseurs de miARN (Fujita and Iba 2008; Corcoran et al. 2009; Chien et al. 2011). Grâce à l'évolution des techniques, un atlas des

miARN et de leur promoteur a été réalisé. Il fait partie intégrante du projet FANTOM5 (*functional annotation of mammalian genome*) (de Rie et al. 2017).

1.1.2.3. Maturation du transcrit primaire

À la suite de sa transcription, s'ensuit la première étape de maturation constituée par le clivage du pri-miR en un précurseur de miARN (le pré-miR) d'environ 65 nucléotides. Ce clivage est réalisé dans le noyau par une enzyme de la famille des ARNases (ou ribonucléase) de type III, appelée Drosha. Cette dernière, possédant une activité endonucléase spécifique à l'ARN double brin, clive la structure tige boucle du pri-miR constituée, cette fois-ci, d'une boucle de terminaison et d'une tige double brin (Figure 2A). Mais pour effectuer un clivage précis, Drosha nécessite un cofacteur, DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) aussi appelé Pasha (*partner of Drosha*) chez la drosophile et PASH-1 chez *C. elegans*, les deux protéines formant un complexe appelé microprocesseur. Des études récentes ont montré que Drosha se lie au motif UG présent à la jonction basale tandis qu'un dimère de DGCR8 interagit avec la tige du pri-miR et reconnaît le motif UGU présent à la jonction apicale (Nguyen et al. 2015) (Figure 3). En plus de son activité, Drosha « mesure » la distance précise, à partir de la jonction basale, de 11 paires de bases où aura lieu le clivage, tandis que le dimère de DGCR8 stabilise l'enzyme (Nguyen et al. 2015). Le pré-miR ainsi formé présente deux nucléotides flottants à son extrémité 3' hydroxyle (OH) ainsi qu'un groupement phosphate à son extrémité 5' (Figure 2B).

1.1.2.4. Export cytoplasmique du pré-miR

Après le clivage par le microprocesseur, le pré-miR est exporté vers le cytoplasme où il subira une deuxième étape de maturation (Figure 3). Chez les mammifères et la drosophile, l'exportin 5 (XPO5), un récepteur de transport nucléaire, associée à une protéine liant le GTP, Ran-GTP, forme un complexe qui, en se liant spécifiquement aux deux nucléotides flottants de l'extrémité 3' du pré-miR, et en hydrolysant le GTP, va permettre la libération du pré-miR dans le cytoplasme (Lund et al. 2004; Bohnsack et al. 2004; Yi et al. 2003). Ce modèle de libération, fondé sur des essais de liaisons et des expériences de diminution de l'expression de XPO5, a été remis en question par de récents travaux. Il a en effet été montré qu'une perte d'expression de XPO5 n'affectait que modestement le niveau d'expression des miARN ce

qui suggère que XPO5 n'est pas indispensable à la voie de biogénèse (Kim et al. 2016). Chez *C. elegans* (qui ne possède pas d'orthologue de XPO5), XPO-1 semble impliqué dans l'export des pré-miR, mais le mécanisme d'action exact reste à définir (Büssing et al. 2010).

1.1.2.5. Maturation du pré-miR

Dans le cytoplasme, les pré-miR sont pris en charge par Dicer (Dicer-1 chez la drosophile), une ARNase de type III, afin d'être clivés en duplex d'ARN de 22 nucléotides de long (Figures 2C et 3). Dicer reconnaît spécifiquement les deux nucléotides flottants en 3'-OH, l'extrémité 5' phosphate, ainsi que la boucle de terminaison qu'elle excise (Figure 2). Dicer s'associe à des protéines liant l'ARN double brin comme PACT (*protein activator of PKR*) et TRBP (*trans-activation response RNA-binding protein*) chez l'homme, et Loquacious, chez la drosophile (*D. melanogaster*). Encore aujourd'hui, le rôle de ces protéines dans la voie des miARN n'est pas précisé.

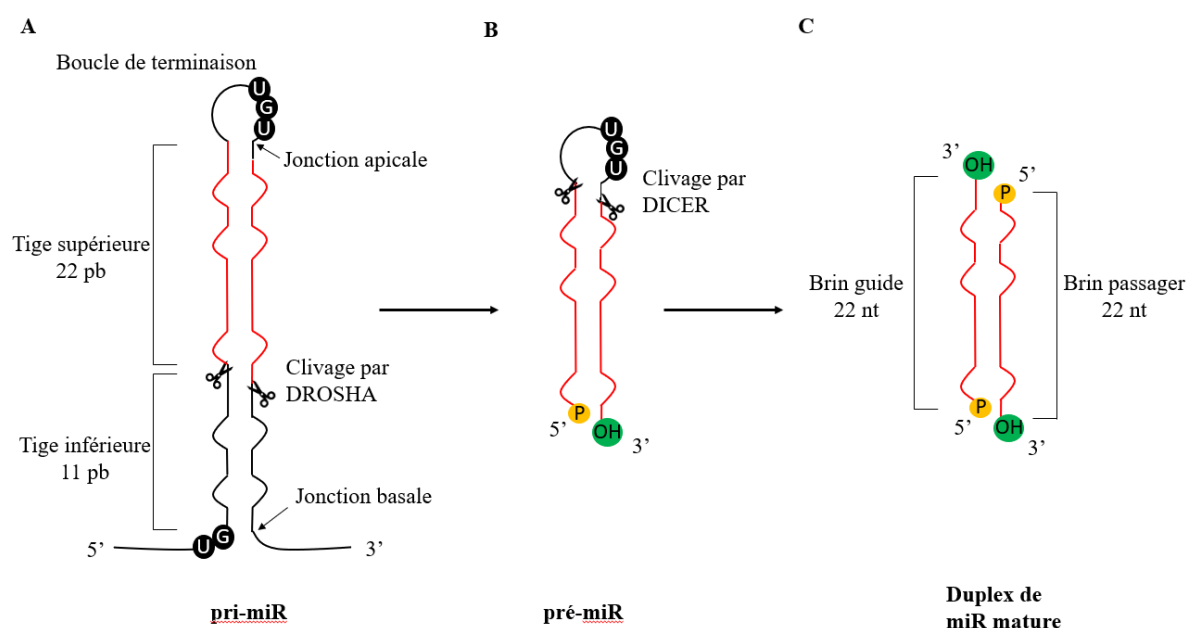


Figure 2 : Structure des formes primaire, précurseur et mature du miARN

(A) Les pri-miR sont majoritairement transcrits par l'ARN polymérase II mais certains sont transcrits par l'ARN polymérase III. Ils sont constitués d'une boucle de terminaison, d'une tige et de deux extrémités simple brin. Drosha, aidée de DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*), « mesure » 11 paires de bases (pb) à partir de la jonction basale et clive le pri-miR à cette position. (B) Le pré-miR est constitué d'une boucle de terminaison, d'une tige, d'une extrémité 5' présentant un groupement phosphate (P) et de deux nucléotides flottants à l'extrémité 3' hydroxyle (3'OH). Dicer

reconnait les extrémités 5' et 3' par son domaine PAZ (un domaine de liaison aux acides nucléiques retrouvé chez les protéines Dicer et Argonautes). La boucle de terminaison est alors alignée le long de l'axe de Dicer qui « mesure » 22 nucléotides (nt) à partir des extrémités et clive la boucle de terminaison. (C) Le duplexe de miARN mature compte 22 nt et est constitué du brin guide et du brin passager.

Un modèle alternatif de maturation a également été proposé. Dans ce modèle, le pré-miR, pris en charge par le complexe Dicer, TRBP et Ago2 (protéine Argonaute), est clivé à son extrémité 3' par Ago2 en un ac-pré-miR (*Ago2-cleaved precursor miRNA*), lui-même clivé par Dicer (Diederichs and Haber 2007). Cet ac-pré-miR pourrait permettre une meilleure sélection du brin guide, brin du duplex d'ARN, qui est gardé pour former le miRISC (*microRNA-induced silencing complex*) (Diederichs and Haber 2007). Ce modèle a été décrit principalement pour le miARN let-7, et n'a pas été validé pour les autres miARN. Chez *C. elegans*, il a été montré que l'activité de clivage des protéines Argonautes ALG-1/2, est importante pour coordonner la production du miARN avec Dicer (Bouasker and Simard 2012).

1.1.2.6. Formation du miRISC, le complexe effecteur

RISC est un complexe ribonucléoprotéique effecteur, qui est appelé miRISC lorsqu'il comprend un miARN. L'assemblage du miRISC, se réalise en deux étapes. La première consiste en la formation du complexe pré-miRISC (*precursor miRISC*), qui permet le transfert du produit de clivage de Dicer aux protéines Argonautes, des protéines majeures du complexe effecteur. Chez les mammifères, il existe quatre protéines Argonaute impliquées dans la voie des miARN (Ago1 à 4), alors que *C. elegans* en compte deux, ALG-1 et ALG-2, et *D. melanogaster*, une seule Ago1 (Hutvagner and Simard 2008). Le pré-miRISC est constitué des protéines Dicer, Argonautes et les chaperonnes moléculaires Hsc (*heat shock cognate protein*) 70 / Hsp (*heat shock protein*) 90. Ces dernières, en hydrolysant l'ATP, permettent d'« ouvrir » la protéine Argonaute afin de faciliter la prise en charge du duplex d'ARN (Iwasaki et al. 2010). L'importance de l'action des chaperonnes dans la dynamique de l'assemblage du pré-miRISC a été montrée chez la drosophile (Iwasaki et al. 2015) mais il reste à définir si ce mécanisme est conservé chez les autres espèces animales.

La deuxième étape consiste en la séparation des brins d'ARN afin de ne garder que le brin guide au sein du miRISC et d'éliminer le brin passager, qui sera dégradé. La sélection du brin guide est fondée sur la stabilité thermodynamique des extrémités 5' du duplex : le brin présentant l'extrémité 5' la moins stable sera conservé (Schwarz et al. 2003; Khvorova et al. 2003). En revanche le mécanisme de séparation des deux brins reste inconnu.

Après l'élimination du brin passager, le complexe minimal du miRISC, constitué d'une protéine Argonaute et du brin guide, est alors formé, prêt à assurer sa fonction de répression (Figure 3).

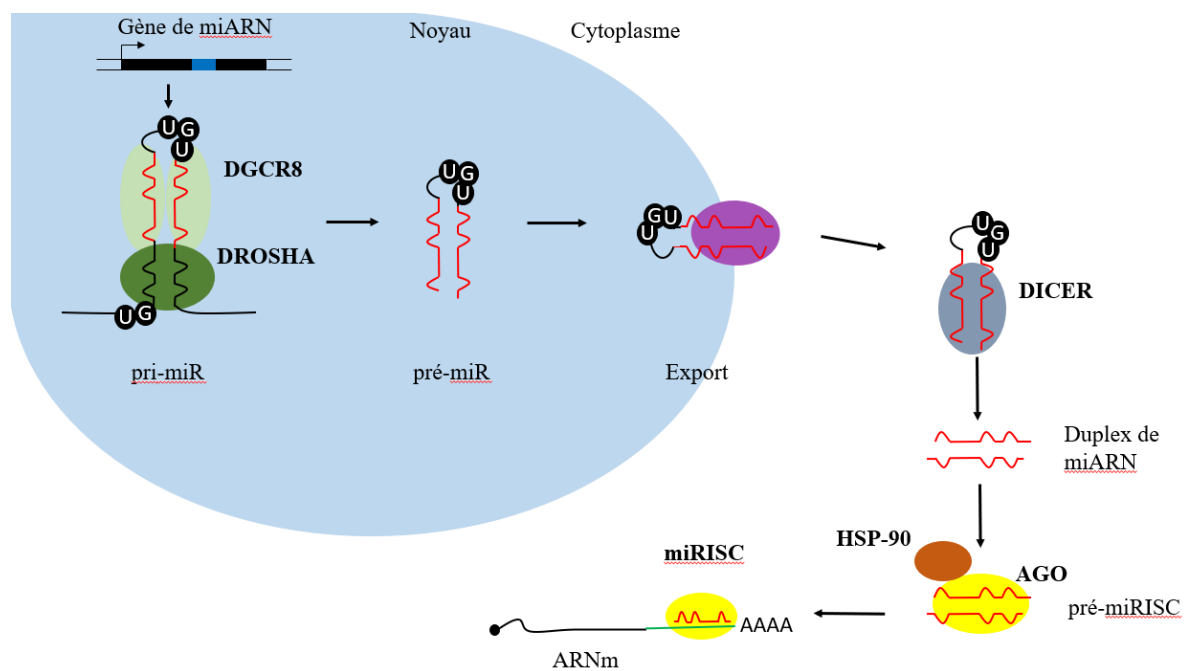


Figure 3 : Voie de biogenèse des miARN

Le pri-miR est transcrit par l'ARN polymérase II. Il est ensuite clivé par le microprocesseur constitué de Drosha/DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) pour former le pré-miR. Ce dernier est exporté dans le cytoplasme pour être de nouveau clivé par Dicer. Le duplex de miARN mature ainsi formé est alors pris en charge par une protéine Argonaute (AGO) aidée de la protéine chaperonne Hsp-90 (*heat shock protein 90*). Le brin passager est dégradé, le brin guide restant ancré dans la protéine Argonaute pour former le miRISC. Celui-ci pourra s'associer à ces ARNm cibles afin de réprimer leur traduction.

1.1.2.7. Production de miARN non canoniques

Des voies alternatives de biogénèse des miARN, dites non-canoniques, indépendantes de Drosha ou Dicer ont été décrites. La première à avoir été caractérisée est celle des mirtrons, des miARN fonctionnels dont la maturation contourne l'étape réalisée par Drosha, et qui sont produits par la machinerie d'épissage (Chung et al. 2011). Ces miARN épissés adoptent une structure en tige-boucle semblable à celle des pré-miR. Ils peuvent, par la suite, intégrer la voie canonique des miARN (Chung et al. 2011). Un miARN, le miR-451, est produit indépendamment de Dicer. Ce miARN d'abord clivé par Drosha (comme décrit précédemment), est exporté dans le cytoplasme où il est directement pris en charge par Ago2 qui va le cliver pour former le duplex de miARN mature (Cheloufi et al. 2010; Cifuentes et al. 2010).

1.1.3. Les PIWI-interacting RNA ou piARN

Les piARN représentent la famille des ARN courts non codants la moins caractérisée. Ces mystérieux ARN courts non codants présentent une méthylation sur l'oxygène en 2' de leur extrémité 3', ainsi qu'une base uridine à leur extrémité 5'. Ils sont exprimés spécifiquement dans la lignée germinale des animaux. Leur rôle est de protéger les cellules germinales d'« envahisseurs » du génome, comme les éléments transposables (Muller et al. 2013), en s'associant à des protéines Argonautes spécialisées, appelées PIWI. Plusieurs travaux ont montré l'existence d'une faible quantité de piARN également dans les cellules somatiques. Leur rôle dans la régulation des processus somatiques reste cependant à découvrir d'autant que, dans ces cellules, leur association aux protéines PIWI est encore inconnue (Lim and Kai 2015).

Chez la souris, trois PIWI sont impliquées dans la voie des piARN, MILI (PIWIL2), MIWI (PIWIL1) et MIWI2 (PIWIL4), alors que chez *C. elegans*, il en existe deux, PRG-1/2, et trois chez la drosophile, PIWI, Aubergine (Aub) et AGO3 (Hutvagner and Simard 2008).

La fonction des piARN est conservée au cours de l'évolution. Ils sont cependant utilisés différemment selon les espèces afin de réprimer les transposons.

1.1.3.1. Biogénèse des piARN chez la drosophile et la souris

La voie de biogénèse des piARN chez la drosophile et la souris s'effectue en deux étapes : la maturation du transcrite primaire et l'amplification, de type ping-pong (Muller et al. 2013). Ces piARN de 22 à 30 nucléotides de long, sont capables de différencier les séquences du soi de celles du non soi et ainsi éliminer spécifiquement les « envahisseurs » (Muller et al. 2013).

1.1.3.1.1. Organisation génomique des piARN

Dans les ovaires et testicules de drosophile, tout comme dans le stade prepachytène (troisième stade de la prophase) chez la souris, les piARN sont transcrits à partir de transposons et de séquences répétées qui en sont dérivées (Watanabe et al. 2006; Girard et al. 2006). Dans le génome, leurs gènes sont réunis en groupes de piARN, et la majorité d'entre eux sont monodirectionnels, ce qui signifie que tous les piARN d'un groupe sont produits à partir d'un seul des deux brins d'ADN.

1.1.3.1.2. Maturation du piARN primaire

Les précurseurs de piARN sont transcrits par l'ARN polymérase de type II et sont indépendants de Dicer. La maturation des piARN primaires est un mécanisme peu connu. Initialement, un seul modèle, démontré chez la drosophile, décrivait succinctement ce mécanisme : le précurseur de piARN serait clivé par une endonucléase, Zucchini/MitoPLD (*mitochondrial phospholipase D*) (non conservée chez *C. elegans*), qui marque, d'un groupement monophosphate, l'extrémité 5' du piARN (Nishimasu et al. 2012; Ipsaro et al. 2012) (Figure 4). Des expériences *in vitro* proposent que des protéines PIWI prennent en charge ce fragment d'ARN, assistées par les protéines chaperonnes (Hsp90) (Kawaoka et al. 2011) (Figure 4). Une exonucléase 3'-5' (qui reste inconnue) couperait ensuite l'extrémité 3' de ces précurseurs de piARN permettant ainsi à la méthyltransférase Hen1 (ou *small RNA 2'-O-methyltransferase*) d'ajouter un groupement méthyle à la position 2' de l'extrémité 3' (Horwich et al. 2007), afin de former le piARN primaire mature, qui sera ainsi protégé de la dégradation. De récents travaux ont néanmoins montré que les piARN pouvaient être générés selon deux voies parallèles (Hayashi et al. 2016). À côté de la voie décrite précédemment, les précurseurs de piARN peuvent également être clivés directement par les protéines Argonaute, Aub et Ago3, et voir leur extrémité 3' réduite par Nibbler, une exonucléase 3'-5'

[31, 32]. La méthyltransférase Hen1 forme ensuite le piARN primaire mature, qui, associé à une protéine PIWI, constituera le piRISC. D'autres travaux ont révélé que les facteurs Armitage (Armi, une hélicase) et Yb (*somatic piRNA biogenesis factor*), impliqués dans la voie de biogénèse des piARN chez la drosophile, permettent, lorsqu'ils sont associés à un transcrit, de l'identifier comme précurseur de piARN (Pandey et al. 2017), ce qui est essentiel à l'engagement du précurseur de piARN dans la voie de biogénèse.

1.1.3.1.3. L'amplification ping-pong

Le complexe effecteur piRISC peut cliver, entre les nucléotides 10 et 11 de son extrémité 5', le brin sens de sa cible qui lui est complémentaire formant ainsi un nouveau piARN secondaire (Figure 4). Ce dernier sera alors pris en charge par une protéine PIWI, Ago3 chez la drosophile, ou MIWI2 chez la souris. L'ajout d'un groupement 2'-O-méthyle à l'extrémité 3' formera le piARN secondaire mature. Il sera alors capable, à son tour, de cliver le brin antisens de sa cible, par complémentarité de bases. Ce cycle se poursuivra tant que les piARN secondaires reconnaîtront et cliveront des transposons afin générer de grande quantité de piARN pour permettre une répression efficace. La reconnaissance spécifique des brins antisens et sens par les protéines PIWI/Aub et Ago3 est un mécanisme qui reste encore inconnu.

De nombreuses autre protéines interviennent dans la production des piARN telles que les protéines de la famille Tudor et des hélicases à ARN (Siomi et al. 2011). Malheureusement, leurs fonctions moléculaires exactes dans la voie des piARN sont encore inconnues et des investigations supplémentaires reste nécessaires.

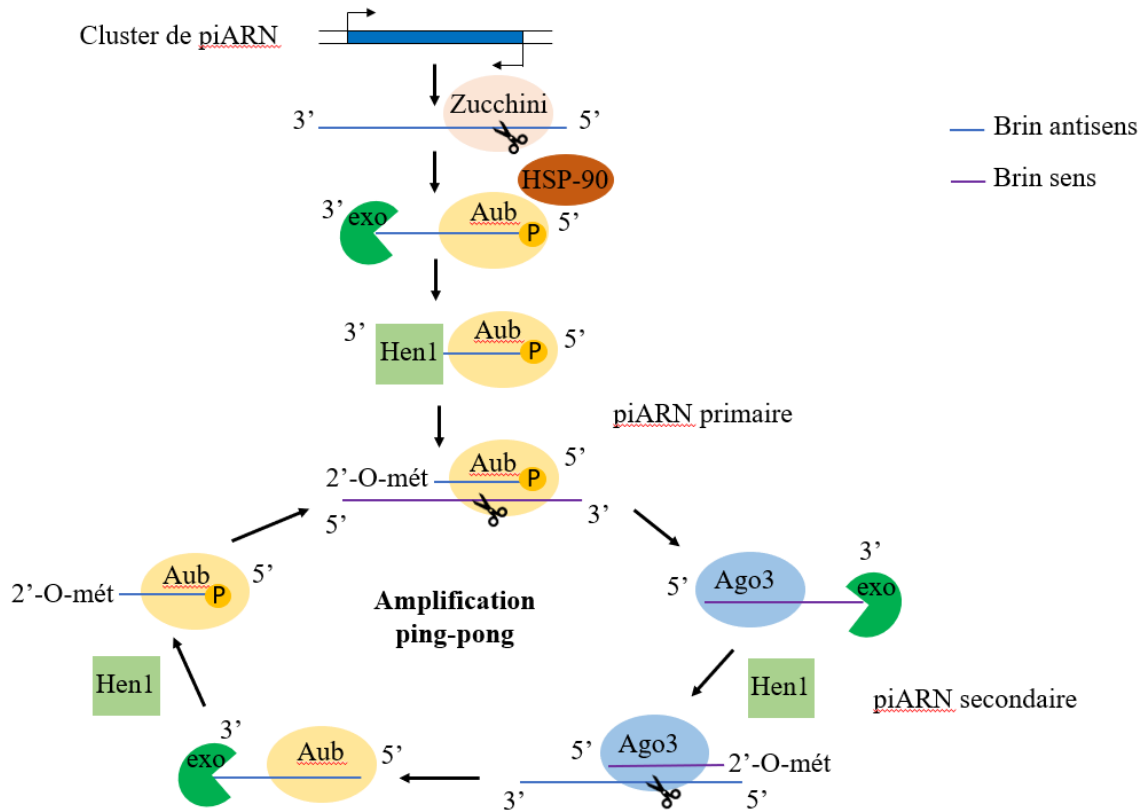


Figure 4 : Voie de biogénèse des piARN chez *D. melanogaster*

Le transcrite antisens (brin bleu) de piARN est clivé par Zucchini, qui génère l'extrémité 5'. Il est ensuite pris en charge par la protéine Aubergine (Aub). L'extrémité 3' est alors raccourcie par l'action d'une exonucléase (qui reste inconnue) et finalement un groupement méthyle est ajouté à la position 2' (2'-O-mét) du nucléotide en 3' par Hen1. L'ensemble forme le piRISC qui va pouvoir cliver le brin sens (brin violet) de sa cible en un précurseur de piARN secondaire. Les piARN secondaires sens seront pris en charge par Ago3 et subiront une maturation par une exonucléase et Hen1. Ils pourront alors, à leur tour, cliver le brin antisens de leurs cibles en un précurseur de piARN antisens qui sera pris en charge, à nouveau, par Aub.

1.1.3.2. Biogénèse des piARN chez *C. elegans*

Chez le nématode, les piARN, aussi appelés 21U-ARN parce qu'ils sont constitués précisément de 21 nucléotides et qu'ils présentent une uridine à leur extrémité 5', sont exprimés dans les cellules germinales (Ruby et al. 2006).

1.1.3.2.1. Organisation génomique piARN 21U-ARN

Les 21U-ARN sont codés dans les régions intergéniques et introniques de gènes codants une protéine (Ruby et al. 2006; Batista et al. 2008). Chaque locus de 21U-ARN produit un court transcrit indépendant d'environ 26 nucléotides de long (Ruby et al. 2006).

1.1.3.2.2. Maturation des 21U-ARN

La maturation des 21U-ARN reste un processus peu connu. Les précurseurs de 21U-ARN sont transcrits par l'ARN polymérase de type II. Deux nucléotides en 5' sont ensuite éliminés (par un mécanisme inconnu) afin de permettre leur prise en charge par une protéine Argonaute, PRG-1 (*piwi-related gene 1*) (Montgomery et al. 2012) (Figure 5). Le précurseur subit alors un raccourcissement de 3 nucléotides en 3' (par un mécanisme qui reste inconnu) et une réaction de méthylation par HENN-1 (l'orthologue de Hen1) afin de former le 21U-ARN mature (Montgomery et al. 2012) (Figure 5). Une autre protéine Argonaute, homologue à PRG-1, PRG-2, a été décrite. Mais sa fonction n'a pas encore été clairement démontrée (Wang and Reinke 2008).

1.1.3.2.3. Production des 22G-ARN

Les 21U-ARN complexés à PRG-1, s'associent à leurs cibles en tolérant quelques mésappariements de bases, et recrutent des ARN polymérases ARN-dépendantes ou RdRP (*RNA-dependent RNA polymerases*) (Figure 5). Ces dernières entraînent la production massive de siARN secondaires (ou 22G-ARN), des ARN de 22 nucléotides possédant un groupement triphosphate à leur extrémité 5'. Ces 22G-ARN sont pris en charge par des protéines WAGO (*worm-specific Agos*) (Figure 5), dont la protéine Argonaute HRDE-1 (*heritable RNAi defective 1*, ou WAGO-9), dans les cellules germinales, et NRDE-3 (*nuclear RNAi defective 3*, ou WAGO-12), dans les cellules somatiques, afin de réprimer l'expression de gènes envahisseurs de manière transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Une voie de protection du soi, qui peut entrer en compétition avec la voie de répression reposant sur le complexe WAGO/22G-ARN, est activée lorsque les 22G-ARN sont pris en charge par une autre protéine Argonaute, CSR-1 (Wedeles et al. 2013). Le rôle exact de cette protéine dans la voie des ARN courts non codants reste controversé et fait l'objet de nombreuses études.

Comme chez la drosophile et la souris, d'autres protéines sont nécessaires pour la production de piARN comme les protéines TOFU (*twenty-one-u fouled ups*), la protéine PID-1 (*piRNA-*

induced silencing defective-1) et la protéine PRDE-1 (*piRNA silencing defective 1*) (Goh et al. 2014; de Albuquerque et al. 2014; Weick et al. 2014). À ce jour, leur fonction dans la voie des piARN est encore mal comprise et demande plus d'investigations.

1.1.4. La voie de biogénèse des siARN endogènes

Les petits ARN interférents communément appelé siARN sont de courts ARN non codants qui régulent l'expression des gènes en provoquant la dégradation de l'ARNm. Chez *C. elegans*, il existe deux voies de de biogénèse des siARN : la voie exogène et la voie endogène. Les siARN exogènes sont produits après introduction dans la cellule d'ARN double brin exogène. Ils sont à l'origine de l'ARNi (interférence à l'ARN), un mécanisme mis en évidence par Fire et Mello en 1998 (Fire et al. 1998).

Nous nous intéresserons essentiellement aux siARN endogènes chez *C. elegans*. Les siARN endogènes sont bien conservés au cours de l'évolution, de *C. elegans* et *D. melanogaster* jusqu'aux mammifères. Nous ne décrivons cependant leur voie de biogénèse que chez le nématode, celle-ci restant inconnue chez la drosophile et les mammifères.

La voie de biogénèse des siARN endogènes présente quelques similarités avec celle des miARN. Leur mode de régulation quant à lui, se rapproche de celui des piARN puisqu'ils ciblent principalement des éléments transposables.

1.1.4.1. Maturation des siARN endogènes primaires

Les siARN endogènes sont transcrits à partir de séquences codantes du génome. Un long ARN double brin est clivé par Dicer pour former un duplex d'ARN long de 26 nucléotides présentant un groupement monophosphate en 5', un groupe hydroxyle en 3' et deux nucléotides flottants en 3' (Ketting et al. 2001) (Figure 5). De façon similaire aux miARN, les siARN primaires, aussi appelées 26G-ARN, vont être pris en charge par une protéine Argonaute appelée ERGO-1 (Gent et al. 2010) (Figure 5). La dissociation des deux brins d'ARN, par un mécanisme encore inconnu, conduira à la formation du RISC.

1.1.4.2. Production des siARN secondaires endogènes

Le complexe effecteur RISC reconnaît avec une complémentarité parfaite la cible qu'il clive. L'Argonaute ERGO-1 recrute alors une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP, RRF-3) qui utilisera l'ARNm cible comme modèle afin de produire des siARN secondaires (Han et al. 2009) (Figure 5). Ces siARN secondaires, plus abondants que les siARN primaires, sont appelées 22G-siARN. Ils permettent de renforcer le processus de dégradation de l'ARNm. De polarité antisens par rapport à l'ARNm, initialement ciblés par des 21U-ARN, ils s'associent ensuite aux protéines Argonautes WAGO (au nombre de 18) (Yigit et al. 2006), pour réprimer efficacement l'expression du gène ciblé. Dans les gonades mâles, les 26G-ARN sont pris en charge par les protéines Argonaute ALG-3 et ALG-4 afin d'initier la production de 22G-ARN par des RdRP qui, une fois associés aux WAGO, réguleront la spermatogénèse (Conine et al. 2010).

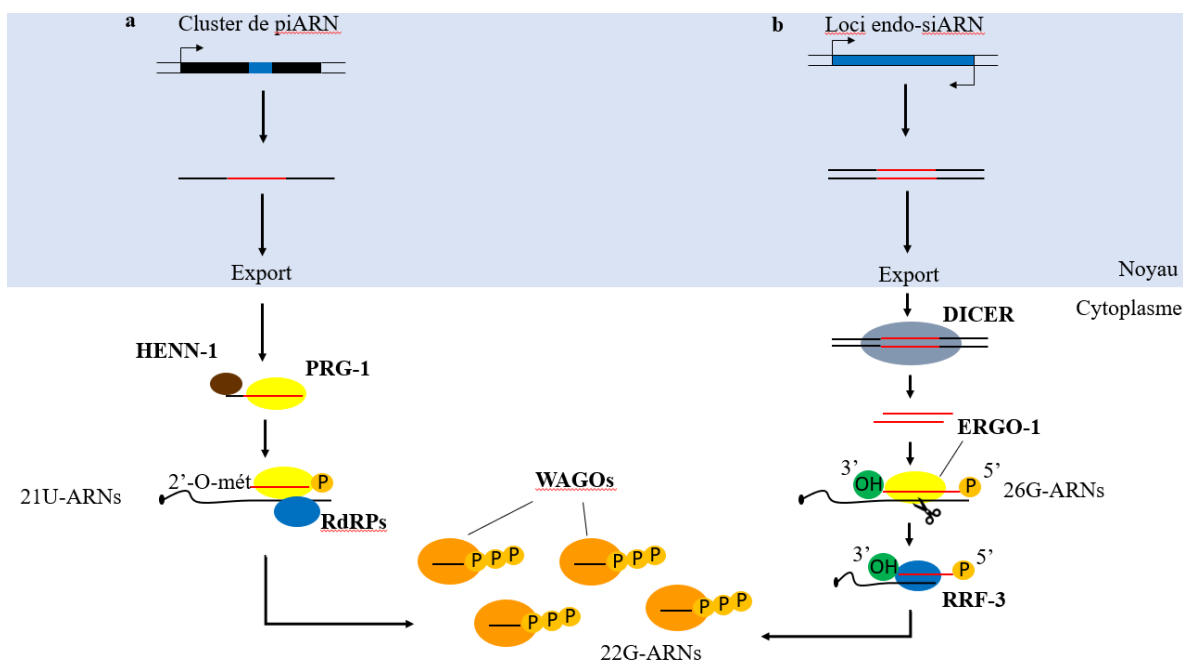


Figure 5 : Voie de biogénèse des piARN et siARN chez *C. elegans*

(A) Le transcrite de piARN est exporté dans le cytoplasme pour pouvoir être pris en charge par la protéine Argonaute PRG-1. HENN-1 forme alors le piARN primaire mature, aussi appelé 21U-ARN, en ajoutant un groupement méthyl à son extrémité 3' (2'-O-mét). Le piRISC ainsi formé va reconnaître sa cible et recruter des RdRP qui vont produire des piARN secondaire, appelés 22G-ARN. Ces derniers, pour réprimer leurs cibles, s'associeront aux protéines WAGO (*worm-specific Argonautes*). (B) Le long transcrite d'ARN double brin, après avoir été exporté dans le cytoplasme, est clivé par Dicer pour former un duplexe d'ARN. Les brins sont dissociés par un mécanisme encore inconnu et l'un des brins, appelé 26G-ARN, sera pris en charge par la protéine Argonaute ERGO-1. Le complexe effecteur ainsi formé va reconnaître son ARNm cible et le cliver. ERGO-1 recrute

ensuite des RdRP (ARN polymérase ARN-dépendante) qui utilisent l'ARNm comme modèle pour produire des siARN secondaires, appelés 22G-ARN. Ces derniers vont être pris en charge par les protéines WAGO (tel que HRDE-1 [*heritable RNAi deficient 1*] et NRDE-3 [*nuclear RNAi defective 3*]) et ainsi réprimer leurs cibles.

Chez les mammifères et la drosophile, il n'existe pas de RdRP. Cependant, il a été montré, chez la souris et la drosophile, que, malgré l'absence de ces protéines, une production naturelle de siARN endogènes fonctionnels était réalisée à partir de molécules d'ARN double brins (Czech et al. 2008; Okamura et al. 2008; Tam et al. 2008; Watanabe et al. 2008). Ces derniers aideraient les piARN à réguler l'expression des rétrotransposons mais aussi les miARN à réguler les ARNm (Piatek and Werner 2014).

1.1.5. Conclusion

Chaque catégorie d'ARN courts non codants possède une voie de biogénèse qui lui est propre, mais certaines voies peuvent partager des facteurs communs. Ainsi, les miARN et les siARN sont clivés par une seule et même enzyme Dicer, chez *C. elegans* et les mammifères, alors que deux enzymes Dicer distinctes sont utilisées chez la drosophile. De même, chez *C. elegans*, la voie de biogénèse des piARN fusionne avec celle des siARN pour former des 22G-ARN.

Les ARN courts non codants, aussi appelés « micromanagers », ont un puissant potentiel de répression et sont très conservés au cours de l'évolution, suggérant un rôle important dans la cellule. Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que le développement, l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaires, la spermatogénèse, la ségrégation des chromosomes et la défense contre des « envahisseurs » du génome. Ceci fait donc de ces petits ARN, des molécules essentielles au bon fonctionnement de la cellule. Ce nouveau domaine de recherche suscite beaucoup d'intérêts, toutefois il reste encore de nombreux aspects de la biologie des ARN courts non codants à étudier et comprendre afin d'éclairer la biologie du vivant.

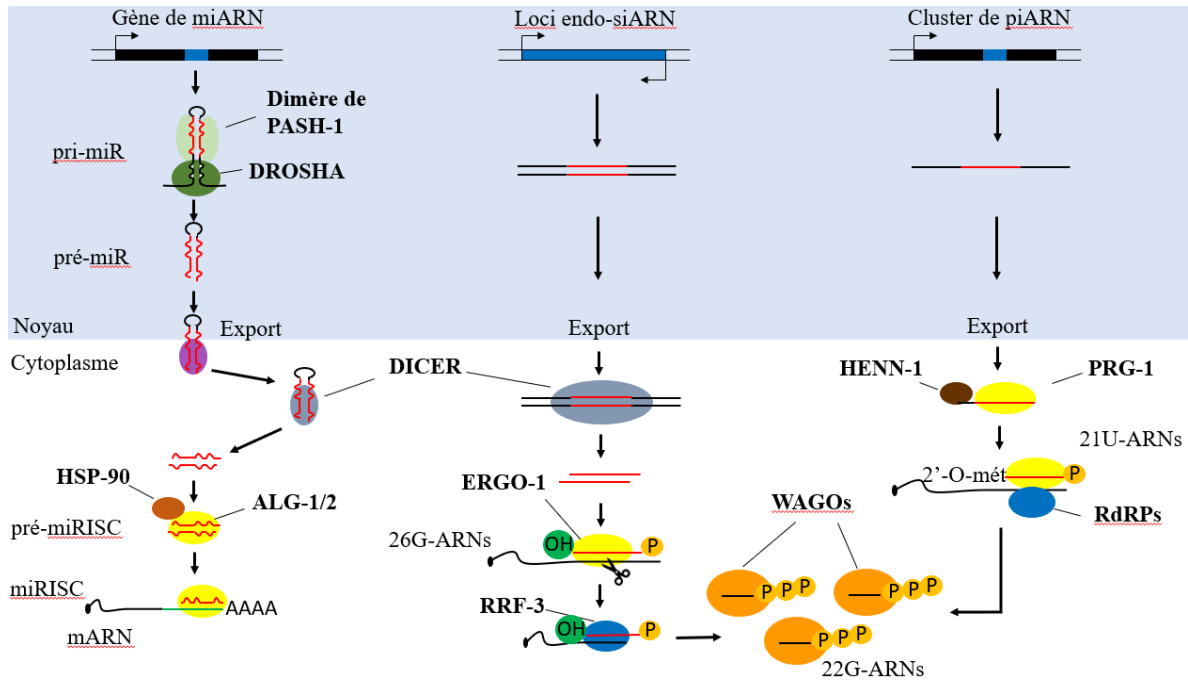


Figure 6 : Résumé graphique des voies de biogénèse des ARN courts non codants chez *C. elegans*

1.1.6. Remerciements

Nous tenons à remercier les membres du groupe de recherche pour leurs commentaires et suggestions. Ce travail a été supporté par le soutien financier du Conseil de recherches en sciences naturelles et génie du Canada et des Instituts de recherche en santé du Canada. M.J.S. est récipiendaire d'une chaire de recherche des Fonds de recherche du Québec-Santé. Restreints dans le nombre de références, nous nous excusons auprès de tous ceux et celles que nous n'avons pas cité.

1.1.7. Liens d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

1.1.8. Summary

1.1.9. Biogenesis of small non-coding RNAs in animals

In recent years, the discovery of small non-coding RNAs has opened an all new field in molecular biology. Indeed, these non-coding sequences give rise to powerful regulators of gene expression. Nowadays, different types of small non-coding RNAs have been described. Of these, the best-characterized types are microRNAs, piRNAs (Piwi-interacting RNAs) and siRNAs (small interfering RNAs). Because of their fine-tuning function important in the regulation of gene and genome expression, an aberrant expression level of those small non-coding RNAs are associated to several pathologies. While this new research field is attracting attention, many aspects of the biology of those small non-coding RNAs remain to be discovered. This review focuses on the biogenesis pathways of microRNAs, piRNAs and siRNAs in animals.

1.2. Le mode d'action des courts ARN non codants

Les miARN, les siARN et les piARN présentent des différences dans leur voie de biogénèse ainsi que dans leur mode de régulation et dans les voies biologiques dans lesquelles ils interviennent. Cependant, la communauté scientifique commence à réaliser que, malgré toutes ces divergences, les actions de ces courts ARN non codants sont interconnectées. Ils entrent en compétition et collaborent afin de réguler l'expression des gènes et de protéger efficacement le génome de menaces externes et internes.

1.2.1 Le mode d'action des miARN

Afin de pouvoir réguler l'expression des gènes, le corps minimal du miRISC, composé du miARN mature et de la protéine Argonaute, va s'associer à la protéine GW182. Les protéines GW182 se caractérisent par des séquences riches en répétition glycine (G) et tryptophane (W) dans leurs régions N-terminales, qui leur permettent de s'associer aux protéines Argonautes (Takimoto et al. 2009; Lian et al. 2009). Une perte de fonction de ces protéines abolit l'activité de répression des miARNs (Rehwinkel et al. 2005; Liu et al. 2005; Ding et al. 2005). L'implication des protéines GW182 dans le mécanisme de répression des gènes est conservée de *C. elegans* en passant par *D. melanogaster* jusqu'à l'Homme. Chez les

mammifères, il existe trois paralogues de GW182, appelés TNRC6A/B/C alors que le génome de *C. elegans*, lui, code pour deux protéines, AIN-1/2, et le génome de *D. melanogaster* ne contient qu'un seul membre, GW182 (Eulalio et al. 2009).

1.2.1.1 Reconnaissance de la cible

Une fois le miRISC formé, il va pouvoir reconnaître et s'associer spécifiquement à certains ARNm afin de réguler leur traduction. Dans cette étape, chaque composant du miRISC joue un rôle bien précis. Le miARN, par complémentarité de séquences, reconnaît les ARNm à cibler tandis que la protéine Argonaute, aidée de la protéine GW182, recrute divers facteurs responsables de la régulation de la traduction.

Initialement, le miRISC doit être recruté au niveau des ARNm. Un ancien membre du laboratoire, Guillaume Jannot, a démontré que le miRISC, aussi bien chez les mammifères que chez *C. elegans*, interagit avec RACK1 (RACK-1 chez *C. elegans*) (Jannot et al. 2011), un composant du ribosome. RACK-1, essentielle au mécanisme de répression, pourrait être à l'origine du recrutement du miRISC au niveau du site actif de traduction (Jannot et al. 2011).

Chez la plante, une fois que le miRISC est recruté au niveau des ARNm, il reconnaît sa cible par complémentarité parfaite de séquences et la clive alors que chez les animaux, une association par complémentarité imparfaite aux ARNm empêche leur clivage. Seulement les nucléotides 2 à 8 dans la région 5' du miARN, formant la séquence « seed », interagissent avec la région 3' non codante des ARNm (3' UTR) (Lewis et al. 2003; Brennecke et al. 2005; Doench and Sharp 2004). Cette séquence « seed » est conservée au cours de l'évolution, soulignant ainsi son importance biologique (Lewis et al. 2005). Du fait de sa petite taille, une même séquence « seed » peut réguler des centaines de gènes différents (Brennecke et al. 2005). Il existe également différents miARN qui présentent la même séquence « seed ». Ceux-ci sont regroupés en famille et ont le potentiel de réguler les mêmes cibles (Bartel 2009) (Figure 7).

Alors que la séquence « seed » dans la région 5' du miARN représente le déterminant le plus important pour la liaison à l'ARNm cible, il s'avère que la région 3' du miARN peut moduler la stabilité de cette interaction (Brennecke et al. 2005; Doench and Sharp 2004). Par exemple, un mésappariement de la séquence « seed » avec un ARNm peut être compensé par l'interaction d'une séquence en 3' du miARN avec la cible (Grimson et al. 2007). De plus, des travaux ont montré que l'enrichissement des séquences adjacentes en nucléotides A (adénine) et U (uracile), aux sites de miARN actifs, est un phénomène important qui pourrait influencer la reconnaissance de l'ARNm (Grimson et al. 2007) (Figure 7).

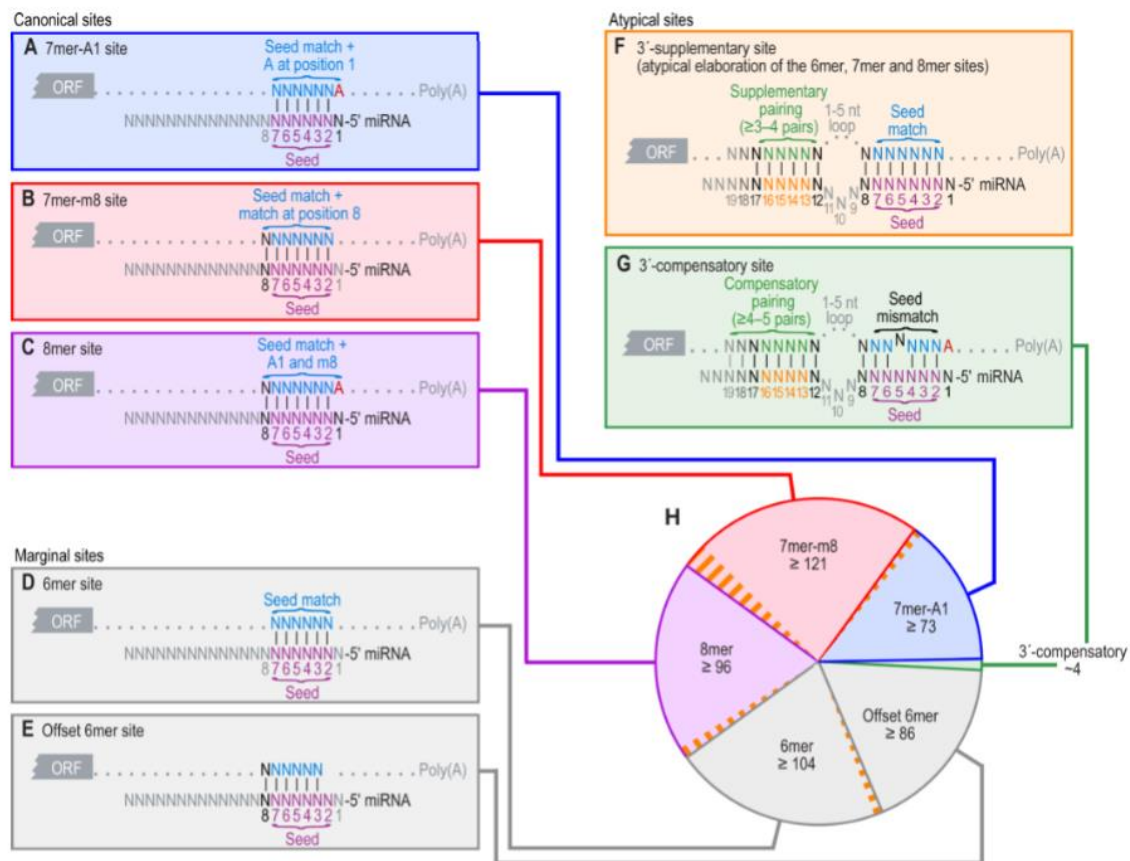


Figure 7 : Types de site de reconnaissance des miARN

A-B-C : Les sites de reconnaissance canoniques des miARN reposent sur l'interaction des nucléotides 2- 8 du miARN, formant la séquence seed, avec la cible. **D-E** : Les sites de reconnaissance marginaux correspondent aux sites où seulement 6 nucléotides de la séquence « seed » interagissent avec la cible. **F-G** : Les sites de reconnaissance atypiques sont caractérisés par une forte interaction dans la région 3' du microARN qui permet de compenser l'interaction avec la séquence « seed » qui dans ces cas-là n'est pas suffisante. **H** : Représentation de la répartition des

différents types de site de reconnaissance des miARNs chez les mammifères. Figure tirée de *Cell* (Bartel 2009).

Une région 3' UTR d'un ARNm peut présenter plusieurs sites de reconnaissance des miARN et ainsi être régulée par différents miARN simultanément (Doench and Sharp 2004). Une étude récente, chez *C. elegans*, a montré qu'un site de miARN non canonique, présentant un mésappariement avec la séquence « seed », lorsqu'il était voisin d'un site de miARN canonique, pouvait recruter un miRISC. Le site voisin de miARN canonique est ciblé par un miRISC. Ce dernier va pouvoir alors recruter et s'associer à un autre miRISC qui va ainsi pouvoir cibler le site de miARN non canonique. Cette coopération entre les miRISC est nécessaire à la répression des ARNm cibles par les miARN (Flamand et al. 2017).

Chez l'humain et chez *C. elegans*, parfois les miARN doivent collaborer ou alors entrer en compétition avec d'autres protéines qui lient la région 3' non codante des ARNm. C'est le cas pour les protéines PUF et HuR qui peuvent influencer l'action des miARN (Galgano et al. 2008; Adams et al. 2014).

1.2.1.2 Protéines recrutées par le miRISC

Une fois que le miARN s'est associé à sa cible, la protéine GW182 va servir de plateforme et recruter divers facteurs responsables de bloquer la traduction et/ou dégrader les ARNm.

1.2.1.2.1 PABP (Poly Adenosine Binding Protein)

L'un des mécanismes de répression de l'expression des ARNm, utilisé par le miARN, est la déadénylation des ARNm cibles. Ce mécanisme permet de déstabiliser et de rendre les ARNm sensibles à la dégradation via une exonucléase 5'-3' (XRN-1). Les protéines PABP sont requises pour médier ce mécanisme de déadénylation (Flamand et al. 2016; Zekri et al. 2009). Le domaine C-terminal de la protéine GW182, aussi appelé PAM2 (PABP-interacting motif 2), se lie directement à PABP (Fabian et al. 2009; Huntzinger et al. 2010). Cette interaction est conservée au cours de l'évolution malgré que chez *C. elegans*, AIN-1 ne possède pas de domaine PAM2 (Kuzuoğlu-Öztürk et al. 2012).

A l'origine, les PABP sont connues pour lier la queue poly-A des ARNm afin de réguler leur traduction. Ces protéines, en se liant à eIF4G (facteur d'initiation de la traduction) et PAIP1 (PABP-interacting protein 1), permettent de circulariser l'ARNm afin de stimuler sa traduction (Fabian and Sonenberg 2012). Le modèle accepté aujourd'hui, concernant le rôle de PABP dans la voie des miARN, suggère que GW182 entre en compétition avec eIF4G pour lier PABP (Fabian et al. 2009). Ceci empêche alors l'initiation de la traduction de l'ARNm et permet de former une boucle avec la queue poly-A, rendant l'extrémité 5' additionnée d'une coiffe ainsi que la queue poly-A des ARNm accessibles aux enzymes de dégradation (Flamand et al. 2016; Zekri et al. 2009). Malgré que la protéine PABP soit essentielle pour réprimer les ARNm par la voie des miARN chez l'Homme, la souris et *C. elegans*, son rôle n'est pas nécessaire chez le poisson zèbre (Mishima et al. 2012) et la drosophile (Fukaya and Tomari 2011). La protéine PABP étant la protéine reconnue par GW182 pour bloquer l'initiation de la traduction, l'étude de la répression des ARNm dans des modèles animaux où PABP n'est pas indispensable est alors plus complexe (Figure 8).

1.2.1.2.2 CCR4-NOT et PAN2-PAN3

Les miARN recrutent aussi d'autres complexes de déadénylation tels que CCR4-NOT (*Carbon Catabolite Repression 4 – Negative on Tata less*) et PAN2-PAN3 (*Poly A Nuclease*) (Behm-Ansmant et al. 2006; Chen et al. 2009; Piao et al. 2010). L'intervention de ces enzymes dans le processus de déadénylation est un mécanisme conservé au cours de l'évolution (Braun et al. 2011; Kuzuoğlu-Öztürk et al. 2012).

Chez l'Homme et la drosophile, il a été montré que le domaine C-terminal de GW182 interagit directement avec la sous-unité NOT1 du complexe CCR4-NOT et la sous-unité PAN3 du complexe PAN2-PAN3 (Braun et al. 2011; Fabian et al. 2011). En effet, les protéines GW182 seraient des co-activatrices de déadénylation facilitant la dégradation de la queue poly A en activant le complexe CCR4-NOT chez l'humain (Fabian et al. 2011). Mais le plus souvent, le complexe PAN2-PAN3, n'étant pas nécessaire à la déadénylation, interagit indirectement avec GW182 via les PABP (Chekulaeva et al. 2011; Fabian et al. 2011). Chez *C. elegans*, AIN-1 (et non AIN-2) interagit avec NOT1, NOT2 et PAN3 validant son implication en tant que plateforme de machineries de déadénylation (Kuzuoğlu-Öztürk et al.

2012). AIN-2 est une protéine importante pour la fonction du miRISC (Zhang et al. 2007) mais son rôle en tant que protéine GW n'est toujours pas clair. (Figure 8).

1.2.1.2.3 Enlèvement de la coiffe des ARNm

La dégradation des ARNm qui est médiée par les protéines GW182 nécessite, au préalable, l'action de déadénylases mais aussi l'action de protéines qui enlèvent la coiffe des ARNm, tel que le complexe DCP1:DCP2 (Behm-Ansmant et al. 2006). Pendant longtemps, la communauté scientifique ne savait pas si le mécanisme de déadénylation était requis pour permettre l'enlèvement de la coiffe. En 2013, il a été montré que les facteurs d'activation du clivage de la coiffe tels que DCP1, Me31B et HPat, sont recrutés au miRISC, indépendamment de la déadénylation, pour permettre la dégradation des ARNm cibles (Nishihara et al. 2013). Ce mécanisme, contrairement à la déadénylation, est irréversible et permet donc d'accélérer la répression des ARNm cibles par les miARN (Figure 8).

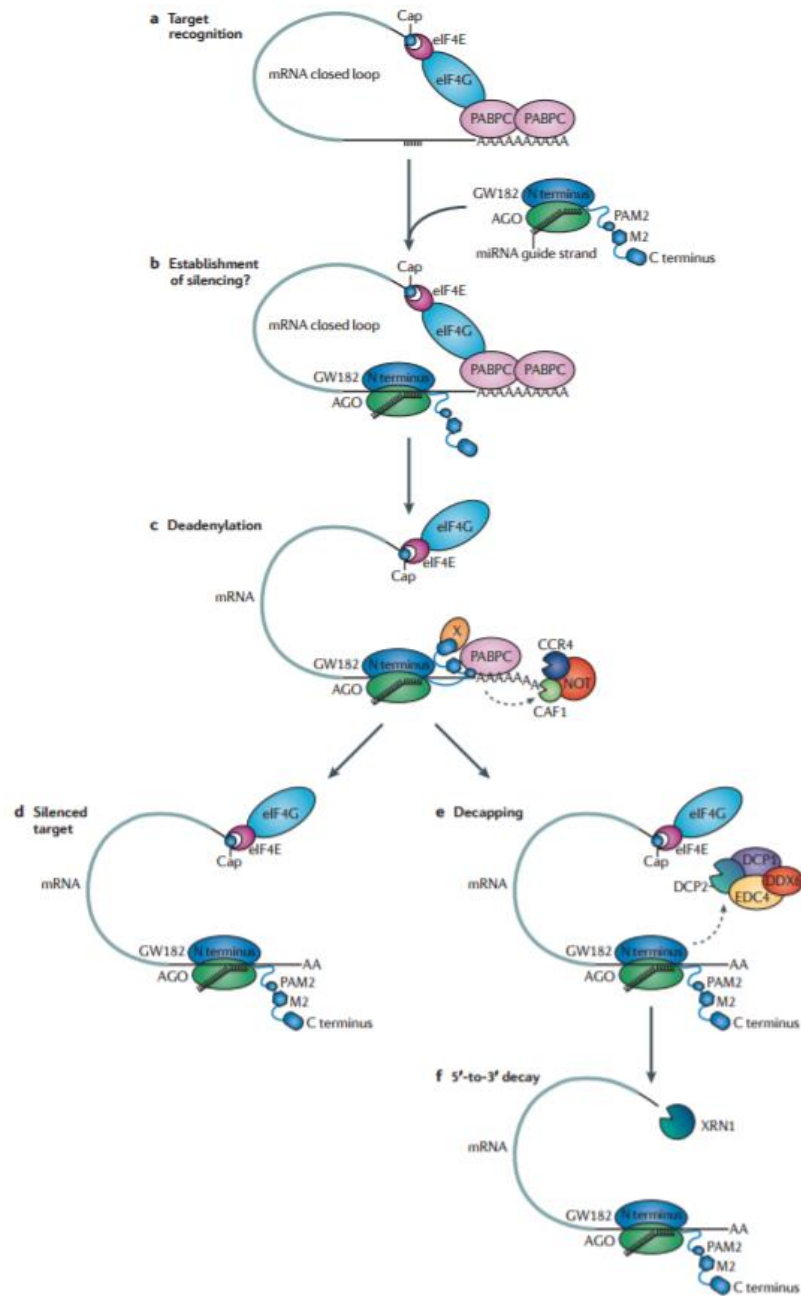


Figure 8 : Inhibition de l'initiation de la traduction par les miARN

a. Circularisation de l'ARNm due à l'interaction entre eIF4G et la protéine PABP. Cette interaction permet la traduction de l'ARNm coiffé en recrutant eIF4E à l'extrémité 5' de l'ARNm. **b.** Le miRISC reconnaît et lie la séquence 3' UTR de l'ARNm cible. **c.** La protéine GW182 se lie directement ou via une autre protéine (X) à la protéine PABP empêchant ainsi la liaison de cette dernière à eIF4G ce qui inhibe la traduction. Il y a alors recrutement des déadénylases CCR4 et CAF1. La queue poly(A) est alors séquestrée au voisinage de CCR4 et CAF1 qui vont pouvoir déadényler l'ARNm. **d.** Selon le type cellulaire et la cible, les ARNm déadénylés peuvent être stockés dans un état de traduction réprimée. **e.** Les ARNm déadénylés sont ensuite décoiffés par des

enzymes de décoiffage telles que DCP1. f. Les ARNm sont finalement dégradés par l'exonucléase 5' vers 3', XRN1. Figure tirée de *Nature Reviews Genetics* (Huntzinger and Izaurralde 2011).

1.2.1.3 Mécanismes de régulation de la cible

Les miARN peuvent réguler l'expression des gènes à l'aide de deux mécanismes post-transcriptionnels différents : la répression de la traduction ou la dégradation de l'ARNm cible (Bartel 2004). Ce choix dépend principalement du type de miRISC présent. En effet, il a été montré que, chez la drosophile, en absence de la protéine GW182, remplacée par Loqs-PB (*Loquacious*), le miARN entraîne plutôt une inhibition de la traduction et non une dégradation de la cible (Wu et al. 2013). Ces deux mécanismes peuvent cependant collaborer pour atteindre une répression maximale des cibles de miARN (Bagga et al. 2005; Ding and Großhans 2009).

1.2.1.3.1 Inhibition de l'initiation de la traduction

Dès la découverte des miARN, il a été proposé que lin-4 réprimait la traduction de sa cible, lin-14, plutôt que de la dégrader directement (Wightman et al. 1993). Depuis, il est accepté que l'un des mécanismes de répression des ARNm utilisé est l'inhibition de la traduction (Pillai et al. 2005).

La répression de la traduction tolère une complémentarité de séquences imparfaite entre la cible et le court ARN non codant. Cependant, lorsqu'un court ARN non codant lie parfaitement sa cible, il est en mesure de la cliver (Bartel 2004).

Les miARN, chez les métazoaires, présentant des mésappariements avec leurs cibles, sont donc plus sujets à réprimer la traduction de leurs cibles. Quant aux miARN présents chez la plante, ils se lient avec une complémentarité parfaite avec leurs cibles et peuvent donc directement les cliver (Rhoades et al. 2002). Cependant, chez l'Homme, à l'instar de la situation chez la plante, il a été montré que, parfois, le miARN peut lier avec une complémentarité parfaite sa cible. Dans ce cas-là, la protéine AGO2 est l'enzyme responsable du clivage de l'ARNm cible (Meister et al. 2004). La protéine AGO3 possède, tout comme la protéine AGO2, un site catalytique mais il s'avère qu'aucune activité de clivage ne lui

avait été attribuée jusqu'à récemment. En effet, une étude a démontré que la protéine AGO3, chez l'Homme, possède également une activité de clivage qui est dépendante du miARN qu'elle lie (Park et al. 2017). Dans ce cas-là, l'activation de l'activité de clivage est indépendante de la complémentarité parfaite entre le miARN et sa cible, ce qui diffère du mécanisme de clivage de la protéine AGO2.

Comme expliqué auparavant, la machinerie des miARN entre en compétition avec la formation du complexe d'initiation de la traduction eIF4E pour bloquer l'initiation de la traduction (Fabian et al. 2009) (Figure 9). D'autres analyses ont mis en évidence que le facteur d'initiation eIF4A2, qui interagit avec le complexe CCR4-NOT, est nécessaire pour réprimer la traduction (Meijer et al. 2013). Sa présence au niveau de l'ARNm bloque l'initiation de la traduction et permet au miARN de déstabiliser sa cible.

1.2.1.3.2 Inhibition après l'initiation de la traduction

Après la découverte du rôle de répression de l'initiation de la traduction du miARN lin-4 sur sa cible lin-14, des études de profil de sédimentation polysomal sur lin-14 ont révélé que le profil de cet ARNm ne diffère pas selon que le miARN lin-4 est exprimé ou non (Olsen and Ambros 1999). Ceci suggère que la traduction de l'ARNm de lin-14 est réprimée à une étape ultérieure à l'initiation. Deux possibilités peuvent expliquer ce phénomène. La première serait que les miARN entraînent une dissociation précoce des polysomes et ainsi inhibent l'élongation de la traduction (Petersen et al. 2006). La seconde serait que le peptide naissant est directement dégradé par le miARN comme dans le cas du miARN let-7 qui régule c-Myc. Dans ce cas-là, un peptide naissant de c-Myc est détectable mais pas le peptide pleine longueur (Nottrott et al. 2006) (Figure 9).

1.2.1.3.3 Dégradation de l'ARNm

En 2005, une nouvelle étude est venue contredire celle effectuée en 1993 qui suggérait que les miARN répriment la traduction de leurs cibles (Wightman et al. 1993; Bagga et al. 2005). En effet, il a été montré que les miARN let-7 et lin-4 sont capables de cibler pour la dégradation leurs ARNm cibles malgré une complémentarité de séquence imparfaite (Behm-Ansmant et al. 2006; Bagga et al. 2005).

Comme détaillé préalablement, que ce soit chez le poisson-zèbre, la drosophile ou l'Homme, les miARN, grâce à leur interaction avec la protéine GW182, accélèrent la déadénylation et le clivage de la coiffe pour déstabiliser l'ARNm, le rendant ainsi vulnérable à la dégradation par XRN-1 (Rehwinkel et al. 2005; Giraldez 2006; Wu et al. 2006; Chen et al. 2009; Behm-Ansmant et al. 2006) (Figure 9). L'hypothèse serait donc que GW182 est impliquée dans la dégradation de l'ARNm et en son absence les miARN procèdent différemment à la répression des gènes. Récemment, il a été montré qu'il existe un complexe miRISC, exprimé pendant l'embryogénèse chez *C. elegans*, qui est dépourvu de protéines GW182 mais qui pourtant est tout de même capable de réprimer les ARNm cibles (Jannot et al. 2016). L'éclaircissement du mécanisme de répression des ARNm cibles utilisé dans ce contexte ci pourrait permettre d'étoffer l'hypothèse établie ci-dessus.

De manière intéressante, dans l'embryon de *C. elegans*, les ARNm cibles qui sont déadénylés ne sont pas dégradés mais stabilisés par un mécanisme encore inconnu (Wu et al. 2010). Ce découplage entre la déadénylation et la dégradation de la cible serait essentiel pour protéger les ARNm maternels d'une dégradation précoce.

Des études du transcriptome à grande échelle ont démontré que les miARN stimulent principalement la déstabilisation et la dégradation des ARNm cibles au détriment de la répression de la traduction qui à elle seule n'est pas suffisante pour entraîner une répression génique efficace (Baek et al. 2008; Eichhorn et al. 2014; Guo et al. 2010). En conclusion, même si la déstabilisation et la dégradation de la cible semblent être les mécanismes de répression génique majeurs, les miARN peuvent utiliser plusieurs moyens pour réguler l'expression des gènes qui diffèrent suivant le contexte et le type cellulaire.

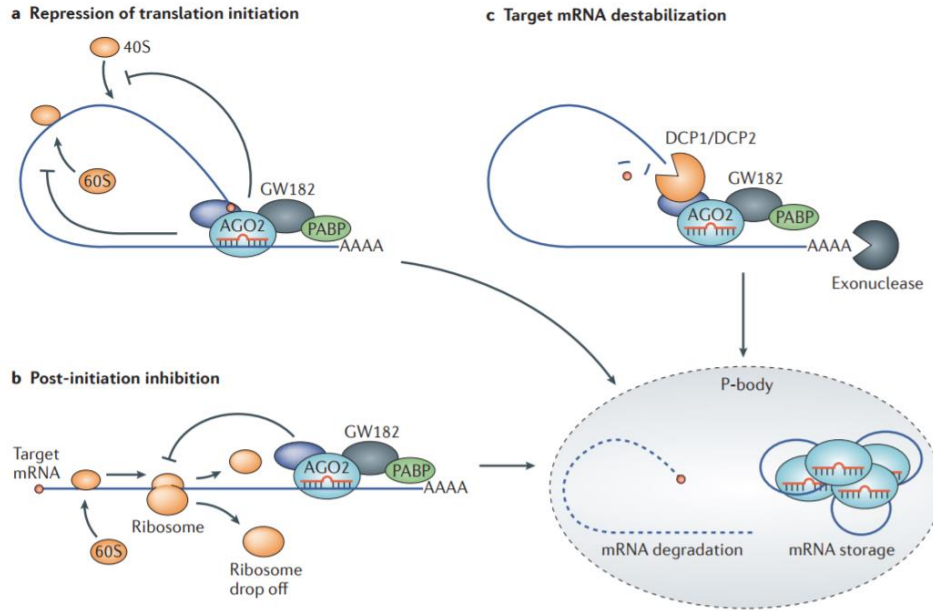


Figure 9 : Trois mécanismes utilisés par les miARN pour réprimer l'expression des gènes

a. Répression de l'initiation de la traduction. Les miARN inhibent l'initiation de la traduction en affectant la liaison de eIF4E à la coiffe de l'ARNm. Ceci permet d'inhiber le recrutement de la sous unité 40S du ribosome et/ou d'inhiber l'incorporation de la sous unité 60S empêchant ainsi la formation du complexe ribosomal 80S. Quelques ARNm associés au miRISC sont stockés dans les « P-bodies » (processing bodies) en attendant que des signaux exogènes, tels que le stress, favorisent à nouveau leur traduction. **b.** Répression après l'initiation de la traduction. Les miRISC peuvent inhiber l'élongation de la traduction causant leur décrochage de l'ARNm et/ou facilite la dégradation du peptide nouvellement synthétisé. **c.** Destabilisation des ARNm cibles. La liaison du miRISC à sa cible entraîne le recrutement des enzymes de décoiffage et/ou des déadénylases conduisant à la destabilisation de l'ARNm. Les « P-bodies » sont des organelles où les ARNm sont dégradés et stockés. Figure tirée de la revue (Li and Rana 2014).

1.2.2 Le mode d'action des piARN

Les éléments transposables, classifiés en transposons ADN et en rétrotransposons, se propagent dans le génome grâce à l'activité de la transposase. Pour cela, les transposons ADN utilisent le mécanisme de « copier-coller » alors que les rétrotransposons se propagent par une réaction de transcription inverse. Dans les deux cas, le transposon doit être transcrit en ARNm puisqu'il code pour la transposase utile à sa transposition dans le génome (Tóth et al. 2016). Le mode d'action des piARN est un mécanisme peu connu excepté chez la drosophile. Chez les animaux, les piARN agissent à deux niveaux pour limiter l'activité des éléments transposables dans la lignée germinale. Les piARN peuvent cliver directement les éléments

transposables dans le cytoplasme ou réprimer leur transcription en régulant la structure de la chromatine (Tóth et al. 2016).

1.2.2.1 La fonction cytoplasmique des piARN

Chez la drosophile, la répression cytoplasmique des éléments transposables est attribuable à l'action de deux protéines PIWI, AUB et AGO3, qui sont impliquées dans le cycle d'amplification ping-pong (Brennecke et al. 2007) (Figure 4). Premièrement, les piARN primaires antisens, dérivés de transcrits d'éléments transposables, s'associent à AUB et partent à la recherche d'une séquence complémentaire. Une fois un élément transposable identifié, il sera clivé par AUB, 10 nucléotides en amont de l'extrémité 5' du piARN (Brennecke et al. 2007) (Figure 10). Ce clivage permettra, dans un premier temps, de détruire le transcrit d'un élément transposable puis, dans un deuxième temps, de générer un piARN secondaire sens. Ce dernier est pris en charge par AGO3 qui, une fois une séquence complémentaire reconnue, va pouvoir la cliver (Brennecke et al. 2007). Le mécanisme précis concernant la coordination des protéines AUB et AGO3 dans le cycle d'amplification ping-pong n'est toujours pas élucidé, ni le rôle exact des protéines à domaine Tudor dans ce cycle ping-pong.

Chez *C. elegans*, les piARN s'associent à leurs cibles avec une complémentarité imparfaite (maximum de 4 mésappariements) afin que l'Argonaute PRG-1 puisse cliver en *trans* l'élément transposable cible (Bagijn et al. 2012) (Figure 10). De ce fait, les piARN peuvent cibler des gènes codant pour une protéine et les réprimer. L'importance biologique de ce phénomène est peu comprise. Chez la drosophile, les piARN régulent l'expression de gènes codants pour une protéine afin de favoriser le développement embryonnaire (Rouget et al. 2010).

Le mécanisme de cycle d'amplification ping-pong permettant la répression d'éléments transposables par clivage de la cible est conservé chez les mammifères (Aravin et al. 2007). Chez la souris, les piARN sont exprimés en deux phases lors du développement des cellules germinales mâles : les piARN pré-pachytènes et les piARN pachytènes. Les piARN pré-pachytènes sont enrichis dans les séquences de transposons et s'associent à MIWI2 et/ou

MILI pour permettre la méthylation de l'ADN alors que les piARN pachytènes viennent des régions intergéniques non-transposons. Il a été montré, récemment, que ces derniers forment un complexe avec MIWI et la déadénylase CAF1 dans le but de déadényler les ARNm et d'induire leur dégradation (Gou et al. 2014). Ce mécanisme, qui ressemble à celui utilisé par les miARN, permet l'inactivation de vastes programmes cellulaires dans le but de favoriser la production de sperme (Gou et al. 2014; Zhang et al. 2015). La fonction cytoplasmique principale des piARNs est donc de cliver leurs cibles même si parfois ils entraînent l'inhibition de la traduction de ces dernières.

1.2.2.2 La fonction nucléaire des piARN

Chez la drosophile et la souris, une protéine PIWI, PIWI et MIWI2 respectivement, est localisée au noyau suggérant un rôle nucléaire pour la voie des piARN (Aravin et al. 2008). Chez la souris, la méthylation de l'ADN dans les régions régulatrices des éléments transposables entraîne la répression de ces derniers. MIWI2, la protéine majeure du piRISC, est exprimée dans le noyau à un temps précis du développement qui correspond à la méthylation de l'ADN dans les spermatocytes (Aravin et al. 2008). La protéine Argonaute MILI, qui est exprimée dans le cytoplasme, est nécessaire à la localisation de MIWI2 au noyau (Aravin et al. 2008). Il a été montré que la perte de fonction de MIWI2 ou MILI entraîne des défauts chez la souris qui correspondent à ceux observés lorsque DNMT3L, un facteur nécessaire pour la synthèse *de novo* d'ADN méthylé, est absent des cellules de l'animal (Kuramochi-Miyagawa et al. 2008). De plus, chez les souris déficientes en MIWI2 ou MILI, le patron de méthylation sur les séquences de rétrotransposon n'est pas rétabli et le niveau d'expression des piARN est diminué (Kuramochi-Miyagawa et al. 2008). Ceci suggère donc que les piARN, chez la souris, fonctionnent en amont de la machinerie de méthylation. Du fait de la rareté du processus de méthylation de l'ADN pendant l'embryogénèse, le mécanisme d'action précis des piARN a été peu exploré. Il reste à déterminer si les piARN s'associent à la chromatine ou bien encore aux méthyltransférases à ADN (Figure 10).

Chez la drosophile, la répression transcriptionnelle des éléments transposables est initiée par la déposition de marques répressives d'histones. Il a été montré que la délétion de la partie

N-terminale de PIWI entraîne sa délocalisation du noyau et ainsi, une augmentation des marques actives d'histones (di-méthylation sur H3K9 et H3K4) au détriment des marques répressives d'histones (di ou tri-méthylation sur H3K9) sur plusieurs transposons (Klenov et al. 2007). Une étude récente a confirmé l'implication des piARN au niveau de la répression transcriptionnelle des transposons. En effet, des cellules ou animaux déficients en PIWI induisent une dérégulation transcriptionnelle des transposons qui corrèle avec une augmentation de l'occupation de leurs promoteurs par la polymérase II (Le Thomas et al. 2013) (Figure 10).

Récemment, il a été montré que la protéine Maelstrom (MAEL) est impliquée dans la répression transcriptionnelle des éléments transposables aussi bien chez la souris que la drosophile (Soper et al. 2008; Sienski et al. 2012). En effet, des drosophiles déficientes en MAEL, présentent une augmentation de l'occupation des promoteurs de transposons par l'ARN polymérase II. Mais cette protéine n'a aucune action au niveau de l'établissement de marques répressives d'histones (Sienski et al. 2012). La protéine Asterix (CG3893), quant à elle, a été identifiée comme étant un facteur requis pour l'établissement de marques répressives d'histones sur certains éléments transposables (Muerdter et al. 2013).

1.2.3 Le mode d'action des siARN

Le mode d'action des siARN endogènes ressemble fortement à celui des piARN et tout comme ces derniers, les siARN ciblent des éléments transposables. Ils agissent à deux niveaux pour réprimer l'expression des gènes : clivage de la cible directement ou régulation de la chromatine (Aalto and Pasquinelli 2012) (Figure 10). Récemment, il a été montré que les siARN pouvaient également intervenir dans la réparation des cassures double brins de l'ADN (Wei et al. 2012; Gao et al. 2014).

1.2.3.1 Clivage de la cible

Le siARN se lie avec une complémentarité parfaite avec son ARNm cible pour que le RISC puisse par la suite le cliver. Chez les mammifères, la protéine AGO2, en particulier son domaine PIWI, est la protéine majoritaire de clivage des ARNm (Liu et al. 2004) (Figure 10). Ce mécanisme requiert du magnésium pour cliver la cible précisément entre les nucléotides

10 et 11 en amont de l'extrémité 5' du siARN (Tomari and Zamore 2005). Contrairement à la voie des miARN, les ARNm ciblés par les siARN ne sont pas dégradés par les mécanismes de déadénylation et de décoiffage. Ainsi, chez la drosophile, il a été montré que le fragment 5' de la cible est ensuite dégradé par les exosomes alors que le fragment 3', lui, est dégradé par XRN1 (Orban and Izaurralde 2005). Le RISC ainsi libéré peut reprendre en charge d'autres ARNm cibles.

Des mésappariements présents au centre du duplex siARN/cible empêchent le clivage endonucléolytique (Tomari and Zamore 2005). Cependant, certaines cibles qui sont partiellement complémentaires aux siARN peuvent tout de même être réprimées de la même manière qu'elles le seraient par un miARN, soit via la répression de la traduction ou la dégradation exonucléolytique. L'étendue et l'importance de ce phénomène sont encore très peu connues.

1.2.3.2 Régulation de la structure de la chromatine

Le rôle des siARN dans la régulation de la structure de la chromatine a été découvert chez *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*). Il a été montré que la délétion des protéines Argonautes, Dicer et les RdRP entraîne la réduction de la marque répressive d'histone (H3mK9), un dysfonctionnement de la fonction des centromères et une dé-répression transcriptionnelle des transgènes intégrés au centromère (Volpe et al. 2002). Le complexe effecteur de ce mécanisme, appelé RITS (*RNAi-induced transcriptional gene silencing*), est constitué d'un siARN homologue aux séquences répétées centromériques, d'une protéine Argonaute (Ago1), une protéine à chromodomaine Chp1 et de Tas3 (fonction inconnue) (Verdel et al. 2004). Le mécanisme d'action de la modification des marques d'histones par RITS sur la chromatine reste encore inconnu (Figure 10). Les siARN jouent aussi un rôle dans la formation de l'hétérochromatine chez les animaux. Chez la drosophile, la mutation des protéines AUB et PIWI entraîne une perte de H3mK9 et donc influence la formation de l'hétérochromatine (Fagegaltier et al. 2009; Pal-Bhadra et al. 2004) (Figure 10).

Chez les mammifères, il a été suggéré que l'introduction artificielle de siARN pouvait induire la méthylation H3K9 (Weinberg et al. 2006; Kim et al. 2006). D'autres études ont même

montré que les siARN peuvent inhiber la transcription du gène tout en méthylant l'ADN de la séquence ciblée (Morris et al. 2004; Hawkins et al. 2009). En revanche, il reste encore à confirmer ces observations et à déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle médiée par les siARN chez les mammifères.

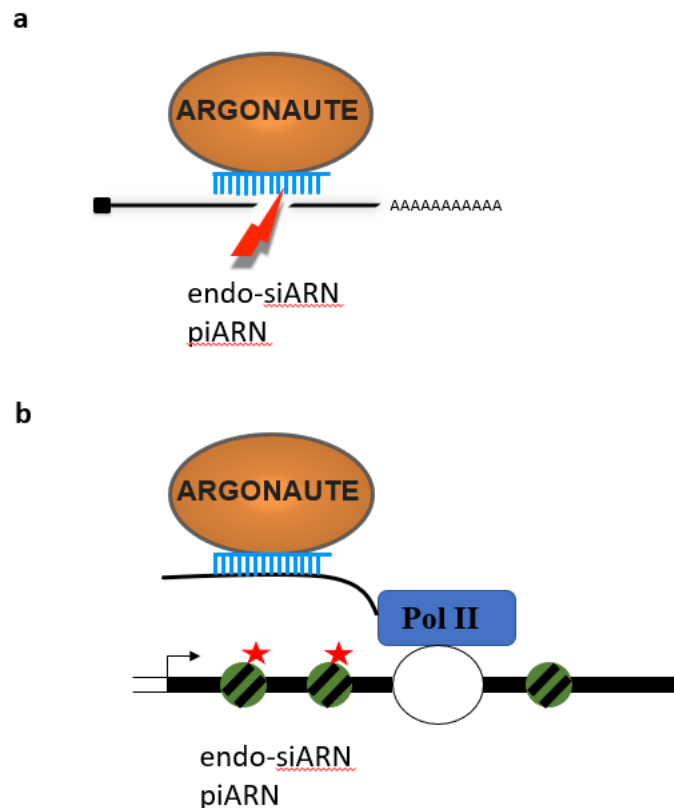


Figure 10 : Mécanismes utilisés par les piARN et les siARN pour réprimer l'expression des gènes

a. Une complémentarité parfaite entre un court ARN non codant et sa cible entraîne un clivage de cette dernière qui est médié par certaines protéines Argonautes. **b.** Les endo-siARN et les piARN entraînent des modifications d'histones et de l'ADN (étoiles rouges) qui permettent de réguler l'expression des transposons au niveau transcriptionnel.

1.2.3.3 Régulation de la réparation des cassures double brins de l'ADN

L'existence de diARN (*DNA DSB-derived siRNA*), qui sont des siARN produits à partir des séquences environnantes de sites de cassure double brin de l'ADN (DSB), a été mise en évidence dans des cellules humaines et chez la drosophile (Wei et al. 2012; Michalik et al.

2012). De manière intéressante, l'inhibition de Dicer ou d'AGO2 affecte la réparation des cassures double brins ce qui suggère que ces courts ARN sont requis pour le processus de réparation de ces cassures (Wei et al. 2012). Les auteurs proposent que ces courts ARN entraînent des modifications de la chromatine ou recrutent des protéines au site de DSB pour faciliter la réparation de l'ADN (Wei et al. 2012). De plus, une autre étude a montré qu'AGO2 recrute et forme un complexe avec la recombinaise RAD51 facilitant la réparation des cassures double brins de l'ADN par recombinaison homologue (Gao et al. 2014). Cependant, chez la drosophile, il a été montré que lorsque la voie des siARN est affectée, cela n'impacte pas le processus de réparation. Dans ce cas-là, les siARN seraient plutôt impliqués dans le contrôle de la qualité des ARNm (Schmidts et al. 2016).

1.2.4 Le mode d'action des 22G-ARN chez *C. elegans*

Chez *C. elegans*, il a été montré que les 22G-ARN (siARN et piARN secondaires) sont impliqués dans la modification de la structure de la chromatine en ajoutant une marque répressive d'histones (Burkhart et al. 2011). La méthylation de H3K9 requiert la protéine NRDE1 qui se lie au précurseur de l'ARNm et à la chromatine (Burkhart et al. 2011) (Figure 11).

Aussi, les 22G-ARN sont à l'origine de l'héritage transgénérationnel chez *C. elegans*. La protéine Argonaute nucléaire, HRDE-1, se lie aux 22G-ARN et les transporte au noyau afin qu'ils puissent tri-méthyliser H3K9 dans le but de médier la répression transgénérationnelle (Shirayama et al. 2012; Ashe et al. 2012; Buckley et al. 2012). Le mécanisme d'héritage du signal de répression génique, transmis d'une génération à une autre, reste à déterminer. Il a été proposé que ce sont soit des piARN parentaux ou des 22G-ARN ou bien encore la marque d'histone qui puissent être transmis aux embryons (Weick and Miska 2014) (Figure 11).

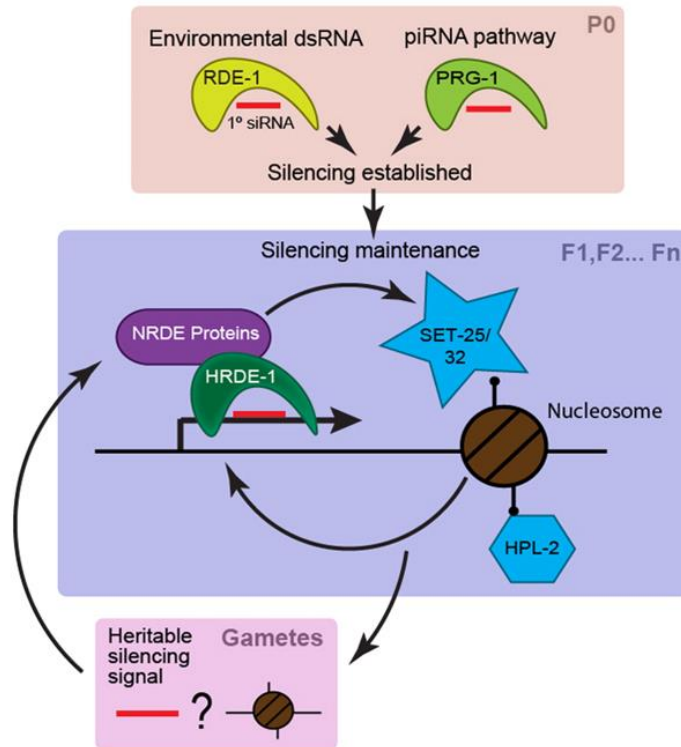


Figure 11 : Modèle de répression transgénérationnelle dans la lignée germinale de *C. elegans*

Les 22G-ARN, provenant de la voie des siARN et de celle des piARN, conduisent à l'établissement d'une voie de régulation nucléaire agissant sur la structure de la chromatine. Cette voie requiert les protéines Argonautes NRDE. Le maintien de la répression d'une génération à une autre requiert des facteurs nucléaires tels que la protéine Argonaute HRDE-1/WAGO-9, des protéines de la chromatine telles que HPL-2 et une méthyltransférase, SET-25/32. Le signal de répression qui est transmis d'une génération à une autre peut l'être par les 22G-ARN ou la marque d'histone. Figure tirée de (Ashe et al. 2012).

1.3. Régulation de la biogénèse des courts ARN

La plupart des courts ARN non codants sont transcrits par l'ARN polymérase de type II (Lee et al. 2004; Weick and Miska 2014). De ce fait, tout comme les gènes codant pour une protéine, l'expression des courts ARN non codants peut être régulée de manière transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle.

1.3.1. Régulation transcriptionnelle des courts ARN

La régulation de la transcription des courts ARN est un mécanisme peu étudié. Mais avec l'utilisation de la technique ChIP-chip (*Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip*), l'identification des promoteurs des courts ARN non codants permet d'apporter un certain niveau de compréhension. La régulation de ces courts ARN diffère selon leur type et le contexte génomique d'où ils proviennent.

Les miARN localisés dans les régions intergéniques et 26% de ceux localisés dans les régions intragéniques utilisent leur propre promoteur (Ozsolak et al. 2008; Corcoran et al. 2009). La transcription de ces miARN sera dépendante des facteurs de transcription. Le reste des miARN, localisés dans les régions intragéniques, partage soit le promoteur de leur gène hôte soit un promoteur indépendant de leur gène hôte (Ozsolak et al. 2008). Dans ce cas-là, la régulation post-transcriptionnelle jouera un rôle clé dans le devenir de chaque transcrit. Il a été montré que l'architecture de la plupart des promoteurs de miARN est semblable à celle des promoteurs de gènes codant pour une protéine (Zhou et al. 2007). De plus, ils sont régulés par des modifications de la structure de la chromatine (Ozsolak et al. 2008). En effet, 10% des miARN sont régulés par la méthylation de l'ADN (Han et al. 2007).

Les facteurs de transcription qui sont dérégulés dans les cellules cancéreuses utilisent les régions promotrices libérées de nucléosomes pour réguler la transcription des miARNs. Dans les mélanomes, le facteur de transcription MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) reconnaît les éléments E-box dans le promoteur de plusieurs miARN afin de réprimer leur expression (Ozsolak et al. 2008). Chez l'Homme, le facteur de transcription oncogénique c-Myc active l'expression du groupe de miARN oncogéniques, miR-17-92 en se liant directement à ses locus (O'Donnell et al. 2005). Il a été montré aussi que l'induction de c-Myc entraîne la diminution de l'expression de nombreux miARN (Chang et al. 2008). En effet, c-Myc se lie directement aux promoteurs de miARN suppresseurs de tumeurs pour réprimer leur transcription (Chang et al. 2008).

Les facteurs de transcription sont aussi responsables de la régulation du patron d'expression temporel et spatial de nombreux miARN. Chez *C. elegans*, la protéine LIN-42 se lie aux

régions régulatrices de plusieurs miARN afin de réguler négativement leur expression (Perales et al. 2014). Cette régulation est plus ou moins importante suivant le stade de développement de l'animal, permettant ainsi une expression temporelle efficace des miARN. Dans les cellules souches embryonnaires de souris, les facteurs de pluripotences, tels que SOX2, OCT4 et NANOG, occupent seulement les régions promotrices des miARN qui sont préférentiellement exprimés dans les cellules souches (Marson et al. 2008).

La régulation transcriptionnelle des piARN reste un mécanisme peu connu. Des études de ChIP ont montré qu'ils sont régulés par la structure de la chromatine. Dans des lignées cellulaires d'ovaires de vers à soie, les groupes de piARN sont caractérisés par des marques actives d'histone permettant la transcription (Kawaoka et al. 2013). En revanche, chez la drosophile, la transcription des groupes de piARNs requiert des marques répressives d'histones (Rangan et al. 2011). La protéine Rhino, membre des protéines HP1 (*heterochromatin protein 1*), se lierait à ces marques répressives d'histones pour favoriser la transcription des piARN (Klattenhoff et al. 2009). De plus, la protéine Rhino forme un complexe avec la protéine Cutoff (Cuff), qui est un homologue de la nucléase 5'-3' Rai1/DXO connue pour participer dans le contrôle de la qualité des ARN et dans la terminaison de la transcription (Jiao et al. 2010, 2013; Kim et al. 2004), qui favoriserait la transcription des piARN (Pane et al. 2011; Mohn et al. 2014).

La régulation de la transcription des siARN endogènes est un domaine de recherche très peu étudié. Ils sont transcrits à partir de séquences codantes pour des protéines, donc il est possible que leur régulation soit similaire à celle de certains miARN.

1.3.2. Régulation post-transcriptionnelle des courts ARN

Le rôle primordial des courts ARN non codants dans la régulation de l'expression des gènes fait que le contrôle de leur expression est un enjeu primordial pour la cellule. C'est pourquoi il existe de nombreux mécanismes permettant de moduler leur biogénèse tels que la régulation post-traductionnelle des protéines majeures des voies de biosynthèse des courts ARN non codants. Il existe aussi plusieurs exemples de protéines qui modulent l'expression des formes intermédiaires des courts ARN non codants.

1.3.2.1. Régulation post-transcriptionnelle des miARN

1.3.2.1.1. Régulation du Microprocesseur

L'efficacité du Microprocesseur est primordiale dans la maturation des miARN, c'est pourquoi son expression et son activité sont finement régulées. Tout d'abord, il existe une boucle d'autorégulation entre Drosha et DGCR8. En effet, DGCR8 stabilise Drosha par une interaction protéine-protéine, tandis que Drosha régule la production de DGCR8 en clivant son ARNm (Han et al. 2009).

Drosha et DGCR8 sont aussi sujettes à différentes modifications post-traductionnelles qui influencent leur localisation et leur activité mais aussi la stabilité du complexe Microprocesseur. Concernant Drosha, sa phosphorylation sur les sérines 300 et 302 par GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) est requise pour sa localisation au noyau (Tang et al. 2010, 2011). L'acétylation de Drosha dans sa portion N-terminale permet d'empêcher sa dégradation par le protéasome et donc d'augmenter sa stabilité (Tang et al. 2013). Concernant la stabilité de DGCR8, celle-ci est augmentée lorsque cette protéine est phosphorylée par ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) (Herbert et al. 2013). DGCR8 peut aussi être déacétylée par HDAC1 (*histone deacetylase 1*) ce qui lui permet d'augmenter son affinité pour les pri-miARN (Wada et al. 2012). Spécifiquement dans les neurones, DGCR8 est séquestrée par la protéine MECP2 (*methyl-CpG-binding protein 2*) jusqu'à ce que cette dernière soit phosphorylée et puisse alors relâcher DGCR8. Ainsi DGCR8 va pouvoir s'associer à Drosha pour rétablir la production des miARN (Cheng et al. 2014) (Figure 12).

1.3.2.1.2. Régulateurs de l'activité du Microprocesseur

De nombreuses protéines interagissant avec les miARN ont été identifiées comme régulant l'activité du Microprocesseur. Parmi ces protéines, on retrouve les hélicases p68 et p72. Il a été montré qu'elles sont requises pour le clivage de plusieurs miARN par Drosha (Fukuda et al. 2007) (Figure 12). Une des fonctions de p68 et p72 est de faire le lien entre le Microprocesseur et d'autres protéines régulatrices telles que p53 et les protéines SMAD (*Mothers Against Decapentaplegic*) afin de réguler la biogénèse de certains miARN. L'association du gène suppresseur de tumeur p53 au complexe Microprocesseur/p68 permet

de stimuler la maturation des miARN, notamment ceux impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire (Suzuki et al. 2009), dans le but de renforcer la fonction de suppression de la croissance tumorale de p53. Quant aux protéines SMAD, elles s'associent au complexe Drosha/DGCR8 via p68 afin d'activer la production de certains miARN (Davis et al. 2008, 2010) (Figure 12). Une autre protéine à activité suppresseur de tumeur, appelée BRCA1 (*breast cancer 1*), est impliquée dans l'activation de la maturation de certains miARN (Kawai and Amano 2012). Elle s'associe soit directement au miARN primaire, soit elle interagit avec Drosha, p68, p53 et Smad3 (une protéine SMAD) afin d'augmenter l'expression de miARN qui présentent des effets suppresseurs de tumeurs tels que let-7, miR-16 et miR-145 (Kawai and Amano 2012).

La protéine TDP43 (*TAR DNA-binding protein 43*) a aussi été montrée comme interagissant avec Drosha. Cette interaction augmente la stabilité de Drosha pendant la différenciation neuronale et régule la production des miARN (Kawahara and Mieda-Sato 2012; Di Carlo et al. 2013) (Figure 12).

1.3.2.1.3. Régulation du miARN primaire

La boucle de terminaison des miARN primaires est une structure conservée au cours de l'évolution. Elle possède des séquences spécifiques qui peuvent être reconnues par plusieurs protéines présentant des domaines de liaison à l'ARN qui peuvent alors réguler la production des miARN. Par exemple, hnRNPA1 (*Heterogenous nuclear RiboNucleoProtein A1*) se lie à la boucle de terminaison de miR-18a et induit un changement de conformation dans ce miARN pour permettre d'activer son clivage par le Microprocesseur (Michlewski et al. 2008; Guil and Cáceres 2007). MiR-18a fait partie du groupe de miARN oncogènes miR-17-92 mais il est le seul à être régulé par hnRNPA1. La raison de cette régulation spécifique reste inconnue. À l'inverse, lorsque hnRNPA1 reconnaît la boucle de terminaison du miARN let-7a-1, cette protéine va entraîner l'inhibition du clivage de ce miARN par le Microprocesseur (Michlewski and Cáceres 2010). Ce rôle de répression serait attribuable au fait que hnRNP entre en compétition avec d'autres protéines stimulant la production des miARN telles que les protéines KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) (Michlewski and Cáceres 2010). Ces dernières sont capables de réguler les miARN primaires et les précurseurs de miARN en

se liant aux séquences riches en résidus G présentes dans la boucle de terminaison (Trabucchi et al. 2009). Ainsi KSRP active le clivage des miARN primaires en favorisant leur interaction avec Drosha, mais aussi active le clivage par Dicer des précurseurs de miARN (Trabucchi et al. 2009) (Figure 12).

Les miARN primaires sont aussi sujets à une régulation négative par des facteurs empêchant leur clivage, telle que la protéine LIN28. Chez *C. elegans*, LIN-28 se lie au pri-let-7 pour empêcher son clivage par Drosha (Van Wynsberghe et al. 2011) alors que chez les mammifères il existe deux paralogues de LIN-28, LIN28A et LIN28B. LIN28B se lie au pri-let-7 afin d'empêcher son accès au Microprocesseur tandis que LIN28A, qui est localisée dans le cytoplasme, empêche la maturation du précurseur de miARN par Dicer (Piskounova et al. 2011) (Figure 12). Ceci permet de réguler finement l'expression temporelle du miARN let-7 qui est un miARN jouant un rôle clé dans le développement. Le rôle cytoplasmique de LIN28 sera décrit dans la section 1.3.2.1.7.

Finalement, la structure des miARN primaires peut être altérée par le phénomène d'édition des nucléotides. En effet, les protéines ADAR (*adenosine deaminase that acts on RNA*) sont capables de convertir l'adénosine en inosine (A en I) en utilisant un ADN double brin comme modèle (Luciano et al. 2004). Cette conversion entraîne d'importants changements dans la structure des ARN double brin. Ainsi, les protéines ADAR affectent la maturation de certains miARN en inhibant l'activité de clivage par Drosha (Yang et al. 2006). Les transcrits édités et non clivés vont être dégradés par la protéine TSN (*Tudor-SN*) (Yang et al. 2006). Dans le cas où l'édition est située dans la région du « seed », cela aura pour conséquence de cibler un ARNm différent (Kawahara et al. 2007). Certaines études suggèrent que 16% des transcrits primaires seraient édités, mais l'impact de ce phénomène d'édition sur la maturation et l'activité des miARN n'est toujours pas clair (Kawahara et al. 2007). De manière intéressante, chez la drosophile, l'expression d'une forme inactive d'ADAR bloque l'action de Drosha, suggérant qu'ADAR pourrait influencer la régulation d'un grand nombre de miARN en plus de ceux qu'elle édite (Heale et al. 2009) (Figure 12).

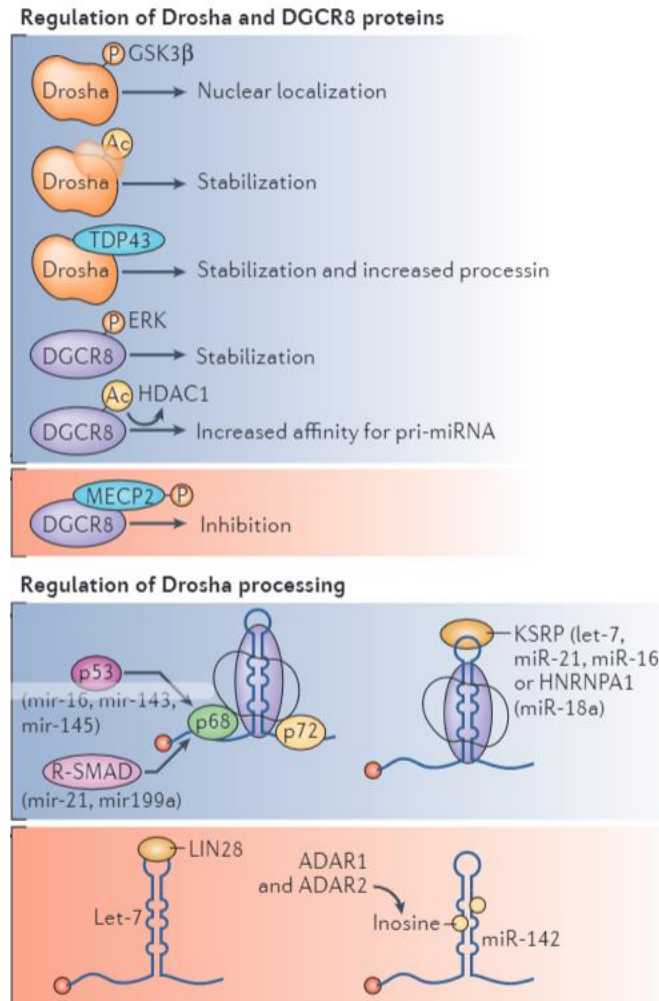


Figure 12 : Facteurs influençant la régulation des miARN primaires

Les facteurs régulant la maturation des miARN primaires peuvent être classés en deux groupes : les facteurs qui régulent directement les protéines Drosha et DGCR8 et ceux qui régulent l'activité du Microprocesseur en se liant directement à ce dernier où aux pri-miARN. Figure rognée de (Ha and Kim 2014).

1.3.2.1.4. Régulation de l'export vers le cytoplasme

Après le clivage par Drosha, les précurseurs de miARN sont transportés au cytoplasme par un transport actif nécessitant entre autres la protéine Exportin 5. Le niveau d'expression de l'Exportin 5 est régulé selon le contexte cellulaire. Les cellules cancéreuses présentent une diminution globale du niveau des miARN. L'une des causes de cette diminution est attribuable au fait que dans certains types de cellules cancéreuses, la protéine Exportin 5 est

inactivée par des mutations conduisant à la formation d'une protéine tronquée. Cette inhibition bloque la formation du complexe pré-miR/XPO-5/Ran-GTP et les pré-miARN sont alors piégés dans le noyau, ce qui diminue leur production (Melo et al. 2010). La réintroduction d'une copie sauvage de XPO-5 conduit au rétablissement du niveau des miARN et inhibe la prolifération et la division des cellules tumorales, témoignant de la fonction de suppresseur de tumeur des miARN. De plus, le transport des pré-miARN au cytoplasme peut être activé en réponse aux dommages à l'ADN. Dans ce cas, la protéine AKT (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*), activée par ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), va phosphoryler une protéine du nucléopore (NUP153) entraînant une augmentation de l'interaction entre XPO-5 et le nucléopore (Wan et al. 2013). Il a été montré que XPO-5 interagit avec l'ARNm de Dicer afin de permettre son export au cytoplasme. Ainsi l'inhibition de XPO-5 entraîne une diminution de l'expression de Dicer (Bennasser et al. 2011). De plus, la titration de XPO-5 par la surexpression de pré-miARN ou d'ARN d'adénovirus induit la diminution de l'interaction entre XPO-5 et Dicer et ainsi favorise la réplication virale au détriment de la maturation des pré-miR (Bennasser et al. 2011).

1.3.2.1.5. Régulation de Dicer

La régulation de l'activité de Dicer est primordiale pour assurer la bonne production des miARN. C'est pourquoi il existe de nombreuses façons de réguler cette protéine. Chez l'Homme, la région codante de l'ARNm de Dicer est elle-même ciblée par le miARN let-7, conduisant à la formation d'une boucle d'autorégulation négative (Forman et al. 2008). De plus, la protéine Dicer régule négativement sa propre activité catalytique via son domaine hélicase. En effet, lorsque ce dernier est muté ou absent, Dicer voit son activité de clivage augmentée (Ma et al. 2008). Cet effet d'auto-inhibition peut être modulé par des cofacteurs qui lient le domaine hélicase de Dicer. La protéine Dicer est aussi sujette aux modifications post-traductionnelles. Il a été montré que pendant l'ovogenèse, ERK phosphoryle Dicer dans son domaine ARNase IIIb et son domaine de liaison à l'ARN double brin afin de piéger cette protéine dans le noyau (Drake et al. 2014). Juste avant la fertilisation, Dicer est réactivée par sa déphosphorylation, permettant ainsi une bonne transition ovocyte-embryon (Drake et al. 2014). Ce mécanisme est conservé de *C. elegans* à l'Homme. Finalement, Dicer est mutée dans de nombreuses lignées cancéreuses, ce qui affecte son activité (Foulkes et al. 2014).

1.3.2.1.6. Régulateurs de l'activité de Dicer

L'activité de Dicer est augmentée par des interactions avec de nombreuses protéines liant l'ARN double brin. Chez la drosophile, DCR-1 (la protéine Dicer impliquée dans la voie des miARN) interagit avec la protéine Loqs (*Loquacious*) pour permettre de stimuler et stabiliser Dicer et ainsi d'améliorer la biogénèse des miARN (Förstemann et al. 2005; Saito et al. 2005). L'homologue chez l'Homme de la protéine Loqs est TRBP. Le rôle exact de TRBP dans la maturation des miARN, chez les mammifères, fait l'objet de nombreux débats. Certaines études montrent que TRBP stabilise la protéine Dicer et que sa déplétion entraîne une diminution du niveau des miARN (Chendrimada et al. 2005), alors que d'autres études montrent que la perte de TRBP n'a pas d'impact sur la stabilité de Dicer ni sur le niveau d'expression des miARN (Haase et al. 2005). Il a été montré aussi que TRBP induit des changements de conformation dans Dicer et ainsi facilite son interaction avec les pré-miARN, permettant une bonne maturation de ces derniers (Taylor et al. 2013). De plus, TRBP peut être phosphorylée par ERK, ce qui augmente la stabilité du complexe Dicer/TRBP et ainsi favorise la production de miARN (Paroo et al. 2009). Finalement, il a été montré que TRBP est mutée dans de nombreuses lignées cancéreuses, affectant ainsi la stabilisation de Dicer et la production de miARN (Melo et al. 2009).

Chez les mammifères, une autre protéine liant l'ARN double brin, appelée PACT (*Protein Activator of the interferon-induced protein kinase*), s'associe à Dicer afin de promouvoir la maturation des miARN (Lee et al. 2006). En effet, la perte de PACT par ARNi (interférence à ARN), entraîne la diminution du niveau des miARN matures (Lee et al. 2006). De manière intéressante, TRBP et PACT n'agissent pas sur les mêmes miARN et affectent différemment leur maturation (Lee et al. 2013). Finalement, une nouvelle étude, du même laboratoire, a démontré que l'inactivation génique de PACT, dans des cellules Hela, n'avait pas d'effets sur la maturation ou l'abondance des miARN. Aussi, dans ces cellules, PACT s'associe faiblement à Dicer (Kim et al. 2014). De plus amples investigations sont requises afin de permettre une meilleure compréhension du rôle joué par PACT dans la voie des miARN.

La protéine Dicer, non associée à un pré-miARN, a aussi été montrée comme étant dégradée par l'autophagie via son association à NDP52 (*Nuclear Dot Protein 52 kDa*). De plus, comme

mentionné précédemment, l'ARNm de Dicer est une cible du miARN let-7 dont l'activité est régulée par l'autophagie (Gibbins et al. 2012). L'autophagie régule donc Dicer au niveau protéique et au niveau post-transcriptionnel via let-7 (Gibbins et al. 2013).

1.3.2.1.7. Régulateurs du précurseur de miARN

La forme précurseur des miARN est aussi sujette à de nombreuses régulations. Plusieurs protéines lient le pré-miARN afin de réguler négativement ou positivement sa maturation par Dicer. La protéine RBM3 (*RNA Binding Motif protein 3*), une chaperonne à ARN, se lie directement aux précurseurs de miARN et facilite leur association avec Dicer par un mécanisme encore inconnu (Pilotte et al. 2011). L'augmentation du niveau de plusieurs miARN est dépendante de RBM3, ce qui suggère que cette protéine est un important régulateur de la voie des miARN en condition de stress (Pilotte et al. 2011). Au cours de la réponse inflammatoire, MCP1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1-Induced Protein-1*) catalyse le clivage de la boucle terminale des pré-miARN ce qui les envoie vers la dégradation. De manière intéressante, MCP1 est fortement exprimée dans plusieurs cancers, suggérant que la baisse du niveau des miARN, qui est observée dans de nombreux types de cancers, pourrait être attribuable en partie à MCP1 (Suzuki et al. 2011). Comme mentionné précédemment, LIN28 régule la maturation des précurseurs de miARN. Chez les mammifères, LIN28 recrute des TUT (*Terminal UridylTransferase*) qui vont ajouter une queue poly-A au pré-let-7 et ainsi bloquer l'activité de Dicer et induire la dégradation de let-7 (Heo et al. 2008, 2009). D'autres miARN que let-7 possèdent la séquence reconnue par LIN28 suggérant que son action pourrait être généralisée à plusieurs miARN (Heo et al. 2009). Les précurseurs de miARN, tout comme les pri-miARN, sont sujets à l'édition des nucléotides par les protéines ADAR, ce qui affecte leur liaison à Dicer. En effet, une étude a montré que l'édition de miR-151 inhibe son clivage médié par Dicer et entraîne l'accumulation de pré-miR-151 (Kawahara et al. 2007). Finalement, certains miARN peuvent faire l'objet d'une régulation spécifique, cela ne sera pas traité dans cette thèse.

1.3.2.1.8. Régulation du miRISC

Le complexe effecteur de la voie des miARN est constitué d'une protéine Argonaute, de la protéine GW182 et d'un miARN mature. La section qui suit porte sur la régulation de la protéine GW182 et la dégradation des miARN matures. La régulation des protéines Argonautes sera détaillée dans la section 1.4.

L'activité du miRISC est régulée par les protéines de la famille TRIM-NHL (*TRIPartite Motif-NCL-1/HT2A/LIN-41*) possédant des domaines RING (*Really Interesting New Gene*) qui sont le plus souvent impliquées dans la dégradation protéique. Chez la souris et chez *C. elegans*, il a été montré que TRIM-32 et NHL-2 (respectivement) stimulent l'activité du miRISC par un mécanisme encore peu compris (Hammell et al. 2009; Schwamborn et al. 2009), alors que l'orthologue chez la drosophile, Mei-P26, inhibe la voie des miARN (Neumüller et al. 2008).

Chez *C. elegans*, il a été montré que TEG-1 régule la stabilité de ALG-1 et VIG-1 (orthologue de *Vasa Intronic Gene* chez la drosophile), une protéine qui se lie au miRISC. TEG-1 affecte l'abondance des miARN. De manière intéressante, ce mécanisme semble être conservé chez l'Homme car la protéine orthologue humaine de TEG-1, CD2BP2 (*CD2 antigen cytoplasmic tail-Binding Protein 2*), est retrouvée en complexe avec AGO2 et SERBP1/PAI-RBP1 (orthologue humain de VIG-1) et son inhibition entraîne la diminution du niveau d'expression de certains miARN (Wang et al. 2016).

Les protéines GW182 interagissent avec les Argonautes pour former une plateforme de recrutement de protéines impliquées dans la dégradation des ARNm ou dans l'inhibition de la traduction. Chez l'Homme, la répression de l'expression des ARNm par les miARN peut être modulée par l'E3 ligase TRIM65 qui, en catalysant l'ubiquitination de GW182, entraîne sa dégradation (Li et al. 2014). La protéine GW182 est également associée au transport vésiculaire. Chez *C. elegans*, les membres du complexe GARP (*Golgi Associated Retrograde Protein*), qui jouent un rôle dans le transport rétrograde, modulent la fonction des miARN en affectant le recyclage de AIN-1 et AIN-2 (Vasquez-Rifo et al. 2013). En effet, il a été montré

que la perte de fonction de *vps-52* diminue l'abondance des protéines AIN-1 et AIN-2 ainsi que de certains miARN (Vasquez-Rifo et al. 2013).

Les miARN sont des molécules perçues comme étant très stables. De ce fait, l'étude de leur dégradation a pendant longtemps été mise de côté. Pourtant, la dégradation active des miARN matures est un mécanisme important dans la régulation des miARN. En effet, au cours du développement et de la différenciation cellulaire, le niveau des miARN matures varie. Certains doivent être dégradés tandis que d'autres doivent être exprimés (Rüegger and Großhans 2012). Chez *C. elegans*, il a été montré que les enzymes XRN-1 et XRN-2, des exoribonucléases 5' vers 3', sont responsables de la dégradation des miARN (Chatterjee and Groszhans 2009; Chatterjee et al. 2011). Le plus souvent, lorsqu'un miARN, par exemple *let-7*, interagit avec sa cible, cela le protège de la dégradation par XRN-1 et XRN-2 (Chatterjee et al. 2011). Cependant, dans les neurones, les miARN s'associeront à leur ARNm cible avec une complémentarité parfaite, ce qui initiera leur dégradation (De La Mata et al. 2015). Ce mécanisme, appelé TDMD (*target RNA-directed miRNA degradation*) permet donc de dégrader le miARN et sa cible (De La Mata et al. 2015). De plus, l'existence d'un complexe de dégradation, qui permet d'éliminer plusieurs miARN, a été mis en évidence chez *C. elegans*. Ce complexe de dégradation est composé de la protéine DCS-1 (*decapping scavenger 1*) et de l'enzyme XRN-1. Lorsque ce complexe est affecté négativement, cela entraîne l'augmentation du niveau d'expression de certains miARN (Bossé et al. 2013). Cependant, sa spécificité à dégrader certains miARN reste inconnue. De manière intéressante, le rôle de ce complexe de dégradation est conservé chez l'Homme. Dans ce cas, l'orthologue humain de DCS-1, appelé DCPS, s'associe à XRN2 pour permettre la dégradation de plusieurs miARN (Meziane et al. 2015). Chez l'Homme, plusieurs autres enzymes de dégradation des miARN ont été mises en évidence telles que XRN1 et RRP41 (*RNase PH*) ou bien encore l'enzyme PNPase^{old-35} (*polynucleotide phosphorylase*) dans les cellules de mélanomes (Bail et al. 2010; Das et al. 2010). Chez la drosophile, une forte complémentarité entre un ARNm cible et un miARN associé à AGO1 déclenche l'uridylation de la queue du miARN ainsi que sa dégradation par une exonucléase de type 3'-5' (Ameres et al. 2010). Récemment, il a été montré que les endonucléases TSN (*Tudor-SN*) entraînent la dégradation des miARN libres ou de ceux associés aux protéines Argonautes en clivant

spécifiquement les dinucléotides CA et UA présents au sein des miARN (Elbarbary et al. 2017). De plus, ce mécanisme nécessite l'action de l'hélicase UPF1 (*RNA helicase and ATPase*) qui permet de dissocier le miARN de sa cible le rendant plus accessible aux TSN (Elbarbary et al. 2017). Finalement, dans certaines conditions cellulaires, la stabilité de miARN spécifiques est affectée. Par exemple, l'accumulation de miR-29b est régulée suivant l'état du cycle cellulaire dans lequel la cellule se trouve (Hwang et al. 2007). Plusieurs miARN voient également leur quantité diminuer de 50% lorsque le facteur de croissance, EGF, est présent en plus forte concentration (Avraham et al. 2010). Enfin, chez la souris, les miARNs miR-204, miR-211 et le groupe de miARN miR-183/96/182, qui sont présents dans la rétine, sont régulés suivant l'intensité de la lumière (Krol et al. 2010)

1.3.2.2. Régulation post-transcriptionnelle des piARN

Très peu de travaux se sont penchés sur l'étude de la régulation post-transcriptionnelle de la voie de biogénèse des piARN, qui est un mécanisme peu détaillé. PIWI, étant la principale protéine permettant la biogénèse des piARNs, seulement des études concernant la régulation des protéines Argonautes PIWI ont été décrites. Ceci sera discuté dans la section 1.4.

1.3.2.3. Régulation post-transcriptionnelle des siARN endogènes

La régulation post-transcriptionnelle des siARN est un mécanisme peu étudié. Chez l'Homme, tout comme les miARN, les siARN sont sujets à l'édition de nucléotides A en I par les protéines ADAR (Heale et al. 2009). Ceci a pour impact d'antagoniser l'activité des siARN. Par exemple, l'action des protéines ADAR altère la répression du gène de couleur blanc dans les yeux de la drosophile (Heale et al. 2009). La biogénèse des siARN étant dépendante de la protéine Dicer, leur maturation par cette dernière est aussi régulée par les protéines TRBP et PACT (Lee et al. 2013). De manière intéressante, lorsque Dicer est associée à PACT, le chargement des pré-siARN est désavantagé vis-à-vis de celui des pré-miARN. Cependant, cette distinction de substrat pour la protéine Dicer n'est pas aussi établie lorsque cette dernière s'associe à TRBP (Lee et al. 2013). Une étude *in vitro* a montré que chez *C. elegans*, ERI-1 (*3'-5' ExoRlbonuclease 1*) dégrade les duplexes de siARN présentant 2 nucléotides flottants à leur extrémité 3' (Kennedy et al. 2004), ce qui réduit ainsi l'efficacité

du ARNi *in vivo*. Mais le rôle de ERI-1 dans la dégradation des siARN n'est pas très clair puisqu'une autre étude a montré que cette protéine est aussi impliquée dans la biogénèse de certains siARN endogènes (Gabel and Ruvkun 2008). Chez la drosophile, il a été montré qu'un groupe d'endo-siARN, aussi appelé hp-esiARNs (*hairpin-derived esiRNAs*), suivant leurs séquences, leurs structures et leurs longueurs, peuvent s'associer aux deux protéines Argonautes AGO1 et AGO2. Ceux qui s'associent à AGO1 sont dégradés par le mécanisme d'uridylation suivi de la dégradation par une exonucléase de type 3'-5', alors que ceux qui se lient à AGO2 présentent une modification 2' O-méthyl à leur extrémité 3', les protégeant de la dégradation (Ameres et al. 2011). La régulation post-transcriptionnelle des protéines Argonautes dans la voie des siARN sera détaillée dans la section 1.4.

1.4. Régulation des protéines Argonautes

Les protéines Argonautes sont les actrices majeures de la répression des gènes effectuée par les courts ARN non codants (Meister 2013). La première protéine Argonaute a été mise en évidence chez la plante, suite à l'identification d'un mutant affectant le développement des feuilles. Les auteurs ont vu une similarité entre la forme des feuilles adoptées dans ce mutant et une pieuvre appelée Argonaute. C'est ainsi que le gène affecté dans ce mutant fut nommé Ago (Bohmert et al. 1998). Les protéines Argonautes sont très bien conservées au cours de l'évolution (Figure 13).

L'importance des protéines Argonautes pour l'activité des courts ARN non codants a été mise en évidence pour la première fois par un criblage génétique chez *C. elegans* (Tabara et al. 1999). Cette étude, réalisée par l'équipe du Dr. Mello, a identifié la protéine RDE-1 (*RNAi-defective 1*) comme jouant un rôle essentiel dans les mécanismes d'interférence à l'ARN (Tabara et al. 1999). Toujours chez *C. elegans*, s'en est suivi la découverte des protéines Argonautes requises pour la voie des miARN, ALG-1 et ALG-2 (*Argonaute-like gene*) (Grishok et al. 2001).

Les protéines Argonautes sont classées en trois groupes. Le premier groupe est celui des Argonaute-like. Leur nom provient de l'homologie qu'elles présentent avec la première protéine Argonaute découverte chez la plante. Ces protéines Argonaute sont impliquées dans

les voies des miARN et des siARN. Le deuxième groupe est composé des protéines PIWI (*P-element induced wimpy testis*) qui sont impliquées dans la voie des piARN. Le troisième groupe comprend les Argonautes spécifiques à *C. elegans*, appelées WAGO, qui sont impliquées dans les voies du siARN endogène et exogène (Hutvagner and Simard 2008) (Figure 13).

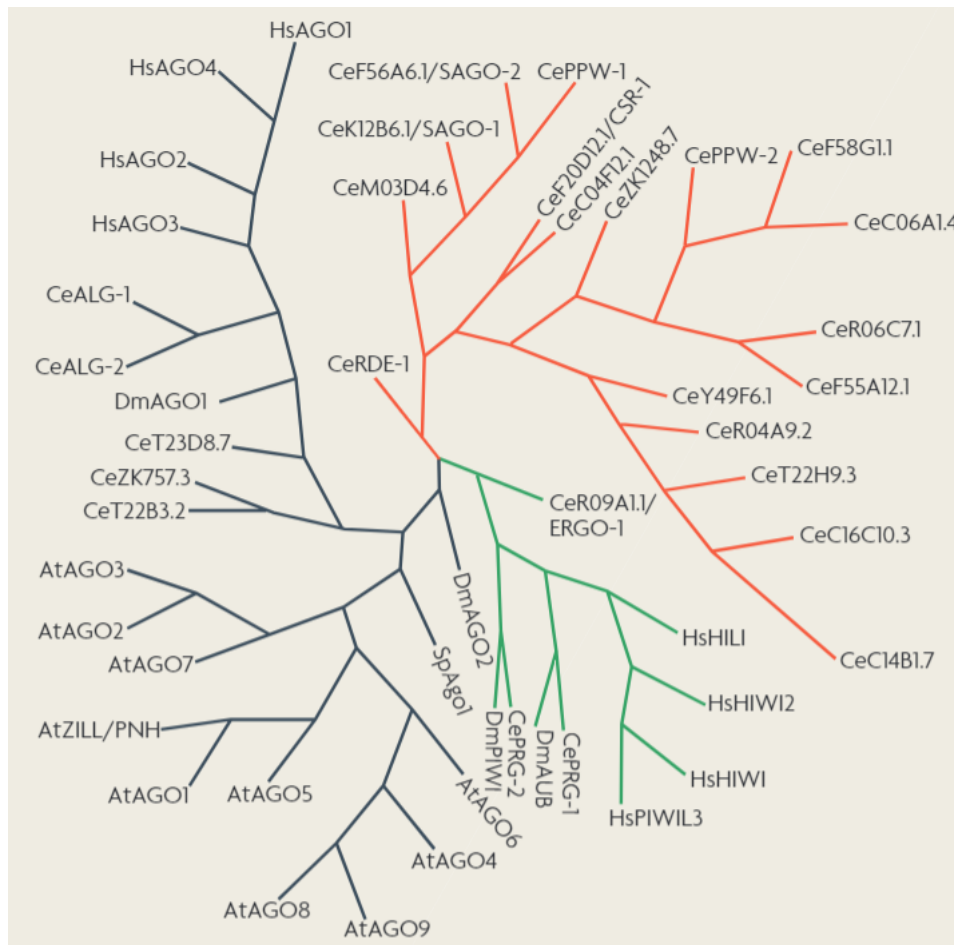


Figure 13 : Arbre phylogénétique des Argonautes

Cette figure montre les relations phylogénétiques entre les protéines Argonautes. Le groupe des *Argonaute-like* est indiqué en noir. Celui des protéines PIWI est indiqué en vert et les protéines Argonautes spécifiques à *C. elegans* sont représentées en rouge. Figure tirée (Hutvagner and Simard 2008).

Le nombre des protéines Argonautes varie selon les espèces. Chez l'Homme, on retrouve 8 protéines Argonautes, 5 à 7 Ago-like et 4 Piwi-like, alors que chez *C. elegans* on en retrouve

26, soit 5 Ago-like, 3 Piwi-like et 18 Argonautes spécifiques au nématode (Hutvagner and Simard 2008).

1.4.1. Structure des protéines Argonautes

Les protéines Argonautes consistent en 4 domaines distincts qui adoptent une structure bilobée. Le premier lobe est constitué du domaine N-terminal et du domaine PAZ tandis que le deuxième lobe est formé des domaines MID et PIWI (Meister 2013) (Figure 14). Cette structure permet de positionner le court ARN non codant de façon à favoriser son interaction avec sa cible (Schirle et al. 2014).

1.4.1.1. Le domaine N-terminal

Le domaine N-terminal est le domaine des protéines Argonautes le moins caractérisé. Une étude a démontré que ce domaine est seulement requis pour la séparation des deux brins du duplex d'ARN mature une fois que ce dernier est pris en charge par la protéine Argonaute (Kwak and Tomari 2012) (Figure 14). Chez l'Homme, une étude a suggéré que de courtes séquences présentes dans le domaine N-terminal sont importantes pour l'activité de clivage des Argonautes dans la voie des siARN (Hauptmann et al. 2013).

1.4.1.2. Le domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille)

Ce domaine reconnaît spécifiquement l'extrémité 3' flottante des courts ARN non codant qui est générée par Dicer (Lingel et al. 2004; Song et al. 2003; Ma et al. 2004). L'extrémité 3' du court ARN non codant est ainsi insérée dans une poche hydrophobique du domaine PAZ (Lingel et al. 2004). La spécificité de ce domaine à lier des séquences simple brins vient de la conformation dite « OB fold » (oligonucleotide/oligosaccharide binding) qu'il adopte. En effet, cette conformation est présente dans une famille de protéines qui lie des séquences d'ARN ou d'ADN simple brin (Lingel et al. 2004; Song et al. 2003). Le domaine PAZ, du fait de sa spécificité à reconnaître des molécules présentant des extrémités 3' hydroxyle, peut distinguer des courts ARN non codants d'ARN dégradés (Hutvagner and Simard 2008). Chez

les protéines Argonautes PIWI, ce domaine reconnaît spécifiquement l'extrémité 3' méthylée des piARN (Simon et al. 2011) (Figure 14).

1.4.1.3. Le domaine MID (Middle)

Ce domaine possède une poche d'interaction qui reconnaît l'extrémité 5' du court ARN non codant en agissant spécifiquement avec le phosphate en 5' (Boland et al. 2010; Frank et al. 2011). L'interaction entre le domaine MID et l'extrémité 5' est très stable puisque le court ARN non codant est fortement ancré dans la poche d'interaction (Boland et al. 2010, 2011) (Figure 14).

1.4.1.4. Le domaine PIWI

Ce domaine présente une structure similaire à celle des RNases H ce qui fait que certaines protéines Argonautes fonctionnent comme des endonucléases et sont capables de cliver l'ARNm cible (Song et al. 2004). Le domaine PIWI contient une triade catalytique qui est composée d'un site actif DDH (motif aspartate-aspartate-histidine) (Song et al. 2004). Mais une étude structurale de la protéine Argonaute, chez la levure, a montré qu'un quatrième résidu serait essentiel pour l'activité catalytique des Argonautes formant ainsi une tétrade catalytique (DEDH) (Nakanishi et al. 2012). Cette activité de clivage de l'ARNm cible est seulement requise dans la voie des siARN et est attribuable principalement à AGO2 (Liu et al. 2004) (Figure 14).

Chez *C. elegans*, l'activité de clivage est importante pour la biogénèse des miARN. En effet, la perte de fonction de ALG-1 et de ALG-2 entraîne une dérégulation du niveau des miARN matures, suggérant que les Argonautes sont impliquées dans la maturation de ces derniers (Bouasker and Simard 2012). De plus, le remplacement d'ALG-1 et ALG-2 par leurs formes mutées pour leur activité de clivage ne permet pas de rétablir le niveau des miARN (Bouasker and Simard 2012). Chez la souris, il a été montré que l'activité de clivage de Ago2 est essentielle à la biogénèse de certains miARNs (Cheloufi et al. 2010). Chez le poisson-zèbre aussi, l'activité de clivage de Ago2 est requise pour la maturation de certains précurseurs de miARN qui sont maturés indépendamment de Dicer (pré-miR-451) (Cifuentes et al. 2010). De plus, chez l'Homme, certains précurseurs de miARN sont aussi clivés par AGO2 pour

générer une forme précurseuse plus courte facilitant le choix du brin guide (Diederichs and Haber 2007).

Le domaine PIWI est aussi celui qui permet à la protéine Argonaute d'interagir avec la protéine GW182. Chez *C. elegans*, il a été montré qu'ALG-1 possède des poches de liaison au tryptophane dans son domaine PIWI qui sont requises pour sa liaison à GW182 (Jannot et al. 2016). La mutation de ces poches altère l'association d'AIN-1 et AIN-2 à ALG-1 et ainsi affecte la répression des ARNm cibles par les miARN (Jannot et al. 2016).

Le rôle important de ces poches de liaison au tryptophane, situées dans le domaine PIWI des protéines Argonautes et permettant leur interaction avec la protéine GW182, a également été mis en évidence chez la drosophile et l'humain (Kuzuoğlu-Öztürk et al. 2016).

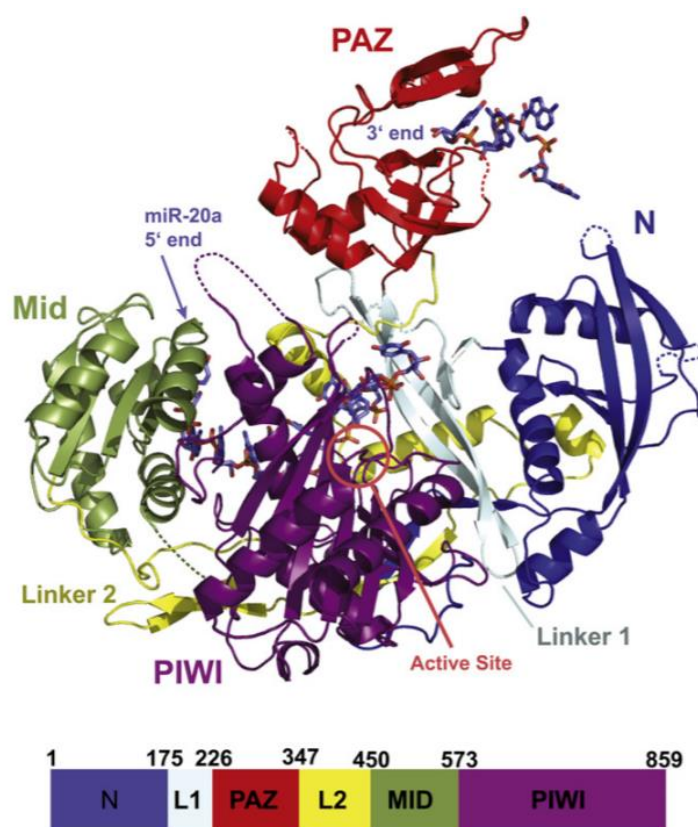


Figure 14 : Les domaines et la structure d'une protéine Argonaute

En haut : Représentation schématique de la structure cristalline de la protéine Argonaute humaine en complexe avec le miARN miR-20a. L'extrémité 5' de miR-20a est fermement ancrée dans le

domaine MID. La localisation du site actif de l'Argonaute est encadrée en rouge. **En bas :** Les protéines Argonautes consistent en un domaine variable N-terminal (bleu) et trois domaines C-terminaux conservés : les domaines PAZ (rouge), MID (vert) et PIWI (violet). L1 (gris) et L2 (jaune) sont des inter-domaines. Figure tirée de (Elkayam et al. 2012).

1.4.2. Régulation des protéines Argonautes

1.4.2.1. Régulation post-traductionnelle des protéines Argonautes

Les protéines Argonautes sont les facteurs limitants du complexe effecteur des courts ARN non codants. De ce fait, elles sont sujettes à des modifications post-traductionnelles qui permettent de moduler rapidement leur activité selon le contexte cellulaire. L'hydroxylation sur les protéines Argonautes est l'une des premières modifications post-traductionnelles à avoir été mise en évidence. En effet, la proline 700 d'AGO2 a été montrée comme étant hydroxylée par C-P4H (*prolyl 4-hydroxylase*) stabilisant ainsi AGO2 (Qi et al. 2008). Les auteurs ont montré aussi qu'AGO2 et AGO4 sont plus susceptibles d'être hydroxylées qu'AGO1 et AGO3. Ainsi, l'hydroxylation d'AGO2 est indispensable au bon fonctionnement de la voie des siARN, qui utilise seulement AGO2, mais n'est pas nécessaire à la voie des miARN (Qi et al. 2008). De plus, il a été montré qu'en condition d'hypoxie, C-P4H est augmentée, ce qui permet d'accroître le mécanisme d'hydroxylation d'AGO2 et d'entraîner son accumulation tout en améliorant l'activité des miARN (Wu et al. 2011) (Figure 15). En condition de stress, l'importance de poly (ADP-ribose) pour la formation des granules de stress a été mise en évidence (Leung et al. 2011). Dans ces mêmes conditions, les 4 protéines Argonautes, chez l'Homme, sont alors recrutées aux granules de stress et subissent la poly-ADP ribosylation conduisant ainsi à l'inhibition de leur activité (Leung et al. 2011). AGO2 est aussi sujette à la sumoylation sur sa lysine 402 qui est située dans la boucle liant ses domaines PAZ et PIWI. En effet, SUMO1 et SUMO2/3 peuvent modifier AGO2, ce qui affecte négativement sa stabilité (Sahin et al. 2014) (Figure 15). Les protéines Argonautes de la voie des piARN chez la drosophile ont été montrées comme étant régulées par la méthylation des arginines. En effet, la perte de la méthyltransférase dPRMT5 (*drosophila* homologue of *protein methyltransferase 5*) induit la diminution du niveau des piARN et des protéines Argonautes, AGO3 et AUB, qui sont des substrats de cette enzyme (Kirino et al. 2009).

La phosphorylation des protéines Argonautes est la modification post-traductionnelle la plus étudiée. La voie p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) phosphoryle hAGO2 sur sa sérine 387, ce qui facilite sa localisation aux *P-bodies* (Zeng et al. 2008). La phosphorylation d'AGO2 sur cette même sérine 387 par la kinase AKT3 (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*) altère son activité de clivage au dépend de son activité de répression traductionnelle. De plus, cette phosphorylation augmente l'interaction entre AGO2 et GW182 et favorise la localisation d'AGO2 aux *P-bodies* (Horman et al. 2013). La phosphorylation, toujours sur ce même résidu, médiée cette fois ci par MEK, affecte la sécrétion d'AGO2 aux exosomes (McKenzie et al. 2016). La tyrosine 529, située dans le domaine MID des protéines Argonautes humaines, peut aussi être phosphorylée par une kinase inconnue, créant ainsi une charge négative dans la poche de liaison de l'extrémité 5' des courts ARNs. Ceci altère le chargement de l'extrémité 5' des courts ARNs dans AGO2 et par la même occasion pourrait aussi intervenir dans sa dégradation puisque lorsque cette dernière n'est pas liée à un court ARN, elle est instable (Rüdel et al. 2011). En condition d'hypoxie, EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) phosphoryle AGO2 sur sa tyrosine 393 ce qui diminue son interaction avec Dicer et TRBP. Par conséquent, la maturation des miARN est inhibée. De plus, cette phosphorylation, médiée par EGFR, augmente l'invasion et la survie cellulaire ce qui corrèle avec un faible taux de survie chez des patients atteints du cancer du sein (Shen et al. 2013). Cette même tyrosine peut aussi être déphosphorylée par PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) dans certaines conditions (Yang et al. 2014). Récemment, un cycle de phosphorylation sur AGO2 a été mis en évidence. CSNK1A1 (*CaSeiN Kinase 1 alpha 1*) phosphoryle plusieurs résidus qui sont ensuite déphosphorylés par ANKRD52-PPP6C (*ANKyrin Repeat Domain 52-Protein PhosPhatase 6 Catalytic subunit*). Ce cycle de phosphorylation régule l'interaction entre les miARN et leur cibles dans le but de maintenir une bonne efficacité de la voie des miARNs (Golden et al. 2017). Une autre étude est venue renforcer ces données. Elle a également montré que la phosphorylation, sur 5 résidus conservés différents, présents dans le domaine PIWI d'AGO2 et d'ALG-1, est essentielle pour la fonction de ces protéines et affecte la liaison du miRISC à sa cible (Huberdeau et al. 2017) (Figure 15).

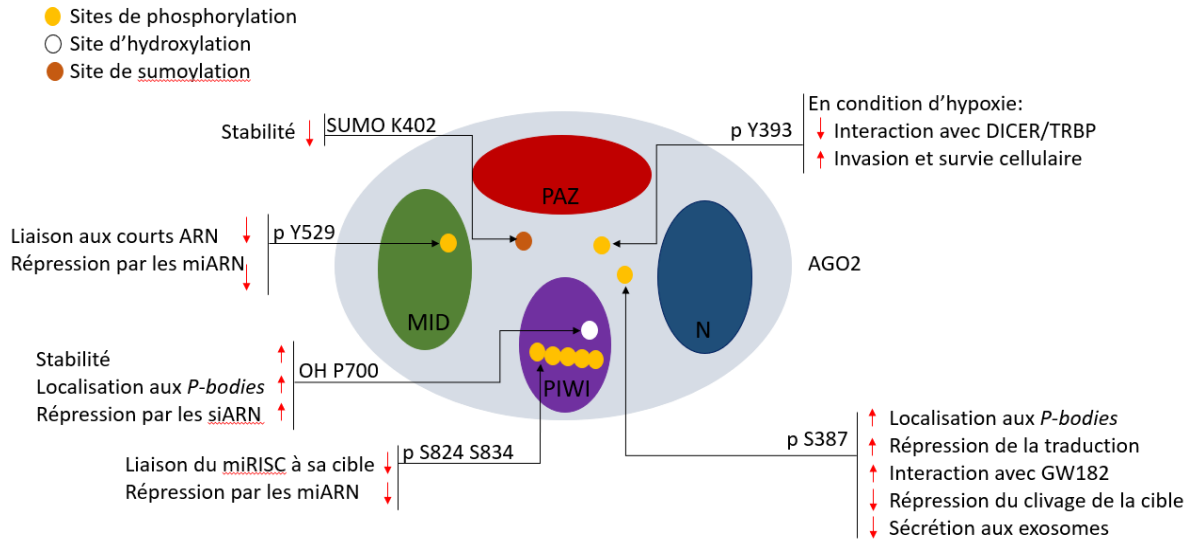


Figure 15 : Résumé des sites spécifiques de modifications post-traductionnelles sur AGO2

Schéma représentant la localisation des résidus modifiés sur AGO2 avec leurs conséquences fonctionnelles.

1.4.2.2. Dégradation et recyclage des protéines Argonautes

La voie de dégradation médiée par le protéasome et l'autophagie sont deux stratégies permettant de contrôler l'accumulation des protéines Argonautes. Chez la souris, mLIN41 (*mouse homologue of abnormal cell LINEage 41*), qui est ciblée spécifiquement par le miARN let-7, agit comme une E3 ubiquitine ligase sur AGO2. mLIN41 se lie directement à AGO2 et l'ubiquitine, ce qui régule négativement la voie des miARN (Rybak et al. 2009). De plus, il a été montré que l'activation des cellules T induit une diminution globale du niveau des miARN. Ceci est attribuable au fait qu'AGO2 est ubiquitinée et dégradée par le protéasome (Bronevetsky et al. 2013). Finalement, la voie des piARN, chez la souris, régule l'accumulation de la protéine MIWI en augmentant son interaction avec APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*), une E3 ubiquitine ligase. Ceci entraîne alors la dégradation de MIWI par la voie du protéasome (Zhao et al. 2013).

Dans les cellules HeLa, il a été montré qu'AGO2, lorsqu'elle n'est pas associée à un miARN, est instable et dégradée par l'autophagie via son interaction avec NDP52. Le mécanisme d'autophagie est alors essentiel à l'activité de répression des miARN puisqu'il permet

d'éliminer les protéines AGO2 libres qui peuvent entrer en compétition avec des complexes actifs (Gibbins et al. 2012). Chez la souris et l'Homme, les co-chaperonnes FKBP4 et FKBP5 (*FK506 Binding Protein*) s'associent à AGO2. Il a été mis en évidence que l'inhibition de ces co-chaperonnes entraîne la dégradation d'AGO2 via l'autophagie (Martinez et al. 2013).

L'abondance des protéines Argonautes dépend étroitement de celle des miARN. Chez la drosophile et l'Homme, il a été montré qu'une diminution du niveau des miARN entraîne une diminution d'AGO1 et AGO2, respectivement (Martinez and Gregory 2013; Smibert et al. 2013). En effet, comme mentionné précédemment, les miARN, lorsqu'ils s'associent aux Argonautes, stabilisent ces dernières et les protègent de la dégradation. L'étude de Smibert et collaborateurs suggère que le protéasome est à l'origine de la dégradation d'AGO1 (Smibert et al. 2013), alors que celle de Martinez et Grégory propose qu'AGO2 est dégradée par l'autophagie (Martinez and Gregory 2013). La dégradation des protéines Argonautes utilise différents types de mécanismes qui varient selon le type cellulaire ou encore les signaux responsables de cette dégradation.

1.5. Le nématode *C. elegans* comme modèle d'étude

1.5.1. Description

Le nématode *C. elegans* a été introduit dans les laboratoires de génétique à la fin des années 1960 par Sydney Brenner. Ce dernier s'est tourné vers l'étude d'un organisme simple, le nématode, comme organisme modèle, pour tenter de mieux comprendre l'élaboration d'un organisme pluricellulaire ainsi que la neurobiologie. Cela lui a valu le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2002 avec John E. Sulston et Robert Horvitz.

C. elegans est un petit ver non segmenté d'environ un millimètre de longueur, transparent et non-parasitaire. Dans la nature, on le retrouve dans des fruits pourris en décomposition puisqu'il se nourrit principalement de bactéries. Au laboratoire, les animaux sont cultivés dans des pétris d'agar additionnés de bactéries *Escherichia coli* comme source de nourriture. Ces vers se développent à des températures comprises entre 12 et 25°C et ont une durée de

vie de 3 semaines. La plupart des individus sont hermaphrodites (XX) et peuvent donc produire à la fois des ovocytes et des spermatozoïdes. Ceci leur permet de s'autoféconder et de pondre en moyenne 300 œufs en l'espace de quelques jours. Dans 0,2% des cas, une non-disjonction du chromosome X à la méiose va produire des mâles (XO) (Corsi et al. 2015).

Cet animal possède un nombre invariable de cellules somatiques. Les hermaphrodites adultes contiennent 959 cellules tandis que les mâles sont composés de 1031 cellules. Cette caractéristique a permis aux chercheurs de retracer le devenir de chaque cellule entre la fertilisation et le stade adulte de ces animaux et ainsi de générer un lignage complet (Sulston and Horvitz 1977; Kimble and Hirsh 1979; Sulston et al. 1983).

C. elegans a un cycle de vie court. En trois jours, à 25°C, il se développe du stade embryonnaire jusqu'au stade adulte en passant par 4 stades larvaires, nommés L1, L2, L3 et L4. Entre chaque stade larvaire, l'animal mue, ce qui le fait entrer dans un état léthargique. De plus, par manque de nourriture, l'animal au stade larvaire L2 peut entrer dans un état de dormance appelé « dauer » où il va arrêter son développement. Il le reprendra une fois les conditions environnantes plus favorables (Corsi et al. 2015) (Figure 16).

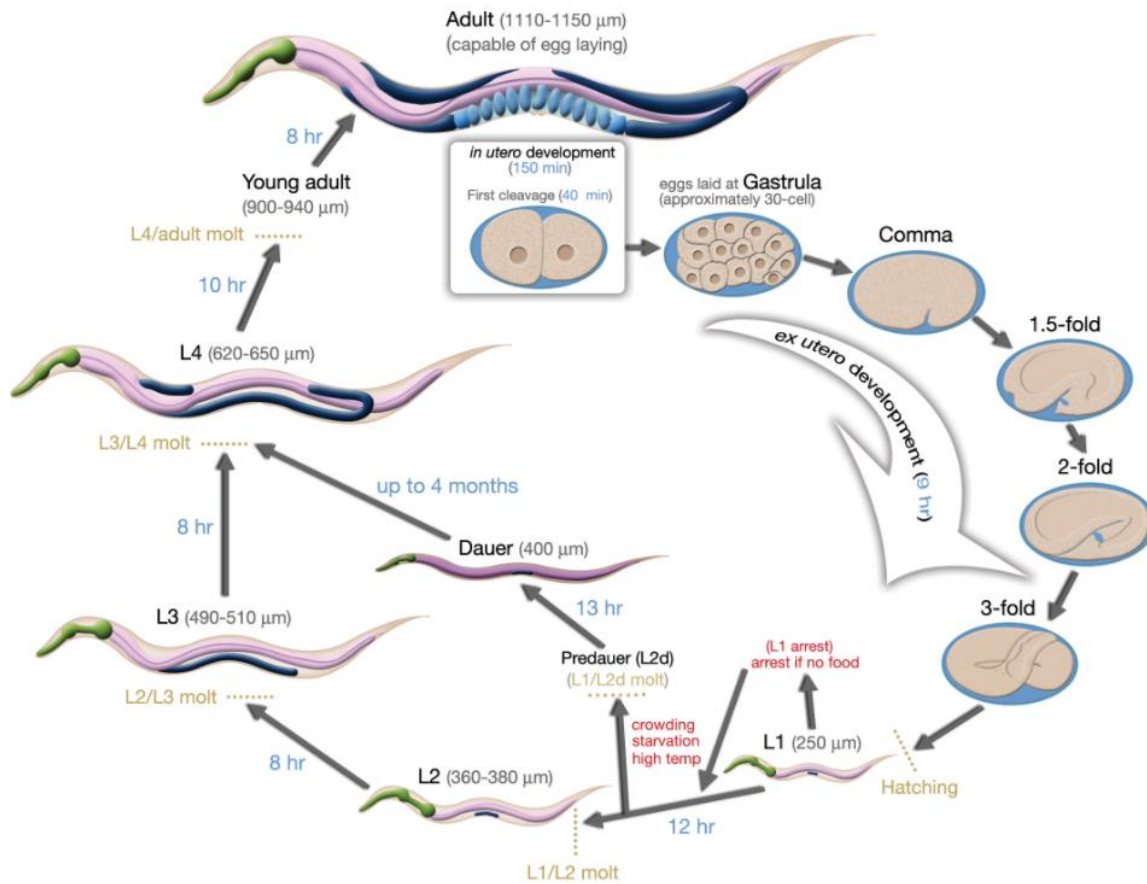


Figure 16 : Cycle de vie du nématode *C. elegans*

Le développement embryonnaire se déroule d'abord dans l'utérus à l'intérieur de l'œuf, puis hors de l'utérus, de la ponte de l'œuf jusqu'à l'éclosion de la larve L1. S'ensuit le développement post-embryonnaire qui passe par 4 stades larvaires (L1 à L4), séparés chacun par une mue, jusqu'à formation de l'adulte à même de se reproduire. Lorsque les conditions sont défavorables, la larve L2 passe par un stade *dauer*, où elle reste immobile et accumule des graisses, pour finir par muer, 4 mois après, directement en une larve L4. Les nombres en bleu désignent le temps que l'animal passe à chaque stade. La taille de l'animal est indiquée en micromètres (μm) avec le nom du stade. Figure tirée de (Altun and Hall 2017).

1.5.2. Génétique

En 1998, ce nématode fut le premier animal dont le génome a été totalement séquencé. Il fait 100 Mb et contient 20 000 gènes codant pour des protéines réparties en 6 chromosomes, 5 autosomes et 1 chromosome sexuel. De plus, 40% des gènes chez *C. elegans* présentent des équivalents dans le patrimoine génétique humain.

L'un des avantages à utiliser le nématode *C. elegans* comme modèle d'étude est que de nombreux mutants présentent des phénotypes remarquables. Ces derniers sont devenus des marqueurs qui ont permis d'élaborer des approches génétiques par mutagenèse. L'utilisation de la méthode de l'ARNi permet également de créer des souches présentant des phénotypes ressemblant à ceux observés chez certains mutants. Pour réaliser cette technique, qui permet également d'étudier la fonction d'un gène, il suffit de nourrir les vers avec des bactéries générant un double brin d'ARN spécifique reconnaissant le gène d'intérêt (Timmons and Fire 1998). Mais l'une des qualités majeures de *C. elegans* est que les souches de mutants créées peuvent être congelées et conservées à -80°C. Après décongélation, les larves de nématode vont se réveiller et pondre le jour suivant. De plus, du fait de leur caractère hermaphrodite autofécondant, de leur taille et de leur faible coût, il est facile et rapide de générer de nombreux mutants et animaux transgéniques en particulier avec la technique de CRISPR-Cas9 (Paix et al. 2014, 2015). Finalement, la transparence de ces animaux est très utile pour créer des animaux génétiquement modifiés qui contiennent un fluorochrome, tel que la GFP (*Green Fluorescent Protein*) et ainsi, permettre d'évaluer le patron d'expression cellulaire (Corsi et al. 2015). En conclusion, le nématode *C. elegans* est un outil génétique puissant.

1.6. Objectif du doctorat

Afin de mieux comprendre comment se fait la régulation des miARN, nous avons identifié des facteurs associés au complexe de dégradation des miARN, DCS-1/XRN-1 (Bossé et al. 2013). En effet, DCS-1 interagit avec XRN-1 ce qui stimule la dégradation des miARN. De plus, ce processus est indépendant de l'activité de décoiffage de DCS-1 (Bossé et al. 2013). Dans le but de trouver spécifiquement des interacteurs associés au rôle de DCS-1 dans la dégradation des miARN, et non à son activité de décoiffage, nous avons réalisé une immunoprécipitation de la protéine mutante de DCS-1 qui n'est plus capable de lier XRN-1, que nous avons comparé à l'immunoprécipitation de la protéine DCS-1 sauvage. Deux protéines de modification post-traductionnelle ont été retenues comme interagissant seulement avec la protéine DCS-1 sauvage, suggérant qu'elles sont importantes pour la fonction du complexe DCS-1/XRN-1. Les deux protéines que nous avons retenues sont PPM-2 et HECD-1.

L'hypothèse de mon projet de doctorat était que PPM-2 et HECD-1 sont importantes pour la régulation de la voie des miARN. En effet, en plus du fait que ces protéines interagissent spécifiquement avec DCS-1 lorsque ce dernier est lui-même associé à XRN-1, les résultats préliminaires montraient que la perte de fonction de *ppm-2* et de *hecd-1* affecte la formation d'une structure hypodermale chez l'animal qui est très finement régulée par les miARN. Afin d'étayer l'hypothèse de mon projet de doctorat, mon objectif général a été d'étudier l'implication de PPM-2 et d'HECD-1 dans la voie des courts ARN non codants.

Objectif 1

Le premier objectif de mon doctorat était de caractériser l'implication de PPM-2 dans la voie des courts ARN non codants. Grâce à l'utilisation du nématode *C. elegans* comme modèle d'étude, j'ai pu utiliser, dans un premier temps, la génétique afin d'évaluer l'impact de la perte de fonction de *ppm-2* dans la voie des courts ARNs non codants. Puis, la biologie moléculaire m'a permis de mieux caractériser le rôle de PPM-2 dans la voie des courts ARN non codants. Les travaux réalisés pour ce premier objectif sont présentés dans le chapitre 2.

Objectif 2

Le second objectif de mon doctorat était de caractériser l'implication d'HECD-1 dans la voie des courts ARN non codants. J'ai réalisé des études préliminaires concernant l'impact de la perte de fonction d'*hecd-1* sur la régulation de la voie des miARN. Les travaux réalisés pour ce second objectif sont présentés dans le chapitre 3.

Chapitre 2: PPM-2 regulates small RNA function by stabilizing Argonaute proteins in *C. elegans*

Lucile Fressigné^{1,2}, François Houle^{1,2}, Gabriel D. Bossé^{1,2,3}, Lichao Li⁴, Vincent Perreira-Bourque^{1,2}, Weifeng Gu⁴ and Martin J. Simard^{1,2}

¹St-Patrick Research Group in Basic Oncology, CHU de Québec-Université Laval Research Centre (L'Hôtel-Dieu de Québec), ²Laval University Cancer Research Centre, Quebec City, Québec, G1R 3S3, Canada

³Present address: College of Pharmacy, University of Utah, Salt Lake City, Utah, 84112, USA

⁴Department of Cell Biology and Neuroscience, University of California, Riverside, California, 92521, USA

Corresponding Author:

Email: Martin.Simard@crchudequebec.ulaval.ca

KEYWORDS: miRNAs, piRNAs, nuclear siRNA, Argonaute protein

Avant-propos

Avant mon arrivée au laboratoire, un ancien étudiant, Gabriel D. Bossé, avait mis en évidence l'existence d'un complexe de dégradation des miARN chez *C. elegans*. Suite à cette

découverte, il a réalisé une immunoprécipitation dans le but de trouver des interacteurs de ce complexe afin de mieux comprendre comment sont régulés les miARN. Il a alors sélectionné un interacteur potentiellement intéressant, la phosphatase PPM-2, et a commencé à caractériser son rôle dans la voie des miARN. Pour cela, il a utilisé son expertise en génétique du nématode *C. elegans*.

A mon arrivée au laboratoire, Gabriel m'a enseigné les rudiments de *C. elegans* ainsi que les bases génétiques. J'ai alors pu continuer la caractérisation du rôle de PPM-2 dans la régulation des courts ARN non codants. Dans la dernière année, j'ai également eu la chance de pouvoir compter sur l'aide de notre PPR, François Houle, qui possède une expertise en biologie moléculaire. Une collaboration avec un étudiant du laboratoire du Dr Weifeng Gu, nous a également permis d'obtenir des résultats de séquençage à haut débit des courts ARN. J'ai réalisé la plupart des expériences présentées dans ce chapitre 2 et les expériences ont été conçues par moi-même en étroite collaboration avec le Dr. Martin J. Simard. Ce projet est en préparation pour soumission.

Certaines études génétiques ont été réalisées par Gabriel Bossé, notamment celle évaluant une possible interaction génétique entre *ppm-2* et le gène *let-60* (Figure 18B) ainsi que celle évaluant l'efficacité de répression du gène *lin-41* par le miARN *let-7* chez des animaux mutés pour *ppm-2* (Figure 18C). Les graphes représentant la quantification des miARN et des piARN chez des animaux mutants (Figure 19B et 23B-C) ont été réalisés par Lichao Li. L'immunobuvardage de la protéine PRG-1 (Figure 21B) a été réalisée par François Houle. En somme, j'évalue ma contribution globale à cet article à 70%.

2.1. Résumé

Les protéines Argonautes s'associent à des courts ARN non codants tels que les miARN, les piARN et les siARN afin de réguler l'expression des gènes. Par conséquent, une mutation de l'un de ces courts ARN affecte le bon développement de l'animal ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaire. Les protéines Argonautes représentent la composante majeure des complexes effecteurs. Chez *C. elegans*, nous avons identifié PPM-2, une sérine/thréonine phosphatase dépendante de Mg^{2+}/Mn^{2+} , comme étant un interacteur du complexe de

dégradation DCS-1/XRN-1 qui entraîne la dégradation de certains miARN. Nous avons démontré que PPM-2 est impliquée dans la régulation des miARN de la famille *let-7* mais aussi dans la régulation de l'interférence à l'ARN nucléaire et, que cette phosphatase contribue à la fonction des piARN. La perte de fonction de *ppm-2* affecte le niveau d'expression des piARN ainsi que la stabilité des protéines Argonautes ALG-1, PRG-1 et NRDE-3 qui sont envoyées à la dégradation par la voie du protéasome. En conclusion, nos résultats suggèrent que PPM-2 régule la fonction des courts ARN non codants en empêchant la dégradation, par la voie du protéasome, des protéines Argonautes.

2.2. Abstract

Argonaute proteins associate with small non-coding RNAs such as microRNAs, piRNAs and siRNAs to regulate gene expression required for cell proliferation and differentiation. Argonaute proteins are the major components of effector complexes. In *C. elegans*, we identified PPM-2, a Mg^{2+}/Mn^{2+} -dependent serine/threonine phosphatase, as a partner of the degradation complex DCS-1/XRN-1 that performs microRNA turnover. We demonstrate that PPM-2 is implicated in the regulation of the *let-7* microRNA family but also in the regulation of nuclear RNAi and that it contributes to the function of piRNAs. Loss of *ppm-2* affects the expression level of piRNAs and the stability of ALG-1, PRG-1 and NRDE-3 Argonaute proteins by sending them to the proteasomal degradation pathway. Altogether, our findings suggest that PPM-2 is regulating the function of small non-coding RNA pathways by preventing Argonaute proteins to be degraded via the proteasomal pathway.

2.3. Introduction

In metazoans, small non-coding RNAs, including microRNAs (miRNAs), Piwi-interacting RNAs (piRNAs), also called 21U-RNAs in *C. elegans*, and small interfering RNAs (siRNAs) have emerged as major regulators of gene expression. Following their biogenesis, these small RNAs associate with Argonaute proteins to form effector complexes called RISCs (RNA-induced silencing complexes) (Sheu-Gruttadauria and MacRae 2017). The RISC complexes use sequence complementarity to bind messenger RNA (mRNA) in order to regulate gene expression via translational and/or transcriptional repression (Aalto and Pasquinelli 2012).

Argonaute proteins are the major actors allowing the regulation of gene expression mediated by small non-coding RNAs. In the past years, 26 Argonaute proteins were discovered in *C. elegans*, and, for the most part, their specific functions were uncovered. Argonaute proteins ALG-1 and ALG-2, are essential for the miRNA pathway which dominate the class of small RNAs in somatic tissue (Vasquez-Rifo et al. 2012; Grishok et al. 2001). PiRNAs, the germline-specific small RNAs, require the presence of PRG-1 to inhibit transposon expression since only the loss of function of *prg-1* and not *prg-2* affect the accumulation of 21U-RNAs (Wang and Reinke 2008; Batista et al. 2008). In *C. elegans*, there are two pathways that are characterized by the source of the double stranded RNA. ERGO-1 and CSR-1 are essential for endogenous siRNA (endo-siRNA) whereas RDE-1 is required for exogenous siRNA (exo-siRNA) (Yigit et al. 2006). Finally, the WAGOs (*Worm-specific Argonautes*) function in both siRNA pathways (Yigit et al. 2006; Gu et al. 2009) but some of them have a specific function due to their localization. For example, NRDE-3 (WAGO-12) regulates gene expression in the nucleus of somatic cells (Guang et al. 2008) whereas HRDE-1 (WAGO-9) is expressed in the nucleus of germline cells (Buckley et al. 2012). All these studies allowed us to better understand how small non-coding RNA regulate gene expression.

Despite significant advances in our understanding of the function and the regulation of small RNAs, little is known about their turnover. Small RNA pathways are involved in diverse biological functions like cell proliferation, differentiation, control of development and protection against genomic invaders (Huang et al. 2013). Therefore, controlling their function and turnover is essential for cells. Naturally, small RNAs are really stable due to their sequestration within Argonaute proteins (Sanei and Chen 2015). Previous work has identified some specialized targets that mediate miRNA degradation or target-directed miRNA degradation (TDMD) (De La Mata et al. 2015). It has also been shown that exonucleases control miRNA turnover (Chatterjee and Groszhans 2009) and that the degradation complex DcpS/XRN is present in both *C. elegans* and human cells to degrade miRNAs (Bossé et al. 2013; Meziane et al. 2013). Recently, a study in human cells showed that an endonuclease called TSN initiates the decay of both protein-free and AGO2-loaded miRNAs (Elbarbary et al. 2017). This mechanism needs the activity of an helicase called UPF1, which is able to

dissociate the miRNA from his target (Elbarbary et al. 2017). On the other hand, the mechanisms implicated in the turnover and the stability of the major effector of small RNAs, Argonaute proteins, are less understood. The unloaded Argonaute proteins are unstable in cells and are degraded by the lysosome (Gibbings et al. 2012), which can explain why AGO proteins congregate at endosomes and multivesicular bodies (MVBs) (Gibbings et al. 2009). Alternatively, it has been shown that Argonaute proteins are degraded via the ubiquitin-proteasome system (Smibert et al. 2013; Rybak et al. 2009; Johnston and Hutvagner 2011; Chinen and Lei 2017). The stability of Argonaute proteins is also sensitive to miRNA availability (Martinez and Gregory 2013; Smibert et al. 2013; Martinez et al. 2013; Connerty et al. 2016) and is affected by hydroxylation (Qi et al. 2008) and sumoylation (Sahin et al. 2014). In *Drosophila*, Aubergine and AGO3, which are homologs of PIWI Argonautes, have to be methylated by protein methyltransferase 5 (PRMT5) to be stable (Kirino et al. 2009). However, is it still unclear what triggers RISC turnover and how disassembly and degradation of its parts are orchestrated.

In order to uncover factors implicated in the turnover of the miRNA pathway components, we performed an immunoprecipitation of the miRNA degradation complex DCS-1/XRN-1 in *C. elegans* (Bossé et al. 2013) followed by mass spectrometry analysis of associated proteins. Among the interacting proteins, we identified the phosphatase PPM-2 as an interactor of this degradation complex. We found that *C. elegans* PPM-2 is an important regulator of the diverse small RNA pathways. Our data reveal that PPM-2 is essential for the stability and function of specific Argonaute proteins required for the miRNA, piRNA and nuclear siRNA pathways in worms by preventing their proteasomal degradation.

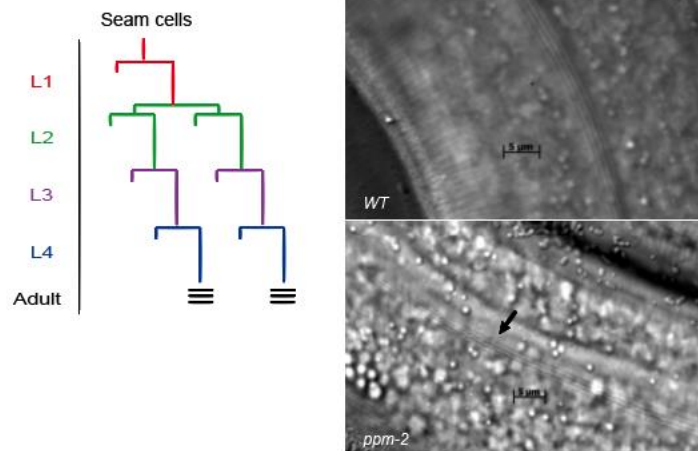
2.4. Results

2.4.1. *ppm-2* is implicated in the regulation of the miRNA pathway

In order to assess the implication of PPM-2 in the miRNA pathway, we studied the alae structure in *ppm-2* loss of function animals. The development of seam cells into a structure called alae is a complex process of cell division, differentiation and morphogenesis. The proper development of this postembryonic event is robustly controlled temporally and

spatially by miRNAs such as the members of the *let-7* family (Abbott et al. 2005; Reinhart et al. 2000). A defect of this developmental program is frequently observed in mutants of core components of the miRNA pathway and its modulators (Hammell et al. 2009; Grishok et al. 2001; Büssing et al. 2010; Zhang et al. 2007; Jannot et al. 2011; Vasquez-Rifo et al. 2013). Inappropriate terminal differentiation of seam cells leads to discontinuities of the cuticular alae structure that are indicator of possible alteration in their developmental program. We analyzed *ppm-2* mutants and observed that 40% of them show a mild but penetrant defect on the alae structures (Figure 17A). We then proceeded to monitor the defects of the *ppm-2* mutant in the absence of functional mRNA-specific Argonaute genes, *alg-1* and *alg-2* (Vasquez-Rifo et al. 2012; Grishok et al. 2001). While we did not observe any enhancement of alae defects in *ppm-2; alg-2* double mutant animals (data not shown), combining the loss of both *ppm-2* and *alg-1* genes caused a very prominent increase in alae defects, when compared to single mutant animals (Figure 17B). In addition, the enhancement of alae defects was correlated with an increase in the number of seam cells (Figure 17C) supporting a defect in the control of their division during animal development. Taken together, these results indicate that *ppm-2* is important for the miRNA-dependent gene regulation during seam cells development.

A



B

	% Alae defect			% Lethality transition L4-adult	n
	Normal	Break	Minor		
<i>ppm-2</i>	60		40		20
<i>alg-2</i>	66		34		22
<i>alg-1</i>	36	28	36	6,6	25
<i>ppm-2;alg-2</i>	65		35		21
<i>ppm-2;alg-1</i>	36,4	50	13,6	21	22

C

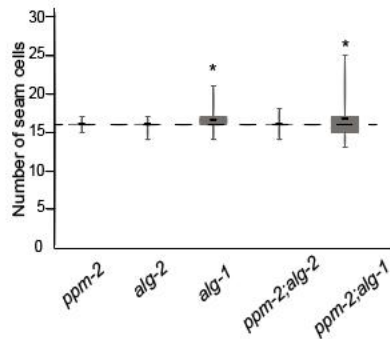


Figure 17 : *ppm-2* is implicated in the microRNA pathway

(A) Representative image of alae defects seen in *ppm-2* mutant. In young adult wild-type animals, alae are normal (left) while 40% of young adult *ppm-2* mutant animals show alae defects in their structure (right). (B) Alae defects and lethality during the transition L4-adult were scored in *ppm-2*, *alg-1* and *alg-2* simple mutant also *ppm-2;alg-1* and *ppm-2;alg-2* double mutant animals at the L4/Adult stage transition. n: number of animals scored. (C) *alg-1*, *alg-2* and *ppm-2* mutants were crossed with a strain where the GFP is tagged to the seam cells (*scm::GFP*) and the number of seam cells were scored in young adults animals. Box plot recapitulating all the individual counts of seam cells in *ppm-2* (n=99), *alg-1* (n=45), *alg-2* (n=85), *ppm-2;alg-1* (n=55) and *ppm-2;alg-2* (n=73) mutant animals (n: number of animals scored). The dashed line represents the number of seam cells found in wild-type animals. The bottom and the top of the box represent the difference between the first and the third quartile with the median. The bottom and the top of whiskers show the minimum and the maximum of seam cells observed. P-values were obtained using Student test (p<0,01).

2.4.2. The loss of *ppm-2* alters *let-7* family miRNAs gene regulation

The loss of *let-7* and its miRNA family members miR-48, miR-84 and miR-241 either alone or in pairs leads to seam cells and other developmental defects of varied penetrance, thereby creating useful genetic backgrounds to monitor the action of miRNA pathway modulators such as the GARP complex (Vasquez-Rifo et al. 2013) and NHL-2 (Hammell et al. 2009). We first evaluated the regulation mediated by the *let-7* miRNA that is important to control the developmental program at the L4 to adult transition. The complete loss of *let-7* causes a highly penetrant phenotype of bursting through the vulva (Reinhart et al. 2000) that is typically used as readout of miRNA function (Parry et al. 2007). While we did not observe any bursting phenotype for the *ppm-2* mutant, its loss exacerbated the phenotype seen for *alg-1* mutant animals (Figure 18A). We confirmed that a similarly strong enhancement of this phenotype is also detected in animals carrying the *let-7* hypomorphic mutation (Bagga et al. 2005; Reinhart et al. 2000).

To determine whether *ppm-2* acts on others *let-7* family miRNAs targets, we investigated the regulation of vulva development by miRNA-targeted *let-60*, a gene essential in the control of vulval cell fate (Beitel et al. 1990; Han et al. 1990; Han and Sternberg 1990). *Let-7* family miRNAs participate in this developmental process via the downregulation of *let-60* in specific vulva precursor cells (Johnson et al. 2005). In absence of this important regulation, ectopic expression of *let-60* in these cells lead to a supernumary vulva-like structure known as the Muv phenotype (Beitel et al. 1990; Han et al. 1990; Han and Sternberg 1990). The miRNA-mediated regulation of this gene can modulate the penetrance of the Muv phenotype observed in gain-of-function mutants (Vasquez-Rifo et al. 2013; Hammell et al. 2009). While the loss of *ppm-2* did not display any Muv phenotype, the absence of *ppm-2* in animals carrying a gain-of-function allele of *let-60* enhanced by more than two-fold the number of animals with multivulva seen in *let-60(n1056)/+* animals (Figure 18B). These results suggest that *ppm-2* contributes in the regulation of *let-7* family miRNAs.

To address whether PPM-2 is implicated in the function of miRNAs other than the *let-7* family, we investigated the regulation of ASEL neuron (*Amphid Sensory Neurons Left*) development by the *lxy-6* miRNA. This miRNA promotes the adoption of a specific cell fate

by the ASEL chemosensory neurons resulting in a functional asymmetry between it and its counterpart, the ASER neuron (Johnston and Hobert 2003). In the ASEL neuron, the repression of the *lgy-6* targeted gene, expressing the transcription factor COG-1, leads to the activation of ASEL-specific gene expression. In particular, *lgy-6* mediated repression leads to the transcriptional derepression of *lim-6* (Johnston and Hobert 2003). Thus, a transcriptional fluorescent reporter of *lim-6* (*lim-6p::GFP*) can be used as an indicator of *lgy-6*-mediated *cog-1* silencing (Vasquez-Rifo et al. 2013; Flamand et al. 2016). While the hypomorphic *lgy-6(ot150)* mutation induced a mildly penetrant loss of this reporter, we observed that the loss of *ppm-2* did not exacerbate its derepression (Figure 24), suggesting that *ppm-2* is not implicated in the gene regulation mediated by the *lgy-6* miRNA.

We next tested whether the loss of *ppm-2* led to the misregulation of *lin-41*, a known target of *let-7* that is an important regulator of the L4-to-adult developmental transition in *C. elegans* (Slack et al. 2000; Reinhart et al. 2000). To achieve this, we used a GFP reporter under the control of the *lin-41* 3'UTR that contains binding sites for *let-7* miRNA (Slack et al. 2000) (Figure 18C). Consistent with the temporal expression of *let-7*, we observed a strong GFP signal in L3 animals that was abrogated in adult wild-type animals once the *let-7* miRNA level increases at the larvae to adult transition (Figure 18C). In contrast, we observed that in absence of *ppm-2*, the animals still expressed GFP at the adult stage (Figure 18C). Altogether, these observations suggest that *ppm-2* is required for an appropriate gene regulation mediated by the *let-7* miRNA family.

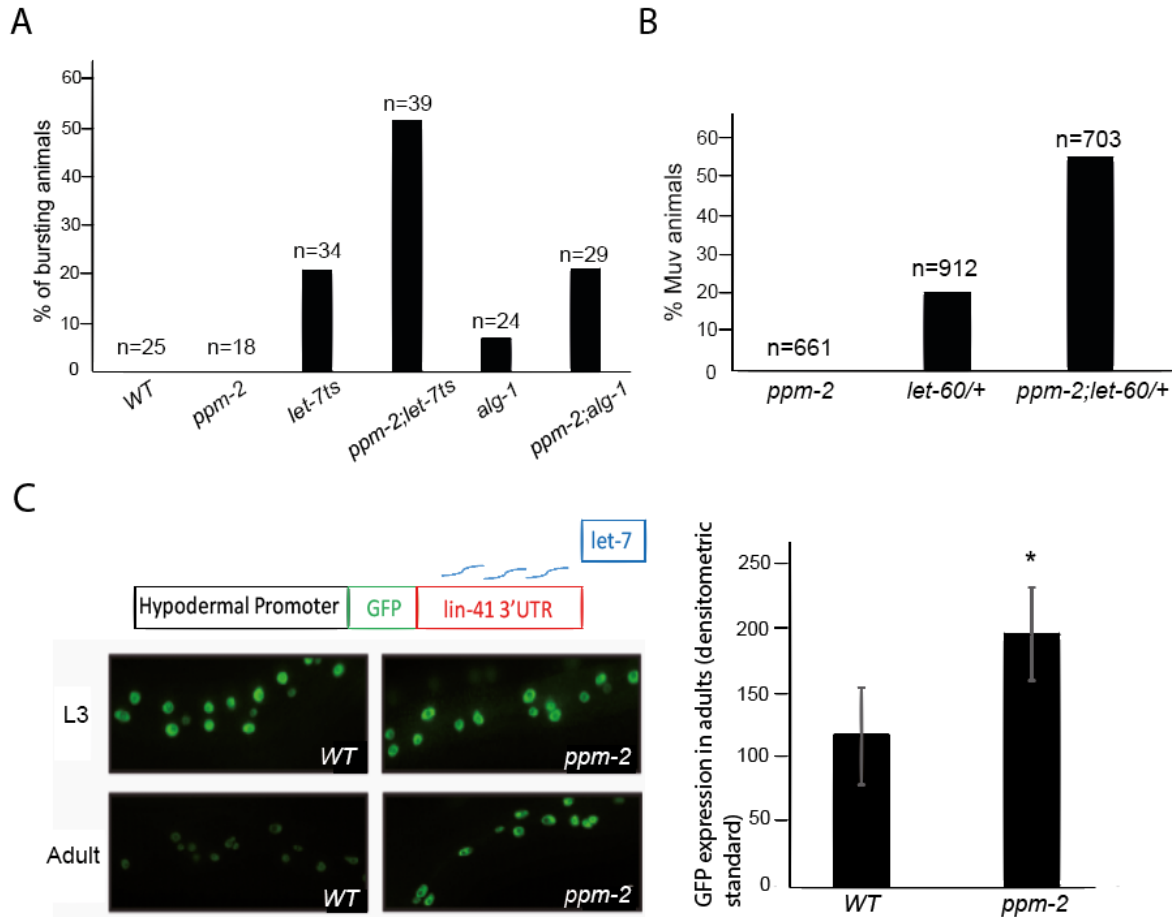


Figure 18 : *ppm-2* is implicated in the regulation of *let-7* miRNA family

(A) *let-7* and *ppm-2;let-7* mutant animals bursting through the vulva were scored at 15°C as well as *alg-1* and *ppm-2;alg-1* mutant animals. n: number of animals scored. (B) Quantification of the multivulva (Muv) phenotype in *ppm-2*, *let-60/+* and *ppm-2;let-60/+* adult animals. Number of animals scored (n) is indicated. (C) Regulation of *lin-41* using a green fluorescent protein (GFP) reporter was monitored. This GFP reporter is under the control of a hypodermic-specific *col-10* promoter and is fused to *lin-41* 3'UTR containing the *let-7* microRNA binding sites (blue lines on diagram). *ppm-2* mutant animals were crossed with animals expressing this reporter. Left: Representative pictures of GFP expression during early larval stage (L3) and adult animals (Adult). Right: Quantification of GFP in adult animals was performed by measuring the mean of the GFP detected in five different cells for each animal. The number of animal scored (n) is indicated. AU: Arbitrary Units. The error bars represent the standard deviation. P-value was obtained using Student test ($p < 0,01$).

2.4.3. The loss of *ppm-2* does not affect miRNA level but promotes ALG-1 degradation through the proteasome

A possible explanation for the role of *ppm-2* in the regulation of *let-7* family miRNAs could be that in *ppm-2* mutant animals, the level of miRNAs is altered. To test this hypothesis, we first monitored the abundance of *let-7* family members by quantitative RT-PCR and Northern blotting (miR-241 and miR-48), we observed no significant changes of miRNA level in *ppm-2* mutant animals when compared to levels detected in wild-type animals (Figures 19A, 25A-B). In order to determine whether the loss of *ppm-2* can affect other miRNAs, we cloned small RNAs from *ppm-2* and wild-type young adult animals and compared miRNA levels using high throughput sequencing. As observed for the *let-7* family miRNAs, we did not see any significant differences between *ppm-2* and wild type animals (Figure 19B). We therefore conclude that the loss of *ppm-2* does not lead to a significant effect on miRNAs abundance.

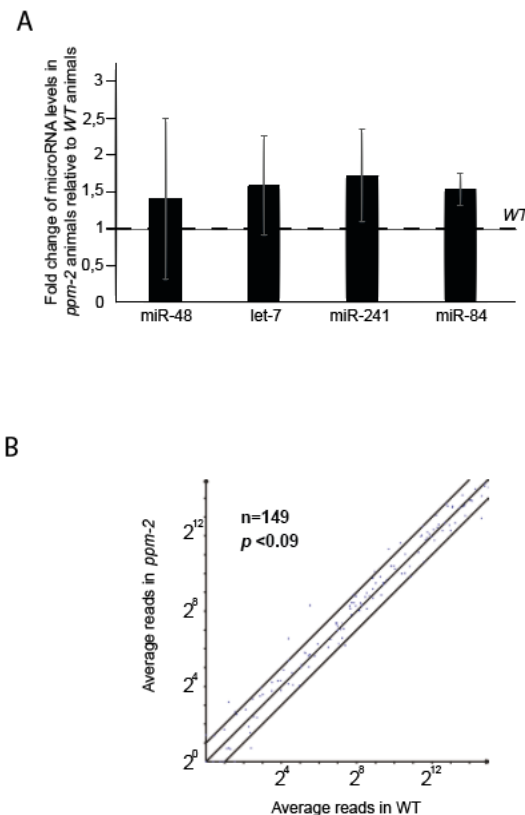


Figure 19 : *ppm-2* does not affect miRNA expression level

(A) The expression level of miR-48, let-7, miR-241 and miR-84 was measured by quantitative RT-PCR in wild-type and *ppm-2* mutant young adult animals. The sn2841 RNA was used as the normalization control. The error bars represent the 95% confidence interval of three independent experiments. (B) Normalized small RNA reads for the wild-type and *ppm-2* mutants were obtained and mapped to genes, each of which is represented by a dot with X reads derived from the wild-type and Y reads derived from the *ppm-2* mutant. The total gene number analyzed (n) and the p-value obtained (two-tailed paired-t-test) are indicated.

We next tested whether *ppm-2* could affect the level of miRISC components. We observed an important decrease of ALG-1 protein in animals lacking *ppm-2* (Figure 20A). To determine if the absence of *ppm-2* guided ALG-1 protein to the proteasome-mediated degradation pathway, we treated wild-type and *ppm-2* animal population with MG132, an inhibitor of proteasome known to be efficient in *C. elegans* (Lee et al. 2012). While we did not observe a significant increase in the expression level of ALG-1 in wild-type animals upon MG132 treatment, we re-established the level of ALG-1 in *ppm-2* animals upon treatment (Figure 20B and 27A). Taken all together, our data suggest that PPM-2 contributes to the miRNA pathway by controlling the level of ALG-1.



Figure 20 : PPM-2 is implicated in the regulation of ALG-1

(A) The detection of ALG-1 was achieved by Western blotting in young adult animals. Actin was used as a loading control. (B) Animals were treated (or not) for 2 hours with proteasome inhibitor MG132 (50uM) and harvested. ALG-1 detection was done as in A.

2.4.4. PRG-1 and NRDE-3 Argonaute proteins are degraded by the proteasome in *ppm-2* mutant animals

Since we showed that *ppm-2* affects the expression level of ALG-1, we wanted to verify if other Argonaute proteins were also affected. We thus evaluated the expression level of other

Argonaute proteins important for different small non-coding RNA pathways in *C. elegans* (Youngman and Claycomb 2014) We first monitored the level of PRG-1, essential of the piRNA pathway (Izumi and Tomari 2014), and observed a decrease of PRG-1 protein in *ppm-2* mutant animals (Figure 21A). We next monitored the expression of NRDE-3, which is the nuclear Argonaute protein essential for the nuclear RNAi (Guang et al. 2008), and observed also a decrease in *ppm-2* compared to wild type animals (Figure 21B). Interestingly, we did not observe any differences in the expression level of CSR-1, RDE-1, HRDE-1 and SAGO-1, which are important Argonaute proteins of the siRNA pathways (Claycomb et al. 2009; Gu et al. 2009; Buckley et al. 2012; Tabara et al. 1999; Yigit et al. 2006), in *ppm-2* animals (Figure 26A-D).

We next tested if PRG-1 and NRDE-3 were also degraded through the proteasome in absence of *ppm-2*. As seen for ALG-1, the treatment with the proteasome inhibitor blocked the degradation of PRG-1 and NRDE-3 in *ppm-2* animals (Figures 21C-D and 27B-C). Taken together, these results indicate that PPM-2 also stabilizes PRG-1 and NRDE-3 Argonautes by preventing their proteasomal degradation.

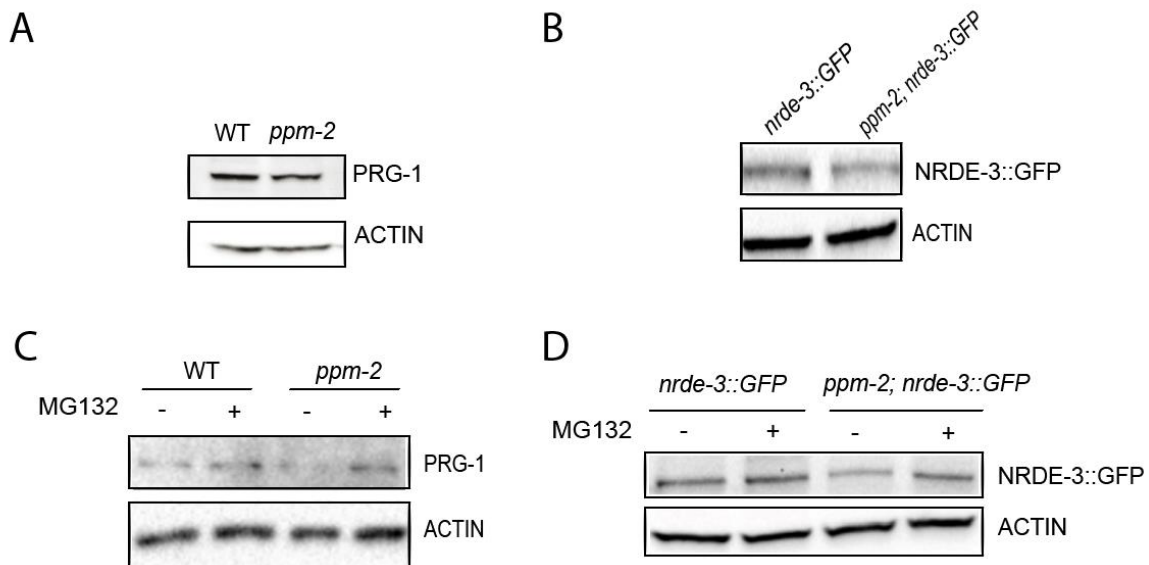


Figure 21 : PPM-2 is implicated in the regulation of PRG-1 and NRDE-3 Argonaute proteins

(A-D) The detection of Argonaute proteins was achieved by Western blotting for young adult animals. Actin was used as a loading control. (C-D) Animals were treated or not for 2 hours with proteasome inhibitor MG132 (50uM) and then harvested in parallel. NRDE-3 was detected by Western blotting.

2.4.5. *ppm-2* is required for nuclear RNAi

Since NRDE-3 is destabilized in *ppm-2* mutant animals, we wanted to know if *ppm-2* affects the efficacy of the exogenous-mediated siRNA pathway in *C. elegans*. To this end, we first monitored functional nuclear RNAi by exposing animals to bacteria expressing dsRNA molecules targeting *lir-1*, a gene which is organized in operon with *lin-26* (Bosher et al. 1999). Upon induction of *lir-1* RNAi, NRDE-3 Argonaute binds siRNAs and targets the *lir-1/lin-26* pre-mRNA in the nucleus, leading to embryonic lethality caused by the loss of *lin-26* (Bosher et al. 1999). Once we exposed *ppm-2* animals to bacteria expressing dsRNA molecules targeting *lir-1*, we observed a strong decrease in embryonic lethality when compared to wild-type animals (Figure 22A). To test whether the resistance observed in *ppm-2* is caused by a defect of those animals to uptake dsRNA molecules, we exposed them to bacteria expressing dsRNA targeting *pos-1* (germline) and *unc-22* (soma) genes, whose knockdown by cytoplasmic RNAi leads to lethality and paralysis, respectively (Yigit et al. 2006). When we compared to wild-type animals, we did not observe any differences in the RNAi response obtained in *ppm-2* animals (Figure 22B), suggesting that the cytoplasmic RNAi is functional in absence of *ppm-2*. We therefore conclude that PPM-2 is involved in the regulation of nuclear RNAi most likely by controlling the level of NRDE-3 Argonaute.

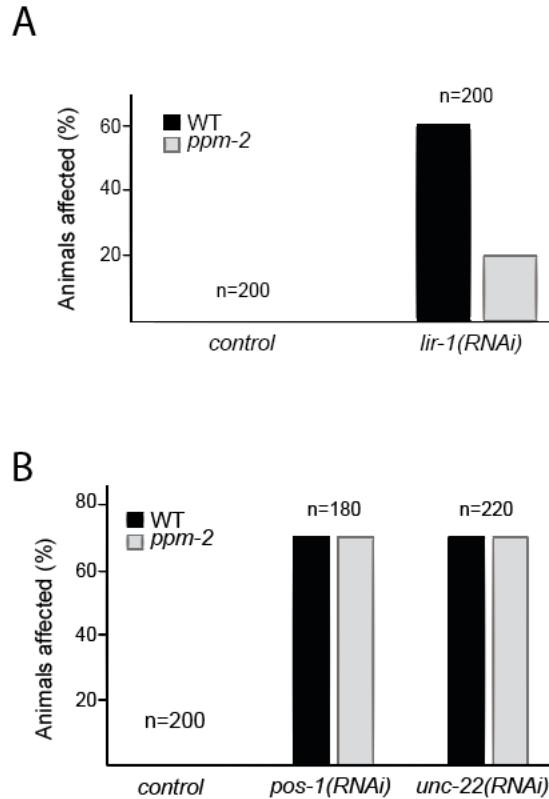


Figure 22 : *ppm-2* affects the function of nuclear RNAi

(A-B) Wild-type and *ppm-2* mutant animals were fed with bacteria expressing either control, *pos-1*, *unc-22* or *lir-1* double-stranded RNA, as indicated. The number of animals scored (n) is indicated.

2.4.6. *ppm-2* is important for the 21U piRNA pathway

Our analyses demonstrated that as for ALG-1 and NRDE-3, the PRG-1 Argonaute that is essential for the piRNA pathway in *C. elegans* is also destabilized in *ppm-2* mutant animals. We therefore wanted to test if *ppm-2* controls the 21U piRNA function by measuring their efficacy to repress Tc1 and Tc3 transposons, which are known targets of piRNAs in *C. elegans* (Das et al. 2008; de Albuquerque et al. 2015). As detected in *prg-1* mutant animals, the loss of *ppm-2* caused an increase in the expression of both Tc1 and Tc3, when compared to wild-type animals (Figure 23A). Moreover, the loss of both *ppm-2* and *prg-1* in animals caused a drastic increase of the expression level of Tc1 and Tc3 (10 fold) (Figure 23A), suggesting that PPM-2 contributes to piRNA-mediated transposons silencing. Interestingly,

when we detected 21U small RNAs by high throughput sequencing, we observed that the global expression level of Type 1 21U piRNAs significantly decreased in *ppm-2* animals (one-tailed paired-t-test, $p < 1.83 \times 10^{-138}$). Although the Type 2 21U appear to decrease as well, this was not significant, likely due to the small read number for each 21U and the large statistical variance. (Figure 23B-C). This decrease of 21U piRNAs is most likely the consequence of the decrease of PRG-1 protein in *ppm-2* animals, which is in line with the observations that the loss of *prg-1* in worms leads to a diminution of these small RNAs (Batista et al. 2008; Wang and Reinke 2008).

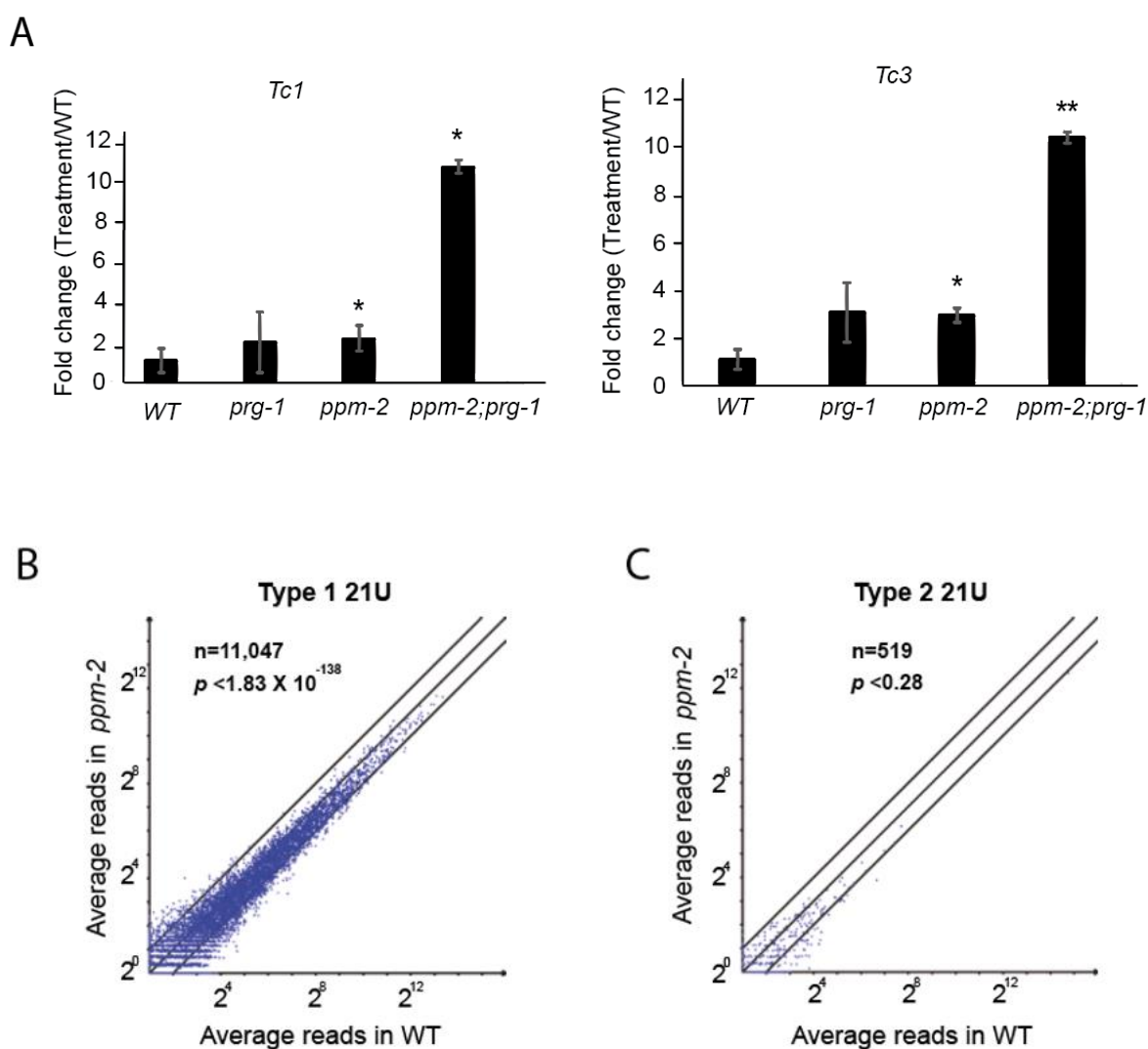


Figure 23 : *ppm-2* is implicated in the piRNA pathway

(A) Expression level of two transposons (Tc1 and Tc3) was measured by quantitative RT-PCR in wild-type, *prg-1*, *ppm-2* and *ppm-2; prg-1* double mutant adult animals. *Q*PCR for tubulin was used as control. Error bars represent standard deviation of 3 independent population of worms grown at 15°C. P values were obtained using Student test (* for $p < 0,05$ and ** for $p < 0,01$). (B-C) Normalized small RNA reads for wild-type and *ppm-2* mutants were obtained and mapped to the genes, each of which is represented by a dot with X reads derived from the N2 and Y reads derived from the *ppm2* mutant. Genes are grouped according to the major classes of small RNAs. Each panel contains the gene number analyzed (n) and the p-value obtained by one-tailed paired-t-test.

Taken together, our data indicate that PPM-2 contributes to the piRNA pathway in addition to the nuclear RNAi and the miRNA pathways by affecting the stability of specific Argonaute proteins that are essential for their gene regulatory pathways.

2.5. Discussion

In this study, we identify new roles of *ppm-2* in the regulation of small non-coding RNA pathways. First, our observations demonstrate that *ppm-2* is necessary to stabilize the principal Argonaute protein of the miRNA pathway, ALG-1, by preventing its proteasomal degradation. By acting on the major protein of the miRISC, PPM-2 is contributing to the function of miRNAs.

Interestingly, PPM-2 is also required to stabilize the principal Argonaute of the piRNA pathway, PRG-1, by preventing its proteasomal degradation. It has been shown that PRG-1 is implicated in the regulation of piRNAs (Wang et al. 2014). This could explain the fact that in *ppm-2* mutant animals, where there is a destabilization of PRG-1, we observed a 2-fold decrease in the expression level of piRNAs leading to a defect in the silencing of transposons Tc1 and Tc3.

Finally, PPM-2 is necessary to stabilize the only Argonaute required for the nuclear RNAi pathway in somatic tissues, NRDE-3, by preventing its proteasomal degradation. Moreover, *ppm-2* mutant animals are resistant only to nuclear RNAi which can be explained by the fact that there is less NRDE-3 to trigger nuclear RNAi in those animals. We did not observe any role of *ppm-2* on the other Argonaute proteins required for the cytoplasmic RNAi. A reason can be that the siRNA pathway uses many Argonaute proteins to amplify the signal during

the silencing process (Yigit et al. 2006). Therefore, redundancy may prevent the effect of *ppm-2* that we see on the nuclear siRNA, which requires only one Argonaute protein to silence nuclear targets.

The *ppm-2* gene encodes a Mg^{2+}/Mn^{2+} -dependent phosphatase that has been shown to be implicated in many cellular activities contributing to disease and cancer (Lu et al. 2014; Budhiraja et al. 2012; Dvashi et al. 2014). So far, the only substrate identified for PPM-2 in *C. elegans* is DLK-1 (Dual Leucine zipper Kinase-1) (Baker et al. 2014), which is a MAP3K well conserved during evolution. In *C. elegans*, human and mouse, this protein has been shown to be important for the neural development and its regeneration (Holland et al. 2016; Tedeschi and Bradke 2013). Due to its unique localization and neuronal function, the probability for DLK-1 to be implicated in small non-coding RNA pathways regulation such as piRNAs, which are most exclusively expressed in the animal germline, is unlikely. While we extensively tried by different methods to detect changes in ALG-1 phosphorylation in *ppm-2* animals, we were not able to get convincing evidence that ALG-1 is a direct substrate of PPM-2. Moreover, our genetic data show that *ppm-2* presents a synergy with *alg-1* and *prg-1*, meaning that *ppm-2* can also affect pathways working in parallel with those Argonautes. One possibility is that *ppm-2* acts as well as on other Argonaute proteins required for the miRNA pathway such as ALG-2 (Vasquez-Rifo et al. 2012). Notably, this redundancy has not been described for nuclear RNAi in which NRDE-3 is the only Argonaute reported to be essential. We can therefore propose that PPM-2 dephosphorylates a substrate that acts on the stability of several Argonautes. Further studies will be required to elucidate the direct substrate of PPM-2 that is implicated in the regulation of small non-coding RNAs.

Taken all together, our data present insight into the regulation of small non-coding RNA pathways by PPM-2. This is a new function for this phosphatase acting on the regulation of the function of diverse small non-coding RNAs through its role in the control of the stability of Argonaute proteins.

2.6. Experimental procedures

Nematode methods:

C. elegans strains were grown in standard conditions (Brenner 1974). All experiments were performed at 20°C unless otherwise noted. The RNAi by feeding was performed on nematode growth media (NGM) plates containing 1 mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) after overnight induction (25°C) of the bacterial culture, as described previously (Vasquez-Rifo et al. 2013).

***C. elegans* strains**

Wild type *N2*; *ppm-2(ok2186)*; *alg-1(gk214)*; *alg-2(ok304)*; *let-7(n2853)*; *let-60(n1046)*; *612.5: col-10p::GFP::lin-41 3'UTR*; *lsy-6(ot150)*; *ppm-1(ok578)*; *nrde-3p::3xFLAG::GFP::NRDE-3*

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.

Quantitative PCR

Quantitative RT-PCR analyses were performed with 10ng of total RNA, isolated from staged populations of worms, using either TaqMan Gene Expression Assay kit (Life Technologies) for detecting *let-7*, *miR-48*, *lin-4*, *miR-80* miRNA and *miR-20A* (control) or SYBR green ROX mix (Invitrogen) for detecting *Tc1*, *Tc3* transposons and *sn2841* (small nucleolar RNA; endogenous control) following manufacturers procedures. Specific assays for *let-7* (Assay ID:000377), *cel-lin-4* (Assay ID:000258), *cel-miR-48* (Assay ID: 000208) and *cel-miR-80* (Assay ID:000232) were purchased from Life Technologies.

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 software (Fujifilm). DNA probes were designed and radiolabeled using the Starfire system (IDT) and α -³²P dATP (Perkin Elmer).

Total worm lysate preparation

Populations of synchronized animals were harvested at the young adult stage. When mentioned, the worms were treated by rotating them in suspension for two hours with 50 μ M of MG132 in M9 (3g KH₂PO₄, 6g Na₂HPO₄, 0,5g NaCl, 1g NH₄Cl and H₂O). Harvested animals were homogenized in ice-cold lysis buffer (100 mM potassium acetate, 30 mM HEPES-KOH [pH 7.4], 2 mM magnesium acetate, 1 mM dichlorodiphenyltrichloroethane [DDT], 0.5% [v/v] Triton X-100, 2% [v/v] SUPERase-In [Ambion], and Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail [Roche]). The homogenized extract was clarified by centrifugation at 1.400 \times g for 10 min at 4°C, and the protein concentrations of the different samples were normalized using DC protein assay (Bio-Rad).

Western Blot analysis

To detect ALG-1 or PRG-1 or GFP::*NRDE-3*, the total protein extract was boiled for 10 minutes in 20 μ l 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 8% acrylamide gel and transferred to Hybond-ECL membranes (GE Healthcare). Membranes were incubated overnight at 4°C with the following antibodies: (i) Rabbit polyclonal ALG-1 diluted 1:1,000; or (ii) Rabbit polyclonal PRG-1 protein diluted 1:1,000; or (iii) Mouse monoclonal GFP (Roche) diluted 1:1,000. Antibodies were diluted in PBST-5% milk solution (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl [pH 7.4], 0.05% [v/v] Tween-20 and 5% [w/v] dried milk). Membrane was incubated for 1 hour at room temperature with HRP-conjugated secondary antibody in PBST and then revealed using Western Lightening ECL Kit (Perkin Elmer) and visualized using Chemidoc imaging system (Biorad).

RNA Cloning and Sequencing

TruSeq small RNA libraries were prepared and sequenced as described (Gu et al. 2009), with some modifications. The small RNAs of less than 200 nucleotides were enriched using mirVana kits (Ambion). Then the small RNA was ligated with a 3' TruSeq linker. In this ligation, a home-made RNA polyphosphatase was added to convert 5' triphosphorylated RNAs to monophosphorylated RNA. The 3'-ligated and 5'-treated RNA was ligated with a 5' TruSeq linker. The RNA was reverse-transcribed, and PCR amplified with full TruSeq linkers (Gu et al. 2009; Gu et al. 2011). Libraries were sequenced using an Illumina HiSeq instrument at the Genome Quebec Innovation Center (Montreal, Qc).

Bioinformatics

Reads were mapped to the genome and cDNA using custom PERL (5.10.1) scripts and Bowtie 0.12.7 (Langmead et al. 2009). Databases used include *C. elegans* genome (WormBase release WS215), Repbase 15.10 (Jurka et al. 2005), and miRBase 16 (Kozomara and Griffiths-Jones 2011). Generic Genome Browser (Stein et al. 2002) was used to visualize alignments. Detailed PERL scripts and related database files and analyses in this study are available upon request.

List of oligonucleotides

-Starfire DNA probes

miR-241: tcatttctcgactacctca

miR-48: tcgcatctactgagcctacctca

tRNA^{gly}: gcttgaaggcatccatgctgaccatt

2.7. Acknowledgements

We thank members of our laboratory for comments on the manuscript. We also thank Julie

Claycomb, Eric Miska and Craig Mello for reagents. Some nematode strains were provided by the *Caenorhabditis* Genetics Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR). This work has been funded by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-130327). G.D.B. was a recipient of a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Graham-Bell Scholar. M.J.S. holds a Research Chair from Fonds de Recherche du Québec-Santé.

2.8. Supplemental information

- Figure 24 (S1) related to Figure 18
- Figure 25 (S2) related to Figure 19
- Figure 26 (S3) related to Figure 21
- Figure 27 (S4) related to Figure 20 et 21

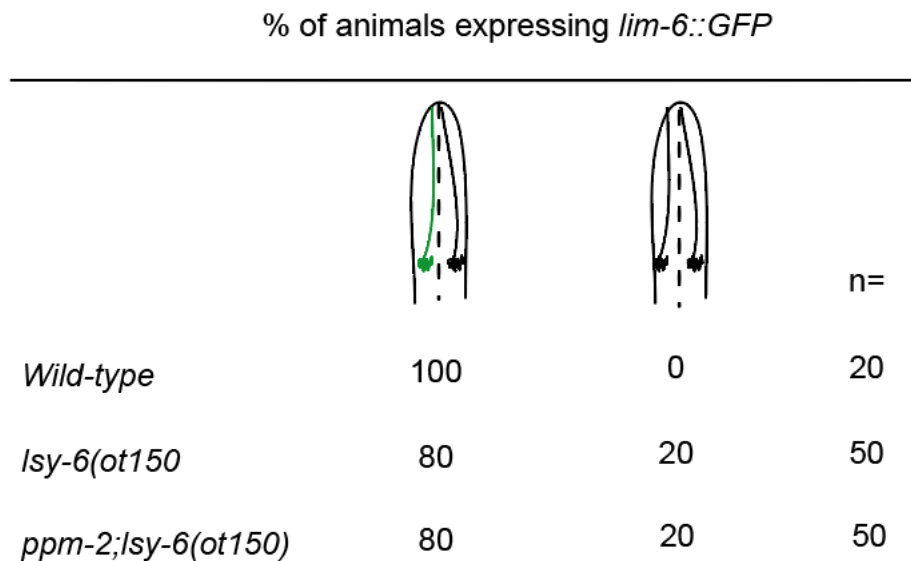


Figure 24 : PPM-2 is not implicated in the regulation of the miRNA *lsy-6*

Figure S1: Quantification of *lim-6^{pro}::GFP* misexpression phenotype in wild type, *lsy-6(ot150)* and *ppm-2;lsy-6(ot150)* young adult animals. The number of animals scored (n) is indicated.

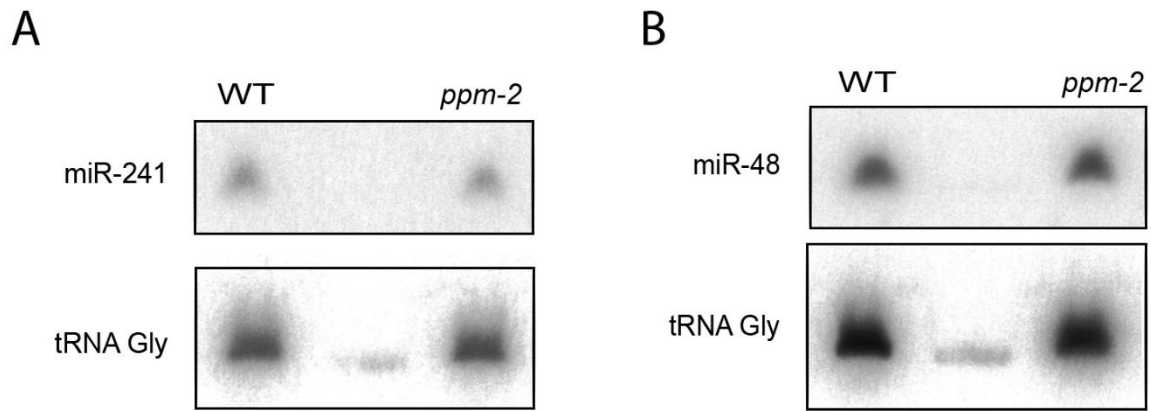


Figure 25 : PPM-2 does not affect miRNA expression level

Figure S2: (A-B) The expression level of miR-241 and miR-48 was detected by Northern blot hybridization of RNA samples purified from young adult wild-type and *ppm-2* mutant animals. tRNA^{Gly} (transfer RNA glycine) was used as a loading control.

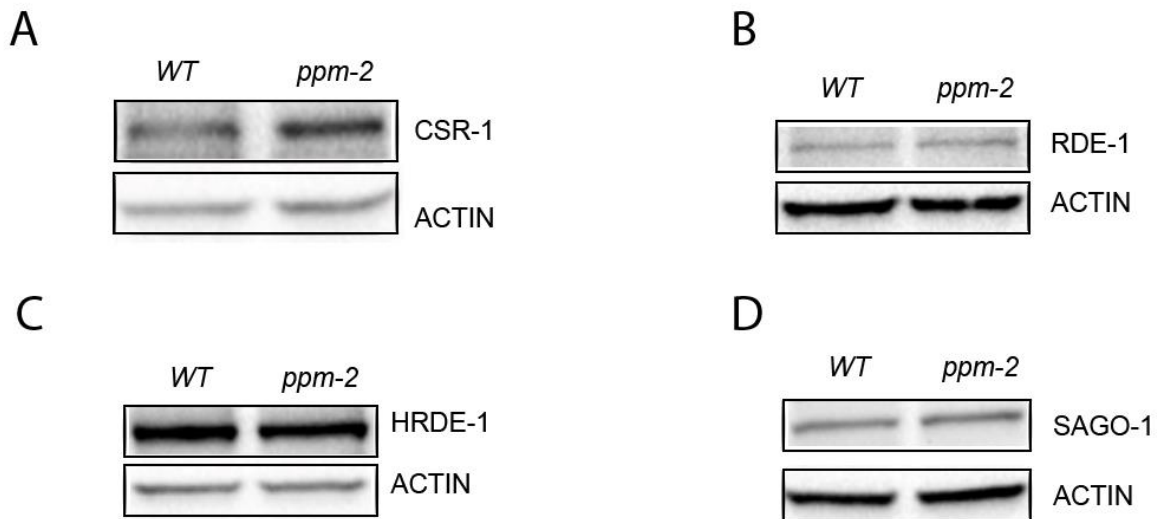


Figure 26 : PPM-2 is not implicated in the regulation of Argonaute proteins of the siRNA pathway

Figure S3: (A-D) The detection of CSR-1, RDE-1, HRDE-1 and SAGO-1 was achieved by Western blotting on protein extracts from wild-type and *ppm-2* mutant young adult animals. Actin was used as a loading control.

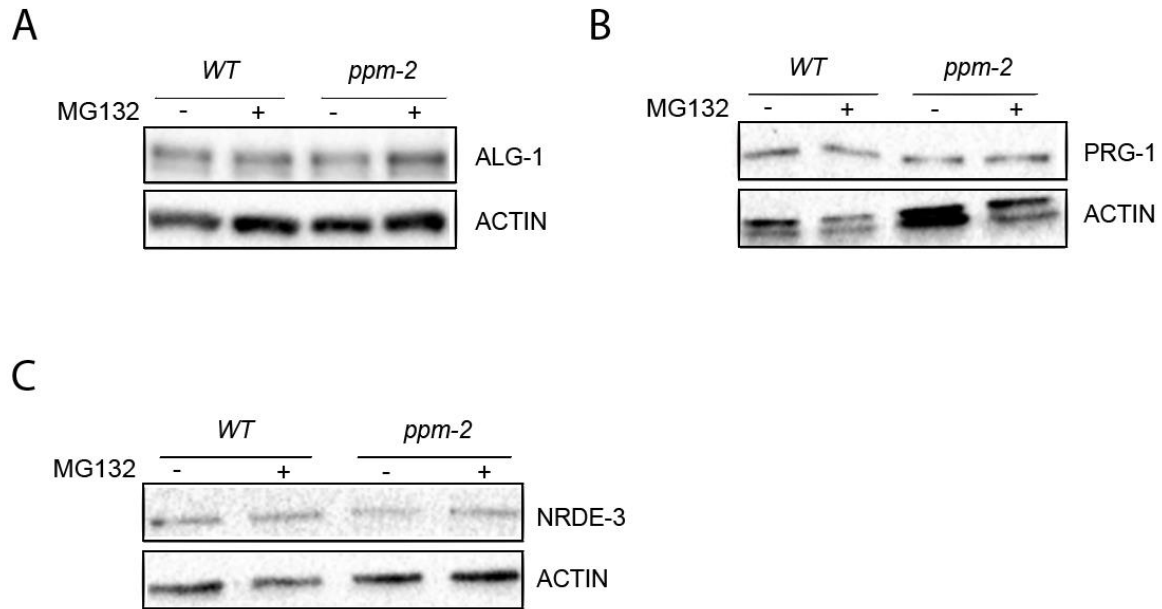


Figure 27 : PPM-2 prevents the proteasomal degradation of Argonaute proteins

Figure S4: (A-C) Mix population or young adult animals (for PRG-1) of the indicated genotypes were treated or not for 2 hours with 50 μ g of MG132. After then they were harvested in parallel. The detection of ALG-1, PRG-1 and NRDE-3::GFP was achieved by Western blotting on protein extracts. Actin was used as a loading control.

Chapitre 3 : HECD-1, une ubiquitine ligase importante pour la voie des miARNs

Lucile Fressigné, Gabriel Bossé, Guillaume Landry-Proulx et Martin J. Simard

Avant-propos

Depuis les 20 dernières années, de nombreux laboratoires de recherche se sont concentrés sur l'étude de la voie des miARN. Bien que les travaux de recherche se soient beaucoup intéressés à la compréhension de la voie de biogénèse des miARN, les étapes de dégradation ou de recyclage de ces molécules restent incomprises.

L'une des thématiques du laboratoire du Dr Martin Simard est d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la voie des miARN. En 2013, l'une de ces études a mis en évidence l'existence d'un complexe de dégradation des miARN constitué des protéines DCS-1 et XRN-1. Cette découverte a permis de mettre en lumière le premier modulateur de la dégradation des miARN chez les animaux. Suite à cela, nous avons voulu identifier de nouveaux interacteurs de ce complexe de dégradation afin de mieux le caractériser.

L'immunoprécipitation de la protéine DCS-1, réalisée par un ancien étudiant au laboratoire, Gabriel Bossé, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, a permis d'identifier plusieurs candidats pouvant être impliqués dans le complexe DCS-1/XRN-1. Parmi tous les candidats, la sélection de ceux jouant possiblement un rôle dans la voie des miARN a été réalisée par un stagiaire d'été, Guillaume Landry-Proulx. Ce chapitre regroupe les travaux que j'ai effectué au début de mon doctorat et concerne la caractérisation préliminaire de l'un de ces candidats, soit l'ubiquitine ligase HECD-1. Ma contribution pour ce chapitre est de 80%.

3.1. Résumé

Les courts ARN non codants tels que les miARN, en s'associant aux protéines Argonautes (ALG-1/2), agissent comme de puissants régulateurs de l'expression des gènes. De ce fait, plusieurs évidences supportent qu'une dérégulation de leur niveau cellulaire contribue au développement et au maintien de nombreuses pathologies telles que le cancer. C'est pourquoi le contrôle de la stabilité et de la biogénèse des miARN est un mécanisme primordial au bon fonctionnement d'une cellule. Dans le but de mieux comprendre comment le niveau des miARN est régulé, nous avons identifié l'E3 ubiquitine ligase HECD-1 comme étant un

nouveau composant du complexe de dégradation DCS-1/XRN-1. Chez *C. elegans*, la perte de fonction de *hecd-1* induit des défauts développementaux qui sont associés à des défauts dans la voie des miARN. De plus, *hecd-1* interagit génétiquement avec le miARN *let-7* en diminuant les phénotypes associés à la perte de fonction de ce dernier. De manière intéressante, la perte d'*hecd-1* entraîne une augmentation de l'expression de plusieurs miARN. Finalement, des animaux mutés pour *hecd-1* ont une progéniture diminuée et présentent un phénotype encore plus pénétrant lorsqu'ils sont croisés avec des animaux mutés pour *alg-1*. En effet, des animaux *ppm-2;alg-1* sont stériles. En conclusion, nos résultats préliminaires suggèrent que l'ubiquitination d'une protéine par HECD-1 est importante pour la dégradation ou la transcription des miARN matures ce qui pourrait affecter le bon développement des nématodes.

3.2. Introduction

Les miARN s'associent à la séquence 3' UTR des ARNm afin de réprimer leur production protéique. Au cours du développement et de la différenciation cellulaire, le niveau des miARN matures varie. Certains doivent être dégradés tandis que d'autres doivent être exprimés (Rüegger and Großhans 2012). Le développement du nématode *C. elegans*, par exemple, se caractérise par la succession de 4 stades larvaires (L1 à L4) qui sont finement contrôlés par l'expression temporelle des miARN de la famille *let-7* et le miARN *lin-4* (Abbott et al. 2005; Reinhart et al. 2000; Wightman et al. 1993). Par conséquent, une mutation de l'un de ces miARN affecte le bon développement de l'animal.

Au cours des dernières années, plusieurs équipes de recherche ont permis de mieux caractériser les différentes étapes de biogénèse des miARN et de décrire différentes méthodes de régulation des miARN (Ha and Kim 2014). Cependant, les étapes de dégradation et de recyclage des facteurs formant le miRISC sont encore peu comprises. Certaines études suggèrent que les protéines Argonautes, retrouvées au niveau des endosomes et des corps multivésiculaires, sont dégradées par l'autophagie alors que d'autres travaux proposent que les Argonautes sont dégradées via la voie du protéasome (Gibbins et al. 2012; Gibbins et al. 2009; Gibbins et al. 2013; Bronevetsky et al. 2013). Concernant les protéines GW182, leur recyclage est dépendant du transport vésiculaire (Vasquez-Rifo et al. 2013). Les miARN,

eux, sont dégradés par des exonucléases (Chatterjee and Groszhans 2009; Chatterjee et al. 2011) et par le complexe de dégradation DCS-1/XRN-1 (Bossé et al. 2013). Or, ce complexe n'affecte seulement qu'une fraction des miARN. Cette spécificité de reconnaissance de certains miARN reste incomprise.

Les étapes préalables à la dégradation des miARN telles que le relâchement du miRISC de sa cible et la dissociation des protéines Argonautes de leur miARN sont deux mécanismes encore inconnus. L'interaction entre un miARN et sa cible entraîne la protection du miARN (De et al. 2013; Chatterjee et al. 2011; Ameres et al. 2010) et l'interaction de ce dernier avec une protéine Argonaute le stabilise (De et al. 2013). La dissociation de ces interactions, qui sont naturellement stables et favorables au bon fonctionnement de la voie des miARN, doit donc être stimulée. Nous pensons que le recrutement de facteurs encore inconnus ou un changement dans l'état des modifications post-traductionnelles des composants principaux de la voie des miARN peut stimuler le relâchement du miRISC de sa cible et la dissociation des Argonautes de leur miARN cible.

En conclusion, il existe donc plusieurs étapes inexplorées dans la régulation du niveau cellulaire des miARN. La découverte de nouveaux facteurs impliqués dans la dégradation des miARN pourrait permettre d'apporter de nouvelles connaissances.

3.3. Matériel et Méthodes

Souches de *C. elegans* utilisées :

Sauvage *N2*, *hecd-1(ok1437)*, *let-7(n2853)*, *alg-1(gk214)*, *alg-2(ok304)*.

Manipulation de *C. elegans*:

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

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 à Ph 6.8, 2% SDS, 100 mM DTT et 10% glycérol). Les protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE qui a ensuite été coloré au SYPRO (Bio-Rad) en suivant les instructions du manufacturier. Les bandes ont été révélées à l'aide d'une lampe ultraviolet (UV) avant d'être découpées et analysées en spectrométrie de masse.

Spectrométrie de masse :

Les échantillons ont été traités et analysés par la plateforme protéomique du Centre de génomique de Québec situé au centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval.

Microscopie :

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

Extraction d'ARN total :

L'ARN total a été extrait de populations constituées d'environ 150 000 vers au stade jeune adulte. Ils ont été resuspendus dans du TRI Reagent (Sigma) et ont subi trois cycles rapides de congélation-décongélation. L'ARN extrait a été resuspendu dans de l'eau dépourvue de RNase puis quantifié.

RT-PCR quantitatif en temps réel :

La RT-PCR quantitative a été réalisée avec 10 ng d'ARN total en suivant les instructions du manufacturier pour l'utilisation du kit Taqman (Life Technologies). Les sondes spécifiques à let-7 (ID:000377), lin-4 (ID:000258), miR-48 (ID:000208) et miR-20a (ID:000580) proviennent de Life Technologies.

3.4. Résultats

3.4.1. Identification de protéines qui interagissent avec le complexe DCS-1/XRN-1

Afin de mieux comprendre la régulation de la dégradation des miARN, nous avons identifié des protéines interagissant avec le complexe de dégradation DCS-1/XRN-1. Il a été montré que l'activité de décoiffage de DCS-1 n'est pas nécessaire à son rôle dans la dégradation des miARNs mais que son association à XRN-1 l'est (Bossé et al. 2013). Dans le but d'identifier des protéines impliquées dans ce complexe et non dans l'activité de décoiffage de DCS-1, la protéine DCS-1 sauvage et la protéine mutante L32P, qui abolit l'interaction de DCS-1 avec XRN-1 et ainsi, empêche la formation du complexe de dégradation (Bossé et al. 2013), ont été immunoprécipitées. Les bandes se retrouvant uniquement dans la piste correspondant à DCS-1 sauvage (Figure 28) ont été analysées par spectrométrie de masse. Dans ce cas-là, ces bandes correspondent à des protéines qui ont une plus forte probabilité d'être impliquées dans la voie des miARN. A partir de l'analyse protéomique, une liste de 16 candidats potentiels fut établie (Tableau 1). Ceux possédant une activité de modification post-traductionnelle telles que les protéines PPM-2 et HECD-1 ou encore ceux impliqués dans la dégradation des protéines et ARNm furent sélectionnés (Tableau 1).

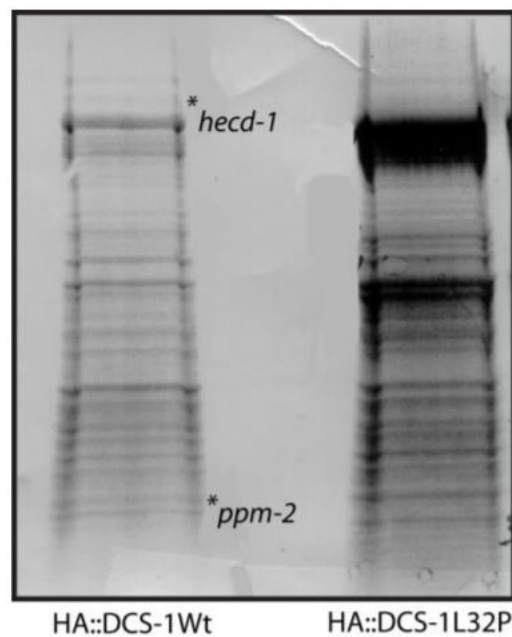


Figure 28 : Identification des interacteurs de DCS-1

Après immunoprécipitation de la protéine HA::DCS-1 sauvage et HA::DCS-1 mutante (L32P), les protéines associées à DCS-1 dans les deux cas ont été séparées sur un gel SDS-PAGE et ont été révélées par coloration au Sypro. Des bandes spécifiques à DCS-1 ont été excisées et analysées en spectrométrie de masse. Les bandes correspondant aux protéines sélectionnées ont été marquées d'une étoile (*) telles que pour la protéine HECD-1.

Tableau 1 : 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 (fbox-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 associée à la membrane des lysosomes	CD68	Protéine associée au lysosome
R151.2	-	PRPS1	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	PPM-2	Protein Phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ 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

3.4.2. Sélection d'HECD-1 comme étant un interacteur intéressant impliqué dans la voie des miARN

Afin de sélectionner parmi nos candidats identifiés précédemment les protéines qui pourraient jouer un rôle important dans la voie des miARN, nous avons étudié les phénotypes associés à la perte de fonction de ces protéines candidates. En particulier, nous avons observé la formation d'une structure hypodermale appelée alae qui permet d'évaluer la fonctionnalité

de la voie des miARN chez *C. elegans*. Ces alae apparaissent à la transition entre le dernier stade larvaire et le stade adulte suite à une prolifération et une différenciation cellulaire spécifique des cellules de couture tout au long du développement larvaire de l'animal. Au stade de jeune adulte, elles vont fusionner. Tout ce processus est contrôlé très finement par des miARN tels que *lin-4* et les membres de la famille *let-7* (Rougvie 2001). Lorsque la voie des miARN est affectée, ceci se traduit par des malformations dans la structure des alae comme chez des animaux mutés pour *ppm-2* où des distorsions sont observées (Figure 17A).

L'analyse de la formation des alae dans les différentes souches mutantes suggère qu'en plus du gène de *ppm-2*, le gène de *hecd-1* est impliqué dans la voie des miARN. En effet, 40% des animaux mutés pour *hecd-1* présentent des distorsions dans la structure des alae (Figure 29).

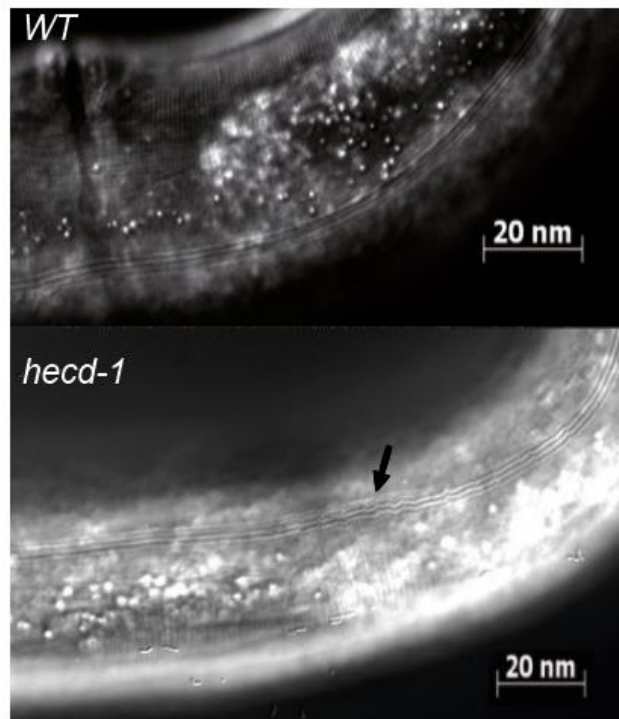


Figure 29 : La perte de *hecd-1* affecte la structure des alae

Images représentatives de la structure des alae chez des animaux sauvages et mutés pour *hecd-1*. 40% des animaux mutés pour *hecd-1* présentent des distorsions dans la structure des alae. La flèche indique ces distorsions.

3.4.3. Caractérisation de la souche mutante *hecd-1(ok1437)*

La protéine HECD-1 est une E3 ubiquitine ligase homologue à HectD1 chez l'humain. Chez *C. elegans*, cette protéine a été montrée comme étant impliquée dans le métabolisme mitochondrial (Segref et al. 2014) et comme modulant l'activité Notch (Chen and Greenwald 2015). Dans le but d'étudier l'implication d'HECD-1 dans la voie des miARNs, nous avons utilisé une souche mutante présentant une délétion dans *hecd-1(ok1437)*, qui est considérée comme un mutant nul (Chen and Greenwald 2015).

Nous avons tout d'abord analysé la progéniture des animaux mutés pour *hecd-1*. Nous avons remarqué que ces derniers avaient une plus petite progéniture que des animaux sauvages. En effet, un nématode hermaphrodite sauvage aura une progéniture constituée d'environ 300 bébés à 20°C, alors que pour des animaux mutés pour *hecd-1*, leur progéniture est en moyenne de 194 bébés (Figure 30). De plus, des animaux *hecd-1* pondront des œufs, qui pour certains, ne pourront éclore suite à des défauts dans la division cellulaire lors de l'embryogénèse (Figure 30). En revanche, les embryons qui échapperont à cette létalité embryonnaire vont par la suite se développer jusqu'au stade adulte normalement. Afin d'évaluer si cette diminution de la taille de la progéniture était attribuable à un défaut dans l'ovogénèse ou la spermatogénèse, nous avons croisé des hermaphrodites *hecd-1* avec des mâles de type sauvage. L'apport de sperme par un mâle sauvage n'a pas permis de rétablir la progéniture, ce qui suggère qu'HECD-1 est importante pour l'ovogénèse (données non montrées).

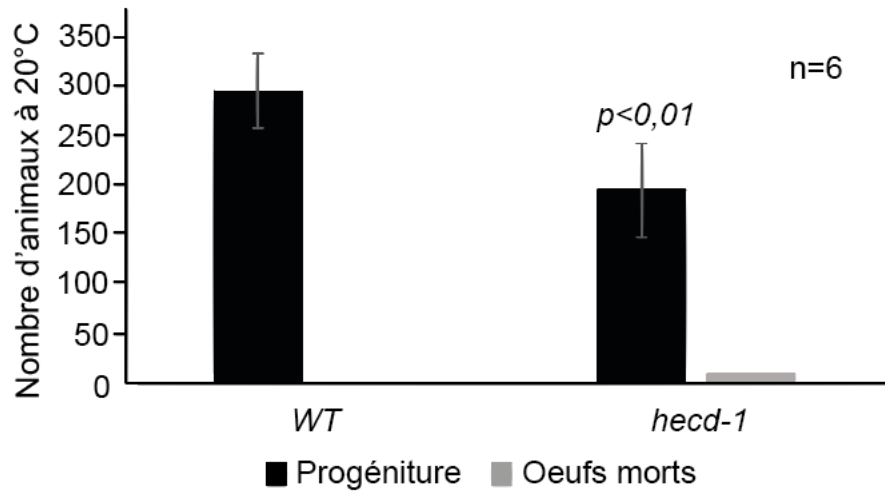


Figure 30 : La perte de fonction de *hecd-1* diminue la taille de la progéniture et affecte le développement embryonnaire à 20°C

À 20°C, le nombre de bébés et d’embryons morts obtenus par 6 hermaphrodites chez des animaux sauvages et mutés pour *hecd-1* a été compté et la moyenne a été calculée. Le nombre de nématodes qui a été compté est indiqué (n). Les barres d’erreurs représentent l’écart type calculé sur trois expériences indépendantes et la p-value est indiquée.

Nous avons observé ces mêmes phénotypes mais encore plus pénétrants lorsque les animaux sont cultivés à 15°C (Figure 31). Dans ces conditions, des animaux sauvages pondront en moyenne 268 bébés alors que des animaux mutés pour *hecd-1* pondront en moyenne 84,5 bébés et 24,5 œufs morts.

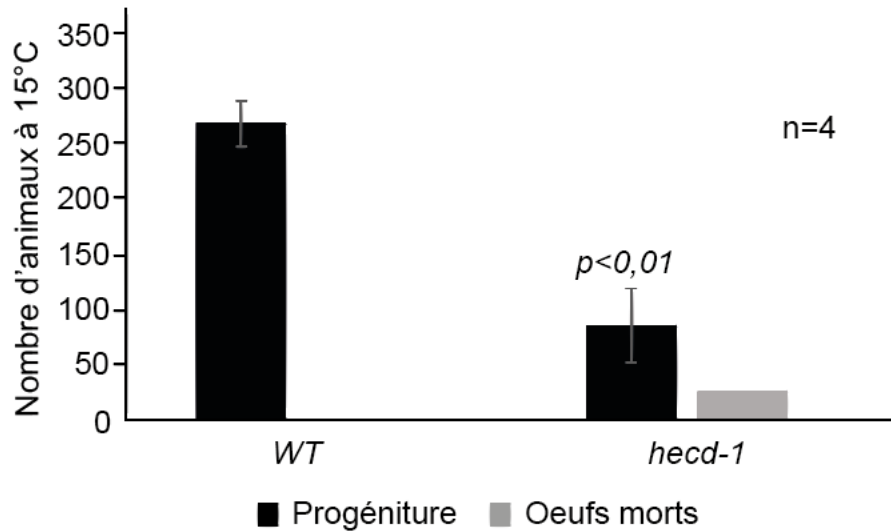


Figure 31 : La perte de fonction de *hecd-1* diminue la taille de la progéniture et affecte le développement embryonnaire à 15°C

À 15°C, le nombre de bébés et d'embryons morts obtenus par 4 hermaphrodites chez des animaux sauvages et mutés pour *hecd-1* a été compté et la moyenne a été calculée. Le nombre de nématodes qui a été compté est indiqué (n). Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur trois expériences indépendantes et la p-value est indiquée.

Dans le but de déterminer à quel stade du développement les embryons de génotype *hecd-1* s'arrêtent de croître, nous avons compilé des photos prises toutes les 10 minutes pendant 8 heures afin de produire une vidéo du développement embryonnaire de ces animaux mutants. Un embryon de type sauvage, jusqu'au stade de l'éclosion, se développera en 11 heures, soit 2 heures *in utero* et 9 heures *ex utero*, tout en passant par différents stades de développement embryonnaire : gastrula, comma, 1.5-fold, 2-fold et 3-fold (Figure 32).

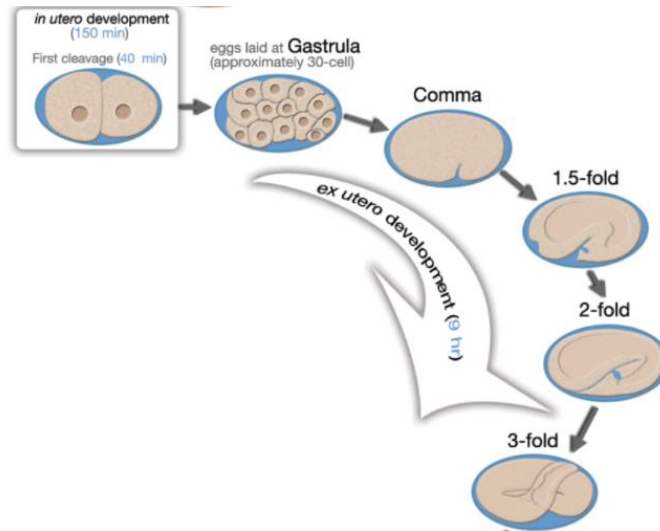


Figure 32 : Schéma représentant le développement embryonnaire chez *C. elegans*

Le développement embryonnaire chez *C. elegans* commence *in utero* et dure 2 heures environ. Puis les œufs sont pondus au stade de gastrula et se développeront encore 9 heures *ex utero* jusqu'au stade 3-fold où ils vont pouvoir éclore. Figure tirée de (Altun and Hall 2017).

La figure 33 correspond à 6 étapes du développement embryonnaire de 3 embryons mutés pour *hecd-1*. Ces étapes ont été photographiées au cours de 8h d'enregistrement du développement de ces embryons. Nous pouvons observer que l'embryon numéro 1 commence un développement *in utero* normal avec des divisions symétriques, en passant du stade 1 cellule (11 min), 2 cellules (32 min), 4 cellules (1h04) jusqu'au stade de gastrula (3h12) (stade où l'œuf est pondu) auquel il va rester bloqué jusqu'à la fin de l'enregistrement (Figure 33). Concernant l'embryon numéro 3, à 11 minutes d'enregistrement, il est au stade de « comma » et se développe normalement jusqu'au stade 3-fold (8h) (Figure 33). En revanche l'embryon numéro 2, qui est au stade de gastrula à 11 minutes d'enregistrement, y reste pendant les 8 heures où nous enregistrons le développement (Figure 33). Ceci suggère que la létalité embryonnaire observée pour certains embryons de type *hecd-1* (embryon 1 et 2) est attribuable à un arrêt de développement au stade de gastrula.

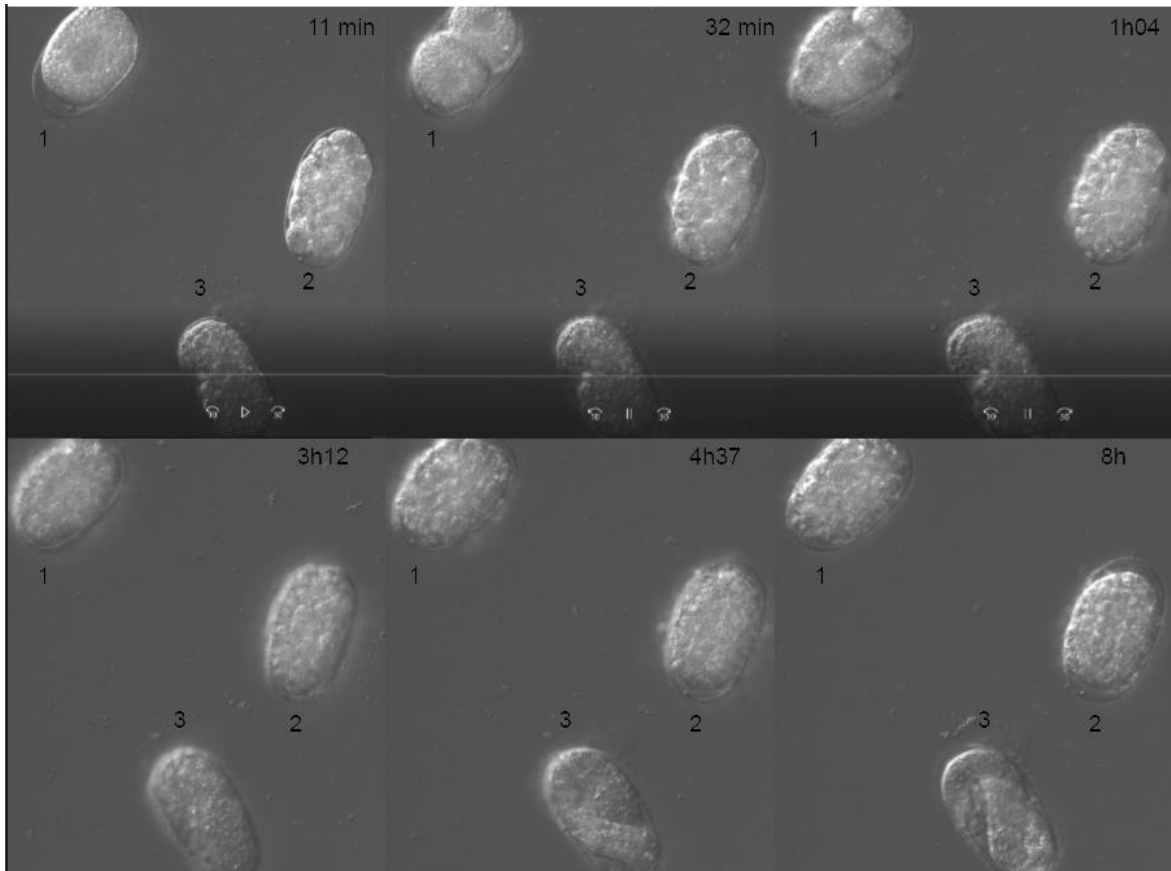


Figure 33 : Photos représentant le développement embryonnaire d'embryons mutés pour *hecd-1*

Des photos du développement embryonnaire d'embryons mutés pour *hecd-1* ont été prises toutes les 10 minutes pendant 8 heures. Des animaux hermaphrodites au stade adulte ont été sacrifiés pour récupérer les œufs *in utero* et enregistrer un développement embryonnaire complet.

De plus, des expériences de génétique nous ont permis de remarquer que les mâles homozygotes pour la mutation de *hecd-1* sont incapables de se reproduire. Ceci suggère qu'ils présentent des défauts dans la spermatogénèse. En conclusion, sachant que les hermaphrodites homozygotes pour la mutation de *hecd-1* présentent un défaut dans l'ovogénèse, nous pouvons affirmer que des animaux mutés pour *hecd-1* présentent des défauts dans la gamétogénèse.

3.4.4. Analyse génétique du rôle de *hecd-1* dans la voie des miARN

Afin d'évaluer l'implication de *hecd-1* dans la voie des miARN, nous avons voulu savoir si *hecd-1* présente une interaction génétique avec les protéines Argonautes. Pour cela, nous avons croisé des animaux *hecd-1* avec des animaux mutés pour *alg-1(gk214)*. De manière intéressante, nous avons observé que des animaux double homozygotes mutants *hecd-1;alg-1* sont 100 % stériles alors que lorsque la mutation pour *alg-1* est hétérozygote seulement 13% des animaux sont stériles (Figure 34). Ce phénotype, absent chez les animaux simple mutants pour *alg-1* ou *hecd-1* suggère que la mutation de *hecd-1* présente une synergie avec la mutation de *alg-1*.

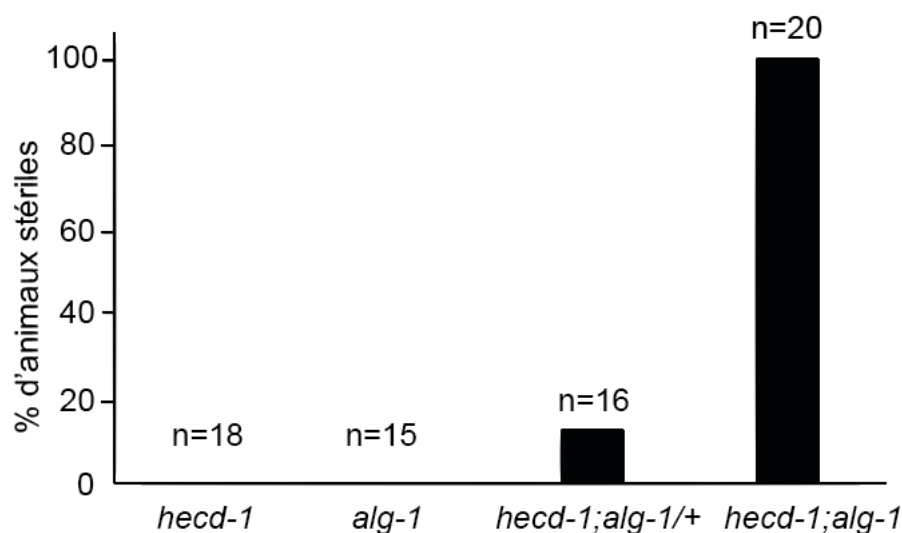


Figure 34 : Synergie entre *hecd-1* et *alg-1*

Analyse d'animaux double mutants *hecd-1;alg-1* après croisement. Tous les animaux double homozygotes mutants *hecd-1;alg-1* sont stériles. Dans le cas où la mutation pour *alg-1* est hétérozygote, seulement 13% des animaux sont stériles. Le nombre de nématodes qui a été compté dans chacun des cas est indiqué (n).

Cependant, lorsque l'on a croisé des animaux mutés pour *hecd-1* avec des animaux mutés pour *alg-2(ok304)*, la deuxième protéine Argonaute impliquée dans la voie des miARN chez *C. elegans*, nous n'avons pas observé de synergie entre les mutations de ces deux gènes (Figure 35). La mutation *alg-2(ok304)* est une délétion qui est considérée comme une mutation nulle mais qui présente un faible phénotype. Donc, il est possible que l'absence de

phénotype dans le double mutant homozygote soit attribuable au fait que la souche mutée pour *alg-2* ne soit pas assez sensible pour voir l'impact de la perte de fonction de *hecd-1*.

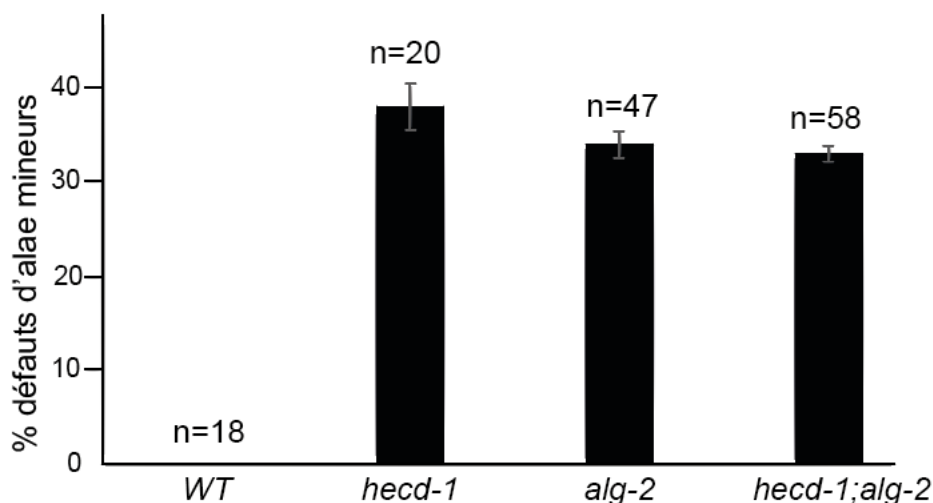


Figure 35 : Étude du double mutant *hecd-1;alg-2*

Analyse d'animaux double mutants *hecd-1;alg-2* après croisement. La perte de fonction de *hecd-1* n'affecte pas les défauts mineurs observés dans la structure des alae chez des animaux seulement mutés pour *alg-2*. Le nombre de nématodes qui a été compté dans chacun des cas est indiqué (n).

Chez *C. elegans*, le miARN *let-7* joue un rôle fondamental dans le bon développement du nématode, spécifiquement dans la transition entre le dernier stade larvaire et le stade adulte. Nous avons croisé des animaux mutés pour *hecd-1* avec des animaux mutés pour *let-7*. Nous avons utilisé la souche mutante *let-7ts(n2853)*, qui est une souche thermosensible présentant une modification d'un nucléotide. Cette mutation affecte la maturation des pré-*let-7* en miARN mature. À température permissive (15°C), 35% des animaux *let-7ts* meurent à la transition larvaire L4 – adulte (Figure 36). Cette létalité est pratiquement supprimée (2,6%) chez des animaux double homozygotes mutants *hecd-1;let-7ts* (Figure 36). Ceci suggère que *hecd-1* permet de rétablir la régulation médiée par le miARN *let-7*.

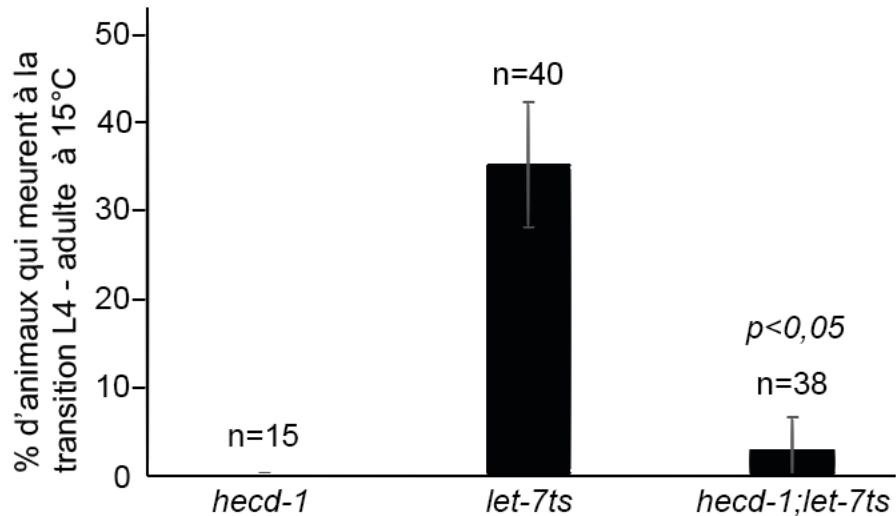


Figure 36 : La perte de fonction de *hecd-1* rétablit la régulation médiée par le miARN *let-7*

Analyse de la létalité d'animaux double mutant *hecd-1;let-7ts* à la transition larvaire L4-adulte à température permissive (15°C). Environ 40% des animaux *let-7ts* mutants meurent à la transition larvaire L4 – adulte mais cette létalité est supprimée chez des animaux double mutants *hecd-1;let-7ts*. Le nombre de nématodes qui a été compté dans chacun des cas est indiqué (n). Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur trois expériences indépendantes et la p-value est indiquée.

3.4.5. La souche mutante *hecd-1(ok1437)* affecte le niveau des miARN

Les résultats obtenus avec le mutant *hecd-1* suggèrent que la voie des miARN est affectée lorsque cette protéine est absente. Ceci pourrait être attribuable à un défaut dans le niveau d'expression des miARN ou bien encore à un défaut dans le niveau d'expression des protéines impliquées dans leur biogénèse. Nous avons commencé par mesurer le niveau d'expression de trois miARN par PCR quantitatif en temps réel chez des animaux mutés pour *hecd-1*. Ces niveaux ont été comparés à ceux observés chez des animaux sauvages (Figure 37). Nous avons alors observé une augmentation significative dans le niveau d'expression des miARN *lin-4* et *miR-48* et une augmentation non significative du niveau de *let-7* (Figure 37). Ceci suggère que HECD-1 est important pour la dégradation des miARN ou la régulation de leur transcription et de leur maturation.

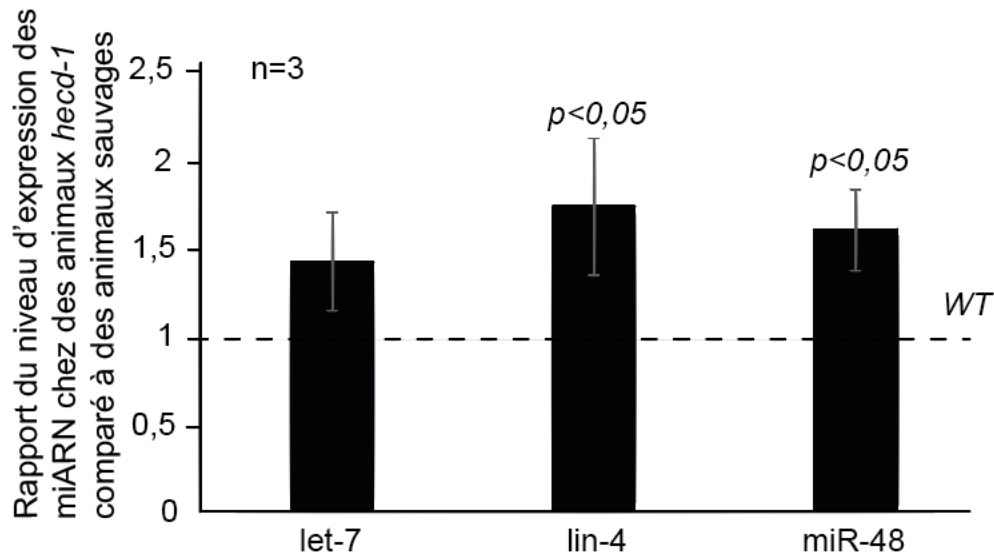


Figure 37 : Le niveau des miARN augmente dans un mutant *hecd-1*

Le niveau d'expression des miARN let-7, lin-4 et miR-48 a été mesuré par la technique de PCR quantitatif en temps réel (Taqman) chez des animaux sauvages (trait en pointillé) et mutés pour *hecd-1* au stade jeune adulte. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé sur trois expériences indépendantes et les p-values sont indiquées.

3.5. Conclusion et perspectives

L'immunoprécipitation de DCS-1, composante du complexe de dégradation, a permis de mettre en évidence une ubiquitine ligase, HECD-1, qui pourrait être impliquée dans la voie des miARN. HECD-1 est bien conservée dans l'évolution, son orthologue chez l'humain est HECTD1. Les E3 ubiquitine ligases permettent l'attachement d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur un substrat afin de le cibler pour la dégradation par le protéasome ou de réguler la signalisation. Ces protéines présentent deux domaines fonctionnels. L'un permet l'interaction de E3 avec la protéine E2 (enzyme de conjugaison) alors que l'autre est responsable de la reconnaissance du substrat. Il existe deux groupes de E3 classés suivant l'identité de leur domaine d'interaction à E2 : les E3 à domaine HECT et les E3 à domaine RING. Les E3 à domaine HECT, qui sont très bien conservées dans l'évolution, représentent la première famille de E3 à avoir été décrite en 1995 (Scheffner and Kumar 2014). Le processus d'ubiquitylation correspond au transfert séquentiel de l'ubiquitine d'une enzyme activant l'ubiquitine (E1) à une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) jusqu'au substrat, étape facilitée par une enzyme de ligation de l'ubiquitine (E3) (Rotin and Kumar 2009). Les

E3 à domaine HECT, telle que HECD-1, vont permettre ce transfert en deux étapes grâce à leur activité enzymatique. Elles vont tout d'abord former un intermédiaire thioester avec l'ubiquitine avant de transférer l'ubiquitine au substrat (Figure 38).

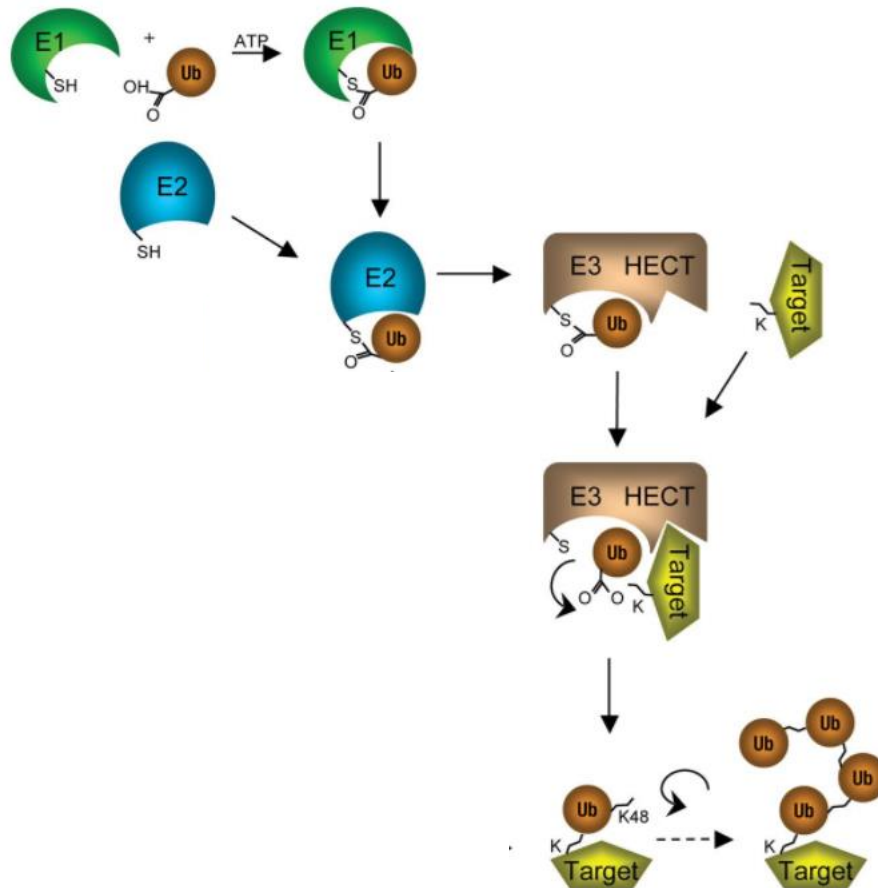


Figure 38 : La voie de l'ubiquitination

L'ubiquitine (Ub) est activée par l'enzyme E1 (carboxylation) via une étape ATP-dépendante. L'ubiquitine activée est ensuite transférée au site actif cystéine de l'enzyme E2 formant un intermédiaire thioester E2-Ub. La ligase E3 fait une réaction de transthioestérification qui permet le transfert du site actif de E2 au domaine HECT de E3 pour finalement transférer l'Ub au substrat. Figure adaptée de (Hurley et al. 2006).

Chez *C. elegans*, il est connu qu'HECD-1 est impliquée dans la régulation de la voie mitochondriale, suggérant que la perte de fonction de *hecd-1* peut affecter la production d'énergie et le métabolisme (Segref et al. 2014). De plus, HECD-1 a été montrée comme étant un modulateur de l'activité de Notch. En effet, suivant le contexte cellulaire, la perte de

fonction de *hecd-1* réduit l'activité de *lin-12*/Notch dans les cellules somatiques ou augmente l'activité de *glp-1*/Notch dans la lignée germinale (Chen and Greenwald 2015). Chez l'humain, HECTD1 ubiquitine APC (*adenomatous polyposis coli*) ce qui favorise son interaction à Axin. Ceci forme un complexe de destruction qui régule négativement la voie de signalisation Wnt (Tran et al. 2013). PIPKI γ 90 (*Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I γ*) est aussi un substrat de HECTD1. Dans ce cas-là, HECTD1 régule la dynamique des points focaux d'adhésion et la migration cellulaire en favorisant la dégradation de PIPKI γ 90 (Li et al. 2013). Finalement, chez la souris, cette E3 ubiquitine ligase régule la localisation intracellulaire et la sécrétion de HSP90 dans le but de contrôler le bon développement du tube neural et du mésenchyme (Sarkar and Zohn 2012; Zohn et al. 2007).

Nos résultats montrent que, chez des animaux mutés pour *hecd-1*, le niveau d'expression de certains miARN est augmenté. De plus, l'analyse du mutant *hecd-1* a révélé que la régulation par le miARN *let-7* est rétablie chez des animaux où le niveau de *let-7* est diminué. Ceci suggère que la perte de fonction de *hecd-1* entraîne l'accumulation de miARN fonctionnels ce qui pourrait affecter la gamétogénèse. En effet, les hermaphrodites présentent des défauts dans l'ovogenèse et les mâles dans la spermatogénèse. De plus, ces défauts sont exacerbés par la perte de fonction de *alg-1*. En conclusion, soit la transcription et la maturation des miARN est augmentée soit la dégradation des miARN est affectée en absence de la protéine HECD-1.

Pour la suite du projet, il serait intéressant de quantifier le niveau d'expression des pri-miR et des pré-miR chez des animaux mutés pour *hecd-1* en comparaison à des animaux sauvages afin d'évaluer si la transcription et la maturation des miARN sont affectés. Il serait également intéressant de déterminer l'état d'ubiquitination des composantes du complexe de dégradation et du miRISC en absence de *hecd-1* dans le but de savoir si c'est plutôt la dégradation des miARN qui est affectée. Les résultats de ce chapitre seront discutés plus en détail dans le chapitre 5.

Chapitre 4 : Discussion et Perspectives

4.1. Implication de la phosphatase PPM-2 dans la régulation des courts ARN non codants

4.1.1. PPM-2, un interacteur du complexe de dégradation

Dans l'année précédent mon arrivée dans le laboratoire du Dr Martin Simard, un étudiant du laboratoire a publié un article révélant l'existence d'un complexe de dégradation des miARN chez le nématode *C. elegans*, composé des protéines DCS-1 et XRN-1. En effet, il a montré que la perte de fonction du gène *dcs-1* affecte la dégradation de certains miARN relâchés du miRISC et entraîne leur accumulation (Bossé et al. 2013). La protéine DCS-1 est connue pour avoir une activité catalytique dédiée au décoiffage des ARNm (Cohen et al. 2004). Son association à un complexe de dégradation est alors nécessaire pour permettre son implication dans la dégradation des miARN. C'est alors qu'il a été montré que DCS-1 s'associe à l'exonucléase 5'-3' XRN-1 pour former un complexe de dégradation. De plus, l'utilisation d'une souche mutée dans le gène *dcs-1* (L32P), qui empêche l'association de DCS-1 à l'enzyme XRN-1, entraîne l'inhibition de l'activité de dégradation des miARN, ce qui suggère que XRN-1 est le moteur catalytique du complexe de dégradation des miARN (Bossé et al. 2013). Cette étude a donc permis de mettre en évidence l'existence d'un modulateur du niveau d'expression des miARN. En revanche, le mécanisme exact par lequel DCS-1 influence l'activité de XRN-1 n'a pas été démontré dans cet article, de même que la spécificité du complexe à dégrader certains miARN.

L'étude de la dégradation des miARN est un domaine récent. Aujourd'hui, dans les différents organismes, seules certaines enzymes responsables de la dégradation des miARN ont été identifiées (Rüegger and Großhans 2012) telles que les endonucléases TSN qui dégradent les miARN libres ou associés aux protéines Argonautes (Elbarbary et al. 2017), et un seul modulateur est connu (Bossé et al. 2013; Meziane et al. 2015). Dans le but de mieux comprendre le phénomène de dégradation des miARN, le laboratoire du Dr Simard a voulu identifier de nouveaux interacteurs du complexe de dégradation DCS-1/XRN-1. Pour cela, une purification par immunoprécipitation de la protéine DCS-1 sauvage et de la forme mutée

ne pouvant plus interagir avec XRN-1 a été réalisée (Figure 28). L'analyse en spectrométrie de masse des protéines associées spécifiquement à la protéine DCS-1 sauvage, pouvant former le complexe de dégradation, a permis de mettre en évidence une liste de candidats potentiellement impliqués dans la voie des miARN (Tableau 1). Les protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles ou bien impliquées dans la dégradation des protéines et ARNm, au nombre de 16, furent sélectionnées (Tableau 1). Il a été décidé d'établir ces critères car un changement dans le niveau protéique d'un des composants du complexe de dégradation ou encore un changement dans ses modifications post-traductionnelles pourrait affecter la formation, le recrutement, le recyclage ou la fonction de ce complexe. Cependant, il est évident que de cette façon, une de ces protéines importantes pour dans la régulation des miARN ont pu être exclues.

L'analyse des phénotypes associés à la perte de fonction de ces candidats potentiels a permis de révéler que PPM-2 et HECD-1, des protéines de modifications post-traductionnelles, sont des candidates intéressantes à étudier. En effet, ces protéines ont été sélectionnées en raison des défauts observés dans la structure des alae dans des animaux n'exprimant pas l'une ou l'autre des protéines (Figure 17A et 29). La formation de ces structures est un mécanisme régulé très finement par les miARN. Le rôle d'HECD-1 sera discuté plus en profondeur dans la deuxième partie de cette discussion (4.2). Concernant PPM-2, les défauts affectant l'intégrité structurale des alae sont différents de ceux observés chez des animaux mutés pour *dcs-1*. En effet, chez ces animaux, les alae apparaissent plus précocement dans le développement (Bossé et al. 2013). Ceci suggère que la perte de fonction de *ppm-2* affecte la voie des miARN différemment de DCS-1.

Cette conclusion peut paraître surprenante puisque PPM-2 a été montrée comme étant un interacteur du complexe de dégradation DCS-1/XRN-1. Or ce complexe, qui agit une fois que le miARN est libéré de sa cible puis de la protéine Argonaute, se trouve à proximité du miRISC et donc proche des protéines le composant. La phosphatase peut alors agir aussi bien au niveau du complexe de dégradation que du miRISC.

La protéine PPM-2 est une sérine/thréonine phosphatase qui requiert deux ions métalliques, le magnésium (Mg^{2+}) et le manganèse (Mn^{2+}), pour l'activer. Elle fait partie de la famille des

PPM (*Probable Protein Phosphatase*) que l'on retrouve chez tous les eucaryotes. Son orthologue humain est PPM1A (PP2C α). Les protéines phosphatases possèdent une activité de déphosphorylation qui consiste à enlever un groupement phosphate d'un substrat par hydrolyse. Elles catalysent la réaction inverse des kinases qui ajoutent un groupement phosphate sur un substrat. Cette forme de modification post-traductionnelle réversible, qui permet par exemple de modifier le comportement d'une enzyme en l'activant ou au contraire en la désactivant, est très répandue. C'est aussi la modification la plus utilisée dans la régulation de la transduction du signal. En effet, l'ajout ou le retrait d'un phosphate modifie très fortement la charge d'une protéine, affectant ainsi sa structure tridimensionnelle ce qui conduit à une modification de sa fonction et de son interactome. De plus, l'état de phosphorylation d'une enzyme joue sur l'activation ou l'inhibition de son activité.

De ce fait, la réaction réversible de phosphorylation/déphosphorylation joue un rôle crucial dans le contrôle de nombreux processus biologiques et est impliquée dans de nombreuses maladies (Barford 1996).

4.1.2. Implication de la perte de fonction de *ppm-2* dans la voie des miARN

L'objectif de mon doctorat était de déterminer si PPM-2 était impliquée dans la voie des miARN. Étant donné qu'un animal muté pour *ppm-2* ne présente aucun phénotype excepté le défaut d'alaie, nous avons utilisé des souches déjà sensibilisées pour la voie des miARN afin d'évaluer l'implication de PPM-2 dans cette voie.

Afin de savoir si les défauts dans la structure des alae, qui sont observés chez des animaux mutés pour *ppm-2*, sont attribuables au développement anormal des cellules de couture, nous avons compté ces cellules marquées à la GFP dans la souche rapporteur *scm::GFP*. Ces cellules de coutures sont des cellules hypodermiques qui, tout au long du développement de l'animal, subissent plusieurs rondes de divisions à chaque stade larvaire jusqu'au stade adulte où elles seront au nombre de 16. À ce stade, elles fusionneront pour former les alae. La division et la fusion de ces cellules sont des mécanismes très finement régulés par les miARN. Un défaut dans la voie des miARN peut entraîner des déficiences lors des divisions ou de la fusion de ces cellules, menant ainsi à des aberrations dans la formation des alae

(Resnick et al. 2010). En moyenne, des animaux sauvages ou mutés pour *ppm-2* possèdent 16 cellules de couture tandis que des animaux mutés pour *alg-1* en possède plus ($p < 0,01$). Mais lorsque ces derniers sont croisés avec des animaux mutés pour *ppm-2*, ce nombre augmente de manière synergique ($p < 0,01$) (Figure 17C). Ceci montre que *ppm-2* présente une synergie avec *alg-1* et que les défauts observés dans la structure des alae sont attribuables à des défauts lors des divisions des cellules de couture. En revanche, aucun effet n'est observable chez des mutants *alg-2* et *ppm-2;alg-2*. Ceci suggère que soit *ppm-2* ne présente pas d'interaction génétique avec *alg-2*, soit un animal muté pour *alg-2* n'est pas assez sensible pour pouvoir évaluer l'implication de *ppm-2* dans la voie des miARN.

La synergie observée entre *ppm-2* et *alg-1* a été validée en observant les phénotypes des animaux double mutants *ppm-2;alg-1*. En effet, les défauts dans la structure des alae et le pourcentage de létalité entre la transition L4-adulte sont augmentés chez ces animaux en comparaison aux animaux simple mutants (Figure 17B en 18A). En conclusion, ces résultats indiquent que PPM-2 est impliquée dans la régulation des gènes médiée par les miARN lors du développement de l'animal.

Puis, nous avons voulu évaluer l'implication de *ppm-2* dans la régulation des miARN de la famille *let-7*. Le miARN *let-7* est le miARN le plus important, permettant un bon développement du dernier stade larvaire au stade adulte. À température permissive, 20% des animaux mutés pour *let-7* mourront à cette transition. Chez des animaux double mutants *ppm-2;let-7ts*, ce pourcentage augmente considérablement à plus de 50% (Figure 18A). Le miARN miR-84 fait partie de la famille *let-7*. Il inhibe l'expression de *let-60*, un gène impliqué dans le destin des cellules précurseuses de la vulve. L'utilisation d'un mutant gain de fonction pour *let-60* affecte le développement du tissu vulvaire et entraîne la formation de vulves ectopiques (Muv) chez 20% des animaux hétérozygotes pour ce gène. Nous n'utilisons pas les animaux homozygotes mutants pour *lsy-6* car le phénotype est trop pénétrant ce qui ne nous permet pas d'étudier d'interactions génétiques. Le phénotype Muv est exacerbé chez des animaux double mutants *ppm-2;let-60/+* (Figure 18B). Finalement, nous avons évalué la régulation du gène *lin-41* par le miARN *let-7* dans des animaux mutés pour *ppm-2* en utilisant une souche rapporteur GFP fusionnée à la séquence 3'UTR du gène *lin-41*. Cette expérience a démontré que la perte de fonction de *ppm-2* affecte la régulation

du miARN *let-7* et donc inhibe la répression du gène *lin-41* (Figure 18C). Tous ces résultats montrent que *ppm-2* est impliqué dans la régulation des miARNs de la famille *let-7*.

Afin de savoir si *ppm-2* est aussi impliqué dans la régulation d'autres miARN, nous avons utilisé la souche mutée pour le miARN *lisy-6*. Ce miARN est exprimé dans le neurone de gauche de l'animal (ASEL) et régule positivement l'expression du gène *lim-6*. En utilisant une souche rapporteur où le gène *lim-6* est fusionné à la GFP, nous avons pu évaluer l'impact de la perte de fonction de *ppm-2* sur la régulation du miARN *lisy-6*. Chez les animaux mutants pour *lisy-6*, 16% d'entre eux perdront l'expression de la GFP dans le neurone de gauche. Le même phénotype est observé chez des animaux *ppm-2;lisy-6* (Figure 24). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. La première serait que tout simplement *ppm-2* n'est pas impliqué dans la régulation du miARN *lisy-6*. La seconde, concerne le fait que le mutant *lisy-6* est un mutant hypomorphe (Ren et al. 2016). Ce dernier n'est peut-être pas assez sensible pour évaluer l'implication de *ppm-2* dans cette voie. Finalement, chez le nématode *C. elegans*, il existe deux protéines phosphatases appartenant à la famille des PPM, soit PPM-1 et PPM-2. Ces phosphatases sont des protéines régulatrices du développement neuronal chez *C. elegans* (Baker et al. 2014; Tulgren et al. 2011). Il est possible que dans les neurones, PPM-1 soit plus exprimée que PPM-2, ce qui pourrait compenser la perte de fonction de *ppm-2* dans la régulation du miARN *lisy-6*.

Par la suite, en collaboration avec le laboratoire du Dr Weifeng Gu, nous avons quantifié le niveau d'expression des miARN par séquençage à haut débit des courts ARN non codants chez des animaux mutés pour *ppm-2*. Les résultats de cette analyse ont démontré que les miARN ne sont pas affectés par la perte de fonction de *ppm-2* (Figure 19B). Ceci a été validé par des expériences de RT-PCR quantitative en temps réel et de Northern Blot (Figure 19A et 25A-B). Ceci suggère que la voie de biogénèse des miARN n'est pas affectée.

En conclusion, la phosphatase PPM-2 est impliquée dans la voie des miARN. Sa perte de fonction affecte la régulation des miARN de la famille *let-7* sans impacter leur niveau d'expression. Ceci suggère que PPM-2 n'agit pas sur les composantes de la voie de biogénèse des miARN mais plutôt au niveau du complexe effecteur de cette voie. De plus, *ppm-2*

présente une interaction génétique avec *alg-1*, ce qui signifie que PPM-2 agit dans une voie parallèle à ALG-1 au niveau du complexe effecteur.

4.1.3. Implication de la perte de fonction de *ppm-2* dans la voie des piARN et siARN

L'expérience de séquençage à haut débit des courts ARN non codants nous a également permis de quantifier le niveau d'expression des piARN et des siARN chez des animaux mutés pour *ppm-2* en comparaison à des animaux sauvages. De manière intéressante, nous avons observé une diminution significative du niveau d'expression des piARN de type 1 (Figure 23B). En revanche le niveau d'expression des piARN de type 2, qui sont produits à partir de courts ARN coiffés (Gu et al. 2012), n'était pas affecté (Figure 23C). Ceci suggère qu'une des composantes présentes dans la voie de biogénèse des piARN de type 1 mais absente dans celle des piARN de type 2 est affectée par la perte de fonction de *ppm-2*. Concernant les siARN secondaires, le niveau d'expression de ces derniers est augmenté chez des animaux mutés pour *ppm-2* (Figure 39). Cependant les changements observés dans le niveau d'expression des siARN sont moins impressionnants que ceux obtenus pour les piARN. Il faut savoir que, aussi bien chez des animaux sauvages que mutés pour *ppm-2*, la quantité de chaque type de court ARN a été normalisée sur la quantité totale de courts ARN. Étant donné que celle-ci est diminuée chez des animaux mutés pour *ppm-2* en comparaison à des animaux sauvages du fait de la diminution drastique des piARN, les rapports des niveaux d'expression des siARN obtenus dans les deux cas ne sont pas vraiment comparables. En effet, même si le niveau d'expression des siARN est similaire chez des animaux sauvages et mutés pour *ppm-2*, une augmentation du niveau d'expression de ces derniers sera observée après normalisation sur la quantité totale de courts ARN chez des animaux mutés pour *ppm-2*. Les siARN primaires, eux, du fait de leur faible niveau d'expression, sont difficiles à détecter par cette technique de séquençage. En conclusion, le niveau d'expression des piARN est drastiquement diminué ce qui rend la légère augmentation du niveau d'expression des siARN probablement pas réelle.

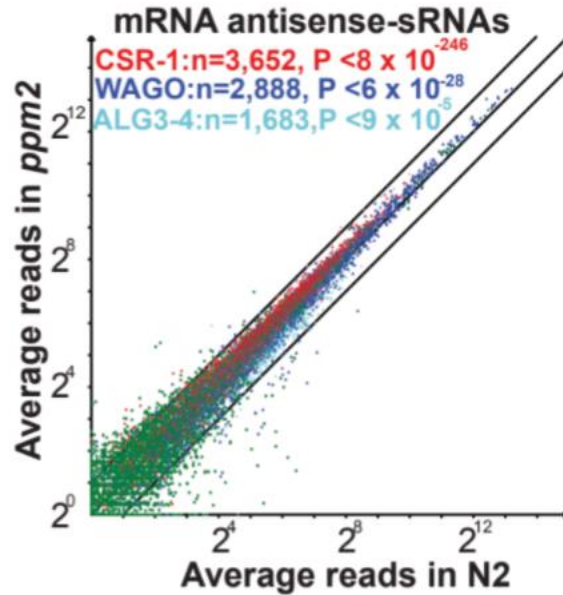


Figure 39 : Quantification par séquençage à haut débit des siARN

Quantification des siARN chez des animaux mutés pour *ppm-2* en comparaison à des animaux sauvages normalisée sur la totalité des courts ARN non codants. Chaque siARN détecté est représenté par un point avec l'axe des abscisses correspondant aux animaux sauvages et l'axe des ordonnées correspondant aux animaux mutés pour *ppm-2*. En rouge sont les siARN associés à CSR-1, en bleu foncé ceux associés aux WAGOs et en turquoise ceux associés à ALG3-4. Le nombre de gènes analyse est indiqué (n) ainsi que la p-value (two-tailed paired-TTest).

Après avoir observé une diminution de l'abondance des piARN chez des animaux mutés pour *ppm-2*, nous avons voulu évaluer le niveau d'expression des cibles de piARN. Par RT-PCR quantitative en temps réel, nous avons observé que le niveau d'expression de Tc1 et Tc3, deux transposons, est significativement augmenté chez des animaux mutés pour *ppm-2*. Cette augmentation est d'autant plus drastique lorsque des animaux mutés pour *ppm-2* sont croisés avec des animaux mutés pour *prg-1* (Figure 23A). Donc, la perte de *ppm-2* entraîne la dérégulation des transposons suite à une diminution du niveau des piARN. L'étude des phénotypes du double mutant *ppm-2;prg-1* a validé la synergie observée entre *ppm-2* et *prg-1* pour la répression des transposons. En effet, à température permissive (15°C), la progéniture des animaux double mutants est plus faible que celle observée chez des animaux mutés pour *prg-1*. Nous avons remarqué aussi que les animaux double mutants *ppm-2;prg-1* présentent des retards dans leur développement (données non montrées).

Afin d'évaluer si la perte de fonction de *ppm-2* affecte la fonction des siARN, nous avons examiné l'efficacité de cette voie à réprimer ses cibles par des expériences d'ARNi. Nous avons alors observé que des animaux mutés pour *ppm-2* sont tout aussi sensibles que des animaux sauvages aux ARNi cytoplasmiques mais résistants au ARNi nucléaire (Figure 22A-B). Ceci suggère que *ppm-2* est seulement impliqué dans la régulation de la voie du siARN nucléaire.

4.1.4. Rôle de *ppm-2* dans la voie des courts ARN non codants

La perte de fonction de *ppm-2* affecte la voie des miARN sans modifier le niveau d'expression de ces derniers. Les chances que les protéines de la voie de biogénèse des miARN soient affectées étant minimes, nous sommes donc allés vérifier le niveau d'expression de la protéine majoritaire du complexe effecteur, la protéine ALG-1. Par immunobuvardage, nous avons observé une diminution du niveau d'expression d'ALG-1 chez des animaux mutés pour *ppm-2* en comparaison à des animaux sauvages (Figure 20A). Nous avons observé le même résultat pour ALG-2 (Figure 40).

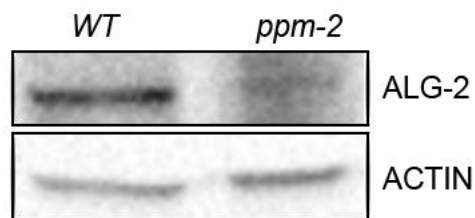


Figure 40 : Quantification de ALG-2 chez des animaux mutés pour *ppm-2*

La détection de la protéine Argonaute ALG-2 a été réalisée par immunobuvardage chez des animaux au stade L1. L'actine a été utilisée comme contrôle de chargement des protéines totales.

Les expériences d'immunobuvardage concernant ALG-1 sont toutes réalisées sur des animaux au stade de jeune adulte mais d'une population à une autre, les animaux peuvent être à un stade légèrement plus précoce ou tardif. Les animaux d'une population peuvent alors posséder un patron d'expression protéique et génique légèrement différent de ceux venant d'une autre population. Ceci explique le fait que la diminution du niveau d'ALG-1 est plus ou moins évidente suivant les immunobuvardages. Dans le but d'évaluer le niveau

d'expression de PPM-2 tout au long du développement, nous avons créé une souche pour laquelle le locus endogène de *ppm-2* est marqué avec l'étiquette HA par la technique de CRISPR-Cas9. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas utilisée la souche marquée avec l'étiquette GFP créée par l'équipe de Dr Brock Grill (Baker et al. 2014). Par des expériences d'immunobuvardage, nous avons observé que PPM-2 est exprimée faiblement dans les embryons, pour atteindre un pic d'expression en L1 et pour finalement être exprimée de façon constante du stade L2 à adulte (Figure 41). Ceci suggère que les variations observées dans nos expériences ne sont pas attribuables au fait que le niveau d'expression de PPM-2 est différent entre un animal au stade L4, jeune adulte ou adulte.

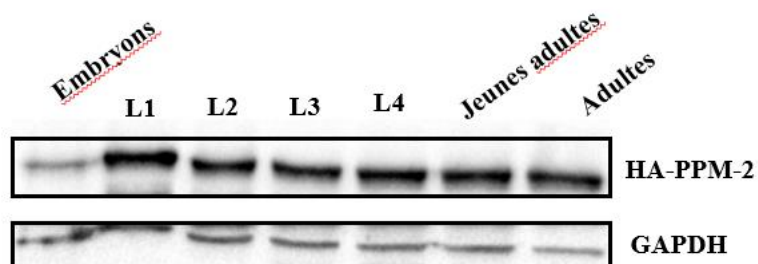


Figure 41 : Niveau d'expression de PPM-2 au cours du développement de *C. elegans*

Le locus endogène de *ppm-2* a été marqué par l'étiquette HA par la technique de CRISPR-Cas9. L'utilisation de l'anticorps anti HA a permis de révéler l'expression de PPM-2 dans la souche *ppm-2::HA* à chaque étape du développement du nématode. GAPDH est utilisée comme contrôle de chargement de protéines totales dans chaque cas.

En revanche, le patron d'expression de PPM-1 au cours du développement de l'animal n'est pas connu. Il est alors probable que dans certains stades de développement de l'animal, PPM-1 compense plus fortement la perte de PPM-2 et entraîne une variation du niveau d'expression d'ALG-1.

Il a été montré, chez l'humain, que les protéines Argonautes sont retrouvées au niveau des endosomes ainsi que des corps multivésiculaires, ce qui explique qu'elles peuvent être dégradées par l'autophagie (Gibbins et al. 2012; Gibbins et al. 2009). Cependant, chez la souris, ces protéines seraient plutôt dégradées par la voie du protéasome (Rybak et al. 2009; Bronevetsky et al. 2013). Nous avons commencé par investiguer la contribution de la voie

du protéasome pour la dégradation d'ALG-1 chez des animaux mutés pour *ppm-2* en traitant ces derniers avec la drogue MG132, un inhibiteur courant qui bloque les activités peptidases du protéasome (Lee and Goldberg 1998). Ce traitement, chez des animaux sauvages, n'a pas d'impact sur le niveau d'expression d'ALG-1 suggérant, que la voie du protéasome n'est pas la voie de contrôle de qualité d'ALG-1 normalement utilisée. Or, chez des animaux mutés pour *ppm-2*, après traitement au MG132, le niveau d'expression d'ALG-1 revient au même niveau que chez des animaux sauvages (Figure 20B et 27A). Ceci suggère que la perte de fonction de *ppm-2* active la dégradation d'ALG-1 par la voie du protéasome. Or, seulement une fraction d'ALG-1 est dégradée lorsque PPM-2 est inhibée.

L'une des hypothèses pouvant expliquer le fait que seulement une fraction d'ALG-1 est dégradée chez des animaux mutés pour *ppm-2* serait que PPM-1 peut compenser, jusqu'à un certain niveau, la perte de PPM-2. Afin d'évaluer l'impact de la perte de fonction des deux phosphatases sur l'expression d'ALG-1, nous avons créé une souche double mutante *ppm-2;ppm-1*. Malheureusement, des animaux double mutant *ppm-2;ppm-1* sont létaux au stade embryonnaire (données non montrées) tout comme les sont des animaux double mutants *alg-1;alg-2* (Vasquez-Rifo et al. 2012). Une autre alternative permettant de tester cette première hypothèse aurait été de nourrir des animaux mutés pour le gène d'une phosphatase avec du ARNi ciblant le gène de la seconde phosphatase. Une seconde hypothèse serait que la perte de PPM-2 entraîne la dégradation d'un certain « pool » d'ALG-1. En effet, ALG-1 existe sous plusieurs formes : libre, associée au miARN ou encore associée à un ARNm cible. Il est possible que la perte de fonction de *ppm-2* entraîne la dégradation de seulement une des formes d'ALG-1. L'une des expériences qui pourrait permettre de tester cette hypothèse est de vérifier si ALG-1 est plus ou moins associée à AIN-1 et Dicer (protéines du miRISC) en absence de PPM-2 en réalisant des expériences de co-immunoprécipitation. Nous avons analysé en spectrométrie de masse des échantillons d'ALG-1 immunoprécipitée chez des animaux sauvages et mutants pour *ppm-2*. Nos résultats montrent que l'interaction entre ALG-1 et AIN-1 n'est pas affectée en absence de PPM-2 ce que nous avons validé par co-immunoprécipitation (données non montrées). Concernant l'association entre ALG-1 et Dicer, la mutation de *ppm-2* ne l'affecte pas, excepté dans 1 expérience sur 3 ou elle est favorisée (données non montrées). Donc, nos résultats suggèrent que la forme d'ALG-1

associée à Dicer n'est pas la forme majoritairement dégradée par la voie du protéasome. Il serait aussi intéressant d'immunoprécipiter ALG-1 chez des animaux sauvages et mutés pour *ppm-2*, et de quantifier les miARN associés à ALG-1 par RT-PCR quantitative en temps réel dans chacune des conditions. Si l'on détecte des miARN associés à ALG-1 aussi bien chez des animaux mutés pour *ppm-2* que sauvage, nous pourrions dire que cette forme d'ALG-1 (non libre) n'est pas la forme dégradée.

Les protéines envoyées à la dégradation par la voie du protéasome sont marquées par une petite protéine, l'ubiquitine. Nous avons donc voulu vérifier si ALG-1 est ubiquitinée en absence de PPM-2 par des expériences d'immunoprécipitation d'ALG-1 et détection de l'ubiquitine pour examiner l'état d'ubiquitination d'ALG-1. Nos résultats préliminaires montrent que, chez des animaux mutés pour *ppm-2* en comparaison avec des animaux sauvages, ALG-1 est davantage ubiquitinée que ce soit en présence de MG132 ou non (Figure 42), ce qui concorde avec le fait qu'elle soit dégradée par la voie du protéasome. Il serait intéressant de marquer de façon endogène la protéine ubiquitine avec une étiquette par la technique de CRISP-Cas9. L'anticorps anti-Ub utilisé dans notre cas n'étant pas très efficace, l'utilisation d'un anticorps anti-HA serait plus favorable à l'obtention de meilleurs résultats par immunobuvardage.

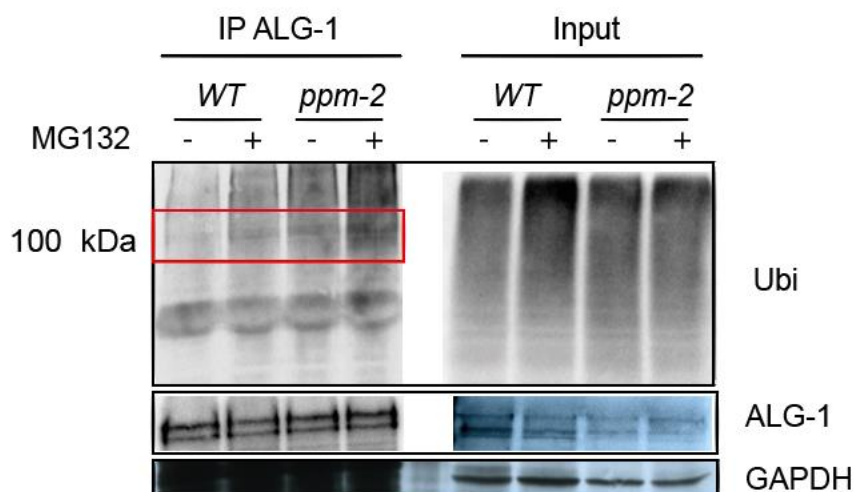


Figure 42 : Analyse de l'ubiquitination de ALG-1 en absence de *ppm-2*

Immunoprécipitation de la protéine ALG-1 chez des animaux sauvages et mutés pour *ppm-2* en présence ou non de MG132. L'anticorps anti ALG-1 permet de vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation. GAPDH est utilisée comme contrôle de chargement des protéines totales. L'encadré rouge met en évidence les bandes correspondantes à la protéine ALG-1 qui est ubiquitinée.

La perte de fonction de *ppm-2* est aussi impliquée dans la voie des piARN et celle des siARN. Les protéines Argonautes sont aussi les protéines majeures des complexes effecteurs de chacune de ces voies. Sachant que la perte de PPM-2 déstabilise ALG-1, nous avons voulu vérifier si le niveau des protéines Argonautes des autres voies de courts ARN non codants était aussi affecté.

PRG-1 est la protéine Argonaute principale de la voie des piARN (Batista et al. 2008; Wang and Reinke 2008). Par immunobuvardage, nous avons observé une déstabilisation de son niveau d'expression en absence de PPM-2 (Figure 21A). Tout comme pour ALG-1, PRG-1 est dégradée par la voie du protéasome (Figure 21C et 27B). L'effet de la déstabilisation du niveau de PRG-1 est moins évident que dans le cas d'ALG-1. Or, nous ne savons pas si PPM-2 est exprimée dans la lignée germinale, comme le sont les piARN et PRG-1. La déstabilisation de PRG-1 qui est observée chez des animaux mutés pour *ppm-2* peut expliquer la diminution du niveau d'expression des piARN. En effet, il a été montré, chez la drosophile, que la protéine Argonaute PIWI agit comme un activateur épigénétique dans les régions subtélomériques permettant ainsi une meilleure transcription des piARN (Yin and Lin 2007). De plus, chez *C. elegans*, seule la protéine Argonaute PRG-1 (non PRG-2) est requise pour l'accumulation des piARN (Batista et al. 2008; Wang and Reinke 2008). Donc, en son absence, aucune autre protéine Argonaute ne peut compenser sa fonction contrairement à la voie des miARN.

Chez *C. elegans*, il existe la voie de l'endo-siARN et celle de l'exo-siARN. Cette dernière ressemble très fortement à la voie de l'endo-siARN. En effet, dans cette voie, un ARN double brin exogène est pris en charge par la protéine Argonaute RDE-1 (au lieu de ERGO-1) pour former des siARN secondaires qui seront pris en charge par les WAGO (Yigit et al. 2006). Ces deux voies requièrent la fonction de nombreuses protéines Argonautes pour fonctionner. Cependant, la voie de l'endo-siARN nucléaire, dans la lignée germinale, ne requiert que la

protéine NRDE-3 (WAGO-12) (Guang et al. 2008) et dans la lignée germinale, n'est dépendante que de la protéine HRDE-1 (WAGO-9) (Buckley et al. 2012). NRDE-3 prend en charge un siARN secondaire et le transporte au noyau pour réprimer une cible (comme dans le cas du gène *lir-1*) ou modifier la structure de la chromatine (Guang et al. 2008; Burkhart et al. 2011). Tandis que HRDE-1 prend en charge les 22G-ARN pour tri-méthyle H3K9 dans le but de médier la répression transgénérationnelle (Shirayama et al. 2012; Ashe et al. 2012; Buckley et al. 2012). Par immunobuvardage, nous avons observé une déstabilisation du niveau d'expression de NRDE-3 en absence de PPM-2 (Figure 21B) qui est attribuable à une dégradation par la voie du protéasome (Figure 21D et 27C). Cependant, nous n'avons pas observé de différences dans le niveau d'expression de HRDE-1 en absence de PPM-2 (Figure 26C). Nous avons aussi évalué le niveau d'expression de certaines protéines Argonautes impliquées dans la voie cytoplasmique de l'endo-siARN et de l'exo-siARN. En absence de PPM-2, le niveau d'expression de la protéine Argonaute RDE-1, impliquée dans la voie de l'exo-siARN, n'est pas affecté, ni celui des protéines WAGO, CSR-1 et SAGO-1 (Figure 26A-B-D). Donc, l'absence de PPM-2 déstabilise seulement la protéine Argonaute nucléaire NRDE-3 qui est spécifique des cellules somatiques. L'une des raisons pour expliquer ce mécanisme spécifique pourrait être que la redondance des protéines Argonautes utilisées dans la voie du siARN cytoplasmique peut empêcher l'effet de la perte de fonction de *ppm-2* que nous observons dans la voie du siARN nucléaire des cellules somatiques, qui ne requiert qu'une seule protéine Argonaute. De plus, la voie du siARN nucléaire dans la lignée germinale n'est pas affectée par la perte de fonction de *ppm-2* ce qui pourrait s'expliquer par le fait que PPM-2 n'est peut-être pas exprimée dans la lignée germinale. De plus, NRDE-3 agit directement sur la structure de la chromatine donc, en régulant son activité, *ppm-2* influence directement l'expression des gènes au niveau transcriptionnel.

En conclusion, PPM-2 est important pour la stabilisation des protéines Argonautes ALG-1, PRG-1 et NRDE-3 en empêchant leur dégradation par la voie du protéasome.

4.1.5. Détermination du substrat de PPM-2

Nous avons utilisé différentes méthodes dans le but de déterminer le substrat de PPM-2. Tandis que des résultats préliminaires nous dirigent dans une certaine direction, nous n'avons

pas été capables d'avoir des évidences convaincantes nous permettant d'affirmer que telle protéine est le substrat de PPM-2.

Une chose est sûre, c'est que d'après nos résultats génétiques, les protéines Argonautes ne sont pas les substrats directs de PPM-2. Étant donné que *ppm-2* présente des interactions génétiques avec *alg-1* et *prg-1*, ceci suggère que cette phosphatase agit dans une voie parallèle à celle médiée par ces protéines Argonautes. De plus, nous n'avons jamais détecté de changements dans l'état de phosphorylation d'ALG-1 que ce soit par des expériences de spectrométrie de masse ou de migration sur gel spécifique aux protéines phosphorylées (données non montrées).

De plus, malgré qu'ALG-1, PRG-1 et NRDE-3 soient 3 protéines Argonautes, elles présentent peu de similarités dans leurs séquences. Aucune séquence homologue semble être retrouvée dans ces 3 protéines, écartant l'hypothèse que PPM-2 pourrait les reconnaître spécifiquement. De plus, NRDE-3, une protéine requise dans la voie de l'endo-siARN, n'est pas plus proche dans sa séquence d'ALG-1 et PRG-1 que d'autres protéines Argonautes de la voie de l'endo-siARN. Donc l'hypothèse d'une homologie de séquence retrouvée seulement dans ces 3 protéines Argonautes et non dans les autres Argonautes qui ne voient pas leur niveau d'expression affecté, est peu probable.

Chez *C. elegans*, l'équipe du Dr Brock Grill a démontré que DLK-1, une MAPKKK, est un substrat de PPM-2 important pour le développement neuronal de l'animal (Baker et al. 2014). Or, cette MAPKKK, qui est bien conservée dans l'évolution, est seulement exprimée dans les neurones (Holland et al. 2016). Des expériences sont en cours au laboratoire, afin d'évaluer l'implication de DLK-1 dans la voie des courts ARN non codant. Mais du fait de sa localisation, la probabilité que cette protéine soit impliquée dans la régulation des courts ARN non codants, notamment dans la voie des piARN, est faible.

Chez l'humain et la souris, il a été montré que suite à une infection virale, PPM1A déphosphoryle TBK1 (*Tank-Binding Kinase 1*), une sérine thréonine kinase, dans le but d'inhiber sa fonction qui est importante pour réguler la défense antivirale (Li et al. 2015; Xiang et al. 2016). Une autre étude de 2011, réalisée chez l'humain, a aussi montré que TBK1

interagit avec AGO2 (Li et al. 2011). Il serait donc intéressant de vérifier si ces interactions sont conservées chez *C. elegans*. En effet, l'absence de PPM-2 pourrait empêcher la déphosphorylation de la protéine TBK1, qui resterait active et pourrait alors être impliquée dans la phosphorylation des Argonautes.

En revanche, des résultats préliminaires de spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence une protéine s'associant à ALG-1 et dont le profil de phosphorylation est modifié en absence de PPM-2. Cette protéine, qui est conservée dans l'évolution, est TFG-1 (*TRK-fused gene*) ou TFG1 chez l'humain. Chez *C. elegans*, il a été montré que cette protéine est exprimée au niveau du réticulum endoplasmique et est requise pour permettre la sécrétion des protéines dans la lignée germinale, aidée par des vésicules recouvertes des protéines COP-II (Witte et al. 2011). De plus, cette protéine est un oncogène (Witte et al. 2011). Dans nos expériences de spectrométrie de masse, nous avons observé que TFG-1 est seulement phosphorylée chez des animaux mutés pour *ppm-2* (données non montrées).

Dans le but de valider cette observation d'une autre manière, nous avons fait migrer sur gel des extraits protéiques totaux venant d'animaux sauvages et mutés pour *ppm-2* et avons coloré le gel au « Pro-Q Diamond », qui permet de révéler les protéines phosphorylées. Plusieurs bandes sont apparues avec une intensité plus forte dans la piste correspondant aux animaux mutés pour *ppm-2*, notamment à des tailles correspondant à des protéines de 50 kDa et 70 kDa (Figure 43). Sachant que TFG-1 a une taille de 50 kDa, nous avons découpé ces bandes et les avons analysées en spectrométrie de masse. TFG-1 a été retrouvée phosphorylée dans la bande située vers 70 kDa en absence de PPM-2. Ceci suggère que TFG-1 pourrait être un substrat de PPM-2 car en l'absence de cette phosphatase, TFG-1 est davantage phosphorylée.

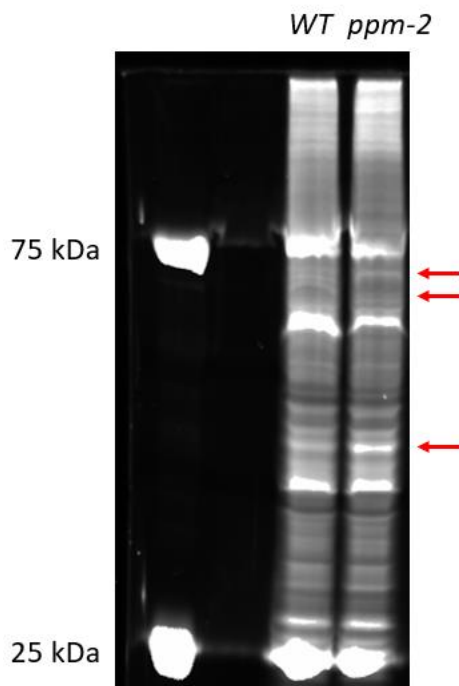


Figure 43 : Révélation de protéines phosphorylées par coloration au Pro-Q Diamond

Migration d'extraits protéiques totaux d'animaux sauvages et mutés pour *ppm-2* sur gel d'acrylamide ensuite coloré au Pro-Q Diamond. Des bandes, aux environs de 50 et 70 kDa, apparaissent plus colorées dans la piste des animaux mutés pour *ppm-2* (flèches rouges). Elles ont été découpées et analysées en spectrométrie de masse.

Afin de vérifier si TFG-1 peut être un substrat potentiel de la phosphatase PPM-2, nous avons créé un mutant catalytique de PPM-2. La structure cristalline de PP2C, établie en 1996, a révélé la présence d'un domaine catalytique de la protéine étant capable de lier les ions manganèse et magnésium (Das et al. 1996). Suite à cela, une autre étude, réalisée chez l'humain, a mis en évidence que les résidus catalytiques D60 et D239, situés dans le site actif de PP2C, sont nécessaires à son activité catalytique (Jackson et al. 2003). De plus, deux autres études ont validé que la mutation des acides aspartiques 59 (correspond à 60) et 229 en asparagine affectent l'activité catalytique de PPM-2 chez *C. elegans* et de PPM1A chez l'Homme, respectivement (Baker et al. 2014; Xiang et al. 2016). Nous avons décidé de muter l'acide aspartique en position 228 (correspondant à l'acide aminé 229 chez l'humain) en asparagine (D228N) par la technique de CRISPR-Cas9 car ce résidu est celui qui contribue

le plus à l'activité catalytique de PP2C (Jackson et al. 2003). Cette mutation a été réalisée dans la souche que nous avons créée au préalable, où PPM-2 est marquée avec l'étiquette HA.

La souche du mutant catalytique ainsi obtenue a été croisée dans la souche mutante pour *let-7*. Nous avons observé, dans ce double mutant, un pourcentage d'animaux mourants à la transition L4 – adulte beaucoup plus élevé (74%) que chez des animaux *ppm-2;let-7ts* (51%) (Figure 44 et 18A). La souche du mutant catalytique affecte plus fortement la régulation du miARN *let-7*. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'un tel type de mutant peut tout de même s'associer à son substrat en le séquestrant faute de pouvoir le déphosphoryler.

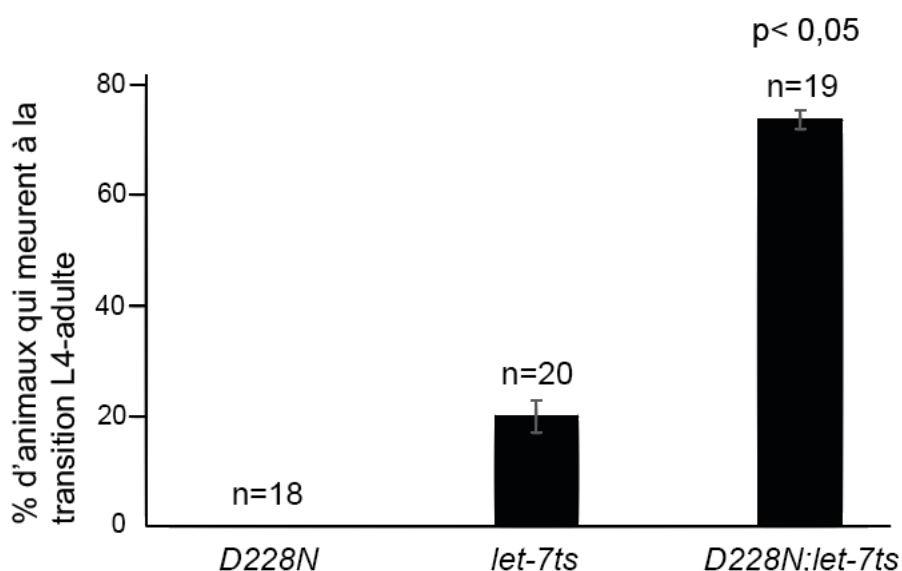


Figure 44 : Le mutant catalytique de *ppm-2* présente une synergie avec *let-7*

Les animaux de génotype *D228N* sont mutés pour l'activité catalytique de *ppm-2*. Analyse de la létalité d'animaux double mutant *D228N;let-7ts* à la transition larvaire L4-adulte à température permissive (15°C). Environ 20% des animaux *let-7ts* mutants meurent à la transition larvaire L4 – adulte et cette létalité est fortement augmentée chez des animaux double mutants *D228N;let-7ts*. Le nombre de nématodes qui a été compté dans chacun des cas est indiqué (n). Les barres d'erreurs représentent l'écart type calculé sur trois expériences indépendantes et la p-value est indiquée.

Nous avons ensuite réalisé des expériences préliminaires de co-immunoprécipitation dans le but de déterminer si TFG-1 est séquestrée par le mutant catalytique de PPM-2. En condition non traitée au MG132 (NT), nous avons observé que la protéine PPM-2 sauvage interagit avec TFG-1 mais que cette interaction est favorisée lorsque l'activité catalytique de PPM-2 est abolie (Figure 45). De plus, le patron d'expression de la protéine TFG-1 présente plusieurs bandes supérieures à la bande originale, ce qui pourrait correspondre à une forme hyperphosphorylée de la protéine (Figure 45). L'interaction entre ALG-1 et le mutant catalytique de la protéine PPM-2, quant à elle, est aussi augmentée en absence de PPM-2 (Figure 45). De plus, le niveau d'ALG-1 total est légèrement augmenté chez des animaux où l'activité catalytique de PPM-2 est mutée en comparaison à des animaux sauvages. Ceci est le résultat inverse de celui qu'on obtient en absence de PPM-2. Comme mentionné auparavant, le mutant catalytique de PPM-2 pourrait entraîner la séquestration de son substrat (possiblement TFG-1) et par la même occasion d'ALG-1, empêchant, ainsi, sa dégradation. Il serait intéressant de répéter ces expériences et de réaliser des analyses protéomiques plus poussées afin de déterminer le substrat de PPM-2 en utilisant, par exemple, des techniques d'enrichissement de phosphopeptides suivies d'analyses par spectrométrie de masse à partir d'extraits protéiques sauvage et mutant pour *ppm-2*. La comparaison entre les souches sauvages et mutantes pourrait nous permettre de détecter une phosphorylation différentielle sur TFG-1 ou une autre protéine. Si TFG-1 s'avère être seulement phosphorylée en absence de PPM-2, il serait intéressant de produire un anticorps spécifique au site phosphorylé de TFG-1, après l'avoir identifié, dans le but de valider cette observation par immunobuvardage. Finalement, il faudrait valider que le mutant D228N que nous avons créé par CRISPR-Cas9 est bien un mutant catalytique de PPM-2. L'expérience idéale serait de réaliser une déphosphorylation *in vitro* d'un peptide phosphorylé correspondant à un substrat connu de PPM-2.

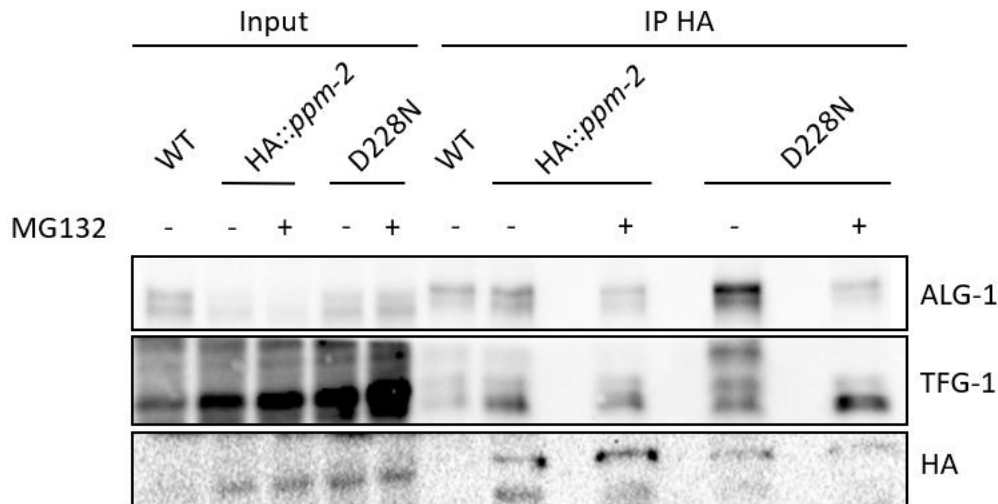


Figure 45 : Co-immunoprécipitation entre PPM-2, TFG-1 ET ALG-1

Immunoprécipitation de la protéine PPM-2 avec l'anticorps anti-HA et révélation des protéines TFG-1 et ALG-1. D228N correspond au mutant catalytique de PPM-2.

Le domaine riche en PQ (proline/glutamine) de TFG-1 a été montré comme étant important pour l'homéostasie intracellulaire protéique. En effet, ce domaine de TFG-1 favorise le système UPR (*Unfolded Protein Response*) au dépit du système UPS (*Ubiquitin-Proteasome System*) pour maintenir l'homéostasie et est important pour une bonne formation des vésicules situées au site de sortie du réticulum endoplasmique (Yagi et al. 2014). Par spectrométrie de masse, le site différentiellement phosphorylé en absence de PPM-2 que nous avons trouvé, se situe dans le domaine PQ de TFG-1. Une hypothèse, à ce jour, serait que la perte de PPM-2 empêcherait la déphosphorylation de TFG-1 ce qui affecterait son domaine PQ et favoriserait alors la dégradation des protéines, en sortie du réticulum endoplasmique, par la voie du protéasome au lieu du système UPR.

Mes travaux démontrent que PPM-2, interacteur du complexe DCS-1/XRN-1, est le premier modulateur mis en évidence comme permettant de réguler plusieurs voies de courts ARN non codants. Cette phosphatase, associée au complexe DCS-1/XRN-1, permettrait la déphosphorylation d'une protéine associée aux protéines Argonautes, ce qui entrainerait le recyclage de ces dernières tandis que les courts ARN seraient dégradés. Or, l'inhibition de la déphosphorylation du substrat de PPM-2 favoriserait le marquage des protéines Argonautes

par des molécules d'ubiquitine ce qui activerait leur dégradation par la voie du protéasome (Figure 46).

4.2. Caractérisation de la protéine HECD-1

Tout comme PPM-2, HECD-1 a été identifiée comme étant un interacteur du complexe DCS-1/XRN-1 (Figure 28). Les défauts observés chez des animaux mutés pour *hecd-1* dans la structure des alae (distorsions) suggèrent que cette E3 ubiquitine ligase est impliquée dans la voie des miARN (Figure 29).

La caractérisation de la souche mutante pour *hecd-1* a révélé que la perte de HECD-1 affecte la taille de la progéniture des animaux (Figure 30 et 31). De plus, un faible pourcentage de bébés présente un phénotype de létalité embryonnaire (Figure 30 et 31) qui est attribuable à un développement anormal de l'embryon observé au stade de gastrula (Figure 33). Il s'avère que, chez les hermaphrodites, ce phénotype est lié à un problème dans l'ovogenèse. Mais les mâles eux, ne pouvant se reproduire, présentent un problème dans la spermatogénèse.

Dans de nombreux modèles d'études différents, il a déjà été démontré que des protéines à domaine HECT sont impliquées dans l'embryogénèse (Zhu et al. 1999; Zahreddine et al. 2010; Huang et al. 2000; Kajiro et al. 2011; Chen et al. 2016; Iimura et al. 2016). Notamment chez *C. elegans*, l'inhibition de la protéine WWP1 par l'interférence à l'ARN entraîne un phénotype de létalité embryonnaire (84%) attribuable à une morphogénèse anormale observée au stade tardif de l'embryogénèse (Huang et al. 2000). Chez des embryons sauvages, toutes les divisions cellulaires sont complétées au stade de « comma ». Sachant que la perte de WWP1 affecte seulement la morphogénèse des embryons après ce stade mais que la perte de HECD-1, elle, affecte le développement embryonnaire aux stades précoces, ceci suggère que WWP1 est essentielle pour la morphogénèse tandis que HECD-1 est plutôt importante pour la prolifération cellulaire et le métabolisme.

Afin d'évaluer l'implication de HECD-1 dans la voie des miARN, nous avons commencé par croiser des animaux mutés pour *hecd-1* avec des animaux mutés pour *alg-1*. De manière intéressante, des animaux double mutants pour ces deux gènes sont stériles (Figure 34). Ceci

suggère que *hecd-1* présente une interaction génétique avec *alg-1*. Puis, nous avons également observé que la perte de *hecd-1* permet de rétablir la régulation médiée par le miARN *let-7* (Figure 36).

Tout comme nous l'avons fait pour l'étude de PPM-2, il serait intéressant de faire des analyses génétiques plus poussées afin de mieux caractériser le rôle de HECD-1 dans la voie des miARN. Notamment, nous pourrions évaluer l'implication de HECD-1 sur la régulation d'autres miARN tels que *mir-84* (avec la souche *let-60*) et *lsy-6*. De plus, sachant que la perte de fonction de *hecd-1* affecte la régulation du miARN *let-7*, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de la régulation du gène *lin-41* par le miARN *let-7* en l'absence de cette E3 ubiquitine ligase. Pour cela, nous utiliserons la souche rapporteur GFP fusionnée à la séquence 3'UTR du gène *lin-41*.

Puisque la perte de *hecd-1* rétablit l'activité du miARN *let-7*, nous avons décidé de quantifier le niveau d'expression de certains miARN par RT-PCR quantitative en temps réel. Cette quantification a révélé que le niveau d'expression de 3 miARN, dont *let-7*, est augmenté en absence de *hecd-1* (Figure 37). Ceci suggère que la perte de fonction de *hecd-1* entraîne une accumulation de miARN fonctionnels. De manière intéressante, des animaux mutés pour *dcs-1* présentent aussi une accumulation de niveau d'expression de plusieurs miARN fonctionnels (Bossé et al. 2013).

Le modèle que nous proposons est que HECD-1, en tant qu'E3 ubiquitine ligase, est impliquée dans l'ubiquitination d'une protéine importante pour la dégradation ou la transcription des miARN. L'absence d'ubiquitination chez des animaux mutés pour *hecd-1* pourrait mener à une surexpression d'une protéine ou à une mauvaise localisation de celle-ci.

Afin de mieux comprendre à quel niveau est impliqué HECD-1, il serait intéressant de quantifier le niveau d'expression des formes primaires et précurseurs des miARN par RT-PCR quantitative en temps réel et par des expériences de Northern Blot. Ceci dans le but de savoir si HECD-1 affecte plutôt la transcription des miARN.

Dans le cas où les formes primaires et précurseurs des miARN ne seraient pas affectées, cela signifiera que HECD-1 est importante pour la dégradation des miARN. Cette hypothèse semble plus probable sachant que l'on a identifié HECD-1 comme étant un interacteur du complexe DCS-1/XRN-1 et que la perte de fonction de *hecd-1* présente les mêmes phénotypes que chez des animaux mutés pour *dcs-1*. L'étude du niveau d'expression des protéines du miRISC et du complexe de dégradation des miARN sera alors incontournable. Premièrement, des analyses de spectrométrie de masse pourront permettre d'identifier une protéine différenciellement ubiquitinée chez des animaux sauvages en comparaison à des animaux mutés pour *hecd-1*. Ensuite, des expériences d'immunobuvardage nous permettront d'évaluer si, en absence de HECD-1, la protéine non ubiquitinée voit son niveau d'expression augmenter. Si non, nous vérifierons sa localisation dans la cellule en utilisant une souche où ce substrat potentiel est marqué par l'étiquette GFP ou RFP (*Red Fluorescent Protein*). Finalement, faute d'avoir un anticorps reconnaissant la protéine HECD-1, il serait primordial de la marquer avec une étiquette par la technique de CRISPR-Cas9. Ceci permettrait par la suite de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation et de connaître la localisation de la protéine dans le cas où l'étiquette est une protéine fluorescente.

D'après les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent, nous ne sommes pas en mesure de déterminer, avec précision, la protéine pouvant être affectée par HECD-1. En revanche, nous avons quelques candidats potentiels en raison de leur importance pour contrôler la dégradation des miARN ou bien leur transcription.

Dans le cas où le niveau des miARN primaires et/ou précurseurs sont aussi augmentés chez des animaux mutés pour *hecd-1*, cela indiquera que HECD-1 agit sur l'ARN polymérase de type II ou sur le microprocesseur. Or, si seulement le niveau des miARN matures est augmenté cela peut suggérer que HECD-1 est impliquée dans la régulation de Dicer. L'hypothèse serait que la perte de HECD-1 entraîne une accumulation de Dicer qui pourrait cliver plus de miARN précurseurs et donc produire plus de miARN matures.

L'interaction génétique entre *hecd-1* et *alg-1* que nous avons mis en évidence suggère que HECD-1 agit dans une voie parallèle à ALG-1. En revanche, il a déjà été montré, chez la souris, que la protéine HSP90 est un substrat de HECTD1. HSP90, dans la voie des miARN,

permet à la protéine Argonaute d'adopter une bonne conformation pour pouvoir prendre en charge le miARN (Iwasaki et al. 2010). Chez *C. elegans*, la perte de HECD-1 pourrait empêcher l'ubiquitination d'HSP-90 et ainsi entraîner son accumulation. Ceci favoriserait l'interaction entre ALG-1 et les miARN, ce qui permettrait de protéger ces derniers de la dégradation.

Cependant, l'hypothèse la plus plausible serait que HECD-1 agisse au niveau du complexe de dégradation DCS-1/XRN-1. En effet, HECD-1 a été identifiée comme étant un interacteur de ce complexe. De plus, les phénotypes observés chez des animaux mutés pour *hecd-1* sont semblables à ceux observés chez des animaux mutés pour *dcs-1*. Ceci suggère que *hecd-1* agit dans la même voie que *dcs-1*. L'une des hypothèses serait que HECD-1 pourrait permettre l'ubiquitination soit de DCS-1 soit de XRN-1 et ainsi entraîner une relocalisation cellulaire de ces dernières, au miRISC. HECD-1 pourrait également être nécessaire à l'interaction entre DCS-1 et XRN-1.

Il serait intéressant également d'étudier l'impact de HECD-1 sur les autres voies de courts ARN non codants, et en particulier la voie des piARN car il est connu que lorsque la protéine Argonaute PRG-1 est inhibée, la prolifération germinale ainsi que la fertilité des animaux sont affectées (Wang and Reinke 2008; Batista et al. 2008). Ceci pourrait peut-être expliquer le fait que des animaux mutés pour *hecd-1* présentent des défauts dans la gamétogénèse.

Conclusion générale

Pendant de longues années, la molécule d'ADN a été au centre de toutes les attentions alors qu'une molécule parente, l'ARN, est restée dans l'ombre, cantonnée aux tâches subalternes. Les ARN les plus étudiés étant essentiellement les ARNm, portant l'information génétique, et les ARNr et ARNt, permettant de fabriquer des protéines à partir de l'ARNm. Mais la situation a changé dans les 25 dernières années. En effet, la découverte de trois nouvelles classes d'ARN, que sont les miARN, les siARN et les piARN, a révolutionné le domaine de la recherche sur la régulation de l'expression génique. De plus, ces courtes molécules d'ARNs, étant très bien conservées dans l'évolution, jouent un rôle primordial dans le développement et le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Très rapidement, les scientifiques ont analysé et détaillé finement la biogénèse de ces courts ARN non codants considérant leur rôle incontournable dans le bon fonctionnement de la cellule. L'étude de ces voies de régulation dans différents organismes a révélé l'importance de plusieurs protéines communes nécessaires à leur biogénèse, comme par exemple les protéines Argonautes. Ce n'est que depuis très récemment que des travaux s'intéressent plus aux rôles joués par des protéines accessoires sur la régulation de ces voies. En effet, ces dernières ne sont pas indispensables au bon fonctionnement des voies de régulation impliquant les courts ARN non codants mais en modulent l'activité.

Le but principal de mon projet de doctorat a été d'élargir nos connaissances sur la régulation et la modulation des courts ARN non codants en caractérisant le rôle de deux protéines chez le nématode *C. elegans*. Mes travaux ont permis de mettre en évidence la première protéine modulatrice, la phosphatase PPM-2, de la stabilité des protéines Argonautes impliquées dans différentes voies de courts ARN non codants. Concernant la deuxième protéine, HECD-1, les travaux préliminaires réalisés sur sa caractérisation indiquent que cette ubiquitine ligase serait impliquée dans la stabilité des miARN. En conclusion, mes travaux ont permis d'étoffer notre compréhension à propos de la régulation de ces puissants régulateurs de l'expression génique. Cette démarche de caractérisation s'avère être un outil indispensable dans notre domaine de recherche pour une meilleure compréhension du fonctionnement de ces micromanagers.

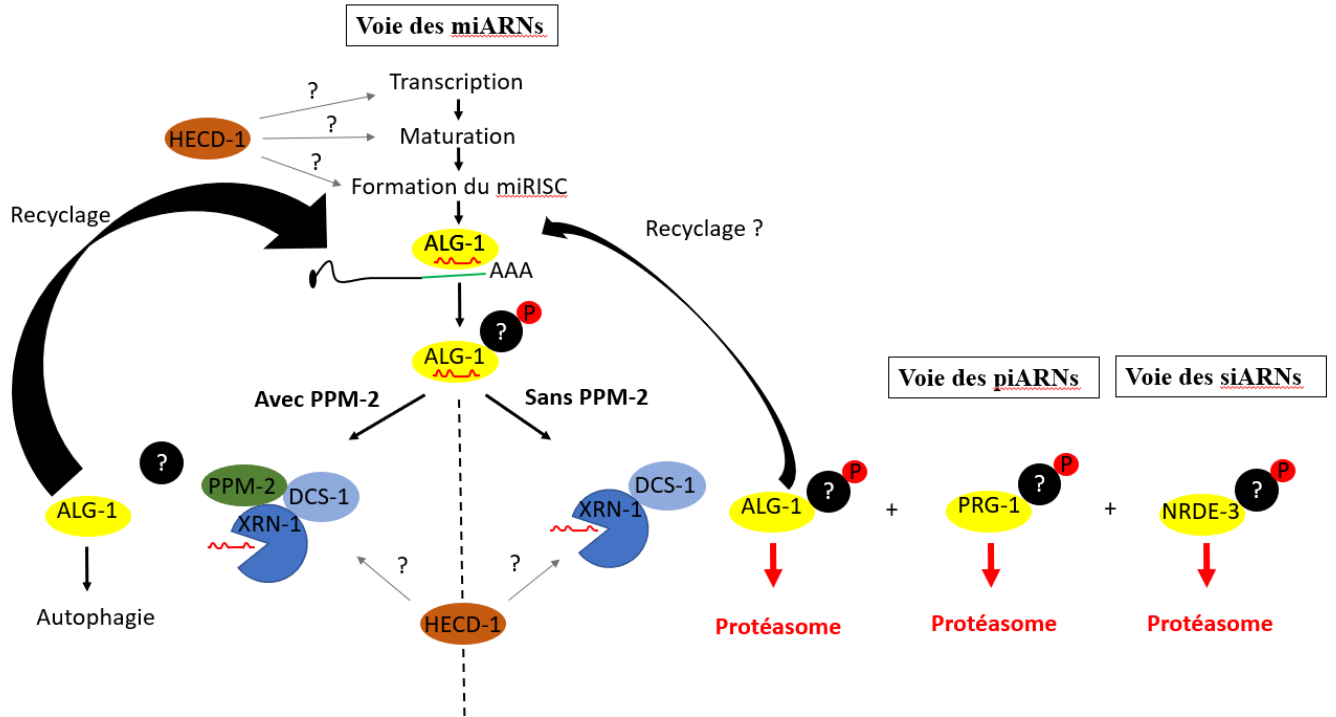


Figure 46 : Résumé de mes travaux de recherche

En absence de PPM-2, son substrat (encore inconnu) reste phosphorylé ce qui entraîne la dégradation par la voie du protéasome des protéines Argonautes ALG-1, PRG-1 et NRDE-3. La protéine HECD-1 pourrait être importante soit pour réguler la transcription des miARN ou leur maturation, soit pour favoriser leur dégradation.

Bibliographies :

- Aalto, Antti P, and Amy E Pasquinelli. 2012. "Small Non-Coding RNAs Mount a Silent Revolution in Gene Expression." *Current Opinion in Cell Biology* 24 (3): 333–40.
- Abbott, Allison L, Ezequiel Alvarez-Saavedra, Eric A Miska, Nelson C Lau, David P Bartel, H Robert Horvitz, and Victor Ambros. 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 (3): 403–14.
- Adams, Brian D, Andrea L Kasinski, and Frank J Slack. 2014. "Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer." *Current Biology : CB* 24 (16): R762–76.
- Albuquerque, Bruno F.M. de, Maria Placentino, and René F. Ketting. 2015. "Maternal piRNAs Are Essential for Germline Development Following De Novo Establishment of Endo-siRNAs in *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental Cell* 34 (4): 448–56.
- Albuquerque, Bruno F M de, Maartje J Luteijn, Ricardo J Cordeiro Rodrigues, Petra van Bergeijk, Selma Waaijers, Lucas J T Kaaij, Holger Klein, Mike Boxem, and René F Ketting. 2014. "PID-1 Is a Novel Factor That Operates during 21U-RNA Biogenesis in *Caenorhabditis Elegans*." *Genes & Development* 28 (7): 683–88.
- Ameres, S. L., J.-H. Hung, J. Xu, Z. Weng, and P. D. Zamore. 2011. "Target RNA-Directed Tailing and Trimming Purifies the Sorting of Endo-siRNAs between the Two *Drosophila* Argonaute Proteins." *RNA* 17 (1): 54–63.
- Ameres, Stefan L, Michael D Horwich, Jui-Hung Hung, Jia Xu, Megha Ghildiyal, Zhiping Weng, and Phillip D Zamore. 2010. "Target RNA-Directed Trimming and Tailing of Small Silencing RNAs." *Science* 328 (5985): 1534–39.
- Aravin, Alexei A, Ravi Sachidanandam, Deborah Bourc'his, Christopher Schaefer, Dubravka Pezic, Katalin Fejes Toth, Timothy Bestor, and Gregory J Hannon. 2008. "A piRNA Pathway Primed by Individual Transposons Is Linked to de Novo DNA Methylation in Mice." *Molecular Cell* 31 (6): 785–99.
- Aravin, Alexei A, Ravi Sachidanandam, Angélique Girard, Katalin Fejes-Toth, and Gregory J Hannon. 2007. "Developmentally Regulated piRNA Clusters Implicate MILI in Transposon Control." *Science* 316 (5825): 744–47.
- Ashe, Alyson, Alexandra Sapetschnig, Eva-Maria Weick, Jacinth Mitchell, Marloes P Bagijn, Amy C Cording, Anna-Lisa Doebley, et al. 2012. "piRNAs Can Trigger a Multigenerational Epigenetic Memory in the Germline of *C. Elegans*." *Cell* 150 (1): 88–99.
- Avraham, Roi, Aldema Sas-Chen, Ohad Manor, Israel Steinfeld, Reut Shalgi, Gabi Tarcic, Noa Bossel, et al. 2010. "EGF Decreases the Abundance of MicroRNAs That Restrain Oncogenic Transcription Factors." *Science Signaling* 3 (124): ra43.
- Baek, Daehyun, Judit Villén, Chanseok Shin, Fernando D Camargo, Steven P Gygi, and David P Bartel. 2008. "The Impact of microRNAs on Protein Output." *Nature* 455

(7209): 64–71.

- Bagga, Shveta, John Bracht, Shaun Hunter, Katlin Massirer, Janette Holtz, Rachel Eachus, and Amy E Pasquinelli. 2005. “Regulation by Let-7 and Lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation.” *Cell* 122 (4): 553–63.
- Bagijn, Marloes P, Leonard D Goldstein, Alexandra Sapetschnig, Eva-Maria Weick, Samir Bouasker, Nicolas J Lehrbach, Martin J Simard, and Eric A Miska. 2012. “Function, Targets and Evolution of *Caenorhabditis Elegans* piRNAs.” *Science (New York, N.Y.)* 337 (6094): 574–78.
- Bail, Sophie, Mavis Swerdel, Hudan Liu, Xinfu Jiao, Loyal A Goff, Ronald P Hart, and Megerditch Kiledjian. 2010. “Differential Regulation of microRNA Stability.” *RNA* 16 (5): 1032–39.
- Baker, Scott T, Karla J Opperman, Erik D Tulgren, Shane M Turgeon, Willy Bienvenut, and Brock Grill. 2014. “RPM-1 Uses Both Ubiquitin Ligase and Phosphatase-Based Mechanisms to Regulate DLK-1 during Neuronal Development.” *PLoS Genetics* 10 (5): e1004297.
- Barford, D. 1996. “Molecular Mechanisms of the Protein Serine/threonine Phosphatases.” *Trends in Biochemical Sciences* 21 (11): 407–12.
- Bartel, David P. 2009. “MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions.” *Cell* 136 (2): 215–33.
- Bartel, David P. 2004. “MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function.” *Cell* 116: 281–97.
- Batista, Pedro J, Graham Ruby, Julie M Claycomb, Rosaria Chiang, Noah Fahlgren, Kristin D Kasschau, Daniel A Chaves, et al. 2008. “PRG-1 and 21U-RNAs Interact to Form the piRNA Complex Required for Fertility in *C. Elegans*.” *Molecular Cell* 31 (1): 67–78.
- Behm-Ansmant, Isabelle, Jan Rehwinkel, Tobias Doerks, Alexander Stark, Peer Bork, and Elisa Izaurralde. 2006. “mRNA Degradation by miRNAs and GW182 Requires Both CCR4:NOT Deadenylase and DCP1:DCP2 Decapping Complexes.” *Genes & Development* 20 (14): 1885–98.
- Beitel, Greg J, Scott G Clark, and H Robert Horvitz. 1990. “*Caenorhabditis Elegans* Ras Gene Let-60 Acts as a Switch in the Pathway of Vulval Induction.” *Nature* 348 (6301): 503–9.
- Bennasser, Yamina, Christine Chable-Bessia, Robinson Triboulet, Derrick Gibbings, Carole Gwizdek, Catherine Dargemont, Eric J Kremer, Olivier Voinnet, and Moncef Benkirane. 2011. “Competition for XPO5 Binding between Dicer mRNA, Pre-miRNA and Viral RNA Regulates Human Dicer Levels.” *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (3): 323–27.
- Bohmert, K, I Camus, C Bellini, D Bouchez, M Caboche, and C Benning. 1998. “AGO1 Defines a Novel Locus of Arabidopsis Controlling Leaf Development.” *The EMBO Journal* 17 (1): 170–80.

- Bohnsack, Markus T, Kevin Czapinski, and Dirk G Rlich. 2004. "Exportin 5 Is a RanGTP-Dependent dsRNA-Binding Protein That Mediates Nuclear Export of Pre-miRNAs." *RNA* 10: 185–91.
- Boland, Andreas, Eric Huntzinger, Steffen Schmidt, Elisa Izaurre, and Oliver Weichenrieder. 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 (26): 10466–71.
- Boland, Andreas, Felix Tritschler, Susanne Heimstädt, Elisa Izaurre, and Oliver Weichenrieder. 2010. "Crystal Structure and Ligand Binding of the MID Domain of a Eukaryotic Argonaute Protein." *EMBO Reports* 11 (7): 522–27.
- Borges, Filipe, and Robert A Martienssen. 2015. "The Expanding World of Small RNAs in Plants." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (12): 727–41.
- Bosher, J M, P Dufourcq, S Sookhareea, and M Labouesse. 1999. "RNA Interference Can Target Pre-mRNA: Consequences for Gene Expression in a Caenorhabditis Elegans Operon." *Genetics* 153 (3): 1245–56.
- Bossé, Gabriel D, Stefan Rügger, Maria C Ow, Alejandro Vasquez-Rifo, Evelyne L Rondeau, Victor R Ambros, Helge Großhans, and Martin J Simard. 2013. "The DeCapping Scavenger Enzyme DCS-1 Controls microRNA Levels in Caenorhabditis Elegans." *Molecular Cell* 50 (2): 281–87.
- Bouasker, Samir, and Martin J Simard. 2012. "The Slicing Activity of miRNA-Specific Argonautes Is Essential for the miRNA Pathway in C. Elegans." *Nucleic Acids Research* 40 (20): 10452–62.
- Braun, Joerg E., Eric Huntzinger, Maria Fauser, and Elisa Izaurre. 2011. "GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylation Complexes to miRNA Targets." *Molecular Cell* 44 (1): 120–33.
- Brennecke, Julius, Alexei A. Aravin, Alexander Stark, Monica Dus, Manolis Kellis, Ravi Sachidanandam, and Gregory J. Hannon. 2007. "Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in Drosophila." *Cell* 128 (6): 1089–1103.
- Brennecke, Julius, Alexander Stark, Robert B Russell, and Stephen M Cohen. 2005. "Principles of MicroRNA–Target Recognition." *PLOS Biology* 3 (3): e85.
- Brenner, S. 1974. "The Genetics of CAENORHABDITIS ELEGANS." *Genetics* 77 (1): 71–94.
- Britten, Roy J, and Eric H Davidson. 1969. "Gene Regulation for Higher Cells: A Theory." *Science* 165 (3891): 349–57.
- Brockdorff, Neil, Alan Ashworth, Graham F. Kay, Veronica M. McCabe, Dominic P. Norris, Penny J. Cooper, Sally Swift, and Sohaila Rastan. 1992. "The Product of the Mouse Xist Gene Is a 15 Kb Inactive X-Specific Transcript Containing No Conserved ORF and Located in the Nucleus." *Cell* 71 (3): 515–26.
- Bronevetsky, Yelena, Alejandro V. Villarino, Christopher J. Easley, Rebecca Barbeau,

- Andrea J. Barczak, Gitta A. Heinz, Elisabeth Kremmer, et al. 2013. “T Cell Activation Induces Proteasomal Degradation of Argonaute and Rapid Remodeling of the microRNA Repertoire.” *The Journal of Experimental Medicine* 210 (2): 417–32.
- Buckley, Bethany, Kirk Burkhart, Sam Guoping Gu, George Spracklin, Aaron Kershner, Heidi Fritz, Judith Kimble, Andrew Fire, and Scott Kennedy. 2012. “A Nuclear Argonaute Promotes Multi-Generational Epigenetic Inheritance and Germline Immortality.” *Nature* 489: 447–51.
- Budhiraja, Sona, Rajesh Ramakrishnan, and Andrew P Rice. 2012. “Phosphatase PPM1A Negatively Regulates P-TEFb Function in Resting CD4(+) T Cells and Inhibits HIV-1 Gene Expression.” *Retrovirology* 9 (52): 1–10.
- Burkhart, Kirk B., Shouhong Guang, Bethany A. Buckley, Lily Wong, Aaron F. Bochner, and Scott Kennedy. 2011. “A Pre-mRNA-Associating Factor Links Endogenous Sirnas to Chromatin Regulation.” *PLoS Genetics* 7 (8): e1002249.
- Büssing, Ingo, Jr-Shiuan Yang, Eric C Lai, and Helge Großhans. 2010. “The Nuclear Export Receptor XPO-1 Supports Primary miRNA Processing in *C. Elegans* and *Drosophila*.” *The EMBO Journal* 29 (11): 1830–39.
- Carlo V., Grossi E., Laneve P., Morlando M., Dini Modigliani S., Ballarino M., Bozzoni I. and Caffarelli E. Di. 2013. “TDP-43 Regulates the Microprocessor Complex Activity During In Vitro Neuronal Differentiation.” *Molecular Neurobiology* 48 (3): 952–63.
- Chang, Tsung-Cheng, Duonan Yu, Yun-Sil Lee, Erik A Wentzel, Dan E Arking, Kristin M West, Chi V Dang, Andrei Thomas-Tikhonenko, and Joshua T Mendell. 2008. “Widespread microRNA Repression by Myc Contributes to Tumorigenesis.” *Nature Genetics* 40 (1): 43–50.
- Chatterjee, Saibal, Monika Fasler, Ingo Büssing, and Helge Großhans. 2011. “Target-Mediated Protection of Endogenous MicroRNAs in *C. Elegans*.” *Developmental Cell* 20 (3): 388–96.
- Chatterjee, Saibal, and Helge Groszhans. 2009. “Active Turnover Modulates Mature microRNA Activity in *Caenorhabditis Elegans*.” *Nature* 461 (7263): 546–49.
- Chekulaeva, Marina, Hansruedi Mathys, Jakob T Zipprich, Jan Attig, Marija Colic, Roy Parker, and Witold Filipowicz. 2011. “miRNA Repression Involves GW182-Mediated Recruitment of CCR4–NOT through Conserved W-Containing Motifs.” *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (11): 1218–26.
- Cheloufi, Sihem, Camila O Dos Santos, Mark M W Chong, and Gregory J Hannon. 2010. “A Dicer-Independent miRNA Biogenesis Pathway That Requires Ago Catalysis.” *Nature* 465 (7298): 584–89.
- Chen, Chyi-Ying A, Dinghai Zheng, Zhenfang Xia, and Ann-Bin Shyu. 2009. “Ago–TNRC6 Triggers microRNA-Mediated Decay by Promoting Two Deadenylation Steps.” *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (11): 1160–66.
- Chen, L. J., W. M. Xu, M. Yang, K. Wang, Y. Chen, X. J. Huang, and Q. H. Ma. 2016. “HUWE1 Plays Important Role in Mouse Preimplantation Embryo Development and

- the Dysregulation Is Associated with Poor Embryo Development in Humans.” *Scientific Reports* 30 (6): 37928.
- Chen, Yunting, and Iva Greenwald. 2015. “Heed-1 Modulates Notch Activity in *Caenorhabditis Elegans*.” *G3: Genes/Genomes/Genetics* 5 (3): 353–59.
- Chendrimada, Thimmaiah P, Richard I Gregory, Easwari Kumaraswamy, Jessica Norman, Neil Cooch, Kazuko Nishikura, and Ramin Shiekhattar. 2005. “TRBP Recruits the Dicer Complex to Ago2 for microRNA Processing and Gene Silencing.” *Nature* 436 (7051): 740–44.
- Cheng, Tian Lin, Zhizhi Wang, Qiuming Liao, Ying Zhu, Wen Hao Zhou, Wenqing Xu, and Zilong Qiu. 2014. “MeCP2 Suppresses Nuclear MicroRNA Processing and Dendritic Growth by Regulating the DGCR8/Drosha Complex.” *Developmental Cell* 28 (5): 547–60.
- Chien, Chia-Hung, Yi-Ming Sun, Wen-Chi Chang, Pei-Yun Chiang-Hsieh, Tzong-Yi Lee, Wei-Chih Tsai, Jorng-Tzong Horng, Ann-Ping Tsou, and Hsien-Da Huang. 2011. “Identifying Transcriptional Start Sites of Human microRNAs Based on High-Throughput Sequencing Data.” *Nucleic Acids Research* 39 (21): 9345–56.
- Chinen, Madoka, and Elissa P. Lei. 2017. “*Drosophila* Argonaute2 Turnover Is Regulated by the Ubiquitin Proteasome Pathway.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483: 951–57.
- Choudhuri, Supratim. 2010. “Small Noncoding RNAs: Biogenesis, Function, and Emerging Significance in Toxicology.” *J Biochem Mol Toxicol* 24 (3): 195–216.
- Chung, Wei-Jen, Phaedra Agius, Jakub O Westholm, Michael Chen, Katsutomo Okamura, Nicolas Robine, Christina S Leslie, and Eric C Lai. 2011. “Computational and Experimental Identification of Mirtrons in *Drosophila Melanogaster* and *Caenorhabditis Elegans*.” *Genome Research* 21 (2): 286–300.
- Cifuentes, Daniel, Huiling Xue, David W Taylor, Heather Patnode, Yuichiro Mishima, Sihem Cheloufi, Enbo Ma, et al. 2010. “A Novel miRNA Processing Pathway Independent of Dicer Requires Argonaute2 Catalytic Activity.” *Science* 328: 1694–98.
- Claycomb, Julie M, Pedro J Batista, Ka Ming Pang, Weifeng Gu, Jessica J Vasale, Josien C van Wolfswinkel, Daniel A Chaves, et al. 2009. “The Argonaute CSR-1 and Its 22G-RNA Co-Factors Target Germline Genes and Are Required for Holocentric Chromosome Segregation.” *Cell* 139 (1): 123–34.
- Cohen, Leah S, Claudette Mikhli, Cassandra Friedman, Marzena Jankowska-anyszka, Janusz Stepinski, Edward Darzynkiewicz, and Richard E Davis. 2004. “Nematode m(7)GpppG and m(3)(2,2,7)GpppG Decapping: Activities in *Ascaris* Embryos and Characterization of *C. Elegans* Scavenger DcpS.” *RNA* 10 (10): 1609–24.
- Conine, Colin C, Pedro J Batista, Weifeng Gu, Julie M Claycomb, Daniel A Chaves, Masaki Shirayama, and Craig C Mello. 2010. “Argonautes ALG-3 and ALG-4 Are Required for Spermatogenesis-Specific 26G-RNAs and Thermotolerant Sperm in *Caenorhabditis Elegans*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America 107 (8): 3588–93.

- Connerty, Patrick, Sarah Bajan, Judit Remenyi, Frances V Fuller-Pace, and Gyorgy Hutvagner. 2016. “The miRNA Biogenesis Factors, p72/DDX17 and KHSRP Regulate the Protein Level of Ago2 in Human Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859 (10): 1299–1305.
- Corcoran, David L, Kusum V Pandit, Ben Gordon, Arindam Bhattacharjee, Naftali Kaminski, and Panayiotis V Benos. 2009. “Features of Mammalian microRNA Promoters Emerge from Polymerase II Chromatin Immunoprecipitation Data.” *PLoS ONE* 4 (4): e5279.
- Corsi, Ann K, Bruce Wightman, and Martin Chalfie. 2015. “A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis Elegans* *.” *Caenorhabditis Elegans* 1. WormBook.
- Czech, Benjamin, Colin D Malone, Rui Zhou, Alexander Stark, Catherine Schlingeheyde, Monica Dus, Norbert Perrimon, et al. 2008. “An Endogenous Small Interfering RNA Pathway in *Drosophila*.” *Nature* 453 (7196): 798–802.
- Das, A K, N R Helps, P T Cohen, and D Barford. 1996. “Crystal Structure of the Protein Serine/threonine Phosphatase 2C at 2.0 Å Resolution.” *The EMBO Journal* 15 (24): 6798–6809.
- Das, Partha P, Marloes P Bagijn, Leonard D Goldstein, Julie R Woolford, Nicolas J Lehrbach, Alexandra Sapetschnig, Heeran R Buhecha, et al. 2008. “Piwi and piRNAs Act Upstream of an Endogenous siRNA Pathway to Suppress Tc3 Transposon Mobility in the *Caenorhabditis Elegans* Germline.” *Molecular Cell* 31 (1): 79–90.
- Das, Swadesh K, Upneet K Sokhi, Sujit K Bhutia, Belal Azab, Zhao-zhong Su, Devanand Sarkar, and Paul B Fisher. 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 (26): 11948–53.
- Davis, Brandi N., Aaron C. Hilyard, Giorgio Lagna, and Akiko Hata. 2008. “SMAD Proteins Control DROSHA-Mediated microRNA Maturation.” *Nature* 454 (7200): 56–61.
- Davis, Brandi N., Aaron C. Hilyard, Peter H. Nguyen, Giorgio Lagna, and Akiko Hata. 2010. “Smad Proteins Bind a Conserved RNA Sequence to Promote MicroRNA Maturation by Drosha.” *Molecular Cell* 39 (3): 373–84.
- De, Nabanita, Lisa Young, Pick Wei Lau, Nicole Claudia Meisner, David V Morrissey, and Ian J. MacRae. 2013. “Highly Complementary Target RNAs Promote Release of Guide RNAs from Human argonaute2.” *Molecular Cell* 50 (3): 344–55.
- Diederichs, Sven, and Daniel A. Haber. 2007. “Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression.” *Cell* 131 (6): 1097–1108.
- Ding, Lei, Andrew Spencer, Kiyokazu Morita, and Min Han. 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 Cell* 19 (4): 437–47.
- Ding, Xavier C, and Helge Großhans. 2009. “Repression of *C. Elegans* microRNA Targets at the Initiation Level of Translation Requires GW182 Proteins.” *The EMBO Journal* 28 (3): 213–22.
- Doench, John G, and Phillip A Sharp. 2004. “Specificity of microRNA Target Selection in Translational Repression.” *Genes & Development* 18 (5): 504–11.
- Drake, Melanie, Tokiko Furuta, Kin Man Suen, Gabriel Gonzalez, Bin Liu, Awdhesh Kalia, John E. Ladbury, Andrew Z. Fire, James B. Skeath, and Swathi Arur. 2014. “A Requirement for ERK-Dependent Dicer Phosphorylation in Coordinating Oocyte-to-Embryo Transition in *C.elegans*.” *Developmental Cell* 31 (5): 614–28.
- Drinnenberg, Ines A, David E Weinberg, Kathleen T Xie, Jeffrey P Mower, Kenneth H Wolfe, Gerald R Fink, David P Bartel, et al. 2009. “RNAi in Budding Yeast.” *Source: Science, New Series* 326 (5952): 544–50.
- Dvashi, Zeev, Hadas Sar Shalom, Meytal Shohat, Daniella Ben-Meir, Shiran Ferber, Ronit Satchi-Fainaro, Ruth Ashery-Padan, Mordechai Rosner, Arie S Solomon, and Sara Lavi. 2014. “Protein Phosphatase Magnesium Dependent 1A Governs the Wound Healing–Inflammation–Angiogenesis Cross Talk on Injury.” *The American Journal of Pathology* 184 (11): 2936–50.
- Eichhorn, Stephen W., Huili Guo, Sean E. McGeary, Ricard A. Rodriguez-Mias, Chanseok Shin, Daehyun Baek, Shu hao Hsu, Kalpana Ghoshal, Judit Villén, and David P. Bartel. 2014. “mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian microRNAs by the Time Substantial Repression Ensues.” *Molecular Cell* 56 (1): 104–15.
- Elbarbary, Reyad A, Keita Miyoshi, Jason R Myers, Peicheng Du, John M Ashton, Bin Tian, and Lynne E Maquat. 2017. “Tudor-SN-Mediated Endonucleolytic Decay of Human-Cell microRNAs Promotes G1/S Phase Transition.” *Science (New York, N.Y.)* 356 (6340): 859–62.
- Elbarbary R.A., Miyoshi K., Hedaya O., Myers J.R. and Maquat L.E. 2017. “UPF1 Helicase Promotes TSN-Mediated miRNA Decay.” *Genes and Development* 31: 1483–93.
- Elkayam, Elad, Claus D. Kuhn, Ante Tocilj, Astrid D. Haase, Emily M. Greene, Gregory J. Hannon, and Leemor Joshua-Tor. 2012. “The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a.” *Cell* 150 (1): 100–110.
- Eulalio, Ana, Felix Triteschler, and Elisa Izaurralde. 2009. “The GW182 Protein Family in Animal Cells: New Insights into Domains Required for miRNA-Mediated Gene Silencing.” *RNA* 15 (8): 1433–42.
- Fabian, Marc R., Géraldine Mathonnet, Thomas Sundermeier, Hansruedi Mathys, Jakob T. Zipprich, Yuri V. Svitkin, Fabiola Rivas, et al. 2009. “Mammalian miRNA RISC

- Recruits CAF1 and PABP to Affect PABP-Dependent Deadenylation.” *Molecular Cell* 35 (6): 868–80.
- Fabian, Marc R, Maja K Cieplak, Filipp Frank, Masahiro Morita, Jonathan Green, Tharan Srikumar, Bhushan Nagar, et al. 2011. “miRNA-Mediated Deadenylation Is Orchestrated by GW182 through Two Conserved Motifs That Interact with CCR4–NOT.” *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (11): 1211–17.
- Fabian, Marc R, and Nahum Sonenberg. 2012. “The Mechanics of miRNA-Mediated Gene Silencing: A Look under the Hood of miRISC.” *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (6): 586–93.
- Fagegaltier, Delphine, Anne-Laure Bougé, Bassam Berry, Émilie Poisot, Odile Sismeiro, Jean-Yves Coppée, Laurent Théodore, Olivier Voinnet, and Christophe Antoniewski. 2009. “The Endogenous siRNA Pathway Is Involved in Heterochromatin Formation in *Drosophila*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (50): 21258–63.
- Feltzin, Virzhiniya L., Mugdha Khaladkar, Masashi Abe, Michael Parisi, Gert Jan Hendriks, Junhyong Kim, and Nancy M. Bonini. 2015. “The Exonuclease Nibbler Regulates Age-Associated Traits and Modulates piRNA Length in *Drosophila*.” *Aging Cell* 14 (3): 443–52.
- Fire, Andrew, SiQun Xu, Mary K Montgomery, Steven A Kostas, Samuel E Driver, and Craig C Mello. 1998. “Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*.” *Nature* 391 (6669): 806–11.
- Flamand, Mathieu N., Hin Hark Gan, Vinay K. Mayya, Kristin C. Gunsalus, and Thomas F. Duchaine. 2017. “A Non-Canonical Site Reveals the Cooperative Mechanisms of microRNA-Mediated Silencing.” *Nucleic Acids Research* 45 (12): 7212–25.
- Flamand, Mathieu N, Edlyn Wu, Ajay Vashisht, Guillaume Jannot, Brett D Keiper, Martin J Simard, James Wohlschlegel, and Thomas F Duchaine. 2016. “Poly(A)-Binding Proteins Are Required for microRNA-Mediated Silencing and to Promote Target Deadenylation in *C. Elegans*.” *Nucleic Acids Research* 44 (12): 5924–35.
- Forman, Joshua J, Aster Legesse-Miller, and Hilary A Collier. 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 (39): 14879–84.
- Förstemann, Klaus, Yukihide Tomari, Tingting Du, Vasily V. Vagin, Ahmet M. Denli, Diana P. Bratu, Carla Klattenhoff, William E. Theurkauf, and Phillip D. Zamore. 2005. “Normal microRNA Maturation and Germ-Line Stem Cell Maintenance Requires Loquacious, a Double-Stranded RNA-Binding Domain Protein.” *PLoS Biology* 3 (7): e236.
- Foulkes, William D., John R. Priest, and Thomas F. Duchaine. 2014. “DICER1: Mutations, microRNAs and Mechanisms.” *Nature Reviews Cancer* 14 (10): 662–72.
- Frank, Filipp, Marc R Fabian, Janusz Stepinski, Jacek Jemielity, Edward Darzynkiewicz,

- Nahum Sonenberg, and Bhushan Nagar. 2011. “Structural Analysis of 5' -mRNA–cap Interactions with the Human AGO2 MID Domain.” *EMBO Reports* 12: 415–20.
- Fujita, Shuji, and Hideo Iba. 2008. “Putative Promoter Regions of miRNA Genes Involved in Evolutionarily Conserved Regulatory Systems among Vertebrates.” *Bioinformatics* 24 (3): 303–8.
- Fukaya, Takashi, and Yukihide Tomari. 2011. “PABP Is Not Essential for microRNA-Mediated Translational Repression and Deadenylation in Vitro.” *The EMBO Journal* 30 (24): 4998–5009.
- Fukuda, Toru, Kaoru Yamagata, Sally Fujiyama, Takahiro Matsumoto, Iori Koshida, Kimihiro Yoshimura, Masatomo Mihara, 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 (5): 604–11.
- Gabel, Harrison W, and Gary Ruvkun. 2008. “The Exonuclease ERI-1 Has a Conserved Dual Role in 5.8S rRNA Processing and RNAi.” *Nat Struct Mol Biol* 15 (5): 531–33.
- Galgano, Alessia, Michael Forrer, Lukasz Jaskiewicz, Alexander Kanitz, Mihaela Zavolan, and André P. Gerber. 2008. “Comparative Analysis of mRNA Targets for Human PUF-Family Proteins Suggests Extensive Interaction with the miRNA Regulatory System.” *PLoS ONE* 3 (9): e3164.
- Gao, Min, Wei Wei, Ming-Ming Li, Yong-Sheng Wu, Zhaoqing Ba, Kang-Xuan Jin, Miao-Miao Li, et al. 2014. “Ago2 Facilitates Rad51 Recruitment and DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination.” *Cell Research* 24: 532–41.
- Gent, Jonathan I., Ayelet T. Lamm, Derek M. Pavelec, Jay M. Maniar, Poornima Parameswaran, Li Tao, Scott Kennedy, and Andrew Z. Fire. 2010. “Distinct Phases of siRNA Synthesis in an Endogenous RNAi Pathway in *C. Elegans* Soma.” *Molecular Cell* 37 (5): 679–89.
- Gibbins, Derrick, Serge Mostowy, Florence Jay, Yannick Schwab, Pascale Cossart, and Olivier Voinnet. 2012. “Selective Autophagy Degrades DICER and AGO2 and Regulates miRNA Activity.” *Nature Cell Biology* 14 (12): 1314–21.
- Gibbins, Derrick, Serge Mostowy, and Olivier Voinnet. 2013. “Autophagy Selectively Regulates miRNA Homeostasis.” *Autophagy* 9 (5): 781–83.
- Gibbins 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: 1143–49.
- Giraldez, A. J. 2006. “Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs.” *Science* 312 (5770): 75–79.
- Girard, Angélique, Ravi Sachidanandam, Gregory J Hannon, and Michelle A Carmell. 2006. “A Germline-Specific Class of Small RNAs Binds Mammalian Piwi Proteins.” *Nature* 442 (7099): 199–202.
- Goh, Wee Siong Sho, Jun Wen Eugene Seah, Emily J. Harrison, Caifu Chen, Christopher

- M. Hammell, and Gregory J. Hannon. 2014. "A Genome-Wide RNAi Screen Identifies Factors Required for Distinct Stages of *C. Elegans* piRNA Biogenesis." *Genes and Development* 28 (7): 797–807.
- Golden, ryan J, Beibei Chen, Tuo Li, Juliane Braun, Hema Manjunath, Xiang Chen, Jiayi Wu, et al. 2017. "An Argonaute Phosphorylation Cycle Promotes microRNA-Mediated Silencing." *Nature* 542 (7640): 197–202.
- Gou, Lan-Tao, Peng Dai, Jian-Hua Yang, Yuanchao Xue, Yun-Ping Hu, Yu Zhou, Jun-Yan Kang, et al. 2014. "Pachytene piRNAs Degrade mRNAs in Elongating Spermatids 680 Pachytene piRNAs Instruct Massive mRNA Elimination during Late Spermiogenesis." *Cell Research* 24 (2410): 680–700.
- Griffiths-Jones, Sam, Harpreet Kaur Saini, Stijn Van Dongen, and Anton J. Enright. 2008. "miRBase: Tools for microRNA Genomics." *Nucleic Acids Research* 36: D154–58.
- Grimson, Andrew, Kyle Kai How Farh, Wendy K. Johnston, Philip Garrett-Engele, Lee P. Lim, and David P. Bartel. 2007. "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing." *Molecular Cell* 27 (1): 91–105.
- Grishok, Alla, Amy E Pasquinelli, Darryl Conte, Na Li, Susan Parrish, Ilho Ha, David L Baillie, Andrew Fire, Gary Ruvkun, and Craig C Mello. 2001. "Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs That Control *C. Elegans* Developmental Timing." *Cell* 106 (1): 23–34.
- Gu, Weifeng, Heng Chi Lee, Daniel Chaves, Elaine M. Youngman, Gregory J. Pazour, Darryl Conte, and Craig C. Mello. 2012. "CapSeq and CIP-TAP Identify Pol II Start Sites and Reveal Capped Small RNAs as *C. Elegans* piRNA Precursors." *Cell* 151 (7): 1488–1500.
- Gu, Weifeng, Masaki Shirayama, Darryl Conte, Jessica Vasale, Pedro J Batista, Julie M Claycomb, James J Moresco, et al. 2009. "Distinct Argonaute-Mediated 22G-RNA Pathways Direct Genome Surveillance in the *C. Elegans* Germline." *Molecular Cell* 36 (2): 231–44.
- Guang, Shouhong, Aaron F Bochner, Derek M Pavelec, Kirk B Burkhart, Sandra Harding, Jennifer Lachowicz, and Scott Kennedy. 2008. "An Argonaute Transports siRNAs from the Cytoplasm to the Nucleus." *Science (New York, N.Y.)* 321 (5888): 537–41.
- Gu W., Claycomb J.M., Batista P.J., Mello C.C., Conte D. 2011. "Cloning Argonaute-Associated Small RNAs from *Caenorhabditis Elegans*." *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* 725: 251–80.
- Guil, Sonia, and Javier F Cáceres. 2007. "The Multifunctional RNA-Binding Protein hnRNP A1 Is Required for Processing of miR-18a." *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (7): 591–96.
- Guo, Huili, Nicholas T. Ingolia, Jonathan S. Weissman, and David P. Bartel. 2010. "Mammalian microRNAs Predominantly Act to Decrease Target mRNA Levels." *Nature* 466: 835–40.
- Ha, Minju, and V Narry Kim. 2014. "Regulation of microRNA Biogenesis." *Nature*

Reviews. Molecular Cell Biology 15: 509–24.

- Haase, Astrid D, Lukasz Jaskiewicz, Haidi Zhang, Sébastien Lainé, Ragna Sack, Anne Gatignol, and Witold Filipowicz. 2005. “TRBP, a Regulator of Cellular PKR and HIV-1 Virus Expression, Interacts with Dicer and Functions in RNA Silencing.” *EMBO Reports* 6 (10): 961–67.
- Hammell, Christopher M, Isabella Lubin, Peter R Boag, T Keith Blackwell, and Victor Ambros. 2009. “Nhl-2 Modulates microRNA Activity in *Caenorhabditis Elegans*.” *Cell* 136 (5): 926–38.
- Han, Jinju, Jakob S. Pedersen, S. Chul Kwon, Cassandra D. Belair, Young Kook Kim, Kyu Hyeon Yeom, Woo Young Yang, David Haussler, Robert Blelloch, and V. Narry Kim. 2009. “Posttranscriptional Crossregulation between Drosha and DGCR8.” *Cell* 136 (1): 75–84.
- Han, Liangfeng, P Dane Witmer Witmer, Emily Casey, David Valle, and Saraswati Sukumar. 2007. “DNA Methylation Regulates microRNA Expression.” *Cancer Biology & Therapy* 6 (8): 1290–94.
- Han, M, R V Aroian, and P W Sternberg. 1990. “The Let-60 Locus Controls the Switch between Vulval and Nonvulval Cell Fates in *Caenorhabditis Elegans*.” *Genetics* 126 (4): 899–913.
- Han, Min, and Paul W Sternberg. 1990. “Let-60, a Gene That Specifies Cell Fates during *C. Elegans* Vulval Induction, Encodes a Ras Protein.” *Cell* 63 (5): 921–31.
- Han, Ting, Arun Prasad Manoharan, Tim T Harkins, Pascal Bouffard, Colin Fitzpatrick, Diana S Chu, Danielle Thierry-Mieg, Jean Thierry-Mieg, and John K Kim. 2009. “26G Endo-siRNAs Regulate Spermatogenic and Zygotic Gene Expression in *Caenorhabditis Elegans*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18674–79.
- Hauptmann, Judith, Anne Dueck, Simone Harlander, Janina Pfaff, Rainer Merkl, and Gunter Meister. 2013. “Turning Catalytically Inactive Human Argonaute Proteins into Active Slicer Enzymes.” *Nature Structural & Molecular Biology* 20: 814–17.
- Hawkins, Peter G, Sharon Santoso, Christopher Adams, Vasiliki Anest, and Kevin V Morris. 2009. “Promoter Targeted Small RNAs Induce Long-Term Transcriptional Gene Silencing in Human Cells.” *Nucleic Acids Research* 37 (9): 2984–95.
- Hayashi, Rippei, Jakob Schnabl, Dominik Handler, Fabio Mohn, Stefan L Ameres, and Julius Brennecke. 2016. “Genetic and Mechanistic Diversity of piRNA 3'-End Formation.” *Nature* 539 (7630): 588–92.
- Heale, Bret S E, Liam P Keegan, Leeanne McGurk, Gracjan Michlewski, James Brindle, Chloe M Stanton, Javier F Caceres, and Mary A O'Connell. 2009. “Editing Independent Effects of ADARs on the miRNA/siRNA Pathways.” *The EMBO Journal* 28 (20): 3145–56.
- Heo, Inha, Chirlmin Joo, Jun Cho, Minju Ha, Jinju Han, and V. Narry Kim. 2008. “Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of Let-7 Precursor MicroRNA.” *Molecular Cell* 32

(2): 276–84.

- Heo, Inha, Chirlmin Joo, Young Kook Kim, Minju Ha, Mi Jeong Yoon, Jun Cho, Kyu Hyeon Yeom, Jinju Han, and V. Narry Kim. 2009. “TUT4 in Concert with Lin28 Suppresses MicroRNA Biogenesis through Pre-MicroRNA Uridylation.” *Cell* 138 (4): 696–708.
- Herbert, Kristina M., Genaro Pimienta, Suzanne J. DeGregorio, Andrei Alexandrov, and Joan A. Steitz. 2013. “Phosphorylation of DGCR8 Increases Its Intracellular Stability and Induces a Progrowth miRNA Profile.” *Cell Reports* 5 (4): 1070–81.
- Holland, Sabrina M, Kaitlin M Collura, Andrea Ketschek, Kentaro Noma, Toby A Ferguson, Yishi Jin, Gianluca Gallo, and Gareth M Thomas. 2016. “Palmitoylation Controls DLK Localization, Interactions and Activity to Ensure Effective Axonal Injury Signaling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (3): 763–68.
- Horman, Shane R., Maja M. Janas, Claudia Litterst, Bingbing Wang, Ian J. MacRae, Mary J. Sever, David V. Morrissey, et al. 2013. “Akt-Mediated Phosphorylation of Argonaute 2 Downregulates Cleavage and Upregulates Translational Repression of MicroRNA Targets.” *Molecular Cell* 50 (3): 356–67.
- Horwich, Michael D., Chengjian Li, Christian Matranga, Vasily Vagin, Gwen Farley, Peng Wang, and Phillip D. Zamore. 2007. “The Drosophila RNA Methyltransferase, DmHen1, Modifies Germline piRNAs and Single-Stranded siRNAs in RISC.” *Current Biology* 17 (14): 1265–72.
- Huang, Kai, Kirby D. Johnson, Andrei G. Petcherski, Thomas Vandergon, Eric A. Mosser, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins, Judith Kimble, and Emery H. Bresnick. 2000. “A HECT Domain Ubiquitin Ligase Closely Related to the Mammalian Protein WWP1 Is Essential for Caenorhabditis Elegans Embryogenesis.” *Gene* 252 (1–2): 137–45.
- Huang Y., Zhang J.L., Yu X.L., Xu T.S., Wang Z.B., Cheng X.C. 2013. “Molecular Functions of Small Regulatory Noncoding RNA.” *Biochemistry (Moscow)* 78: 221–30.
- Huberdeau, Miguel Quévillon, Daniela M Zeitler, Judith Hauptmann, Astrid Bruckmann, Lucile Fressigné, Johannes Danner, Sandra Piquet, et al. 2017. “Phosphorylation of Argonaute Proteins Affects mRNA Binding and Is Essential for microRNA- Guided Gene Silencing in Vivo.” *The EMBO Journal* 36: 2088–2106.
- Huntzinger, Eric, Joerg E Braun, Susanne Heimstädt, Latifa Zekri, and Elisa Izaurralde. 2010. “Two PABPC1-Binding Sites in GW182 Proteins Promote miRNA-Mediated Gene Silencing.” *The EMBO Journal* 29 (24): 4146–60.
- Huntzinger, Eric, and Elisa Izaurralde. 2011. “Gene Silencing by microRNAs: Contributions of Translational Repression and mRNA Decay.” *Nature Reviews Genetics* 12 (2): 99–110.
- Hurley, James H, Sangho Lee, and Gali Prag. 2006. “Ubiquitin-Binding Domains.”

Biochem. J 399: 361–72.

- Hutvagner, Gyorgy, and Martin J. Simard. 2008. “Argonaute Proteins: Key Players in RNA Silencing.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (1): 22–32.
- Hwang, Hun-Way, Erik A Wentzel, and Joshua T Mendell. 2007. “A Hexanucleotide Element Directs MicroRNA Nuclear Import.” *Science* 315 (5808): 97–100.
- Imura, Akira, Fuhito Yamazaki, Toshiyasu Suzuki, Tatsuya Endo, Eisuke Nishida, and Morioh Kusakabe. 2016. “The E3 Ubiquitin Ligase Hace1 Is Required for Early Embryonic Development in *Xenopus Laevis*.” *BMC Developmental Biology* 16 (31): 1–12.
- Ipsaro, Jonathan J, Astrid D Haase, Simon R Knott, Leemor Joshua-Tor, and Gregory J Hannon. 2012. “The Structural Biochemistry of Zucchini Implicates It as a Nuclease in piRNA Biogenesis.” *Nature* 491 (7423): 279–83.
- Iwasaki, Shintaro, Maki Kobayashi, Mayuko Yoda, Yuriko Sakaguchi, Susumu Katsuma, Tsutomu Suzuki, and Yukihide Tomari. 2010. “Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes.” *Molecular Cell* 39 (2): 292–99.
- Iwasaki, Shintaro, Hiroshi M. Sasaki, Yuriko Sakaguchi, Tsutomu Suzuki, Hisashi Tadakuma, and Yukihide Tomari. 2015. “Defining Fundamental Steps in the Assembly of the *Drosophila* RNAi Enzyme Complex.” *Nature* 521: 533–36.
- Izumi, Natsuko, and Yukihide Tomari. 2014. “Diversity of the piRNA Pathway for Nonsel f Silencing: Worm-Specific piRNA Biogenesis Factors.” *Genes & Development* 28 (7): 665–71.
- Jackson, Michael D, Clark C Fjeld, and John M Denu. 2003. “Probing the Function of Conserved Residues in the Serine/Threonine Phosphatase PP2Ca.” *Biochemistry* 42 (28): 8513–21.
- Jannot, Guillaume, Sarah Bajan, Nellie J Giguère, Samir Bouasker, Isabelle H Banville, Sandra Piquet, Gyorgy Hutvagner, and Martin J Simard. 2011. “The Ribosomal Protein RACK1 Is Required for microRNA Function in Both *C. Elegans* and Humans.” *EMBO Reports* 12 (6): 581–86.
- Jannot, Guillaume, Pascale Michaud, Miguel Quévillon Huberdeau, Louis Morel-Berryman, James A. Brackbill, Sandra Piquet, Katherine McJunkin, Kotaro Nakanishi, and Martin J. Simard. 2016. “GW182-Free microRNA Silencing Complex Controls Post-Transcriptional Gene Expression during *Caenorhabditis Elegans* Embryogenesis.” *PLoS Genetics* 12 (12): e1006484.
- Jiao, Xinfu, Jeong Ho Chang, Turgay Kilic, Liang Tong, and Megerditch Kiledjian. 2013. “A Mammalian Pre-mRNA 5’ End Capping Quality Control Mechanism and an Unexpected Link of Capping to Pre-mRNA Processing.” *Molecular Cell* 50 (1): 104–15.
- Jiao, Xinfu, Song Xiang, ChanSeok Oh, Charles E Martin, Liang Tong, and Megerditch Kiledjian. 2010. “Identification of a Quality-Control Mechanism for mRNA 5'-End

- Capping.” *Nature* 467: 608–11.
- Johnson, Steven M, Helge Grosshans, Jaclyn Shingara, Mike Byrom, Rich Jarvis, Angie Cheng, Emmanuel Labourier, Kristy L Reinert, David Brown, and Frank J Slack. 2005. “RAS Is Regulated by the Let-7 MicroRNA Family.” *Cell* 120 (5): 635–47.
- Johnston, Michael, and Gyorgy Hutvagner. 2011. “Posttranslational Modification of Argonautes and Their Role in Small RNA-Mediated Gene Regulation.” *Silence* 2: 2–5.
- Johnston, Robert J Jr, and Oliver Hobert. 2003. “A microRNA Controlling Left / Right Neuronal Asymmetry in *Caenorhabditis Elegans*.” *Nature* 426 (18): 845–49.
- Jurka J., Kapitonov V.V., Pavlicek A., Klonowski P., Kohany O., Walichiewicz J. 2005. “Rebase Update, a Database of Eukaryotic Repetitive Elements.” *Cytogenetic and Genome Research* 110: 462–67.
- Kajiro, Masashi, Mai Tsuchiya, Yoh-ichi Kawabe, Ryohei Furumai, Naoya Iwasaki, Yuki Hayashi, Miyuki Katano, et al. 2011. “The E3 Ubiquitin Ligase Activity of Trip12 Is Essential for Mouse Embryogenesis.” *PLoS ONE* 6 (10): e25871.
- Kawahara, Y., and A. Mieda-Sato. 2012. “TDP-43 Promotes microRNA Biogenesis as a Component of the Drosha and Dicer Complexes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (9): 3347–52.
- Kawahara, Yukio, Boris Zinshteyn, Thimmaiah P Chendrimada, Ramin Shiekhattar, and Kazuko Nishikura. 2007. “RNA Editing of the microRNA-151 Precursor Blocks Cleavage by the Dicer–TRBP Complex.” *EMBO Reports* 8 (8): 763–69.
- Kawai, Shinji, and Atsuo Amano. 2012. “BRCA1 Regulates microRNA Biogenesis via the DROSHA Microprocessor Complex.” *Journal of Cell Biology* 197 (2): 201–8.
- Kawaoka, Shinpei, Kahori Hara, Keisuke Shoji, Maki Kobayashi, Toru Shimada, Sumio Sugano, Yukihide Tomari, Yutaka Suzuki, and Susumu Katsuma. 2013. “The Comprehensive Epigenome Map of piRNA Clusters.” *Nucleic Acids Research* 41 (3): 1581–90.
- Kawaoka, Shinpei, Natsuko Izumi, Susumu Katsuma, and Yukihide Tomari. 2011. “3’ End Formation of PIWI-Interacting RNAs In Vitro.” *Molecular Cell* 43 (6): 1015–22.
- Kennedy, Scott, Duo Wang, and Gary Ruvkun. 2004. “A Conserved siRNA-Degrading RNase Negatively Regulates RNA Interference in *C. Elegans*.” *Nature* 427 (6975): 645–49.
- Ketting, R. F., S. E J Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon, and R. H A Plasterk. 2001. “Dicer Functions in RNA Interference and in Synthesis of Small RNA Involved in Developmental Timing in *C. Elegans*.” *Genes and Development* 15 (20): 2654–59.
- Khvorova, Anastasia, Angela Reynolds, and Sumedha D. Jayasena. 2003. “Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias.” *Cell* 115 (2): 209–16.
- Kim, Daniel H., Louisa M. Villeneuve, Kevin V. Morris, and John J. Rossi. 2006. “Argonaute-1 Directs siRNA-Mediated Transcriptional Gene Silencing in Human Cells.” *Nature Structural and Molecular Biology* 13: 793–97.

- Kim, Minkyu, Nevan J Krogan, Lidia Vasiljeva, Oliver J Rando, Eduard Nedeia, Jack F Greenblatt, and Stephen Buratowski. 2004. "The Yeast Rat1 Exonuclease Promotes Transcription Termination by RNA Polymerase II." *Nature* 432: 517–22.
- Kim, Yoosik, Jinah Yeo, Jung Hyun Lee, Jun Cho, Daekwan Seo, Jong Seo Kim, and V. Narry Kim. 2014. "Deletion of Human tarbp2 Reveals Cellular microRNA Targets and Cell-Cycle Function of TRBP." *Cell Reports* 9 (3): 1061–74.
- Kim, Young-Kook, Boseon Kim, and V Narry Kim. 2016. "Re-Evaluation of the Roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA Biogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (13): E1881–89.
- Kimble, Judith, and David Hirsh. 1979. "The Postembryonic Cell Lineages of the Hermaphrodite and Male Gonads in *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental Biology* 70 (2): 396–417.
- Kirino, Yohei, Namwoo Kim, Mariàngels de Planell-Saguer, Eugene Khandros, Stephanie Chiorean, Peter S Klein, Isidore Rigoutsos, Thomas A Jongens, and Zissimos Mourelatos. 2009. "Arginine Methylation of Piwi Proteins, Catalyzed by dPRMT5, Is Required for Ago3 and Aub Stability." *Nature Cell Biology* 11 (5): 652–58.
- Klattenhoff, Carla, Hualin Xi, Chengjian Li, Soohyun Lee, Jia Xu, Jaspreet S. Khurana, Fan Zhang, et al. 2009. "The *Drosophila* HP1 Homolog Rhino Is Required for Transposon Silencing and piRNA Production by Dual-Strand Clusters." *Cell* 138 (6): 1137–49.
- Klenov, Mikhail S., Sergey A. Lavrov, Anastasia D. Stolyarenko, Sergey S. Ryazansky, Alexei A. Aravin, Thomas Tuschl, and Vladimir A. Gvozdev. 2007. "Repeat-Associated siRNAs Cause Chromatin Silencing of Retrotransposons in the *Drosophila Melanogaster* Germline." *Nucleic Acids Research* 35 (16): 5430–38.
- Kozomara, Ana, and Sam Griffiths-Jones. 2011. "miRBase: Integrating microRNA Annotation and Deep-Sequencing Data." *Nucleic Acids Research* 39: D152–57.
- Krol, Jacek, Volker Busskamp, Ilona Markiewicz, Michael B Stadler, Sebastian Ribi, Jens Richter, Jens Duebel, et al. 2010. "Characterizing Light-Regulated Retinal MicroRNAs Reveals Rapid Turnover as a Common Property of Neuronal MicroRNAs." *Cell* 141 (4): 618–31.
- Kuramochi-Miyagawa, Satomi, Toshiaki Watanabe, Kengo Gotoh, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Masahito Ikawa, Noriko Asada, et al. 2008. "DNA Methylation of Retrotransposon Genes Is Regulated by Piwi Family Members MILI and MIWI2 in Murine Fetal Testes." *Genes and Development* 22 (7): 908–17.
- Kuzuo Glu-Öztürk, Duygu, Dipankar Bhandari, Eric Huntzinger, Maria Fauser, Sigrun Helms, and Elisa Izaurralde. 2016. "miRISC and the CCR4–NOT Complex Silence mRNA Targets Independently of 43S Ribosomal Scanning." *The EMBO Journal* 35: 1186–1203.
- Kuzuoğlu-Öztürk, Duygu, Eric Huntzinger, Steffen Schmidt, and Elisa Izaurralde. 2012. "The *Caenorhabditis Elegans* GW182 Protein AIN-1 Interacts with PAB-1 and

- Subunits of the PAN2-PAN3 and CCR4-NOT Deadenylation Complexes.” *Nucleic Acids Research* 40 (12): 5651–65.
- Kwak, Pieter Bas, and Yukihide Tomari. 2012. “The N Domain of Argonaute Drives Duplex Unwinding during RISC Assembly.” *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (2): 145–51.
- La Mata, Manuel De, Dimos Gaidatzis, Mirela Vitanescu, Michael B Stadler, Corinna Wentzel, Peter Scheiffele, Witold Filipowicz, and Helge Großhans. 2015. “Potent Degradation of Neuronal miRNAs Induced by Highly Complementary Targets.” *EMBO Reports* 16 (4): 500–511.
- Langmead, Ben, Cole Trapnell, Mihai Pop, and Steven L Salzberg. 2009. “Ultrafast and Memory-Efficient Alignment of Short DNA Sequences to the Human Genome.” *Genome Biology* 10 (3): R25.1-10.
- Lee, Do Hee, and Alfred L Goldberg. 1998. “Proteasome Inhibitors: Valuable New Tools for Cell Biologists.” *Trends in Cell Biology* 8 (10): 397–403.
- Lee, Ho Young, Kaihong Zhou, Alison Marie Smith, Cameron L. Noland, and Jennifer A. Doudna. 2013. “Differential Roles of Human Dicer-Binding Proteins TRBP and PACT in Small RNA Processing.” *Nucleic Acids Research* 41 (13): 6568–76.
- Lee, Kiho, Jiwon Shim, Jaebum Bae, Young-Joon Kim, and Junho Lee. 2012. “Stabilization of RNT-1 Protein, Runt-Related Transcription Factor (RUNX) Protein Homolog of *Caenorhabditis Elegans*, by Oxidative Stress through Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (13): 10444–52.
- Lee, Rosalind C, Rhonda L Feinbaum, and Victor Ambros. 1993. “The *C. Elegans* Heterochronic Gene *Lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *Lin-14*.” *Cell* 75 (5): 843–54.
- Lee, Yoontae, Inha Hur, Seong-Yeon Park, Young-Kook Kim, Mi Ra Suh, and V Narry Kim. 2006. “The Role of PACT in the RNA Silencing Pathway.” *The EMBO Journal* 25 (3): 522–32.
- Lee, Yoontae, Minju Kim, Jinju Han, Kyu-Hyun Yeom, Sanghyuk Lee, Sung Hee Baek, and V Narry Kim. 2004. “MicroRNA Genes Are Transcribed by RNA Polymerase II.” *The EMBO Journal* 23 (20): 4051–60.
- Leung, Anthony K L, Sejal Vyas, Jennifer E. Rood, Arjun Bhutkar, Phillip A. Sharp, and Paul Chang. 2011. “Poly(ADP-Ribose) Regulates Stress Responses and MicroRNA Activity in the Cytoplasm.” *Molecular Cell* 42 (4): 489–99.
- Lewis, Benjamin P., Christopher B. Burge, and David P. Bartel. 2005. “Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes Are microRNA Targets.” *Cell* 120 (1): 15–20.
- Lewis, Benjamin P, I-hung Shih, Matthew W Jones-Rhoades, David P Bartel, and Christopher B Burge. 2003. “Prediction of Mammalian MicroRNA Targets.” *Cell* 115 (7): 787–98.

- Li, S., L. Wang, B. Fu, M. A. Berman, A. Diallo, and M. E. Dorf. 2014. “TRIM65 Regulates microRNA Activity by Ubiquitination of TNRC6.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (19): 6970–75.
- Li, Shitao, Lingyan Wang, Michael Berman, Young-Yun Kong, and Martin E Dorf. 2011. “Mapping a Dynamic Innate Immunity Protein Interaction Network Regulating Type I Interferon Production.” *Immunity* 35 (3): 426–40.
- Li, Xiang, Qi Zhou, Manjula Sunkara, Matthew L Kutys, Zhaofei Wu, Piotr Rychahou, Andrew J Morris, Haining Zhu, B Mark Evers, and Cai Huang. 2013. “Ubiquitylation of Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Type I γ by HECTD1 Regulates Focal Adhesion Dynamics and Cell Migration.” *Journal of Cell Science* 126 (Pt 12): 2617–28.
- Li, Zexing, Ge Liu, Liwei Sun, Yan Teng, Xuejiang Guo, Jianhang Jia, Jiahao Sha, Xiao Yang, Dahua Chen, and Qinmiao Sun. 2015. “PPM1A Regulates Antiviral Signaling by Antagonizing TBK1-Mediated STING Phosphorylation and Aggregation.” *PLoS Pathogens* 11 (3): e1004783.
- Li, Zhonghan, and Tariq M. Rana. 2014. “Therapeutic Targeting of microRNAs: Current Status and Future Challenges.” *Nature Reviews Drug Discovery* 13 (8): 622–38.
- Lian, S. L., S. Li, G. X. Abadal, B. A. Pauley, M. J. Fritzler, and E. K.L. Chan. 2009. “The C-Terminal Half of Human Ago2 Binds to Multiple GW-Rich Regions of GW182 and Requires GW182 to Mediate Silencing.” *RNA* 15 (5): 804–13.
- Lim, Robyn S M, and Toshie Kai. 2015. “A Piece of the Pi(e): The Diverse Roles of Animal piRNAs and Their PIWI Partners.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 47–48: 17–31.
- Lingel, Andreas, Bernd Simon, Elisa Izaurralde, and Michael Sattler. 2004. “Nucleic Acid 3'-End Recognition by the Argonaute2 PAZ Domain.” *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (6): 576–77.
- Liu, Jidong, Michelle A Carmell, Fabiola V Rivas, Carolyn G Marsden, J Michael Thomson, Ji-Joon Song, Scott M Hammond, Leemor Joshua-Tor, and Gregory J Hannon. 2004. “Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi.” *Science* 305 (5689): 1437–41.
- Liu, Jidong, Fabiola V. Rivas, James Wohlschlegel, John R. Yates, Roy Parker, and Gregory J. Hannon. 2005. “A Role for the P-Body Component GW182 in microRNA Function.” *Nature Cell Biology* 7 (12): 1261–66.
- Lu, X, H An, R Jin, M Zou, Y Guo, P-F Su, D Liu, Y Shyr, and W G Yarbrough. 2014. “PPM1A Is a RelA Phosphatase with Tumor Suppressor-like Activity.” *Oncogene* 33 (22): 2918–27.
- Luciano, Daniel J, Henry Mirsky, Nicholas J Vendetti, and Stefan Maas. 2004. “RNA Editing of a miRNA Precursor.” *RNA* 10 (8): 1174–77.
- Lund, Elsebet, Stephan Güttinger, Angelo Calado, James E Dahlberg, and Ulrike Kutay. 2004. “Nuclear Export of MicroRNA Precursors.” *Science* 303 (5654): 95–98.

- Ma, Enbo, Ian J. MacRae, Jack F. Kirsch, and Jennifer A. Doudna. 2008. "Autoinhibition of Human Dicer by Its Internal Helicase Domain." *Journal of Molecular Biology* 380 (1): 237–43.
- Ma, Jin-Biao, Keqiong Ye, and Dinshaw J. Patel. 2004. "Structural Basis for Overhang-Specific Small Interfering RNA Recognition by the PAZ Domain." *Nature* 429 (6989): 318–22.
- Marson, Alexander, Stuart S. Levine, Megan F. Cole, Garrett M. Frampton, Tobias Brambrink, Sarah Johnstone, Matthew G. Guenther, et al. 2008. "Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells." *Cell* 134 (3): 521–33.
- Martinez, Natalia J, Hao-Ming Chang, Jacob de Riba Borrajo, and Richard I Gregory. 2013. "The Co-Chaperones Fkbp4/5 Control Argonaute2 Expression and Facilitate RISC Assembly." *RNA* 19 (11): 1583–93.
- Martinez, Natalia J, and Richard I Gregory. 2013. "Argonaute2 Expression Is Post-Transcriptionally Coupled to microRNA Abundance." *RNA* 19 (5): 605–12.
- McKenzie, Andrew J., Daisuke Hoshino, Nan Hyung Hong, Diana J. Cha, Jeffrey L. Franklin, Robert J. Coffey, James G. Patton, and Alissa M. Weaver. 2016. "KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes." *Cell Reports* 15 (5): 978–87.
- Meijer, H. A., Y. W. Kong, W. T. Lu, A. Wilczynska, R. V. Spriggs, S. W. Robinson, J. D. Godfrey, A. E. Willis, and M. Bushell. 2013. "Translational Repression and eIF4A2 Activity Are Critical for MicroRNA-Mediated Gene Regulation." *Science* 340 (6128): 82–85.
- Meister, Gunter. 2013. "Argonaute Proteins: Functional Insights and Emerging Roles." *Nature Reviews Genetics* 14: 447–59.
- Meister, Gunter, Markus Landthaler, Agnieszka Patkaniowska, Yair Dorsett, Grace Teng, and Thomas Tuschl. 2004. "Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs." *Molecular Cell* 15 (2): 185–97.
- Melo, Sonia A., Catia Moutinho, Santiago Ropero, George A. Calin, Simona Rossi, Riccardo Spizzo, Agustin F. Fernandez, et al. 2010. "A Genetic Defect in Exportin-5 Traps Precursor MicroRNAs in the Nucleus of Cancer Cells." *Cancer Cell* 18 (4): 303–15.
- Melo, Sonia A, Santiago Ropero, Catia Moutinho, Lauri A Aaltonen, Hiroyuki Yamamoto, George A Calin, Simona Rossi, et al. 2009. "A TARBP2 Mutation in Human Cancer Impairs microRNA Processing and DICER1 Function." *Nat Genet* 41 (3): 365–70.
- Meziane, Oussama, Gabriel D Bossé, and Martin J Simard. 2013. "The Decapping Scavenger Enzyme DCS-1: A New Modulator of miRNA Turnover." *Cell Cycle* 12 (17): 2715–16.
- Meziane, Oussama, Sandra Piquet, Gabriel D. Bossé, Dominic Gagné, Eric Paquet, Claude Robert, Michael A. Tones, and Martin J. Simard. 2015. "The Human Decapping Scavenger Enzyme DcpS Modulates microRNA Turnover." *Scientific Reports* 5

(16688): 1–8.

- Michalik, Katharina M., Romy Böttcher, and Klaus Förstemann. 2012. “A Small RNA Response at DNA Ends in *Drosophila*.” *Nucleic Acids Research* 40 (19): 9596–9603.
- Michlewski, Gracjan, and Javier F Cáceres. 2010. “Antagonistic Role of hnRNP A1 and KSRP in the Regulation of Let-7a Biogenesis.” *Nature Structural & Molecular Biology* 17: 1011–18.
- Michlewski, Gracjan, Sonia Guil, Colin A. Semple, and Javier F. Cáceres. 2008. “Posttranscriptional Regulation of miRNAs Harboring Conserved Terminal Loops.” *Molecular Cell* 32 (3): 383–93.
- Mirsky, A E, and Hans Ris. 1951. “The Desoxyribonucleic Acid Content of Animal Cells and Its Evolutionary Significance.” *The Journal of General Physiology* 34 (4): 451–62.
- Mishima, Yuichiro, Akira Fukao, Tomoyoshi Kishimoto, Hiroshi Sakamoto, Toshinobu Fujiwara, and Kunio Inoue. 2012. “Translational Inhibition by Deadenylation-Independent Mechanisms Is Central to microRNA-Mediated Silencing in Zebrafish.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (4): 1104–9.
- Mohn, Fabio, Grzegorz Sienski, Dominik Handler, and Julius Brennecke. 2014. “The Rhino-Deadlock-Cutoff Complex Licenses Noncanonical Transcription of Dual-Strand piRNA Clusters in *Drosophila*.” *Cell* 157 (6): 1364–79.
- Montgomery, Taiowa A., Young Soo Rim, Chi Zhang, Robert H. Dowen, Carolyn M. Phillips, Sylvia E J Fischer, and Gary Ruvkun. 2012. “PIWI Associated siRNAs and piRNAs Specifically Require the *Caenorhabditis Elegans* HEN1 Ortholog Henn-1.” *PLoS Genetics* 8 (4): e1002616.
- Morris, Kevin V, Simon W.-L. Chan, Steven E Jacobsen, and David J Looney. 2004. “Small Interfering RNA-Induced Transcriptional Gene Silencing in Human Cells.” *Science* 305 (5688): 1289–92.
- Muerdter, Felix, Paloma M. Guzzardo, Jesse Gillis, Yicheng Luo, Yang Yu, Caifu Chen, Richard Fekete, and Gregory J. Hannon. 2013. “A Genome-Wide RNAi Screen Draws a Genetic Framework for Transposon Control and Primary piRNA Biogenesis in *Drosophila*.” *Molecular Cell* 50 (5): 736–48.
- Muller, Sébastien, Radha Raman Pandey, and Ramesh S. Pillai. 2013. “Les piARN Forgent Un Système Immunitaire Pour Le Génome.” *Medecine/Sciences*.
- Nakanishi, Kotaro, David E. Weinberg, David P. Bartel, and Dinshaw J. Patel. 2012. “Structure of Yeast Argonaute with Guide RNA.” *Nature* 486: 368–74.
- Neumüller, Ralph A., Joerg Betschinger, Anja Fischer, Natascha Bushati, Ingrid Poernbacher, Karl Mechtler, Stephen M. Cohen, and Juergen A. Knoblich. 2008. “Mei-P26 Regulates microRNAs and Cell Growth in the *Drosophila* Ovarian Stem Cell Lineage.” *Nature* 454 (7201): 241–45.
- Nguyen, Tuan Anh, Myung Hyun Jo, Yeon-Gil Choi, Joha Park, S. Chul Kwon, Sungchul

- Hohng, V. Narry Kim, and Jae-Sung Woo. 2015. "Functional Anatomy of the Human Microprocessor." *Cell* 161 (6): 1374–87.
- Nishihara, Tadashi, Latifa Zekri, Joerg E. Braun, and Elisa Izaurralde. 2013. "MiRISC Recruits Decapping Factors to miRNA Targets to Enhance Their Degradation." *Nucleic Acids Research* 41 (18): 8692–8705.
- Nishimasu, Hiroshi, Hirotsugu Ishizu, Kuniaki Saito, Satoshi Fukuhara, Miharu K Kamatani, Luc Bonnefond, Naoki Matsumoto, et al. 2012. "Structure and Function of Zucchini Endoribonuclease in piRNA Biogenesis." *Nature* 491 (7423): 284–87.
- Nottrott, Stephanie, Martin J Simard, and Joel D Richter. 2006. "Human Let-7a miRNA Blocks Protein Production on Actively Translating Polyribosomes." *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (12): 1108–14.
- O'Donnell, Kathryn A, Erik A Wentzel, Karen I Zeller, Chi V Dang, and Joshua T Mendell. 2005. "C-Myc-Regulated microRNAs Modulate E2F1 Expression." *Nature* 435: 839–43.
- Okamura, Katsutomo, Wei-Jen Chung, J Graham Ruby, Huili Guo, David P Bartel, and Eric C Lai. 2008. "The Drosophila Hairpin RNA Pathway Generates Endogenous Short Interfering RNAs." *Nature* 453 (7196): 803–6.
- Olsen, Philip H, and Victor Ambros. 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 (2): 671–80.
- Orban, Tamas I, and Elisa Izaurralde. 2005. "Decay of mRNAs Targeted by RISC Requires XRN1, the Ski Complex, and the Exosome." *RNA* 11 (4): 459–69.
- Ozsolak, Fatih, Laura L. Poling, Zhengxin Wang, Hui Liu, X. Shirley Liu, Robert G. Roeder, Xinmin Zhang, Jun S. Song, and David E. Fisher. 2008. "Chromatin Structure Analyses Identify miRNA Promoters." *Genes and Development* 22: 3172–83.
- Paix, Alexandre, Andrew Folkmann, Dominique Rasoloson, and Geraldine Seydoux. 2015. "High Efficiency, Homology-Directed Genome Editing in *Caenorhabditis Elegans* Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes." *Genetics* 201 (1): 47–54.
- Paix, Alexandre, Yuemeng Wang, Harold E Smith, Chih-Yung S Lee, Deepika Calidas, Tu Lu, Jarrett Smith, Helen Schmidt, Michael W Krause, and Geraldine Seydoux. 2014. "Scalable and Versatile Genome Editing Using Linear DNAs with Microhomology to Cas9 Sites in *Caenorhabditis Elegans*." *Genetics* 198 (4): 1347–56.
- Pal-Bhadra, M., Leibovitch BA., Gandhi SG., Chikka MR., Bhadra U., Birchler JA., Elgin SC. 2004. "Heterochromatic Silencing and HP1 Localization in *Drosophila* Are Dependent on the RNAi Machinery." *Science* 303 (5658): 669–72.
- Palazzo, Alexander F., and Eliza S. Lee. 2015. "Non-Coding RNA: What Is Functional and What Is Junk?" *Frontiers in Genetics* 6 (2): 1–11.
- Pandey, Radha Raman, David Homolka, Kuan-Ming Chen, Ravi Sachidanandam, Marie-Odile Fauvarque, and Ramesh S. Pillai. 2017. "Recruitment of Armitage and Yb to a

- Transcript Triggers Its Phased Processing into Primary piRNAs in *Drosophila* Ovaries.” *PLOS Genetics* 13 (8): e1006956.
- Pane, Attilio, Peng Jiang, Dorothy Yanling Zhao, Mona Singh, and Trudi Schüpbach. 2011. “The Cutoff Protein Regulates piRNA Cluster Expression and piRNA Production in the *Drosophila* Germline.” *The EMBO Journal* 30 (22): 4601–15.
- Park, Mi Seul, Hong-Duc Phan, Florian Busch, Samantha H. Hinckley, James A. Brackbill, Vicki H. Wysocki, and Kotaro Nakanishi. 2017. “Human Argonaute3 Has Slicer Activity.” *Nucleic Acids Research* 45 (20): 11867–77.
- Paroo, Zain, Xuecheng Ye, She Chen, and Qinghua Liu. 2009. “Phosphorylation of the Human MicroRNA-Generating Complex Mediates MAPK/Erk Signaling.” *Cell* 139 (1): 112–22.
- Parry, Devin H, Jinling Xu, and Gary Ruvkun. 2007. “A Whole-Genome RNAi Screen for *C. Elegans* miRNA Pathway Genes.” *Current Biology : CB* 17 (23): 2013–22.
- Perales, Roberto, Dana M. King, Cristina Aguirre-Chen, and Christopher M. Hammell. 2014. “LIN-42, the *Caenorhabditis Elegans* PERIOD Homolog, Negatively Regulates MicroRNA Transcription.” *PLoS Genetics* 10 (7): e1004486.
- Petersen, Christian P., Marie Eve Bordeleau, Jerry Pelletier, and Phillip A. Sharp. 2006. “Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells.” *Molecular Cell* 21 (4): 533–42.
- Piao, X., X. Zhang, L. Wu, and J. G. Belasco. 2010. “CCR4-NOT Deadenylates mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 30 (6): 1486–94.
- Piatek, Monica J, and Andreas Werner. 2014. “Endogenous siRNAs, Regulators of Internal Affairs.” *Biochemical Society Transactions* 42 (4): 1174–79.
- Pillai, Ramesh S, Suwendra N Bhattacharyya, Caroline G Artus, Tabea Zoller, Nicolas Cougot, Eugenia Basyuk, Edouard Bertrand, and Witold Filipowicz. 2005. “Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells.” *Science* 309 (5740): 1573–76.
- Pilotte, Julie, Esther E. Dupont-Versteegden, and Peter W. Vanderklish. 2011. “Widespread Regulation of miRNA Biogenesis at the Dicer Step by the Cold-Inducible RNA-Binding Protein, RBM3.” *PLoS ONE* 6 (12): e28446.
- Piskounova, Elena, Christos Polytaichou, James E. Thornton, Robert J. Lapierre, Charalabos Pothoulakis, John P. Hagan, Dimitrios Iliopoulos, and Richard I. Gregory. 2011. “Lin28A and Lin28B Inhibit Let-7 MicroRNA Biogenesis by Distinct Mechanisms.” *Cell* 147 (5): 1066–79.
- Qi, Hank H, Pat P Ongusaha, Johanna Myllyharju, Dongmei Cheng, Outi Pakkanen, Yujiang Shi, Sam W Lee, Junmin Peng, and Yang Shi. 2008. “Prolyl 4-Hydroxylation Regulates Argonaute 2 Stability.” *Nature* 455 (7211): 421–24.
- Rangan, Prashanth, Colin D. Malone, Caryn Navarro, Sam P. Newbold, Patrick S. Hayes,

- Ravi Sachidanandam, Gregory J. Hannon, and Ruth Lehmann. 2011. "PiRNA Production Requires Heterochromatin Formation in *Drosophila*." *Current Biology* 21 (16): 1373–79.
- Rehwinkel, J A N, Isabelle Behm-ansmant, David Gatfield, and Elisa Izaurralde. 2005. "A Crucial Role for GW182 and the DCP1:DCP2 Decapping Complex in miRNA-Mediated Gene Silencing." *RNA* 11 (11): 1640–47.
- Reinhart, Brenda J, Frank J Slack, Michael Basson, Amy E Pasquinelli, Jill C Bettinger, Ann E Rougvie, H Robert Horvitz, and Gary Ruvkun. 2000. "The 21-Nucleotide Let-7 RNA Regulates Developmental Timing in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature* 403 (6772): 901–6.
- Ren, Zhiji, Isana Veksler-Lublinsky, David Morrissey, and Victor Ambros. 2016. "Staufen Negatively Modulates MicroRNA Activity in *Caenorhabditis Elegans*." *G3: Genes/Genomes/Genetics* 6 (5): 1227–37.
- Resnick, Tamar D, Katherine A McCulloch, and Ann E Rougvie. 2010. "miRNAs Give Worms the Time of Their Lives: Small RNAs and Temporal Control in *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental Dynamics* 239 (5): 1477–89.
- Rhoades, Matthew W., Brenda J. Reinhart, Lee P. Lim, Christopher B. Burge, Bonnie Bartel, and David P. Bartel. 2002. "Prediction of Plant microRNA Targets." *Cell* 110 (4): 513–20.
- Rie, Derek de, Imad Abugessaisa, Tanvir Alam, Erik Arner, Peter Arner, Haitham Ashoor, Gaby Åström, et al. 2017. "An Integrated Expression Atlas of miRNAs and Their Promoters in Human and Mouse." *Nature Biotechnology* 35: 872–78.
- Romero, Yannick, Pierre Calvel, and Serge Nef. 2012. "Petits ARN Non Codants et Spermatogenèse." *Medecine/Sciences* 28 (28): 490–96.
- Rotin, Daniela, and Sharad Kumar. 2009. "Physiological Functions of the HECT Family of Ubiquitin Ligases." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (6): 398–409.
- Rouget, Christel, Catherine Papin, Anthony Boureux, Anne-Cécile Meunier, Bénédicte Franco, Nicolas Robine, Eric C. Lai, Alain Pelisson, and Martine Simonelig. 2010. "Maternal mRNA Deadenylation and Decay by the piRNA Pathway in the Early *Drosophila* Embryo." *Nature* 467 (7319): 1128–32.
- Rougvie, Ann E. 2001. "Control of Developmental Timing in Animals." *Nat Rev Genet* 2 (9): 690–701.
- Ruby, J. Graham, Calvin Jan, Christopher Player, Michael J. Axtell, William Lee, Chad Nusbaum, Hui Ge, and David P. Bartel. 2006. "Large-Scale Sequencing Reveals 21U-RNAs and Additional MicroRNAs and Endogenous siRNAs in *C. Elegans*." *Cell* 127 (6): 1193–1207.
- Rüdel, Sabine, Yanli Wang, René Lenobel, Roman Körner, He Hsuan Hsiao, Henning Urlaub, Dinshaw Patel, and Gunter Meister. 2011. "Phosphorylation of Human Argonaute Proteins Affects Small RNA Binding." *Nucleic Acids Research* 39 (6): 2330–43.

- Rüegger, Stefan, and Helge Großhans. 2012. "MicroRNA Turnover: When, How, and Why." *Trends in Biochemical Sciences* 37 (10): 436–46.
- Rybak, Agnieszka, Heiko Fuchs, Kamyar Hadian, Lena Smirnova, Ellery A Wulczyn, Geert Michel, Robert Nitsch, Daniel Krappmann, and F Gregory Wulczyn. 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: 1411–21.
- Sahin, Umut, Pierre Lapaquette, Alexandra Andrieux, Guilhem Faure, and Anne Dejean. 2014. "Sumoylation of Human Argonaute 2 at Lysine-402 Regulates Its Stability." *PLoS ONE* 9 (7): e102957.
- Saini, Harpreet Kaur, Sam Griffiths-Jones, and Anton James Enright. 2007. "Genomic Analysis of Human microRNA Transcripts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (45): 17719–24.
- Saito, Kuniaki, Akira Ishizuka, Haruhiko Siomi, and Mikiko C. Siomi. 2005. "Processing of Pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious Complex in Drosophila Cells." *PLoS Biology* 3 (7): e235.
- Sanei, Maryam, and Xuemei Chen. 2015. "Mechanisms of microRNA Turnover." *Current Opinion in Plant Biology* 27: 199–206.
- Sarkar, Anjali a, and Irene E Zohn. 2012. "Hectd1 Regulates Intracellular Localization and Secretion of Hsp90 to Control Cellular Behavior of the Cranial Mesenchyme." *The Journal of Cell Biology* 196 (6): 789–800.
- Scheffner, Martin, and Sharad Kumar. 2014. "Mammalian HECT Ubiquitin-Protein Ligases: Biological and Pathophysiological Aspects." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1843 (1): 61–74.
- Schirle, N. T., J. Sheu-Gruttadauria, and I. J. MacRae. 2014. "Structural Basis for microRNA Targeting." *Science* 346 (6209): 608–13.
- Schmidts, Ines, Romy Böttcher, Milijana Mirkovic-Hösle, and Klaus Förstemann. 2016. "Homology Directed Repair Is Unaffected by the Absence of siRNAs in Drosophila Melanogaster." *Nucleic Acids Research* 44 (17): 8261–71.
- Schwamborn, Jens C., Eugene Berezikov, and Juergen A. Knoblich. 2009. "The TRIM-NHL Protein TRIM32 Activates MicroRNAs and Prevents Self-Renewal in Mouse Neural Progenitors." *Cell* 136 (5): 913–25.
- Schwarz, Dianne S., György Hutvágner, Tingting Du, Zuoshang Xu, Neil Aronin, and Phillip D. Zamore. 2003. "Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex." *Cell* 115 (2): 199–208.
- Segref, Alexandra, Éva Kevei, Wojciech Pokrzywa, Kathrin Schmeisser, Johannes Mansfeld, Nurit Livnat-Levanon, Regina Ensenaer, Michael H. Glickman, Michael Ristow, and Thorsten Hoppe. 2014. "Pathogenesis of Human Mitochondrial Diseases Is Modulated by Reduced Activity of the Ubiquitin/proteasome System." *Cell Metabolism* 19 (4): 642–52.

- Shen, Jia, Weiya Xia, Yekaterina B Khotskaya, Longfei Huo, Kotaro Nakanishi, Seung-Oe Lim, Yi Du, et al. 2013. "EGFR Modulates microRNA Maturation in Response to Hypoxia through Phosphorylation of AGO2." *Nature* 497: 383–87.
- Sheu-Gruttadauria, Jessica, and Ian J MacRae. 2017. "Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute." *Journal of Molecular Biology* 429 (17): 2619–39.
- Shirayama, Masaki, Meetu Seth, Heng Chi Lee, Weifeng Gu, Takao Ishidate, Darryl Conte, and Craig C. Mello. 2012. "PiRNAs Initiate an Epigenetic Memory of Nonspecific RNA in the *C. Elegans* Germline." *Cell* 150 (1): 65–77.
- Sienski, Grzegorz, Derya Dönertas, and Julius Brennecke. 2012. "Transcriptional Silencing of Transposons by Piwi and Maelstrom and Its Impact on Chromatin State and Gene Expression." *Cell* 151 (5): 964–80.
- Simon, Bernd, John P. Kirkpatrick, Stephanie Eckhardt, Michael Reuter, Elsa A. Rocha, Miguel A. Andrade-Navarro, Peter Sehr, Ramesh S. Pillai, and Teresa Carlomagno. 2011. "Recognition of 2'-O-Methylated 3'-End of piRNA by the PAZ Domain of a Piwi Protein." *Structure* 19 (2): 172–80.
- Siomi, Mikiko C, Kaoru Sato, Dubravka Pezic, and Alexei A Aravin. 2011. "PIWI-Interacting Small RNAs: The Vanguard of Genome Defence." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (4): 246–58.
- Slack, Frank J, Michael Basson, Zhongchi Liu, Victor Ambros, H. Robert Horvitz, and Gary Ruvkun. 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 Cell* 5 (4): 659–69.
- Smibert, Peter, Jr-Shiuan Yang, Ghows Azzam, Ji-Long Liu, and Eric C Lai. 2013. "Homeostatic Control of Argonaute Stability by microRNA Availability." *Nature Structural and Molecular Biology* 20 (7): 789–97.
- Song, Ji-Joon, Jidong Liu, Niraj H Tolia, Jonathan Schneiderman, Stephanie K Smith, Robert A Martienssen, Gregory J Hannon, and Leemor Joshua-Tor. 2003. "The Crystal Structure of the Argonaute2 PAZ Domain Reveals an RNA Binding Motif in RNAi Effector Complexes." *Nature Structural Biology* 10 (12): 1026–32.
- Song, Ji-Joon, Stephanie K Smith, Gregory J Hannon, and Leemor Joshua-Tor. 2004. "Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity." *Science* 305 (5689): 1434–37.
- Soper, Sarah F C, Godfried W. van der Heijden, Tara C. Hardiman, Mary Goodheart, Sandra L. Martin, Peter de Boer, and Alex Bortvin. 2008. "Mouse Maelstrom, a Component of Nuage, Is Essential for Spermatogenesis and Transposon Repression in Meiosis." *Developmental Cell* 15 (2): 285–97.
- Stein, Lincoln D, Christopher Mungall, ShengQiang Shu, Michael Caudy, Marco Mangone, Allen Day, Elizabeth Nickerson, et al. 2002. "The Generic Genome Browser: A Building Block for a Model Organism System Database." *Genome Research* 12 (10): 1599–1610.

- Sulston, J E, and H R Horvitz. 1977. "Post-Embryonic Cell Lineages of the Nematode, *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental Biology* 56 (1): 110–56.
- Sulston, J E, E Schierenberg, J G White, and J N Thomson. 1983. "The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental Biology* 100 (1): 64–119.
- Suzuki, Hiroshi I., Mayu Arase, Hironori Matsuyama, Young Lim Choi, Toshihide Ueno, Hiroyuki Mano, Koichi Sugimoto, and Kohei Miyazono. 2011. "MCPIP1 Ribonuclease Antagonizes Dicer and Terminates microRNA Biogenesis through Precursor microRNA Degradation." *Molecular Cell* 44 (3): 424–36.
- Suzuki, Hiroshi I., Kaoru Yamagata, Koichi Sugimoto, Takashi Iwamoto, Shigeaki Kato, and Kohei Miyazono. 2009. "Modulation of microRNA Processing by p53." *Nature* 460 (7254): 529–33.
- Tabara, Hiroaki, Madathia Sarkissian, William G Kelly, Jamie Fleenor, Alla Grishok, Lisa Timmons, Andrew Fire, and Craig C Mello. 1999. "The Rde-1 Gene, RNA Interference, and Transposon Silencing in *C. Elegans*." *Cell* 99 (2): 123–32.
- Taft, Ryan J, and John S Mattick. 2003. "Increasing Biological Complexity Is Positively Correlated with the Relative Genome-Wide Expansion of Non-Protein-Coding DNA Sequences." *Genome Biology* 5 (1): 1–24.
- Takimoto, Koji, Motoaki Wakiyama, and Shigeyuki Yokoyama. 2009. "Mammalian GW182 Contains Multiple Argonaute-Binding Sites and Functions in microRNA-Mediated Translational Repression." *RNA* 15 (6): 1078–89.
- Tam, Oliver H, Alexei A Aravin, Paula Stein, Angélique Girard, Elizabeth P Murchison, Sihem Cheloufi, Emily Hodges, et al. 2008. "Pseudogene-Derived Small Interfering RNAs Regulate Gene Expression in Mouse Oocytes." *Nature* 453 (7194): 534–38.
- Tang, Xiaoli, Ming Li, Lynne Tucker, and Bharat Ramratnam. 2011. "Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK3 β) Phosphorylates the RNAase III Enzyme Drosha at S300 and S302." *PLoS ONE* 6 (6): e20391.
- Tang, Xiaoli, Sicheng Wen, Dong Zheng, Lynne Tucker, Lulu Cao, Dennis Pantazatos, Steven F. Moss, and Bharat Ramratnam. 2013. "Acetylation of Drosha on the N-Terminus Inhibits Its Degradation by Ubiquitination." *PLoS ONE* 8 (8): e72503.
- Tang, Xiaoli, Yingjie Zhang, Lynne Tucker, and Bharat Ramratnam. 2010. "Phosphorylation of the RNase III Enzyme Drosha at Serine300 or Serine302 Is Required for Its Nuclear Localization." *Nucleic Acids Research* 38 (19): 6610–19.
- Taylor, David W, Enbo Ma, Hideki Shigematsu, Michael A Cianfrocco, Cameron L Noland, Kuniaki Nagayama, Eva Nogales, Jennifer A Doudna, and Hong-Wei Wang. 2013. "Substrate-Specific Structural Rearrangements of Human Dicer." *Nature Structural & Molecular Biology* 20: 662–70.
- Tedeschi, Andrea, and Frank Bradke. 2013. "The DLK Signalling Pathway—a Double-Edged Sword in Neural Development and Regeneration." *EMBO Reports* 14 (7): 605–14.

- Thomas, Adrien Le, Alicia K. Rogers, Alexandre Webster, Georgi K. Marinov, Susan E. Liao, Edward M. Perkins, Junho K. Hur, Alexei A. Aravin, and Katalin Fejes Tóth. 2013. “Piwi Induces piRNA-Guided Transcriptional Silencing and Establishment of a Repressive Chromatin State.” *Genes and Development* 27 (4): 390–99.
- Thomas, C A. 1971. “The Genetic Organization of Chromosomes.” *Annual Review of Genetics* 5: 237–56.
- Timmons, Lisa, and Andrew Fire. 1998. “Specific Interference by Ingested dsRNA.” *Nature* 395 (6705): 854.
- Tomari Y., Zamore PD. 2005. “Perspective: Machines for RNAi.” *Genes & Development* 19: 517–29.
- Tóth, Katalin Fejes, Dubravka Pezic, Evelyn Stuwe, and Alexandre Webster. 2016. “The piRNA Pathway Guards the Germline Genome Against Transposable Elements.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 886: 51–77.
- Trabucchi, Michele, Paola Briata, MariaFlor Garcia-Mayoral, Astrid D. Haase, Witold Filipowicz, Andres Ramos, Roberto Gherzi, and Michael G. Rosenfeld. 2009. “The RNA-Binding Protein KSRP Promotes the Biogenesis of a Subset of microRNAs.” *Nature* 459 (7249): 1010–14.
- Tran, Hoanh, Daisy Bustos, Ronald Yeh, Bonnee Rubinfeld, Cynthia Lam, Stephanie Shriver, Inna Zilberleyb, et al. 2013. “HectD1 E3 Ligase Modifies Adenomatous Polyposis Coli (APC) with Polyubiquitin to Promote the APC-Axin Interaction.” *The Journal of Biological Chemistry* 288 (6): 3753–67.
- Tulgren, Erik D, Scott T Baker, Laramie Rapp, Allison M Gurney, and Brock Grill. 2011. “PPM-1, a PP2C α/β Phosphatase, Regulates Axon Termination and Synapse Formation in *Caenorhabditis Elegans*.” *Genetics* 189 (4): 1297–1307.
- Vasquez-Rifo, Alejandro, Gabriel D Bossé, Evelyne L Rondeau, Guillaume Jannot, Alexandra Dallaire, and Martin J Simard. 2013. “A New Role for the GARP Complex in MicroRNA-Mediated Gene Regulation.” *PLoS Genetics* 9 (11): e1003961.
- Vasquez-Rifo, Alejandro, Guillaume Jannot, Javier Armisen, Michel Labouesse, Syed Irfan Ahmad Bukhari, Evelyne L. Rondeau, Eric a. Miska, and Martin J. Simard. 2012. “Developmental Characterization of the microRNA-Specific *C. Elegans* Argonautes Alg-1 and Alg-2.” *PLoS ONE* 7 (3): 1–11.
- Verdel, André, Songtao Jia, Scott Gerber, Tomoyasu Sugiyama, Steven Gygi, Shiv I S Grewal, and Danesh Moazed. 2004. “RNAi-Mediated Targeting of Heterochromatin by the RITS Complex.” *Science* 303 (5658): 672–76.
- Volpe, Thomas A, Catherine Kidner, Ira M Hall, Grace Teng, Shiv I S Grewal, and Robert A Martienssen. 2002. “Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi.” *Science* 297 (5588): 1833–37.
- Wada, Taeko, Jiro Kikuchi, and Yusuke Furukawa. 2012. “Histone Deacetylase 1 Enhances microRNA Processing via Deacetylation of DGCR8.” *EMBO Reports* 13 (2): 142–49.

- Wan, Guohui, Xinna Zhang, Robert R. Langley, Yunhua Liu, Xiaoxiao Hu, Cecil Han, Guang Peng, Lee M. Ellis, Stephen N. Jones, and Xiongbin Lu. 2013. “DNA-Damage-Induced Nuclear Export of Precursor MicroRNAs Is Regulated by the ATM-AKT Pathway.” *Cell Reports* 3 (6): 2100–2112.
- Wang, Chris, Pratyush Gupta, Lucile Fressigne, Gabriel D. Bossé, Xin Wang, Martin J. Simard, and Dave Hansen. 2016. “TEG-1 CD2BP2 Controls miRNA Levels by Regulating miRISC Stability in *C. Elegans* and Human Cells.” *Nucleic Acids Research* 45 (3): 1488–1500.
- Wang, Guilin, and Valerie Reinke. 2008. “A *C. Elegans* Piwi, PRG-1, Regulates 21U-RNAs during Spermatogenesis.” *Current Biology : CB* 18 (12): 861–67.
- Wang, Jia-Jia, Dong-Ya Cui, Tengfei Xiao, Xubin Sun, Peng Zhang, Runsheng Chen, Shunmin He, and Da-Wei Huang. 2014. “The Influences of PRG-1 on the Expression of Small RNAs and mRNAs.” *BMC Genomics* 15 (321): 1–11.
- Watanabe, Toshiaki, Atsushi Takeda, Tomoyuki Tsukiyama, Kazuyuki Mise, Tetsuro Okuno, Hiroyuki Sasaki, Naojiro Minami, and Hiroshi Imai. 2006. “Identification and Characterization of Two Novel Classes of Small RNAs in the Mouse Germline: Retrotransposon-Derived siRNAs in Oocytes and Germline Small RNAs in Testes.” *Genes and Development* 20 (13): 1732–43.
- Watanabe, Toshiaki, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Masahiro Kaneda, Satomi Kuramochi-Miyagawa, Yayoi Obata, Hatsune Chiba, et al. 2008. “Endogenous siRNAs from Naturally Formed dsRNAs Regulate Transcripts in Mouse Oocytes.” *Nature* 453: 539–43.
- Wedeles, Christopher J, Monica Z Wu, and Julie M Claycomb. 2013. “Protection of Germline Gene Expression by the *C. Elegans* Argonaute CSR-1.” *Developmental Cell* 27 (6): 664–71.
- Wei, Wei, Zhaoqing Ba, Min Gao, Yang Wu, Yanting Ma, Simon Amiard, Charles I. White, Jannie Michaela Rendtlew Danielsen, Yun Gui Yang, and Yijun Qi. 2012. “A Role for Small RNAs in DNA Double-Strand Break Repair.” *Cell* 149 (1): 101–12.
- Weick, E.-M., and E. A. Miska. 2014. “piRNAs: From Biogenesis to Function.” *Development* 141: 3458–71.
- Weick, Eva Maria, Peter Sarkies, Nicola Silva, Ron A. Chen, Sylviane M M Moss, Amy C. Cording, Julie Ahringer, Enrique Martinez-Perez, and Eric A. Miska. 2014. “PRDE-1 Is a Nuclear Factor Essential for the Biogenesis of Ruby Motif-Dependent piRNAs in *C. Elegans*.” *Genes and Development* 28 (7): 783–96.
- Weinberg, Marc S, Louisa M Villeneuve, A L I Ehsani, Mohammed Amarzguioui, Lars Aagaard, Zhao-Xia Chen, Arthur D Riggs, John J Rossi, and Kevin V Morris. 2006. “The Antisense Strand of Small Interfering RNAs Directs Histone Methylation and Transcriptional Gene Silencing in Human Cells.” *RNA* 12 (2): 256–62.
- Wightman, Bruce, Ilho Ha, and Gary Ruvkun. 1993. “Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *Lin-14* by *Lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C.*

- Elegans.” *Cell* 75 (5): 855–62.
- Witte, Kristen, Amber L Schuh, Jan Hegermann, Ali Sarkeshik, Jonathan R Mayers, Katrin Schwarze, John R Yates Iii, Stefan Eimer, and Anjon Audhya. 2011. “TFG-1 Function in Protein Secretion and Oncogenesis.” *Nature Cell Biology* 13 (5): 550–58.
- Wu, C., J. So, B. N. Davis-Dusenbery, H. H. Qi, D. B. Bloch, Y. Shi, G. Lagna, and A. Hata. 2011. “Hypoxia Potentiates MicroRNA-Mediated Gene Silencing through Posttranslational Modification of Argonaute2.” *Molecular and Cellular Biology* 31 (23): 4760–74.
- Wu, Edlyn, Caroline Thivierge, Mathieu Flamand, Geraldine Mathonnet, Ajay A. Vashisht, James Wohlschlegel, Marc R. Fabian, Nahum Sonenberg, and Thomas F. Duchaine. 2010. “Pervasive and Cooperative Deadenylation of 3’utrs by Embryonic microRNA Families.” *Molecular Cell* 40 (4): 558–70.
- Wu, Ligang, Jihua Fan, and Joel G Belasco. 2006. “MicroRNAs Direct Rapid Deadenylation of mRNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (11): 4034–39.
- Wu, Pei Hsuan, Mamiko Isaji, and Richard W. Carthew. 2013. “Functionally Diverse MicroRNA Effector Complexes Are Regulated by Extracellular Signaling.” *Molecular Cell* 52 (1): 113–23.
- Wynsberghe, Priscilla M Van, Zoya S Kai, Katlin B Massirer, Victoria H Burton, Gene W Yeo, and Amy E Pasquinelli. 2011. “LIN-28 Co-Transcriptionally Binds Primary Let-7 to Regulate miRNA Maturation in *Caenorhabditis Elegans*.” *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (3): 302–8.
- Xiang, Weiwen, Qian Zhang, Xia Lin, Shiyong Wu, Yao Zhou, Fansen Meng, Yunyun Fan, et al. 2016. “PPM1A Silences Cytosolic RNA Sensing and Antiviral Defense through Direct Dephosphorylation of MAVS and TBK1.” *Science Advances* 2 (7): e1501889.
- Yagi, Takuya, Daisuke Ito, and Norihiro Suzuki. 2014. “Evidence of TRK-Fused Gene (TFG1) Function in the Ubiquitin-Proteasome System.” *Neurobiology of Disease* 66: 83–91.
- Yang, Ming, Astrid D. Haase, Fang-Ke Huang, Gérald Coulis, Keith D. Rivera, Bryan C. Dickinson, Christopher J. Chang, 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 (5): 782–90.
- Yang, Weidong, Thimmaiah P Chendrimada, Qingde Wang, Miyoko Higuchi, Peter H Seeburg, Ramin Shiekhattar, and Kazuko Nishikura. 2006. “Modulation of microRNA Processing and Expression through RNA Editing by ADAR Deaminases.” *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (1): 13–21.
- Yi, Rui, Yi Qin, Ian G. Macara, and Bryan R. Cullen. 2003. “Exportin-5 Mediates the Nuclear Export of Pre-microRNAs and Short Hairpin RNAs.” *Genes and Development* 17: 3011–16.
- Yigit, Erbay, Pedro J Batista, Yanxia Bei, Ka Ming Pang, Chun-Chieh G Chen, Niraj H

- Tolia, Leemor Joshua-Tor, Shohei Mitani, Martin J Simard, and Craig C Mello. 2006. "Analysis of the *C. Elegans* Argonaute Family Reveals That Distinct Argonautes Act Sequentially during RNAi." *Cell* 127 (4): 747–57.
- Yin, Hang, and Haifan Lin. 2007. "An Epigenetic Activation Role of Piwi and a Piwi-Associated piRNA in *Drosophila Melanogaster*." *Nature* 450 (7167): 304–8.
- Youngman, Elaine M, and Julie M Claycomb. 2014. "From Early Lessons to New Frontiers: The Worm as a Treasure Trove of Small RNA Biology." *Frontiers in Genetics* 5 (416): 1–13.
- Zahreddine, Hala, Huimin Zhang, Marie Diogon, Yasuko Nagamatsu, and Michel Labouesse. 2010. "CRT-1/Calreticulin and the E3 Ligase EEL-1/HUWE1 Control Hemidesmosome Maturation in *C. Elegans* Development." *Current Biology* 20 (4): 322–27.
- Zekri, L., E. Huntzinger, S. Heimstadt, and E. Izaurralde. 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 (23): 6220–31.
- Zeng, Yan, Heidi Sankala, Xiaoxiao Zhang, and Paul R Graves. 2008. "Phosphorylation of Argonaute 2 at Serine-387 Facilitates Its Localization to Processing Bodies." *Biochem. J* 413 (3): 429–36.
- Zhang, Liang, Lei Ding, Tom H Cheung, Meng-Qiu Dong, Jun Chen, Aileen K Sewell, Xuedong Liu, John R Yates, and Min Han. 2007. "Systematic Identification of miRISC Proteins, miRNAs, and Their mRNA Targets in *C. Elegans* by Their Interactions with GW182 Family Proteins AIN-1 and AIN-2." *Molecular Cell* 28 (4): 598–613.
- Zhang, Peng, Jun-Yan Kang, Lan-Tao Gou, Jiajia Wang, Yuanchao Xue, Geir Skogerboe, Peng Dai, et al. 2015. "MIWI and piRNA-Mediated Cleavage of Messenger RNAs in Mouse Testes." *Cell Research* 25 (2): 193–207.
- Zhao, Shuang, Lan Tao Gou, Man Zhang, Li Dong Zu, Min Min Hua, Ye Hua, Hui Juan Shi, et al. 2013. "PiRNA-Triggered MIWI Ubiquitination and Removal by APC/C in Late Spermatogenesis." *Developmental Cell* 24 (1): 13–25.
- Zhou, Xuefeng, Jianhua Ruan, Guandong Wang, and Weixiong Zhang. 2007. "Characterization and Identification of microRNA Core Promoters in Four Model Species." *PLoS Computational Biology* 3 (3): e37.
- Zhu, Haitao, Peter Kavsak, Shirin Abdollah, Jeffrey L Wrana, and Gerald H Thomsen. 1999. "A SMAD Ubiquitin Ligase Targets the BMP Pathway and Affects Embryonic Pattern Formation." *Nature* 400 (6745): 687–93.
- Zohn, Irene E, Kathryn V Anderson, and Lee Niswander. 2007. "The Hectd1 Ubiquitin Ligase Is Required for Development of the Head Mesenchyme and Neural Tube Closure." *Developmental Biology* 306 (1): 208–21.

Annexes

Annexe 1:

TEG-1 CD2BP2 controls miRNA levels by regulating miRISC stability in *C. elegans* and human cells, Chris Wang, Pratyush Gupta, Lucile Fressigné, Gabriel D. Bossé, Xin Wang, Martin J. Simard and Dave Hansen (2016). *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/gkw836.

Contribution

Cet article a montré que TEG-1 régule la stabilisation de deux composants du miRISC, VIG-1 et ALG-1 ce qui permet de maintenir un bon niveau d'expression des miARN matures. Dans cet article, j'ai effectué l'expérience de Northern Blot, du processus de révision, pour révéler le niveau d'expression des miARNs lin-4 et miR-62 (Figure S2B). Ainsi j'évalue ma contribution à 5%.

Lien: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388422/>

Annexe 2:

Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for microRNA-guided gene silencing *in vivo*, Miguel Quévillon Huberdeau, Daniela M. Zeitler, Judith Hauptmann, Astrid Bruckmann, Lucile Fressigné, Johannes Danner, Sandra Piquet, Nicholas Strieder, Julia C. Engelmann, Guillaume Jannot, Rainer Deutzmann, Martin J. Simard and Gunter Meister (2017). *The EMBO Journal*, 36: 2088–2106. doi:10.15252/embj.

Contribution

Cette étude, réalisée par mon collègue Miguel Quévillon Huberdeau en collaboration avec Daniela M. Zeitler, a démontré que l'état de phosphorylation du cluster sérine/thréonine de la protéine Argonaute est important pour son interaction avec les ARNm cibles. Dans cet article, j'ai contribué à la figure 5 en créant quatre souches double mutantes et en analysant les phénotypes obtenus (Figure 5C et 5D). J'évalue ma contribution de cet article à 15%.

Lien : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28645918>