

EVELYNE RONDEAU

**IDENTIFICATION D'INTERACTEURS
MOLÉCULAIRES ET GÉNÉTIQUES DES
ARGONAUTES IMPLIQUÉS DANS LA VOIE DES
MICROARN CHEZ *C. ELEGANS***

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

Résumé

Chez les eucaryotes, les microARN sont de courts ARN non codants régulant les gènes essentiels pour le développement et la différenciation cellulaire. Parmi les facteurs cellulaires clés de cette voie métabolique, on retrouve les RNAses de type III Drosha et Dicer, ainsi que les protéines Argonautes ALG-1 et ALG-2 chez *C. elegans*. Dans le but de mieux caractériser l'implication des protéines Argonautes dans la voie des microARN, nous avons utilisé deux approches différentes. Premièrement, nous avons étudié la liaison de la protéine Argonaute ALG-1 aux microARN chez *C. elegans* en fonction du stade développemental, et ce par analyse par micropuce des microARN associés avec ALG-1. Cette étude nous a permis de remarquer que ALG-1 lie la majorité des microARN, mais non la totalité, et ce, de façon très importante aux stades développementaux tardifs. Deuxièmement, nous nous sommes intéressés à l'identification d'interacteurs génétiques d'*alg-2*. Nous avons donc réalisé un criblage génétique basé sur la létalité synthétique avec le gène *alg-2*. Ainsi, lorsque le gène synthétique létal est muté simultanément avec *alg-2*, tel qu'observé avec *alg-1*, la double lésion induit la mort de l'animal. De ce criblage, nous avons isolé 11 mutants, classés en 5 groupes de complémentation. Par l'utilisation de techniques de cartographie génétique, nous avons localisé la mutation chez le candidat *sla-1* sur le chromosome V, entre les positions génétiques de -12.7 et -3.65.

Abstract

In eukaryotes, microRNAs are small non-coding RNAs which have the role of regulating genes essential for development and cellular differentiation. Beside the RNase III family members (Drosha and Dicer) and the Argonaute proteins ALG-1 and ALG-2 in *C. elegans*, essential components of this gene regulation pathway are still not uncovered. In order to characterize the implication of Argonaute proteins ALG-1 and ALG-2 in microRNA pathway, we used two approaches. First, we studied the interaction between microRNA and ALG-1 during worm development by microarray analysis of microRNA associated to ALG-1. From this analysis, we observed that the majority, but not the totality, of microRNA are associated to ALG-1, mostly at early developmental stages. Secondly, to identify new components of microRNA pathway, we conducted a genetic screen to identify new interactors of *alg-2*. Our screen is based on the synthetic lethality feature of *alg-2* and *alg-1* genes. In absence of both genes, the animal can not survive. With this synthetic lethal screen, we want to identify new genes that work in synergy with *alg-2*, like *alg-1*, interacting in the same genetic pathway. The worms have been mutagenized and 11 mutants, classified in 5 complementation groups, have been collected. By using various mapping techniques, we localized the mutation on mutant *sla-1(qbc1)* on chromosome V, between the genetic positions of -12.7 and -3.65.

Avant-Propos

Je tiens à remercier le Dr Martin Simard pour m'avoir donné la chance de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire, ainsi que pour sa grande disponibilité, sa supervision constante et son dynamisme. Merci à Gabriel Bossé pour avoir été non seulement un stagiaire d'été talentueux, mais aussi pour avoir partagé mes hauts et mes bas. Merci à Isabelle Banville pour l'information collosale et les nombreuses discussions. Merci à tous, Martin, Gabriel, Isabelle, Samir, Guillaume, Marie-Eve, Alejandro, Sandra, Nellie, Berthier, pour les discussions et moments de folie qui me donneront assurément des moments de nostalgie de ce labo...

Merci à toi, Charlot, pour ton soutien, ta compréhension. Merci de supporter mes projets et mon quotidien.

Merci à ma famille pour les encouragements.

Et pour toutes les souches de vers que j'ai piquées, croisées, nourries, « bleachées », décontaminées, « chunkées », comptées, mutagénisées, observées et injectées durant deux ans, je vous souhaite longue vie et un avenir prometteur!

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Avant-Propos.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
1 Introduction aux microARN.....	1
1.1 Historique.....	1
1.1.1 Le gène <i>lin-4</i>	1
1.1.2 Le gène <i>let-7</i>	3
1.2 Fonctions des microARN.....	4
1.2.1 Développement.....	4
1.2.2 Cancer.....	8
1.3 La voie métabolique.....	12
1.3.1 La biogénèse.....	12
1.3.2 Les protéines Argonautes.....	19
1.3.3 Reconnaissance de la cible.....	22
1.3.4 Modes d'action d'inhibition de la synthèse protéique.....	23
2 Problématique et objectifs.....	30
3 Étude de l'association des microARN avec la protéine Argonaute ALG-1 au cours du développement chez <i>C. elegans</i>	31
3.1 Détermination de la quantité de protéines nécessaire pour l'expérience.....	33
3.2 Analyse des microARN associés à la protéine GFP::ALG-1 selon les stades développementaux.....	36
3.3 Matériels et méthodes.....	40
3.3.1 Souches de <i>C. elegans</i>	40
3.3.2 Synchronisation des animaux.....	40
3.3.3 Extraction protéique.....	41
3.3.4 Immunoprécipitation.....	41
3.3.5 Extraction de l'ARN.....	42
3.3.6 Analyse par micropuce.....	42
4 Criblage génétique pour l'identification de nouvelles composantes de la voie des microARN.....	43
4.1 La stratégie de criblage.....	43
4.2 Caractérisation des mutants.....	46
4.3 Test de complémentation.....	47
4.4 Étude du candidat 189-A.....	51
4.4.1 Caractérisation du candidat 189-A.....	51
4.4.2 Cartographie génétique de la mutation.....	53
4.5 Matériels et méthodes.....	62
4.5.1 Souches de <i>C. elegans</i>	62
4.5.2 Génération de mâles.....	63
4.5.3 Croisements.....	64

4.5.4	Mutagenèse et criblage	64
4.5.5	Analyse des polymorphismes (SNP)	64
4.5.6	Extraits d'ADN génomique	65
4.5.7	PCR.....	65
4.5.8	Digestion et dépôt sur gel	66
4.5.9	RNAi.....	66
4.5.10	Analyse en 3 points.....	67
4.5.11	Injection de cosmides.....	67
5	Discussion.....	68
5.1	Étude de l'association des microARN avec la protéine Argonaute ALG-1 au cours du développement	68
5.2	Criblage génétique pour l'identification de nouvelles composantes de la voie des microARN.....	73
6	Conclusion.....	78
	Bibliographie	80
	Annexe 1: microARN détectés comme associés à ALG-1 selon l'utilisation de 1, 2 ou 4mg de protéines.....	91
	Annexe 2: Étude des microARN associés à ALG-1 au cours des stades développementaux	93

Liste des tableaux

Tableau 3-I: Temps de croissance à 25°C chez <i>C. elegans</i> et quantité de vers nécessaire pour la récolte de populations synchronisées à des stades précis du développement...	33
Tableau 3-II: MicroARN dont l'expression est spécifique à certains stades du développement.	40
Tableau 4-I: Phénotypes observés chez les 11 candidats obtenus du criblage génétique synthétique létal.	47
Tableau 4-II: Tests de complémentation entre les 11 candidats.	49
Tableau 4-III: Groupes de complémentation.	50
Tableau 4-IV: Résultats du croisement déterminant si la mutation est située sur le chromosome X.	51
Tableau 4-V: Recombinants obtenus de l'analyse des polymorphismes (SNP).	56
Tableau 4-VI: Résultats de l'analyse en 3 points.	59
Tableau 4-VII: Cosmides injectés chez le candidat mutant.	61

Liste des figures

Figure 1-1 : Le cycle de vie de <i>C. elegans</i>	2
Figure 1-2 : Structures en tige-boucle du transcrit primaire de <i>let-7</i> chez <i>C. elegans</i> , <i>D. melanogaster</i> et <i>Homo sapiens</i>	4
Figure 1-3 : Structure du pri-microARN.	13
Figure 1-4 : Maturation du pri-microARN en pré-microARN par le complexe Drosha-DGCR8.	14
Figure 1-5 : Formation du pré-microARN selon la voie des mirtrons.....	16
Figure 1-6 : Voie des microARN et des mirtrons.....	18
Figure 1-7 : Arbre des Argonautes.	19
Figure 1-8 : Structure d'une protéine Argonaute.....	20
Figure 1-9 : Modes d'action d'inhibition de la synthèse protéique.	24
Figure 1-10 : Protection de la liaison du microARN par Dnd1.	28
Figure 3-1 : Schéma de l'expérience d'immunoprécipitation pour l'isolation des microARN associés à ALG-1.	32
Figure 3-2 : Apparence et taille des vers selon le stade du développement.	33
Figure 3-3 : Immunobuvardage de type <i>Western</i> de la protéine GFP::ALG-1 après son immunoprécipitation chez les extraits de jeunes adultes.	34
Figure 3-4 : microARN détectés chez les jeunes adultes par l'analyse sur micropuce comportant 116 microARN de <i>C. elegans</i>	35
Figure 3-5 : Immunobuvardage de type <i>Western</i> de la protéine GFP::ALG-1 immunoprécipitée chez les divers stades développementaux de <i>C. elegans</i>	36
Figure 3-6 : Pourcentage des microARN de la micropuce associés à ALG-1 ou présents dans l'extrait total à chaque stade du développement.....	37
Figure 3-7: MicroARN associés à ALG-1 par rapport aux microARN détectés dans l'extrait total pour chacun des stades.....	38
Figure 3-8: Fraction des microARN totaux détectés dans l'immunoprécipitation et dans l'extrait total (sans immunoprécipitation).....	39
Figure 3-9: Répartition des microARN totaux selon leur profil d'expression au cours des stades développementaux.	39
Figure 4-1: <i>C. elegans</i> exprimant <i>sur-5::gfp</i>	44
Figure 4-2: Schéma de la stratégie du criblage génétique synthétique létal avec <i>alg-2</i>	45
Figure 4-3: Détails de la réalisation du criblage génétique.	46
Figure 4-4: Schéma du croisement pour les tests de complémentation.....	48
Figure 4-5: Schéma du croisement visant à déterminer si la mutation se situe sur le chromosome X.....	50
Figure 4-6: Caractérisation de la résistance au RNAi chez le candidat 189-A, et chez <i>sla-1</i> (<i>qbc1</i>).....	52
Figure 4-7: Exemple d'analyse SNP à la position 1.2 sur le chromosome V(F20D6).....	54
Figure 4-8: Schéma du croisement pour l'analyse SNP de 189-A.	55
Figure 4-9: Schéma du chromosome V et de l'analyse SNP.....	57
Figure 4-10: Schéma du croisement pour l'analyse en 3 points.....	58
Figure 4-11: Exemple de calcul de distance de la mutation selon le nombre de recombinants obtenus.....	59
Figure 4-12 : Schéma du chromosome V et de l'analyse en 3 points.....	60

Figure 4-13 : Génération de la souche *dpy-11(e224) unc-34(e566)V; alg-2(ok304)II*.....63

Liste des abréviations

ALG : *Argonaute like gene*
 ADN : acide désoxyribonucléique
 ADNc : ADN complémentaire
 AGO : *Argonaute*
 ARN : acide ribonucléique
 ARNm : ARN messenger
C. elegans : *Caenorhabditis elegans*
 DCR : *Dicer related*
 Dpy : *Dumpy*
 Egl : *egg laying defect*
 EMS : éthylméthanesulfonate
 Exp5 : Exportin-5
 GFP : *green fluorescent protein*
 h : heure
 Him : haute incidence de mâles
 IP : immunoprécipitation
 let : letal
 lin : *abnormal cell lineage*
 Loqs : Loquacious
 pb : paires de bases
 Kb : kilobase
 Mb : mégabase
 min : minutes
 polIII : ARN polymérase de type II
 pré-microARN : précurseur du microARN
 pri-microARN : *primary microARN*
 RISC : *RNA induced silencing complex*
 RNAi : *RNA interference*
 Rol : *roller*
 rpm : révolution par minute
 µg : microgramme
 µl : microlitre
 Unc : *uncoordinated*
 UTR : *untranslated region*
 YAC : *yeast artificial chromosome*

1 Introduction aux microARN

Les microARN sont de courts ARN non codants d'environ 22 nucléotides qui ont pour rôle de réguler l'expression des gènes par leur hybridation séquence-spécifique à un ARN messager (ARNm) cible. Chez les animaux, cette hybridation a lieu à la région 3' non-codante (3'UTR) de l'ARNm. Les microARN régulent divers processus biologiques, tels que la différenciation cellulaire, l'apoptose et le développement. Il est estimé qu'environ 3% des gènes humains encodent des microARN, et que 30% des gènes seraient eux-mêmes régulés par un ou plusieurs microARN (Rajewsky, 2006).

1.1 Historique

Longtemps demeurés dans l'ombre, les microARN ont été découverts chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Ce ver rond d'un millimètre de long à l'âge adulte, se nourrissant de bactéries dans le sol, a été sélectionné par Sydney Brenner en 1965 pour ses études sur le développement et le système nerveux. De par son anatomie simple et sa facilité de manipulation génétique, cet animal s'est effectivement avéré un puissant modèle génétique et un formidable outil de recherche. Son génome a été entièrement séquencé en 1998, et la destinée de chacune de ses 959 cellules somatiques est déterminée, ce qui en fait un animal bien caractérisé.

1.1.1 Le gène *lin-4*

Au cours de son développement, *C. elegans* passe par quatre stades larvaires bien précis avant d'atteindre l'âge adulte. À la température de 25°C, le ver quitte l'œuf environ 14 heures après le début de l'embryogénèse, et traverse les quatre stades larvaires (L1, L2, L3, L4) avant de passer au stade adulte en 36 heures et de pouvoir se reproduire par auto-fécondation (Figure 1-1). L'équipe du Dr Victor Ambros s'intéresse aux gènes hétérochroniques chez *C. elegans*, gènes responsables de réguler le destin des cellules durant le développement larvaire en contrôlant la synchronisation et la séquence des événements dans diverses lignées cellulaires. Au début des années 1990, l'équipe du Dr Ambros a étudié le gène hétérochronique *lin-4*, affectant la synchronisation des événements développementaux au cours des stades larvaires dans divers types cellulaires (Lee et al., 1993). Le gène *lin-4*, impliqué dans le développement par la régulation négative du gène

lin-14, est essentiel pour permettre le passage du stade larvaire L1 au stade L2. Afin de déterminer le mécanisme par lequel le gène *lin-4* régule les niveaux du facteur de transcription LIN-14, le groupe du Dr Ambros a cloné le locus *lin-4*. De façon surprenante, leur analyse de la séquence génomique du gène a indiqué que *lin-4* n'encodait pas de protéine. Ils ont identifié deux courts transcrits de 22 et 61 nucléotides, respectivement un *lin-4* mature et une forme précurseur, la forme mature étant partiellement complémentaire à une séquence répétée de la région 3'UTR de *lin-14* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). En 1993, ce fut donc la caractérisation du premier microARN. Au cours d'études subséquentes, il a été démontré que *lin-4* régulait aussi négativement *lin-28*, un autre gène impliqué au passage du stade L1 au stade L2 au cours du développement (Moss et al., 1997). Peu d'intérêt a été accordé à l'époque au microARN *lin-4*, puisqu'il était perçu comme phénomène isolé et spécifique au nématode. L'Histoire a cependant montré qu'il s'agissait d'une découverte majeure.

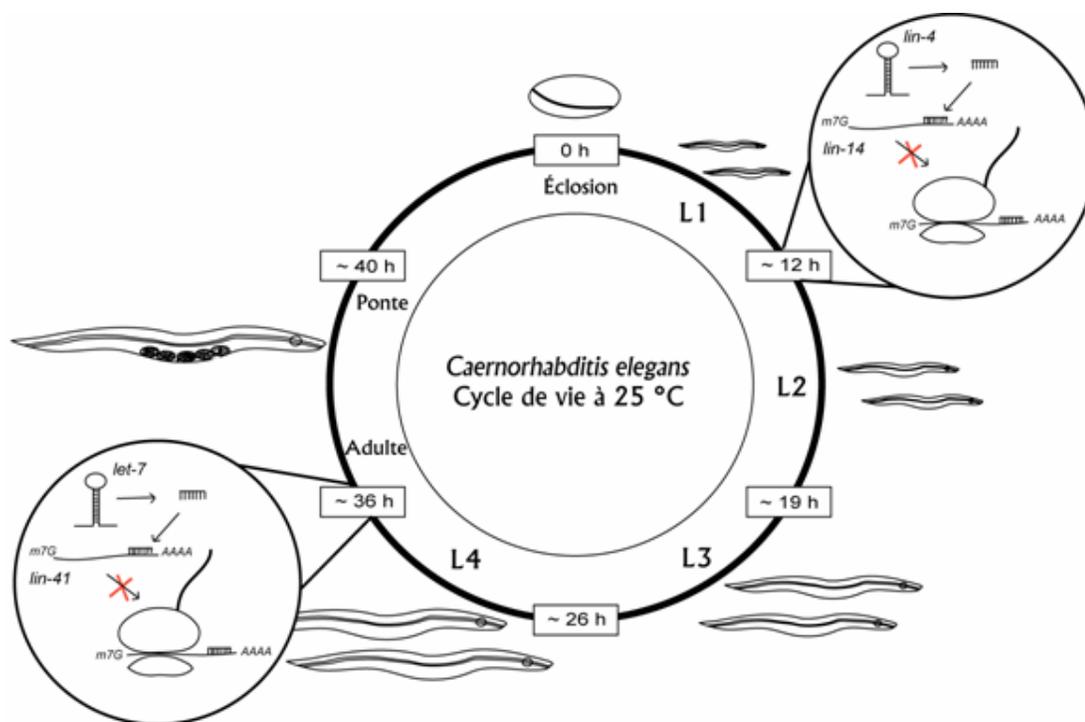


Figure 1-1 : Le cycle de vie de *C. elegans*.

Après l'écllosion, à 25°C, la larve L1 devient L2 en environ 12 heures. Le microARN *lin-4* bloque la cible *lin-14*, permettant au ver de passer au stade L2. Après environ 36 heures, le microARN *let-7* régule négativement la cible *lin-41*, permettant au ver de passer au stade adulte. Le ver peut se reproduire par auto-fertilisation après environ 40h. (Figure de Boisvert, 2007)

1.1.2 Le gène *let-7*

En 2000, la découverte d'un second microARN impliqué dans la synchronisation développementale du ver a ravivé l'intérêt de la communauté scientifique. Identifié lors d'un criblage génétique pour l'identification de nouveaux gènes hétérochroniques chez *C. elegans*, le microARN *let-7* encode un ARN de 21 nucléotides partiellement complémentaire à la région 3'UTR de gènes hétérochroniques (Reinhart et al., 2000). La première cible décrite de *let-7* est l'ARNm de *lin-41*, codant pour une protéine inhibitrice du facteur de transcription *lin-29*, spécifiant les patrons de lignées cellulaire et de différenciation spécifiques au stade adulte. Ainsi, l'expression du microARN *let-7* est essentielle au stade L4 pour permettre la transition au stade adulte par l'inhibition du gène *lin-41*, ce qui permet à la protéine LIN-29 d'être exprimée dans les cellules hypodermales (Slack et al., 2000). Une perte de fonction de *let-7* cause une production inappropriée de cuticules larvaires au stade adulte, ce qui a pour conséquence de produire des cuticules faibles, et, dû à la pression trop élevée des gonades pour celles-ci, l'animal éclate par la vulve (Reinhart et al., 2000). Quelques mois plus tard, il a été démontré que le microARN *let-7* était conservé chez plusieurs espèces animales, incluant des vertébrés, des ascidiens, des hémichordés, des mollusques, des annélides et des arthropodes (Pasquinelli et al., 2000). De plus, non seulement sa structure (Figure 1-2), mais également sa fonction hétérochronique est conservée. *let-7* est effectivement exprimé aux stades larvaires tardifs chez *C. elegans* et la drosophile ainsi que 48h après la fertilisation chez le poisson-zèbre, et au stade adulte chez les annélides et mollusques (Pasquinelli et al., 2000). Par la suite, une série de nouveaux microARN ont été découverts, dont plusieurs, comme *let-7*, étaient hautement conservés entre les espèces (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001).

Wienholds et al., 2003). Les microARN semblaient alors pouvoir toucher plusieurs processus développementaux. En effet, à ce jour, on leur reconnaît un rôle dans la prolifération cellulaire, ainsi qu'au cours des développements embryonnaire, neuronal, musculaire, cardiaque et lymphocytaire.

1.2.1.1 Prolifération cellulaire, apoptose et différenciation cellulaire

Plusieurs événements développementaux sont effectivement régulés par la prolifération cellulaire et par l'apoptose. Chez *C. elegans*, les microARN miR-61 et miR-84 ont été identifiés comme modulateurs d'orthologues de deux oncogènes humains, *vav* et *ras*, eux-mêmes impliqués dans le développement de la vulve (Johnson et al., 2005; Yoo and Greenwald, 2005). Chez la drosophile, les microARN *bantam*, miR-2, miR-6 et miR-14 régulent la croissance tissulaire en modulant l'apoptose et la prolifération cellulaire. Le microARN *bantam* est un régulateur positif de croissance, les tissus surexprimant *bantam* étant plus gros que les tissus normaux (Brennecke et al., 2003). La croissance exacerbée est causée par une augmentation du nombre de cellules dû à une augmentation de la prolifération cellulaire et à une diminution de l'apoptose. Ces effets seraient dus à l'action de *bantam* sur la voie de signalisation antiproliférative Hippo (Thompson and Cohen, 2006). *bantam* a aussi été décrit comme ayant un effet sur l'apoptose en régulant le gène pro-apoptotique *hid*. Les microARN miR-2 et miR-6, quand à eux, sont requis pour supprimer l'apoptose embryonnaire et agissent sur les facteurs proapoptotiques *hid*, *grim*, *reaper* et *sickle* (Leaman et al., 2005). miR-14, lui, agit comme suppresseur de mort cellulaire (Xu et al., 2003). Les microARN agissent aussi au niveau de la différenciation; les microARN du locus *iab-4* contrôlent l'expression du gène *Ultrabithorax*, induisant la transformation homéotique des haltères en ailes chez la drosophile (Ronshaugen et al., 2005). De plus, d'importantes voies de signalisation, telles que Notch et EGF (*Epidermal Growth Factor*), sont sous le contrôle des microARN (Lai et al., 2005; Li and Carthew, 2005). Ainsi, ces voies promouvoient la croissance et la différenciation nécessaires au développement, mais un dérèglement de celles-ci peut contribuer à plusieurs cancers (voir section 1.2.2 pour plus de détails).

1.2.1.2 Développement embryonnaire

Chez certains organismes, il a été montré que les microARN jouaient un rôle important pour le développement précoce de l'embryon. Chez le poisson-zèbre, les microARN sont essentiels pour réguler la morphogénèse du cerveau (Giraldez et al., 2005). De plus, des études récentes ont montré l'implication des microARN dans la gastrulation, étape nécessaire pour la formation du tube neural et de l'axe embryonnaire. Chez l'embryon de *Xenopus laevis*, la signalisation par le ligand Nodal est cruciale pour l'induction dorsale du *Spemann organizer*, nécessaire pour la gastrulation et l'induction de l'endoderme à former la plaque et le tube neural. Les microARN miR-15 et miR-16 réduisent la taille du *Spemann organizer* en ciblant le récepteur Acvr2a de Nodal. Les miR-15 et miR-16 se retrouvent ventralement enrichis, puisqu'ils sont régulés négativement par la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dorsale. Ainsi, l'inhibition de ces microARN du côté dorsal semble un mécanisme majeur par lequel la voie signalétique Wnt contribue à la signalisation par Nodal et donc à la formation du mésoderme dorsal (Martello et al., 2007).

1.2.1.3 Développement neuronal

Les microARN sont aussi impliqués pour le développement et la différenciation des neurones. Chez *C. elegans*, les microARN *lxy-6* et miR-273 sont impliqués dans un complexe régulant l'asymétrie gauche-droite de deux neurones chimiosensibles de la tête, ASEL et ASER. *lxy-6* réprime les gènes spécifiant le neurone ASER, alors que miR-273 réprime ceux formant le neurone ASEL (Johnston and Hobert, 2003; Johnston et al., 2005). De plus, chez le rat, miR-134 régule négativement la taille des prolongements dendritiques, les sites postsynaptiques de la transmission synaptique excitatoire. Cet effet est produit par l'inhibition par miR-134 de la protéine kinase Limk1, contrôlant le développement et la fonction synaptique (Schratt et al., 2006).

Récemment, un rôle des microARN pour le maintien de l'identité cellulaire neuronale a été identifié. Le microARN miR-124 a pour cible la protéine polypyridine tract-binding (PTB), une protéine régulatrice de l'épissage alternatif. Durant la différenciation neuronale, le changement d'expression de PTB et de nPTB (*neuronal PTB*), un isoforme neuronal de PTB, produit de grands changements dans le patron d'épissage de gènes impliqués dans des fonctions neuronales cruciales. PTB altère l'épissage de nPTB en empêchant l'inclusion

d'un exon alternatif, résultant en un ARNm comportant un codon stop prématuré (Boutz et al., 2007). miR-124 active indirectement l'expression de nPTB en inhibant PTB et favorise ainsi la différenciation neuronale (Boutz et al., 2007; Makeyev et al., 2007). miR-124 joue un autre rôle dans la différenciation neuronale en régulant l'expression d'un gène neurone-spécifique : le *RE1-silencing transcription factor* (REST). REST est un facteur de transcription réprimant la transcription extra-neuronale de plusieurs gènes, incluant miR-124. Réciproquement, miR-124 inhibe l'activité de REST, ce qui conduit à un cycle rétro-actif : dans les cellules non neuronales, REST inhibe l'expression de miR-124, et à mesure que la cellule progresse vers la différenciation neuronale et que REST est transcriptionnellement inhibé, miR-124 permet la fin plus rapide des effets biologiques de REST (Visvanathan et al., 2007).

1.2.1.4 Développement musculaire et cardiaque

Le microARN miR-1 a été identifié comme fortement exprimé dans les muscles squelettiques et cardiaques chez de nombreuses espèces et il joue un rôle crucial pour leur formation et leur maintenance. Son expression est régulée par des régulateurs transcriptionnels de la myogénèse : MEF (*myocyte-specific enhancer-binding factor*) et MYOD (*myoblast determination protein-1*), facteurs requis pour l'expression somitique de miR-1-1 et miR-1-2, respectivement, tandis que le SRF (*serum response factor*) est requis pour leur expression cardiaque. Il a été observé qu'une surexpression de miR-1 dans des myoblastes augmente la différenciation tout en réduisant la prolifération. Sur un coeur en développement, la surexpression de miR-1 réduit la prolifération cellulaire, résultant en des parois ventriculaires amincies (Zhao et al., 2005). Chez des souris nulles pour miR-1-2, les coeurs sont plus grands, dû à leurs parois amincies. Environ la moitié de ces souris meurent avant ou tout juste après leur naissance (Zhao et al., 2007b). Il a été démontré que miR-1 cible le facteur de transcription HAND2 (Zhao et al., 2005). Certains autres microARN semblent aussi impliqués dans l'hypertrophie cardiaque, tels que miR-195, miR-133 et miR-208, ce dernier agissant sur l'activité du récepteur hormonal de la thyroïde (TR) (van Rooij et al., 2007). En cas de surexpression de miR-208, l'activité diminuée du récepteur mène à l'expression de β MHC (*β -myosin heavy chain*), causant l'hypertrophie (van Rooij et al., 2007).

1.2.1.5 Développement des lymphocytes

Le contenu du système hématopoïétique en microARN a récemment été étudié (Chen et al., 2004; Monticelli et al., 2005; Neilson et al., 2007), et le microARN miR-181 est ressorti comme élevé chez les thymocytes à double polarité, cellules immatures présentant à la fois les récepteurs CD4 et CD8. miR-181 semble augmenter la sensibilité de ces cellules à la stimulation du récepteur à cellule T (TCR). Au cours du développement des thymocytes dans le thymus, la signalisation par le TCR est hautement régulée, puisqu'elle est essentielle pour sélectionner les cellules interagissant seulement avec les ligands du non-soi. La sélection négative des cellules interagissant fortement avec des ligands du soi est essentielle pour éliminer les cellules pouvant induire l'autoimmunité. Les cellules doivent lier avec forte affinité les complexes peptidiques CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) pour être maturées en lymphocytes. Les cellules surexprimant miR-181 montrent une suractivation du TCR en réponse à de faibles concentrations de peptides CMH. miR-181, puisque exprimé à des niveaux 10 fois supérieurs dans les lymphocytes immatures que matures, semble responsable pour la modulation de la sensibilité à l'activation par le TCR, et donc important pour la différenciation (Li et al., 2007). Le microARN miR-155 est aussi impliqué dans le système immunitaire, étant retrouvé dans les cellules activées B et T, dans les macrophages et les cellules dendritiques. L'absence de miR-155 chez la souris résulte en une altération complexe de la réponse immunitaire et en une histopathologie rénale semblable à celle chez des maladies auto-immunes humaines. miR-155 régule l'équilibre entre deux classes de lymphocytes CD4+ (*T-helper*), Th1 et Th2, par l'inhibition de c-MAF, un facteur de transcription régulant l'expression de l'interleukine-4, un agent nécessaire à la maturation des cellules Th2 (Rodriguez et al., 2007; Thai et al., 2007).

1.2.2 Cancer

Depuis plusieurs années, une mauvaise régulation des microARN apparaît de plus en plus impliquée dans plusieurs cancers. Après la découverte des microARN, certaines observations suggéraient déjà un rôle potentiel dans le cancer humain. Premièrement, les microARN découverts chez *C. elegans* et la drosophile avaient des fonctions de prolifération cellulaire et de régulation de l'apoptose (Brennecke et al., 2003; Lee et al., 1993), leur dérégulation pouvant contribuer à des maladies prolifératives comme le cancer.

Ensuite, les microARN découverts chez l'humain étaient fréquemment localisés dans des régions génomiques souvent amplifiées ou délétées dans les cas de cancer humain (Calin et al., 2004). Enfin, il a été observé que les microARN des tumeurs malignes et lignées cellulaires cancéreuses avaient une expression dérégulée, par rapport aux tissus normaux (Calin and Croce, 2006; Gaur et al., 2007; Lu et al., 2005). Ces observations montraient un lien entre microARN et cancer, mais ne spécifiaient pas si l'expression altérée des microARN était la cause ou la conséquence du cancer.

La première évidence directe d'une implication des microARN dans le cancer a été montrée en 2002, avec l'observation d'une délétion très fréquente sur le chromosome 13 chez les patients atteints de leucémie chronique lymphocytaire. Calin et collaborateurs ont remarqué que les microARN *mir-15* et *mir-16* se retrouvaient dans cette délétion. Une analyse sanguine de patients atteint de la maladie a révélé que la majorité d'entre eux (68%) ont des niveaux nuls ou faibles de ces deux microARN (Calin et al., 2002). En 2005 sont apparues les premières informations sur la mécanique de comment les microARN peuvent contribuer au cancer, avec la relation entre le groupe *mir-17-92* et la voie oncogénique Myc (He et al., 2005; O'Donnell et al., 2005), ainsi qu'avec l'interaction entre le microARN *let-7* et le proto-oncogène RAS (Johnson et al., 2005).

1.2.2.1 Le potentiel oncogénique

Le groupe *mir-17-92* est composé de six microARN, et est localisé dans une région du chromosome 13 qui est fréquemment amplifiée dans les lymphomes humains à cellule B (Ota et al., 2004). Il a été démontré dans des lignées cellulaires de lymphomes où cette région est amplifiée que ces six microARN sont surexprimés. Afin de vérifier si *mir-17-92* contribue à la formation de lymphomes, He et collaborateurs ont utilisé un modèle de souris de lymphome humain à cellule B développant des lymphomes dû à une surexpression de l'oncogène Myc (He et al., 2005). Myc est un oncogène encodant le facteur de transcription c-Myc, régulant la prolifération cellulaire, la croissance, l'apoptose et est fréquemment surexprimé dans les cas de cancer (Askew et al., 1991; Kohl et al., 1983). L'expression du groupe *mir-17-92* dans ce modèle de souris a accéléré la tumorigénèse induite par c-Myc, suggérant donc le rôle oncogène de ce groupe de microARN (He et al., 2005). Récemment le potentiel oncogénique de *mir-17-92* a été éclairci; il aurait un potentiel anti-apoptotique

en favorisant la prolifération cellulaire et la croissance, et serait un facteur angiogénique dans les tumeurs induites par c-Myc (Dews et al., 2006; Matsubara et al., 2007; Sylvestre et al., 2007). Par contre, il a aussi été démontré que miR-17-92, lui-même induit par c-Myc, agissait au niveau de l'inhibition du facteur de croissance E2F1, dont l'expression est induite par Myc (O'Donnell et al., 2005). c-Myc contrôlerait donc finement l'expression de gènes en activant à la fois des protéines cibles et les microARN régulant ces mêmes protéines cibles.

1.2.2.2 Le potentiel suppresseur de tumeur

Des mutations dans l'oncogène RAS sont présentes dans approximativement 15-30% de tous les cancers humains, et la surexpression de RAS est commune dans le cancer du poumon (Bos et al., 1987). Il a été démontré par Johnson et collaborateurs que la surexpression de la protéine RAS dans les tissus cancéreux du poumon corrèle avec l'expression réduite du microARN *let-7* (Johnson et al., 2005). Dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines, le microARN *let-7* inhibe l'expression de RAS. Donc, la réduction de *let-7* dans le cancer du poumon mène à la surexpression de RAS, induisant la croissance cellulaire et contribuant à la tumorigénèse. *let-7* a donc été suggéré d'agir comme un gène suppresseur de tumeur (Johnson et al., 2005). Il en est de même pour les microARN miR-15a et miR-16-1 qui régulent négativement BCL2, une protéine anti-apoptotique souvent surexprimée dans de nombreux cancers (Cimmino et al., 2005).

1.2.2.3 microARN et p53

La protéine p53, connue comme gardienne du génome, régule la réponse cellulaire suite au stress et aux événements initiateurs du cancer, comme les dommages à l'ADN (Lane, 1992). Le microARN miR-34 a été identifié comme étant directement activé par le facteur de transcription p53 après des dommages à l'ADN et le stress oncogénique. Lorsque surexprimé, miR-34 conduit à l'apoptose ou à la sénescence cellulaire, alors que la réduction de la fonction de miR-34 atténue la mort cellulaire induite par p53 (He et al., 2007).

1.2.2.4 Les microARN sont globalement sous-exprimés dans les cancers

En 2005, une étude a vérifié les niveaux de 217 microARN de mammifères dans 334 types de cancers, lignées cellulaires cancéreuses et tissus sains, ce qui a permis de remarquer que

les microARN étaient globalement sous-exprimés dans les tumeurs, comparativement aux tissus sains (Lu et al., 2005). Les tumeurs peu différenciées présentaient de plus faibles niveaux de microARN comparativement aux tumeurs mieux différenciées. Les auteurs ont donc attribué aux microARN un rôle global potentiel de différenciation et de prévention de la division cellulaire. Cependant, la preuve que les niveaux altérés de microARN étaient une cause et non une conséquence de la transformation maligne a vu le jour avec les travaux de Kumar et collaborateurs (Kumar et al., 2007). Ils ont réduit la production de microARN matures dans des lignées cellulaires en inhibant les enzymes essentielles à la maturation des microARN, Drosha et Dicer. Ces cellules ont montré une croissance cellulaire *in vitro* augmentée et, lorsqu'injectées dans des souris nues, ces cellules ont montré une croissance rapide et des tumeurs plus invasives que chez les souris contrôles. De même, la délétion de Dicer dans une souris modèle du cancer du poumon a conduit à une augmentation du nombre et de la taille des tumeurs, ainsi qu'à une plus faible différenciation de ces mêmes tumeurs par rapport aux contrôles. Ces résultats suggèrent donc que la perte globale des microARN joue un rôle important dans le processus de tumorigénèse (Kumar et al., 2007).

1.2.2.5 MicroARN, invasion tumorale et métastases

Bien qu'il y avait des évidences que certains microARN avaient des fonctions d'oncogène et de suppresseur de tumeurs, le rôle des microARN dans la formation de métastases ne fut découvert que récemment, en 2007. Ma et collaborateurs ont remarqué que miR-10b était hautement exprimé uniquement dans les cellules métastatiques de cancer du sein et qu'il régulait positivement la migration cellulaire et l'invasion *in vitro* (Ma et al., 2007). *In vivo*, la surexpression de miR-10b dans les tumeurs du sein non-métastatiques a initié une robuste invasion et la formation de métastases. Ils ont suggéré un modèle dans lequel le facteur de transcription Twist induit l'expression de miR-10b, qui lui inhibe la traduction de l'ARNm encodant l'homeobox D10, résultant en une expression augmentée d'un gène pro-métastatique, *RHOC*. De plus, les niveaux d'expression de miR-10b dans les carcinomes primaires du sein corrèlent avec la progression clinique de la maladie. Ces résultats suggèrent donc un rôle pour les microARN non seulement au niveau des événements initiateurs du cancer, mais aussi directement au niveau de la progression tumorale et des métastases (Ma et al., 2007).

1.2.2.6 La dérégulation des microARN

Puisque les microARN sont souvent dérégulés dans le cancer, certaines études se sont intéressées à caractériser ces dérèglements. Pour la surexpression de *mir-17-92*, impliqué avec l'oncogène MYC, il s'agirait de l'amplification du locus (He et al., 2005); pour la faible expression de miR-15 et miR-16, il s'agit plutôt d'une délétion chromosomale (Calin et al., 2002). Des régulations transcriptionnelles et épigénétiques ont aussi été répertoriées : le promoteur de *mir-124a* est hyperméthylé dans plusieurs tumeurs, empêchant l'activation du gène (Lujambio et al., 2007). De même, le microARN miR-127 semble régulé par le même type de processus (Saito et al., 2006). Des études récentes ont également démontré que la fonction des microARN pouvait être régulée par la perte des sites de liaison des microARN sur la cible. Les translocations chromosomales de l'oncogène *Hmga2* (*high mobility group A2*) peuvent mener à la perte des sites de liaison de *let-7* sur cet ARNm, empêchant donc sa répression par *let-7*, ce qui promouvoit une transformation oncogénique et la croissance dans les cellules de mammifères (Lee and Dutta, 2007; Mayr et al., 2007). De plus, les enzymes de maturation des microARN pourraient jouer un rôle dans leur dérégulation. Il a été montré que la baisse du niveau de microARN matures dans des cancers humains ne corrélait pas avec le niveau de leurs précurseurs, suggérant une régulation au cours de la biogénèse des microARN (Thomson et al., 2006).

1.3 La voie métabolique

1.3.1 La biogénèse

Les microARN sont des gènes, donc encodés dans le génome et, jusqu'à présent, on les retrouve dispersés sur tous les chromosomes humains, excepté le chromosome Y. On estime qu'environ 50% d'entre eux sont arrangés en groupes, et qu'ils sont transcrits en transcrits primaires polycistroniques (Lee et al., 2002). On en retrouve aussi dans les introns d'unités transcriptionnelles codantes, comme miR-10 dans le gène *HOXB4*, ainsi que dans les introns et les exons d'unités transcriptionnelles non codantes (Ohler et al., 2004). En 2004, la première étude sur la transcription des microARN a montré que ceux-ci étaient transcrits par l'ARN polymérase de type II (pol II), puisque les promoteurs étaient directement associés à la pol II, que les transcrits présentaient une coiffe et une queue poly-A caractéristiques des transcrits de la pol II, et que l'inhibition de la pol II diminuait le

niveau de microARN primaires (Lee et al., 2004). Cependant, des études d'immunoprécipitation de la chromatine et des essais de transcription *in vitro* ont montré que l'ARN polymérase III, et non la pol II, était responsable de la transcription de certains microARN (Borchert et al., 2006). Toutefois, la régulation de l'expression des microARN n'est pas connue à ce jour. Les microARN proviennent ainsi de longs transcrits primaires de plusieurs centaines de nucléotides à plusieurs kilobases, organisés sous forme de structures en tige-boucle (Figure 1-3). On appelle cette structure pri-microARN, le précurseur primaire (Lee et al., 2002). Ce pri-microARN est par la suite tronqué par la RNase III Drosha en une molécule de structure en épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides (Lee et al., 2003). Ce pré-microARN sort ensuite du noyau pour être pris en charge par Dicer, afin de former le microARN mature.

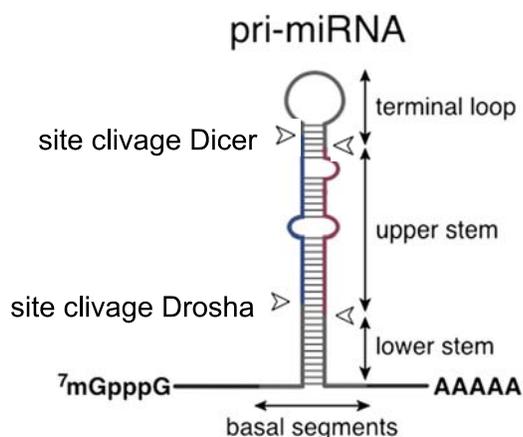


Figure 1-3 : Structure du pri-microARN.

Les pri-microARN proviennent de longs transcrits primaires organisés en structures de type tige-boucle. La structure du duplexe de microARN suite aux clivages de Drosha (flèches du bas) et de Dicer (flèches du haut) est montrée en bleu et rouge. (Figure modifiée de Chan and Slack, 2007).

1.3.1.1 Le complexe Drosha-DGCR8

L'équipe du Dr Kim avait remarqué, en étudiant la molécule du pré-microARN, que la structure possédait deux nucléotides non-appariés à son extrémité 3', ce qui est une signature du clivage par les membres de la famille des RNase III (Lee et al., 2002). Chez l'humain, trois RNase III étaient connues : L44, Dicer et Drosha. Drosha, à cette époque connue pour la maturation des ARN ribosomiaux, est principalement localisée dans le noyau

(Wu et al., 2000), ce qui en faisait une candidate de choix pour la maturation nucléaire des pri-microARN (Lee et al., 2002). Effectivement, la protéine Drosha immunopurifiée clive, *in vitro*, des précurseurs primaires pour donner des fragments d'environ 70 nucléotides, comme les pré-microARN. De plus, des expériences d'interférence à l'ARN ciblées contre Drosha ont montré une accumulation de pri-microARN. Ainsi, Drosha a été reconnue comme responsable de l'étape de maturation des pri-microARN en pré-microARN (Lee et al., 2003).

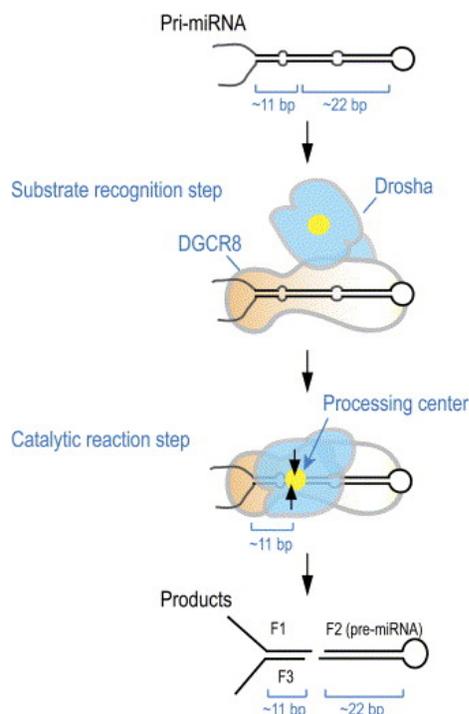


Figure 1-4 : Maturation du pri-microARN en pré-microARN par le complexe Drosha-DGCR8.

La protéine DGCR8 reconnaît les boucles de mésappariement du pri-microARN et recrute Drosha sur la structure afin qu'elle clive la base de la structure en tige-boucle, formant ainsi le pré-microARN (Figure de Han et al., 2006).

Des études subséquentes ont montré que Drosha faisait partie d'un complexe comprenant la protéine DGCR8, ou Pasha chez la drosophile et *C. elegans* (Denli et al., 2004), et que cette protéine est essentielle pour le clivage du transcrit primaire. L'équipe du Dr Kim a procédé à la purification de Drosha et a détecté la présence d'un complexe de 650kDa, suggérant ainsi la présence de cofacteurs. Une immunoprécipitation de Drosha a permis de récupérer la protéine DGCR8, identifiée par spectrométrie de masse. Il a ensuite été montré, *in vitro*,

que Drosha seule ne peut produire de pré-microARN, mais que la fonction est restaurée en présence de DGCR8. Ainsi, le complexe Drosha-DGCR8 est le complexe fonctionnel requis pour la maturation du pri-microARN en pré-microARN (Figure 1-4) (Han et al., 2004). La protéine DGCR8 contient deux domaines de liaison à l'ARN double brin, responsables de son interaction directe avec le pri-microARN, et stabilise Drosha par l'interaction entre son domaine C-terminal et le domaine central de Drosha (Yeom et al., 2006). Il a été ensuite démontré que DGCR8 reconnaissait les boucles de mésappariements du transcrit primaire, permettant à Drosha de cliver à une distance de 11 nucléotides de la base de la structure en tige-boucle, formant ainsi le pré-microARN (Han et al., 2006). Des études récentes chez la drosophile et *C. elegans* ont montré l'existence d'une autre voie de production de microARN ne nécessitant pas l'intervention de Drosha. Ces courts ARN proviennent de courts ARN introniques en structure de tige-boucle, appelés mirtrons. Les tige-boucle mirtrons sont maturés par la machinerie d'épissage et l'enzyme de débranchement des lassos introniques (lariat debranching enzyme (ldbr)), afin de former des tiges-boucle de type pré-microARN (Figure 1-5). La voie des mirtrons rejoint ensuite la voie classique des microARN : le pré-microARN provenant du mirtron sera exporté au cytoplasme, puis clivé par Dicer (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Tout récemment, des mirtrons ont aussi été identifiés chez les mammifères, et puisqu'on les retrouve aussi chez la drosophile et chez *C. elegans*, cela suggère une apparition plutôt ancienne de ce type de molécule dans l'évolution (Berezikov et al., 2007).

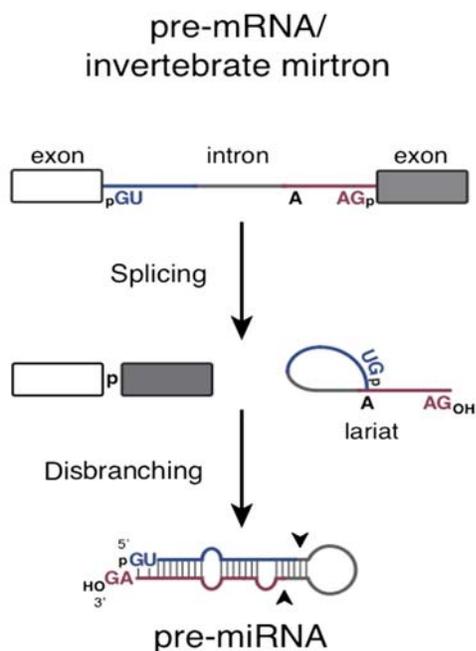


Figure 1-5 : Formation du pré-microARN selon la voie des mirtrons.

Après l'épissage, l'intron est re-linéarisé par l'enzyme de débranchement des lassos introniques (lariat), puis forme une structure en tige-boucle, de type pré-microARN. Les régions formant le microARN mature sont indiquées en couleur. Les flèches noires montrent le site de clivage de Dicer (Figure de Chan and Slack, 2007).

1.3.1.2 Export du pré-microARN du noyau vers le cytoplasme

La maturation du pri-microARN en pré-microARN survenant dans le noyau, le pré-microARN doit donc être exporté dans le cytoplasme pour être maturé en microARN par l'enzyme Dicer (DCR-1). Cette exportation du précurseur est assurée par la karyophérine Exportin-5 (Exp5) (Brownawell and Macara, 2002). Exp5 était connue pour exporter du noyau des courts ARN en structure de « mini-hélice » (Gwizdek et al., 2003) ainsi que des ARN de transfert (Calado et al., 2002). Exp5 peut lier directement les pré-microARN humains *in vitro*, mais uniquement en présence du cofacteur Ran-GDP, caractéristique du transport des cargos nucléaires chez les karyophérines (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). La déplétion d'Exp5 par interférence à l'ARN conduit à une diminution des niveaux de microARN matures dans les cellules (Lund et al., 2004), démontrant ainsi le rôle essentiel d'Exp5 pour la production de microARN matures. Des études ultérieures ont montré qu'Exp5 semble reconnaître la longueur et la structure du précurseur, et présente une préférence pour la liaison d'extrémités 3' cohésives de deux nucléotides (Zeng and Cullen,

2004). Il a récemment été montré que le microARN mature dans le cytoplasme peut être localisé au noyau s'il possède une séquence de localisation nucléaire. En effet, miR-29b présente un motif terminal de 6 nucléotides responsable de son enrichissement nucléaire, permettant ainsi sa fonction uniquement en mitose, lorsque la membrane nucléaire est désassemblée (Hwang et al., 2007).

1.3.1.3 Complexe Dicer-Loqs

Une fois dans le cytoplasme, le microARN est maturé en duplex de microARN de 19-23 nucléotides par le complexe endonucléase Dicer (DCR-1 chez *C. elegans*), en clivant la forme précurseur (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001). À l'origine, l'activité nucléase de Dicer a été associée à la production de siARN (Hammond et al., 2000), mais des études subséquentes chez *C. elegans* ont montré l'importance de DCR-1 pour la production de microARN (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001) ainsi que pour l'exo-RNAi (Knight and Bass, 2001), le développement de la lignée germinale (Knight and Bass, 2001) et l'endo-RNAi (Ambros et al., 2003b). Dicer est donc impliqué dans les processus d'interférence à l'ARN en général. DCR-1 contient à son extrémité N-terminale un domaine ARN hélicase de type DExH/DEAD-box, deux domaines RNase III et un domaine de liaison à l'ARN double brin (PAZ) en C-terminal (Knight and Bass, 2001). Dicer, comme les autres RNase III, clive en laissant deux nucléotides libres à l'extrémité 3' de son substrat. Il a été montré que Dicer agissait en quelque sorte de « règle moléculaire » en mesurant la longueur précise de l'ARN double brin et en clivant à une distance spécifique de l'extrémité de l'hélice, la distance de 65 angström entre les domaines PAZ (liaison à l'ARN) et RNase III coïncidant avec la longueur de 25 paires de bases (Macrae et al., 2006). La reconnaissance du précurseur ne serait toutefois pas faite par Dicer, la présence d'un cofacteur recrutant Dicer sur la structure du précurseur étant nécessaire. Chez les vertébrés, la protéine TRBP (Chendrimada et al., 2005) aurait cette fonction, tout comme Loquacious (Loqs) chez la drosophile. Loqs est une protéine comportant deux domaines de liaison à l'ARN double brin et est associé à Dcr-1 chez la drosophile. Une perte de fonction de Loqs résulte en une accumulation de pré-microARN dans les cellules, montrant son rôle essentiel pour la maturation des microARN (Forstemann et al., 2005; Saito et al., 2005). Chez *C. elegans*, aucune protéine de reconnaissance du précurseur n'a été identifiée jusqu'à présent, bien que

l'on puisse supposer qu'il en existe une, puisque dans la voie du RNAi chez *C. elegans*, Dicer nécessite aussi un cofacteur pour être recruté à l'ARN double brin (Jannot et al., 2008; Tabara et al., 2002).

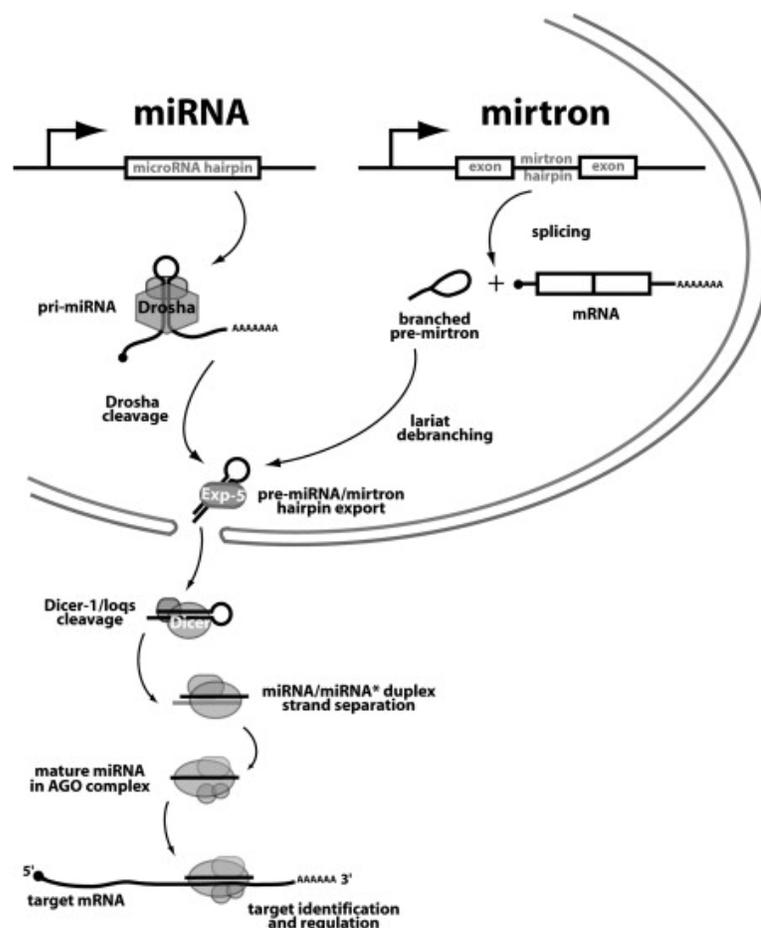


Figure 1-6 : Voie des microARN et des mirtrons.

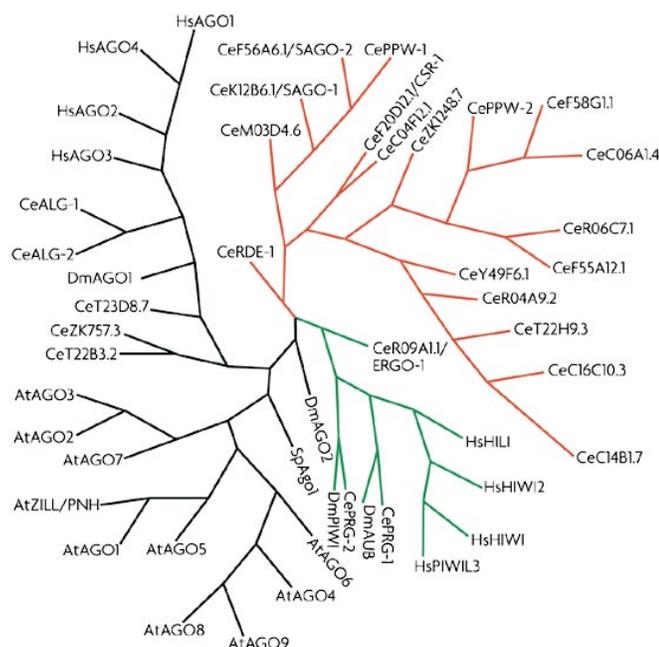
Les microARN proviennent d'un transcrit primaire, le pri-microARN, qui est ensuite clivé par le complexe Droscha/DGCR8. Le pré-microARN est ensuite exporté vers le cytoplasme pour être reconnu et maturé par Dicer/loqs. Le duplex de microARN ainsi formé est ensuite séparé, et le brin favorisé par la loi de l'asymétrie est incorporé au complexe miRISC et se lie à la cible (Schwarz et al., 2003). Pour la voie des mirtrons, le pré-microARN provient d'introns restructurés par l'enzyme de débranchement des lassos introniques. Chez *C. elegans*, le facteur d'exportation vers le cytoplasme ainsi que le facteur de reconnaissance du précurseur ne sont pas identifiés. Les deux brins du duplex de microARN présentent des mésappariements et les protéines Argonautes faisant partie du miRISC sont ALG-1/ALG-2. (Figure de Okamura et al., 2007)

1.3.2 Les protéines Argonautes

D'abord décrites comme importantes pour le développement des plantes (Bohmert et al., 1998; Moussian et al., 1998) et la division des cellules souches germinales chez la drosophile (Lin and Spradling, 1997), les protéines Argonautes ont ensuite été reconnues comme étant associées aux courts ARN non codants et essentielles pour les voies de l'interférence à l'ARN et des microARN.

1.3.2.1 Diversité des Argonautes

Les Argonautes sont regroupées en trois groupes paralogues : les *Argonaute-like*, les *Piwi-like* et les Argonautes du groupe 3 spécifiques à *C. elegans* (Yigit et al., 2006) (Figure 1-7). Les deux premiers groupes sont retrouvés chez les bactéries, les archées ainsi que chez les eucaryotes. Le nombre de protéines Argonautes varie cependant selon les espèces : on en retrouve 8 chez les humains, 5 chez la drosophile, 10 chez *Arabidopsis thaliana*, seulement une chez *Schizosaccharomyces pombe* et au moins 26 chez *C. elegans* (Hutvagner and Simard, 2008).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 1-7 : Arbre des Argonautes.

Le groupe des *Argonaute-like* est représenté en noir, le groupe *Piwi-like*, en vert, et le groupe 3 des Argonaute spécifiques à *C. elegans*, en rouge (Figure de Hutvagner and Simard, 2008).

1.3.2.2 Structure des Argonautes

Les protéines Argonautes possèdent quatre domaines distincts : les domaines N-terminal, Paz, Mid et PIWI (Figure 1-8).

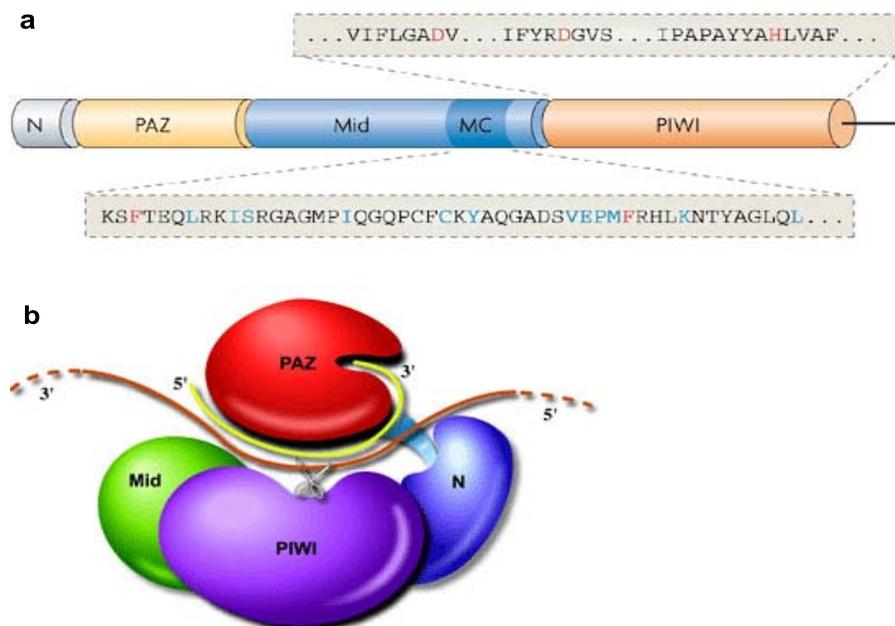


Figure 1-8 : Structure d'une protéine Argonaute.

(a) Schéma linéaire des domaines d'une protéine Argonaute (AGO2 humain en exemple). Le domaine PAZ est important pour la liaison des courts ARN, reconnaissant les extrémités 3' d'ARN simple brin. Le domaine PIWI est un domaine endonucléase, les résidus essentiels pour le clivage sont indiqués en rouge. Le domaine de liaison à la coiffe de l'ARNm, le domaine MC (bleu foncé), est à l'intérieur du domaine Mid (bleu). Les résidus en couleur sont ceux qui sont conservés chez le facteur de liaison à la coiffe eIF4E (Figure de Hutvagner and Simard, 2008). (b) Structure modélisée d'une protéine Argonaute et du positionnement des ARN. Le court ARN est représenté en jaune, alors que l'ARNm cible est en rouge (Figure de Song et al., 2004).

1.3.2.2.1 Le domaine PAZ

En plus d'être retrouvé chez les protéines Argonaute, le domaine PAZ est retrouvé chez Dicer. Il consiste en deux sous-domaines, un ayant une structure de repliement OB-like (*oligonucleotide/oligosaccharide binding*) indiquant la possibilité de liaison aux acides nucléiques à simple brin. Des études cristallographiques combinées à des approches biochimiques ont révélé que le domaine PAZ lie les ARN simple brin avec une faible affinité de façon séquence indépendante (Lingel et al., 2003; Ma et al., 2005). Le domaine PAZ peut reconnaître les extrémités 3' des ARN simple brin, permettant ainsi la

reconnaissance des microARN, puisque étant clivés par Drosha et Dicer, ils présentent deux nucléotides non appariés en 3'.

1.3.2.2.2 *Le domaine PIWI*

Le domaine PIWI montre des ressemblances avec la structure de la RNase H, une endonucléase clivant l'ARN de duplexes ARN-ADN, possédant un motif catalytique Asp-Asp-Glu/Asp et nécessitant la liaison de deux ions métalliques divalents (Lai et al., 2000). Le domaine PIWI clive plutôt aux motifs Asp-Asp-Asp/Glu/His/Lys et requiert la liaison d'un seul cation divalent (Song et al., 2004). La mutation d'un acide aminé du domaine catalytique chez l'Argonaute humain AGO2 abolit l'activité catalytique (Liu et al., 2004; Rivas et al., 2005). À la fois la RNase H et les protéines Argonautes ayant la fonction de clivage laissent un 3'OH et un 5' phosphate à leurs produits (Martinez and Tuschl, 2004; Schwarz et al., 2004). Le 5' phosphate des microARN, acquis suite à leur maturation par les RNaseIII, est un élément important pour leur reconnaissance par les protéines Argonautes, le 5' phosphate étant ancré par le cation divalent à l'interface entre les domaines PIWI et Mid (Ma et al., 2005; Parker et al., 2005). Une portion du domaine Mid, appelée MC, présente une grande homologie au motif de liaison à la coiffe du facteur d'initiation eIF4E, le domaine MC pouvant lier la coiffe afin d'assurer une régulation efficace de la traduction en empêchant eIF4E de se lier (Kiriakidou et al., 2007). Ce ne sont pas tous les mécanismes de régulation des gènes par de courts ARN qui requièrent l'activité catalytique des protéines Argonaute; la régulation des gènes par les microARN n'implique pas de clivage séquence-spécifique (*slicing*), même s'ils sont associés avec des protéines Argonautes ayant une activité endonucléase. Toutefois, chez la drosophile, il a été montré que le domaine catalytique d'AGO2 pouvait jouer un rôle pour la maturation du microRISC (voir 1.3.2.4 pour plus de détails).

1.3.2.3 **Les Argonautes associées à la voie des microARN**

Chez *C. elegans*, parmi ses 26 protéines Argonaute, un rôle dans la voie des microARN a été déterminé seulement pour ALG-1 et ALG-2. Leur perte de fonction génère d'importants problèmes dans le développement du nématode, aussi appelés phénotypes hétérochroniques, que l'on observe aussi lors de la perte de fonction de plusieurs microARN. Les niveaux des microARN *let-7* et *lin-4* sont diminués lorsque les gènes *alg-1*

et *alg-2* sont inhibés (Grishok et al., 2001). Il a été démontré par des approches biochimiques que le microARN *let-7* est associé *in vivo* avec ALG-1/ALG-2 (Hutvagner et al., 2004). Chez la drosophile, la protéine AGO1 est associée à la régulation des gènes par les microARN et, chez les mammifères, ce sont les protéines AGO1, AGO2, AGO3 et AGO4 qui remplissent ces fonctions (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004).

1.3.2.4 Complexe microRISC

Chez la drosophile, le microRISC (*microRNA-induced silencing complex*) est formé par Loqs et Dcr-1, recrutant la protéine Argonaute au duplex de microARN. Il se produira ensuite une sélection du brin actif du duplex de microARN. En effet, une étude a montré une accumulation 100 fois plus grande du brin antisens du microARN que du brin sens chez *C. elegans* (Lim et al., 2003). Le brin guide ou actif est déterminé selon la loi de l'asymétrie : le brin ayant l'extrémité 5' la plus facile à désappairier du brin complémentaire serait incorporé dans le complexe (Schwarz et al., 2003). Dans la voie du RNAi, la protéine Argonaute clive le brin passager (non-actif) du duplexe de siARN. Cependant, pour les microARN, bien que les protéines Argonautes impliquées possèdent le domaine endonucléase, la présence des mésappariement empêche le clivage du brin passager par le domaine PIWI, excepté pour certains microARN parfaitement appariés (Förstemann et al., 2007; Horwich et al., 2007). Il a même été observé, chez certains microARN, un clivage du brin passager avant le clivage par Dicer (Diederichs and Haber, 2007). Une hélicase non-identifiée pourrait être responsable du désappariement des deux brins du duplex de microARN.

1.3.3 Reconnaissance de la cible

Il a été découvert, chez les premiers microARN identifiées chez *C. elegans*, *lin-4* et *let-7*, que ceux-ci se liaient à plusieurs endroits de la région 3' non traduite (3'UTR) de leurs ARNm cibles *lin-14* et *lin-41*, et ce, de façon partiellement complémentaire (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000; Wightman et al., 1993). De par sa séquence nucléotidique, le microARN peut cibler un ARNm de façon séquence-spécifique. Les nucléotides aux positions 2 à 8 du microARN sont critiques pour la reconnaissance de la cible. La mutation d'un de ces nucléotides diminue de façon significative l'inhibition de la synthèse protéique (Brennecke et al., 2005; Doench and Sharp, 2004; Lai et al., 2005; Lewis et al., 2005;

Lewis et al., 2003; Mallory et al., 2004). Le premier nucléotide du microARN n'est pas apparié pour sa fonction (Haley and Zamore, 2004; Ma et al., 2005; Parker et al., 2005), de même que sa portion 3', tandis que les nucléotides 2 à 8 sont parfaitement appariés. Cette région contenant les nucléotides 2 à 8, en 5', essentiels pour la liaison de la cible, est appelée séquence *seed*, et celle-ci est retrouvée chez la plupart des microARN (Lai, 2002). Cette région étant plutôt restreinte, plusieurs microARN peuvent réguler des centaines d'ARNm différents. Les microARN qui possèdent la même séquence *seed* peuvent être regroupés en familles, et, puisque leur séquence *seed* est identique, ceux-ci ciblent pratiquement les mêmes ARNm, ce qui permet une inhibition protéique très importante pour ces ARNm ciblés. De même, souvent les ARNm cibles comportent plusieurs sites de liaison de microARN, permettant une régulation négative efficace par effets additifs (Bartel, 2004). Lorsque le microARN, en complexe avec les Argonautes, est lié en 3'UTR de sa cible, l'inhibition de la synthèse protéique peut se produire.

1.3.4 Modes d'action d'inhibition de la synthèse protéique

À ce jour, les études ont montré que les microARN contrôlent l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle en agissant au niveau de la traduction et/ou de la stabilité de l'ARNm dans le cytoplasme. Cependant, les microARN pourraient réguler les gènes par d'autres moyens : par exemple en régulant l'épissage des ARN pré-messagers, en agissant comme chaperonnes ou en modulant les interactions protéines-protéines (Filipowicz et al., 2008). Les mécanismes par lesquels les microARN inhibent la synthèse protéique sont toutefois peu compris, les différents modèles se contredisant parfois. Les modèles proposés indiquent que les microARN inhibent la synthèse protéique de quatre façons différentes : dégradation du polypeptide naissant, inhibition de l'élongation de la traduction, terminaison prématurée de la traduction, et inhibition de l'initiation de la traduction (Figure 1-9).

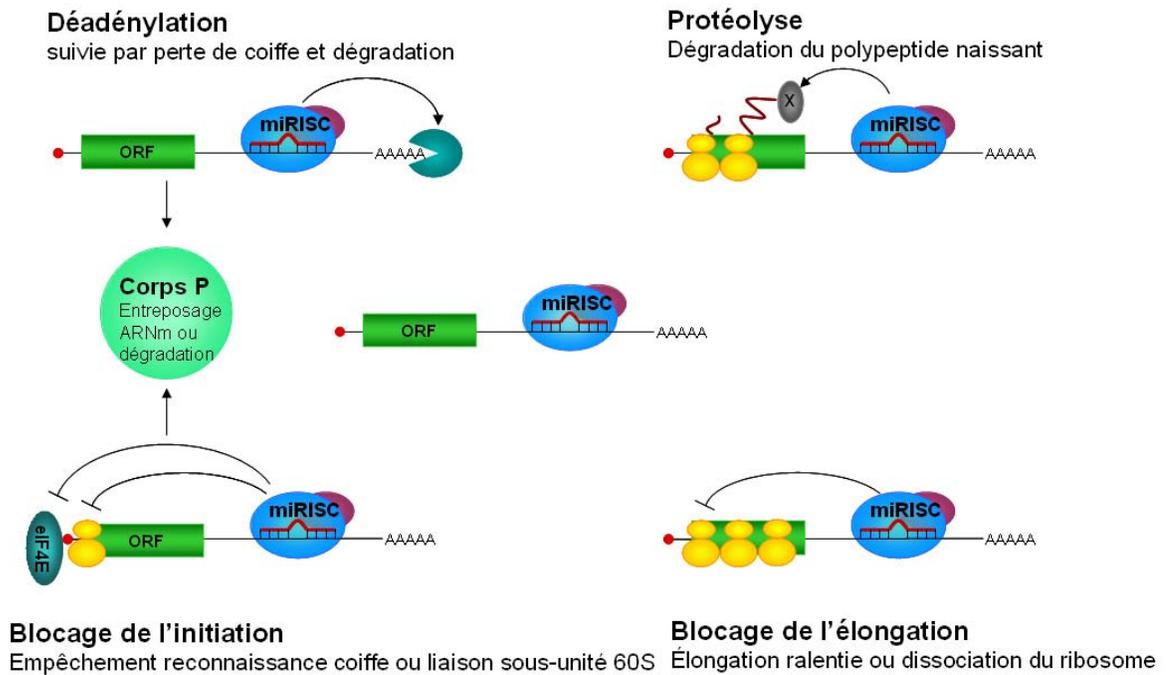


Figure 1-9 : Modes d'action d'inhibition de la synthèse protéique.

Les microARN, une fois liés à leur cible, peuvent conduire à leur déadénylation, à la protéolyse, au blocage de l'initiation de la traduction ou au blocage de l'élongation.

1.3.4.1 Les mécanismes post-initiation de la traduction

Les premières études sur le microARN *lin-4* chez *C. elegans* ont montré un niveau d'ARNm cible *lin-14* faiblement affecté, contrairement au niveau de la protéine LIN-14 (Lee et al., 1993). Des études subséquentes chez *C. elegans* montraient que les ARNm *lin-14* et *lin-28*, cibles de *lin-4*, restaient associés aux polysomes malgré une réduction marquée de la production de protéines (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002). De plus, l'étude de trois microARN endogènes humains (miR-21, miR-16 et let-7a) a montré qu'ils sont retrouvés en grande majorité associés aux polysomes avec les ARNm (Maroney et al., 2006). Le microARN *let-7* est lui aussi retrouvé avec les ribosomes actifs (Nottrott et al., 2006). Les cibles des microARN semblent donc être activement traduites, mais aucune protéine correspondante n'est détectable. Une étude propose que les ARNm réprimés sont continuellement traduits, mais que le polypeptide est rapidement dégradé par des protéases recrutées par le microRISC, et donc ne s'accumule pas (Nottrott et al., 2006).

Une autre étude suggère une dissociation prématurée des ribosomes sur l'ARNm, causant l'arrêt de la traduction (Petersen et al., 2006).

1.3.4.2 Inhibition de l'initiation de la traduction

En contradiction avec les études décrites précédemment, il a été montré, en fractionnement sur gradients de sucrose, que les microARN et leurs cibles ne sont pas associés aux polysomes, mais plutôt avec les complexes microRISC libres dans les cellules de mammifères (Pillai et al., 2005). Il a été proposé que les microARN peuvent inhiber l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe. Il a été montré que les structures de la coiffe en 5', et de la queue poly-A en 3', étaient nécessaires pour une répression efficace de la traduction, et que le microRISC pouvait interférer avec celles-ci ainsi qu'avec la protéine de liaison de la coiffe eIF4E, facteur d'initiation eucaryotique essentiel (Humphreys et al., 2005). Récemment, il a été montré que le domaine central (Mid domain) de protéines Argonautes montrait des similarités de séquence avec le facteur eIF4E (Kiriakidou et al., 2007). eIF4E lie la coiffe des ARNm par l'interaction entre ses deux tryptophanes et la base méthylée de la coiffe. À la position des tryptophanes, les protéines Argonautes ont deux phénylalanines pouvant produire une interaction semblable. Il a donc été montré qu'AGO2 lie une coiffe sur billes de Sepharose, et qu'il y a compétition pour la liaison avec un analogue de coiffe. De plus, la mutation d'une phénylalanine suffit pour abolir l'interaction. Les Argonautes associées aux microARN aboliraient donc l'initiation de la traduction en déplaçant eIF4E de la coiffe. Une étude additionnelle a montré *in vitro* que les microARN inhibent l'initiation de la traduction en ciblant la protéine de liaison de la coiffe eIF4F (Mathonnet et al., 2007). Cette inhibition de l'initiation de la traduction serait le premier événement moléculaire produit par les microARN. Une autre étude suggère un mode d'action additionnel des microARN à l'étape d'initiation de la traduction. Les études de Chendrimada et collaborateurs ont montré, dans les cellules humaines, que AGO2 est associé avec eIF6 et les sous-unités ribosomales 60S (Chendrimada et al., 2007). La liaison d'eIF6 aux grandes sous-unités 60S empêcherait leur liaison aux petites sous-unités 40S, donc si AGO2 recrute eIF6, cela pourrait empêcher la formation du ribosome et donc la traduction. Ils ont montré, chez les cellules humaines ainsi que chez *C. elegans*, que la délétion partielle de eIF6 empêche l'inhibition de la cible par les microARN (Chendrimada et al., 2007). Cependant, il a aussi été démontré que eIF6 est un facteur important pour la

biogénèse de la sous-unité 60S au nucléole, ainsi que pour son transport jusqu'au cytoplasme (Basu et al., 2001; Sanvito et al., 1999; Si and Maitra, 1999). L'implication d'eIF6 dans la biogénèse des ribosomes peut suggérer une autre explication aux observations de Chendrimada et collaborateurs. Il a été montré précédemment que des mutations de protéines impliquées dans la biogénèse de la sous-unité 60S pouvaient supprimer l'effet de la délétion de la protéine Pab1 (*poly(A) binding protein*). Pab1 est une protéine contribuant à l'initiation de la traduction en permettant la circularisation de l'ARNm et le recrutement de la sous-unité 40S. En mutant une protéine de biogénèse de 60S, cette sous-unité se retrouve déficiente, et le niveau de sous-unités 40S libres est augmenté. Ainsi, cette grande quantité de 40S libres favorise leur recrutement à l'ARNm, ce qui compense donc pour la mutation de Pab1. L'étape limitante du recrutement de 40S est donc reportée sur l'association des unités 60S (Sachs and Davis, 1989, 1990). Un modèle semblable serait possible pour eIF6 : le déficit en sous-unités 60S dû à l'inhibition de eIF6 pourrait mener à une baisse de la répression induite par les microARN, en permettant la liaison d'unités 40S. La répression par les microARN pourrait donc affecter l'initiation de la traduction en ciblant la coiffe ou la queue poly(A), mais peut-être sans l'implication directe de eIF6 (Filipowicz et al., 2008).

1.3.4.3 Dégradation de l'ARNm cible

Bien qu'il avait été montré originalement que les niveaux de l'ARNm *lin-14* n'étaient pas affectés par le microARN *lin-4*, plusieurs études ont observé que les microARN induisaient une dégradation de l'ARNm cible, y compris pour les microARN *lin-4* et *let-7* (Bagga et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2007; Giraldez et al., 2006; Lim et al., 2005; Wu et al., 2006). La dégradation de l'ARNm n'est cependant pas causée par le clivage endonucléolityque de la cible comme dans la voie du RNAi, mais est plutôt due à la machinerie de dégradation de l'ARNm. Des études chez plusieurs organismes ont montré que les microARN accélèrent la déadénylation (perte de la queue poly-A) ainsi que la perte de la coiffe des ARNm cibles (Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2007; Giraldez et al., 2006; Wu et al., 2006). Les cibles seraient ensuite recrutées aux corps P, enrichis en protéines responsables du catabolisme des ARNm, par la protéine Argonaute et son interacteur GW182, une protéine des corps P (Behm-Ansmant et al., 2006; Ding et al., 2005; Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005a; Liu et al., 2005b). Une fois dans les corps P,

la cible pourrait être dégradée par la machinerie de dégradation, ou simplement rendue inaccessible à la machinerie traductionnelle. Cependant, une question importante demeure, à savoir si la dégradation ou la localisation aux corps P est un mécanisme d'inhibition de la traduction, ou alors une conséquence d'un effet primaire sur la traduction.

1.3.4.4 Protection de la répression des ARNm par les microARN

Récemment, la protéine Dead End (Dnd1), connue pour être impliquée dans la régulation de la viabilité des cellules germinales et la suppression de la formation de cellules germinales tumorales, s'est fait attribuer une nouvelle fonction. Kedde et collaborateurs ont montré que ses fonctions étaient plutôt dues à son implication dans la voie des microARN, puisqu'elle empêche l'inhibition de la traduction induite par les microARN (Kedde et al., 2007). En utilisant des essais sur des cellules en culture, les auteurs ont montré que Dnd1 élève l'expression d'un gène rapporteur ayant la région 3'UTR du gène LATS2, lui-même régulé par miR-372 et miR-373 (Kedde et al., 2007). De plus, cette restauration de l'expression est dépendante des sites de liaison fonctionnels des microARN. Ils ont démontré que Dnd1 se lie à des régions riches en uridine à proximité des sites de liaison des microARN, et que sans ces régions riches en uridine, Dnd1 ne peut affecter la fonction des microARN. Les auteurs suggèrent que Dnd1, en se liant en 3'UTR de la cible, empêche les microARN de se lier, empêchant ainsi leur fonction (Kedde et al., 2007). Autrement, Dnd1 pourrait aussi changer la localisation cellulaire de la cible, la rendant inaccessible pour la traduction (Figure 1-10) (Ketting, 2007).

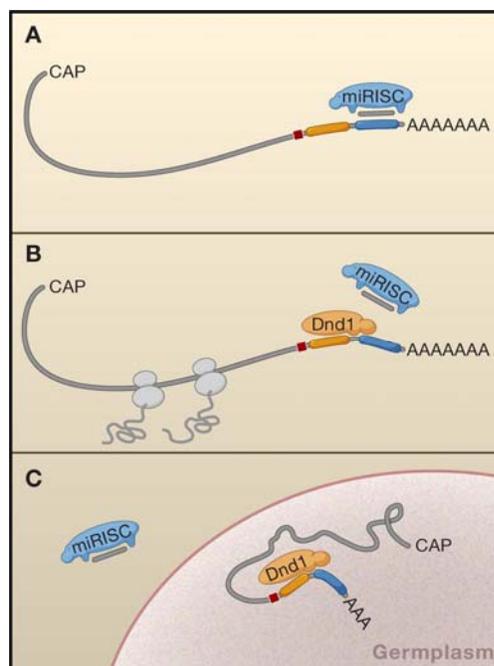


Figure 1-10 : Protection de la liaison du microARN par Dnd1.

(A) microARN associé à sa cible. (B) Lorsque Dnd1 lie une séquence riche en uridine à proximité du site de liaison du microARN, la liaison du microARN serait empêchée. (C) Dnd1 pourrait aussi modifier la localisation cellulaire de la cible, prévenant son association au microARN (Figure de Ketting, 2007).

1.3.4.5 Réversibilité de la répression des ARNm induite par les microARN

Il a récemment été montré que, sous certaines conditions et dans certains types cellulaires, la répression induite par les microARN pouvait être prévenue (Kedde et al., 2007), renversée (Bhattacharyya et al., 2006; Schratt et al., 2006), et que même des composantes du microRISC pouvaient agir en tant qu'activateurs traductionnels (Vasudevan et al., 2007). Dans des cellules humaines d'hépatomes, l'ARNm de CAT-1 subit une répression par miR-122 et est accumulé dans les corps P. Cependant, suite à diverses formes de stress cellulaire, l'ARNm de CAT-1 est relâché et recruté aux polysomes (Bhattacharyya et al., 2006). Dans les cellules neuronales, certains ARNm sont transportés le long des dendrites en état réprimé, pour être activés une fois parvenus aux synapses dendritiques. C'est le cas de LIMK1, une protéine kinase impliquée dans le développement des synapses (Meng et al., 2002). Une fois à destination, des stimuli extracellulaires induiraient la dérèpression de *Limk1* par miR-134 (Schratt et al., 2006). Non seulement la dérèpression des cibles des microARN est possible, mais il a été observé que les microARN pouvaient aussi réguler de

façon positive la traduction. Vasudevan et collaborateurs ont montré qu'en situation d'arrêt du cycle cellulaire, les microARN peuvent recruter des facteurs associés au microRISC, tels que les protéines Argonautes, et que cela active la transcription du gène cible (Vasudevan et al., 2007).

Bref, le mécanisme par lequel les microARN induisent l'inhibition de la traduction demeure flou, et les évidences apportées se contredisent parfois. Il est suggéré qu'un événement initial pourrait avoir lieu, qui serait ensuite amplifié par les différents mécanismes décrits plus haut, par exemple par la dégradation de la cible ou du polypeptide naissant. Autrement, il est aussi suggéré que ces différents mécanismes pourraient agir chez des organismes différents, dans des types cellulaires différents et sous des conditions différentes (Filipowicz et al., 2008).

2 Problématique et objectifs

Quoi qu'il en soit, il demeure peu de facteurs cellulaires connus comme étant impliqués dans la voie des microARN. L'identification de nouvelles composantes de la voie apporterait une meilleure compréhension du mécanisme d'inhibition traductionnelle des ARNm ciblés. C'est donc dans le but de mieux comprendre la voie métabolique des microARN que nous nous intéressons aux protéines Argonautes reliées à cette voie, soient ALG-1 et ALG-2 chez *C. elegans*. En effet, ces protéines jouent un rôle central dans cette voie, puisqu'elles sont impliquées dans la formation du complexe microRISC et sont directement reliées au microARN et fort probablement à la cible. Ainsi, afin de mieux caractériser les fonctions des protéines Argonaute ALG-1/2 et donc de mieux comprendre la voie des microARN et l'inhibition des gènes en découlant, nous avons utilisé deux approches différentes :

- 1- **Identification des microARN associés aux protéines ALG-1/2 au cours du développement chez *C. elegans*.** Par l'immunoprécipitation de la protéine GFP::ALG-1 de vers aux divers stades du développement et par l'extraction de l'ARN associé, nous avons étudié les microARN présents par analyse sur micropuce. De plus, nous avons étudié le profil d'expression des microARN au cours du développement.
- 2- **Identification de nouveaux facteurs interagissant génétiquement avec *alg-2*.** Nous avons effectué un criblage génétique afin d'identifier des gènes synthétiques létaux avec *alg-2*, tels que *alg-1*, agissant ainsi dans la même voie métabolique. Cette technique nous permettrait donc de découvrir de nouveaux facteurs de la voie des microARN, ou d'identifier une nouvelle fonction pour ALG-2.

3 Étude de l'association des microARN avec la protéine Argonaute ALG-1 au cours du développement chez *C. elegans*.

ALG-1 et ALG-2 sont deux protéines Argonautes présentant environ 80% d'identité en séquence d'acides aminés entre elles et sont essentielles pour la fonction des microARN. Leur perte de fonction simultanée amène de graves problèmes développementaux et conduit à la mort embryonnaire (Grishok et al., 2001). Les animaux de la souche mutante pour *alg-2* (*ok304*) se comportent comme des animaux de type sauvage, sans défaut apparent dans le développement, alors que la souche mutante pour *alg-1* (*gk214*) montre des phénotypes hétérochroniques atténués chez certains individus de la population, tels qu'un éclatement par la vulve dû à un problème de cuticules ou une incapacité de pondre due à la malformation de la vulve. Il est proposé qu'ALG-1 et ALG-2 agissent de façon complémentaire et s'entrecroisent dans leurs fonctions. Il est connu que leur perte de fonction conduit à une diminution du niveau de microARN *lin-4* et *let-7* matures (Grishok et al., 2001) et qu'ALG-1 et ALG-2 lient le microARN *let-7* *in vivo* (Hutvagner et al., 2004). Cependant, en réalité, on ignore si les autres microARN chez *C. elegans* leur sont associés et s'ils s'associent à la fois avec les deux protéines Argonautes. De plus, le profil d'expression des microARN au cours du développement n'est pas connu. Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé une souche de *C. elegans* transgénique portant une copie fonctionnelle extrachromosmique de la *gfp* fusionnée à *alg-1*, sous le contrôle du promoteur endogène et de la région 3' non-codante de *alg-1* (Hutvagner et al., 2004). Pour la sélection des vers transgéniques, la caractéristique thermosensible pour le gène *pha-1*(*e2123ts*) est utilisée. Cette souche mutante thermosensible, à la température non-permissive de 25°C, présente un défaut du pharynx conduisant à la mort des vers en stade L1 (Schnabel and Schnabel, 1990). L'ajout d'une copie fonctionnelle de *pha-1* dans cette souche, en combinaison avec *gfp::alg-1*, permet aux animaux transgéniques de survivre à 25°C. En effet, lors de l'injection simultanée de deux plasmides pour la génération d'animaux transgéniques, les deux plasmides co-ségrégent (Mello et al., 1991). Ainsi, puisque seuls les animaux transgéniques *pha-1*(*e2123ts*) portant les copies fonctionnelles de *pha-1* et *gfp::alg-1* peuvent survivre à 25°C, toute la population de vers croissant à cette température est transgénique. Donc, afin d'isoler les microARN associés à ALG-1, des populations de

ces vers ont été récoltées à chacun des stades du développement, puis des extraits protéiques ont été produits. Par la suite, la protéine GFP::ALG-1 a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps monoclonal α -GFP, puis les ARN retrouvés dans le complexe, comprenant les microARN, ont été extraits et hybridés sur une micropuce contenant les microARN connus de *C. elegans* (Figure 3-1).

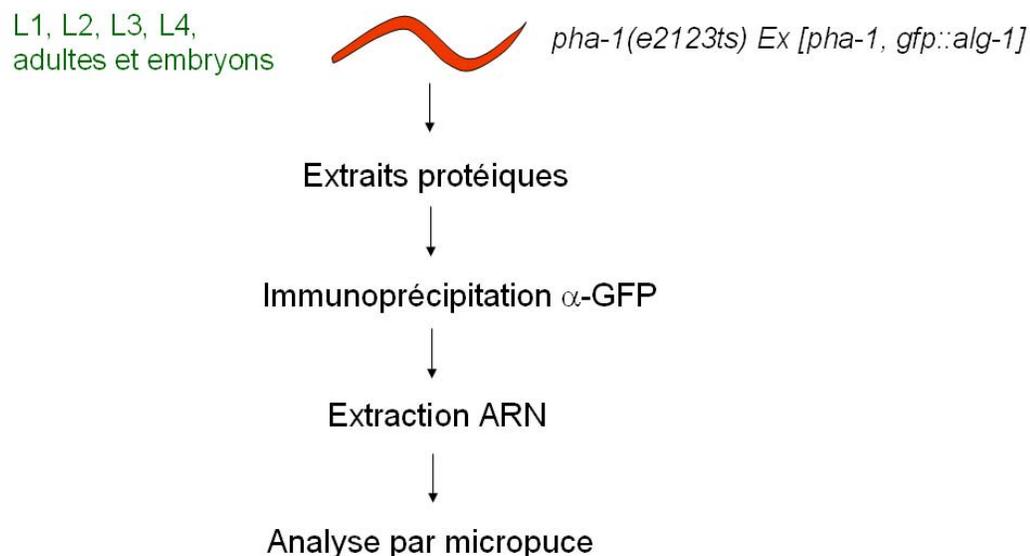


Figure 3-1 : Schéma de l'expérience d'immunoprécipitation pour l'isolation des microARN associés à ALG-1.

Des populations de vers synchronisées sont récoltées pour chacun des stades du développement. Des extraits protéiques sont produits, puis la protéine GFP::ALG-1 est immunoprécipitée à l'aide d'anticorps anti-GFP. L'ARN associé est extrait, puis hybridé sur une micropuce contenant les microARN connus de *C.elegans*.

Afin de récolter des populations de vers à des stades développementaux précis, les vers synchronisés ont été déposés sur pétri en début de stade L1, et laissés à 25°C sur de la nourriture *E.coli* OP50 selon les périodes décrites dans le Tableau 3-I. Une observation visuelle a également été faite avant la récolte, afin de s'assurer que les vers sont au bon stade (Figure 3-2).

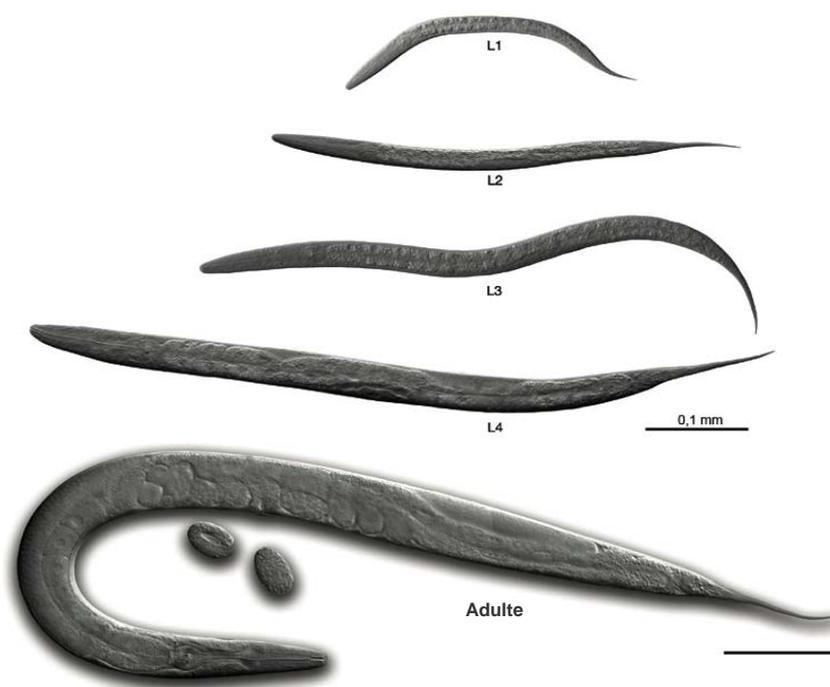


Figure 3-2 : Apparence et taille des vers selon le stade du développement.
Images en DIC de vers à chacun des stades (Figure de Altun and Hall, 2005).

Stade désiré	L1	L2	L3	L4	Jeunes adultes
heures de croissance à 25°C	6	15	23	30	36
Nombre de vers nécessaires (x1000)	1 600	1 000	600	300	150

Tableau 3-I: Temps de croissance à 25°C chez *C. elegans* et quantité de vers nécessaire pour la récolte de populations synchronisées à des stades précis du développement

Les vers synchronisés sont déposés sur pétri au temps 0 alors qu'ils sont au début du stade L1. La synchronisation au stade L1 est obtenue en laissant des embryons éclore en absence de nourriture, stoppant ainsi les larves au stade L1 (voir 3.3.2 pour plus de détails).

3.1 Détermination de la quantité de protéines nécessaire pour l'expérience

Une fois les vers récoltés, des extraits protéiques ont été produits, et la protéine GFP::ALG-1 a été immunoprécipitée. L'ARN associé a été isolé, puis envoyé au collaborateur Dr Eric

Miska pour l'hybridation sur micropuce. Toutefois, avant de procéder à l'expérience chez tous les stades développementaux, nous avons tout d'abord déterminé la quantité d'extrait protéique nécessaire pour détecter les microARN selon la méthode. Nous avons donc fait l'immunoprécipitation de GFP::ALG-1 à partir de 1 mg, 2 mg et 4 mg d'extraits de protéines totales de vers au stade jeune adulte (sans embryons). L'ARN a été isolé, et envoyé pour l'analyse par micropuce. Un contrôle post-immunoprécipitation a été fait par immunobuvardage de type Western sur 10% de l'immunoprécipité afin de vérifier la réussite de l'immunoprécipitation de la protéine GFP::ALG-1 (Figure 3-3).

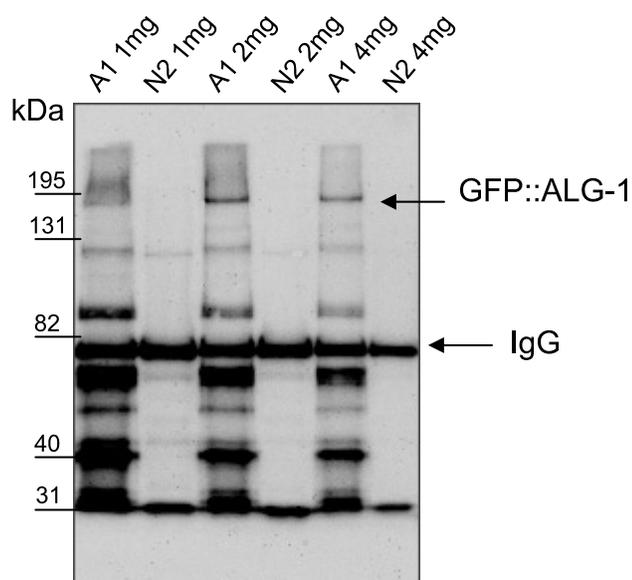


Figure 3-3 : Immunobuvardage de type *Western* de la protéine GFP::ALG-1 après son immunoprécipitation chez les extraits de jeunes adultes.

10% de l'immunoprécipité a été migré sur gel SDS-PAGE 8% acrylamide pour l'immunobuvardage, donc les échantillons représentent 100, 200 et 400µg. A1 représente la souche *pha-1(e2123ts) Ex [pha-1, gfp::alg-1]* alors que N2 est la souche de type sauvage.

La protéine GFP::ALG-1 est détectée par immunobuvardage de type *Western* chez les jeunes adultes pour les trois quantités de protéines utilisées (1 mg, 2 mg et 4 mg), mais n'est pas détectée chez les vers N2, utilisés comme contrôles. Il semble cependant y avoir beaucoup de dégradation de la protéine GFP::ALG-1.

Selon les résultats obtenus de l'hybridation sur micropuce des ARN associés à GFP::ALG-1, nous pouvons remarquer que peu de microARN sont détectés à partir de l'immunoprécipitation dans 1 mg de protéines totales, et que le nombre de microARN détectés va en augmentant avec la plus grande quantité d'extrait utilisée (Figure 3-4). Dans l'extrait de 4 mg, on retrouve pratiquement tous les microARN détectés dans l'extrait total (ARN extrait directement de 500 µg d'extrait protéique, sans immunoprécipitation). Une différence du nombre de microARN détectés se remarque entre l'utilisation de 2 mg ou 4 mg d'extraits, mais une observation attentive des données montre que les microARN n'étant pas retrouvés dans les 2 mg ont en fait un signal très faible pour les 4 mg (voir données Annexe 1). Nous avons aussi fait cette expérience en parallèle avec des vers N2 (type sauvage), n'exprimant donc pas GFP::ALG-1, afin s'assurer que l'anticorps ou les billes utilisées ne lient pas des microARN de façon non-spécifique. Nos résultats ont montré très peu de signal provenant des échantillons N2, la majorité des microARN n'étant pas du tout détectés dans ces échantillons, alors que quelques uns sont détectés, mais avec un signal très faible (voir données Annexe 1). En tenant compte de ces résultats, nous avons décidé de réaliser l'expérience chez tous les stades développementaux avec 3 mg d'extrait protéique total.

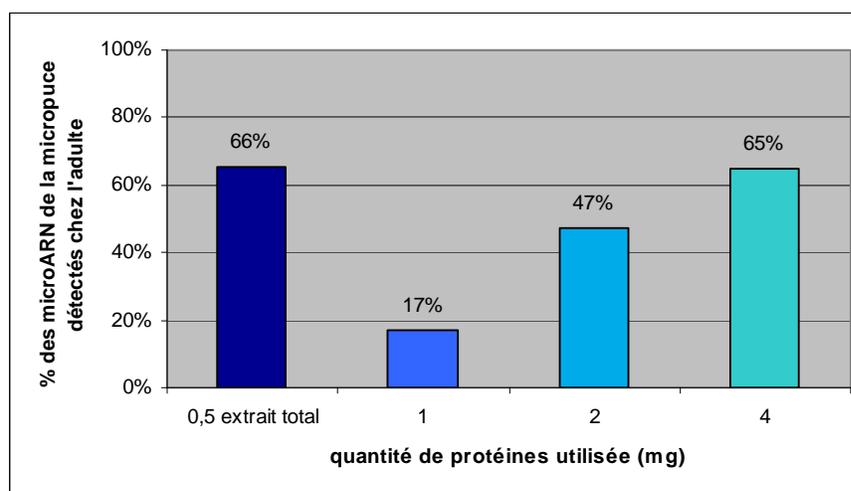


Figure 3-4 : microARN détectés chez les jeunes adultes par l'analyse sur micropuce comportant 116 microARN de *C. elegans*.

Les microARN détectés ont été extraits de la protéine GFP::ALG-1 immunoprécipitée à partir d'extraits protéiques de 1 mg, 2 mg et 4 mg. Les microARN provenant de 0,5 mg d'extrait total non immunoprécipité ont aussi été analysés afin de représenter la population de microARN présents.

3.2 Analyse des microARN associés à la protéine GFP::ALG-1 selon les stades développementaux.

Nous avons donc procédé aux immunoprécipitations de GFP::ALG-1 dans 3 mg d'extraits protéiques de populations de vers pour chacun des stades développementaux. L'ARN associé à GFP::ALG-1 a été extrait, puis analysé sur micropuce contenant 116 microARN de *C. elegans*.

En observant le contrôle d'expression de GFP::ALG-1 par immunobuvardage de type *Western* suite à l'immunoprécipitation, on remarque que, chez les embryons, GFP::ALG-1 n'est aucunement détectée. (Figure 3-5). La protéine est présente chez les autres stades, quoique le signal soit plutôt faible. On note beaucoup de dégradation.

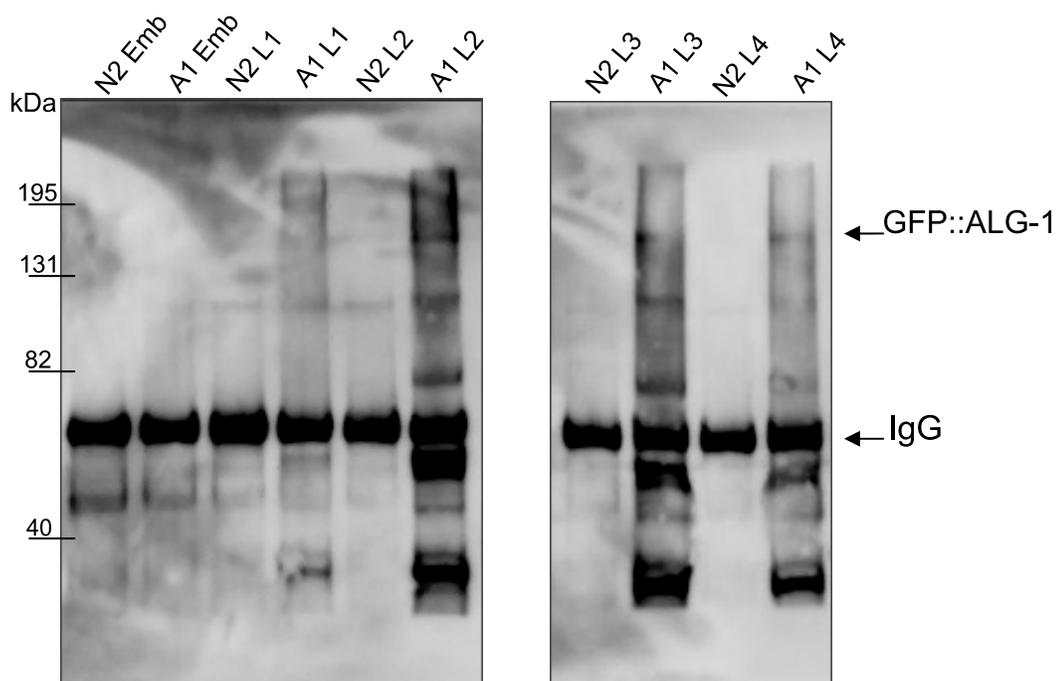


Figure 3-5 : Immunobuvardage de type *Western* de la protéine GFP::ALG-1 immunoprécipitée chez les divers stades développementaux de *C. elegans*.

10% des 3 mg de protéines immunoprécipitées ont été chargés sur gel SDS-PAGE 8% acrylamide. N2 représente la souche de type sauvage, et A1 représente la souche *pha-1(e2123) ex [pha-1, gfp::alg-1]*. Emb représente le stade embryonnaire.

L'étude par micropuce des microARN retrouvés associés à ALG-1 au cours des stades du développement chez *C. elegans* nous a révélé plusieurs informations. Tout d'abord, nous avons déterminé la proportion des 116 microARN de la micropuce qui sont détectés à chacun des stades du développement comme étant associés à ALG-1. On retrouve de 40 à 65% des microARN, dépendamment du stade (Figure 3-6). Concernant les microARN présents dans les extraits totaux par rapport à ceux retrouvés dans l'immunoprécipité, on en retrouve une quantité relativement similaire, excepté au stade L2, où leur nombre est plus élevé. Cette analyse nous donne donc une indication de la proportion de tous les microARN de la micropuce retrouvée à chacun des stades développementaux.

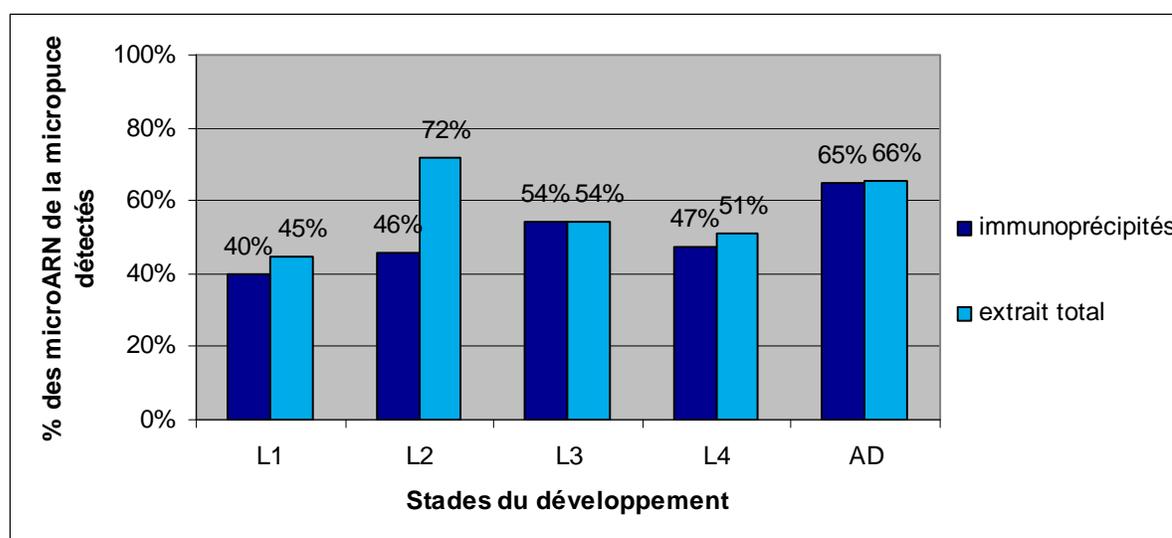


Figure 3-6 : Pourcentage des microARN de la micropuce associés à ALG-1 ou présents dans l'extrait total à chaque stade du développement.

3 mg d'extrait total a été utilisé pour l'immunoprécipitation d'ALG-1, alors que 0,5 mg d'extrait total a été utilisé pour l'isolation des ARN associés. AD représente les jeunes adultes. L'expérience a été réalisée une fois.

Ensuite, nous avons regardé, par rapport aux microARN retrouvés dans l'extrait total (sans immunoprécipitation), ceux qui ont été immunoprécipités avec GFP::ALG-1. Cela nous donne donc une indication, parmi les microARN détectés à ce stade, de combien sont associés à ALG-1. On remarque qu'aux stades L3, L4 et adulte, les microARN détectés sont pratiquement tous associés à ALG-1, alors que cette proportion est moindre aux stades plus précoces L1 et principalement L2 (Figure 3-7).

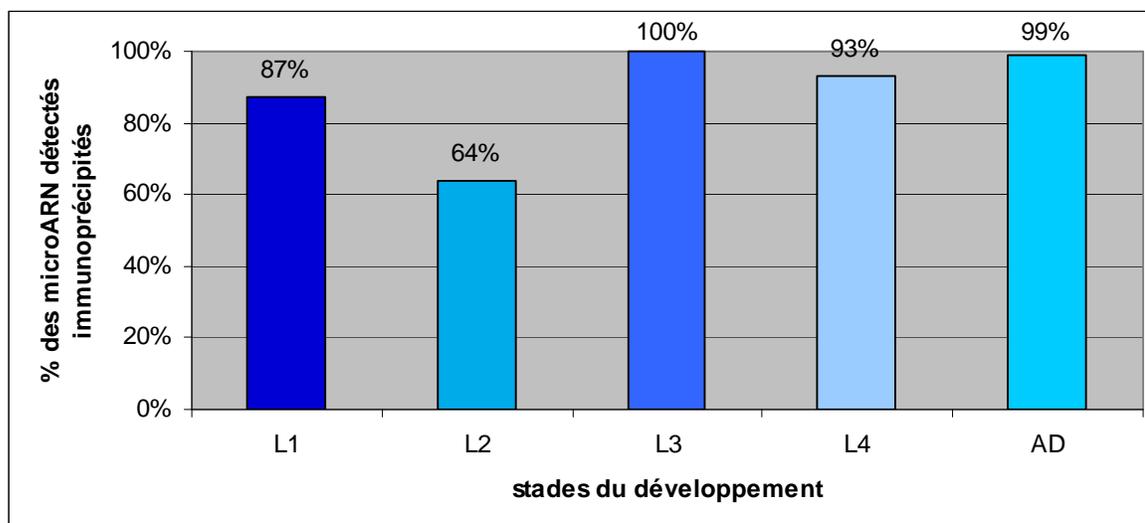


Figure 3-7: MicroARN associés à ALG-1 par rapport aux microARN détectés dans l'extrait total pour chacun des stades.

3 mg d'extrait total ont été utilisés pour l'immunoprécipitation d'ALG-1 et l'isolation des ARN associés, et 0,5 mg d'extrait total ont été utilisés pour l'isolation des ARN. AD représente les jeunes adultes.

Par la suite, nous avons observé la quantité de microARN détectés, tous stades confondus, avant et après l'immunoprécipitation. Les microARN qui étaient détectés avant l'immunoprécipitation (extrait total), mais non après, ne sont probablement pas associés à ALG-1, mais pourraient l'être à une autre protéine Argonaute, comme ALG-2. Les données ont révélé que 69% des 116 microARN sont détectés après l'immunoprécipitation, que 12% sont détectés uniquement dans l'extrait total mais n'ont pas été immunoprécipités, et que 19% ne sont détectés dans aucun des stades (Figure 3-8).

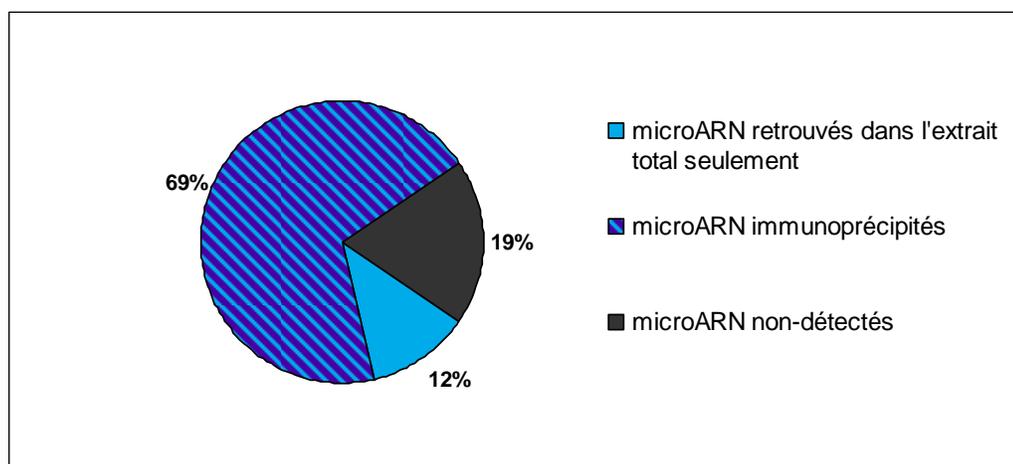


Figure 3-8: Fraction des microARN totaux détectés dans l'immunoprécipitation et dans l'extrait total (sans immunoprécipitation).

De plus, nous avons analysé l'expression de chacun des microARN selon le stade, et nous avons observé que l'expression de certains microARN est spécifique à un ou quelques stades en particulier (19%), alors que d'autres ont une expression répartie sur tous les stades (62%) (Figure 3-9). Il y a donc 22 microARN qui, selon nos données, semblent spécifiques à certains stades en particulier. Une liste de ces microARN est donnée au Tableau 3-II.

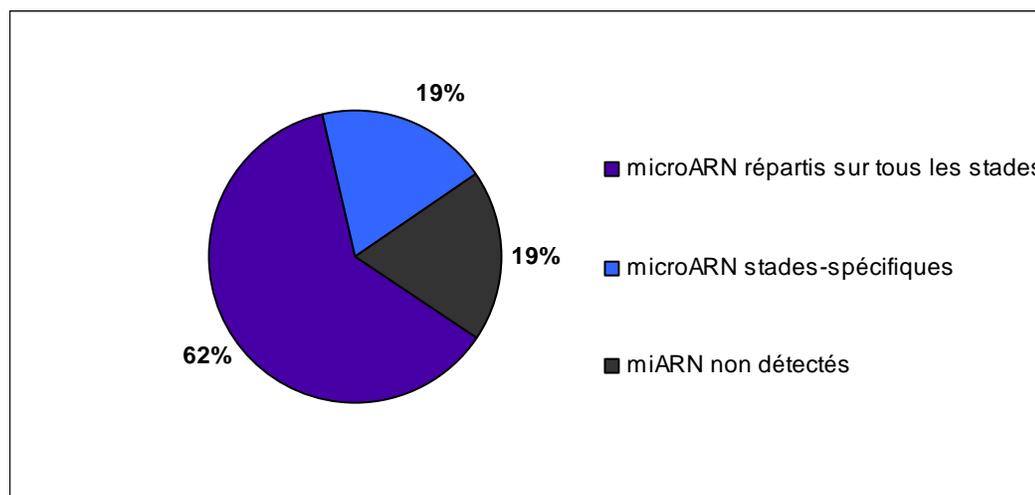


Figure 3-9: Répartition des microARN totaux selon leur profil d'expression au cours des stades développementaux.

microARN	stade d'expression	microARN	stade d'expression
miR-41	L2	miR-76	AD
miR-46	L2	miR-87	L2
miR-53	AD	miR-235	AD
miR-56	L2	miR-237	L3
miR-61	L2	miR-238	AD
miR-63	L2	miR-246	L2
miR-64	L2	miR-257	L3, L4, AD
miR-66	AD	miR-260	AD
miR-73	L1	miR-262	L2
miR-74	L3, L4, AD	miR-265	L2
miR-75	L2	miR-273	L2

Tableau 3-II: MicroARN dont l'expression est spécifique à certains stades du développement.

3.3 Matériels et méthodes

3.3.1 Souches de *C. elegans*

Les souches utilisées pour cette expérience sont les souches N2 (type sauvage) et *pha-1(e2123ts) Ex [pha-1, gfp::alg-1]* (Hutvagner et al., 2004). Les souches sont maintenues à 25°C afin de maintenir la copie extrachromosomique chez toute la population, puisque la mutation *pha-1(e2123ts)* est thermosensible à 25°C.

3.3.2 Synchronisation des animaux

Les souches N2 et *pha-1(e2123) Ex[pha-1, gfp::alg-1]* ont été synchronisées afin d'obtenir des populations de vers au même stade. 15 ml de la solution M9 (22mM KH₂PO₄, 42mM Na₂HPO₄, 86mM NaCl, 1mM MgSO₄) est déposée sur un pétri contenant une grande quantité de vers adultes (environ 150 000) porteurs d'embryons. La solution est ensuite centrifugée à 2800 rpm pendant 30 secondes, et le surnageant est jeté, conservant ainsi un culot de vers. 10 ml de la solution de synchronisation (20% hypochlorite de sodium, 500mM KOH) est ajoutée aux vers et le tout est agité vigoureusement pendant environ 2 minutes. La solution est centrifugée, le surnageant jeté, et un nouveau 10ml de solution de synchronisation est ajouté aux vers. Le tout est agité jusqu'à la dissolution complète des corps adultes. La solution est centrifugée et les vers sont rincés 4 fois avec la solution M9. Le culot lavé est resuspendu dans 10 ml de M9, et on le laisse pour 24h à la température de 25°C avec agitation. Les œufs, ayant survécu au traitement, éclosent durant

les 24h d'incubation et les larves seront bloquées au stade L1 puisqu'elles sont en absence de nourriture.

3.3.3 Extraction protéique

Les animaux synchronisés sont ensuite comptés, en utilisant 1 μ l des 10 ml de la suspension de larves déposé sur lame de microscope. La moyenne de 3 comptes est ensuite multipliée par 10 000 afin d'obtenir le nombre total d'animaux dans le tube. Les animaux sont ensuite déposés sur pétris (150mm) en présence de nourriture *E.coli* OP50, et laissés pour croître selon les temps indiqués au Tableau 3-I (page 33), selon le stade désiré. Chaque pétri peut contenir environ 150 000 adultes, 200 000 L4, 250 000 L3, 300 000 L2 et 400 000 L1. Les vers sont ensuite récoltés et resuspendus dans le tampon de lyse froid (100mM acétate de potassium, 30mM HEPES-KOH pH 7.4, 2mM acétate de magnésium, 1mM DTT, 0,5% Triton X-100, 2% SUPERaseIn (Ambion), le tout additionné d'une tablette d'inhibiteurs de protéases *Mini Complete protease Inhibitor Cocktail* (Roche) par 5ml de tampon de lyse) et sont broyés manuellement avec un piston de type *Dounce*. L'extrait est ensuite centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 min à 4°C et le surnageant est conservé. Le surnageant est dosé pour la quantité de protéines selon la méthode Lowry (*DC Protein Assay kit* (Bio-Rad)). Les extraits protéiques sont aliquotés en échantillons de 2 mg de protéines et conservés à -80°C.

3.3.4 Immunoprécipitation

30 μ l de billes protéine G agarose (Roche) sont ajoutées à 3 mg d'extrait protéique et le tout est incubé 1h à 4°C sur un agitateur rotatif. Le surnageant est récupéré et incubé avec 6 μ g d'anticorps monoclonal Anti-AFP (QBiogene) pour 1h à 4°C. L'anticorps Anti-AFP reconnaît GFP et BFP, ainsi que leurs variantes. 30 μ l de billes protéine G agarose sont ajoutées à la solution et le tout est incubé 1h à 4°C. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec le tampon de lyse froid. 10% des billes sont resuspendues dans du tampon Laemmli 2X, bouillies 5 minutes, centrifugées, puis le surnageant est déposé sur gel SDS-PAGE à une concentration de 8%. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane Hybond-P (GE/Amersham) pour l'immunobuvardage de type *Western*. La protéine GFP::ALG-1 est révélée par l'utilisation de l'anticorps monoclonal Anti-GFP (1 :1000; Roche) et de

l'anticorps secondaire Anti-souris conjugué à la peroxydase (1 :5000; Cedarlane laboratories).

3.3.5 Extraction de l'ARN

Un volume du tampon de protéinase K (50mM EDTA, 3% SDS) est ajouté à l'échantillon, ainsi que 20µg de glycogène et 50µg de protéinase K. Le tout est incubé à 65°C pendant 15 minutes. On ajoute ensuite 200µl de phénol-chloroforme, on vortexe la solution durant 30 secondes et on centrifuge durant 5 min à vitesse maximale. La phase aqueuse est isolée, et l'ARN contenu est précipité avec 500 µl d'éthanol 100% froid, puis la solution est placée à -20 °C pour au moins 1h. L'ARN est ensuite centrifugé, et le culot lavé à l'éthanol 70%. Les échantillons d'ARN ont été conservés dans l'éthanol.

3.3.6 Analyse par micropuce

La méthode d'analyse du profil d'expression des microARN par micropuce a été réalisée telle que décrite précédemment (Miska et al., 2004). Brièvement, les échantillons conservés dans l'éthanol ont été centrifugés à 4°C, 12 000g pour 15 minutes. 5µg de chacun des échantillons d'ARN ont été chargés sur un gel de polyacrylamide à 15%. Une section de gel correspondant aux courts ARN de 18 et 26 nucléotides a été coupée, et placée dans la solution d'éluion (0,3M NaCl) à 4°C pour la nuit. L'ARN a été précipité à l'éthanol avec l'utilisation de 20µg de glycogène. Les échantillons ont été centrifugés à 4°C, 12 000g pour 30 minutes et lavés à l'éthanol 80%. Les culots d'ARN ont été resuspendus dans 15µl de mélange de ligation (tampon ligation 3X, 200 µM 3' pCU-Cy3, 100 mM DTT, 10 mM ATP, T4 ARN ligase) pour le marquage et incubés à 30°C pour 2 heures. Les micropuces sont bloquées dans la solution de blocage (50mM ethanolamine, 0,1M Tris pH 8.8/9, 0.1% SDS) à 48°C pour 5 minutes, rincées, puis asséchées. 60µl de solution d'hybridation (5X SSC/0.1% SDS, 0.6µl ADN de sperme de saumon) ont été ajoutés aux échantillons et le tout est chauffé à 80°C pour 5 minutes. 35µl d'échantillon a été utilisé pour l'hybridation, et les micropuces ont été incubées dans un bain d'eau à 48°C pour 10-12 minutes. Les micropuces ont ensuite été rincées avec du SSC 4X, lavées deux fois dans le SSC 2X/0.1% SDS à 48°C pour 5 minutes, puis lavées avec du SSC 0,2X à la température de la pièce pour 1 minute. Finalement, les micropuces ont été asséchées et lues à 532nm. Les données d'expression ont été log-transformées, *gene-centered (mean)*, et normalisées.

4 Criblage génétique pour l'identification de nouvelles composantes de la voie des microARN

4.1 La stratégie de criblage

À ce jour, le mécanisme d'inhibition de la synthèse protéique par les microARN est mal compris, de même que l'implication des protéines Argonautes ALG-1 et ALG-2 dans cette voie métabolique. Puisque ces protéines Argonautes jouent un rôle central dans la voie des microARN, nous nous sommes intéressés à l'identification de nouveaux facteurs interagissant avec ces protéines. Nous avons donc conçu un criblage génétique basé sur la caractéristique de létalité synthétique des gènes *alg-1* et *alg-2*. En effet, lorsque les deux gènes sont mutés simultanément, l'animal ne peut survivre (Grishok et al., 2001). Toutefois, tel que mentionné précédemment, lorsque le gène *alg-2* seul est muté, le ver se comporte comme un animal de type sauvage, alors que lorsque le gène *alg-1* est muté, l'animal présente des phénotypes hétérochroniques atténués. En utilisant le mutant *alg-2(ok304)*, nous désirons identifier des gènes qui, lorsque mutés, présentent une létalité synthétique avec *alg-2*, comme le fait *alg-1*. Nous espérons ainsi découvrir de nouveaux interacteurs génétiques d'*alg-2*. Pour ce faire, nous avons basé notre criblage sur celui conduit par Fay et collaborateurs qui a mené à l'identification de gènes interagissant avec *lin-35/Rb* (Fay et al., 2002). Pour notre criblage, nous utilisons une souche de *C. elegans* ayant sa copie génomique du gène *alg-2* délétée et transportant une copie extrachromosomique contenant à la fois le gène *alg-2* fonctionnel et la *gfp* sous le contrôle du promoteur *sur-5* (Figure 4-1). Puisqu'il a été démontré que les plasmides co-injectés dans le ver pour former une lignée transgénique co-ségrégent ensemble (Mello et al., 1991), les copies de *alg-2* et *sur-5::gfp* co-ségrégent.

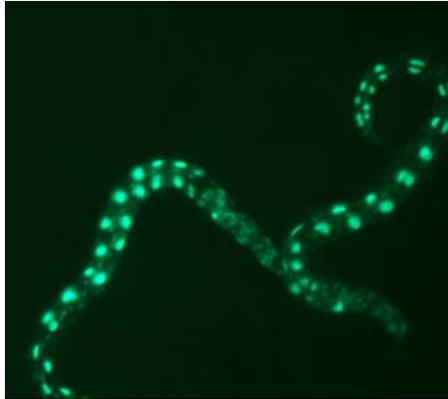


Figure 4-1: *C. elegans* exprimant *sur-5::gfp*

Lorsque la copie extrachromosomique est présente chez l'animal, on observe une forte expression de la *gfp*, témoignant ainsi de la présence du gène *alg-2* fonctionnel. Cette copie étant extrachromosomique, elle est transmise de façon non-mendélienne à la descendance, et donc environ 50% des individus perdent la copie à chaque génération. La génération de mutations synthétiques létales avec *alg-2* conduira donc à la nécessité pour l'animal de posséder la copie fonctionnelle extrachromosomique d'*alg-2* pour survivre, et par l'expression de la GFP, il sera facile d'identifier ces animaux. En effet, l'inhibition de *alg-1* par RNAi sur cette souche a donné des animaux entièrement GFP positifs (Martin Simard, données non montrées). Ainsi, suite à la mutagenèse, les vers ayant acquis une mutation synthétique létale avec *alg-2* ne ségrégeront que des vers GFP positifs, alors que ceux n'ayant pas de mutation synthétique létale pourront perdre la GFP (Figure 4-2). Les candidats nous intéressant sont donc évidemment ceux qui conservent l'expression de la GFP.

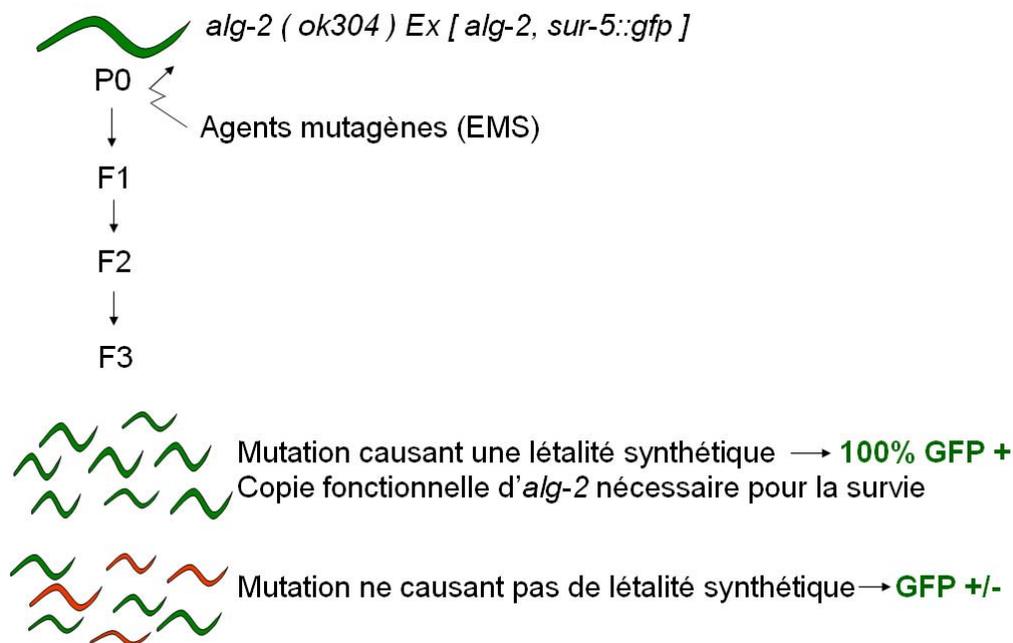


Figure 4-2: Schéma de la stratégie du criblage génétique synthétique létal avec *alg-2*.

Les animaux ont donc été mutagénisés au EMS (éthylméthanesulfonate), agent mutagène causant principalement des transitions G/C-A/T, mais aussi quelques courtes délétions et autres réarrangements chromosomiques (Riddle et al., 1997). Les animaux ont été mutagénisés en P₀ (lignée parentale), et 1000 F₁ exprimant la GFP (GFP positifs) ont été isolés. Les F₁ sont hétérozygotes pour la mutation, ayant reçu un seul gamète mutagénisé de leur mère, qui est hermaphrodite et se reproduit par auto-fertilisation. Dans le cas d'une mutation récessive, les F₂ peuvent être homozygotes pour la mutation (1/4 de ceux-ci), donc quatre F₂ GFP positifs par F₁ ont été isolés. On observe ensuite la population de F₃ se développant sur ses pétris des F₂, et on conserve ceux qui ont une population entièrement GFP positive (Figure 21). Ainsi, à partir des 1000 F₁, nous avons pu isoler des F₂ de 730 F₁, et à la fin nous avons observé la génération F₃ de 1556 F₂ pour identifier celle où la population est 100% GFP positive. Ceux qui n'ont pas pu être observés présentaient des phénotypes de létalité, de stérilité ou des problèmes de croissance. Nous avons finalement identifié 11 candidats ayant une génération F₃ entièrement GFP positive.

alg-2 (ok304) ex [alg-2, sur-5::gfp]

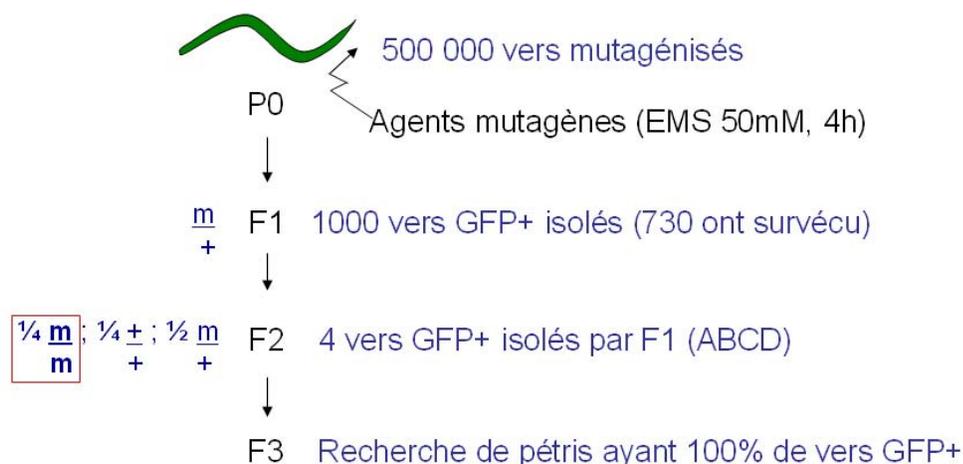


Figure 4-3: Détails de la réalisation du criblage génétique.

Les vers ont été mutagénisés au EMS en P0, puis 1000 F1 GFP+ ont été isolés. 4 F2 ont été isolés par F1 (1/4 seront homozygotes mutants) et la population F3 a été observée pour l'expression de la GFP chez tous les individus.

4.2 Caractérisation des mutants

Les 11 candidats obtenus ont tout d'abord été isolés et caractérisés (

Tableau 4-I). Certains candidats présentent des phénotypes répertoriés chez *C. elegans*, comme la paralysie ou les mouvements non coordonnés (*uncoordinated*), le mouvement de rotation sur eux-mêmes (*roller*), une haute incidence de mâles (*high incidence of males*), une incapacité à pondre (*egg laying defect*) ou une morphologie modifiée, comme des vers plus courts et larges (*dumpy*). Certains présentent aussi de la thermosensibilité; à 15°C ils sont en santé, alors qu'à la température de 25°C, ils deviennent stériles et meurent. De plus, puisque certaines protéines, comme Dicer, sont communes à la fois aux voies des microARN et de l'interférence à l'ARN (RNAi) (Hutvagner et al., 2001), nous avons vérifié si les candidats présentaient aussi de la résistance au RNAi. Les vers ont donc été nourris avec des bactéries produisant de l'ARN double brin ciblant le gène *let-2*, qui, lorsque inhibé, cause la mort des vers par un éclatement par la vulve. Trois candidats parmi les 11 ont montré une résistance au RNAi. Il reste cependant à déterminer si ces phénotypes sont liés ou non à la mutation synthétique létale avec *alg-2*.

candidats	phénotypes observés	thermosensibilité	Résistance à l'interférence à l'ARN
43-B			
43-D			
48-A	unc		
164-A	malade	x	
164-D	malade	x	
175-D	him		x
189-A			x
226-C	unc, dpy, rol, egl		
515-B			x
593-A			
727-D	unc, malade	x	

Tableau 4-I: Phénotypes observés chez les 11 candidats obtenus du criblage génétique synthétique létal.

Unc (*uncoordinated*), Him (*high incidence of males*), Dpy (*dumpy*), Rol (*roller*), Egl (*egg laying defect*), malade: défaut de croissance, de motricité, meurt sur le pétri.

4.3 Test de complémentation

Avant de procéder à la cartographie génétique des candidats pour identifier les gènes mutés par leur position sur le chromosome, nous avons effectué un test de complémentation, dont le but est de vérifier si certains candidats pourraient porter la même mutation, ayant le même gène muté. Chez *C. elegans*, le génome est organisé en 6 chromosomes : 5 autosomes et le chromosome X. Les hermaphrodites sont diploïdes pour les six chromosomes, alors que les mâles sont diploïdes pour les autosomes, mais haploïdes pour le chromosome X. Les hermaphrodites se reproduisent généralement par auto-fertilisation, sauf lorsqu'elles sont fécondées par un mâle. Les mâles sont peu fréquents chez les vers de type sauvage (0,02%). Pour effectuer le test de complémentation, il suffit de croiser deux candidats entre eux, un mâle avec une hermaphrodite, et d'observer si leur descendance se complémente. Si les gènes mutés sont différents chez les deux candidats croisés, chacun sera en mesure de fournir une copie fonctionnelle du gène muté chez l'autre candidat, ce qui produira une descendance hétérozygote pour les deux mutations, et ces animaux pourront perdre l'expression de la GFP. À l'inverse, si les deux candidats ont le même gène muté, la descendance sera nécessairement GFP positive, puisqu'ayant conservé la mutation, la copie extrachromosomique est nécessaire à sa survie (Figure 4-4). Ainsi, des candidats ayant des gènes mutés différents peuvent se compléter, alors que ceux étant mutés sur

le même gène ne le peuvent pas. Nos tests de complémentation ont permis de classer les 11 candidats en 5 groupes distincts (Tableau 4-II et

Tableau 4-III).

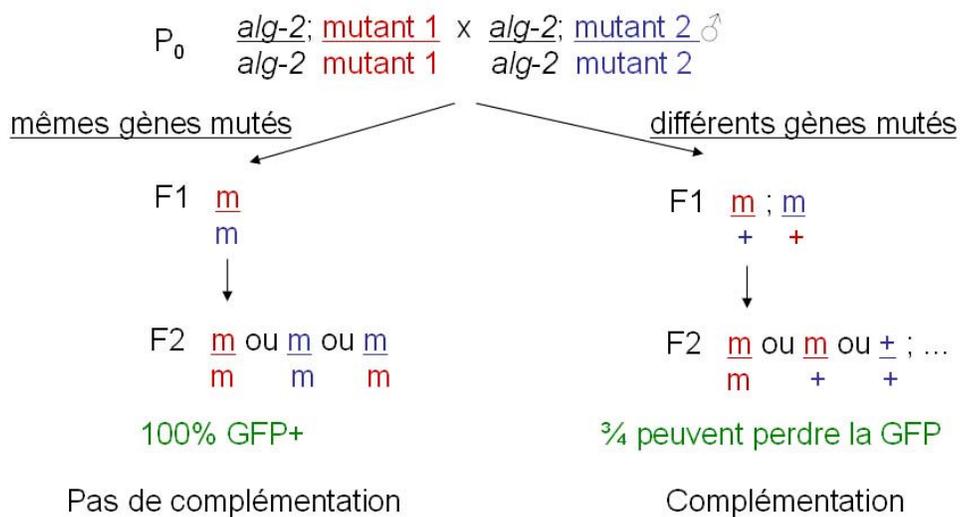


Figure 4-4: Schéma du croisement pour les tests de complémentation.

Si les gènes mutés sont les mêmes chez les deux mutants croisés, les générations suivantes seront toujours homozygotes mutantes et conserveront l'expression de la GFP. Cependant, si les deux gènes mutés sont différents entre les deux mutants croisés, chacun pourra fournir une copie fonctionnelle du gène muté chez l'autre parent. Ainsi, la génération suivante est hétérozygote, et peut perdre la GFP. La mutation *alg-2* n'est pas illustrée dans les génotypes des F1 et F2 afin d'alléger l'illustration.

43-B		-	+	+	+	+	+	+	-	+	(+)
43-D	-		+	+	+	+	+	+	-	+	(+)
48-A	+	+		+	+	+	+	+	+	-	+
164-A	+	+	+		-	(+)	-	(+)	+	+	-
164-D	+	+	+	-		(+)	-	(+)	+	+	(-)
175-D	+	+	+	(+)	(+)		+	(+)	+	+	+
189-A	+	+	+	-	-	+		+	+	+	-
226-C	+	+	+	(+)	(+)	(+)	+		+	+	(+)
515-B	-	-	+	+	+	+	+	+		+	+
593-A	+	+	-	+	+	+	+	+	+		+
727-D	(+)	(+)	+	-	(-)	+	-	(+)	+	+	
	43-B	43-D	48-A	164-A	164-D	175-D	189-A	226-C	515-B	593-A	727-D

Tableau 4-II: Tests de complémentation entre les 11 candidats.

Les « + » signifient que les deux candidats se complémentent, alors que les « - » signifient que les candidats ne se complémentent pas. Les résultats entre parenthèses sont déduits à partir des tests de complémentation avec les candidats faisant partie du même groupe de complémentation.

Afin de vérifier si les gènes mutés seraient des gènes déjà connus comme interagissant génétiquement avec *alg-2*, tels que *alg-1* (Grishok et al., 2001), *sex-1*, *sdc-2* ou ZK262.8 (Tops et al., 2006), et sachant que trois gènes sur les quatre (*alg-1*, *sex-1* et *sdc-2*) sont situés sur le chromosome X, nous avons effectué un test génétique. Ce test exploite l'haploïdie des mâles pour le chromosome X. Nous avons croisé les hermaphrodites mutantes avec des mâles *alg-2* et observé la descendance. Si la mutation est située sur le chromosome X, les descendants mâles seront nécessairement mutants, puisque les mâles n'ont qu'un seul chromosome X, provenant de leur mère. Si, au contraire, la mutation n'est pas sur X, les mâles seront hétérozygotes pour la mutation. En croisant donc de nouveau les mâles obtenus avec l'hermaphrodite mutant, si la mutation est sur le chromosome X, tous les descendants seront mutants et conserveront la GFP. Si la mutation n'est pas sur le chromosome X, seulement $\frac{1}{4}$ des descendants seront mutants, donc le $\frac{3}{4}$ des descendants pourront perdre la GFP (Tableau 4-IV, Figure 4-5).

groupe 1	groupe 2	groupe 3	groupe 4	groupe 5
43-D	593-A	727-D	175-D	226-C
43-B	48-A	164-A		
515-B		164-D		
		189-A		

Tableau 4-III: Groupes de complémentation

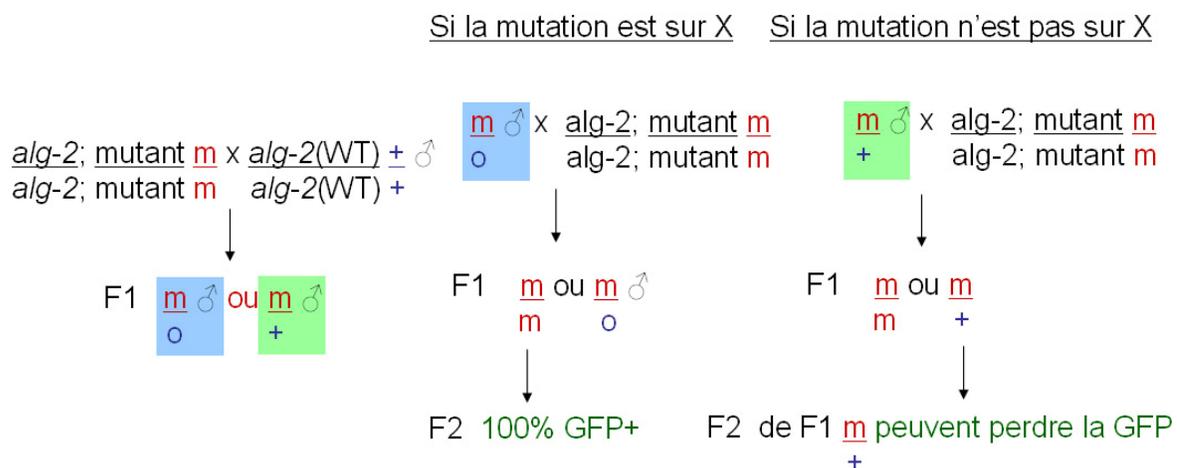


Figure 4-5: Schéma du croisement visant à déterminer si la mutation se situe sur le chromosome X.

En croisant une hermaphrodite mutante avec un mâle *alg-2(ok304)*, si la mutation est sur le chromosome X, les mâles obtenus du croisement seront mutants, alors que si la mutation est sur un autre chromosome, les mâles seront hétérozygotes. En recroisant ces mâles dans une hermaphrodite mutante, les mâles mutants auront une descendance mutante 100% GFP+, alors que les hétérozygotes donneront une descendance en partie hétérozygote, qui pourra perdre l'expression de la GFP. La mutation *alg-2* n'est pas illustrée dans les génotypes des F1 et F2 afin d'alléger l'illustration.

Les groupes de complémentation 2 (593A, 48-A) et 5 (226-C) porteraient leur mutation sur le chromosome X. Pour les groupes 1 (43-B, 43-D, 515-B) et 3 (727-D, 164-A, 164-D, 189-A), cela n'est pas le cas (Tableau 4-IV). Les gènes mutés pour les groupes 1 et 3 ne doivent donc pas être *alg-1*, *sex-1* ni *sdsc-2*, mais il reste toujours la possibilité que ce soit ZK262.8, situé sur le chromosome V. Pour le groupe 4 (175-D), cette information n'a pas été déterminée, cette souche étant Him (haute incidence de mâles), il est difficile de savoir si les hermaphrodites sont fécondées par les mâles, puisqu'elles donnent en tout temps environ 50% de mâles. De plus, les mâles de la souche 175-D sont stériles. En recroisant le

candidat 175-D avec des vers *alg-2(ok304)*, il serait possible de perdre les mutations Him et de stérilité afin de réaliser ce test.

Groupe de complémentation	mutants	Mutation sur X
1	43-B	-
1	43-D	-
1	515-B	-
2	48-A	X
2	593-A	X
3	164-A	-
3	164-D	-
3	189-A	-
3	727-D	-
4	175-D	?
5	226-C	X

Tableau 4-IV: Résultats du croisement déterminant si la mutation est située sur le chromosome X

Les « x » représentent la présence de la mutation sur le chromosome X, les « - » représentent l'absence de mutation sur le chromosome X, et « ? » signifie que l'information est indéterminée pour ce candidat.

4.4 Étude du candidat 189-A

Par sa bonne croissance, la présence de la mutation sur un autre chromosome que le chromosome X et sa résistance au RNAi, nous avons décidé de d'abord caractériser et cartographier le candidat 189-A.

4.4.1 Caractérisation du candidat 189-A

4.4.1.1 Résistance au RNAi

Comme décrit précédemment, le candidat 189-A présente une résistance à l'interférence à l'ARN lorsqu'on le nourrit avec des bactéries produisant de l'ARN double brin ciblant le gène *let-2* (

Tableau 4-I). Afin de vérifier si cette résistance au RNAi est due à la mutation synthétique létale avec *alg-2* ou à une autre mutation générée dans le génome du ver suite à la mutagenèse, nous avons croisé le candidat avec la souche *alg-2(ok304)*, afin d'éliminer des

mutations non-liées. Lors de la méiose, il se produit des événements de recombinaison, ce qui fait que deux mutations peuvent donc être séparées entre elles chez la descendance. Les descendants des croisements sont testés tout d'abord pour la présence de la GFP, témoignant de la présence de la mutation synthétique létale avec *alg-2*, puis sur nourriture ciblant le gène *let-2*. Pour 189-A, 5 croisements successifs ont été nécessaires pour perdre la résistance au RNAi (souche *sla-1 (qbc1)*). Il existe en fait deux types de RNAi : le RNAi germinale et le RNAi somatique (Tijsterman et al., 2002). La protéine Argonaute PPW-1 a été montrée comme essentielle pour le RNAi par nourriture ciblant des gènes exprimés dans la lignée germinale (Tijsterman et al., 2002), alors qu'elle ne l'est pas pour le RNAi ciblant les gènes exprimés dans les cellules somatiques. Puisque la nourriture *let-2* cible à la fois les gènes de la lignée germinale et somatique, nous avons répété le test sur de la nourriture *cdk-1* (germinale, inhibe la *cycline-dependent-kinase 1*, essentielle pour le cycle cellulaire et donc la mitose) et sur la nourriture *unc-22* (somatique, paralyse le ver) (Figure 4-6).

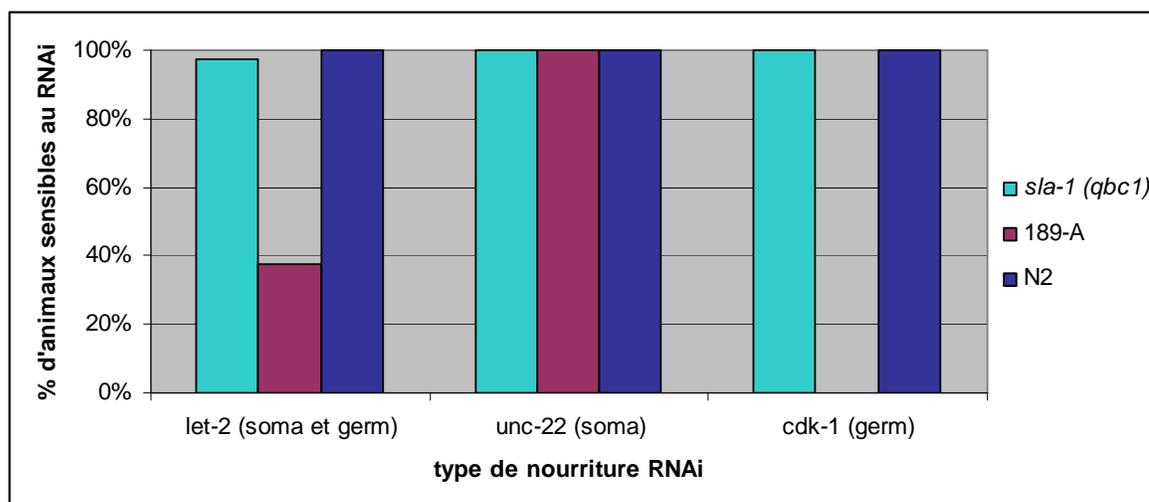


Figure 4-6: Caractérisation de la résistance au RNAi chez le candidat 189-A, et chez *sla-1 (qbc1)*.

Les vers ont été déposés au stade L1 (n=40) sur la nourriture ciblant les gènes *let-2* (RNAi germinale et somatique), *unc-22* (RNAi somatique) et *cdk-1* (RNAi germinale). Les phénotypes sont observés chez les adultes au stéréomicroscope.

Les résultats ont montré que le candidat 189-A était donc sensible au RNAi somatique, mais résistant au RNAi germinale. Une fois le candidat croisé (*sla-1 (qbc1)*), la résistance au

RNAi germinale est perdue, indiquant que cette résistance n'était pas liée à la mutation synthétique létale avec *alg-2*. Les animaux de type sauvage N2 sont sensibles à tous les types de RNAi, montrant que la nourriture RNAi utilisée pour l'expérience fonctionne.

4.4.2 Cartographie génétique de la mutation

Afin de connaître le gène muté et de pouvoir mieux le caractériser, il est nécessaire de déterminer où se situe la mutation générée chez le candidat 189-A. Pour ce faire, nous avons procédé à sa cartographie génétique par analyse des polymorphismes (SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide) ainsi que par analyse en 3 points. Ces techniques exploitent la génétique de *C. elegans*.

En effet, chez *C. elegans*, chacun des 6 chromosomes est d'approximativement 50 unités de mesure appelées *mapping units*, basées sur la fréquence de recombinaison méiotique. Cela signifie que deux points opposés sur un chromosome, séparés par 50 *mapping units*, seront séparés par la recombinaison méiotique 50 fois sur 100. La distance en *mapping units*, distance génétique, diffère donc de la distance physique, puisque la recombinaison ne se fait pas de façon uniforme sur le génome, dû à des points chauds de recombinaison. Le génome de *C. elegans* contient environ 20 000 gènes, répartis sur approximativement 100 Mb, organisées sur les 6 chromosomes de taille variant entre 14Mb et 22Mb. La taille de son génome est donc environ 20 fois supérieure à celui d'*E.coli*, et 30 fois inférieure à celui de l'humain (Riddle et al., 1997).

4.4.2.1 Analyse par polymorphismes (SNP)

Afin d'identifier où la mutation synthétique létale avec *alg-2* se retrouve dans le génome, nous avons d'abord procédé à une analyse SNP. Cette méthode exploite les différences de polymorphismes entre deux souches de *C. elegans* éloignées géographiquement durant une longue période. La souche N2, provenant d'Angleterre, couramment utilisée en laboratoire, a, durant l'évolution, accumulé des mutations différentes de la souche Hawaïenne CB4856 (Wicks et al., 2001). Ces souches présentent plusieurs polymorphismes différents entre elles, et plusieurs de ces polymorphismes créent des sites de restriction différents entre ces deux souches. La technique de cartographie par SNP se base donc sur les polymorphismes entre ces souches ainsi que sur la recombinaison méiotique. Le candidat mutant, de base

N2, est croisé avec un ver de souche Hawaïenne. Des événements de recombinaison méiotique auront lieu, ce qui aura pour effet de « briser » le chromosome et de mélanger les génomes N2 et Hawaïen. On classe ensuite les vers selon leur phénotype mutant (descendance 100% GFP positive) ou non-mutant (mélange de descendants GFP positifs et négatifs). Les candidats intéressants seront les recombinants : ceux qui sont mutants auront conservé un génome de type N2 à l'endroit de la mutation, alors que les non-mutants auront acquis un génome de type Hawaïen à l'endroit de la mutation. Afin de déterminer le caractère N2 ou Hawaïen à un endroit précis, on amplifie la région où se retrouve un polymorphisme par PCR, puis on digère ce PCR avec l'enzyme de restriction appropriée pouvant digérer le polymorphisme N2 ou Hawaïen, selon le cas. Ainsi, si l'enzyme peut digérer le génome N2 mais non l'Hawaïen, le PCR N2 sera coupé en deux fragments, alors que le PCR Hawaïen demeurera entier. Ainsi, il est possible de déterminer, aux sites de polymorphismes, de quel type est le génome de l'animal étudié (exemple Figure 4-7).

A

```
GCTTGGAGAGCATCTATGGCGTCTTTTCGGAATATCAAGTCAGTCACGAA
GTCTTGTGCCAATTCCTTTACCAATCGTTTCAATCTGGATcgaggaatga
gcagttcagtagACTGTTGTTGTTTTTCGGATTTCTCGCAGAGCAACTGTA
CCAGAATGAAAAGGATATGATCGTACTGGCTGAGTGACGATTTGCGGCA
TACTCCCCGAAAGGTTCTTTTTGCCAGCCATTGTTTGGTAGATGTGGTGTG
AAATGGAGAGATTGTAAACCCCTTCTATAGGTGCCAAAGGTGAGTGGGCGT
[A/G]GCTTCGAAGTCAACTGCGGTGAAGGGGGCGTGGTTTCTTACTATT
AGAGAACTGTATCAGACTAACTCCGATAAAgcatagtcagtgaactct
cAACATAGTTAGGAAGAGTTACTCAGATTAAATAAAATCGTCAAAGAACA
ATCAGGCCAATTTCTGGGCTAGGCATAGTTCATAGGCAGAACTTGGTAGAG
GAAATCAGAGTAAAGTAACGATGATTTTAATTTTTTCCGTCTGAAAAAAGA
```

↓
AluI : AGCT
TCGA

B

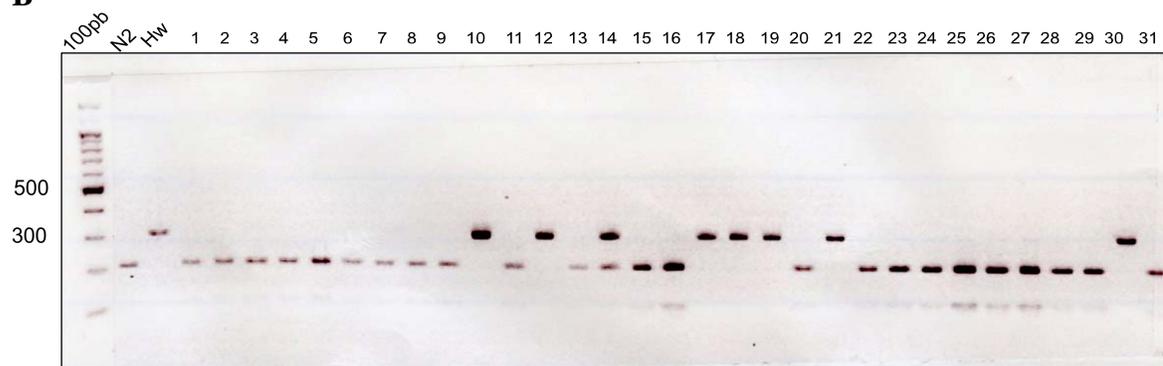


Figure 4-7: Exemple d'analyse SNP à la position 1.2 sur le chromosome V(F20D6).

A) Région comportant le polymorphisme du cosmide F20D6. Le polymorphisme est indiqué en rouge, où A fait partie du génome N2, et G, du génome Hw. L'endroit où les amorces utilisées pour l'amplification de la région polymorphique s'apparient est indiqués

en vert et en bleu. B) Le PCR amplifiant la région polymorphique est ensuite digéré par l'enzyme appropriée. L'enzyme utilisée ici, AluI, digère le polymorphisme N2 (AGCT). Il est donc possible de déterminer le génotype des candidats F2 (numéros de 1 à 31) en comparant avec le patron de digestion des souches N2 et Hw.

Pour la cartographie SNP de 189-A, une hermaphrodite mutante a été croisée avec un mâle de la souche Hawaïenne contenant la mutation *alg-2*. En effet, pour conserver la létalité synthétique et le phénotype GFP+ des mutants, nous devons toujours conserver la mutation *alg-2*. Ces deux souches ont donc été croisées, et les hermaphrodites F1 provenant d'hermaphrodites Po fécondées sont isolées. Nous avons ensuite isolé environ 200 F2, issus d'auto-fécondation des hermaphrodites F1. Nous laissons ensuite les F2 se reproduire par auto-fécondation, et observons les F3 afin de connaître le génotype des F2 : les F3 sont 100% GFP+ si le F2 était homozygote mutant, alors que les F3 seront GFP+ et GFP- si le F2 était hétérozygote ou homozygote non-mutant (Figure 4-8). Un extrait d'ADN génomique est ensuite fait de chacun des F2, et c'est sur cet ADN génomique que seront faits les PCR pour le génotypage.

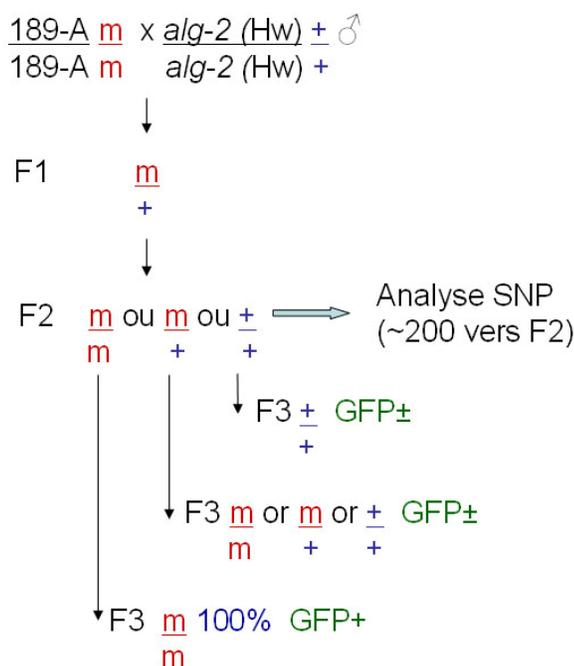


Figure 4-8: Schéma du croisement pour l'analyse SNP de 189-A.

L'analyse SNP initiale faite sur 134 F2 à la position centrale de 1.19 du chromosome V (F20D6) a révélé que 56 mutants sur 58 étaient de génotype N2, alors que 77 non-mutants sur 77 étaient de génotype Hawaïen (Hw) ou hétérozygote (hz) (données non montrées). Cela nous montre que la mutation se situe sur le chromosome V, puisque le génotype des mutants, N2, est effectivement lié aux candidats mutants, et vice-versa.

L'analyse des SNP des F2 sur le chromosome V nous a montré la présence de deux mutations synthétiques létales sur le mutant 189-A, puisque nous avons obtenu des résultats de SNP contradictoires, certains indiquant la mutation sur le bras gauche du chromosome, alors que certains indiquaient à droite (données non montrées). Les deux mutations ont donc été séparées chez les descendants et nous avons poursuivi avec celui dont la mutation se retrouve sur le bras gauche du chromosome V. Nous avons appelé cette souche *sla-1(qbc1)* (*synthetic lethal with alg-2*).

L'analyse de 147 F2 *sla-1(qbc1)* (78 mutants et 53 non-mutants) a révélé la présence de la mutation entre les positions -12.7 (C50H11) et -3.65 (C13D9). En effet, les 3 mutants recombinants obtenus (Tableau 4-V) deviennent de génotype Hawaïen à partir de -3.65 vers la droite, donc la mutation ne peut se situer dans cette région. Le non-mutant 94, lui, est de génotype N2 à partir de -12.7 vers la gauche, ce qui signifie que la mutation n'est pas dans cette région. Puisque ce candidat a perdu la mutation, la mutation devait se trouver dans la portion maintenant devenue hétérozygote ou Hawaïenne de son génome, ce qui porte donc la barrière gauche à -12.7 (Tableau 4-V et Figure 4-9).

phénotype	candidat F2	-18.9	-12.7	-10.7	-7.9	-5.2	-3.65
mutant	1	N2	N2			N2	Hw
mutant	27	hz	N2			N2	Hw
mutant	34	hz	N2			N2	Hw
non-mutant	94	N2	N2	hz	hz		hz

Tableau 4-V: Recombinants obtenus de l'analyse des polymorphismes (SNP).

Les zones en bleu représentent les zones où la mutation ne peut se retrouver, alors que les zones en jaune représentent l'intervalle où la mutation peut se situer. Donc, l'intervalle obtenu où la mutation peut se retrouver est entre -12.7 et -3.75.

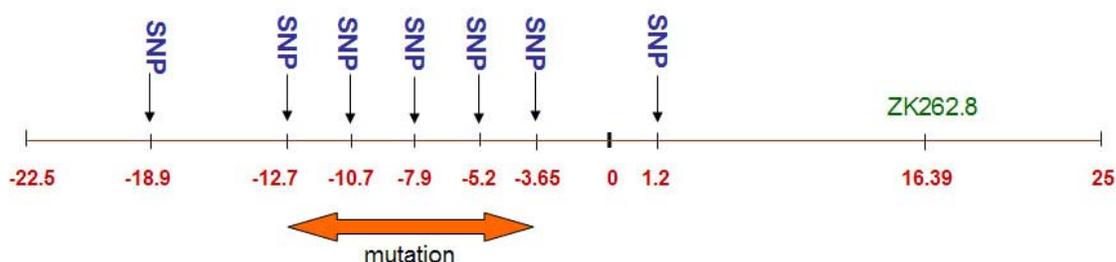


Figure 4-9: Schéma du chromosome V et de l'analyse SNP.

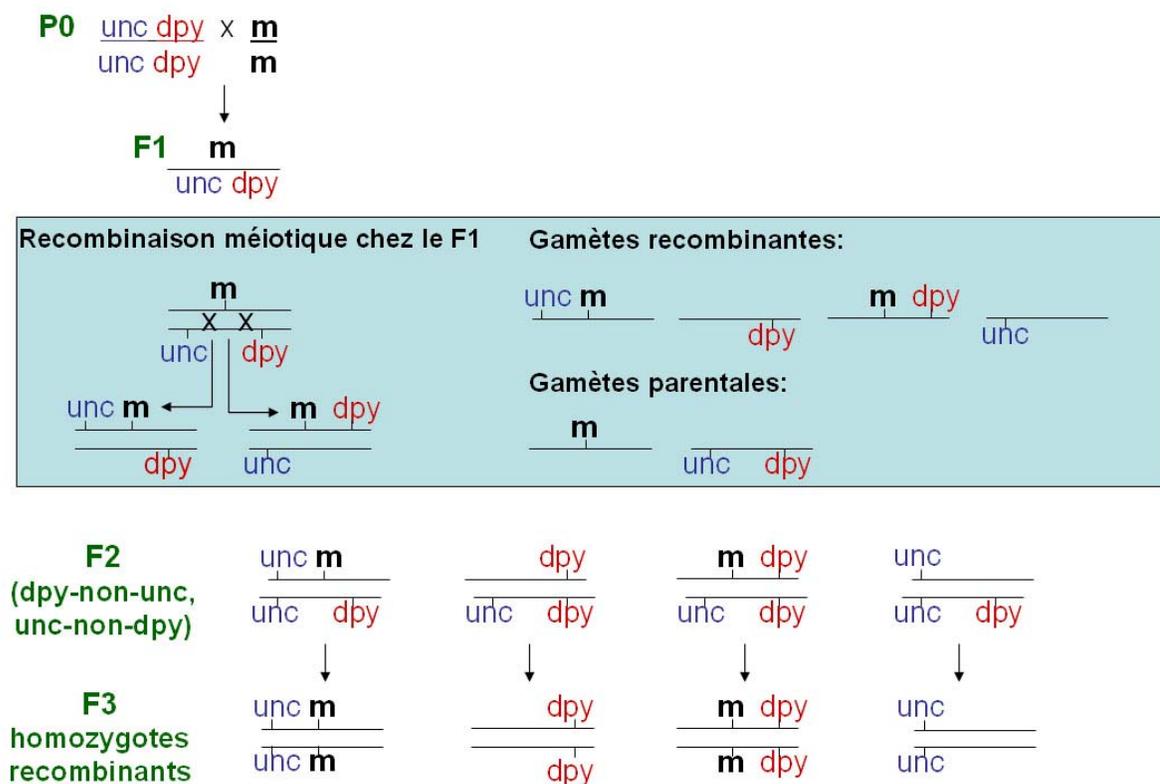
L'intervalle où la mutation peut se trouver est entre -12.7 et -3.65.

4.4.2.2 Analyse en 3 points

En parallèle à la cartographie de la mutation par SNP, nous avons effectué une cartographie en 3 points. Cette méthode se base sur la fréquence de recombinaison entre la mutation et deux marqueurs phénotypiques. Les deux marqueurs doivent être situés de part et d'autre de la mutation. Selon les résultats préliminaires de l'analyse SNP, nous avons choisi le marqueur *Dpy-11* à la position 0, ainsi que le marqueur *Unc-34*, à la position -19.9. Nous avons donc construit la souche *dpy-11(e224) unc-34(e566) V; alg-2(ok304) II*.

Une hermaphrodite de la souche contenant les marqueurs phénotypiques est ensuite croisée avec un mâle mutant (Figure 4-10). Des hermaphrodites F1 GFP+ sont isolées et des F2 sont générés par auto-fécondation. Puisque ce sont les recombinants qui nous intéressent, nous isolons des F2 recombinants de type *Dpy* non-*Unc* et *Unc* non-*Dpy*. Ces derniers sont nécessairement recombinants, puisqu'ils ont perdu le second marqueur phénotypique, démontrant que de la recombinaison méiotique s'est produite avec le mutant entre les deux marqueurs phénotypiques. Ici cependant, les F2 ne peuvent être homozygotes pour la mutation, puisqu'ils auront normalement acquis un seul gamète recombinant. Des F3 seront donc isolés ($\frac{1}{4}$ seront homozygotes recombinants), et on observe la génération F4 pour déceler les homozygotes recombinants (ne possèdent qu'un marqueur phénotypique). Ces pétris F4 homozygotes recombinants sont observés pour l'expression de la GFP : ceux 100% GFP+ sont mutants, alors que les GFP positifs et négatifs ont perdu la mutation. Ainsi, on s'attend à ce que si la mutation est près du marqueur *Dpy* par exemple, très peu de mutants seront *Dpy* non-*Unc*, puisque la fréquence de recombinaison entre *Dpy* et la

mutation serait faible dû à la faible distance. Ainsi, Unc et la mutation apparaîtraient beaucoup plus souvent liés que Dpy et la mutation (Figure 4-11).



Les phénotypes (mutant ou non mutant) sont observés chez les F4 provenant de ces F3

Figure 4-10: Schéma du croisement pour l'analyse en 3 points.

Une hermaphrodite Dpy-Unc est croisée avec un mâle mutant. Des hermaphrodites F1 GFP⁺ sont isolées et des F2 recombinants de type Dpy non-Unc et Unc non-Dpy sont recueillis. Ces derniers sont nécessairement recombinants, puisqu'ils ont perdu le second marqueur phénotypique, démontrant que de la recombinaison méiotique s'est produite avec le mutant entre les deux marqueurs phénotypiques. Les F2 ne peuvent toutefois être homozygotes pour la mutation. Des F3 seront donc isolés (1/4 seront homozygotes recombinants), et on observe la génération F4 pour déceler les homozygotes recombinants. Ceux-ci sont ensuite observés pour la présence de la mutation, par observation de la GFP.

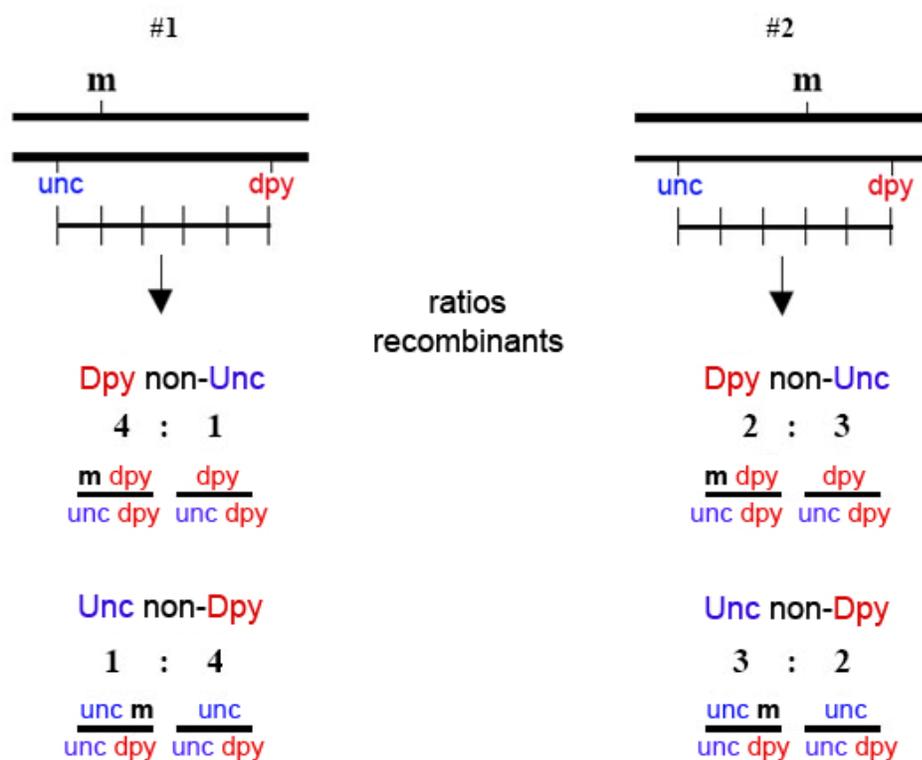


Figure 4-11: Exemple de calcul de distance de la mutation selon le nombre de recombinants obtenus.

Plus il y a de distance génétique entre la mutation et un marqueur, plus fréquemment la mutation et le marqueur seront liés lors de la recombinaison méiotique (Figure modifiée de Fay et al., 2001).

Ainsi, une fois les F3 homozygotes recombinants identifiés, les F4 ont été observés pour connaître le génotype mutant ou non-mutant des F3. Chez les Unc non-Dpy, nous avons identifié 17 mutants et 7 non-mutants. Chez les Dpy non-Unc, nous avons observé 4 mutants et 56 non-mutants (Tableau 4-VI).

Unc non-Dpy		Dpy non-Unc	
mutants	non-mutants	mutants	non-mutants
17	7	4	56
total: 24		total: 60	

Tableau 4-VI: Résultats de l'analyse en 3 points.

Les recombinants Dpy non-Unc et Unc non-Dpy ont été observés pour l'expression de la GFP, afin de déterminer leur caractère mutant ou non mutant.

Selon le résultat des Unc non-Dpy, il y a 17 mutants sur 24 F3, ce qui indique qu'il y a 71% de recombinants, ce qui porte la mutation à 71% de la distance de *unc-34*. 71% de 19.9 (distance entre les marqueurs) donne 14.1 et -19.9 (position de *unc-34*) additionné de 14.1 donne -5.8, soit la position de la mutation selon les résultats des recombinants Unc non-Dpy. Selon le résultat des Dpy non-Unc, il y a 4 mutants sur 60 recombinants, donc 7% de recombinants, ce qui porte la mutation vers -1,3 (Figure 4-12).

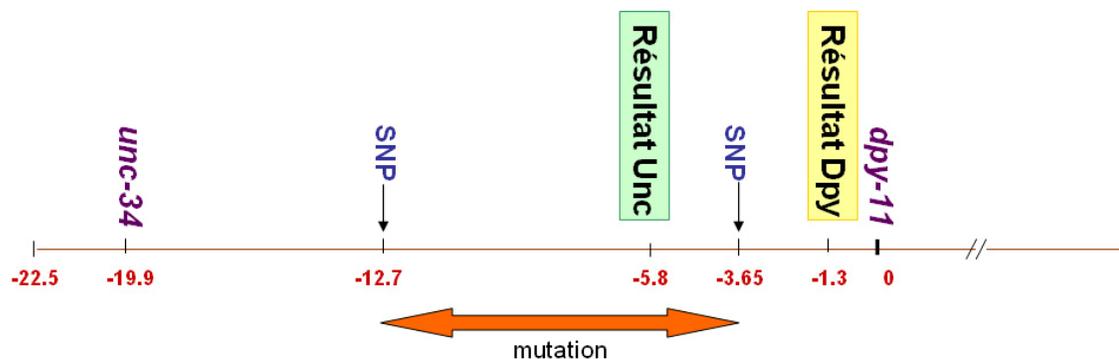


Figure 4-12 : Schéma du chromosome V et de l'analyse en 3 points.

Le résultat obtenu à partir des recombinants Dpy suggère la présence de la mutation vers -1.3, alors que le résultat à partir des recombinants Unc propose la présence de la mutation vers -5.8. L'intervalle obtenu par la cartographie SNP indiquait la présence de la mutation entre -12.7 et -3.65.

Ainsi, l'analyse en 3 points suggère que la mutation se retrouve à -1,3 quand on regarde le résultat pour Dpy, et à -5.8 quand on regarde le résultat pour Unc. Cependant, les barrières obtenues par l'analyse SNP sont toujours de -12.7 à gauche et de -3.65 à droite.

4.4.2.3 Injection de cosmides

En tenant compte des résultats obtenus par l'analyse SNP et l'analyse en 3 points, nous avons décidé de procéder à l'injection de cosmides afin de tenter d'identifier le gène par le rétablissement du phénotype de type sauvage. Les cosmides doivent être injectés dans les gonades de *C. elegans*, afin de générer des descendants transgéniques (Mello et al., 1991). Il est donc attendu que chez un animal transgénique portant le cosmide où se trouve le gène fonctionnel muté chez l'animal, la présence de la copie fonctionnelle du gène *alg-2* liée à la *gfp* ne soit plus essentielle pour sa survie. Ainsi, les animaux transgéniques portant une copie fonctionnelle du gène muté pourront perdre l'expression de la GFP. En tenant compte

de la barrière à gauche obtenue par l'analyse SNP, soit à -3.65, ainsi que de l'analyse en 3 points suggérant la présence de la mutation autour de -1,3 ou de -5,8, nous avons injecté tous les cosmides se situant entre -3,65 et -5,9 (Tableau 4-VII).

groupes d'injection	cosmides /YAC	fonctions associées
A	F54D11	F54D11.4: ARN hélicase
	K11D12	
	T08H10	
B	F39G3	F39G3.3: facteur initiation traduction
	F13A2	
	H22D07	
C	T28F12	
	F26G5	
	K03B4	
D	F32D1	F32D1.9: facteur impliqué maturation extrémités 3' ARNm
	ZC266	
	F37H5	
E	C18G1	C18G1.4 (pgl-3): protéine des corps P
	H23N18	
	C02E7	
F	F41F3	
	C13D9	
	R02F11	
G	T19H12	
H	Y47D7A	
I	Y60C6A	
J	Y61A9LA	

Tableau 4-VII: Cosmides injectés chez le candidat mutant.

Certains cosmides comportaient des gènes donc la fonction aurait pu être reliée aux microARN.

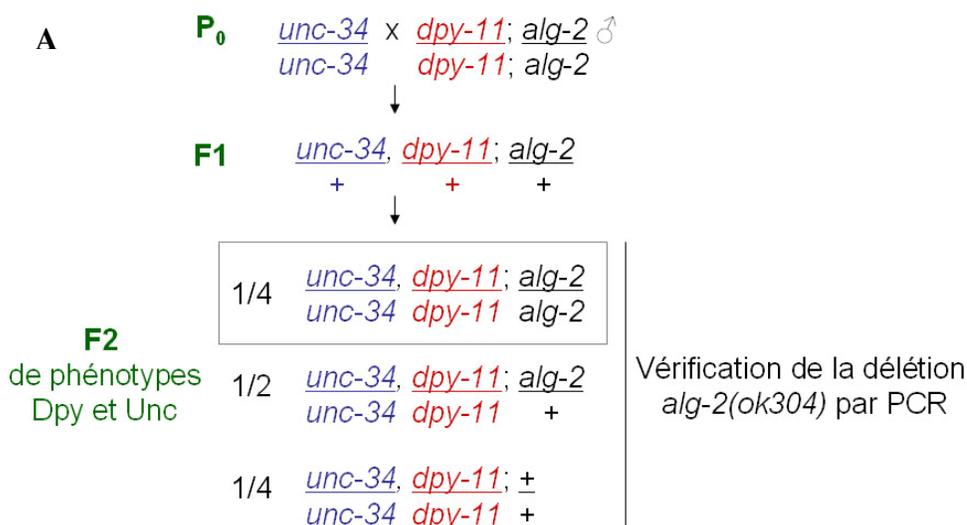
Les cosmides ont été injectés en groupes de 3, ou seuls, en combinaison avec le plasmide pRF4, comportant une mutation dominante du gène *rol-6(su1006)* ayant pour conséquence de donner aux animaux transgéniques un phénotype *roller*, où les animaux tournent sur eux-mêmes (Mello et al., 1991). Les vers Po ont été injectés dans les gonades, puis des F1 *roller* ont été isolés. Les F2 *roller* ont été observés pour la présence ou absence de GFP. Malheureusement, aucune injection n'a rétabli le phénotype de type sauvage, soit la perte

de l'expression de la GFP (données non montrées). Cela suggère donc que la mutation ne se situe probablement pas dans la région dont on a injecté les cosmides.

4.5 Matériels et méthodes

4.5.1 Souches de *C. elegans*

La souche *alg-2(ok304) Ex [gfp::alg-2, sur-5::gfp]* a été générée précédemment dans le laboratoire en co-injectant les constructions *gfp::alg-2* (Hutvagner et al., 2004) et *sur-5::gfp* dans le mutant *alg-2(ok304)*. La GFP visible au microscope à fluorescence est celle sous le contrôle de *sur-5*, la *gfp* associée à *alg-2* n'étant pas visible (données non montrées). La souche Hawaïenne mutante pour *alg-2* utilisée pour l'analyse SNP a été générée par croisements successifs de la souche *alg-2(ok304)* avec la souche Hawaïenne, jusqu'à ce que tous les chromosomes soient de type Hw, excepté la portion comprenant la mutation *alg-2* (souche faite par Isabelle Banville). J'ai généré la souche *dpy-11(e224) unc-34(e566) V; alg-2(ok304) II* à partir des souches *dpy-11(e224) V; alg-2(ok304)II* (faite au laboratoire par Gabriel Bossé) et *unc-34(e566)V*. J'ai croisé ces deux souches et conservé les individus présentant les marqueurs phénotypiques Unc et Dpy, ainsi que la délétion *alg-2(ok304)*, vérifiée par PCR (Figure 4-13).



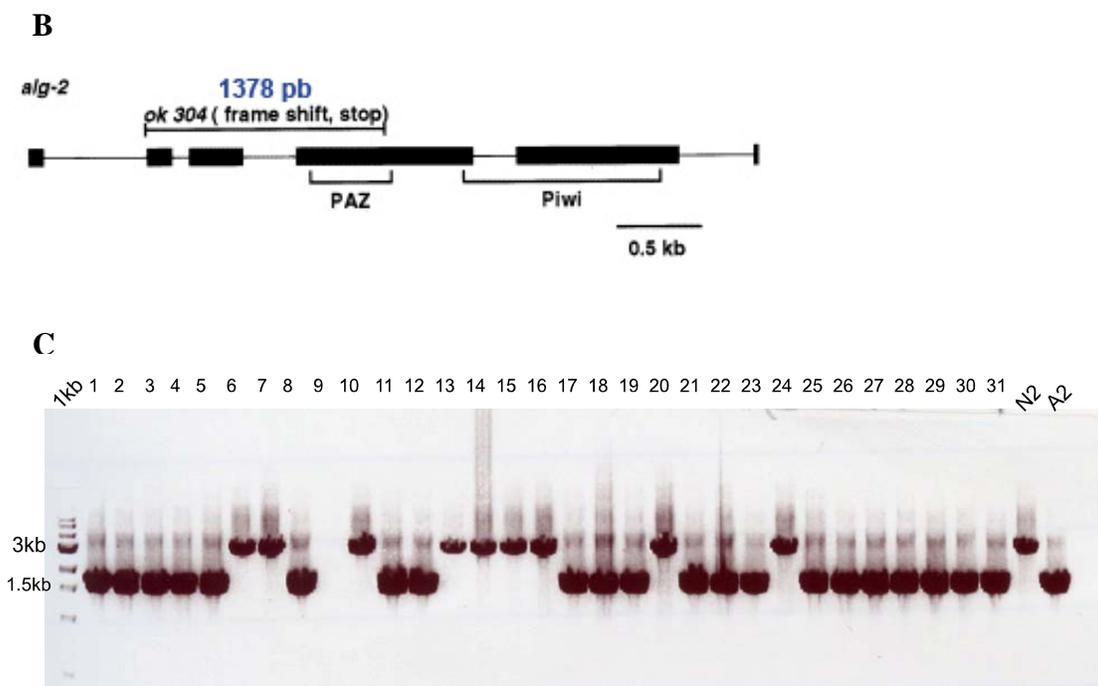


Figure 4-13 : Génération de la souche *dpy-11(e224) unc-34(e566)V; alg-2(ok304)II*.

A) Schéma du croisement pour générer la souche *-11(e224) unc-34(e566)V; alg-2(ok304)II*. Une hermaphrodite *unc-34* a été croisée avec un mâle *dpy-11; alg-2*, et des F1 ont été isolés. Les F2 de phénotypes Dpy et Unc ont été isolés, puis analysés pour la présence de la délétion *alg-2*. **B)** Schéma du gène *alg-2* et de la délétion *ok304* (Figure modifiée de Grishok et al., 2001). **C)** PCR sur *alg-2* pour la vérification de la délétion *ok304*, migré sur gel 1% agarose (voir 4.5.7 pour détail du PCR). Le PCR des mutants A2 (*alg-2(ok304)*) migre vers 1.7kb, alors que celui des N2 migre vers 3kb. Un second PCR est par la suite effectué sur les descendants du candidat choisi, afin de s'assurer qu'il était bien homozygote pour la délétion (tous les descendants doivent avoir la délétion).

4.5.2 Génération de mâles

Afin d'obtenir plus de mâles pour les croisements (ils sont normalement peu fréquents : 0,02%), les vers sont soumis à un choc thermique. Une dizaine d'hermaphrodites en stade L4 tardif sont sélectionnées et déposées sur un pétri que l'on incube à 34°C pendant 3-4 heures. Elles sont par la suite isolées, et quelques jours plus tard, plusieurs mâles devraient être retrouvés. Ces mâles peuvent être croisés avec des hermaphrodites de la même souche afin d'augmenter le nombre de mâles.

4.5.3 Croisements

Lors de croisements, 4 mâles sont déposés sur un pétri avec 8 hermaphrodites au stade L4/adulte. Le pétri ne contient qu'un peu de nourriture au centre, concentrant ainsi les animaux à cet endroit. Les hermaphrodites sont ensuite isolées après 24h. Celles qui donneront une descendance à 50% mâle auront été fécondées par un mâle.

4.5.4 Mutagénèse et criblage

Les animaux *alg-2(ok304) Ex [alg-2, sur-5::gfp]* ont été mutagénisés au EMS. 50 000 animaux au stade L4 ont été resuspendus dans une solution de 50mM EMS (Sigma) dans le tampon M9, et le tout a été placé sur un agitateur rotatif durant 4h à température ambiante. Les vers ont ensuite été rincés 3 fois au tampon M9, puis déposés sur pétri avec de la nourriture OP50. Une fois gorgés d'embryons, les vers ont été synchronisés (voir section 2.3.3), ce qui consiste à dissoudre les corps pour ne conserver que les embryons. Les embryons éclosent dans le tampon M9, puis les larves sont déposées sur pétri avec la nourriture OP50. 1000 vers F1 GFP positifs ont été isolés au stéréomicroscope à GFP, puis 4 F2 GFP positifs ont été isolés par F1. Les F2 se sont reproduits par auto-fertilisation, et les populations F3 ont été observées afin d'identifier celles qui sont GFP positives à 100%.

4.5.5 Analyse des polymorphismes (SNP)

Une souche Hawaïenne contenant la mutation *alg-2* a été générée dans le laboratoire par croisement de la souche Hawaïenne avec la souche *alg-2(ok304)*. Cette souche présente un génome de type Hawaïen, excepté pour le bras droit du chromosome II, où la mutation *alg-2* se situe. Des mâles de cette souche (4) ont été croisés avec des hermaphrodites mutantes (8), et des F1 provenant d'hermaphrodites fécondées par un mâle sont isolées. Les F1 se reproduisent par auto-fertilisation, et des F2 sont isolés. Le génotype des F2 est déterminé en observant les phénotypes de la population F3 : s'ils sont tous GFP+, le F2 était homozygote mutant, alors que si la population est mixte comportant des individus GFP+ et GFP-, le F2 était soit hétérozygote ou homozygote non-mutant. L'ADN génomique des F2 est extrait pour le génotypage (N2 ou Hw) des régions polymorphiques. Les polymorphismes ont été choisis à partir de la base de donnée « *C. elegans* SNP » (http://genome.wustl.edu/genome/celegans/celegans_snp.cgi), puis testés au laboratoire avant leur utilisation.

4.5.6 Extraits d'ADN génomique

Les vers sont déposés, individuellement, dans 10 µl de tampon de lyse (50 mM KCl, 10 mM Tris pH8.2, 2.5 mM MgCl₂, 0,45% NP-40/IPEGAL, 0,45% Tween 20, 0,01% Gélatine). Les tubes sont ensuite incubés 1h à 60°C, puis 20 min à 94°C. Une fois la réaction terminée, 30 µl d'eau distillée sont ajoutés. L'ADN génomique est donc prêt à être amplifié.

4.5.7 PCR

Les conditions d'amplification pour les régions polymorphiques sont les suivantes : 3µl de tampon 10X PCR + MgCl₂ (Denville), 0.24 µl dNTP 25mM, 0.23 µl oligo sens 100µM, 0.23 µl oligo antisens 100µM, 0.3µl Taq (Denville), 1µl d'ADN génomique et de l'eau jusqu'à un volume final de 30 µl.

Les amorces utilisées pour les PCR d'analyse SNP sont les suivantes :

-18.9	(F36H9)	SNP79 :	5' CGGAAAATTGCGACTGTCAC 3'
		SNP80 :	5' ATTAGGACTGCTTGGCTTCC 3'
-12.4	(C50H11)	SNP49 :	5' TGGCCACAGGAATATTCGA 3'
		SNP50 :	5' AAATAGCACAGGCTGAACGC 3'
-10.7	(C02A12)	SNP85 :	5' GCTTACAGTTCTGTGAGCTGTC 3'
		SNP86 :	5' TTCTACTACCGTTTCACAATGG 3'
-7.9	(H10D18)	SNP87 :	5' AATCGCTACTTCCGATAACTTC 3'
		SNP88 :	5' ATTGATCCCATGATCTCGGATC 3'
-5.2	(T28F12)	SNP107 :	5' GGTGTAGAGAGCTCACTCAGC 3'
		SNP108 :	5' TTGGATAGGCCTAGCAGAGC 3'
-3.65	(C13D9)	SNP89 :	5' TTCGCAGTTCCTTGTGCTC 3'
		SNP90 :	5' GGCCAAATTCTCCGTTTCAC 3'
1,2	(F20D6)	SNP41 :	5' CGAGGAATGAGCAGTTCAGTAG 3'
		SNP42 :	5' GAGAGTTCCTGACTATGGC 3'

Programme d'amplification des SNP par PCR :

- 1- 94°C , 2 min
- 2- 94°C, 30s
- 3- 52°C, 30s
- 4- 72°C, 30s
- 5- répétition 30X des étapes 2 à 4
- 6- 72°C, 5 minutes
- 7- 4 °C, infini

Conditions d'amplification du gène *alg-2* afin de vérifier la délétion *alg-2(ok304)* : 6.7µl H₂O, 1µl tampon 10X PCR + MgCl₂ (Denville), 1µl dNTP 2mM, 0.1µl oligo sens 100µM, 0.1µl oligo antisens 100µM, 0.1µl Taq (Denville), 1µl extrait d'ADN génomique, pour un volume final de 10µl.

Les amorces utilisées pour l'amplification du gène *alg-2* sont les suivantes :

PCR <i>alg-2</i> #1	MSo144 : 5' TCTGAGTTTGGCTCGATGTG 3'
	MSo145 : 5' ATGTTTCCTTGGATAACCAGCG 3'
PCR <i>alg-2</i> #2	MSo146 : 5' AGCCCAGAACTGGGAAACTT 3'
	MSo147 : 5' AAGTCGAATTCCGTTGGATG 3'

Le programme PCR d'amplification d'*alg-2* comporte deux PCR consécutifs :

<u>PCR <i>alg-2</i> #1:</u>	<u>PCR <i>alg-2</i> #2:</u>
1- 94°C, 2 min	1- 94°C, 2 min
2- 94 °C, 30s	2- 94 °C, 30s
3- 54°C, 30s	3- 52°C, 30s
4- 72°C, 2 min	4- 72°C, 2 min
5- Répétition 30X des étapes 2 à 4	5- Répétition 30X des étapes 2 à 4
6- 72°C, 15 minutes	6- 72°C, 15 minutes
7- 4°C, infini	7- 4°C, infini

90µl d'eau sont ajoutés à chaque réaction du PCR1, et cette dilution remplace l'extrait d'ADN génomique du PCR #1 pour le PCR #2.

Les 10µl du PCR #2 sont déposés sur gel 1% agarose.

4.5.8 Digestion et dépôt sur gel

10µl du PCR SNP précédent sont digérés par l'enzyme de restriction (NEB) appropriée au polymorphisme durant 3h dans un volume final de 20µl. Les 20µl sont ensuite déposés sur gel 2% agarose.

4.5.9 RNAi

Le RNAi par nourriture se fait en nourrissant les animaux avec des bactéries exprimant de l'ARN double brin ciblant le gène d'intérêt, tel que décrit dans Timmons et Fire (Timmons and Fire, 1998). Brièvement, la technique consiste à cloner une portion de l'ADNc du gène, en utilisant des sites de restriction uniques ajoutés sur les amorces, dans un plasmide ayant un promoteur de la T7 ARN polymérase à chaque extrémité du site de polyclonage, permettant ainsi l'expression d'ARN double brin, sous contrôle de la présence d'IPTG, dans une souche bactérienne contenant le gène de la T7 ARN polymérase. Une culture

bactérienne est produite après environ 15 heures de croissance à 37°C dans du LB additionné d'ampicilline (100µg/ml), puis une goutte de cette culture est déposée sur un pétri NGM contenant 1mM d'IPTG et le tout est laissé à température ambiante durant 24h, afin de permettre l'induction et la transcription de l'ARN double brin. Les vers sont ensuite ajoutés en stade L1 sur la nourriture RNAi induite. Les nourritures RNAi utilisées ciblent les gènes *unc-22*, *cdk-1*, *let-2* et ont été produites antérieurement dans le laboratoire.

4.5.10 Analyse en 3 points

La souche *dpy-11(e224) unc-34(e566) V; alg-2(ok304) II* a été créée pour l'analyse en trois points par les croisements successifs des 3 souches comportant ces mutations (voir section 4.5.1 pour plus de détails). Les mâles *sla-1(qbc1)* ont été croisés avec des hermaphrodites *dpy-11(e224) unc-34(e566) V; alg-2(ok304) II* et des hermaphrodites F1 GFP+ provenant d'hermaphrodites fécondées par un mâle ont été isolées. Les F2 recombinants, présentant un phénotype Unc non-Dpy ou Dpy non-Unc ont été isolés, puis 5 F3 par F2 ont été isolés, afin d'obtenir les homozygotes recombinants. Les pétris F3 où la génération F4 a complètement perdu le 2^e marqueur phénotypique (donc les homozygotes recombinants) sont observés pour l'expression de la GFP, et donc pour le phénotype mutant ou non mutant.

4.5.11 Injection de cosmides

Les cosmides ont été injectés dans les gonades de jeunes adultes, selon la méthode décrite dans Mello et al., 1991. La solution d'injection est constituée de 200ng/µl des cosmides et de 800ng/µl du plasmide pRF4, dans l'eau.

5 Discussion

5.1 Étude de l'association des microARN avec la protéine Argonaute ALG-1 au cours du développement

Chez le nématode *C. elegans*, les protéines ALG-1 et ALG-2 sont les protéines Argonautes associées à la voie des microARN et sont essentielles pour leurs fonctions. Ces protéines sont associées au microARN *let-7 in vivo* (Hutvagner et al., 2004), mais il demeurait inconnu si elles étaient associées à tous les microARN chez *C. elegans*. Afin de vérifier si tous les microARN étaient associés à ALG-1, de même que pour déterminer leur profil d'expression au cours des stades développementaux, nous avons étudié les microARN associés à ALG-1 au cours du développement. La protéine GFP::ALG-1 a été immunoprécipitée à partir d'extraits protéiques de populations synchronisées de vers aux stades embryonnaire, L1, L2, L3, L4 et adulte, puis suivie d'une extraction d'ARN et analyse par micropuce des microARN.

Tout d'abord, on remarque que la protéine GFP::ALG-1 est détectée suite à l'immunoprécipitation par immunobuvardage de type *Western* chez tous les stades du développement, excepté chez les embryons. En fait, les embryons récoltés par la méthode de « bleach », par dissolution des animaux, sont des embryons précoces qui n'étaient pas encore pondus, comportant donc moins de 30 cellules (Altun and Hall, 2005). Il semble donc que la protéine transgénique GFP::ALG-1 ne soit pas encore exprimé à ce stade. Afin d'obtenir les microARN embryonnaires, il faudrait recueillir des embryons au développement plus avancé, et cela pourrait être possible en produisant des cultures liquides de *C. elegans* et en isolant les embryons déjà pondus par centrifugation. Aussi, l'expression de transgènes est souvent inactivée dans la lignée germinale (Kelly et al., 1997), ce qui pourrait être une explication à l'absence de la protéine GFP::ALG-1 chez les embryons récoltés. Pour contrer ce problème, nous pourrions produire une nouvelle lignée transgénique de *C. elegans* où le transgène sera introduit par bombardement, menant plus souvent à l'intégration au génome du transgène que lors de génération d'animaux transgéniques par injection, protégeant donc son expression dans la lignée germinale (Schnabel, 2002). Ainsi, la contribution embryonnaire des microARN n'a pas été analysée dans ce travail. Cependant, bien que nous détectons la protéine GFP::ALG-1 suite à

l'immunoprécipitation et que la quantité d'ARN obtenu semble suffisante pour la réalisation de l'expérience, nous remarquons qu'il semble y avoir beaucoup de dégradation de GFP::ALG-1. Il a déjà été observé chez d'autres protéines Argonautes, telles que RDE-1, que ces protéines semblent très sensibles à la dégradation (laboratoire C.C. Mello, données non publiées). Depuis la réalisation de cette expérience, nous avons fait l'acquisition au laboratoire d'un appareil destructeur de cellules qui a pu être utilisé avec succès pour la production de protéines Argonautes recombinantes (Samir Bouasker). L'utilisation de cet appareil pour la production des extraits protéiques, plutôt que le broyage manuel, pourrait potentiellement diminuer la dégradation de GFP::ALG-1, puisque les manipulations de l'échantillon sont moins importantes et de plus courte durée. .

La micropuce utilisée dans cette expérience peut détecter 116 microARN de *C. elegans*. Cependant, depuis que cette micropuce a été produite, de nouveaux microARN ont été découverts. Sur la base de données miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>), on dénombre 137 microARN chez *C. elegans* à ce jour. Récemment, Zhang et collaborateurs ont isolé 9 nouveaux microARN (Zhang et al., 2007), ce qui porterait le nombre total de microARN découverts à 146. Nous n'avons donc pas d'informations sur l'association entre ALG-1 et les 30 microARN découverts après la fabrication de la micropuce. Ces données pourraient être obtenues par la production d'une nouvelle micropuce, ou par analyse de type *Northern Blot*.

Les résultats obtenus des immunoprécipitations de GFP::ALG-1 nous donnent des informations sur plusieurs points. Tout d'abord, l'on remarque que selon le stade, on retrouve de 40% à 75% des microARN totaux étant associés à ALG-1. En observant le nombre de microARN associés à ALG-1 par rapport aux microARN détectés avant l'immunoprécipitation (extrait total), on remarque que chez les vers L3, L4 et adultes, on retrouve pratiquement tous les microARN associés à ALG-1 (100%, 93% et 99%, respectivement). Chez les stades plus précoces L1 et L2, ce nombre diminue (87% et 64%), ce qui peut suggérer que ALG-2, ou une autre protéine Argonaute, pourrait être impliquée pour la liaison des microARN non associés à ALG-1. Suite à ces résultats, nous pourrions aussi faire l'hypothèse qu'ALG-2 est plus sollicitée aux stades précoces du développement qu'aux stades plus tardifs. Il sera donc intéressant de répéter cette expérience chez des

animaux exprimant GFP::ALG-2 pour vérifier quels sont les microARN associés à cette protéine Argonaute.

De plus, en observant, tous stades confondus, les microARN isolés suite aux immunoprécipitations et les microARN présents dans l'extrait total par rapport aux microARN totaux, on remarque que 19% des microARN ne sont jamais détectés, pas même dans les extraits totaux non immunoprécipités. Puisqu'il nous manque la contribution embryonnaire des microARN, la protéine GFP::ALG-1 n'ayant pas pu être détectée dans les embryons primaires, on peut prédire que ces microARN sont plutôt présents chez les embryons. Outre ces 19% de microARN non détectés, 69% des microARN ont été identifiés comme étant associés à ALG-1, alors que 12% sont retrouvés dans l'extrait total seulement, mais pas dans l'immunoprécipité. Ainsi, bien que ces microARN soient détectés très faiblement dans l'extrait total, il semble que ce ne soit pas tous les microARN qui soient associés à ALG-1. Bref, les microARN seraient, selon nos résultats, en majorité associés à ALG-1, et ce, de façon plus importante aux stades développementaux plus tardifs. Puisque ALG-2 possède une grande similarité de séquence avec ALG-1, il serait possible que ALG-2 puisse lier ces mêmes microARN, ou alors ceux qui ne sont pas liés par ALG-1. Afin de mieux caractériser l'implication des protéines Argonautes dans la voie des microARN, il faudrait répéter cette expérience chez des vers exprimant GFP::ALG-2.

Nos expériences ont aussi permis de tracer un profil d'expression des microARN selon le stade. Bien que 19% de microARN sont non détectés, nous observons que 61% des microARN semblent exprimés au cours de pratiquement tous les stades, alors que 19% semblent être exprimés au cours de certains stades en particulier. Puisqu'un rôle important des microARN se joue dans la régulation fine du développement, il n'est pas surprenant d'avoir observé un profil d'expression variant selon les stades chez plusieurs microARN. Toutefois, dans la littérature, les microARN semblent, une fois exprimés, être continuellement présents chez les animaux. Selon les données obtenues par cette expérience, il semble cependant que ce ne soit pas le cas, certains microARN (identifiés au tableau Tableau 3-II) étant détectés à un stade précoce et non détectés dans un stade plus avancé. Une analyse de ces microARN pourrait révéler un nouveau mode d'action des

microARN pour la régulation d'ARNm cibles à certains moments précis du développement.

Depuis le début de nos expériences d'immunoprécipitation d'ALG-1, des informations additionnelles sur ALG-1 et ALG-2 ont été montrées dans la littérature. Zhang et collaborateurs ont identifié les protéines AIN-1 et AIN-2, protéines de la famille GW182, étant localisées aux corps P, comme étant associées aux protéines ALG-1 et ALG-2 (Zhang et al., 2007). Ils ont immunoprécipité AIN-1 et AIN-2, et vérifié la présence de microARN par pyroséquençage. Ils ont retrouvé presque la totalité des microARN détectés dans leur extrait total comme étant associés à AIN-1, et une majorité comme étant associés à AIN-2 (Zhang et al., 2007). Nos résultats des microARN associés à ALG-1 sont comparables aux leurs, puisque AIN-1 est associé à ALG-1. Nous apportons cependant le profil d'expression des microARN au cours du développement, ce qui n'a pas été montré dans la littérature jusqu'à présent. Tops et collaborateurs ont, quant à eux, immunoprécipité HA::ALG-1 et HA::ALG-2 et conclu qu'il n'y avait pas de différences chez les microARN associés à ces deux protéines Argonautes, bien qu'ils n'ont pas mentionné quels étaient les microARN retrouvés, ni étudié l'expression en fonction du stade développemental (Tops et al., 2006). Nos études sur les microARN associés à ALG-2 pourraient confirmer ou infirmer leurs résultats.

Dans la littérature, le profil d'expression de certains microARN avait été étudié. Lee et Ambros ont étudié les profils d'expression des microARN miR-60, miR-80, miR-229, miR-238, miR-38 et miR-52 par analyse de type *Northern Blot* (Ambros et al., 2003a; Lee and Ambros, 2001). Ils ont détecté une forme précurseur de miR-60 présente aux stades L1 à adulte, mais de façon plus importante au stade L1, et nous détectons la forme mature de ce microARN chez nos extraits totaux. Pour miR-80, ils ont détecté le microARN mature, exprimé uniformément selon les stades, alors que nous le détectons aussi, mais de façon plus abondante au stade L3. Le microARN miR-229 est détecté à tous les stades, autant selon leur analyse que selon la nôtre. De plus, ils observent le précurseur du microARN miR-38 à tous les stades, alors que nous décelons la forme mature à tous les stades, excepté au stade adulte. Toutefois, ils ont détecté miR-238 à tous les stades, alors que nous le retrouvons uniquement au stade adulte. Ils ont aussi détecté miR-52, alors que nous n'avons

aucunement détecté ce microARN dans nos échantillons. Il serait possible que miR-52 ne soit pas associé à ALG-1, et que les 500µg d'extraits protéiques utilisés pour l'analyse des extraits totaux ne soient pas suffisants pour le détecter. En effet, 3 mg d'extraits ont été utilisés pour l'immunoprécipitation contre 0,5 mg pour les extraits totaux, et nous remarquons que nous détectons certains microARN après l'immunoprécipitation, mais pas dans les extraits totaux. C'est entre autres le cas du microARN décrit comme peu abondant dans la littérature, miR-257 (Zhang et al., 2007) : il n'est pas détecté dans les extraits totaux, mais il est détecté dans les immunoprécipitations chez les L3, L4 et adultes. Ainsi, la quantité de protéines utilisée pour l'analyse des extraits totaux n'est peut-être pas suffisante pour détecter les microARN faiblement exprimés, mais les microARN détectés par l'immunoprécipitation semblent correspondre avec les quelques profils d'expression de microARN décrits dans la littérature. De plus, puisque plusieurs microARN sont enrichis par l'immunoprécipitation de GFP::ALG-1, cette approche pourrait être utilisée pour la découverte de nouveaux microARN, dont l'expression serait faible. La méthode d'analyse des microARN par micropuce a l'avantage, par rapport à la détection des microARN par *Northern blot*, d'être quantitative et très sensible.

Donc, l'étude des microARN associés à ALG-1 selon le stade du développement nous a permis de recueillir plusieurs informations. Premièrement, les microARN sont pratiquement tous associés à la protéine Argonaute ALG-1 au cours des stades L3, L4 et adulte, alors que chez les stades plus précoces L1 et L2, une proportion moindre des microARN lui est associée. Ces résultats suggèrent donc l'implication d'une autre protéine Argonaute, potentiellement ALG-2, pour la liaison de ces microARN aux stades précoces. Ensuite, tous stades confondus, l'on remarque que, outre les 19% de microARN aucunement détectés, 12% sont retrouvés uniquement dans les extraits totaux et non pas suite à l'immunoprécipitation. Ce résultat indique que ce ne sont pas tous les microARN qui s'associent à ALG-1, bien qu'ils s'y associent en majorité. De plus, l'analyse des microARN dans les extraits totaux a montré que certains microARN sont exprimés durant toute la vie du ver, alors que d'autres semblent exprimés au cours de certains stades développementaux en particulier. Ces résultats apportent donc de nouvelles informations sur la caractérisation de l'expression des microARN et du rôle de la protéine Argonaute ALG-1. Afin de valider ces observations, cette expérience devrait être répétée, de même

qu'elle devrait être réalisée chez des vers exprimant une version étiquetée d'ALG-2, afin de mieux caractériser les rôles de ces deux protéines Argonautes essentielles à la voie des microARN.

5.2 Criblage génétique pour l'identification de nouvelles composantes de la voie des microARN

Par le criblage génétique synthétique létal avec *alg-2*, nous avons pu isoler 11 candidats montrant un phénotype de létalité embryonnaire chez un mutant *alg-2*, auxquels la viabilité est rétablie en présence d'une copie fonctionnelle du gène *alg-2*. Ces 11 candidats ont pu être classés en 5 groupes de complémentation différents. Tops et collaborateurs ont eux aussi conduit un criblage génétique synthétique létal avec *alg-2*, mais en utilisant la génétique inverse, soit par interférence à l'ARN en nourrissant les vers mutants *alg-2(ok304)* avec la nourriture de la librairie RNAi Ahringer, ciblant pratiquement tous les gènes chez *C. elegans*. Ils ont obtenu seulement quatre gènes synthétiques létaux avec *alg-2* : *alg-1*, *sex-1*, *sdc-2* et ZK262.8 (Tops et al., 2006). Nous espérons obtenir plus de gènes synthétiques létaux que ceux-là par notre criblage, puisque le phénotype est plus important chez un mutant que lors de RNAi par nourriture. En effet, le phénotype est plus ou moins pénétrant lorsqu'on fait du RNAi sur un gène, et plusieurs facteurs peuvent influencer sur l'efficacité du RNAi. Nous avons effectivement obtenu plus de mutants par notre criblage, puisque nous sommes certains d'avoir 5 groupes de complémentation, donc au moins 5 gènes différents, et nous savons que 2 groupes (peut-être 3) n'ont pas leur mutation sur le chromosome X, et sont donc différents de *alg-1*, *sex-1* ou *sdc-2*. Nous savons que la mutation *sla-1(qbc1)* est différente de ZK262.8, sur le chromosome V, puisque les données de cartographie portent la mutation dans une autre région. De plus, des résultats obtenus dans le laboratoire montrent que le groupe 1 serait lui aussi différent de ZK262.8 selon les résultats de cartographie de la mutation de 515-B (Gabriel Bossé).

Les tests de complémentation ont donc permis de classer les 11 candidats en 5 groupes de complémentation différents, ce qui est un résultat plutôt surprenant. Puisque 1000 F1 ont été isolés, nous ne devrions pas avoir saturé le génome en mutations. Nous avons deux groupes de complémentation (2 et 5) qui portent leur mutation sur le chromosome X, qui pourraient donc être deux des trois gènes connus comme étant synthétiques létaux avec *alg-*

2 (*alg-1*, *sex-1* ou *sdc-2*). Il a été indéterminé si le candidat 175-D porte sa mutation sur le chromosome X ou non, puisque cette souche étant *him*, il était difficile de savoir si les hermaphrodites étaient fécondées par un mâle. En effet, suite à une fécondation par un mâle, 50% de la génération F1 est mâle, alors que lorsque l'hermaphrodite se reproduit par auto-fécondation, elle donne normalement des mâles dans une proportion de 0,02%. 175-D étant *him*, elle donne environ 50% de mâles en tout temps. De plus, les mâles obtenus de 175-D sont stériles, et ne peuvent donc pas servir pour les croisements. Ce candidat devrait être croisé dans un mutant *alg-2(ok304)*, afin de perdre les mutations non-liées à la mutation synthétique létale, nous débarrassant ainsi du phénotype *him* s'il est non-lié à la mutation, et peut-être aussi de la stérilité des mâles. Ce candidat 175-D aurait donc la possibilité d'être le 3^e gène connu sur X, ou alors ZK262.8, mais toujours est-il qu'un de ces gènes identifiés par Tops et collaborateurs ne serait pas trouvé dans notre criblage. Cela pourrait indiquer que nous n'avons pas retrouvé tous les gènes synthétiques létaux avec *alg-2*. Toutefois, avec la découverte que le mutant 189-A, du groupe de complémentation 3, porte en effet deux mutations synthétiques létales, cela vient compliquer les résultats des groupes de complémentation. En fait, le groupe 3 semble donc représenter deux mutations différentes sur le chromosome V. La mutation située à droite pourrait potentiellement être ZK262.8.

Tel que montré avec la résistance à l'interférence à l'ARN pour 189-A, les phénotypes observés chez les 11 candidats ne sont pas nécessairement liés à la mutation synthétique létale, mais risquent d'avoir été générés dans le génome de ces candidats. En effet, chez les différents candidats formant le même groupe de complémentation, les phénotypes particuliers ne semblent pas conservés.

La stratégie de criblage génétique basée sur la létalité synthétique comporte à la fois des avantages et des inconvénients par rapport, par exemple, à un criblage par RNAi. La stratégie de criblage utilisée, en plus d'offrir la possibilité de découvrir plus de mutants que par RNAi dû au phénotype plus important de la mutation d'un gène, notre stratégie permet d'avoir le mutant en notre possession pour permettre la caractérisation du gène et son implication dans la voie des microARN. De plus, cette stratégie nous permet d'obtenir des gènes comportant des mutations ponctuelles, donnant une plus grande variété d'allèles, des

phénotypes moins forts ou différents de l'inhibition complète du gène (allèles appelés hypomorphes). Par exemple, la perte d'un gène impliqué dans la voie des microARN pourrait être létale, mais une mutation ponctuelle dans celui-ci nous permettrait de déceler son importance dans la voie métabolique, tout en préservant la viabilité de l'animal. Cependant, seuls les gènes montrant un phénotype de létalité synthétique embryonnaire sévère sont retenus par ce criblage, et non pas ceux qui présenteraient un défaut plus tardif dans leur développement. De plus, avec cette stratégie, il faut être très attentif durant la cartographie du gène à la possible intégration du transgène extrachromosomique [*gfp::alg-2*, *sur-5::gfp*] dans le génome des animaux, puisque cela leur permettrait de conserver l'expression de la GFP sans nécessairement contenir la mutation synthétique létale. La possible intégration du transgène peut cependant être décelée lors de croisements avec cette souche, puisqu'une fois la copie intégrée, elle ségrégera de façon mendélienne.

L'analyse SNP de *sla-1(qbc1)* a montré la présence de la mutation dans l'intervalle -12.7 à -3.65 du chromosome V. Cependant, cette région demeure grande, en effet, il y aurait environ 1.9Mb entre ces deux barrières. Peu de recombinants ont été obtenus de ce croisement, ce qui donne peu de données afin de mieux cerner la mutation. Aussi, pour la cartographie de ces mutants, le phénotype mutant ou non mutant ne s'observe que par l'expression de la GFP, ce qui rend facile la distinction des génotypes homozygotes mutants, mais ne permet pas la distinction entre les génotypes hétérozygotes et homozygotes non mutants. Cela a donc pour effet de diminuer la quantité d'informations utilisables pour déterminer la position de la mutation. Beaucoup de candidats F2 doivent donc être analysés. Un nouveau croisement SNP devra être fait afin d'obtenir plus de recombinants et de données pour la cartographie de ce mutant.

L'analyse en 3 points nous a indiqué, selon le résultat des recombinants Dpy, que la mutation se situait vers -1.3, alors que selon le résultat des recombinants Unc, la mutation se situerait à -5.8. Ces deux résultats diffèrent de manière considérable. De plus, le résultat de -1.3 pour les recombinants Dpy est à l'extérieur de la limite de -3.65 établie par l'analyse SNP. Lors de la réalisation de l'analyse en 3 points, nous avons observé que les mutants *unc-34* avaient un phénotype bien plus difficile à déceler que les *dpy-11*, puisque les Unc ne sont discernables que selon leur mouvement. C'est donc pourquoi plus de

recombinants Dpy que de recombinants Unc ont été isolés, puisqu'ils étaient plus faciles à repérer. Cependant, lors de l'observation des F3 pour déterminer les homozygotes recombinants, il était plus facile de déceler les non-homozygotes chez les Unc, puisque les Dpy parmi eux étaient facilement repérables. Par contre, les non-homozygotes Dpy étaient plus difficilement repérables, ce qui fait que certains ont probablement été considérés comme homozygotes recombinants, et auront paru non-mutants. Pour cette raison, je crois que le résultat obtenu à partir des Dpy comporte plus d'erreur que celui obtenu à partir des Unc. Cela pourrait donc en partie expliquer l'écart considérable entre les résultats obtenus entre les Unc et Dpy, ainsi que le résultat des Dpy à l'extérieur de la barrière établie par SNP.

Basés sur ces résultats de cartographie génétique, nous avons décidé de procéder à l'injection des cosmides et YAC situés entre -3.65 et -5.9 sur le chromosome V. Certains cosmides comportaient des gènes pouvant être d'un intérêt pour la voie des microARN, comme le facteur d'initiation de la traduction F39G3.3, l'ARN hélicase F54D11.4 ainsi que F32D1.9, facteur impliqué pour la maturation des extrémités 3' des ARNm. Cependant, aucun de ces cosmides/YAC n'a restauré un phénotype de type sauvage, soit la perte de la copie GFP. Ainsi, soit que la mutation est située plus à gauche de -5.9 sur le chromosome, ou bien alors une des injections n'aurait pas bien fonctionné, ne permettant pas de voir la restauration du phénotype sauvage. Il était parfois difficile d'observer le phénotype *roller* des animaux transgéniques, le phénotype étant plutôt faible. De plus, les animaux transgéniques possèdent le transgène de façon extrachromosomique et ne le transmettent pas à tous leurs descendants, donc les animaux doivent simultanément porter le transgène et perdre la copie GFP afin que l'on puisse détecter la restauration du phénotype sauvage. Il y a aussi une possibilité que le gène dans le cosmide ne soit pas correctement exprimé, ou alors à des niveaux trop faibles pour permettre le rétablissement du phénotype de type sauvage. L'expérience d'injection devra être répétée, lorsque l'intervalle de localisation de la mutation sera réduit par l'analyse des polymorphismes (SNP).

Nous avons débuté la caractérisation de la souche *sla-1(qbc1)*. Nous tentons d'abord de vérifier l'homologie de fonction de *sla-1(qbc1)* avec le gène *alg-1*. Nous avons donc utilisé la nourriture RNAi pour *alg-2*, pour ainsi pouvoir passer la létalité embryonnaire et inhiber

le gène *alg-2* aux stades larvaires. Si le gène muté se comporte comme le gène *alg-1*, la perte de fonction d'*alg-2* aux stades larvaires devrait mener à un défaut du développement et à la mort par éclatement de la vulve au stade L4, dû à la perte de fonction du microARN *let-7*. Nous désirons aussi déterminer si le gène muté intervient au niveau de la maturation des microARN, comme c'est le cas pour le gène *alg-1*. Nous avons récolté des populations aux stades développementaux mixtes pour les souches N2 et *sla-1(qbc1)*, ayant grandi sur de la nourriture OP50 et RNAi contre *alg-2*. L'ARN de ces populations sera extrait, puis envoyé pour analyse sur micropuce afin de déterminer si, comme cela se passe chez les mutants *alg-1*, il y aurait un problème dans la production des microARN (Grishok et al., 2001).

Ainsi, le criblage synthétique létal nous a permis d'isoler 11 candidats présentant de la létalité synthétique avec *alg-2(ok304)*, nécessitant la copie extrachromosomique fonctionnelle d'*alg-2* pour survivre. Ces 11 candidats ont été classés en 5 groupes de complémentation différents. Le candidat *sla-1(qbc1)* a d'abord été cartographié, et l'analyse SNP a révélé la position de la mutation entre les positions -12.7 et -3.65 sur le chromosome V. L'analyse en 3 points réalisée a suggéré la présence de la mutation aux alentours de -5.8 ou de -1.3. Selon les données de cartographie obtenues, nous avons procédé à l'injection des cosmides et YAC contenant tous les gènes situés entre -5.9 et -3.65 afin de tenter de restaurer le phénotype sauvage, et ainsi identifier le cosmide comportant la copie fonctionnelle du gène muté. Cependant, aucune injection n'a donné d'animaux ayant restauré le phénotype sauvage, soit la perte de la copie extrachromosomique du gène *alg-2*. Afin de poursuivre la cartographie de *sla-1(qbc1)*, il serait préférable de réduire la fenêtre de gènes potentiels mutés en poussant l'analyse SNP plus loin, en préparant un autre croisement avec plus d'animaux. Ensuite, l'injection de cosmides pourra être ré-envisagée. L'identification et la caractérisation de chacun des gènes synthétiques létaux avec *alg-2* trouvés lors du criblage permettront d'éclaircir la mécanique de la voie des microARN, et probablement d'aider à mieux comprendre leur mode d'inhibition de la traduction. Les gènes interagissant génétiquement avec *alg-2* identifiés par ce criblage pourraient agir dans la même voie que le gène *alg-1*, puisqu'*alg-1* est lui-même synthétique létal avec *alg-2*. Ces gènes pourraient aussi être des modulateurs de la fonction ou de l'activité d'*alg-1*. De plus, ces facteurs interagissant génétiquement avec

alg-2 nous permettront de mieux caractériser cette protéine Argonaute, et même de potentiellement lui découvrir de nouvelles fonctions cellulaires.

6 Conclusion

La mécanique de la voie des microARN étant peu comprise, nous nous sommes intéressés à l'étude des protéines Argonautes ALG-1 et ALG-2, protéines essentielles à la fonction des microARN chez *C. elegans*.

Nous avons d'abord cherché à décrire l'association des microARN connus à la protéine Argonaute ALG-1. Par l'immunoprécipitation de GFP::ALG-1 chez les animaux à différents stades développementaux, suivie de l'extraction de l'ARN lui étant associé et l'analyse sur micropuce des microARN obtenus, nous avons pu tirer plusieurs informations. Premièrement, les microARN sont pratiquement tous associés à la protéine Argonaute ALG-1 au cours des stades L3, L4 et adulte, alors qu'ils le sont en proportion moindre chez les stades plus précoces L1 et L2, suggérant l'implication d'une autre protéine Argonaute, potentiellement ALG-2, pour la liaison de ces microARN aux stades précoces. Ensuite, tous stades confondus, l'on remarque que 12% des microARN sont retrouvés uniquement dans les extraits totaux et non pas suite à l'immunoprécipitation, indiquant que la majorité, mais non la totalité, des microARN s'associent à ALG-1. De plus, l'analyse des microARN dans les extraits totaux a montré que certains microARN auraient une expression spécifique à certains stades particuliers. Ces résultats apportent donc de nouvelles informations sur l'implication de la protéine ALG-1 dans la mécanique des microARN, de même que sur le profil d'expression des microARN au cours du développement. Afin de valider les données obtenues, cette expérience devrait être répétée, de même qu'elle devrait être réalisée chez des vers exprimant la protéine ALG-2 immunoprécipitable ainsi que chez les embryons, afin de mieux caractériser les rôles de ces deux protéines Argonautes dans la voie des microARN.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'identification d'interacteurs génétiques d'*alg-2*. Par la stratégie de criblage génétique synthétique létal avec *alg-2*, nous avons pu isoler 11 mutants nécessitant la copie extrachromosomique fonctionnelle du gène *alg-2* liée à la *gfp* pour survivre. Ces 11 mutants ont été classés en 5 groupes de complémentation. Nous

avons tout d'abord cartographié le mutant *sla-1(qbc1)* par l'analyse des polymorphismes (SNP) ayant révélé la présence de la mutation sur le chromosome V, entre les positions génétiques de -3.65 et -12.7. Nous avons par la suite procédé à une analyse en 3 points, qui a suggéré la présence de la mutation autour des positions de -5.8 ou de -1.3. Basés sur les résultats de cartographie par polymorphismes ainsi qu'en 3 points, nous avons injecté tous les cosmides et YAC contenant les gènes situés entre -3.65 et -5.9, tentant ainsi d'identifier le cosmide contenant le gène permettant une restauration du phénotype de type sauvage, soit la possibilité de perte de la copie extrachromosomique du gène *alg-2*. Cependant, aucune injection n'a permis la perte de la copie extrachromosomique du gène *alg-2*. Afin de poursuivre la cartographie de la mutation chez *sla-1(qbc1)*, il faudrait réduire l'intervalle de localisation possible de la mutation par une analyse SNP sur plus de candidats recombinants, puis injecter les cosmides contenant les gènes de cet intervalle réduit. L'identification et la caractérisation des gènes synthétiques létaux avec *alg-2* chez les 11 mutants identifiés par le criblage permettront une meilleure compréhension de la voie des microARN et de potentiellement expliquer leur mode d'inhibition de la traduction. De plus, l'identification d'interacteurs du gène *alg-2* peut mener à la découverte de nouvelles fonctions cellulaires de cette protéine Argonaute.

Bref, par l'identification des facteurs interagissant avec les protéines Argonautes ainsi que par la caractérisation de leur liaison aux microARN, nous permettront une meilleure connaissance de cette voie métabolique, fournissant un pas de plus vers la compréhension de la complexité de la régulation des gènes.

Bibliographie

- Altun, Z., and Hall, D. (2005). Handbook of *C. elegans* Anatomy. (<http://www.wormatlas.org/handbook/contents.htm>).
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., *et al.* (2003a). A uniform system for microRNA annotation. *Rna* 9, 277-279.
- Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T., and Jewell, D. (2003b). MicroRNAs and Other Tiny Endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol* 13, 807-818.
- Askew, D., Ashmun, R., Simmons, B., and Cleveland, J. (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6, 1915-1922.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massierer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553-563.
- Bartel, D. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Basu, U., Si, K., Warner, J., and Maitra, U. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* 21, 1453-1462.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 1885-1898.
- Berezikov, E., Chung, W., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28, 328-336.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35, 215-217.
- Bhattacharyya, S., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111-1124.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., and Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *Embo J* 17, 170-180.
- Boisvert, M. (2007). Les courts ARN chez *C. elegans*: spécificité et fonction des protéines Argonautes (Québec, Université Laval), pp. 95.
- Borchert, G., Lanier, W., and Davidson, B. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1097-1101.
- Bos, J., Fearon, E., Hamilton, S., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J., van der Eb, A., and B, V. (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293-297.
- Boutz, P., Chawla, G., Stoilov, P., and Black, D. (2007). MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev* 21, 71-84.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2003). bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36.

- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R., and Cohen, S. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3, e85.
- Brownawell, A., and Macara, I. (2002). Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol* 156, 53-64.
- Calado, A., Treichel, N., Müller, E., Otto, A., and Kutay, U. (2002). Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *EMBO J* 21, 6216-6224.
- Calin, G., and Croce, C. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6, 857-866.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15524-15529.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., *et al.* (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2999-3004.
- Chan, S., and Slack, F. (2007). And now introducing mammalian mirtrons. *Dev Cell* 13, 605-607.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-86.
- Chendrimada, T., Finn, K., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R., Liebhaber, S., Pasquinelli, A., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447, 823-828.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
- Cimmino, A., Calin, G., Fabbri, M., Iorio, M., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S., Aqeilan, R., Zupo, S., Dono, M., *et al.* (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Sevignani, C., Wentzel, E., Furth, E., Lee, W., Enders, G., Mendell, J., *et al.* (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 38, 1060-1065.
- Diederichs, S., and Haber, D. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097-1108.
- Ding, L., Spencer, A., Morita, K., and Han, M. (2005). The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in *C. elegans*. *Mol Cell* 19, 437-447.
- Doench, J., and Sharp, P. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504-511.
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S., Doerks, T., Dorner, S., Bork, P., Boutros, M., and Izaurralde, E. (2007). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* 21, 2558-2570.

- Fay, D., Starr, D., Spencer, A., and Johnson, W. (2001). Worm Breeding for Dummies: A guide to genetic mapping in *C. elegans*.
- Fay, D.S., Keenan, S., and Han, M. (2002). *fzr-1* and *lin-35/Rb* function redundantly to control cell proliferation in *C. elegans* as revealed by a nonbiased synthetic screen. *Genes Dev* 16, 503-517.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102-114.
- Förstemann, K., Horwich, M., Wee, L., Tomari, Y., and Zamore, P. (2007). *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by *dicer-1*. *Cell* 130, 287-297.
- Forstemann, K., Tomari, Y., Du, T., Vagin, V.V., Denli, A.M., Bratu, D.P., Klattenhoff, C., Theurkauf, W.E., and Zamore, P.D. (2005). Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* 3, e236.
- Gaur, A., Jewell, D., Liang, Y., Ridzon, D., Moore, J., Chen, C., Ambros, V., and Israel, M. (2007). Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res* 67, 2456-2468.
- Giraldez, A., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A., and Schier, A. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75-79.
- Giraldez, A.J., Cinalli, R.M., Glasner, M.E., Enright, A.J., Thomson, J.M., Baskerville, S., Hammond, S.M., Bartel, D.P., and Schier, A.F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833-838.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23-34.
- Gwizdek, C., Ossareh-Nazari, B., Brownawell, A., Doglio, A., Bertrand, E., Macara, I., and Dargemont, C. (2003). Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem* 278, 5505-5508.
- Haley, B., and Zamore, P.D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol* 11, 599-606.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K., Kim, Y., Jin, H., and Kim, V. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18, 3016-3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K., Nam, J., Heo, I., Rhee, J., Sohn, S., Cho, Y., Zhang, B., and Kim, V. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.
- He, L., He, X., Lim, L., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., *et al.* (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.
- He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., *et al.* (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833.

- Horwich, M., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P., and Zamore, P. (2007). The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol* *17*, 1265-1272.
- Humphreys, D., Westman, B., Martin, D., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 16961-16966.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* *293*, 834-838.
- Hutvagner, G., and Simard, M. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 22-32.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* *2*, E98.
- Hwang, H., Wentzel, E., and Mendell, J. (2007). A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* *315*, 97-100.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathiou, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J., Fritzler, M., and Chan, E. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* *7*, 1267-1274.
- Jannot, G., Boisvert, M., Banville, I., and Simard, M. (2008). Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*. *RNA* *14*, 829-835.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell* *120*, 635-647.
- Johnston, R.J., and Hobert, O. (2003). A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *426*, 845-849.
- Johnston, R.J., Jr., Chang, S., Etchberger, J.F., Ortiz, C.O., and Hobert, O. (2005). MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 12449-12454.
- Kedde, M., Strasser, M., Boldajipour, B., Vrieling, J., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P., van Duijse, J., Ørom, U., *et al.* (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* *131*, 1273-1286.
- Kelly, W., Xu, S., Montgomery, M., and Fire, A. (1997). Distinct Requirements for Somatic and Germline Expression of a Generally Expressed *Caenorhabditis elegans* Gene. *Genetics* *146*, 227-238.
- Ketting, R. (2007). A dead end for microRNAs. *Cell* *131*, 1226-1227.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* *15*, 2654-2659.
- Kiriakidou, M., Tan, G., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* *129*, 1141-1151.
- Knight, S.W., and Bass, B.L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *293*, 2269-2271.

- Kohl, N., Kanda, N., Schreck, R., Bruns, G., Latt, S., Gilbert, F., and Alt, F. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35, 359-367.
- Kumar, M., Lu, J., Mercer, K., Golub, T., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 39, 673-677.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lai, E. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30, 363-364.
- Lai, E.C., Tam, B., and Rubin, G.M. (2005). Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev* 19, 1067-1080.
- Lai, L., Yokotac, H., Hungc, L.-W., Kim, R., and Kim, S.-H. (2000). Crystal structure of archaeal RNase HIII: a homologue of human major RNase H. *Structure* 8, 897-904.
- Lane, D. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- Leaman, D., Chen, P.Y., Fak, J., Yalcin, A., Pearce, M., Unnerstall, U., Marks, D.S., Sander, C., Tuschl, T., and Gaul, U. (2005). Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development. *Cell* 121, 1097-1108.
- Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Lee, Y., and Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 21, 1025-1030.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J., Kim, S., and Kim, V. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21, 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K., Lee, S., Baek, S., and Kim, V. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060.
- Lewis, B., Burge, C., and Bartel, D. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
- Li, Q., Chau, J., Ebert, P., Sylvester, G., Min, H., Liu, G., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Skare, P., *et al.* (2007). miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 129, 147-161.
- Li, X., and Carthew, R. (2005). A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell* 123, 1267-1277.

- Lim, L., Lau, N., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J., Castle, J., Bartel, D., Linsley, P., and Johnson, J. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* *433*, 769-773.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* *17*, 991-1008.
- Lin, H., and Spradling, A. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* *124*, 2463-2476.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* *426*, 465-469.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* *305*, 1437-1441.
- Liu, J., Rivas, F., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., Parker, R., and GJ, H. (2005a). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* *7*, 1261-1266.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M., Hannon, G., and Parker, R. (2005b). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* *7*, 719-723.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* *435*, 834-838.
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M., Cerrato, C., Setién, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., *et al.* (2007). Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* *67*, 1424-1429.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* *303*, 95-98.
- Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* *434*, 666-670.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R. (2007). Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* *449*, 682-688.
- Macrae, I., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A., Cande, W., Adams, P., and Doudna, J. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* *311*, 195-198.
- Makeyev, E., Zhang, J., Carrasco, M., and Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* *27*, 435-448.
- Mallory, A., Reinhart, B., Jones-Rhoades, M., Tang, G., Zamore, P., Barton, M., and Bartel, D. (2004). MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J* *23*, 3356-3364.
- Maroney, P., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 1102-1107.
- Martello, G., Zacchigna, L., Inui, M., Montagner, M., Adorno, M., Mamidi, A., Morsut, L., Soligo, S., Tran, U., Dupont, S., *et al.* (2007). MicroRNA control of Nodal signalling. *Nature* *449*, 183-188.

- Martinez, J., and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 18, 975-980.
- Mathonnet, G., Fabian, M., Svitkin, Y., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W., Darzynkiewicz, E., Pillai, R., *et al.* (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation *in vitro* by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764-1767.
- Matsubara, H., Takeuchi, T., Nishikawa, E., Yanagisawa, K., Hayashita, Y., Ebi, H., Yamada, H., Suzuki, M., Nagino, M., Nimura, Y., *et al.* (2007). Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene* 26, 6099-6105.
- Mayr, C., Hemann, M., and Bartel, D. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315, 1576-1579.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197.
- Mello, C., Kramer, J., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10, 3959-3970.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W.-Y., MacDonald, J.F., Wang, J.Y., Falls, D.L., *et al.* (2002). Abnormal Spine Morphology and Enhanced LTP in LIMK-1 Knockout Mice *Neuron* 35, 121-133.
- Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Sestan, N., Rakic, P., Constantine-Paton, M., and Horvitz, H.R. (2004). Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 5, R68.
- Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D., Thuenemann, E., and Baulcombe, D. (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447, 1126-1129.
- Monticelli, S., Ansel, K., Xiao, C., Socci, N., Krichevsky, A., Thai, T., Rajewsky, N., Marks, D., Sander, C., Rajewsky, K., *et al.* (2005). MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 6, R71.
- Moss, E.G., Lee, R.C., and Ambros, V. (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell* 88, 637-646.
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jürgens, G., and Laux, T. (1998). Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO J* 17, 1799-1809.
- Neilson, J., Zheng, G., Burge, C., and Sharp, P. (2007). Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev* 21, 578-589.
- Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1108-1114.
- O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.
- Ohler, U., Yekta, S., Lim, L., Bartel, D., and Burge, C. (2004). Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA* 10, 1309-1322.

- Okamura, K., Hagen, J., Duan, H., Tyler, D., and Lai, E. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130, 89-100.
- Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216, 671-680.
- Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., and Seto, M. (2004). Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 64, 3087-3095.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* 434, 663-666.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degan, B., Muller, P., *et al.* (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.
- Petersen, C., Bordeleau, M., Pelletier, J., and Sharp, P. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21, 533-542.
- Pillai, R., Bhattacharyya, S., Artus, C., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573-1576.
- Rajewsky, N. (2006). microRNA target predictions in animals. *Nat Genet* 38, S8-13.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.
- Riddle, D., Blumenthal, T., Meyer, B., Priess, J., and (1997). *C. elegans* II.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12, 340-349.
- Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M., Couttet, P., Soond, D., van Dongen, S., Grocock, R., Das, P., Miska, E., *et al.* (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608-611.
- Ronshaugen, M., Biemar, F., Piel, J., Levine, M., and Lai, E. (2005). The *Drosophila* microRNA *iab-4* causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. *Genes Dev* 19, 2947-2952.
- Ruby, J., Jan, C., and Bartel, D. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83-86.
- Sachs, A., and Davis, R. (1989). The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell* 58, 857-867.
- Sachs, A., and Davis, R. (1990). Translation initiation and ribosomal biogenesis: involvement of a putative rRNA helicase and RPL46. *Science* 247, 1077-1079.
- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2005). Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 3, e235.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J., Chuang, J., Coetzee, G., and Jones, P. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Res* 66, 443-453.

- Sanvito, F., Piatti, S., Villa, A., Bossi, M., Lucchini, G., Marchisio, P., and Biffo, S. (1999). The beta4 integrin interactor p27(BBP/eIF6) is an essential nuclear matrix protein involved in 60S ribosomal subunit assembly. *J Cell Biol* 144, 823-837.
- Schnabel, H., and Schnabel, R. (1990). An Organ-Specific Differentiation Gene, *pha-1*, from *Caenorhabditis elegans*. *Science* 250, 686-688.
- Schnabel, R. (2002). Ballistic transformation of *C. elegans* (United States, Devgen N. V.).
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., and Greenberg, M.E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283-289.
- Schwarz, D., Tomari, Y., and Zamore, P. (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr Biol* 14, 787-791.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 243, 215-225.
- Si, K., and Maitra, U. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor. *Mol Cell Biol* 19, 1416-1426.
- Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell* 5, 659-669.
- SNP. *C. elegans* Single Nucleotide Polymorphism Data
In Washington University Genome sequencing center
(http://genome.wustl.edu/genome/celegans/celegans_snp.cgi).
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.
- Sylvestre, Y., De Guire, V., Querido, E., Mukhopadhyay, U., Bourdeau, V., Major, F., Ferbeyre, G., and Chartrand, P. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem* 282, 2135-2143.
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H., and Mello, C.C. (2002). The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109, 861-871.
- Thai, T., Calado, D., Casola, S., Ansel, K., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frenthewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J., *et al.* (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316, 604-608.
- Thompson, B., and Cohen, S. (2006). The Hippo pathway regulates the bantam microRNA to control cell proliferation and apoptosis in *Drosophila*. *Cell* 126, 767-774.
- Thomson, J., Newman, M., Parker, J., Morin-Kensicki, E., Wright, T., and Hammond, S. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20, 2202-2207.
- Tijsterman, M., Okihara, K.L., Thijssen, K., and Plasterk, R.H. (2002). PPW-1, a PAZ/PIWI protein required for efficient germline RNAi, is defective in a natural isolate of *C. elegans*. *Curr Biol* 12, 1535-1540.
- Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.

- Tops, B., Plasterk, R., and Ketting, R. (2006). The *Caenorhabditis elegans* Argonautes ALG-1 and ALG-2: almost identical yet different. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 189-194.
- van Rooij, E., Sutherland, L., Qi, X., Richardson, J., Hill, J., and Olson, E. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316, 575-579.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934.
- Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J., and Lee, S. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21, 744-749.
- Wicks, S., Yeh, R., Gish, W., Waterston, R., and Plasterk, R. (2001). Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nat Genet* 28, 160-164.
- Wienholds, E., Koudijs, M.J., van Eeden, F.J., Cuppen, E., and Plasterk, R.H. (2003). The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nat Genet* 35, 217-218.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
- Wu, H., Xu, H., Miraglia, L., and Crooke, S. (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol Chem* 275, 36957-36965.
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4034-4039.
- Xu, P., Vernooy, S.Y., Guo, M., and Hay, B.A. (2003). The *Drosophila* MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. *Curr Biol* 13, 790-795.
- Yeom, K., Lee, Y., Han, J., Suh, M., and Kim, V. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acid Res* 34, 4622-4629.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.
- Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.C., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J., and Mello, C.C. (2006). Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 127, 747-757.
- Yoo, A.S., and Greenwald, I. (2005). LIN-12/Notch activation leads to microRNA-mediated down-regulation of Vav in *C. elegans*. *Science* 310, 1330-1333.
- Zeng, Y., and Cullen, B. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acid Res* 32, 4776-4785.
- Zhang, L., Ding, L., Cheung, T., Dong, M., Chen, J., Sewell, A., Liu, X., Yates, J.r., and Han, M. (2007). Systematic identification of *C. elegans* miRISC proteins, miRNAs, and mRNA targets by their interactions with GW182 proteins AIN-1 and AIN-2. *Mol Cell* 28, 598-613.
- Zhao, T., Li, G., Mi, S., Li, S., Hannon, G., Wang, X., and Qi, Y. (2007a). A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* 21, 1190-1203.

- Zhao, Y., Ransom, J., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A., Tsuchihashi, T., McManus, M., Schwartz, R., and Srivastava, D. (2007b). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 129, 303-317.
- Zhao, Y., Samal, E., and Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436, 214-220.

Annexe 1: microARN détectés comme associés à ALG-1 selon l'utilisation de 1, 2 ou 4mg de protéines

Name	ID	N2-1mg	N2-2mg	N2-4mg	AL-1mg	AL-2mg	AL-4mg
cel-let-7	emc1	0	0	228	368	454	9425
cel-lin-4	emc2	0	0	0	0	0	286
cel-miR-1	emc3	0	0	0	0	350	1681
cel-miR-124	emc61	0	0	201	0	587	524
cel-miR-2	emc4	0	0	0	345	0	2472
cel-miR-227	emc90	0	0	0	0	442	268
cel-miR-228	emc62	0	0	283	0	0	296
cel-miR-229	emc63	234	0	781	0	2440	4864
cel-miR-230	emc64	0	0	3959	2304	60640	62077
cel-miR-231	emc65	0	0	0	0	1031	1983
cel-miR-232	emc66	0	0	0	0	0	676
cel-miR-233	emc67	0	0	708	691	6185	8850
cel-miR-234	emc68	0	0	406	0	1658	2904
cel-miR-235	emc69	0	0	0	0	0	215
cel-miR-236	emc70	0	0	322	0	293	364
cel-miR-237	emc71	0	0	0	0	247	0
cel-miR-238	emc72	251	0	0	0	0	261
cel-miR-239a	emc73	0	0	0	0	0	632
cel-miR-239b	emc74	260	0	444	297	707	5463
cel-miR-240	emc75	0	0	1122	479	1986	7173
cel-miR-241	emc76	0	0	0	0	0	275
cel-miR-242	emc77	557	0	0	0	210	629
cel-miR-243	emc78	0	0	376	0	791	1602
cel-miR-244	emc79	0	0	0	0	0	249
cel-miR-245	emc80	262	0	0	0	0	0
cel-miR-246	emc81	0	0	0	0	0	0
cel-miR-247	emc82	0	0	0	0	0	638
cel-miR-248	emc83	0	0	0	0	520,5	1335
cel-miR-249	emc84	0	0	0	0	0	0
cel-miR-250	emc85	0	0	253	0	517	363
cel-miR-251	emc86	0	0	467	0	1364	2539
cel-miR-252	emc87	0	226	0	0	228	900
cel-miR-253	emc88	0	0	0	0	347	249
cel-miR-254	emc89	0	0	0	0	0	0
cel-miR-256	emc91	0	0	0	0	541	664
cel-miR-257	emc92	0	0	0	0	0	352
cel-miR-258	emc93	0	0	733	0	1879	3477
cel-miR-259	emc94	0	0	0	0	203	373
cel-miR-260	emc95	0	0	0	0	242	235
cel-miR-261	emc96	218	0	0	0	0	0
cel-miR-262	emc97	0	0	0	0	0	0
cel-miR-264	emc98	0	0	0	0	0	0
cel-miR-265	emc99	0	0	0	0	0	0
cel-miR-266	emc100	0	0	0	0	250	0
cel-miR-267	emc101	0	0	0	0	0	0
cel-miR-268	emc102	0	0	0	0	204	0
cel-miR-269	emc103	0	0	0	0	0	0
cel-miR-270	emc104	0	0	0	0	0	0
cel-miR-271	emc105	0	0	0	0	0	0
cel-miR-272	emc106	0	0	0	0	0	0
cel-miR-273	emc107	0	0	301	0	0	0
cel-miR-34	emc5	0	0	0	0	0	336
cel-miR-35	emc6	0	0	0	0	0	0
cel-miR-353	emc140	0	229	0	0	0	0
cel-miR-354	emc141	0	0	0	0	0	0
cel-miR-355	emc142	0	0	0	0	0	0
cel-miR-356	emc143	0	0	0	0	0	0
cel-miR-357	emc144	0	0	0	0	0	0
cel-miR-358	emc145	0	0	0	0	0	0
cel-miR-359	emc146	0	0	0	0	0	0
cel-miR-36	emc7	0	0	623	230	217	7481

cel-miR-360	emc147	0	0	0	0	0	0
cel-miR-37	emc8	0	0	0	0	0	1914
cel-miR-38	emc9	238	0	0	0	0	0
cel-miR-39	emc10	0	0	239	262	0	7623
cel-miR-392	emc148	0	0	0	0	0	0
cel-miR-40	emc11	0	0	0	0	0	443
cel-miR-41	emc12	0	0	0	0	0	0
cel-miR-42	emc13	0	0	1623	613	14758	15846
cel-miR-43	emc14	0	0	0	0	0	201,5
cel-miR-44	emc15	0	0	228	0	530	867
cel-miR-45	emc16	0	0	221	0	878	1560
cel-miR-46	emc17	0	0	0	0	0	0
cel-miR-47	emc18	0	0	330	0	930	2347
cel-miR-48	emc19	0	0	0	0	0	0
cel-miR-49	emc20	0	0	636	420	2759	4273
cel-miR-50	emc21	0	0	0	0	213	250
cel-miR-51	emc22	0	0	0	0	288	286
cel-miR-52	emc23	0	0	0	0	0	0
cel-miR-53	emc24	218	0	211	0	0	209
cel-miR-54	emc25	0	0	0	239	0	11428
cel-miR-55	emc26	0	0	0	0	0	647
cel-miR-56	emc28	0	0	0	0	0	0
cel-miR-56*	emc27	0	0	508	263,5	3015	8873,5
cel-miR-57	emc29	0	0	0	0	0	851
cel-miR-58	emc30	0	0	0	0	1575	3506
cel-miR-59	emc31	0	0	266	338	336	14093
cel-miR-60	emc32	0	0	0	0	397	3673
cel-miR-61	emc33	0	0	0	0	0	0
cel-miR-62	emc34	0	0	0	0	282	4587
cel-miR-63	emc35	0	0	238	0	0	0
cel-miR-64	emc36	0	0	0	0	0	0
cel-miR-65	emc37	0	0	932	241	3810	7116
cel-miR-66	emc38	281	0	252	0	0	206
cel-miR-67	emc39	223	0	0	0	289	440
cel-miR-68	emc40	0	0	1566	418	19944	20651
cel-miR-69	emc41	0	0	1118	599	9997	14004
cel-miR-70	emc42	0	0	746	0	2866,5	5464
cel-miR-71	emc43	0	0	468	669	3249	4320
cel-miR-72	emc44	0	0	331	0	538	1044
cel-miR-73	emc45	0	0	0	0	0	0
cel-miR-74	emc46	0	0	0	0	1612	2062
cel-miR-75	emc47	0	0	0	0	209	0
cel-miR-76	emc48	0	0	214	0	220	410
cel-miR-77	emc49	0	0	0	0	0	4358
cel-miR-78	emc50	786	0	0	0	410	704
cel-miR-79	emc51	0	0	0	0	0	0
cel-miR-80	emc52	0	0	452	0	407	7787
cel-miR-81	emc53	663	0	574	325	2533	8333
cel-miR-82	emc54	0	0	0	0	340	634
cel-miR-83	emc55	0	0	0	382	447	12902
cel-miR-84	emc56	266	0	0	0	0	311
cel-miR-85	emc57	0	0	255	222	4959	7681
cel-miR-86	emc58	0	0	0	0	0	695
cel-miR-87	emc59	0	0	0	0	0	0
cel-miR-90	emc60	0	0	0	0	0	0

Annexe 2: Étude des microARN associés à ALG-1 au cours des stades développementaux

Name	ID	ALG-L1	ALG-L2	ALG-L3	ALG-L4	ALG-Ad	Input ALG-L1	Input ALG-L2	Input ALG-L3	Input ALG-L4	Input ALG-Ad	N2-L1	N2-L2	N2-L3	N2-L4	N2-AD
cel-let-7	emc1	0	0	0	1700	9425	0	268	0	999	2777	0	0	0	0	228
cel-lin-4	emc2	0	0	451	0	286	0	671	0	0	0	0	238	0	0	0
cel-miR-1	emc3	1465	1388	4074	2217	1681	1403	1271	1717	297	646	0	377	0	229	0
cel-miR-124	emc61	0	559	1187	227	524	272	0	0	0	598	0	357	0	0	201
cel-miR-2	emc4	0	333	2260	12258	2472	707	1334	677	0	377	0	402	0	0	0
cel-miR-227	emc90	0	0	0	0	268	487	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-228	emc62	0	0	0	0	296	264	348	0	0	0	0	496	0	0	283
cel-miR-229	emc63	2853	5325	8469	2414	4864	17917	775	782	1139	1273	735	801	369	0	781
cel-miR-230	emc64	9232	42709	62915	29909	62077	45654	15000	61169	9030	41736	2208	2684	2545	485	3959
cel-miR-231	emc65	1132	902	1324	1299	1983	3478	965	916	763	1966	0	552	0	0	0
cel-miR-232	emc66	1582	334	1490	0	676	2767	0	277	349	267	0	288	0	0	0
cel-miR-233	emc67	1720	1986	5928	3156	8850	3146	1286	2051	2200	5015	0	544	0	0	708
cel-miR-234	emc68	6821	3734	5158	1660	2904	8013	1765	800	1465	1134	228	539	0	0	406
cel-miR-235	emc69	0	0	0	0	215	0	0	0	0	0	0	462	0	0	0
cel-miR-236	emc70	203	215	454	0	364	0	311	0	290	0	0	377	0	0	322
cel-miR-237	emc71	0	0	205	0	0	0	0	0	0	0	0	268	0	0	0
cel-miR-238	emc72	0	0	0	0	261	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-239a	emc73	216	308	818	428	632	0	317	0	0	321	0	0	0	0	0
cel-miR-239b	emc74	3563	6184	10413	5594	5463	5886	3262	6779	1759	2400	338	622	392	783	444
cel-miR-240	emc75	8323	4107	6432	12033	7173	34870	6960	23891	1127	9692	927	1462	528	652	1122
cel-miR-241	emc76	0	0	0	0	275	0	391	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-242	emc77	960	378	631	1654	629	1207	854	1214	0	348	0	0	0	0	0
cel-miR-243	emc78	974	741	1931	697	1602	1815	610	1562	308	955	0	501	0	252	376
cel-miR-244	emc79	0	0	565	0	249	0	201	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-245	emc80	0	0	0	597	0	0	772	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-246	emc81	0	0	0	0	0	0	251	0	0	0	0	244	0	0	0
cel-miR-247	emc82	0	525	1082	2365	638	571	436	985	640	0	0	343	0	0	0
cel-miR-248	emc83	1049	512	1684	739	1335	858	781	386	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-249	emc84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	248	0	0	0
cel-miR-250	emc85	0	316	670	0	363	0	334	0	226	317	0	439	0	0	253
cel-miR-251	emc86	2491	5168	5605	1601	2539	5547	1554	1817	1703	1673	0	475	0	0	467
cel-miR-252	emc87	806	688	352	895	900	2505	1737	917	413	1430	0	494	0	0	0
cel-miR-253	emc88	0	0	292	0	249	0	353	0	0	0	253	367	0	0	0
cel-miR-254	emc89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	232	0	0	0
cel-miR-256	emc91	0	0	458	0	664	0	392	222	0	842	0	0	0	0	0
cel-miR-257	emc92	0	0	568	550	352	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-258	emc93	1491	1183	2665	399	3477	1889	421	516	882	1183	0	455	0	0	733
cel-miR-259	emc94	0	235	864	0	373	0	270	0	301	0	0	209	0	0	0
cel-miR-260	emc95	0	0	0	0	235	0	0	0	0	0	0	393	0	0	0
cel-miR-261	emc96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	487	0	0	0
cel-miR-262	emc97	0	0	0	0	0	0	244	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-264	emc98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	289	224	0	0	0
cel-miR-265	emc99	0	0	0	0	0	0	439	0	0	0	0	244	0	0	0
cel-miR-266	emc100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	396	0	0	0
cel-miR-267	emc101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	243	0	0	0
cel-miR-268	emc102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	359	0	0	0
cel-miR-269	emc103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	334	0	0	0
cel-miR-270	emc104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-271	emc105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-272	emc106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	206	0	0	0
cel-miR-273	emc107	0	0	0	0	0	0	204	0	0	0	0	445	0	0	301
cel-miR-34	emc5	0	0	0	653	336	0	345	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-35	emc6	0	0	0	0	0	0	283	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-353	emc140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-354	emc141	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-355	emc142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-356	emc143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-357	emc144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	215	0	0	0
cel-miR-358	emc145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	238	0	0	0
cel-miR-359	emc146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-36	emc7	0	0	444	476	7481	0	496	0	480	672	0	0	0	0	623
cel-miR-360	emc147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	226	0	0	0
cel-miR-37	emc8	0	0	0	0	1914	0	550	0	0	0	0	243	0	0	0
cel-miR-38	emc9	593	0	239	360	0	521	456	330	0	0	0	360	0	0	0
cel-miR-39	emc10	328	326	1975	1173	7623	560	566	821	524	353	207	0	0	0	239
cel-miR-392	emc148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-40	emc11	0	0	0	0	443	0	370	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-41	emc12	0	0	0	0	0	0	257	0	0	0	0	402	0	0	0
cel-miR-42	emc13	0	14212	43520	7669	15846	0	1205	6956	5366	3326	0	970	488	522	1623
cel-miR-43	emc14	0	0	420	0	202	0	435	0	0	382	0	359	0	0	0

cel-miR-44	emc15	473	744	1762	484	867	1182	554	813	523	526	0	422	0	0	228
cel-miR-45	emc16	726	1151	1355	2737	1560	5762	1389	3205	500	1388	0	238	0	0	221
cel-miR-46	emc17	0	0	0	0	0	0	343	0	0	0	0	225	0	0	0
cel-miR-47	emc18	240	725	836	591	2347	876	1409	582	691	2282	0	434	0	0	330
cel-miR-48	emc19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-49	emc20	1548	3898	9335	2856	4273	5996	3350	4369	1183	2027	471	618	0	0	636
cel-miR-50	emc21	362	273	255	0	250	886	310	0	0	0	0	449	0	0	0
cel-miR-51	emc22	0	0	0	0	286	0	456	0	0	0	0	362	0	0	0
cel-miR-52	emc23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	593	335	0	0	0
cel-miR-53	emc24	0	0	0	0	209	0	0	0	0	0	0	329	0	0	211
cel-miR-54	emc25	289	981	5394	1340	11428	2314	659	5576	0	2403	700	491	415	0	0
cel-miR-55	emc26	298	470	963	245	647	434	497	0	218	396	0	396	0	0	0
cel-miR-56	emc28	0	0	0	0	0	0	568	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-56*	emc27	0	257	4957	3933	8874	0	364	4693	1610	7856	0	571	0	800	508
cel-miR-57	emc29	320	262	754	271	851	676	485	364	271	0	0	0	0	0	0
cel-miR-58	emc30	4582	1100	1585	1449	3506	19046	1484	3416	580	2575	412	316	0	0	0
cel-miR-59	emc31	629	956	3021	5495	14093	1554	1119	1564	1269	408	0	327	0	0	266
cel-miR-60	emc32	2305	1809	5462	1865	3673	6199	1231	5284	877	1366	400	0	0	0	0
cel-miR-61	emc33	0	0	0	0	0	0	394	0	0	0	0	286	0	0	0
cel-miR-62	emc34	0	0	0	0	4587	0	303	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-63	emc35	0	0	0	0	0	0	353	0	0	0	0	351	0	0	238
cel-miR-64	emc36	0	0	0	0	0	0	204	0	0	0	0	211	0	0	0
cel-miR-65	emc37	5440	8191	24922	4292	7116	22303	6533	14000	3254	3573	1094	925	715	0	932
cel-miR-66	emc38	0	0	0	0	206	0	0	0	0	0	1078	502	0	0	252
cel-miR-67	emc39	827	263	537	0	440	1613	318	0	0	0	0	289	0	0	0
cel-miR-68	emc40	26420	19127	34457	8656	20651	16936	1391	3970	4005	1767	1002	1067	559	0	1566
cel-miR-69	emc41	3875	4257	7793	4575	14004	2339	1562	1996	1070	4226	1196	505	0	0	1118
cel-miR-70	emc42	15794	5839	15052	1878	5464	27937	2321	1818	4426	4566	363	631	0	0	746
cel-miR-71	emc43	709	1195	1722	3996	4320	3491	1842	5002	1256	7966	0	268	0	210	468
cel-miR-72	emc44	222	625	971	1159	1044	430	544	0	0	0	0	334	0	0	331
cel-miR-73	emc45	0	0	0	0	0	258	0	0	0	0	0	269	0	0	0
cel-miR-74	emc46	0	0	3329	843	2062	0	0	542	655	722	0	0	0	0	0
cel-miR-75	emc47	0	0	0	0	0	0	351	0	0	0	0	362	0	0	0
cel-miR-76	emc48	0	0	0	0	410	0	0	0	0	0	0	426	0	0	214
cel-miR-77	emc49	726	975	3691	1093	4358	1021	556	645	468	268	0	343	0	0	0
cel-miR-78	emc50	2586	2224	3843	1733	704	2171	566	1526	360	364	0	0	0	0	0
cel-miR-79	emc51	0	309	341	624	0	666	772	933	0	355	0	0	0	0	0
cel-miR-80	emc52	1182	2044	10263	1397	7787	2003	930	1282	389	330	486	435	260	0	452
cel-miR-81	emc53	3312	1603	3708	5957	8333	2832	2795	3916	907	6616	0	493	0	542	574
cel-miR-82	emc54	1078	407	1344	717	634	1626	409	606	0	0	0	205	0	0	0
cel-miR-83	emc55	539	739	3523	6288	12902	1642	1029	3250	2855	3008	0	512	0	0	0
cel-miR-84	emc56	555	406	670	727	311	1678	2886	2558	687	537	0	392	0	259	0
cel-miR-85	emc57	5005	3219	9054	1065	7681	1013	524	0	0	411	0	332	0	0	255
cel-miR-86	emc58	218	383	976	522	695	0	244	0	300	0	0	213	0	0	0
cel-miR-87	emc59	0	0	0	0	0	0	471	0	0	0	0	0	0	0	0
cel-miR-90	emc60	0	0	0	804	0	0	253	0	0	0	0	246	0	0	0