

NELLIE GIGUÈRE

**IDENTIFICATION DE PARTENAIRES POTENTIELS
DE LA PROTEINE ALG-1
Découverte de nouveaux joueurs dans la voie des microARNs**

Mémoire présentée
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 en science (M.Sc)

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2011

Résumé

Les miARNs, de courts ARNs non codant de 19 à 22 nucléotides, responsables de la répression traductionnelle, d'approximativement 30 % des ARNm codant. Ils agissent par appariement de base sur des régions situées en 3'UTR des ARNm ciblés. Pour ce faire, les protéines argonautes s'associent aux miARNs et forment le complexe effecteur miRISC (*microRNA-Induced Silencing Complex*). Les mécanismes d'action de ce complexe ne sont pas bien compris et certains autres facteurs inconnus pourraient avoir un rôle important. Nous avons identifié, par criblage double hybride, plusieurs interacteurs de la protéine ALG-1, une argonaute impliquée dans la voie des miARNs chez *C. elegans*. Nous avons aussi mis en évidence un groupe de protéases homologues aux cathepsines humaines. Pour évaluer l'implication des cathepsines dans la voie des miARNs, nous avons utilisé un essai luciférase nous permettant d'apprécier l'effet de l'inhibition de ces protéases sur la traduction d'un ARNm réprimé par un miARN.

Avant-propos

Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai participé à l'élaboration de deux articles, l'un est toujours en révision chez *EMBO J.* et l'autre est accepté chez *JEM*. Le premier (en révision chez *EMBO J.*) est décrit brièvement dans le mémoire et s'intitule « *Conserved function of a ribosomal protein RACK1 in the microRNA pathway* ». Jannot G. Bajan S. et coll. consiste en la description d'une fonction conservée de la protéine ribosomale RACK1 dans la voie des microARNs. Étant donné que l'article est présentement en révision, vous trouverez uniquement le résumé en Annexe I. Dans cet article, j'ai réalisé les expériences dont les résultats sont présentés dans la Figure supplémentaire 1 (Figure 10 de ce mémoire) et y décrivent la caractérisation de l'interaction entre ceRACK1 et ALG-1 par la méthode du double hybride.

Le deuxième article auquel j'ai participé au cours de ma maîtrise s'intitule : « *A critical role of microRNAs in human pulmonary arterial hypertension. MiR-204 : a novel therapeutic target* ». Il est maintenant accepté chez *Journal of Experimental Medicine (JEM)*. Cet article décrit l'interaction entre miR-204 et les voies impliquées dans l'hypertension pulmonaire artérielle (HTAP). On y propose de cibler le microARN miR-204 pour traiter la maladie. En résumé, nous montrons que les cellules des patients atteints d'HTAP présentent une diminution de miR-204. Le rétablissement du niveau de miR-204 dans les cellules malades et dans les poumons de rats auxquels on a induit la maladie entraîne une amélioration de la condition, une diminution de la prolifération des cellules malades et une augmentation de l'apoptose, permettant ainsi de renverser l'HTAP.

L'article décrit aussi une voie de signalisation qui explique les effets de la diminution de miR-204 dans l'HTAP. Mon rôle dans cet article était de trouver la cible directe de miR-204 par des essais luciférase. Les plasmides utilisés dans ces essais étaient composés de régions 3' non-codantes (3'UTR) de gènes candidats déterminés *in silico* et potentiellement ciblés par miR-204. J'ai développé la méthode d'essai luciférase dans les cellules HeLa avec ces 3'UTR que j'ai cloné dans les plasmides utilisés. Les résultats obtenus montrent que dans les cellules HeLa, miR-204 ne cible pas directement le 3'UTR de NFATc1 et que

dans les cellules malades, SHP2 est régulé par miR-204 (Figure supplémentaire 4c et Figure 4b respectivement). Au final, cette collaboration m'a donné l'opportunité de développer une méthode très intéressante dans le cadre de la détection de cible de miARNs. Étant donné que l'article était en révision lors de l'écriture initiale de ce mémoire et aussi parce que je n'aborde pas le sujet dans ce dernier, vous trouverez uniquement le résumé en Annexe II.

Remerciements

Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai eu la chance de travailler en collaboration avec plusieurs personnes. Tout d'abord, j'aimerais remercier le Dr. Martin Simard de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Un merci aussi aux membres du laboratoire passé et présent pour avoir participé aux discussions concernant mes travaux ou même de m'avoir aidée dans certains cas.

Je veux aussi remercier le Dr. Sébastien Bonnet et son étudiante au doctorat, Audrey Courboulin, pour m'avoir invité à collaborer avec eux pour un article maintenant accepté.

Un remerciement aussi à la Dr. Josée Lavoie qui m'a fourni des conseils et des inhibiteurs dans le cadre du projet avec les cathepsines ainsi qu'à Éric Paquet pour son expertise en statistiques et en alignement de séquences.

Finalement, j'aimerais remercier Samir Bouasker pour son précieux soutien tout au long de ma maîtrise et son aide pour la rédaction de ce mémoire.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	II
AVANT-PROPOS.....	III
REMERCIEMENTS.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	X
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1. LES MICROARNS.....	2
1.1.1. <i>La découverte des microARNS</i>	3
1.1.2. <i>Synthèse des microARNS</i>	4
1.1.3. <i>Mécanismes de régulation posttranscriptionnel par les miARNS</i>	12
1.1.4. <i>Les facteurs d'interaction connus des argonautes</i>	21
1.2. OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	24
CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION DE FACTEURS INTERAGISSANT AVEC ALG-1.....	25
2.1. LE NÉMATODE <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> ET SON UTILISATION DANS LE CRIBLAGE.....	25
2.2. RÉSULTATS.....	29
2.2.1. <i>Le criblage double hybride</i>	29
2.2.2. <i>Double Hybride avec l'interacteur ceRACK1</i>	34
2.2.3. <i>Double hybride Domaine de Liaison à ALG-1 des protéases</i>	38
CHAPITRE 3 : HYPOTHÈSE : LES CATHEPSINES SONT IMPLIQUÉES DANS LA VOIE DES MIARNS.....	42
3.1. LES CATHEPSINES HUMAINES.....	42
3.2. RÉSULTATS.....	44
3.2.1. <i>Essais rapporteurs luciférase</i>	44
3.2.2. <i>Essais luciférase avec des inhibiteurs de cathepsines B, L et H</i>	46
3.2.3. <i>La cathepsine E</i>	48
3.2.4. <i>L'inhibiteur de let-7</i>	53
DISCUSSION.....	55
I. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	55
II. CONCLUSION.....	63

MATÉRIEL ET MÉTHODES	64
I. CRIBLAGE DOUBLE HYBRIDE	64
II. PLASMIDES	65
III. DOUBLE HYBRIDE	66
IV. ESSAIS TAQMAN	67
V. CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTION	67
VI. LE TRAITEMENT DES CELLULES	68
VII. ESSAIS LUCIFÉRISE.....	68
ANNEXE I	69
ANNEXE II	70
ANNEXE III	71
BIBLIOGRAPHIE	73

Liste des tableaux

Tableau 1: Courts ARNs impliqués dans les voies d'interférence à l'ARN et groupés par classes	1
Tableau 2 : Facteurs d'interaction trouvés par la méthode du double hybride	33
Tableau 3: Protéases homologues aux cathepsines trouvées par le criblage double hybride	44
Tableau 4 : Liste des constructions et des amorces utilisées.....	66
Tableau 5 : Tableau complet des facteurs qui interagissent avec ALG-1	71

Liste des figures

Figure 1 : Biogenèse des miARNs jusqu'à leur fonction sur leur ARNm	5
Figure 2 : Arbre des relations phylogénétiques des protéines argonautes.....	11
Figure 3 : Domaines structuraux d'une protéine argonaute	12
Figure 4 : Schéma des facteurs principaux impliqués à l'initiation de la traduction.....	14
Figure 5 : Mécanismes de répression de la traduction par les miARNs.	17
Figure 6 : Phénotypes de <i>C. elegans</i> avec ARN interférence sur les protéines argonautes ALG-1 et ALG-2... 27	27
Figure 7 : Défauts des « seam cells » associés aux mutants perte de fonction de <i>lin-4</i> , <i>let-7</i> et <i>lin-41</i>	27
Figure 8 : Le rôle des miARNs dans le développement du ver.....	29
Figure 9 : Schéma de la méthode du double hybride.	30
Figure 10 : Interaction double hybride des ALG-1 et ceRACK1.....	36
Figure 11 : Alignement des protéines ALG-1 et ALG-2 qui sont impliquées dans la voie des miARNs.	38
Figure 13 : Double hybride Domaine de Liaison à ALG-1 (DLA1).....	41
Figure 14 : ARNm de la <i>Renilla</i> luciférase du vecteur psiCHECK2.	45
Figure 15 : Graphique contrôle de l'essai rapporteur luciférase.	46
Figure 16 : Essais luciférase avec traitement de différentes drogues chez les HeLa.	47
Figure 17 : Modèle de recyclage du complexe miRISC aux endosomes/MVBs.	49
Figure 18 : Expression relative d'ARNm de la cathepsine E dans les cellules HeLa et Huh-7.....	50
Figure 19 : Essais luciférase avec traitement de différentes drogues chez les Huh-7.	51
Figure 20 : Expression relative d'ARNm de la cathepsine E dans les cellules Huh-7 traitées soit avec le siARN contrôle ou le siARN contre la cathepsine E (siCTSE).	52
Figure 21 : Essais luciférase avec traitement siARN contre la cathepsine E chez les Huh-7.	52
Figure 22 : Essais luciférase avec traitement le <i>hsa-let-7 miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitors</i>	54
Figure 23 : Expression relative du miARN <i>let-7</i> dans les cellules Huh-7 et HeLa.	54

Liste des abréviations

PCR :	Réaction en chaîne de polymérisation
Kpb :	Kilo paires de bases
TAQ :	ADN polymérase Thermophile isolé de la bactérie <i>Thermus aquaticus</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
TM :	Température de fusion
siARN :	<i>small interfering RNA</i>
piARN :	<i>piwi-interacting RNA</i>
CTSE :	Cathepsine E
ADNss :	<i>Salmon Sperm Carrier DNA</i>
DGCR8 :	<i>Di George Critical Region 8</i>
RNaseIII :	Ribonucléase H
ARNdb :	ARN double brin
ARNsb :	ARN simple brin
Nts :	Nucléotides
Exp5 :	Exportin 5
ATP :	Adénosine triphosphate
TRBP :	<i>Human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein</i>
PACT :	<i>Protein activator of PKC</i>
LOQS :	<i>Loquacious</i>
miRISC :	<i>microRNA-induced silencing complex</i>
miRLC :	<i>microRNA loading complex</i>
PABP1 :	<i>Poly(A) binding protein 1</i>
IRES :	<i>Internal ribosome entry site</i>
CAT-1 :	<i>Cationic aminoacid transporter 1</i>
Poly(A) :	Queue polyadénine
DDH :	motif catalytique, D :acide aspartique, H :histidine
pri-microARN :	miARN primaire
pre-miARN :	Précurseur miARN
ALG :	<i>Argonaute-like protein</i>
SEM :	<i>Standard error of the mean</i>
3AT :	3-Amino-1,2,4-triazole
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
PAZ :	<i>Piwi Argonaute Zwiller</i>
PIWI :	<i>P-element-Induced Wimpy Testis</i>
MVB :	<i>Multivesicular bodies</i>
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
LRRK2 :	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
GARP :	<i>Golgi-associated-retrograde protein complex</i>
P-Bodies :	<i>Processing bodies ou Corps-P</i>
DLA1 :	Domaine de liaison à ALG-1
RACK1 :	<i>Receptor for Activated C-Kinase</i>

ceRACK1 :	<i>C. elegans</i> RACK1
HTAP :	Hypertension pulmonaire artérielle
YAPD :	<i>yeast adenine peptone dextrose</i>
LiAc :	<i>Lithium acetate</i>
PEG :	<i>Poly(ethylene glycol)</i>
Z-VAD-fmk :	<i>Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone</i>
Q-VD-OPH :	<i>N-(Quinolyl)valyl-aspartyl-difluorophenoxymethylketone</i>
PKC :	Protéine Kinase C
UTR :	<i>Untranslated region</i>
NK :	<i>Natural Killer</i>
WD :	Domaine riche en tryptophane et en aspartate

Chapitre 1 : Introduction

Depuis seulement 20 ans que les courts ARNs non-codant impliqués dans les mécanismes d'interférences par l'ARN sont connus. Ils agissent tous de concert avec une protéine de type argonaute afin de reconnaître, par complémentarité de base, leur ARNm cible et de le réguler de façon posttraductionnelle. Jusqu'à présent, on dénombre plusieurs classes de ces courts ARNs présentées dans le Tableau 1, quoique les trois principales soient les microARNs, les siARNs et les piARNs décrites plus en détails ci-dessous.

Tableau 1: Courts ARNs impliqués dans les voies d'interférence à l'ARN et groupés par classes ¹. Leurs longueurs moyennes et leurs fonctions sur l'ARNm cible sont décrites brièvement.

Class	Length (nt)	Function
MicroRNA (miRNA)	19–25	Translational repression
Small interfering RNA (siRNA)	19–21	Target mRNA cleavage
Trans-acting siRNA (tasiRNA)	21–22	mRNA cleavage
Small-scan RNA (scnRNA)	~28	DNA elimination
Repeat-associated siRNA (rasiRNA)	24–27	Transposon control transcriptional silencing
Pwi-interacting RNA (piRNA)	26–31	Transposon control in germ cells

D'abord, les microARNs (miARNs) sont de courtes molécules d'ARN endogènes caractérisées par leur longueur de 19 à 25 nucléotides, leur biogenèse et leur mode d'action. Il consiste en la reconnaissance de leur ARNm cible par complémentarité de base imparfaite située, de façon générale, dans la région 3' non-codante aussi appelée 3'UTR. Ils ont comme fonction de réguler la traduction des ARNm ciblés, majoritairement en réprimant leur production protéique. Puisqu'ils ciblent un grand nombre d'ARNm, ils sont impliqués dans plusieurs processus : le développement, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, le contrôle de voies métaboliques, etc.

Ensuite, les siARNs sont d'une longueur d'environ 19 à 21 nucléotides et ils sont principalement caractérisés par leur mode d'action qui consiste en la reconnaissance de l'ARNm cible sur la région codante de façon parfaitement complémentaire. En fait, ils mènent systématiquement à la dégradation de cet ARNm après son clivage par la protéine

argonaute. La voie des siARNs est impliquée chez la plante, le ver et les insectes dans la défense antivirale ². De la levure à l'humain, les siARNs contribuent aussi au remodelage de la chromatine ³. De plus, cette voie est beaucoup utilisée en recherche comme moyen d'atténuer l'expression d'un gène de façon hautement spécifique.

Enfin, les piARNs sont les courts ARNs les plus longs, environ 26 à 31 nucléotides, retrouvés uniquement dans les cellules germinales. Ils sont appelés ainsi puisqu'ils sont pris en charge par les protéines argonautes de type PIWI aussi localisées dans les cellules germinales. Ils ont le rôle d'empêcher l'action des transposons dans ces cellules et ainsi d'assurer le maintien de l'intégrité du génome qui sera transmis à la prochaine génération ⁴.

De ces classes, les microARNs sont l'objet principal de ce mémoire. Dans le but de bien intégrer les concepts de bases ainsi que les interrogations soulevées, une courte introduction historique et une description détaillée des recherches y sont présentées en introduction.

1.1. Les microARNs

Les miARNs sont des molécules très conservées à travers l'évolution, elles se retrouvent chez les animaux et les plantes, mais aussi chez des organismes unicellulaires tels que *Chlamydomonas reinhardtii* ^{5, 6}. Ces courts ARNs simples brins non-codant de 19 à 25 nucléotides régulent l'expression d'environ 30 % des gènes codant pour une protéine d'après une estimation basée sur les outils bio-informatiques disponibles ⁷. D'ailleurs, cette répression traductionnelle dépend aussi des protéines argonautes qui forment le complexe miRISC avec le miARN et potentiellement d'autres facteurs cellulaires (*microRNA-induced silencing complex*). Ce complexe riboprotéique initie la répression posttranscriptionnelle des gènes ^{8, 9}. Le fonctionnement du miRISC n'est pas parfaitement compris, en revanche, on sait que chez les animaux, le miARN se fixe généralement, de façon partiellement complémentaire, sur la région 3'UTR de son ARNm cible. Cette fixation entraîne la répression de la traduction et parfois même la dégradation de l'ARNm. De cette façon, les microARNs affectent plusieurs voies cellulaires importantes telles que le contrôle du développement ¹⁰, les voies métaboliques ¹¹. Leur mauvaise expression peut aussi mener au

développement de plusieurs maladies telles que le cancer ¹². Il existe aussi des microARNs qui se fixent ailleurs que sur le 3'UTR de l'ARNm cible. Ainsi, d'autres modes de régulation tels qu'une activation de la traduction par les miARNs, ont été observés ^{13, 14}. Dans ce mémoire, ces cas particuliers ne seront pas abordés.

1.1.1. La découverte des microARNs

La découverte de ces courts ARNs remonte à 1992 avec le premier microARN découvert par hasard. Les travaux de Victor Ambros, de 1987 à 1991, ayant pour but de trouver des mutants hétérochroniques chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, ont été déterminants. Ces phénotypes typiques d'un dysfonctionnement au cours du développement l'ont amené à découvrir le locus du gène *lin-14* ¹⁵. Cette découverte a ensuite mené un autre groupe à expliquer que la région 3'UTR de ce gène est nécessaire pour la régulation négative de *lin-14* ¹⁶. Deux ans plus tard, le premier miARN, *lin-4*, a été décrit comme étant une courte molécule d'ARN complémentaire à une région dans le 3'UTR de *lin-14* ¹⁷. De 1993 à 1999, il a été décrit que *lin-4* agit de façon posttranscriptionnelle sur *lin-14* ¹⁸, que le duplex *lin-4/lin-14* n'est pas parfaitement complémentaire ¹⁹ et qu'ainsi, la régulation négative de *lin-14* est dépendante de *lin-4* ²⁰. Toutes ces découvertes étaient certes très intéressantes. Par contre, les spécialistes ont cru que ce phénomène était propre au nématode étudié puisque à ce moment, *lin-4* et *lin-14* n'avaient aucun homologue connu dans le règne animal.

À l'aube du 21^{ème} siècle, un intérêt croissant pour ces courts ARNs a vu le jour avec la découverte de *let-7* et sa cible principale *lin-41* par le groupe de Gary Ruvkun, toujours chez le nématode *C. elegans* ^{21, 22}. Il s'est avéré que *let-7* avait une homologie dans plusieurs organismes du règne animal et plus précisément chez les bilatériens ²³. La conservation de ce miARN, entre les espèces, a fait exploser les recherches qui se sont dirigées à l'identification de mécanismes d'action et de biogenèse de ces courts ARNs. Au même moment, la découverte de plusieurs courts ARNs tels que les piARNs et les siARNs ont faite surface, c'est le *boom* des petits ARNs.

1.1.2. Synthèse des microARNs

1.1.2.1. Biogenèse nucléaire du miARN

1.1.2.1.1. Transcription du pri-miARN

Les miARNs sont transcrits soit par l'ARN polymérase II (pol II)^{24, 25} soit par l'ARN polymérase III (pol III)²⁶. En majorité, la pol II est la plus utilisée puisque plusieurs miARNs sont situés dans la région codante de gènes²⁷. Par contre, l'ARN polymérase III est aussi très importante puisqu'elle transcrit le plus grand groupe de miARNs connu chez l'humain, le C19MC. Il encode 46 pre-microARNs à lui seul à partir d'un promoteur propre à la pol III, le 7SL²⁶.

Le produit de transcription forme de miARN primaire (pri-miARN) et devra subir des changements avant d'être sous une forme fonctionnelle²⁸. Ces pri-miARNs se composent normalement d'une boucle terminale qui est suivie d'une épingle double-brin de 33 paires de bases, celle-ci se termine par deux bouts flanquants simples brins (Figure 1).

De plus, on connaît une grande diversité de localisation des miARNs dans les génomes, ce qui explique la diversité de mécanismes de transcription. Plusieurs miARNs sont retrouvés dans les régions introniques de gènes activement transcrits. Ils dépendent donc de la transcription de ce gène pour leur propre transcription²⁷. D'autres sont retrouvés dans la région codante de gènes ou même dans les régions intergéniques²⁹. La régulation de leur transcription peut être dépendante ou indépendante de celle du gène où ils sont localisés. Si elle est indépendante du gène ou que le miARN se trouve dans une région intergénique, la transcription du miARN peut résulter de leur propre promoteur tel que dans le cas de miR-21 dans le gène TMEM49³⁰. Toujours de façon indépendante, la transcription de certains miARNs est contrôlée par des facteurs de transcriptions tels que c-Myc et p53^{31, 32}. Bref, il y a plusieurs modes de régulation de la transcription des miARNs et il serait faux d'affirmer que tous les miARNs sont transcrits à même leur gène de localisation³³. Enfin,

plusieurs miARNs tendent à se regrouper dans le génome, de sorte que l'on suppose qu'il leur est plus facile de réguler leur transcription^{26, 34, 35}. En somme, leur distribution variée dans le génome permet de croire à une grande diversité de mécanismes de transcription et de régulation transcriptionnelle.

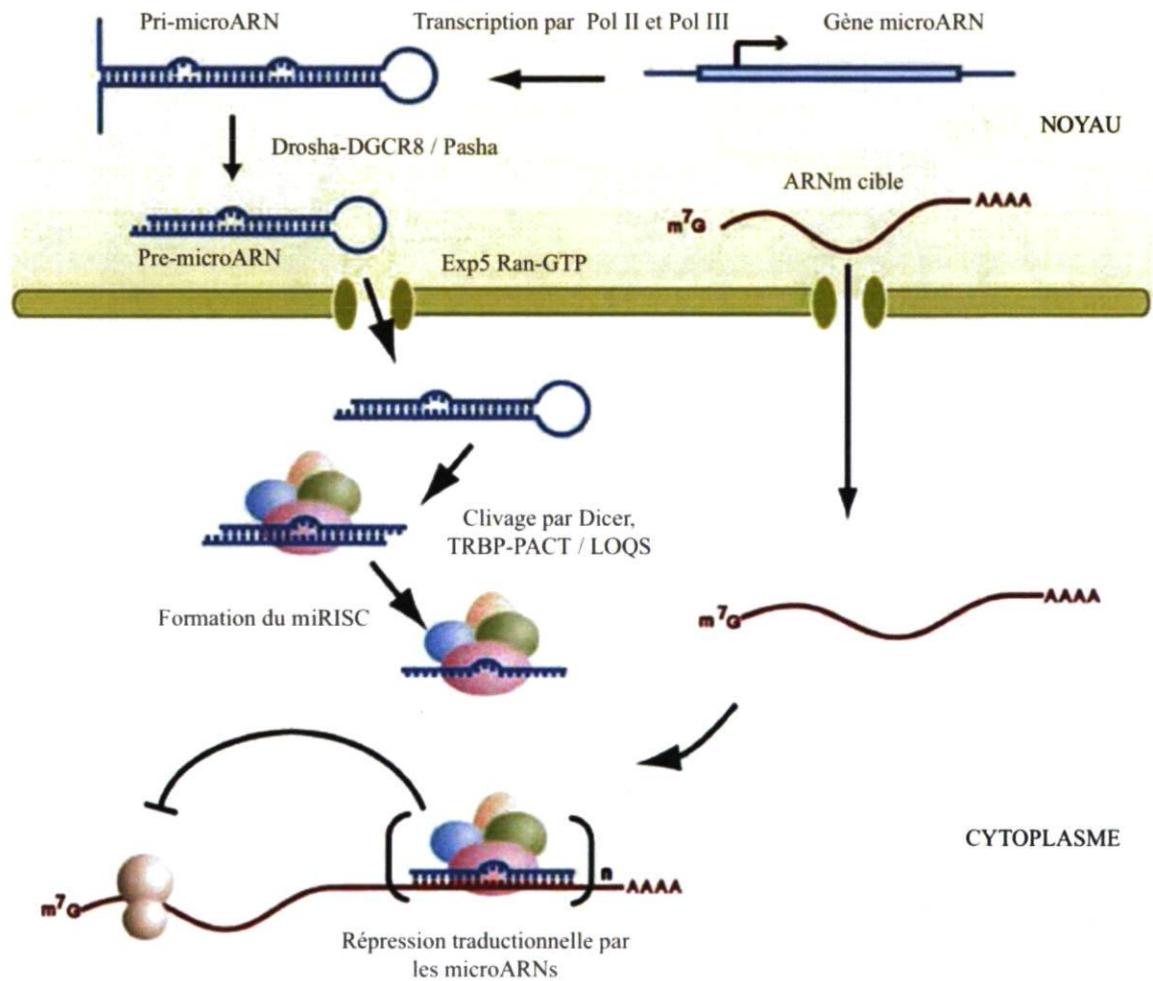


Figure 1 : Biogenèse des miARNs jusqu'à leur fonction sur leur ARNm cible¹. La transcription par l'ARN Polymérase II ou III est suivie du clivage par le complexe Drosha-DGCR8/Pasha au noyau. L'exportin 5 est responsable de l'exportation du pri-miARN au cytoplasme où il est pris en charge et clivé par Dicer. À la suite de ce clivage, il y a formation du complexe miRISC avec une protéine argonaute et autres facteurs inconnus. Le complexe fonctionnel formé s'associe par complémentarité de base au 3'UTR de l'ARNm

cible. Il y a nécessairement mésappariement dans cette reconnaissance et ensuite, la répression de la traduction a lieu.

1.1.2.1.2. Clivage par le complexe Drosha-DGCR8/Pasha

Le pri-miARN, au noyau, doit subir une transformation avant son export dans le cytoplasme. Le complexe Drosha-DGCR8 chez l'humain, aussi appelé microprocesseur (Drosha-Pasha chez *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*), est responsable du clivage du pri-miARN en pre-miARN (Figure 1)^{28, 36-38}. Drosha est une protéine du type RNase III et elle est responsable du clivage du pri-miARN. Par ailleurs, elle a besoin de son cofacteur DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) ou Pasha, dépendant de l'organisme, pour effectuer ce clivage. DGCR8 (Pasha) reconnaît le pri-miARN par deux facteurs. Premièrement, DGCR8 (Pasha) contient deux domaines de liaison à l'ARN double brin, ils sont essentiels à la reconnaissance des 33 paires de bases du pri-miARN et deuxièmement, il sait reconnaître les deux bouts simples brins du pri-miARN³⁹. Suite à la reconnaissance spécifique et à l'interaction avec le pri-miARN, avec DGCR8 (Pasha) stabilise Drosha au bon endroit sur le pri-miARN qui catalyse la réaction de clivage à onze paires de bases de la jonction simple/double brin du pri-miARN⁴⁰.

Le clivage par le complexe Drosha-DGCR8/Pasha s'effectue en parallèle avec la transcription et l'épissage de l'ARNm dans lequel se trouve le miARN⁴¹. Une autre classe de miARNs existe, ce sont les *Mirtrons*, ils représentent environ 5-10% de tous les miARNs chez les vertébrés et invertébrés. Ils ne diffèrent des miARNs que par la biogenèse du pre-miARN. En effet, ces derniers n'ont pas besoin de l'étape de clivage par Drosha-DGCR8/Pasha puisqu'ils sont générés directement par l'épissage des introns par le *spliceosome*^{41, 42}.

Le produit de clivage du microprocesseur ou du *spliceosome* se nomme pre-miARNs. Sa structure se résume en un ARN de 60 à 100 nucléotides ayant un aspect d'épingle à cheveux, c'est-à-dire une extrémité bouclée suivit d'un bout double-brins se terminant avec un bout flanquant de 3 nucléotides à l'extrémité 3'. Cette marque est caractéristique du clivage par les enzymes de type RNase III, comme Drosha.

1.1.2.1.3. Exportation du pre-miARN dans le cytoplasme

Chez les mammifères, le pre-miRNA migre ensuite vers le cytoplasme à l'aide de l'Exportin 5 (EXP5) (Figure 1). Son rôle dans la biogenèse des miARNs était soupçonné avant d'être confirmé puisque Gwizdek et coll.⁴³ ont montré que l'EXP5 était responsable de l'export de la molécule d'adénovirus VA1 qui possède les mêmes attributs que le pre-miARN. Les caractéristiques essentielles pour l'exportation étaient d'avoir un bout d'ARN double-brin d'un minimum de 20 paires de bases ainsi que d'avoir un bout 3' flanquant d'un minimum de trois nucléotides⁴³. Yi et coll. ont ensuite montré que le pre-miARN peut se lier et être transporté hors du noyau à l'aide de l'Exportin-5-Ran-GTP⁴⁴. La GTPase Ran couplée au GTP est aussi nécessaire à l'EXP5 pour l'export des pre-miARNs^{45,46}. Par la suite, l'atténuation par ARN interférence de l'EXP5 montre une diminution des miARNs sous leurs formes fonctionnelles dans le cytoplasme alors que la quantité de pre-miARN du noyau n'est pas affectée⁴⁵. En somme, l'Exportin 5 est une protéine importante dans la biogenèse des miARNs puisqu'elle permet le transport des pre-miARNs au cytoplasme où ils vont subir des transformations afin d'atteindre leur forme finale.

L'orthologue de l'Exportin 5 chez la drosophile joue aussi le rôle d'export des pre-miARNs⁴⁷. Chez le nématode *C. elegans*, l'orthologue de l'EXP5 n'existe pas. Par ailleurs, Büssing et coll. ont rapporté que la protéine XPO-1 est nécessaire à l'accumulation normale du miARN *let-7*⁴⁸. XPO-1 est un récepteur d'export nucléaire, elle pourrait, par le fait même, jouer le rôle d'exportation du pre-miARN hors du noyau chez cet organisme⁴⁸.

1.1.2.2. Synthèse finale du miARN dans le cytoplasme

1.1.2.2.1. Clivage par Dicer

Dicer est responsable du clivage du pre-miARN en miARN sous sa forme finale⁴⁹⁻⁵² (Figure 1). Cette RNase III est très conservée entre les espèces, entre autres chez les plantes, les animaux et même la levure *S. pombe*⁵⁰. Elle est nécessaire à la fois pour la voie du RNAi par la production des siARNs qui implique un clivage d'ARNdb en courts ARNs d'environ 22 nucléotides ainsi qu'à la voie des miARNs où elle clive le pre-miARN près de

la boucle terminale ⁴⁹⁻⁵². Tout comme Drosha, Dicer fait partie de la famille des nucléases RNase III. Elle est composée de quatre types de domaine : un domaine hélicase, un domaine PAZ, deux domaines RNase III et un domaine de liaison à l'ARNdb. Son domaine PAZ qui lie le 3' flanquant résultant du clivage par Drosha est séparé par environ 65 Å du domaine RNase IIIa, ce qui, après le clivage, correspond à environ 25 nucléotides de longueur ⁵³. Cette reconnaissance de l'extrémité 3' du pre-miARN doit diriger le clivage par Dicer et ainsi éliminer sa boucle. Les courts ARNs résultants ont tous un bout flanquant caractéristique de deux nucléotides en 3' et ils sont d'environ 19 à 23 nucléotides.

La protéine Dicer humaine a été produite en recombinante afin d'étudier ses caractéristiques biochimiques plus en profondeur. Elle a été montrée pouvant se lier et cliver des ARNdb en courts ARNs de 21-23 nucléotides ^{54, 55}. Provost et coll. ⁵⁴ ont aussi montré que le pre-*let-7* était clivé en un ARNsb de 21-22 nts tandis que les longs ARNdb produisent des ARNdb de 21-22 nucléotides ce qui confirme le rôle de Dicer dans les voies respectives des miARNs et de l'ARN interférent.

Chez l'humain et la drosophile, Dicer s'associe à des protéines capables de lier l'ARNdb et essentielles à la biogenèse des miARNs. Chez la mouche à fruits, Dicer-1 lie Loquacious (LOQS) ⁵⁶⁻⁵⁸ alors que chez l'humain, ce sont les protéines TRBP et PACT qui s'associent à Dicer ⁵⁹⁻⁶¹ (Figure 1). Les détails biochimiques des rôles de ces protéines sont encore peu compris. Par contre il est connu que TRBP, (*human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*) contient trois domaines de liaison à l'ARNdb ⁶². Elle servirait à la formation du complexe miRISC, elle ne serait pas nécessaire au clivage par Dicer bien qu'elle soit importante pour sa stabilité. Lorsque TRBP est mutée la biogenèse des miARNs est affectée ⁵⁹. Il en est de même pour la protéine LOQS chez la Drosophile ⁵⁸. PACT (*Protein Kinase K Activator*) est aussi une protéine de liaison à l'ARNdb, elle a un impact dans la voie d'interférence par l'ARN ainsi que sur l'accumulation des miARNs. Par contre, tout comme TRBP elle n'est pas nécessaire au clivage médié par Dicer bien qu'elle fasse partie du complexe protéique ⁶⁰. Chez *C. elegans* les orthologues de ces protéines, s'il y en a, ne sont pas connus. Plusieurs facteurs se trouvant dans le même

complexe que Dicer ont été identifiés, seul les rôles de ALG-1 et ALG-2 sont connus dans la voie des miARNs^{51, 52, 63}.

1.1.2.2. Les protéines argonautes et la prise en charge du miARN

Les protéines argonautes sont les protéines effectrices du complexe miRISC pour l'inhibition des ARNm. Le noyau de ce complexe se compose d'une protéine argonaute associée au miARN simple brin. Les argonautes sont conservées à travers les espèces et sont caractérisées en trois groupes de paralogues : le groupe *Argonaute-like*, le groupe *piwi-like* et le groupe 3 qui est spécifique à *C. elegans* (Figure 2). Le nombre d'argonautes varie d'une espèce à l'autre, jusqu'à présent, 8 argonautes sont connues chez l'humain, 5 chez *D. melanogaster*, 26 chez *C. elegans*, 10 chez la plante *A. thaliana* et une seule chez la levure *S. pombe*.

La structure des protéines argonautes se compose de quatre domaines principaux, le domaine N-Terminal, le domaine PAZ, le domaine MID et le domaine PIWI (Figure 3). Les domaines PAZ et PIWI sont les domaines caractéristiques des argonautes, le rôle de ces domaines est encore peu connu en ce sens que dans chaque organisme il semble y avoir des différences dans leur fonctionnement. Néanmoins, le rôle prédit du domaine PAZ serait de lier l'ARN simple brin ce qui lui permettrait de rester associé à l'argonaute. Dans le même sens, le rôle prédit du domaine PIWI serait de cliver l'ARN⁶⁴. Effectivement, le domaine PIWI a une homologie avec les RNase H et contiennent un motif capable de cliver des molécules d'ARN, ce domaine est composé de deux aspartates et une histidine et se nomme : motif DDH. Ce motif permet de lier les ions Mg^{2+} importants à l'activité endonucléase des argonautes⁶⁵. Dans la voie de l'ARN interférence, il est très important pour le clivage de l'ARNm cible et sa dégradation subséquente.

D'autre part, il est maintenant connu que les argonautes jouent parfois des rôles spécifiques dans les voies de répression de la traduction par l'ARN. Par exemple, chez le nématode *C. elegans*, ALG-1 et ALG-2 sont nécessaires à la répression traductionnelle par la voie des miARNs^{66, 67}. Par contre, chez l'humain et la drosophile cette spécification

n'est pas aussi claire, les argonautes impliquées dans la voie des miARNs seraient aussi impliquées dans la voie des siARNs ^{64, 68, 69}. Le choix de la protéine argonaute pour une voie de répression par l'ARN (miARN ou siARN) est toujours mal compris. Quelques caractéristiques sont connues pour être essentielles à la répartition des argonautes, mais il reste encore beaucoup d'interrogations à ce sujet. Une de ces caractéristiques est la structure des courts ARNs, par exemple, les miARNs contiennent des mésappariements contrairement aux siARNs ^{67, 69}. Cette différence intervient dans la reconnaissance spécifique des argonautes dans la voie des miARNs et celle des siARNs.

Pour faire suite à la prise en charge par la protéine argonaute, le miARN doit se trouver sous sa forme simple brin pour être fonctionnel; le brin passager (miARN*) doit disparaître. Deux hypothèses sont toujours acceptées, la première est que le miARN* pourrait être clivé et dégradé pour ne garder que le miARN fonctionnel. La deuxième hypothèse est que le clivage du brin passager n'aurait pas lieu, mais qu'une hélicase séparerait les deux brins d'ARN et l'argonaute resterait avec le miARN fonctionnel ^{70, 71}. Bref, ces mécanismes ne sont toujours pas élucidés.

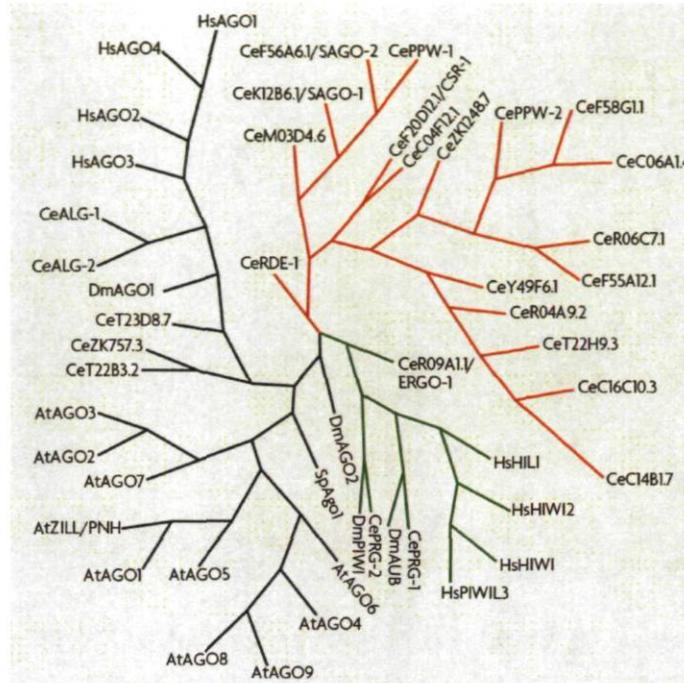


Figure 2 : Arbre des relations phylogénétiques des protéines argonautes. En noir, le groupe des *Argonautes-like* qui se trouve chez les plantes, les animaux et les levures. En vert, le groupe des *Piwi-like* et en rouge c'est le groupe 3 spécifique au nématode *C. elegans*. At, *Arabidopsis thaliana*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Hs, *Homo sapiens*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*.⁶⁴

La prise en charge du miARN par l'argonaute est encore peu comprise. Une hypothèse est que chez l'humain et la Drosophile, les protéines TRBP/PACT et LOQS, respectivement, couplées à Dicer jouent un rôle important dans cet assemblage final. Lorsqu'elles sont absentes, on remarque une diminution des miARNs fonctionnels pris en charge par les argonautes⁵⁸⁻⁶⁰. Un modèle proposé est que le miRLC (*miRNA Loading Complex*) serait composé de Dicer-TRBP-PACT-AGO2 chez l'humain et cliverait le pre-miARN. Par la suite, on ne connaît pas exactement le mécanisme par lequel on passe de la forme double brin à simple brin. Différents modèles sont évoqués dans la littérature et le plus courant serait la participation d'une activité hélicase de provenance inconnue. Finalement, le miARN et l'argonaute seraient relâchés pour former complexe miRISC fonctionnel connu⁷².



Figure 3 : Domaines structuraux d'une protéine argonaute (AGO2 humaine dans ce cas-ci)⁶⁴. Le domaine N-Terminal, le domaine PAZ qui lie l'ARN, le domaine MID incluant le motif MC de reconnaissance de la coiffe par l'argonaute et le domaine PIWI responsable du clivage de l'ARN lorsqu'il y a lieu⁷³.

1.1.3. Mécanismes de régulation posttranscriptionnel par les miARNs

1.1.3.1. L'interaction miARN-ARNm

Les mécanismes de répression de la traduction par les miARNs sont encore peu compris. La répression commence par une interaction par complémentarité de base imparfaite entre le miARN et l'ARNm. Sauf exception, cette règle est suivie et se fait majoritairement en 3'UTR de l'ARNm. La complémentarité imparfaite semble suivre plusieurs règles précises et mises en évidence expérimentalement. La première régit une région dite *seed sequence*, région de nucléation, qui correspond aux nucléotides 2 à 8 du miARN à partir de l'extrémité 5'. C'est l'endroit du miARN qui lie l'ARNm de façon continue et parfaitement appariée. La deuxième règle dicte qu'il doit y avoir absence d'appariement des nucléotides 10 à 12, du moins, dans la région centrale du miARN ce qui préviendrait le clivage de l'ARNm par l'argonaute. La troisième règle veut qu'il y ait une autre région complémentaire du miARN à l'ARNm qui stabiliserait l'interaction, en outre, des mésappariements sont tout de même tolérés dans cette région^{74, 75}. Par ailleurs, il y a une corrélation entre le nombre de miARN qui lie l'ARNm cible, qu'ils soient identiques ou différents et le niveau de répression observé⁷⁶.

À ces règles s'ajoute le contexte du 3'UTR dans lequel sont situés les sites des miARNs. Il est aussi essentiel à la répression de la traduction par les miARNs. Par exemple, dans un système chez *C. elegans*, Didiano et coll. ont montré que les sites du miARN *lgy-6* sur son 3'UTR *cog-1* doivent être dans leurs positions endogènes pour avoir une répression

efficace ⁷⁷. De plus, Grimson et coll. ont observé plusieurs facteurs contextuels importants pour une répression efficace de la traduction par les miARNs. Par exemple, la proximité des sites des miARNs, une composition riche en résidus AU près des sites, des bases additionnelles aux positions 12 à 17 du miARN ainsi que la position des sites de miARN qui se situe loin du centre du 3'UTR sont tous des facteurs qui ont été observés ⁷⁵. En bref, plusieurs caractéristiques semblent importantes pour que la répression traductionnelle par les miARNs ait lieu. La fixation par complémentarité imparfaite de bases, ainsi que le contexte du 3'UTR sont importants. Malgré tout, il est encore difficile de prédire si un site de miARN donné est fonctionnel sur le 3'UTR ciblé.

1.1.3.2. Modes de répression de la traduction

Avant de décrire en détail les modes de répression, une courte introduction portant sur le fonctionnement de la traduction s'impose. La traduction de l'ARNm se divise en trois grandes étapes, l'initiation, l'élongation et la terminaison. Le point de départ de cette initiation est la reconnaissance de la coiffe m⁷G en 5' terminale de l'ARNm par le facteur d'initiation eIF4E (Figure 4). Ce dernier est un composant du complexe appelé facteur d'initiation eucaryotique de la transcription, eIF4F. Il contient aussi eIF4G qui a comme rôle d'ancrer plusieurs autres facteurs d'initiation de la traduction. Le recrutement de ces facteurs initiatiques est aussi nécessaire pour le recrutement des sous-unités ribosomales 40S et 60S qui amorceront l'élongation. Aussi, eIF4G a un important domaine de liaison à la protéine PABP1 (*Poly(A)-Binding Protein 1*) qui est une protéine associée à la queue poly(A) de l'ARNm. Cette interaction a pour conséquence de circulariser l'ARNm ce qui stimule alors l'initiation de la traduction et possiblement le recyclage des ribosomes (Figure 4) ⁷⁸.

La protéine eIF6, importante pour l'initiation de la traduction, joue son rôle à un autre stade de l'initiation. Cette protéine n'est pas un facteur d'initiation, par ailleurs, elle est requise pour la biogenèse de la sous-unité ribosomale 60S et elle est considérée comme un facteur de dissociation ⁷⁹. En ce sens, elle prévient l'association précoce des sous-unités ribosomales 40S et 60S.

Un mode d'initiation de la traduction indépendante de la structure de la coiffe existe aussi. Ce dernier est spécifique à certains ARNm qui possèdent un site interne d'entrée du ribosome, IRES (*Internal Ribosome Entry Site*). Ces éléments IRES contournent la nécessité de la coiffe en recrutant, par différents moyens, les ribosomes à l'ARNm et y permettent la traduction de ce dernier⁸⁰.

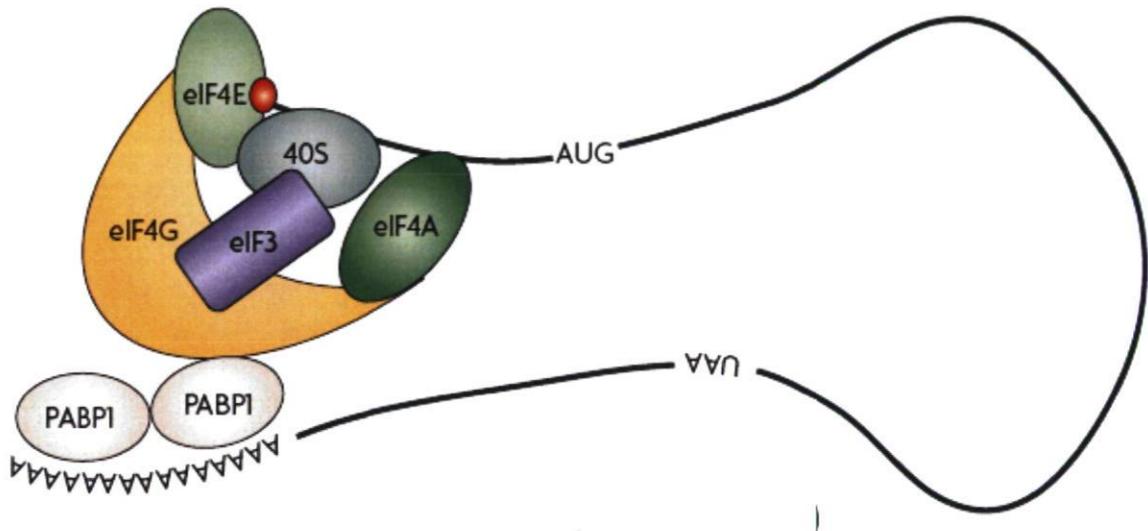


Figure 4 : Schéma des facteurs principaux impliqués dans l'initiation de la traduction. Le facteur eIF4E entre en jeu en premier à la reconnaissance de la coiffe, faisant partie du complexe eIF4F. eIF4E, eIF4G et eIF4A, y sont recrutés. Le facteur eIF4G joue un rôle d'ancrage de plusieurs protéines, il possède des domaines de liaison à la fois pour eIF4E et PABP1. PABP1 est en interaction avec la queue poly(A), sa liaison avec eIF4G est importante pour la circularisation de l'ARNm qui est aussi une étape de l'initiation de la traduction.

Les mécanismes de répression de la traduction par les miARNs semblent vastes et surtout, ils sont encore très mal compris. Certaines évidences ont montré que cette répression se fait à partir de l'initiation de la traduction, tandis que d'autres montrent qu'il y a traduction active pendant la répression de la traduction par les miARNs. Par contre, il n'y a rien qui exclut la répression de la traduction par l'un ou l'autre des modes proposés. Enfin, beaucoup de recherches dans ce domaine sont encore nécessaires afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette répression activée par les miARNs.

1.1.3.2.1. Répression de la traduction à l'initiation

Dans le but de comprendre la mécanistique d'inhibition de la traduction par des miARNs, quelques équipes ont vérifié où se trouvent les ARNm réprimés par des expériences de gradient de polysomes. En effet, ces expériences permettent de savoir si l'ARNm d'intérêt est ou non en présence de polyribosomes actifs. Dans le cas où l'ARNm est en traduction active, il va se retrouver dans la fraction lourde du gradient et au contraire, s'il n'est pas en traduction active, il se retrouvera dans la fraction légère du gradient puisqu'aucun ribosome ne l'aura pris en charge. D'abord, dans la lignée cellulaire humaine HeLa, des ARNm rapporteurs, qui sont des cibles du miARN *let-7* endogène, sont observés dans la fraction légère du gradient de polysome⁸¹. Ensuite, dans la lignée cellulaire d'hépatome Huh-7, l'ARNm CAT-1 (*Cationic aminoacid transporter 1*) ciblé par le miR-122, se retrouve dans la fraction légère du polysome en condition de croissance favorable⁸². Enfin, chez le nématode *C. elegans*, les cibles endogènes de *let-7*, *daf-12* et *lin-14* se retrouvent aussi dans la phase légère du gradient de polysome⁸³. Finalement, dans ces trois expériences, ils suggèrent que l'ARNm ciblé par les miARNs est réprimé à son initiation puisqu'il n'y a pas de prise en charge de l'ARNm par les polyribosomes (Figure 5 (2)).

Un autre argument important pour l'hypothèse de répression à l'initiation de la traduction est la structure de la coiffe des ARNm qui est nécessaire pour cette répression par les miARNs. Dans les cellules HeLa, des ARNm rapporteurs ont été construits pour comprendre le rôle de la coiffe dans ce mécanisme de répression. Avec des constructions contenant une coiffe fonctionnelle ou un IRES, la structure de la coiffe fonctionnelle s'est avérée nécessaire à la répression de l'ARNm par les miARNs^{81, 84}. Ceci suggère que l'initiation de la traduction est essentielle lors de la répression par les miARNs. Aussi, Humphrey et coll.⁸⁴ suggèrent plus précisément que la fonction ou le recrutement du facteur de reconnaissance de la coiffe eIF4E serait affecté puisque ce facteur n'est pas recruté lors d'une traduction par IRES contrairement à d'autres facteurs d'initiation tels que eIF4G.

Pour faire suite à l'hypothèse d'un dysfonctionnement du recrutement de eIF4E à la coiffe m⁷G, une interaction compétitive de eIF4E et AGO2 a aussi été proposée ⁷³. La protéine AGO2, par résidus aromatiques et homologie de domaine avec eIF4E, aurait la faculté d'interagir directement avec la coiffe et par le fait même d'inhiber l'initiation de la traduction. Par contre, cette hypothèse a été très controversée puisqu'un autre groupe a trouvé que ces mêmes résidus aromatiques sont impliqués dans l'interaction de AGO2 avec GW182, une protéine aussi impliquée dans la voie des miARNs ⁸⁵. De plus, des analyses de séquences approfondies et de modélisation de structure par Kinch et Grishin réfutent totalement l'homologie entre eIF4E et AGO2 proposée par Kiriakidou et coll. ^{73, 86}. Enfin, en 2010, Djuranovic et coll. ont montré que le domaine MID des argonautes possède deux domaines de liaison, l'un reconnaît la coiffe m⁷G de l'ARNm en 5' et l'autre reconnaît le miARN simple-brin ⁸⁷. En résumé, la répression de la traduction par les miARNs est dépendante de la coiffe m⁷G, et les argonautes auraient la faculté de lier cette coiffe et fort probablement d'entrer en compétition avec le facteur d'initiation eIF4E (Figure 5(2)).

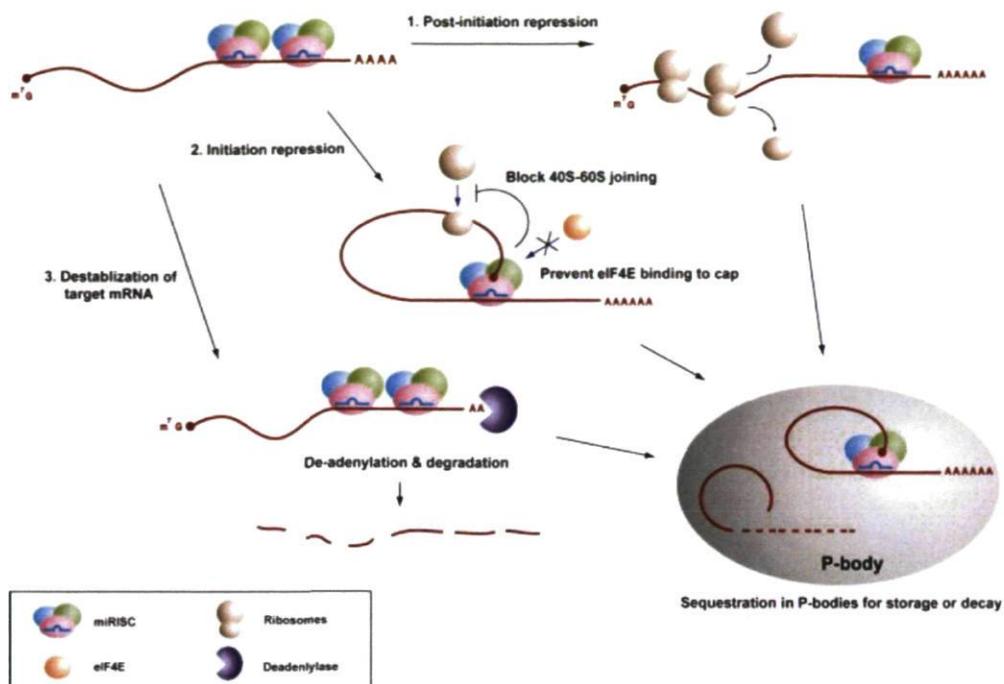


Figure 5 : Mécanismes de répression de la traduction par les miARNs. Le complexe miRISC reconnaît l'ARNm cible à son 3'UTR et en réprime sa traduction par différents mécanismes. (1) Dans la répression postinitiation, le miARN bloque la traduction après son initiation et inhibe la synthèse de la protéine totale. (2) La répression à l'initiation de la traduction par le miRISC inhibe l'entrée en traduction de l'ARNm. Ce modèle requiert la présence d'une coiffe m⁷G et implique la liaison de l'argonaute à la coiffe, ce qui prévient le recrutement de eIF4E, un facteur d'initiation essentiel. Aussi, le miRISC bloque l'assemblage du ribosome 80S par le recrutement de eIF6 qui lie la sous-unité 60S et prévient son association avec la 40S, ce qui prévient l'initiation de la traduction. (3) Le mécanisme de répression par la déstabilisation de l'ARNm. La reconnaissance de l'ARNm par le miRISC induit sa déadenylation et mène à sa dégradation, et ce, en fonction de la protéine GW182/AIN-1. Dans chacun de ces mécanismes, les ARNm cibles du miRISC se retrouvent séquestrés dans les Corps-P, par contre, même si beaucoup de complexes de dégradation protéique se retrouvent dans ces derniers, rien ne prouve que les ARNm sont dégradés seulement à cet endroit. ¹

Par des systèmes d'extraits cellulaires, il a été montré que la répression de l'initiation de la traduction est dépendante de la coiffe de l'ARNm cible. Un système d'ARNm rapporteurs impliquant miR2 endogène dans des extraits d'embryons de drosophile montre bien l'inhibition de la traduction par ce miARN. De plus, une construction d'ARNm avec une coiffe non fonctionnelle a été utilisée dans le même système et il a été montré que l'ARNm n'est pas réprimé dans cette situation ⁸⁸. À l'aide d'un système d'extrait de

cellules tumorales d'ascites de souris Krebs-2, il a été montré que les ARNm n'ayant pas de coiffe, mais une séquence IRES ne sont pas régulés par les miARNs. De plus, l'augmentation du nombre de eIF4F, le complexe de reconnaissance de la coiffe, accroît la traduction des ARNm réprimés par les miARNs ⁸⁹. Ces deux systèmes montrent que la coiffe m⁷G fonctionnelle est nécessaire à la répression de la traduction par les miARNs. Puis, une autre étude, à partir d'extraits de cellules humaines HEK293, montre une déadenylation de l'ARNm ciblé par *let-7*. À l'aide d'ARNm rapporteurs qui ont été modifiés avec ou sans coiffe ni queue poly(A), il a été démontré que la coiffe ainsi que la queue poly(A) sont nécessaires à une répression efficace de l'ARNm ciblé ⁹⁰. Les auteurs proposent, dans ce cas, que la déadenylation ne soit pas la conséquence de la répression traductionnelle, elle serait une cause de cette répression en détruisant la synergie entre la coiffe et la queue poly(A). Ces structures sont d'ailleurs toutes deux importantes pour circulariser l'ARNm, une étape de l'initiation de la traduction. En effet, si l'interaction entre PAPB1 et le facteur eIF4G est brisée d'une façon ou d'une autre, l'initiation de la traduction est interrompue. Dans cette optique, Fabian et coll. ont décrit que la protéine GW182, maintenant connue pour faire partie du complexe miRISC, interagit directement avec PABP ⁹¹.

La dernière hypothèse qui appuie le modèle d'inhibition à l'initiation de la traduction est la prévention de l'assemblage du complexe ribosomal 80S (Figure 5(2)). Chendrimada et coll. ont montré par co-immunoprécipitation une interaction du facteur d'initiation de la traduction eIF6 avec le complexe AGO2-Dicer-TRBP ⁹². Ils ont aussi montré qu'une atténuation de eIF6 chez l'humain et chez *C. elegans* diminue la répression par les miARNs sur leurs ARNm. Le facteur eIF6 étant important pour la synthèse de la sous-unité 60S est aussi un facteur de dissociation du 80S, sa présence au complexe miRISC pourrait l'aider à inhiber la traduction de l'ARNm cible. Par contre, cette donnée est contestée dans le milieu, Filipowicz et coll. croient que ce résultat pourrait être interprété différemment ⁷. Suivant cette théorie, Eulalio et coll. ont montré que chez la drosophile, eIF6 n'a aucun effet sur la répression de la traduction par les miARNs. Ils ont montré qu'en atténuant eIF6 dans les cellules S2, malgré que ses autres fonctions connues sont affectées, la répression par les

miARNs ne l'est pas ⁹³. Finalement, il n'est toujours pas clair si le facteur eIF6 joue un rôle dans la fonction du complexe miRISC.

1.1.3.2.2. Répression postinitiation

La répression posttraductionnelle par les miARNs n'est toutefois pas exclue puisque certaines études l'appuient toujours fortement. Des gradients de polysomes montrent que les ARNm réprimés par les miARNs se retrouvent dans la fraction lourde, c'est-à-dire la portion où les polyribosomes sont en traduction active. Par exemple, chez *C. elegans*, *lin-4* et ses cibles, *lin-14* et *lin-28*, restent associés au polysome au moment où il y a une forte réduction de la quantité de protéine produite ^{20, 94}. Ces résultats impliquent que les ARNm réprimés soient activement traduits (Figure 5(1)).

Chez les mammifères, toujours par gradient de polysomes, plusieurs groupes ont montré que des ARNm réprimés par les miARNs se retrouvent dans la fraction de polysomes actifs ⁹⁵⁻⁹⁹. Plus précisément, Petersen et coll. ont émis comme modèle que la répression par les miARNs rendrait les ribosomes précaires à une terminaison précoce de la traduction des ARNm cibles ⁹⁵. Maroney et coll., pour leur part, ont montré que les miARNs sont associés à leurs ARNm cibles lorsqu'on les retrouve dans la fraction des polysomes actifs ⁹⁶. Nottrott et coll. ont aussi observé que leur ARNm rapporteur, activement réprimé par *let-7a*, ainsi que les composants du miRISC se retrouve dans les polysomes fonctionnels ⁹⁷. Par un système d'immunoprécipitation du polypeptide naissant, il leur est possible de suivre la formation de ce peptide. Grâce à ce système, ils ont montré que lorsque régulé négativement par un miARN, le peptide naissant n'est pas détectable par immunoprécipitation. Pour donner suite à ce résultat, ils proposent deux modèles : une protéase pourrait dégrader très rapidement le peptide naissant, le peptide naissant pourrait être masqué par des facteurs qui, subséquent, vont mener à la dégradation de ce peptide. Il est tout de même connu que cette dégradation n'est pas due au complexe du protéasome puisque son inhibiteur MG132 n'a aucun effet ⁹⁷.

En résumé, les mécanismes de répression activés par les miARNs proposés, qu'ils aient lieu à la phase d'initiation ou à un événement postérieur de la traduction, ne sont pas exclusifs entre eux et ils sont toujours mal compris.

1.1.3.2.3. La déadenylation et la dégradation des ARNm réprimés par les miARNs

En 2005, des groupes de recherche se sont aperçus que certains ARNm réprimés activement par les miARNs diminuaient aussi en quantité. Chez *C. elegans*, les miARNs *let-7* et *lin-4*, lors de la répression traductionnelle sur *lin-41* et *lin-14/lin-28* respectivement, mènent à une diminution de la quantité des ARNm ciblés¹⁰⁰. Rapidement, des facteurs tels que GW182, chez les mammifères et la drosophile, ainsi que AIN-1 et AIN-2, chez le nématode *C.elegans*, ont été identifiés comme facteurs interagissant avec les protéines argonautes¹⁰¹⁻¹⁰³. Ces protéines sont des composantes des Corps-P, sites de dégradation et de stockage d'ARNm, et puisqu'elles interagissent avec les protéines argonautes, les ARNm réprimés par les miARNs ainsi que les miARNs sont retrouvés dans ces sites de dégradation^{81, 104}. De plus, cette localisation est dépendante de la voie de répression traductionnelle par les miARNs¹⁰⁵.

La localisation des ARNm aux Corps-P est nécessaire à la déadenylation et à la dégradation de ceux-ci¹⁰⁶ (Figure 5(3)). Puisque la protéine GW182 (AIN-1 et AIN-2 chez *C. elegans*) est responsable de cette localisation, elle est aussi essentielle à la déadenylation des ARNm ciblés par des miARNs¹⁰³. De plus, la déadenylation et la dégradation subséquente des ARNm ciblés des miARNs requièrent plusieurs protéines. L'argonaute du complexe miRISC, GW182 qui interagit directement avec l'argonaute, CCR4-CAF1-NOT qui sont responsables de la déadenylation, DCP1-DCP2 responsables de la dégradation de la coiffe et XRN1 une autre protéine de dégradation sont nécessaire pour la déadenylation et la dégradation des ARNm¹⁰⁷. Toutes ces protéines se retrouvent dans les Corps-P. Chez *D. melanogaster*, il a été montré que GW182 augmente radicalement la dégradation des ARNm ciblés par les miARNs. Cette dégradation est possible puisque GW182, directement lié au miRISC, recrute les complexes de déadenylation CCR4 : NOT et de dégradation de

la coiffe ¹⁰³. Fabian et coll. ont montré l'interaction directe de GW182 et PABP qui est aussi nécessaire à la déadénylation des ARNm ciblés par les miARNs. Ils ont montré que la déadénylation était dépendante de PABP et CAF1 et qu'une précipitation de cette dernière montre une interaction avec CCR4 ⁹¹. Malgré tout, la répression traductionnelle par les miARNs n'est pas dépendante de la formation des Corps-P ¹⁰⁵. En résumé, il a été montré que la répression de la traduction activée par les miARNs peut mener à la déadénylation et à la dégradation des ARNm cibles ¹⁰⁸. Ces ARNm réprimés sont pris en charge par le complexe miRISC qui comprend la protéine GW182 nécessaire à la formation des Corps-P où les complexes de déadénylation et de dégradation de la coiffe peuvent dégrader ces ARNm.

1.1.4. Les facteurs d'interaction connus des argonautes

Le cœur du complexe miRISC tel que vu précédemment est composé du miARN et d'une protéine argonaute. Par contre, tous les mécanismes, et les questions encore soulevées, de la voie de répression traductionnelle par les miARNs doivent impliquer plusieurs autres facteurs. L'identification de facteurs interagissant avec les protéines argonautes de la voie des miARNs est donc une étape importante pour la compréhension des mécanismes impliqués. Plusieurs facteurs sont identifiés, certains ont un rôle décrit ou sont considérés comme essentiels au fonctionnement de la voie, d'autres n'ont pas de fonction connue. Ceux qui jouent un rôle critique dans la voie des miARNs sont de plus en plus nombreux. Tel que décrit ci-dessus dans la section sur la protéine Dicer, Chendrimada et coll. ont caractérisé un complexe chez l'humain contenant AGO2, Dicer, TRBP et PACT ¹⁰⁹. Ce complexe est principalement tenu responsable d'une étape importante de la biogenèse du miARN. Premièrement, Dicer est responsable du clivage du pre-miARN en miARN. Son atténuation chez les organismes modèles tels que la cellule HeLa et *C. elegans* résulte en une accumulation de pre-miARNs ^{49, 51}. Deuxièmement, l'atténuation de TRBP déstabilise Dicer et résulte en un manque de biogenèse des miARNs ⁵⁹. Troisièmement, l'atténuation de PACT réduit aussi considérablement la biogenèse des miARNs ⁶⁰. Chez la drosophile, l'atténuation de la protéine LOQS, aussi associée à Dicer, mène à une accumulation de pre-miARN dans les cellules S2 ⁵⁸. D'autre part, ce complexe

est nécessaire pour la prise en charge du miARN par l'argonaute, en conséquence, il est considéré comme le miRLC (*miRNA RISC Loading Complex*)^{59,110}.

Pour sa part, le complexe miRISC est responsable de la reconnaissance de l'ARNm cible et de sa répression traductionnelle. Le cœur du complexe est composé de la protéine argonaute et du miARN, à ces protéines s'ajoute GW182, chez l'humain, qui lie directement la protéine argonaute¹⁰³. GW182 a un orthologue chez la drosophile (GW182) et deux orthologues chez *C. elegans* qui se nomment AIN-1 et AIN-2 (*ALG-1 Interactor protein*)^{102,103}. Ce facteur est d'un grand intérêt puisque lorsqu'il est atténué, la répression par les miARNs est grandement diminuée, il joue donc un rôle essentiel dans la voie de la répression⁹³. Comme décrit dans la section concernant la déadenylation et la dégradation des ARNm réprimés par les miARNs, GW182 est aussi essentiel à cette étape. Il recrute ces ARNm aux Corps-P et il est nécessaire au recrutement des complexes de déadenylation CCR4 :NOT, CAF1 et de dégradation DCP1 :DCP2 de la coiffe qui initie la dégradation de l'ARNm réprimé¹⁰³⁻¹⁰⁵. D'ailleurs, l'atténuation de ces complexes de dégradation n'interfère pas avec la répression médiée par les miARNs, par contre, les ARNm ciblés ne sont plus dégradés^{93,103}. Chez la souris, le complexe miRISC *let-7* a été isolé et les protéines décrites ci-dessus telles que CCR4 et CAF1, dans la dégradation des ARNm, ont été trouvées. De plus, PABP a été trouvé comme faisant partie du même complexe que CAF1 et lie directement GW182. Par interférence à la circularisation de l'ARNm, cette interaction facilite la dégradation des ARNm ciblés⁹¹.

Un autre facteur d'interaction avec AGO2 a été récemment décrit, la protéine HSP90. C'est une chaperone moléculaire nécessaire au bon repliement des protéines, elle a été trouvée associée à AGO2. Elle pourrait jouer un rôle dans la stabilité de la protéine argonaute lorsqu'elle n'est pas associée à son miARN¹¹¹. Elle affecte le repliement de AGO2 selon l'ATP disponible qui doit prendre une conformation lui permettant de lier le duplex d'ARN et de former le complexe riboprotéique^{112,113}.

La protéine RPS-14, une composante du ribosome, a été identifiée chez *C. elegans* par immunoprécipitation (IP) de GFP :: ALG-1. Son rôle n'est pas défini précisément, mais on

sait qu'elle a un impact négatif sur le complexe miRISC de *let-7*. L'atténuation de RPS-14 par ARN interférence chez le ver mutant pour le miARN *let-7(n2853)* diminue les phénotypes hétérochroniques provoqués par le manque de *let-7*. Dans la même IP, on retrouve aussi Dicer et AIN-1, ce qui confirme que le complexe est bien celui de ALG-1 ¹¹⁴.

Des protéines de type TRIM-NHL ont aussi été associées récemment à la voie de répression par les miARNs. NHL-2, qui interagit *in vivo* avec le complexe miRISC chez *C. elegans*, a la capacité de promouvoir la répression traductionnelle par les miARNs. Ce phénomène ne serait pas essentiel puisque le mutant de cette protéine n'a pas un phénotype sévère. La répression traductionnelle par NHL-2 serait aussi spécifique pour seulement quelques miARNs tels que ceux de la famille de *let-7* ainsi que *lsy-6* ¹¹⁵. Chez la souris, TRIM32 est impliquée dans le développement neuronal et a aussi été découverte pour son rôle d'accroître la répression par les miARNs. TRIM32 co-immunoprécipite avec AGO1 sur laquelle il joue son rôle dans la voie des miARNs. De plus, la cible principale de TRIM32 serait le miARN *let-7a* auquel il augmente l'activité ¹¹⁶. Ces protéines trouvées dans deux organismes différents affectent l'activité du complexe miRISC de façon miARN spécifique.

Enfin, une immunoprécipitation des protéines AGO1 et AGO2 suivie d'une analyse de spectrométrie de masse et finalement d'analyses de protéomique, plusieurs facteurs interagissant avec les protéines AGO1 et AGO2 chez l'humain ont été trouvés. Leur liste est exhaustive et chacun de ces facteurs fait partie d'un ou plusieurs des trois complexes distincts et décrits pour ces protéines argonautes ^{117, 118}. En résumé, de tous les facteurs trouvés, seulement quelques uns ont un rôle connu dans la voie des miARNs. De plus, ces analyses proviennent majoritairement de lignées cellulaires, elles ne tiennent donc pas compte du stade de développement ou du fait d'être dans un organisme entier.

1.2. Objectifs de recherche

Maintenant que ce qui est connu de la voie de répression traductionnelle par les miARNs est décrit en détail, il est clair que plusieurs points restent en suspens. Par exemple, le mécanisme de recrutement du complexe miRISC à son ARNm cible n'est toujours pas élucidé. De plus, lors de la description des mécanismes possibles de répression de la traduction par les miARNs, des questions sont soulevées au sujet de chacun des modèles proposés. Plusieurs vont dans des voies différentes sans être exclusifs mutuellement, tel que la répression de la traduction à l'initiation et celle en cours d'élongation. Il est donc possible que d'autres facteurs, n'ayant jusqu'ici aucun rôle connu dans la voie des miARNs, pourraient être impliqués dans cette voie de répression. Dans le cadre de mon projet de maîtrise, c'est sur cette question que je me suis penchée. Par criblage double hybride, avec comme protéine cible ALG-1 du nématode *C. elegans*, mon objectif principal était de trouver d'autres facteurs qui pourraient affecter cette voie. Le présent mémoire porte sur les stratégies mises en pratiques pour trouver de nouveaux interacteurs de ALG-1 et pose l'hypothèse que certains interacteurs trouvés jouent un rôle dans la voie des miARNs.

Chapitre 2 : Identification de facteurs interagissant avec ALG-1

Le complexe miRISC est le complexe effecteur de la répression traductionnelle par les miARNs, nous avons vu précédemment que les mécanismes de reconnaissance du miARN à sa cible ainsi que ceux qui en régissent la répression soulèvent toujours des interrogations. La protéine argonaute du miRISC ne peut pas, à elle seule, suffire à toutes ces fonctions, il est fort possible que d'autres facteurs jouent des rôles dans ces mécanismes. Bien connaître la composition du complexe miRISC par la recherche de ces facteurs est la première étape, pour ensuite déterminer s'ils ont ou non un rôle dans la voie des miARNs. Plusieurs équipes se sont déjà penchées sur la question en utilisant différentes méthodes et différents modèles. Une description de certains de ces travaux a été faite dans la section 1.4 de l'introduction. Dans notre cas, nous avons choisi de faire un criblage par la méthode du double hybride en utilisant comme appât la protéine ALG-1 qui est une composante du complexe miRISC chez *C. elegans*.

2.1. Le nématode *Caenorhabditis elegans* et son utilisation dans le criblage

Ce nématode, très étudié dans le domaine des miARNs, est le modèle principal de notre équipe. Il est un modèle d'étude très apprécié pour sa simplicité, sa facilité d'élevage, sa facilité d'utilisation pour faire de la manipulation génétique et il est bien connu comme modèle d'étude. En effet, son génome entier est séquencé, une base de données entière est consacrée à cet organisme et chacune de ses cellules a été caractérisée de sorte que les phénotypes associés à l'altération d'un gène sont facilement identifiables et observables. Son développement est décrit cellule par cellule, stade par stade, donc dans un mutant donné, s'il y a un problème dans le développement, il est possible de le remarquer. Toutes ces caractéristiques et le fait qu'il soit un animal entier en font un modèle de choix.

Les microARNs ont été découverts dans cet organisme, les deux premiers sont *lin-4* et *let-7*. Il s'est avéré qu'ils jouent un rôle primordial dans le développement du ver. En effet,

lorsque *lin-4* ou *let-7* ne sont pas fonctionnels, le ver développe des phénotypes hétérochroniques au cours de son développement qui sont caractérisés par un changement temporel du phénotype normalement observé^{10, 17}. Des exemples de phénotypes hétérochroniques couramment observés chez *C. elegans* sont un développement aberrant de la vulve ou un développement anormal des *alae*, une structure particulière de la cuticule. Cette structure apparaît seulement au stade L1 et au stade adulte du ver, elle est absente des stades L2, L3 et L4. Elle est constituée de crêtes réparties longitudinalement de la tête à la queue du nématode et qui servent de surface d'adhérence à l'animal pour se mouvoir efficacement. Ces crêtes sont utilisées à des fins d'observation des phénotypes hétérochroniques puisqu'elles sont formées à des stades bien spécifiques au cours du développement du ver. Les cellules responsables de la formation de ces *alae* sont les « *seam cells* ». Elles sont distribuées de façon linéaire longitudinale chez le nématode. La division et la différenciation de ces cellules sont dépendantes des miARNs *let-7* et *lin-4* ce qui explique aussi leurs implications dans le développement des *alae* au stade adulte. Chez les mutants *lin-4* et *let-7*, on observe un phénotype retardé de la différenciation finale des « *seam cells* » (Figure 7). Le nématode ayant subi l'atténuation par ARN interférence de ALG-1 et ALG-2, qui sont les deux protéines argonautes utilisées dans le complexe miRISC, développe ces phénotypes hétérochroniques (Figure 6)⁵¹. De plus, la perte de fonction de la protéine LIN-41, qui est normalement régulée négativement par *let-7* au stade larvaire L4, a un phénotype de différenciation précoce des « *seam cells* » (Figure 7). Ces phénotypes reliés à l'altération de la régulation des miARNs sont facilement observables chez l'animal puisque la formation de la structure d'*alae* qui résulte de la différenciation des « *seam cells* » est altérée dans ces cas, ce qui en fait un modèle de choix.

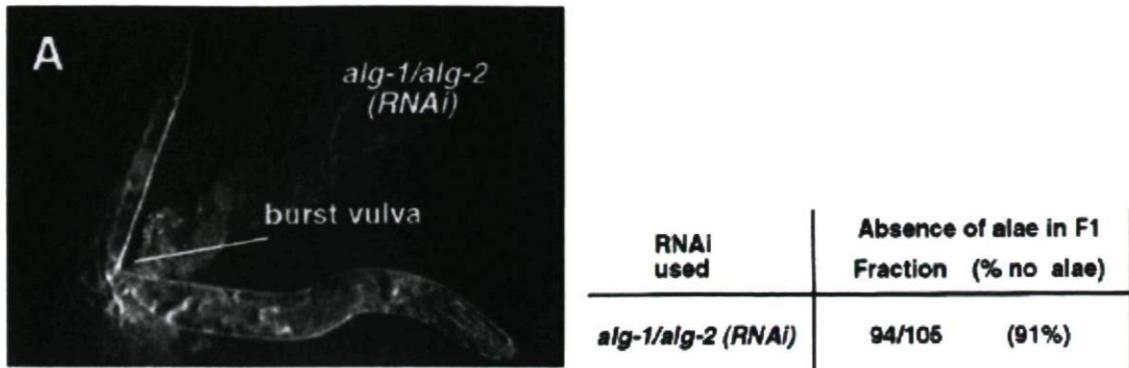


Figure 6: Phénotypes chez *C. elegans* avec un traitement d'ARN interférence sur les protéines argonautes ALG-1 et ALG-2. Le développement de la vulve et des *alae* chez les vers adultes sont régulés par les miARNs. Un défaut majeur dans cette voie, tel que l'atténuation des protéines argonautes ALG-1 et ALG-2, mène à des phénotypes sévères de développement temporel des tissus qui sont dits : hétérochroniques⁵¹.

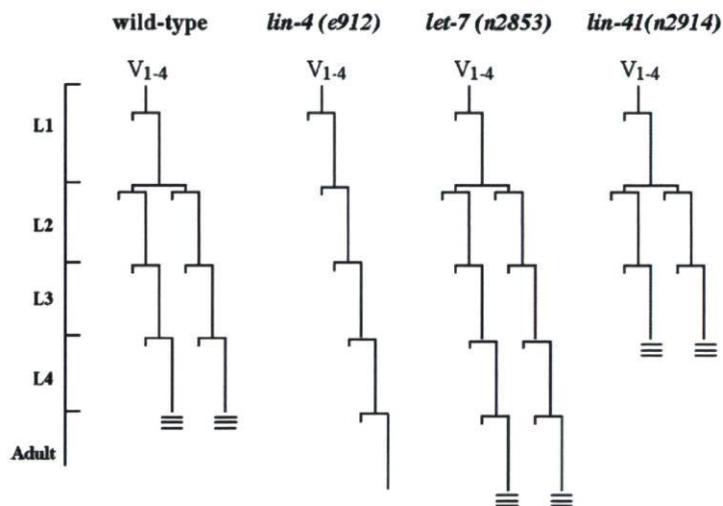


Figure 7 : Défauts des « seam cells » associés aux mutants de perte de fonction des gènes *lin-4*, *let-7* et *lin-41*. La différenciation terminale des « seam cells » est représentée par trois barres horizontales¹¹⁹.

Le développement de *C. elegans* est bien connu et défini en six stades : embryon, larvaire 1 (L1), larvaire 2 (L2), larvaire 3 (L3), larvaire 4 (L4) et finalement le stade adulte où le ver possède ses organes reproducteurs fonctionnels. Les miARNs jouent un rôle de première importance dans ce développement puisqu'ils en régulent le passage d'un stade à l'autre²¹. Dans tous les organismes modèles étudiés, on croit que la quantité de facteurs

protéiques dans chaque stade de développement est finement régulée. Chez *C. elegans*, les miARNs font partie de cette fine régulation de certaines des protéines essentielles telles que LIN-14 et LIN-41 régulées respectivement par *lin-4* et *let-7* (Figure 8). Si on s'intéresse au complexe miRISC et autres qui régulent le fonctionnement de ces miARNs, on sait maintenant que certains facteurs peuvent affecter spécifiquement un stade de développement ou même être spécifiques à une seule famille de miARNs. Un exemple pertinent démontre l'importance d'un facteur de façon spécifique à une famille de miARN. En effet, il a été décrit chez la cellule humaine que LIN-28 joue un rôle dans la biogenèse des miARNs de la famille de *let-7*. Le principe est que la protéine LIN-28 cible le pre-*let-7* et régule sa dégradation en recrutant une uridylyl transférase TUTase4 (TUT4) qui ajoute des groupements uridylyles au pre-*let-7*. Cette uridylylation a comme conséquence de mener pre-*let-7* à la dégradation et donc interfère avec sa biogenèse^{120, 121}. S'il y a présence d'une accumulation de LIN-28, le miARN *let-7* diminue en quantité. Considérant que certains facteurs peuvent être spécifiques à un miARN ou à un stade de développement, notre criblage double hybride a été fait à partir de vers N2, une souche sauvage de *C. elegans*, à un stade larvaire spécifique, L4, qui est le dernier stade avant l'adulte. Auparavant, Isabelle Banville avait effectué un criblage avec des embryons de cette même souche de vers et elle avait obtenu quelques interacteurs intéressants. De cette façon, en comparant les résultats d'un criblage à l'autre, certains facteurs trouvés pourraient s'avérer être importants à un stade spécifique ou à tous les stades. La protéine cible dans le criblage est une protéine argonaute faisant partie du complexe effecteur des miARNs, le miRISC. Deux argonautes impliquées dans la voie des miARNs sont connues chez *C. elegans*, ALG-1 et ALG-2. De plus, les animaux déficients pour la protéine ALG-1, comparés à ceux pour la protéine ALG-2, ont un phénotype plus sévère (Alejandro R. Vasquez, données non publiées), c'est pour cette raison que la protéine ALG-1 a été choisie pour le criblage.

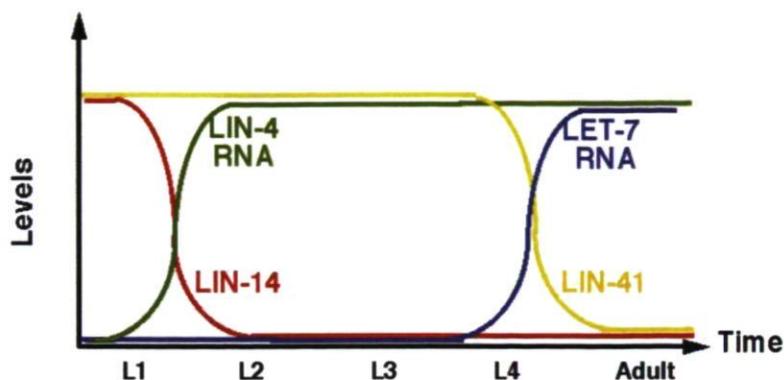


Figure 8 : Le rôle des miARNs dans le développement du ver. Les stades de développement sont l'embryon, les stades larvaires L1, L2, L3, L4 et l'adulte. Cette figure montre que le miARN *lin-4* régule l'entrée en L2 en réprimant la production de protéine LIN-14 et que le miARN *let-7*, de la même façon, régule l'entrée au stade adulte en régulant la protéine LIN-41¹²².

2.2. Résultats

2.2.1. Le criblage double hybride

La méthode du double hybride sert à la mise en relief d'une interaction directe entre deux protéines. Le principe de la technique réside dans la composition des plasmides ainsi que la souche de levure utilisés. Le plasmide pGBKT7 contient le domaine de liaison à l'ADN au promoteur GAL4 et le plasmide pGADT7 contient le domaine d'activation de la transcription du promoteur GAL4. Ces deux domaines forment ensemble le facteur de transcription pour les promoteurs de la famille GAL. Pour sa part, la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* AH109 utilisée contient quatre gènes rapporteurs, deux encodent pour des molécules essentielles à la survie de la levure, l'histidine (*HIS3*) et l'adénine (*ADE2*), les deux autres sont le gène *lacZ* encodant la β -galactosidase et le gène *MEL1* qui encode l' α -galactosidase. Ils sont tous sous l'influence de promoteurs dépendant du facteur de transcription Gal4p, soit les gènes GAL1, GAL2 et MEL1. Donc, lorsque les protéines traduites à partir des plasmides précédents entrent en interaction ensemble, le domaine d'activation de GAL4 se retrouve près du promoteur GAL4 grâce au domaine de liaison de ce même promoteur et ainsi activer la transcription des gènes rapporteurs. La Figure 9

montre un schéma qui représente une interaction protéine-protéine et l'activation d'un promoteur qui répond au facteur de transcription Gal4p.

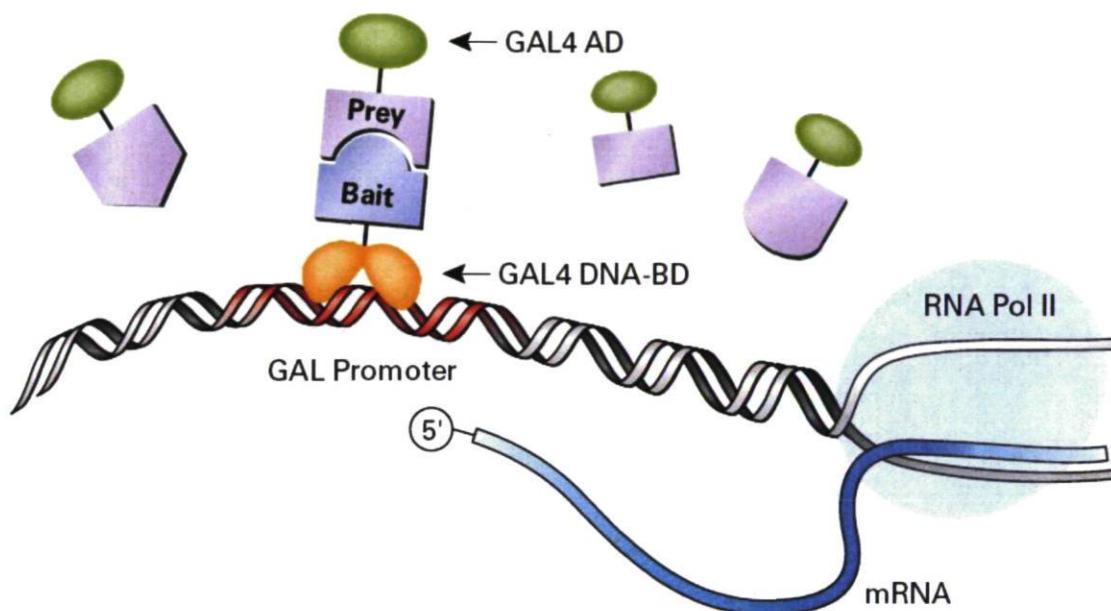


Figure 9 : Schéma de la méthode du double hybride. En violet, ce sont les ADNc clonés dans pGADT7 qui lorsque traduits contiennent l'activateur des promoteurs de la famille GAL. En bleu, l'ADNc de la protéine cible est cloné dans le plasmide pGBKT7 qui contient le domaine de liaison à l'ADN GAL4 aux promoteurs GAL des gènes rapporteurs. Lorsque les deux protéines traduites entrent en interaction, l'activateur de la transcription est capable de jouer son rôle et la levure AH109 peut survivre dans un milieu restrictif en histidine et adénine et exprimer l' α et la β -galactosidase. (*Clontech Two-Hybrid Principle*)

Dans le cas d'un criblage, une banque d'ADNc est clonée dans le plasmide pGADT7rec (« rec » pour région de recombinaison lors du clonage, de cette façon il est plus facile de cloner plusieurs fragments différents, telle une banque d'ADNc). Dans le cas présent, cette banque était déjà disponible au laboratoire, préparée par Isabelle Banville à partir d'extrait d'ARN total de vers au stade de développement L4. Cette banque ne contient que des fragments d'ADNc puisqu'elle a été obtenue par une méthode de transcriptase inverse à partir d'amorces complémentaires à la queue poly(A) des ARNm. De plus, l'ADNc de la protéine cible du criblage, ALG-1 a été cloné dans le vecteur pGBKT7. Par la suite, la méthode consiste en la cotransformation des constructions dans la levure AH109 qui sont mises en culture sur un milieu restrictif pour l'adénine et l'histidine ainsi que la leucine et

le tryptophane qui sont les acides aminés produits par les plasmides, permettant ainsi la sélection spécifique des levures cotransformées. Chaque colonie capable de survivre à ce milieu possède un ADNc de la banque qui, lorsque traduit en protéine, est capable d'interagir avec ALG-1. Les plasmides correspondants ont ensuite été séquencés et une liste d'interacteurs a été obtenue (Tableau 2).

L'avantage principal de cette technique de criblage consiste en l'obtention rapide d'interacteurs directs avec la protéine cible. L'utilisation de fragments d'ADNc implique que l'interaction trouvée se situe dans la région protéique traduite de ce fragment, on a donc un indice de la région d'interaction avec la cible. L'inconvénient de l'utilisation de ces fragments est que soit le domaine d'interaction d'une protéine n'est pas inclus dans le fragment d'ADNc, dans ce cas, des interactions peuvent ne jamais être trouvées par cette méthode, soit le domaine protéique de l'interacteur a une conformation qui ne sera jamais obtenue *in vivo*, donc cette interaction est un faux positif. D'autres types de faux positifs peuvent aussi être obtenus tels que l'activation du promoteur par la protéine qui contient le domaine de liaison à l'ADN sans avoir besoin du domaine d'activation. Il se pourrait même que les protéines contenant le domaine d'activation active le promoteur sans avoir besoin du domaine de liaison. L'utilisation de protéines complètes dans cette méthode est aussi controversée dans certains cas puisque quelques protéines, pour être repliées de façon à être fonctionnelles, doivent subir des modifications posttranscriptionnelles qui peuvent être différentes d'un organisme à l'autre. En bref, cette méthode est une bonne façon de faire un premier criblage pour une protéine cible, puisqu'elle est rapide et donne beaucoup d'interacteurs sur lesquels on doit confirmer l'interaction et le rôle dans le complexe miRISC.

La liste des facteurs d'interaction trouvés par la méthode du double hybride avec la protéine cible ALG-1 et la banque d'ADNc de vers en L4 est énumérée dans le tableau 2. On y retrouve une brève description de leurs fonctions principales ou prédites ainsi que leurs homologues chez l'humain, s'il est connu. Pour la liste complète, comprenant le nombre de fois que l'interacteur a été retrouvé dans ce criblage ainsi que la liste exhaustive des gènes trouvés avec des fonctions encore inconnues, voir l'Annexe III. La liste est

longue, et dans le cadre de ma maîtrise, je ne me suis pas arrêtée à chacun des candidats pour savoir s'il avait un rôle potentiel dans la voie des miARNs. On a donc classé les facteurs en sous-groupes fonctionnels afin d'avoir une meilleure vue d'ensemble sur les fonctions qu'ils pourraient jouer dans cette voie. De plus, les sous-groupes ont parfois des homologues communs chez l'humain, ce qui permet de réduire le champ de recherche à un petit groupe de protéines ainsi que pouvoir trouver des facteurs conservés à travers les espèces.

Tableau 2 : Facteurs d'interaction trouvés par la méthode du double hybride. La cible est ALG-1, une protéine argonaute associée à la voie des microARNs chez *C. elegans*. La banque d'ADNc est celle du nématode en stade L4 de développement.

Facteurs	Famille	Fonction principale ou prédite	Homologue humain
ARN interférence et miARN			
SAGO-2	Argonaute	Argonaute secondaire, voie siARN	EIF2C1
PRG-1	Argonaute	Argonaute, voie piARN	C22:KB-63E7.2
Phosphatase			
GPD-3	GAPDH*	viabilité des embryons	GAPDH-001
PHO-11	Phosphatase	Phosphatase lysosomale et acide prostatique	-
GPD-4	GAPDH*	Glycolyse, chez embryons	GAPDH-001
GPD-1	GAPDH*	Glycolyse, chez embryons	GAPDH-001
Protéase / Peptidase			
ASP-1	Protéase Aspartyl	Cellules intestinales, dégénération es neurones	Cathepsine D
ASP-3	Protéase Aspartyl	Mort cellulaire des neurones	Cathepsine D et E
CPR-4	Cystéine Protéase	-	Cathepsine L et B
CPL-1	Cystéine protéase	Développement	Cathepsine L1
CPR-6	Cystéine Protéase	-	Cathepsine L et B
PBS-4	Sous-unité protéasome	Sous-unité beta	SU proté. beta type-2
F35F10.6	Peptidase	pyroglutamyl peptidase	-
Synthèse protéique			
EFT-2	Facteur d'élongation	Traduction	EF-2
EFT-4	Facteur d'élongation	Traduction	EF-1 Alpha
RPB-3	Polymérase	composante d'ARN polymérase	POLR2C-001
RPB-5	Polymérase	composante des 3 ARN polymérase	POLR2E-201
Sous-unités ribosomales			
K04D7.1/ ceRACK1	-	Protéine d'échafaudage	RACK1
RPL-41	Grande SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPL36AL
RPL-11	Grande SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPL11
RPS-22	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPS15A
RPS-27	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	-
RPS-30	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	FAU-201
RPS-26	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPS26P8
RPL-12	Grande SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPL12
RPS-16	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPS16
RPS-20	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPS20
Enzymes de modification posttraductionnelles / Épissage de l'ARNm			
F22B3.4	-	Gluco.-fructose 6-phosphate aminotransferase	GFPT1
F46H5.3	Créatine Kinase SU ribosomale P0	-	CKM-201
RPA-0	acide	-	RPLP0
RNP-6	RRM	Polyrimidine protéine de liaison PUF60	PUF60
ISP-1	-	Cytochrome reductase ubiquinol, SU RIP1	UQCRFS1
UBC-7	-	E2 Enzyme conjugaison ubiquitine	UBE2G1

(suite)

Facteurs	Famille	Fonction principale ou prédite	Homologue humain
Protéines d'adhérence et de structure			
LEC-6	Galectine	Lectine de liaison au galactose	LGALS9
LEC-9	Galectine	Lectine de liaison au galactose, embryon	
LEC-2	Galectine	Lectine de liaison au galactose	LGALS9
ACT-4	Actine	-	ACTB
ACT-5	Actine	cellules intestinales et excrétoires	ACTG1
ACT-2	Actine	pharynx	ACTB
ACT-1	Actine	pharynx, muscles et mobilité	ACTB
CLEC-12	Lectine de type C	-	DMBT1
CLEC-63	Lectine de type C	-	-
COL-17	Collagène	Formation de la cuticule	AC069113.1
COL-162	Collagène	-	COL3A1
COL-176	Collagène	-	COL3A1

*Glycéraldéhyde 3-phosphate dehydrogenase

2.2.2. Double Hybride avec l'interacteur ceRACK1

Dans le laboratoire, un autre criblage avait été réalisé auparavant par Isabelle Banville sur des vers au stade embryonnaire. Nous avons comparé ses résultats avec ceux du tableau 2 et nous avons remarqué que l'interacteur K04D7.1 était commun aux deux criblages. K04D7.1, chez *C. elegans*, est l'homologue de la protéine d'échafaudage RACK1 (*Receptor for Activated C-Kinase*) chez l'humain. Nous avons décidé de nous y intéresser après avoir remarqué qu'une perte de fonction ceRACK1 (ceRACK1 pour l'homologue de RACK1 chez *C. elegans*) chez le ver mène à des phénotypes hétérochroniques semblables à ceux observés chez le mutant *let-7* (Tableau 2). De plus, un autre groupe a récemment identifié ceRACK1 par une immunoprécipitation de la protéine GFP :: ALG-1 et l'identification du complexe par séquençage LC-MS/MS¹¹⁴. RACK1 est une protéine d'échafaudage connue pour interagir avec plusieurs molécules de signalisation simultanément. Elle est un constituant du ribosome, plus précisément de la sous-unité 40S, et elle est située près de la sortie de l'ARNm. Elle recrute la protéine kinase C (PKC) au ribosome qui phosphoryle le facteur eIF6 permettant ainsi l'association des sous-unités 60S et 40S¹²³.

Un article du laboratoire, auquel j'ai contribué, est en révision concernant le facteur d'interaction ceRACK1 au journal *EMBO*, Jannot et coll. proposent « *Conserved Function*

of a Ribosomal Protein RACK1 in the microRNA pathway ». L'article suggère une fonction de RACK1 dans la voie des microARNs qui serait au stade de reconnaissance du complexe miRISC à l'ARNm cible. Nous montrons qu'une interaction directe entre le complexe miRISC et RACK1 est importante pour la régulation des gènes par les miARNs. Dans des études *in vivo* chez la cellule humaine ainsi que chez le nématode *C. elegans*, RACK1 interagit avec le complexe miRISC et lors d'une atténuation du gène *rack1*, l'association du miRISC au ribosome est compromise. En ce sens, RACK1 joue un rôle dans la voie des miARNs par le recrutement du complexe miRISC au site de traduction.

Pour ma part, j'ai participé à ce travail en utilisant des essais doubles hybrides afin de montrer l'interaction spécifique de ceRACK1 avec ALG-1 (Figure 10). Après avoir identifié cet interacteur par criblage double hybride et montré que sa perte de fonction mène à des phénotypes hétérochroniques, j'ai cloné ceRACK1 à sa pleine longueur pour confirmer son interaction directe avec ALG-1. Par cette méthode, ceRACK1 interagit toujours avec ALG-1 lorsqu'il est à sa pleine longueur en double hybride (Figure 10 A,C), par contre cette interaction est considérée faible puisque seulement un des gènes rapporteurs chez la levure AH109 est activé, *HIS3*. En effet, les rapporteurs *ADE2* et *LacZ* ont aussi été testés pour cette interaction et les résultats se sont avérés négatifs. En revanche, l'activation de *HIS3* n'est pas un faux positif puisque les contrôles de transfections avec les vecteurs vides n'ont aucune croissance et que l'ajout de 3AT (2,5 nM) dans le milieu restrictif en histidine n'affecte pas la croissance des levures confirmant ainsi l'interaction entre ALG-1 et ceRACK1. L'ajout de 3AT au milieu restrictif en histidine force la levure à produire une plus grande quantité d'histidine pour sa survie, le gène rapporteur doit donc être fortement activé. En plus de montrer l'interaction de la protéine pleine longueur ceRACK1 avec ALG-1, la figure 10 montre qu'une région est essentielle pour cette interaction, elle est située en N-Terminal de la protéine ALG-1 entre les acides aminés 66 et 132 (Figure 10 A,C). De plus, ALG-2, très homologue à ALG-1, n'interagit pas avec ceRACK-1 en double hybride. Ce résultat est intéressant et logique puisque la région qui différencie le plus ces deux protéines est en N-Terminal (Figure 11). De plus, plusieurs sous-unités ribosomales (RPS-2, RPS-6, RPS-12, RPL-1, RPL-7, RPL-12) ont été testées en pleine longueur par double hybride pour leur interaction avec ALG-1

et le résultat est négatif, suggérant une interaction spécifique entre ALG-1 et ceRACK1 (Figure 10 D, F).

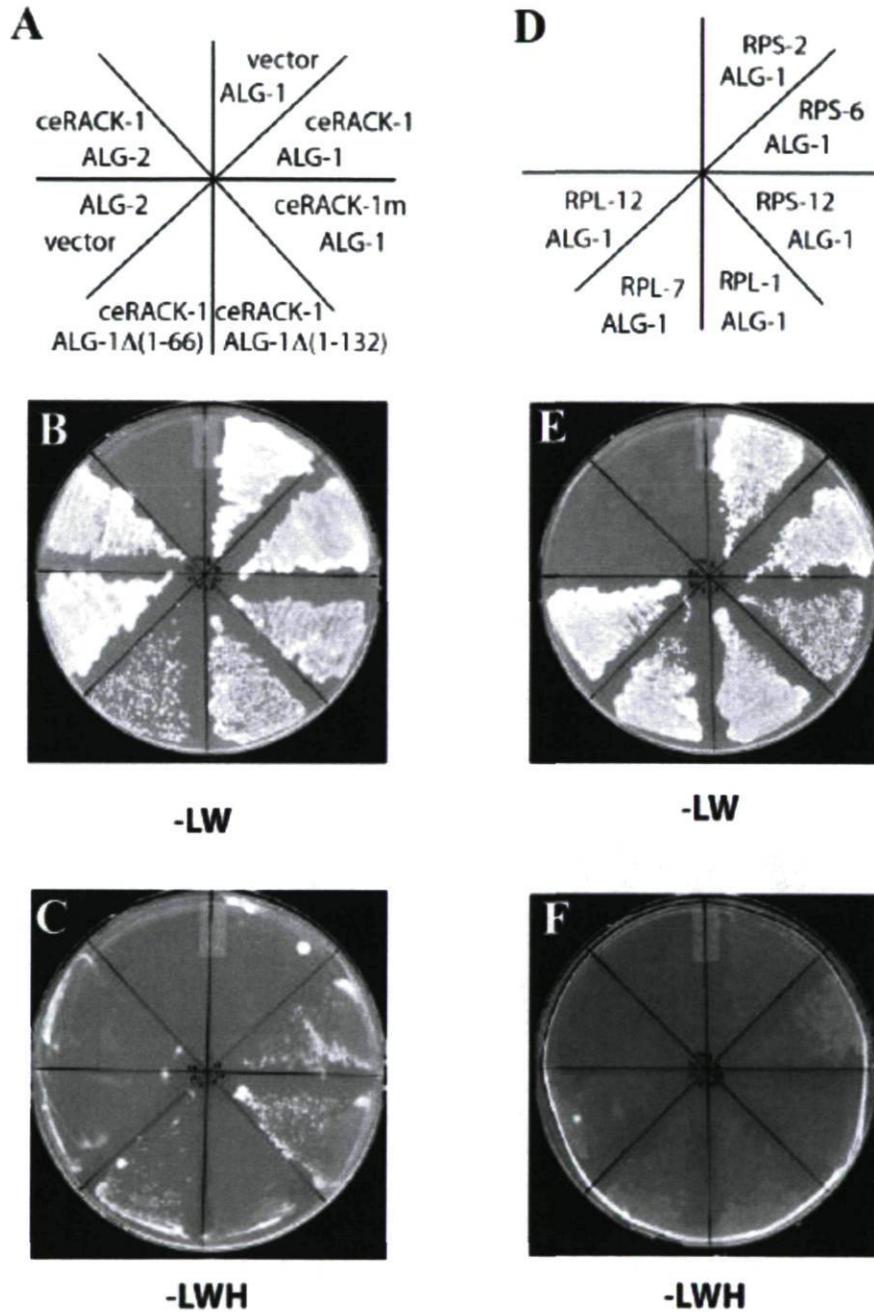


Figure 10 : Interaction double hybride entre ALG-1 et ceRACK1. Figure telle que la Figure supplémentaire 1 de Jannot et coll. 2010. A. Description des cotransformations. B et C correspondent aux contrôles avec le vecteur vide pGADT7, ALG-1 et ALG-2 sont clonés dans pGBKT7 et ceRACK1 dans pGADT7. La construction mutée de ceRACK1

(ceRACK1m) correspond aux mutations de deux acides aminés responsables de son interaction avec la sous-unité ribosomale 40S¹²⁴. Les constructions avec des délétions dans ALG-1 correspondent aux acides aminés en N-Terminal (1-66 et 1-132). B et E sont les portions de figures montrant que la levure AH109 est bien cotransformée avec les vecteurs pGBKT7 et pGADT7 qui contiennent les gènes de la leucine et du tryptophane. C. Montre l'interaction entre ALG-1 et ceRACK1 pleines longueur. L'interaction n'est pas altérée avec les mutations de ceRACK1. Aussi, la deuxième portion du N-Terminal de ALG-1 (les acides aminés 66 à 132) est essentielle à l'interaction entre ALG-1 et ceRACK1. D-F. Les sous-unités ribosomales n'interagissent pas directement avec ALG-1.

```

      .10 . . . . .20 . . . . .30 . . . . .40 . . . . .50 . . . . .60
ALG-1 1:MSGGPQLPQVNMSTIQQFQGATSEELFSPISSTETSEGVVPTSGATQCPFFPSAQA: 60
ALG-2 1:MPDDE.....LTSSEPMDDGARTSESE.....: 23

      .70 . . . . .80 . . . . .90 . . . .100 . . . .110 . . . .120
ALG-1 61:ASTALQDLEEIFNSPPTQPQTFSDVPPQAGSLAPGVPIQNTSVSISGPANTLGGGLP: 120
ALG-2 23:.....QLGGASNS: 31
      66-----
      .130 . . . .140 . . . .150 . . . .160 . . . .170 . . . .180
ALG-1 121:GAPQQLPQGNQGGIQFQCFARFNNQVREKESILLRANHFVVRIPQGTIQNTGVVPTFQ: 180
ALG-2 31:..AISTK...DAGVQPCFVRFNNQVREKESILLRANHFVVRIPQGVQNTQIDVFFQKCF: 87
      132-----
      .190 . . . .200 . . . .210 . . . .220 . . . .230 . . . .240
ALG-1 181:REVVNSIISCLISAFREYFTHIRPVYDGRKHNITSEPLFISRENDQVTLPGDSAVRQ: 240
ALG-2 89:REVVNSVIGCLISSFRKYFTHIRPVYDGRKHNITSEPLFISRENDQVTLPGDSAVRQ: 147

      .250 . . . .260 . . . .270 . . . .280 . . . .290 . . . .300
ALG-1 241:FEVLEKVVQVSLSTEDANDQVREVPFRAGANDVLEKHLFELKTEFVGRSFFSFPV: 300
ALG-2 148:FEVTKNIIGVCLALDDANDQVREVPFRAGANDVLEKHLFELKTEFVGRSFFSFPV: 205

      .310 . . . .320 . . . .330 . . . .340 . . . .350 . . . .360
ALG-1 301:NASQVHAGSCFPQASGAVAGGANSAGQTHASEKLDGGRVYVFPQGVVRFSGQKRNH: 360
ALG-2 205:..SVNI.....PQWQNKSEELGGREYVFPQGVVRFSGQKRNH: 246

      .370 . . . .380 . . . .390 . . . .400 . . . .410 . . . .420
ALG-1 361:VSATAFTSNPFIKFIKAVLELFPQALAEKRALDQAVVFTKEIKELKTEITHCQNR: 420
ALG-2 247:VSATAFTSNPFIKFIKAVLELFPQALAEKRALDQAVVFTKEIKELKTEITHCQNR: 306

      .430 . . . .440 . . . .450 . . . .460 . . . .470 . . . .480
ALG-1 421:KRVCHVTRRPAQTQTFPLQLSTQGTICTVAKYFTRHYIQLKTFRLCLVGGQKNT: 480
ALG-2 307:KRVCHVTRRPAQTQTFPLQLSTQGTICTVAKYFTRHYIQLKTFRLCLVGGQKNT: 366

      .490 . . . .500 . . . .510 . . . .520 . . . .530 . . . .540
ALG-1 481:YLFPEYCNVFPQRCIEKLTQVQSTNIEKATASAPEREKESICKLVKAEKADQVFA: 540
ALG-2 367:YLFPEYCNVFPQRCIEKLTQVQSTNIEKATASAPEREKESICKLVKAEKADQVFA: 426

      .550 . . . .560 . . . .570 . . . .580 . . . .590 . . . .600
ALG-1 541:GTTINPANTVREKRVLSAPPELLYGGHTRAT..ALPQGVNDRGQKQFRTSIDVYVMAI: 599
ALG-2 427:GTTINPANTVREKRVLSAPPELLYGGHTRAT..ALPQGVNDRGQKQFRTSIDVYVMAI: 486

      .610 . . . .620 . . . .630 . . . .640 . . . .650 . . . .660
ALG-1 600:RQQQVEKENDLNFQTLQRIENDANFIVQNFCKETAVQVQVDFMFKYKQNYRQ: 659
ALG-2 487:RQQQVEKENDLNFQTLQRIENDANFIVQNFCKETAVQVQVDFMFKYKQNYRQ: 546

      .670 . . . .680 . . . .690 . . . .700 . . . .710 . . . .720
ALG-1 660:LVVYVLPKETSVAEVSVDVTLQIATQCVQAKMAIRITTFQTLNLCLENNVFLGGV: 719
ALG-2 547:LVVYVLPKETSVAEVSVDVTLQIATQCVQAKMAIRITTFQTLNLCLENNVFLGGV: 606

      .730 . . . .740 . . . .750 . . . .760 . . . .770 . . . .780
ALG-1 720:ELLFVYKRFIRFEPVIEFQCDITSPAGDREKPSIAAVVQNDANFERYAATVYVQNR: 779
ALG-2 607:ELLFVYKRFIRFEPVIEFQCDITSPAGDREKPSIAAVVQNDANFERYAATVYVQNR: 666

      .790 . . . .800 . . . .810 . . . .820 . . . .830 . . . .840
ALG-1 780:ELISDLETNVRRELVQFTNRTFEPARIYVYRDGVSRQFFVFLQTELNAIRACMNER: 839
ALG-2 647:ELISDLETNVRRELVQFTNRTFEPARIYVYRDGVSRQFFVFLQTELNAIRACMNER: 726

      .850 . . . .860 . . . .870 . . . .880 . . . .890 . . . .900
ALG-1 840:STQPIITFIAGKRNHTELFAVREKDVQKATNIFPFTTVDVQITNFTDFLCSHAG: 899
ALG-2 727:STQPIITFIAGKRNHTELFAVREKDVQKATNIFPFTTVDVQITNFTDFLCSHAG: 786

      .910 . . . .920 . . . .930 . . . .940 . . . .950 . . . .960
ALG-1 900:QGTREPRFVYVMDNDLTADELQQLTYQMCITYVCTREVSIPAPAYVAVLVAFRAN: 959
ALG-2 787:QGTREPRFVYVMDNDLTADELQQLTYQMCITYVCTREVSIPAPAYVAVLVAFRAN: 846

      .970 . . . .980 . . . .990 . . .1000
ALG-1 960:LVDRHNDQSE..GGQFQST..SEITLSEKAVQVILAFELVSI...:1000
ALG-2 847:LVDRHNDQSEGGQFQSTSEITLSEKAVQVILAFELVSI...: 891

```

Figure 11 : Alignement de la séquence d'acides aminés des protéines ALG-1 et ALG-2 qui sont impliquées dans la voie des miARNs chez *C. elegans*. La partie soulignée et identifiée 66-132 est la portion protéique, chez ALG-1, qui interagit avec ceRACK1.

2.2.3. Double hybride Domaine de Liaison à ALG-1 des protéases

À la suite du criblage double hybride avec les vers en stade L4, le but de mon projet était de m'intéresser à un facteur ou à un groupe de facteurs d'interaction trouvé et de montrer s'il est ou non impliqué dans la voie de répression par les miARNs. De toute la liste d'interacteurs trouvés, nous nous sommes intéressés au groupe des protéases (Tableau 3).

Ce groupe nous a semblé intéressant puisque certaines équipes proposent que les miARNs répriment leurs ARNm cibles pendant l'élongation de la traduction^{20, 94}. Cette hypothèse implique qu'il y a production d'un peptide naissant aux ARNm réprimés, en revanche ce peptide naissant n'est pas détectable⁹⁷. Il serait donc dégradé rapidement ou pris en charge par des protéines qui recruteraient des protéases. L'élément clé qui confirmerait cette hypothèse serait de trouver une protéase responsable de cette dégradation peptidique. Le protéasome a déjà été testé en l'inhibant avec le MG132 et il n'est pas responsable de cette dégradation puisqu'après un traitement avec cette drogue, les peptides naissants restent impossibles à détecter⁹⁷. Ainsi, un autre type de protéases pourrait être requise pour dégrader les peptides produits par les ARN messagers ciblés par les microARNs.

Le groupe de protéases trouvé comprend plusieurs peptides qui interagissent avec ALG-1. Le séquençage et l'alignement de ces peptides nous ont montré qu'ils étaient très semblables entre eux. Enfin, ils sont majoritairement homologues au groupe des cathepsines chez l'humain. La séquence trouvée correspond à la région catalytique de ces protéines. C'est ainsi que Éric Paquet, bioinformaticien, a trouvé une région consensus par un alignement de séquences avec les cathepsines humaines qui correspond à la région retrouvée dans les peptides du criblage (Figure 12).

DLA1

Séquence Nucléotidique

```
GGACATGCCATCAGAATTCTTGGATGGGGAACTGACAACGGAACTCCATA
CTGGCTTGTGCGCAACTCATGGAACGTCAACTGGGGAGAGAACGGATATT
TCCGTATCATCCGTGGAACCAACGAGTGCGGAATTGAGCACGCCGTTGTC
GGAGGAGTCCCAAAGTC
```

Séquence protéique correspondante

```
GHAIRILGWGTDNGTPYWLVANSWNVNWXGNGYFRIIRGTNECGIEHAVVG
GVPKV
```

Figure 12 : Séquence consensus DLA1 (Domaine de Liaison avec ALG-1) utilisée pour le clonage dans pGADT7 et l'essai double hybride, elle a été déterminée par Éric Paquet, bioinformaticien.

La séquence consensus DLA1 nous a été utile pour confirmer, par double hybride, l'interaction entre elle et la protéine ALG-1 (Figure 13). La partie N-Terminale de ALG-1

semble importante dans cette interaction et, pour sa part, ALG-2 n'interagit pas du tout avec DLA1. La région N-Terminale de ALG-1 est la région qui différencie les protéines argonautes ALG-1 et ALG-2 (Figure 11). On explique donc que l'interaction entre DLA1 et ALG-1 est spécifique puisqu'elle dépend du domaine N-Terminal de ALG-1. Par contre, on doit noter que cette interaction avec ALG-1 en double hybride n'active que le promoteur du gène rapporteur *HIS3* sur les quatre promoteurs possibles. On note aussi qu'il y a croissance dans le contrôle avec le vecteur pGBKT7 vide, ce qui ne remet tout de même pas en cause l'interaction puisqu'avec le mutant ALG-1 Δ 1-132 (cloné dans pGBKT7), on retrouve l'absence de croissance voulue (Figure 13). Le résultat devrait quand même être confirmé en clonant les ADNc (DLA1 et ALG-1) utilisés dans les vecteurs opposés. Finalement, par double hybride, nous avons confirmé que le domaine consensus, homologue au domaine catalytique des cathepsines humaines, interagit toujours avec la protéine ALG-1 dans un système double hybride.

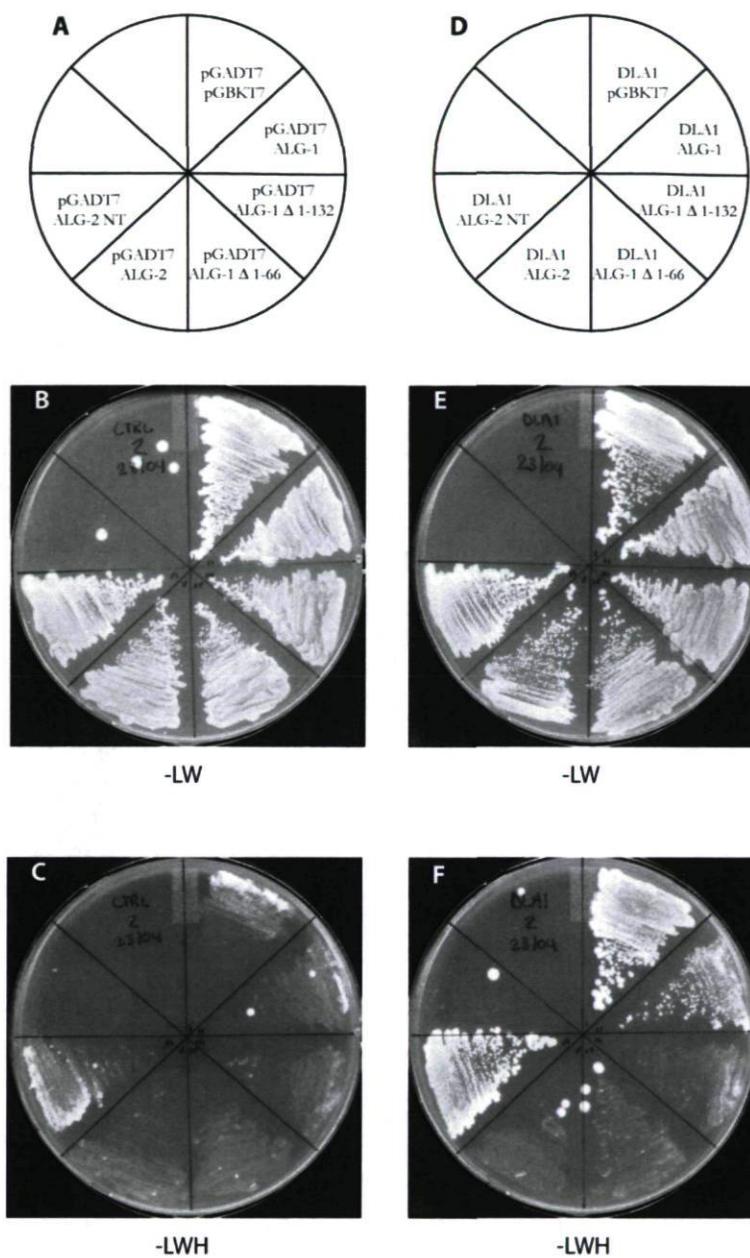


Figure 13 : Double hybride du Domaine de Liaison à ALG-1 (DLA1). A. et D. décrivent les images de double hybride du dessous. B et E sont les contrôles de cotransformation des deux plasmides pGBKT7 et pGADT7. C. et F. sont les expériences de double hybride. C. étant la figure contrôle de F. puisque les plasmides contenant ALG-1 et ses mutants de délétion ainsi que ALG-2 sont cotransformés avec le plasmide opposé vide (pGADT7). F. représente l'interaction de DLA1 avec ALG-1. On y retrouve aussi le contrôle avec le vecteur vide (pGBKT7) avec une croissance de levure.

Chapitre 3 : Hypothèse : les cathepsines sont impliquées dans la voie des miARNs

3.1. Les Cathepsines humaines

Parmi les interacteurs trouvés, le premier groupe auquel nous nous sommes intéressés est celui des protéases. La raison majeure pour laquelle nous les avons choisis est qu'elles pourraient être impliquées dans la répression traductionnelle par les miARNs qui survient posttranscriptionnellement. En effet, dans le modèle de répression postinitiation par les miARNs, une protéase pourrait être importante pour la dégradation du peptide naissant puisque la protéine totale n'est pas détectée ⁹⁷. Sachant que le protéasome n'est pas responsable de cette dégradation ⁹⁷ et que dans notre criblage par double hybride cinq homologues (13 fois au total) des cathepsines ont été trouvés, nous avons choisi d'étudier les cathepsines humaines (Tableau 3).

Le terme cathepsine en Grecque signifie « digérer » et reflète leur fonction qui est de digérer des protéines. Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs. Elles doivent donc être activées afin de jouer leur rôle de protéase. Elles dégradent ces protéines en brisant leurs liaisons peptidiques utilisant une molécule d'eau. Leurs modes d'action varient puisqu'elles sont caractérisées en classe nécessitant un acide aminé en particulier pour amorcer leur réaction. Une expression de ces peptidases librement actives dans la cellule pourrait être désastreuse ayant comme conséquence une digestion protéique anarchique. Heureusement, la cellule est composée de compartiments distincts. En ce sens, les cathepsines se retrouvent majoritairement localisées dans un de ces compartiments vésiculaires, le lysosome. Cette localisation leur permettant à la fois d'être activées par un pH acide et de contenir leurs digestions à l'intérieur de la vésicule. Plus précisément, les cathepsines qui nous intéressent sont la cathepsine B, la cathepsine D, la cathepsine E et la cathepsine L qui sont brièvement introduites ci-dessous.

D'abord, la cathepsine B fait partie de la classe des cystéines protéases. Elle est localisée dans le lysosome et est considérée comme endopeptidase et exopeptidase à la fois

puisque'elle est capable de faire sa fonction à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. La cathepsine B est impliquée dans le cancer et dans la maladie d'Alzheimer. Dans cette dernière pathologie, la cathepsine B et la cathepsine D produisent les peptides *amyloid-beta*, des plaques séniles à partir du précurseur APP (*Amyloid precursor protein*). Ces plaques sont retrouvées en grand nombre chez les patients atteints et sont caractéristiques à cette maladie ^{125, 126}.

La cathepsine D est une protéase à acide aspartique qui est elle aussi localisée au lysosome où elle est activée par un pH acide. La cathepsine D est impliquée dans l'apoptose, dans l'autophagie lysosomale, dans certaines maladies auto-immunes, dans l'inflammation, mais aussi dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer par la dégradation d'APP ^{126, 127}.

Pour sa part, la cathepsine E, une protéase à acide aspartique, est homologue à la cathepsine D. Par contre, elle s'en distingue par ses particularités de localisation : elle ne se retrouve pas dans le lysosome. Sa localisation est variable d'un type cellulaire à l'autre, de plus, elle ne se retrouve pas dans tous les types cellulaires contrairement aux autres cathepsines. Ses localisations les plus répandues sont les endosomes, la membrane plasmique ou dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ses fonctions sont majoritairement liées au système immunitaire où elle est principalement exprimée ¹²⁸. D'autre part, elle est aussi impliquée dans l'apoptose et l'arrêt de la croissance cellulaire ainsi que dans certaines maladies telles que le cancer de la prostate ¹²⁹. Cependant, c'est une protéase peu étudiée contrairement à son homologue, la cathepsine D ¹²⁸.

Finalement, la cathepsine L est localisée au lysosome et fait partie des protéases à cystéine. Elle est impliquée dans le système immunitaire où elle dégrade les chaînes invariables des CMH de classe II. De plus, elle semble participer au cycle cellulaire puisque'elle dégrade des facteurs de transcription nucléaires. Elle est aussi associée au développement des neurones et des cellules NK (*Natural Killers*). Enfin, elle joue un rôle dans le développement de cancers sur plusieurs aspects tels que l'apoptose, l'angiogenèse

ainsi que dans l'invasion et la migration cellulaire, son expression est augmentée lorsque la maladie survient ¹²⁵.

Tableau 3: Protéases homologues aux cathepsines trouvées par le criblage double hybride de vers en stade larvaire L4 avec la protéine argonaute ALG-1 comme cible.

Facteurs	Famille	Fonction principale ou prédite	Homologue humain
ASP-1	Protéase Asparyl	Cellules intestinales, dégénération des neurones	Cathepsine D
ASP-3	Protéase Asparyl	Mort cellulaire des neurones	Cathepsine D et E
CPR-4	Cystéine Protéase	-	Cathepsine L et B
CPL-1	Famille Cathepsine L	Cystéine protéase, développement	Cathepsine L1
CPR-6	Cystéine Protéase	-	Cathepsine L et B

Puisque ce groupe de protéines chez l'humain est très étudié, plusieurs inhibiteurs, anticorps et essais rapporteurs sont disponibles contrairement au nématode *C. elegans*. Conséquemment, nous avons décidé d'utiliser la cellule humaine afin de tester l'hypothèse qu'une ou plusieurs cathepsines pourraient être impliquées dans la voie des miARNs.

3.2. Résultats

3.2.1. Essais rapporteurs luciférase

La stratégie choisie pour vérifier l'hypothèse qu'une ou plusieurs des cathepsines humaines sont impliquées dans la voie de répression par les miARNs est l'utilisation d'essais rapporteurs luciférase. Le principe de l'essai est de transfecter un gène rapporteur, ici la *Renilla* luciférase, qui contient des sites de liaison au miARN *let-7* dans sa région 3'UTR. Le fonctionnement est que lorsque l'enzyme luciférase est traduite, en ajoutant un substrat (luciférine), il y a production de bioluminescence. La lecture de cette luminescence permet de mesurer la quantité d'enzyme produite, dans le cas où il y a répression traductionnelle par les miARNs, la lecture sera moins élevée. Le vecteur utilisé est le psiCHECK2 qui contient la *Renilla* à laquelle des sites complémentaires à *let-7* ont été ajoutés ou non. Le 3'UTR ajouté a été construit pour contenir 8 sites de complémentation imparfaite à *let-7* pour le vecteur psiCHECK2 8X ¹³⁰, tandis que le vecteur psiCHECK2 0X est un rapporteur qui ne contient aucun site de liaison pour le miARN *let-7*. Ces vecteurs contiennent aussi le gène encodant pour la *Firefly* luciférase qui n'a pas été modifié et qui

constitue notre contrôle interne considérant que sa transcription et traduction n'est pas affectée par la voie des miARNs. Ensuite, une fois le vecteur transfecté dans la cellule, il devrait y avoir répression traductionnelle de la *Renilla* du vecteur qui contient les sites de *let-7* en 3'UTR. Le complexe miRISC *let-7* endogène va se fixer sur le 3'UTR de l'ARNm de la *Renilla* Luciférase et en réprimer l'expression (Figure 14). L'expression de la *Firefly* luciférase ne changeant pas, il est possible de normaliser l'unité de luminescence de la *Renilla* avec la luminescence produite par la *Firefly*. Suivant ce principe, sur un graphique montrant les deux vecteurs utilisés psiCHECK2 0X et 8X, la *Renilla* du plasmide contenant les sites de *let-7* (8X) devrait être réprimée tandis que celle ne contenant aucun site de liaison au miARN (0X) devrait avoir une expression plus forte de protéines donc une lecture de luminescence plus élevée. La Figure 15 montre cette expérience contrôle dans la lignée cellulaire HeLa qui a été choisie pour commencer les essais luciférase sur les protéases.

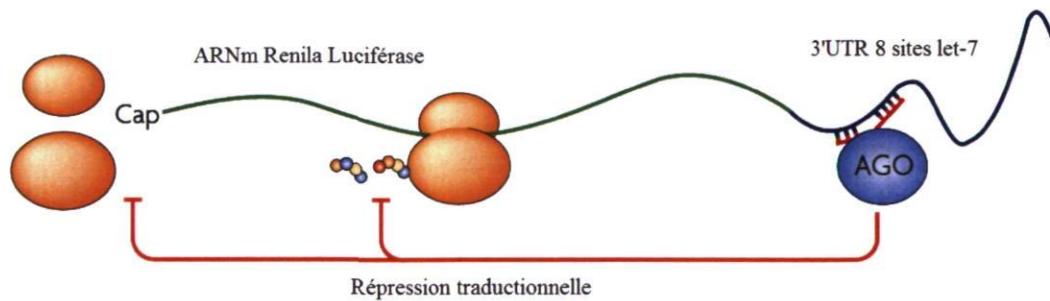


Figure 14 : ARNm de la *Renilla* luciférase du vecteur psiCHECK2. Sa traduction est réprimée par le complexe *let-7* miRISC⁶⁴.

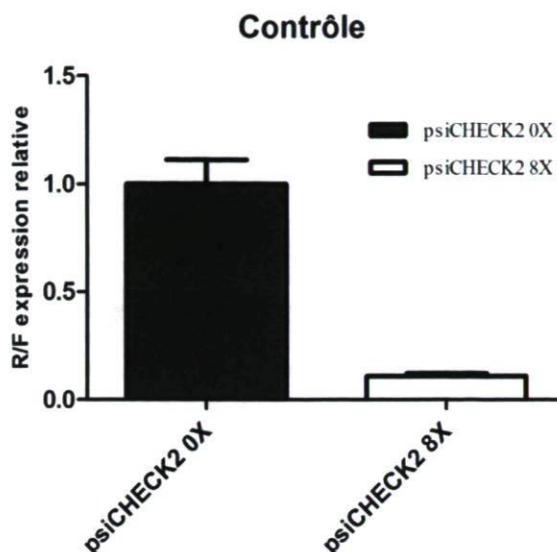


Figure 15 : Graphique contrôle de l'essai rapporteur luciférase. Le vecteur psiCHECK2 0X étant le vecteur vide et le psiCHECK2 8X ayant huit sites de complémentation imparfaite avec le miARN *let-7* situé à la suite de la *Renilla* luciférase. La *Firefly* luciférase est utilisée comme contrôle interne. L'activité de luminescence a été mesurée par le *Dual luciferase reporter system* (Promega). Les barres d'erreurs représentent le SEM pour six expériences indépendantes.

3.2.2. Essais luciférase avec des inhibiteurs de cathepsines B, L et H

L'essai consiste en l'inhibition des cathepsines afin de déterminer si elles pourraient jouer un rôle dans la voie des miARNs. Pour commencer, des drogues inhibant un large spectre de cathepsines ont été utilisées. En effet, si les cathepsines ciblées par les drogues sont essentielles à la répression traductionnelle de la *Renilla* luciférase, qui est régulée par les miARNs, l'expression de luciférase devrait être affectée dans un essai où ces cathepsines sont inhibées. Les expériences ont été faites avec deux drogues, le Q-VD-OPH (*N-(Quinoly)valyl-aspartyl-difluorophenoxymethylketone*) et le Z-VAD-fmk (*Benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone*). Brièvement, le Q-VD-OPH a été utilisé comme contrôle puisqu'il inhibe les caspases, mais n'inhibe aucune cathepsine avec une grande efficacité. Pour sa part, le Z-VAD-fmk inhibe les caspases, mais aussi les cathepsines B, H et L. Donc, si l'obtention d'un effet sur l'expression de la *Renilla* est obtenue sous l'influence des deux drogues, les caspases seraient soupçonnées. Dans le cas où l'effet est spécifique au Z-VAD-fmk, les cathepsines B, H et L seraient soupçonnées

pour jouer un rôle potentiel dans la voie de répression par les miARNs. Le résultat, présenté sous forme de graphique (Figure 16), démontre qu'aucune de ces drogues n'a un effet sur l'expression de la *Renilla* sous le contrôle de *let-7* dans les cellules HeLa. Donc, les cathepsines B, L et H ne sont probablement pas importantes dans la répression traductionnelle par les miARNs.

D'autre part, la cystatin A a été transfectée sous forme de plasmide d'expression. Le peptide, lorsqu'il est exprimé dans la cellule hôte, inhibe les cystéines protéases, c'est-à-dire les cathepsines B, H et L. Le résultat obtenu est le même que pour les drogues Z-VAD-fmk et Q-VD-OPH, il n'y a pas d'effet sur le niveau d'expression de la *Renilla* Luciférase (Figure 16). Ce résultat confirme que les cathepsines B, L et H n'ont pas de rôle essentiel dans la voie de répression par les miARNs.

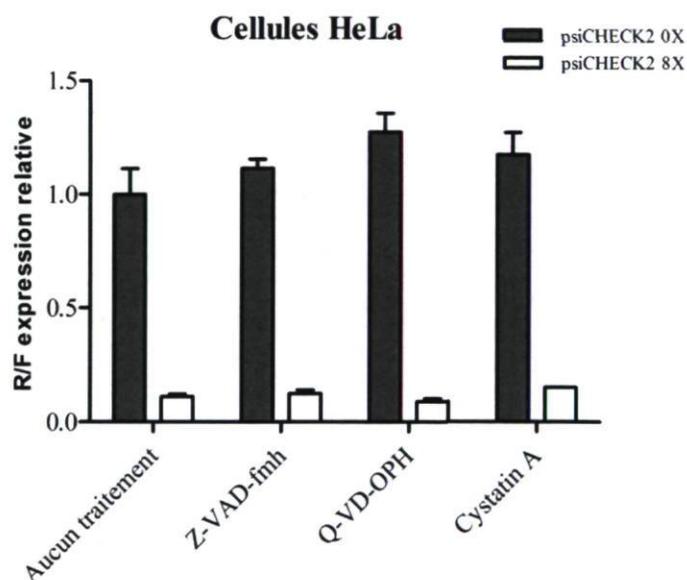


Figure 16 : Essais luciférase avec traitement de différentes drogues chez les cellules HeLa. Les résultats montrés ont été obtenus après 24 heures de traitements avec les drogues Z-VAD-fmk (50 μ M), Q-VD-OPH (10 μ M) et le plasmide exprimant la cystatine A (0,1 μ g/puits). Le plasmide exprimant la *Firefly* et la *Renilla* luciférase est transfecté 24 heures avant l'essai, la *Renilla* peut contenir un 3'UTR qui comporte 8 sites de *let-7* (8X) ou un 3'UTR ne contenant aucun site de *let-7* (0X). Les barres d'erreurs représentent le SEM de six expériences indépendantes.

3.2.3. La cathepsine E

Les cathepsines B, L et H ne jouent pas de rôle dans la voie de répression par les miARNs en utilisant notre essai rapporteur. Par conséquent, les cathepsines D et E sont toujours des candidates potentielles à notre hypothèse que les cathepsines influencent la voie des miARNs. D'abord, notre attention s'est tournée sur la cathepsine E puisque c'est la seule qui n'est pas localisée au lysosome. En effet, elle est localisée dans plusieurs endroits de la cellule selon le type cellulaire. Entre autres, elle peut être localisée aux endosomes chez certains types cellulaires¹²⁸. Cette localisation endosomale de la cathepsine E nous a semblé intéressante sachant que récemment la voie des miARNs a été liée aux endosomes tardifs, aussi appelés les *Multivesicular Bodies* (MVBs) car ils sont formés de plusieurs petites vésicules qui viennent fusionner aux endosomes^{131, 132} (Figure 17). En bref, Gibbins et coll. montrent que les protéines du complexe miRISC GW182 et AGO2, deux protéines impliquées dans la régulation par les miARNs, se retrouvent aux endosomes et aux MVBs. De plus, les ARNm ciblés et leurs miARNs sont enrichis dans ces vésicules. Ils ont remarqué que dans les exosomes sécrétés par les MVBs, GW182 est présent tandis que AGO2 et les miARNs sont absents. Lee et coll. pour leur part démontrent que le blocage de la maturation des MVBs en lysosomes augmente l'activité de répression par les miARNs. Par ailleurs, l'inhibition de la formation des MVBs diminue la fonction des miARNs sur leurs ARNm cibles. Ensemble, ces deux études suggèrent que les complexes miRISCs seraient dépendants des endosomes et des MVBs afin de permettre un recyclage efficace des miRISCs (Figure 17). S'appuyant sur ces études qui établissent la proximité du complexe miRISC aux endosomes, nous avons émis l'hypothèse que la cathepsine E pourrait jouer un rôle dans la répression par les miARNs.

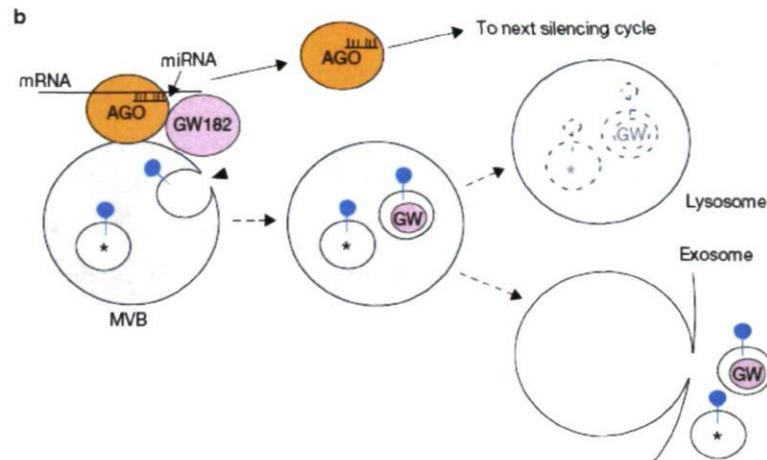


Figure 17 : Modèle de recyclage du complexe miRISC aux endosomes/MVBs. L'inhibition de la fusion des MVBs avec les lysosomes stimule l'activité du miRISC. À l'opposé, bloquer la formation des MVBs inhibe considérablement l'activité du miRISC. La formation des MVBs permettrait l'export de la protéine GW182 hors de la cellule par les exosomes et serait une étape limitante pour la formation du complexe miRISC. La formation des MVBs permettrait l'assemblage et le désassemblage des complexes miRISC associés aux membranes et serait ainsi requis pour la fonction et la maturation de ces complexes miRISC¹³³.

La cathepsine E telle que décrite dans la section 1.1 n'est pas exprimée dans toutes les cellules. D'après la banque de données BioGPS, cette cathepsine n'est pas exprimée chez les cellules HeLa. Nous avons donc utilisé un autre type cellulaire qui exprime la cathepsine E, la lignée cellulaire Huh-7 provenant de cellules de type épithélial d'hépatome. Par la méthode de PCR quantitative, nous avons confirmé que l'expression de l'ARNm de la cathepsine E dans les cellules Huh-7 est significativement plus importante que le niveau retrouvé dans les cellules HeLa (Figure 18). Conséquemment, les cellules Huh-7 ont été utilisées pour tester le rôle de la cathepsine E dans la voie des miARNs.

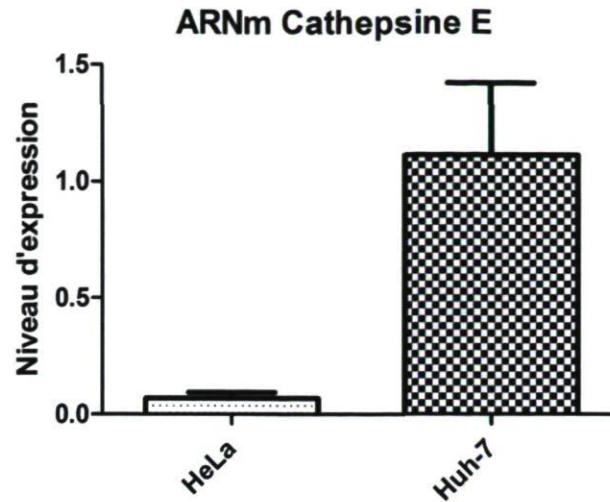


Figure 18 : Expression relative d'ARNm de la cathepsine E dans les cellules HeLa et Huh-7 en rapport avec le niveau d'actine et mesurée par PCR quantitative dans trois expériences indépendantes.

L'essai rapporteur utilisant les inhibiteurs Z-VAD-fmk, Q-VD-OPH et la cycstatine A a été répétée chez les cellules Huh-7 afin de s'assurer qu'ils ont le même effet que sur les cellules HeLa. D'un inhibiteur à l'autre, le résultat ne change pas, par contre l'essai se comporte différemment que dans les cellules HeLa puisqu'on observe une activation et non une inhibition de l'expression de la *Renilla* luciférase avec le vecteur contenant les huit sites de liaison pour le miARN *let-7* (Figure 19). Avec ce vecteur, on s'attendait à une répression de la traduction de la *Renilla*, donc une diminution de la luminescence, mais le contraire a été obtenu.

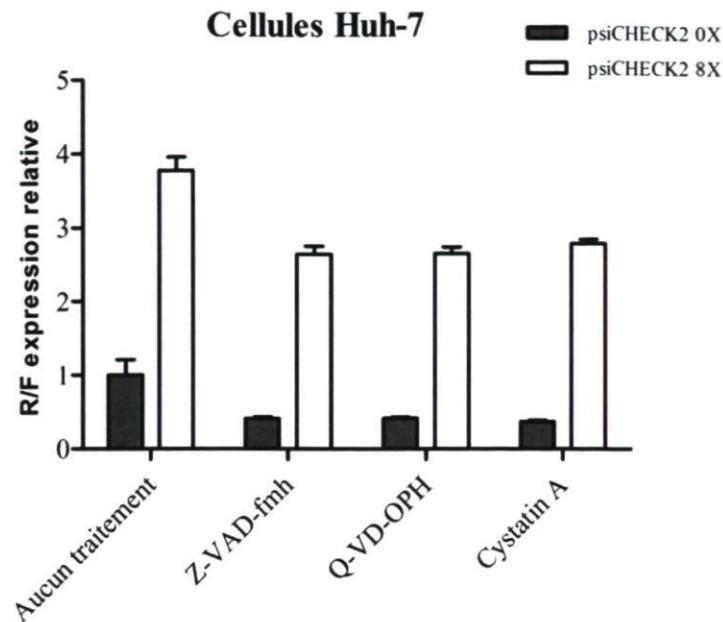


Figure 19 : Essais luciférase avec traitement de différentes drogues chez les cellules Huh-7. Les résultats montrés ont été obtenus après 24 heures de traitements avec les drogues Z-VAD-fmh (50 μ M), Q-VD-OPH (10 μ M) et le plasmide exprimant la cystatine A (0,1 μ g/puits). Le plasmide exprimant la *Firefly* et la *Renilla* luciférase est transfecté 24 heures avant l'essai, la *Renilla* peut contenir un 3'UTR qui comporte 8 sites de *let-7* (8X) ou un 3'UTR ne contenant aucun site de *let-7* (0X). Les barres d'erreurs représentent le SEM de six expériences indépendantes.

Parallèlement, nous avons traité les cellules Huh-7 avec des siARNs afin d'atténuer spécifiquement la cathepsine E. Puisque les inhibiteurs de la cathepsine E ne sont pas spécifiques à cette protéase et répriment aussi la cathepsine D, la méthode d'ARN interférence s'avère la plus efficace pour réprimer spécifiquement l'activité de la cathepsine E. Les siARNs contre la cathepsine E sont toxiques conséquemment à une concentration de plus de 100nM ; on observe une perte d'adhésion cellulaire suivie d'un fort taux de mortalité. Par contre, à 50nM on observe des cellules en croissance et avec une apparence saine. On a donc mesuré par PCR quantitative la quantité d'ARNm de la cathepsine E, ciblé par les siARNs, et on a confirmé sa diminution en quantité (Figure 20). Le résultat de l'essai luciférase avec le siARN contre la cathepsine E n'est pas concluant puisque le même effet d'augmentation de la luminescence de la *Renilla*, avec le 3'UTR contenant les huit sites de *let-7*, est observé (Figure 21). Finalement, la cathepsine E n'est

pas éliminée comme candidate de protéase associée à la voie des miARNs puisque les expériences de rapporteur luciférase donnent un effet aberrant étant donné que la *Renilla* luciférase, sous le contrôle de *let-7* est augmentée plutôt que d'être diminuée.

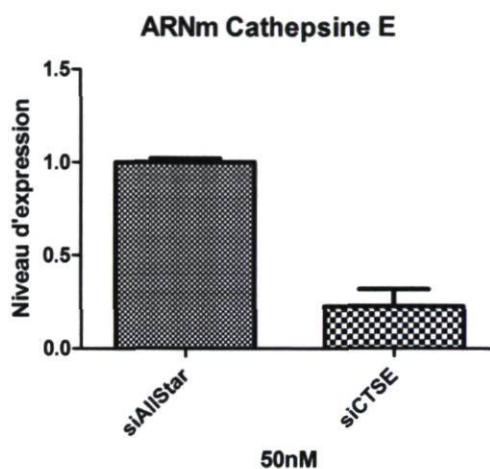


Figure 20 : Expression relative d'ARNm de la cathepsine E dans les cellules Huh-7 traitées soit avec le siARN contrôle (siAllStar) ou le siARN contre la cathepsine E (siCTSE), tous les deux à 50nM. L'expression d'ARNm est mesurée par PCR quantitative dans deux expériences indépendantes, en rapport au niveau d'actine endogène, les barres d'erreurs représentent le SEM.

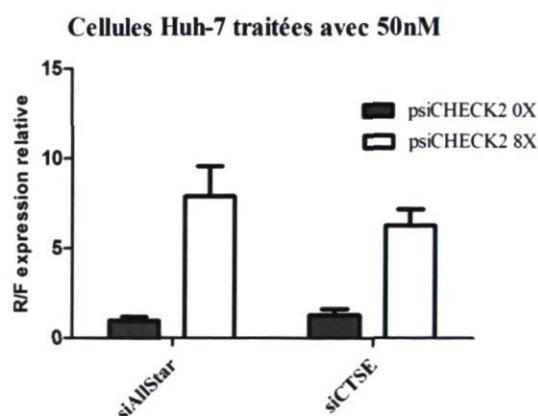


Figure 21 : Essais luciférase avec un traitement de siARNs contre la cathepsine E chez les cellules Huh-7. Les résultats montrés ont été obtenus après 24 heures de traitements avec le siARN contrôle (siAllStar) et le siCTSE contre la cathepsine E, tous les deux à 50nM. Le

plasmide exprimant la *Firefly* et la *Renilla* luciférase est transfecté 24 heures avant l'essai, la *Renilla* peut contenir un 3'UTR qui comporte 8 sites de *let-7* (8X) ou un 3'UTR ne contenant aucun site de *let-7* (0X). Les barres d'erreurs représentent le SEM de quatre expériences indépendantes.

3.2.4. L'inhibiteur de *let-7*

Dans le but de comprendre l'effet inattendu et obtenu lors de l'utilisation des cellules Huh-7 et des vecteurs rapporteurs psiCHECK2 8X et 0X, nous avons émis l'hypothèse que cette augmentation de la luciférase pourrait être due à une activation de la traduction par le complexe miRISC-*let-7*. Dans la littérature, l'activation de la traduction par des miARNs est connue, par contre cette activation est moins fréquente que la répression¹³⁴. Sous des conditions cellulaires particulières, un même miARN peut mener à une répression ou à une activation de la traduction en fonction des différentes conditions. Ce phénomène a déjà été montré au cours des différents stades du cycle cellulaire¹³⁵. Suivant ces observations, nous avons choisi de vérifier si ce phénomène était lié à l'action du miARN *let-7* sur l'ARNm cible. Pour ce faire, nous avons utilisé le même principe d'essai rapporteur, mais cette fois en inhibant le miARN *let-7*. Cet inhibiteur va se fixer sur les molécules d'ARN de *let-7* par complémentarité de base et ainsi empêcher le miARN de jouer son rôle en complexe avec le miRISC¹³⁶. L'expérience d'inhibition de *let-7* a été effectuée chez les cellules Huh-7 ainsi que chez les cellules HeLa comme contrôle où notre système de rapporteur fonctionne bien. Les résultats montrent que chez les cellules Huh-7, rien ne bouge tandis que chez les cellules HeLa, l'ajout de l'inhibiteur de *let-7* résulte en une augmentation de la *Renilla* luciférase qui contient les sites complémentaires de *let-7* (Figure 22). Ce résultat suggère que la diminution du miARN *let-7* dans les cellules HeLa augmente considérablement l'expression de la *Renilla* sous le contrôle de *let-7* (psiCHECK2 8X). La luminescence, dans ce cas, est plus exprimée qu'avec le rapporteur qui n'est pas sous le contrôle de *let-7* (psiCHECK2 0X). Avant de commencer l'utilisation des cellules Huh-7, nous avons vérifié si *let-7* était présent dans ces cellules, ce qui était le cas, mais à un niveau plus faible que celui retrouvé dans les cellules HeLa (Figure 23).

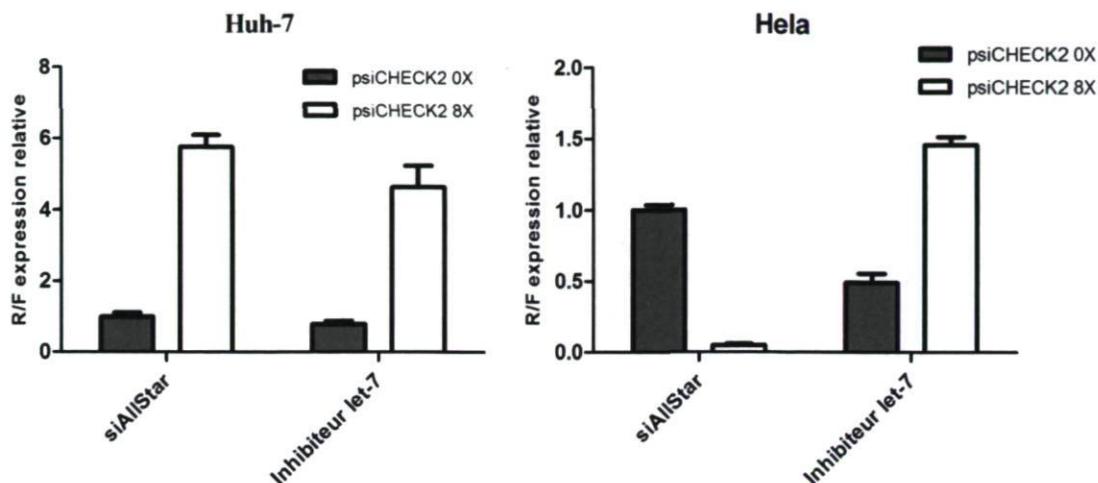


Figure 22 : Essais luciférase avec un traitement de *hsa-let-7 miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitors* qui empêche le miARN *let-7* de faire sa fonction. Les deux types cellulaires sont testés avec 24 heures de traitements à 50 nM. Le siAllStar est utilisé comme contrôle de la même façon que l'inhibiteur de *let-7*. Le plasmide exprimant la *Firefly* et la *Renilla* luciférase est transfecté 24 heures avant l'essai, la *Renilla* peut contenir un 3'UTR qui comporte 8 sites de *let-7* (8X) ou un 3'UTR ne contenant aucun site de *let-7* (0X). Les barres d'erreurs représentent le SEM de trois expériences indépendantes.

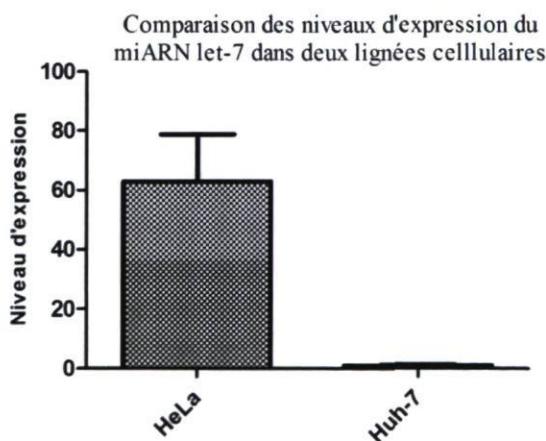


Figure 23 : Expression relative du miARN *let-7* dans les cellules Huh-7 et cellules HeLa. L'expression d'ARNm est mesurée par PCR quantitative dans trois expériences indépendantes, en rapport avec le snoARN U6, les barres d'erreurs représentent le SEM.

Discussion

I. Discussion et perspectives

Le criblage double hybride, les avantages et limitations de la méthode

Les mécanismes de répression traductionnelle par les miARNs sont encore peu compris. Plusieurs hypothèses sont proposées telles que la répression à l'initiation de la traduction, la répression postinitiation et la répression par la déstabilisation de l'ARNm; tous ces mécanismes sont dépendants des complexes miRISCs qui se fixent en 3'UTR des ARNm ciblés. Pendant ma maîtrise, on s'est intéressé aux interrogations concernant ces mécanismes. Par criblage double hybride avec la protéine argonaute ALG-1 de l'organisme *C. elegans*, nous avons identifié de nouveaux facteurs d'interaction qui pourraient intervenir dans les mécanismes de répression traductionnelle par les miARNs. Ainsi, l'étude de ces facteurs pourrait aider à la compréhension des mécanismes de répression. Nous avons montré que 92 facteurs entrent en interaction avec la protéine ALG-1 par double hybride.

La méthode du double hybride est adéquate pour l'obtention d'interactions directes entre deux facteurs protéiques. Par contre, elle présente aussi plusieurs limitations, par exemple l'organisme utilisé, *Saccharomyces cerevisiae*, ne contient pas les mêmes facteurs de repliements protéiques que l'organisme modèle utilisé, *C. elegans*. Un repliement exact de la protéine de *C. elegans* chez *S. cerevisiae* est possible, mais peut aussi être difficile à obtenir. D'autre part, l'obtention d'un si grand nombre de facteurs dans le criblage peut s'expliquer par le fait que la banque d'ADNc utilisée dans ce cas-ci ne se compose que de fragments de protéines. Travailler avec ces fragments protéiques comprend un avantage incontournable, c'est que le domaine exact du facteur d'interaction qui interagit avec la cible peut être connu après le criblage. En revanche, il y a aussi le désavantage du nombre de faux positifs possiblement élevé dans les multiples facteurs d'interaction obtenus. On explique ces multiples interactions par deux raisons principales : 1) un domaine qui

s'associe à ALG-1 peut être présent chez plusieurs protéines, donc interagir plusieurs fois et 2) un domaine pourrait activer de façon non spécifique les promoteurs GAL des gènes rapporteurs utilisés. Dans ce cas, il est important de faire l'expérience avec les plasmides des facteurs d'interaction trouvés en les cotransformant avec le vecteur vide qui n'exprime pas la protéine cible. On est en présence d'un faux positif s'il y a croissance. Malgré tout, le criblage nous a donné plusieurs interacteurs potentiels. Des études plus approfondies sont nécessaires afin de lier ou non les facteurs d'interaction trouvés avec la voie de répression par les miARNs. Une analyse plus pointue de chacune des séquences des fragments de protéines trouvées serait aussi intéressante afin d'éliminer quelques interacteurs, ou du moins les regrouper à l'aide de leurs domaines communs. D'ailleurs, en ce qui concerne le groupe des protéases, l'étude détaillée a été faite par l'alignement des séquences des fragments obtenus en criblage double hybride. Elle nous a permis de déterminer que les fragments trouvés étaient tous très semblables et qu'ils sont homologues au domaine catalytique des cathepsines. Le domaine consensus déterminé à partir des séquences obtenues par double hybride a été nommé DLA1 (Domaine de Liaison à ALG-1) Figure 12. L'expérience du double hybride avec ce domaine montre qu'il interagit toujours avec ALG-1 pleine longueur, mais n'interagit pas avec ALG-2. Assurément, l'utilisation de la protéase complète dans cette interaction double hybride serait requise une fois que la protéase impliquée dans la voie de répression par les miARNs sera identifiée.

Les protéines ribosomales dans la voie des miARNs

Les résultats du criblage sont divisés en 8 sous-groupes dans le Tableau 2. Plusieurs facteurs d'interactions pourraient être intéressants à étudier pour de multiples raisons. Le premier auquel nous nous sommes attardés est celui des protéines ribosomales. Par essai double hybride avec des protéines complètes, j'ai montré que plusieurs des grandes et des petites sous-unités ribosomales n'interagissent pas directement avec la protéine ALG-1 (Figure 10). Du reste, rien n'exclut les autres sous-unités que je n'ai pas mises à l'épreuve par double hybride, même sans interaction physique avec ALG-1, puissent avoir une influence dans les mécanismes de régulation posttranscriptionnels par les miARNs. D'autre part, RPS-14, une petite sous-unité ribosomale, a été trouvée en complexe avec ALG-1 par

immunoprécipitation. De plus, l'atténuation de RPS-14 mène à une augmentation de la fonction de *let-7* chez des vers mutants pour ce miARN. Il y aurait une interaction négative de RPS-14 sur la fonction de *let-7*¹¹⁴. Certaines sous-unités ribosomales pourraient donc avoir un rôle dans le mécanisme de contrôle traductionnel par les miARNs. Elles sont aussi des candidates intéressantes puisqu'elles sont directement liées à la production protéique.

La protéine ceRACK-1, une protéine d'échafaudage trouvée dans le criblage, est également classée dans le groupe des sous-unités ribosomales puisqu'on la trouve, entre autres, à la sous-unité ribosomale 40S. Par des essais doubles hybrides, j'ai montré l'interaction de cette protéine avec la protéine argonaute ALG-1 et plus particulièrement avec l'extrémité N-Terminale de cette dernière. L'interaction est spécifique à ALG-1 puisque ALG-2, qui est très homologue à ALG-1, n'interagit pas avec ceRACK1 en double hybride. La spécificité de l'interaction entre ALG-1 et ceRACK-1 s'explique par le fait que la région d'ALG-1 qui interagit avec ceRACK1 ne se retrouve pas dans la protéine ALG-2 (Figure 11). Encore que ALG-1 et ALG-2 appartiennent à la même voie de répression traductionnelle par les miARNs et qu'il existe une liaison génétique entre ces deux argonautes, ce qui suggère qu'elles ont des fonctions redondantes dans cette voie. En effet, les mutants pour une seule des deux protéines survivent tandis que les doubles mutants pour ces protéines ne sont pas viables. Malgré le fait qu'aucune étude approfondie n'a été réalisée sur les fonctions distinctes de ALG-1 et ALG-2, des données de notre laboratoire supportent qu'il existe des différences entre ces deux argonautes ; les nématodes mutants pour ALG-1 ont un phénotype plus sévère que ceux pour ALG-2 (A.R. Vasquez, données non publiées) et ces protéines possèdent des caractéristiques biochimiques différentes (S. Bouasker, données non publiées) ce qui laisse entendre qu'elles possèdent des différences dans leurs fonctions cellulaires. L'identification d'interacteurs spécifiques à une seule des deux protéines signifie un pas vers la découverte de ces différences de fonctions. Enfin, un criblage double hybride avec la protéine ALG-2 est en cours dans le laboratoire. Ce criblage est intéressant puisqu'il permettra la comparaison des facteurs obtenus avec ceux du criblage avec ALG-1.

Parmi les facteurs d'interaction que j'ai identifiés, la protéine RACK1 est une protéine très conservée à travers les espèces, de la levure à l'humain. Plusieurs protéines interagissent avec RACK1 grâce à ses nombreux domaines riches en acide aminé tryptophane et aspartate (domaine WD)¹³⁷. Elle se retrouve, entre autres, liée à la sous-unité ribosomale 40S. RACK-1 y est située à la sortie de l'ARNm en traduction. Elle est importante pour le recrutement de différentes protéines impliquées dans la régulation de la traduction. La protéine kinase C (PKC), une protéine recrutée par RACK-1 à la sous-unité ribosomale 40S, a une fonction importante pour l'initiation de la traduction puisqu'elle phosphoryle le facteur eIF6 qui, une fois phosphorylé, va permettre l'association des sous-unités 40S et 60S. eIF6 non phosphorylé empêche l'association des sous-unités 40S et 60S compromettant alors l'initiation de la traduction¹²³.

La proximité entre RACK1 et les ribosomes, la confirmation par double hybride de l'interaction entre ceRACK1 et ALG-1 chez *C. elegans* ainsi que les phénotypes hétérochroniques chez le nématode par ARN interférence contre ceRACK1 ont conduit à la soumission d'un article intitulé « *Conserved function of a ribosomal protein RACK1 in the microRNA pathway* ». Dans cet article, chez les deux modèles d'étude, *C. elegans* et la cellule humaine, les interactions par immunoprécipitation entre ceRACK1/ALG-1 ainsi que RACK1/AGO2 ont été mises en évidence. Il y est aussi montré que l'atténuation de RACK1 par ARN interférence résulte en une augmentation de la quantité de miARNs et que, dans ces mêmes conditions, le miARN *let-7* est largement diminué dans la fraction des polysomes comparés aux conditions contrôles. L'article suggère que RACK1 est nécessaire pour le recrutement des protéines ALG-1 ou AGO2 du complexe miRISC à l'ARNm cible. Les détails des expériences et discussions se retrouvent dans l'article en Annexe I de ce document. En somme, les protéines ribosomales sont intéressantes à étudier plus en détail dans la voie des miARNs où RACK1 y joue une fonction maintenant connue.

L'hypothèse de l'implication des protéases dans la répression par les miARNs

Le groupe des protéases trouvé dans le criblage double hybride est la deuxième voie explorée au laboratoire. Deux hypothèses sont intéressantes à ce stade, l'hypothèse de

l'article de Nottrott et coll. que le peptide naissant, lors d'une répression traductionnelle en cours de traduction active, serait dégradé par une protéase⁹⁷. La deuxième hypothèse serait qu'il pourrait être logique de trouver des protéases comme interacteurs double hybride à ALG-1 qui auraient comme rôle la prise en charge de cette argonaute en vue de sa dégradation. La méthode que j'ai utilisée pour évaluer l'activité de certaines protéases trouvées dans le criblage est un essai rapporteur luciférase chez des cellules humaines. Les protéines ciblées dans les essais sont des cathepsines puisque plusieurs de leurs homologues ont été trouvés dans le criblage double hybride. L'essai luciférase rapporteur est intéressant dans le sens qu'en inhibant des protéines essentielles à la voie des miARNs, l'effet observé sur la luciférase ayant le 3'UTR avec les sites de *let-7* ne sera plus réprimée. Mes résultats montrent que les cathepsines B, L et H ne sont pas essentielles à cette voie de répression. Par ailleurs, il est important de savoir que cet essai n'est pas approprié dans le cas où le facteur inhibé aurait un rôle accessoire dans la voie de répression traductionnelle. Effectivement, si une protéase dégrade les peptides naissants, mais que cette dégradation n'est pas essentielle à la répression traductionnelle postinitiation, la protéine fonctionnelle ne sera pas produite et l'essai rapporteur utilisé ne sera d'aucune utilité puisque le niveau d'expression de la *Renilla* sous le contrôle de *let-7* sera réprimé quand même. Pour résoudre cette possibilité, une expérience telle que celle décrite dans l'article de Nottrott et coll.⁹⁷ serait primordiale afin de savoir si avec une inhibition des protéases, le peptide naissant serait détectable par la technique d'immunoprécipitation mise au point par ce groupe.

En ce qui concerne les protéases qui dégraderaient des protéines liées à la voie des miARNs, l'expérience d'essai rapporteur est aussi un essai convenable. Par contre si le facteur n'est pas essentiel à l'étape de la répression traductionnelle et agit en aval de la formation du complexe miRISC, encore une fois, aucun effet ne sera détectable par cet essai. Il serait ainsi important de comparer la quantité de protéines connues dans la voie des miARNs après le traitement avec les différents inhibiteurs de protéases. En bref, d'après mes expériences d'essais luciférase, les cathepsines B, L et H ne sont pas essentielles à la voie de répression traductionnelle.

La localisation endosomale de certaines protéines et leur potentiel dans la voie de répression par les miARNs

Les cathepsines et la majorité des protéases se trouvent souvent dans des compartiments de la cellule afin d'éviter leur activité anarchique de dégradation protéique. Deux groupes de recherche ont lié la voie des miARNs avec les endosomes tardifs, les *Multivesicular bodies* (MVBs). Ces compartiments seraient nécessaires à un recyclage du complexe miRISC^{131, 132}. La cathepsine E est souvent localisée à ces endosomes. Nous avons donc voulu analyser son implication dans la voie des miARNs par la méthode du rapporteur luciférase. Les cellules Huh-7 ont été utilisées dans cet essai et rien n'a été concluant puisque l'essai luciférase avec le rapporteur contenant les sites de *let-7* n'est pas réprimé dans ces cellules, il semble plutôt activé. Mes résultats ne confirment, ni n'infirment, que la cathepsine E aurait une influence dans la voie de répression traductionnelle.

D'autre part, nous avons voulu comprendre ce à quoi cet effet d'activation de la luciférase était dû. L'inhibiteur de *let-7* a été utilisé pour tenter de comprendre si ce miARN était responsable de l'activation de l'expression de la luciférase avec le rapporteur contenant des sites de ce miARN. Mes résultats montrent que non, en fait il n'y a aucune différence d'expression de la luciférase avec ou sans l'inhibiteur de *let-7* dans les cellules Huh-7. Chez les cellules HeLa, l'inhibiteur de *let-7* dans l'essai rapporteur inhibe l'effet de répression. Plus encore, l'expression de la luciférase sous le contrôle de *let-7* est augmentée en comparaison au rapporteur contrôle qui ne contient aucun site de liaison à *let-7* (Figure 22). Nous avons donc comparé les niveaux d'expression du miARN *let-7* par PCR quantitative entre les cellules HeLa et Huh-7 pour nous rendre compte que les cellules Huh-7 n'expriment que très faiblement ce miARN (Figure 23). Ces résultats suggèrent que la quantité du miARN *let-7* n'est pas assez élevée pour avoir un effet de répression sur le rapporteur. Par contre, ce bas niveau d'expression de *let-7* n'explique pas l'activation de la luciférase ni chez les cellules Huh-7 ni chez les HeLa. Plusieurs expériences devraient être faites au sujet de cet effet d'activation de la luciférase puisqu'il est tout de même intéressant que cet effet soit observé en présence de sites de liaison pour le miARN *let-7*. En premier lieu, une expérience simple qui consiste à ajouter des *mimics* de *let-7* aux

cellules Huh-7 pourrait démontrer si, dans ces cellules, la répression traductionnelle par ce miARN est possible. En deuxième lieu, on pourrait aussi altérer la voie des miARNs par l'atténuation d'un membre connu de cette voie, par exemple Dicer, qui nous indiquerait si cette activation de la traduction est dépendante de la voie des miARNs. En troisième lieu, l'essai d'un nouveau rapporteur luciférase ciblant le même miARN serait intéressant à essayer pour comprendre si l'augmentation de luciférase est spécifique à notre rapporteur. En quatrième lieu, on trouve dans la littérature des démonstrations qu'un même miARN peut réprimer ou activer la traduction dépendamment du stade dans le cycle cellulaire. S'il n'y a pas de répression par le *mimic let-7* chez les Huh-7, il serait intéressant de faire des expériences de rapporteurs à différents stades du cycle cellulaire. En somme, la cathepsine E n'est pas éliminée comme candidate de protéase impliquée dans la voie des miARNs. Les mêmes essais rapporteurs pourraient être effectués sur un autre type cellulaire exprimant la cathepsine E montrant ainsi son implication ou non dans la voie des miARNs. Dans les cellules Huh-7, un autre essai rapporteur impliquant un autre miARN que *let-7* pourrait être une autre solution pour évaluer l'importance de la cathepsine E dans la répression par les miARNs. D'un autre côté, la cathepsine D, plus répandue à travers les types cellulaires, est aussi une protéase intéressante à étudier dans notre système en utilisant l'inhibiteur Pepstatin A qui est spécifique à ce type de protéases.

Les endosomes et vésicules cellulaires brièvement introduits ci-dessus sont aussi une piste intéressante pour continuer dans notre recherche de protéines impliquées dans la voie des miARNs. En ce sens, deux articles font le lien avec la voie des miARNs et les endosomes. Par contre, le mécanisme par lequel ils interagissent n'est pas connu^{131, 132}. Dans le laboratoire, une sous-unité du complexe GARP, nécessaire au transport rétrograde de molécules de l'endosome précoce ou tardif à l'appareil de Golgi, a été identifiée comme un interacteur génétique avec ALG-2 (A.R. Vasquez). Jusqu'à présent, les données supportent l'implication de ces endosomes dans la voie des miARNs, ainsi que dans d'autres voies utilisant des protéines Argonautes et de courts ARN non-codants. Il est donc envisageable que la cathepsine E soit aussi impliquée dans ces autres voies de régulation géniques.

De plus, un lien entre la protéine d'échafaudage RACK1 et les endosomes est connu. Bien que dans ce mémoire la protéine RACK1 ait été traitée surtout pour ses rôles dans le contrôle de la traduction, elle est aussi localisée aux endosomes de recyclage. RACK1 est nécessaire dans les embryons de *C. elegans* à la localisation du marqueur des endosomes de recyclage, RAB11. Elle serait importante pendant la division cellulaire embryonnaire pour assurer le trafic membranaire jouant sur la redistribution des endosomes de recyclages¹³⁷. La localisation de RACK1 aux endosomes est très intéressante puisque cette protéine a été trouvée dans le criblage double hybride et identifiée comme protéine impliquée dans la voie des miARNs (Annexe I). Les endosomes étant aussi liés à cette voie, il y aurait peut-être un mécanisme à vérifier qui relierait ces vésicules et la protéine RACK1, laquelle on a trouvé un rôle dans la voie des miARNs (Jannot G. Bajan S. et coll. en révision chez EMBO J.).

Les modifications posttraductionnelles; une voie à explorer dans la répression par les miARNs

Un groupe de facteurs d'interaction en double hybride sur lequel nous ne nous sommes pas penchés encore, celui des phosphatases, serait intéressant à tester dans la voie des miARNs. Elles ont comme fonction d'enlever un groupe phosphate à leurs molécules cibles. Il n'y a pas d'évidence jusqu'à maintenant que ces protéines pourraient jouer un rôle dans la voie des miARNs. Par contre, il est connu que la protéine argonaute responsable de la voie des miARNs chez l'humain, AGO2, est phosphorylée sur la sérine-387. Cette phosphorylation est dépendante de la voie p38 MAPK et elle est nécessaire pour la localisation de AGO2 aux Corps-P¹³⁸. D'autre part, récemment la protéine kinase LRRK2 a été montrée dans le contrôle de la production protéique par les miARNs. Lorsqu'elle est mutée pour un gain de fonction, elle est une cause de la maladie de Parkinson familiale sporadique. LRRK2 s'associe avec dAGO1 et hAGO2 et serait important pour la régulation négative de ces protéines¹³⁹. En somme, des protéines de modifications posttraductionnelles affectent l'activité et la régulation de certaines protéines dans la voie des miARNs. Les phosphatases seraient donc des candidates puisqu'elles pourraient déphosphoryler des protéines changeant ainsi leur conformation et parfois même leurs fonctions. Elles pourraient agir de façon indirecte dans le contrôle de la synthèse protéique

par les miARNs. En bref, le criblage double hybride nous offre plusieurs pistes de recherche pour la découverte de nouvelles protéines impliquées dans la voie de répression par les miARNs.

II. Conclusion

Mes travaux de maîtrise ont permis l'identification de plusieurs facteurs d'interaction avec la protéine ALG-1 par la méthode du double hybride. Ils pourraient affecter la voie des miARNs. La découverte de l'interacteur ceRACK1 est un exemple que les interactions trouvées par double hybride peuvent mener à une meilleure compréhension de la voie de répression par les miARNs. Les questionnements sur les mécanismes de répression par les miARNs dans la littérature sont toujours nombreux. De plus, la découverte de plusieurs facteurs d'interactions, et la recherche de leurs implications dans la voie des miARNs, sont importantes dans la compréhension des mécanismes de régulation de la traduction par les miARNs. Les protéases sont d'intéressantes candidates autant pour leurs rôles de dégradation protéique que par leurs localisations dans le trafic vésiculaire cellulaire qui a été récemment lié aux mécanismes de la voie des miARNs.

L'étude des facteurs d'interaction trouvés et une meilleure compréhension de la voie de régulation de la synthèse protéique sont nécessaires à l'explication de plusieurs maladies et de phénomènes cellulaires dans lesquels les miARNs sont impliqués. Mes recherches peuvent fournir, à moyen et long terme, des pistes intéressantes d'implication, même peut-être des pistes thérapeutiques. Qui sait?

Matériel et méthodes

i. Criblage double hybride

Le criblage double hybride a été fait par cotransformation de la construction contenant l'ADNc cible, ALG-1 avec les constructions contenant le mixte de la banque d'ADNc. Cette dernière a été produite à partir de vers *C.elegans* au stade L4 dont l'ADNc a été cloné dans le vecteur pGADT7rec et transformé dans la souche *S.cerevisiae* AH109. Un mL de cette souche transformée a été mis en culture durant 16 heures à 30°C dans 25 mL de milieu restrictif en acide aminé leucine. Les levures de cette culture ont été récupérées et mises en culture dans un milieu riche (2X YAPD) pendant environ 4 h jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,761. Ces levures ont été traitées au LiAc 0,1 M et incubées à 25 °C pendant 30 minutes, ce qui les rend compétentes. Par la suite, un mixte de PEG à 80 %, de LiAc 1M à 12 % et d'ADNss 2mg/mL à 8 % ainsi que la construction cible, ici ALG-1 clonée dans pGBKT7 à raison de 2,4 µg/tube. Après 30 minutes à 30 °C, un choc thermique à 42 °C de 30 minutes a été fait et les levures nouvellement transformées ont été étalées sur un milieu de culture restrictif en leucine, tryptophane, histidine et adénine. Un titrage de l'efficacité de transformation est testé en parallèle sur un milieu restrictif en leucine et tryptophane pour s'assurer de couvrir le génome du nématode au moins trois fois. Les boîtes de pétris sont incubées à 30 °C pendant 7 jours et les colonies isolées sont récoltées. Ces colonies sont ensuite soumises à une PCR sur colonies avec les conditions suivantes : 95°C, 30 " ; 45°C, 30 " ; 72°C, 30 " répétés 20 fois. Lorsque la PCR est positive, elle est envoyée à séquencer à la plateforme de séquençage du CHUL. On analyse ensuite les séquences obtenues avec l'outil *Blast* disponible pour le nématode (www.wormbase.org).

ii. Plasmides

a. Double Hybride

Les vecteurs utilisés en double hybride ont été clonés soit dans pGADT7 ou dans pGBKT7 (Clontech). C'est à partir d'extrait d'ARN total de l'organisme *C. elegans* qu'on a obtenu l'ADNc pleine longueur des protéines ALG-1, ceRACK-1 et ALG-2 ainsi que la région conservée des *cathepsin-like* chez *C. elegans*, DLA1 (Domaine de liaison à ALG-1). L'utilisation de la transcriptase inverse de Roche (*Transcriptor Reverse Transcriptase*) a permis l'obtention de l'ADNc de ces derniers. À partir de PCR il a été possible de faire les constructions dérivées qui sont principalement des délétions, mais aussi des mutants qu'on a obtenus par mutagenèse dirigées. Les oligonucléotides utilisés pour chacune des constructions sont décrit dans le Tableau 4. Pour tous les clonages, les conditions PCR correspondent à 30 cycles : 95 °C, 30"; TM-5 °C, 30 " ; 68 °C, 1 '/Kpb, pour se terminer par une étape d'élongation finale à 68 °C pendant 10'. Les produits PCR ont été digérés avec les enzymes correspondantes et dans les conditions idéales de chacune de ces enzymes (NEB). Ensuite, les extrémités cohésives de ces produits PCR digérés ont été réassociées en utilisant l'ADN Ligase T4 (Invitrogen). Après transformation dans des bactéries compétentes DH5 α , l'ADN des clones positifs a été séquencé (Plateforme de séquençage et de génotypage, CHUL, Québec, Canada) en utilisant les amorces appropriées.

b. Essais luciférase

En ce qui concerne les essais luciférase, les vecteurs utilisés sont une gracieuseté du Dr. Gyorgy Hutvagner et sont énumérés comme suit : pls1-HMGA2-luc-wt, pls1-HMGA2-luc-m7 (Addgene); pGL3, pGL2 (Promega); psiCHECK2-*let-7* 0X (Promega), psiCHECK2-*let-7* 8X (Addgene plasmid 20931). Le plasmide exprimant la cystatine A est une générosité du Dr. Josée Lavoie.

Tableau 4 : Liste des constructions et des amorces utilisées

Insert	Vecteur	Orientation	Oligonucléotides (5'-3')	Enzymes de restriction
alg-1	pGBKT7	5'	ATTGCTCATATGATGTCCGGCGGGCCGAATATTTG	NdeI
		3'	ATTGCTCCCGGGTTAAGCAAAGTACATGACGTTGTTGGCA	SmaI
alg-1Δ1-132	pGBKT7	5'	ACGACGGATCCGGTTACCTGGCGGCAACCAGAGT	BamHI
		3'	ACGACGCTGCAGTTAAGCAAAGTACATGACGTTGTTGG	PstI
alg-1 Δ 1-66	pGBKT7	5'	ACGACGGATCCGGATGAATGATCTAGAAGAAATATTTAATTCT	BamHI
		3'	ACGACGCTGCAGTTAAGCAAAGTACATGACGTTGTTGG	PstI
alg-2	pGBKT7	5'	ATTGCTCATATGATGTCCCTCTGCCTGTACA	NdeI
		3'	ATTGCTCCCGGGTTAGGCAAATACATGACGTTGT	SmaI
ceRack-1	pGADT7	5'	ATTGCTCATATGATGGTCCAAGAGCAAATGAAG	NdeI
		3'	ATTGCTCCCGGGTTAGTTGGAAGCACGGATC	SmaI
ceRack-1m	pGADT7	5'	CCTGTCATCTTCCGACGACGAGACTATCCTTGTTGG	-
		3'	CCAAACAAGGATAGTCTCGTCGTCGGAAGATGACAGG	-
rps-2	pGADT7	5'	ATTGCTCATATGATGGCCGATAGAGGAGG	NdeI
		3'	GGCAGTGAATCTTAATTGCGGGCAAGGTAC	EcoRI
rps-6	pGADT7	5'	ATTGCTCATATGATGAGACTTAACTTCGCCTAC	NdeI
		3'	GGCAGTCTCGAGTTACTTCTTGCTGGTCTTC	XhoI
rsp-12	pGADT7	5'	ATTGCTCATATGATGCTGACGCAGGAGGAG	NdeI
		3'	GGCAGTCTCGAGTTAGTCTTGAGGGCAAAGTAG	XhoI
rpl-1	pGADT7	5'	AATGCCATATGATGTCGAAGGTTCCCGC	NdeI
		3'	AATGCCCGGGTTAATAAATCTTTGTGGCTTTCCCAT	XmaI
rpl-7	pGADT7	5'	AATGCCATATGATGCCTAGCAAGAAGTTAT	NdeI
		3'	AATGCCGATCCTTAGAGCTTCCAAGATCACG	BamHI
rpl-12	pGADT7	5'	AATGCCATATGATGCCACCAAAGTTTCGAC	NdeI
		3'	AATGCCGATCCTATTGAGCTGGGATCTCG	BamHI

iii. Double Hybride

La souche de levure AH109 de *S. cerevisiae* est utilisée pour les expériences du double hybride. Onensemence une préculture de 5 mL dans un milieu très riche (2X YAPD) à 30 °C pendant 16 heures. La deuxième culture, faite à partir de la préculture, estensemencée dans 50 mL du même type de milieu et est incubée pendant 3 à 5 heures à 30 °C. Afin de rendre les levures compétentes, on les resuspend, après centrifugation, dans 3 mL de LiAc 0,1 M et on les incube à 30 °C pendant 15 minutes. Les levures sont ensuite reprises dans 1 mL de LiAc 0,1 M après centrifugation et on les aliquote en 10 unités de 100 µL. Une solution de PEG 80 %, de LiAc 1M 12 %, d'ADNss 2mg/mL 8 % ainsi que 2,5 µg de chacun des deux plasmides dont on veut tester l'interaction sont ajouté aux levures. Les levures sont incubées à 30 °C pendant 30 minutes, on poursuit avec un choc thermique à 42 °C de 30 minutes. Enfin, les levures sontensemencées sur un milieu restrictif en leucine et tryptophane et incubées trois jours à 30 °C. Par la suite, les colonies

isolées de chaque interaction testée sont ensemencées sur des milieux plus restrictifs en leucine, tryptophane, histidine; et leucine, tryptophane, histidine, adénine. Du 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT) est aussi ajouté au milieu sans histidine afin d'éliminer les levures qui croissent en présence du peu d'histidine qu'elles produisent.

iv. Essais TAQMAN

Les expériences de quantification d'ARN chez les cellules humaines commencent toutes par une extraction d'ARN au Tri Reagent suivant le protocole du fabricant (Sigma). Par la suite, la transcription inverse (*MultiScribe™ Reverse Transcriptase*) ainsi que la réaction de PCR en temps réel du type Taqman (*Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents*) sont faites selon les protocoles *TaqMan® Gene expression Assay* ou *TaqMan® MicroRNA Assays* tout dépendant de l'analyse à faire sur les échantillons, soit la quantification d'ARNm ou de microARN. L'appareil utilisé est le *Applied Biosystems 7900nt Fast Real-Time PCR System*. Les amorces *TaqMan* employées pour les essais d'expression de gènes sont toutes de *Applied Biosystems* : la Cathepsin E (4331182) et l'Actine (ACTB Human 20X 4352935E) comme contrôle. Les amorces utilisées pour les expériences d'expression des microARNs sont *let-7a* (hsa-let7a ID000377) et U6 snoARN (U6snRNA ID001973) comme contrôle. Les SEM (Standard Error of the Mean) sont calculés avec un nombre minimal de trois échantillons biologiques différents.

v. Culture cellulaire et transfection

Les lignées cellulaires HeLa (carcinome cervical humain) et Huh-7 (hépatome humain) sont cultivées à des conditions de 37 °C, 95 % d'humidité et 5 % de CO₂. Leur milieu standard de culture est le DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) avec un haut taux de glucose (Gibco) qui est additionné de sérum foetal de bovin à une concentration finale de 10 %. On y ajoute aussi les antibiotiques pénicilline et streptomycine à 1 %. Au cours des passages de cellules, la trypsine 0,05 % EDTA 1X (Gibco) a été utilisée.

Les plasmides utilisés et les courts ARNs ont été transfectés le même jour, c'est-à-dire 24 heures avant la lecture de la luciférase. Les plasmides psiCHECK2 sont transfectés à une concentration de 0,1µg/puits pour un puits contenant 500µL de culture sur une plaque de 24 puits. Cette transfection s'effectue en suivant le protocole et le produit *Fugene HD* de Roche.

vi. Le traitement des cellules

En ce qui concerne les courts ARNs utilisés, il y a les siARNs tels que celui contre la CTSE s3743 (*Applied Biosystems*) et le contrôle négatif siAllStars (*Qiagen*) tous les deux utilisés à une concentration de 50nM. Un inhibiteur de *let-7a* a aussi été employé, le *hsa-let-7a miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitors* (IH-300473-07-0005) de chez Dharmacon utilisé à une concentration de 50nM.

Les drogues utilisées, le Z-VAD-fmk et le Q-VD-OPH, ont été offertes par le Dr. Josée Lavoie et ont été utilisées aux concentrations respectives de 50µM et 10µM. Le plasmide codant pour l'inhibiteur cystatine A a été utilisé à une concentration 0,1µg/µL.

Tous les traitements ci-dessus sont de 24 heures avant la lecture de la luciférase pour les cellules HeLa et Huh-7.

vii. Essais Luciférase

Le *Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System (Promega)* qui contient les réactifs de lyse cellulaire et les substrats de luminescence a été utilisé. Le protocole du fabricant a été suivi et les essais ont tous été répétés trois fois. Les SEM (Standard Error of the Mean) sont calculés avec un nombre minimal de trois échantillons biologiques différents.

ANNEXE I

Article en révision chez *EMBO J.*

Conserved Function of a Ribosomal Protein RACK1 in the microRNA pathway

Guillaume Jannot, Sarah Bajan, Nellie J. Giguère, Isabelle H. Banville, Sandra Piquet, Gyorgy Hutvagner and Martin J. Simard

Abstract

Despite the importance of microRNAs in gene regulation, it is still unclear how the microRNA-Argonaute or miRISC complex can find and repress translation of a specific mRNA. Here we demonstrate a direct interaction between the miRISC complex and the ribosome by showing that a constituent of the eukaryotic 40S subunit, RACK1, is important for miRNA-mediated gene regulation in animals. *In vivo* studies demonstrate that RACK1 interacts with components of the miRISC complex in nematodes and mammals. In both systems, the decrease of RACK1 alters miRNA function and when RACK1 expression is attenuated, the association of the miRNA complex to the translating ribosomes is impaired. Our data indicate that RACK1 contributes to the miRNA pathway by recruiting the miRISC complex at the active site of translation.

ANNEXE II

Résumé de l'article accepté pour publication à *The Journal of Experimental Medicine*

A critical role of microRNAs in human pulmonary arterial hypertension. miR-204: a novel therapeutic target

Audrey Courboulain; Roxane Paulin; Nellie J. Giguère; Nehmé Saksouk ; Tanya Perrault; Jolyane Meloche; Eric R. Paquet; Sabrina Biardel; Steeve Provencher; Jacques Côté; Martin J. Simard and Sébastien Bonnet

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by enhanced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) and suppressed apoptosis. Since microRNAs have been recently implicated in the regulation of cell proliferation and apoptosis, we hypothesized that these regulatory molecules might be implicated in the etiology of PAH. We show that, miR-204 is confined to PASMC and is downregulated in both human and rodent PAH. Its downregulation correlates with PAH severity and accounts for the proliferative and anti-apoptotic phenotypes. The activation of STAT3 abrogates miR-204 expression, which directly increase SHP2, promoting Src pathway and maintaining STAT3 activation. This promotes NFAT activation and BMPR2 downregulation to sustain PASMC proliferation and resistance to apoptosis. Finally, ectopic restoration of miR-204 level reverses PAH in cells and animals. This study uncovers a new miR-204 regulatory pathway critical to the etiology of PAH and indicates that reestablishing miR-204 expression should be considered as a new therapy for PAH.

ANNEXE III

Tableau 5 : Tableau complet des facteurs qui interagissent avec ALG-1 et identifiés par double hybride avec la banque d'ADNc de vers en L4

Facteurs	Famille	Fonction principale ou prédite	Homologue humain	Nombre de fois
ARN interférence et miARN				
SAGO-2	Argonaute	Argonaute secondaire, voie siARN	EIF2C1	1
PRG-1	Argonaute	Argonaute, voie piARN	C22:KB-63E7.2	2
Phosphatase				
GPD-3	GAPDH*	viabilité des embryons	GAPDH-001	2
PHO-11	Phosphatase	Phosphatase lysosomale et prostatic acid	-	1
GPD-4	GAPDH*	Glycolyse, chez embryons	GAPDH-001	2
GPD-1	GAPDH*	Glycolyse, chez embryons	GAPDH-001	1
Protéase / Peptidase				
ASP-1	Protéase Aspartyl	Cellules intestinale, dispensable for neuronal degeneration	Cathepsine D / PGC (Gastricin)	6
ASP-3	Protéase Aspartyl	Mort cellulaire des neurones	Cathepsine D	1
CPR-4	Cysteine Protéase		Cathepsine L et B	4
CPL-1	Famille Cathepsine L	Cysteine protéase, développement	Cathepsine L1	1
CPR-6	Cysteine Protéase	-	Cathepsine L et B	1
PBS-4	Sous-unité protéasome	Sous-unité beta	SU protéasome beta type-2	1
F35F10.6	Peptidase	pyroglutamyl peptidase	-	1
Synthèse Protéique				
EFT-2	Facteur d'élongation		EF2	1
EFT-4	Facteur d'élongation		EF-1 Alpha	1
RPB-3	Polymérase	composante d'ARN polymérase	POLR2C-001	1
RPB-5	Polymérase	composante des 3 ARN polymérase	POLR2E-201	2
Sous-unités ribosomales				
ceRACK1	-	protéine d'échaffaudage	RACK1	1
RPL-41	Grande SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPL36AL	1
RPL-11	Grande SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPL11	2
RPS-22	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPS15A	1
RPS-27	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	-	1
RPS-30	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	FAU-201	1
RPS-26	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPS26P8	1
RPL-12	Grande SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPL12	1
RPS-16	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPS16	1
RPS-20	Petite SU ribosomale	Biogenèse protéines	RPS20	1
Enzymes de modification post-traductionnelles / Épissage de l'ARNm				
F22B3.4		glucosamine-fructose 6-phosphate aminotransferase	GFPT1	1
F46H5.3		Creatine Kinase	CKM-201	3
RPA-0		SU ribosomale P0 acide	RPLP0	1
F53A2.7			ACAA2	1
RNP-6	RRM	Polypyrimidine tract-binding protein PUF60	PUF60	1
ISP-1		Ubiquinol cytochrome c reductase, subunit RIP1	UQCRFS1	1
UBC-7		E2 ubiquitin-conjugating enzyme	UBE2G1	3

* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Facteurs	Famille	Fonction principale ou prédite	Homologue humain	Nombre de fois
Protéines d'adhérence et de structure				
LEC-6	Galectine	Lectine de liaison au galactose	LGALS9	1
LEC-9	Galectine	Lectine de liaison au galactose, embryon		1
LEC-2	Galectine	Lectine de liaison au galactose	LGALS9	6
ACT-4	Actine		ACTB	3
ACT-5	Actine	cellules intestinales et excrétoires	ACTG1	4
ACT-2	Actine	pharynx	ACTB	2
ACT-1	Actine	pharynx, muscles et mobilité	ACTB	1
CLEC-12	Lectine de type C	-	DMBT1	1
CLEC-63	Lectine de type C	-	-	2
COL-17	Collagène	Formation de la cuticule	AC069113.1	1
COL-162	Collagène	-	COL3A1	4
COL-176	Collagène	-	COL3A1	1
Autres				
pqn-48		Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein		2
Y71HZAM.4		NADH:ubiquinone oxidoreductase, NDUFC2/B14.5B subunit		1
F57B10.3		cofactor-independent phosphoglycerate mutase		1
bcs-1		ATP-binding protein		1
Y7A5A.1		FAD-binding protein DIMINUTO		1
unc-49		UNCoordinated		1
ttr-15		Trans Thyretin-Related family domain		1
acdh-1		Acyl CoA DeHydrogenase		1
R09H10.5		EGF domains		1
acs-19		acyl-CoA synthetase		1
atp-2		ATP synthase subunit		1
cyn-12		Cyclophylin		1
ngp-1		Nuclear/nucleolar GTP-binding Protein family		1
unc-31		UNCoordinated		1
acdh-9		Acyl CoA DeHydrogenase		1
Y41E3.7		maintenance of Golgi structure		1
bas-1		Biogenic Amine Synthesis related		1
F24D7.1		Electron transfer flavoprotein		1
fkf-5		homolog of human FK506 binding protein 9		1
fkf-2		FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerases		1
T08G11.1b		nucleotide binding protein		1
F01F1.12a		Fructose-biphosphatealdolase		1
fum-1		fumarase		1
ZK829.4		ghutamate dehydrogenase		1
mtm-9		myotubularin orthologous to human MTMR9		1
ZK6.7a		lipase		1
cct-7		Chaperonin Containing TCP-1		1
Inconnus				
Y47D7A.13				1
tag-297				1
C17F4.7				1
F45G2.10				1
T20D3.2				1
C44C1.2				1
H34I24.2				1
C04G2.9				1
C50E3.11				1
F57F5.1				1
Y57G11A.2				1
T19B10.2				1
unc-104				1
nlp-41				1
F56C9.7				1
H28O16.1d				1
F01F1.12				1
F53A2.7				1

Bibliographie

1. Chu, C.Y. & Rana, T.M. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* **213**, 412-9 (2007).
2. Sidahmed, A.M. & Wilkie, B. Endogenous antiviral mechanisms of RNA interference: a comparative biology perspective. *Methods Mol Biol* **623**, 3-19.
3. Verdel, A., Vavasseur, A., Le Gorrec, M. & Touat-Todeschini, L. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int J Dev Biol* **53**, 245-57 (2009).
4. Halic, M. & Moazed, D. Transposon silencing by piRNAs. *Cell* **138**, 1058-60 (2009).
5. Molnar, A., Schwach, F., Studholme, D.J., Thuenemann, E.C. & Baulcombe, D.C. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* **447**, 1126-9 (2007).
6. Zhao, T. et al. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev* **21**, 1190-203 (2007).
7. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**, 102-14 (2008).
8. Hutvagner, G. & Zamore, P.D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-60 (2002).
9. Pillai, R.S., Artus, C.G. & Filipowicz, W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna* **10**, 1518-25 (2004).
10. Bussing, I., Slack, F.J. & Grosshans, H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med* **14**, 400-9 (2008).
11. Krutzfeldt, J. & Stoffel, M. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab* **4**, 9-12 (2006).
12. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 259-69 (2006).
13. Tsai, N.P., Lin, Y.L. & Wei, L.N. MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem J* **424**, 411-8 (2009).
14. Zhou, X., Duan, X., Qian, J. & Li, F. Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* **137**, 159-64 (2009).
15. Ambros, V. & Horvitz, H.R. The lin-14 locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes Dev* **1**, 398-414 (1987).
16. Wightman, B., Burglin, T.R., Gatto, J., Arasu, P. & Ruvkun, G. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev* **5**, 1813-24 (1991).
17. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**, 843-54 (1993).

18. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855-62 (1993).
19. Ha, I., Wightman, B. & Ruvkun, G. A bulged *lin-4/lin-14* RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans lin-14* temporal gradient formation. *Genes Dev* **10**, 3041-50 (1996).
20. Olsen, P.H. & Ambros, V. 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**, 671-80 (1999).
21. Reinhart, B.J. et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901-6 (2000).
22. Slack, F.J. et al. 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**, 659-69 (2000).
23. Pasquinelli, A.E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86-9 (2000).
24. Lee, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* **23**, 4051-60 (2004).
25. Cai, X., Hagedorn, C.H. & Cullen, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* **10**, 1957-66 (2004).
26. Borchert, G.M., Lanier, W. & Davidson, B.L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 1097-101 (2006).
27. Martinez, N.J. et al. Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity. *Genome Res* **18**, 2005-15 (2008).
28. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. & Kim, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* **21**, 4663-70 (2002).
29. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. & Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* **14**, 1902-10 (2004).
30. Fujita, S. et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol* **378**, 492-504 (2008).
31. O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V. & Mendell, J.T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* **435**, 839-43 (2005).
32. He, L. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**, 828-33 (2005).
33. Isik, M., Korswagen, H.C. & Berezikov, E. Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Silence* **1**, 5.
34. Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. & Bartel, D.P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858-62 (2001).
35. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-8 (2001).
36. Landthaler, M., Yalcin, A. & Tuschl, T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* **14**, 2162-7 (2004).

37. Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. & Hannon, G.J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231-5 (2004).
38. Gregory, R.I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235-40 (2004).
39. Yeom, K.H., Lee, Y., Han, J., Suh, M.R. & Kim, V.N. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* **34**, 4622-9 (2006).
40. Han, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* **18**, 3016-27 (2004).
41. Kim, Y.K. & Kim, V.N. Processing of intronic microRNAs. *Embo J* **26**, 775-83 (2007).
42. Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E. & Lai, E.C. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* **28**, 328-36 (2007).
43. Gwizdek, C. et al. Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem* **278**, 5505-8 (2003).
44. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. & Cullen, B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* **17**, 3011-6 (2003).
45. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-8 (2004).
46. Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* **10**, 185-91 (2004).
47. Shibata, S. et al. Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. *Nucleic Acids Res* **34**, 4711-21 (2006).
48. Bussing, I., Yang, J.S., Lai, E.C. & Grosshans, H. The nuclear export receptor XPO-1 supports primary miRNA processing in *C. elegans* and *Drosophila*. *Embo J* **29**, 1830-9.
49. Hutvagner, G. et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834-8 (2001).
50. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. & Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-6 (2001).
51. Grishok, A. et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**, 23-34 (2001).
52. Ketting, R.F. et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* **15**, 2654-9 (2001).
53. Macrae, I.J. et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* **311**, 195-8 (2006).
54. Provost, P. et al. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo J* **21**, 5864-74 (2002).
55. Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E. & Filipowicz, W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J* **21**, 5875-85 (2002).
56. Forstemann, K. et al. Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* **3**, e236 (2005).

57. Jiang, F. et al. Dicer-1 and R3D1-L catalyze microRNA maturation in *Drosophila*. *Genes Dev* **19**, 1674-9 (2005).
58. Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H. & Siomi, M.C. Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in *Drosophila* cells. *PLoS Biol* **3**, e235 (2005).
59. Chendrimada, T.P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740-4 (2005).
60. Lee, Y. et al. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo J* **25**, 522-32 (2006).
61. Haase, A.D. et al. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* **6**, 961-7 (2005).
62. Gagnol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B. & Jeang, K.T. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science* **251**, 1597-600 (1991).
63. Duchaine, T.F. et al. Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell* **124**, 343-54 (2006).
64. Hutvagner, G. & Simard, M.J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 22-32 (2008).
65. Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. & Joshua-Tor, L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**, 1434-7 (2004).
66. Steiner, F.A. et al. Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 927-33 (2007).
67. Jannot, G., Boisvert, M.E., Banville, I.H. & Simard, M.J. Two molecular features contribute to the Argonaute specificity for the microRNA and RNAi pathways in *C. elegans*. *Rna* **14**, 829-35 (2008).
68. Tomari, Y., Du, T. & Zamore, P.D. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* **130**, 299-308 (2007).
69. Forstemann, K., Horwich, M.D., Wee, L., Tomari, Y. & Zamore, P.D. *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell* **130**, 287-97 (2007).
70. Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P. & Zamore, P.D. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**, 607-20 (2005).
71. Leuschner, P.J., Ameres, S.L., Kueng, S. & Martinez, J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* **7**, 314-20 (2006).
72. Maniatakis, E. & Mourelatos, Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* **19**, 2979-90 (2005).
73. Kiriakidou, M. et al. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* **129**, 1141-51 (2007).
74. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. & Cohen, S.M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**, e85 (2005).
75. Grimson, A. et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* **27**, 91-105 (2007).
76. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-97 (2004).

77. Didiano, D. & Hobert, O. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. *Rna* **14**, 1297-317 (2008).
78. Derry, M.C., Yanagiya, A., Martineau, Y. & Sonenberg, N. Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**, 537-43 (2006).
79. Basu, U., Si, K., Warner, J.R. & Maitra, U. The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* **21**, 1453-62 (2001).
80. Hellen, C.U. & Sarnow, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**, 1593-612 (2001).
81. Pillai, R.S. et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**, 1573-6 (2005).
82. Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I. & Filipowicz, W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**, 1111-24 (2006).
83. Ding, X.C. & Grosshans, H. Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *Embo J* **28**, 213-22 (2009).
84. Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I. & Preiss, T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16961-6 (2005).
85. Eulalio, A. et al. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev* **21**, 2558-70 (2007).
86. Kinch, L.N. & Grishin, N.V. The human Ago2 MC region does not contain an eIF4E-like mRNA cap binding motif. *Biol Direct* **4**, 2 (2009).
87. Djuranovic, S. et al. Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 144-50.
88. Thermann, R. & Hentze, M.W. *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* **447**, 875-8 (2007).
89. Mathonnet, G. et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* **317**, 1764-7 (2007).
90. Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O. & Yokoyama, S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* **21**, 1857-62 (2007).
91. Fabian, M.R. et al. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* **35**, 868-80 (2009).
92. Chendrimada, T.P. et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**, 823-8 (2007).
93. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 346-53 (2008).
94. Seggerson, K., Tang, L. & Moss, E.G. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* **243**, 215-25 (2002).
95. Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J. & Sharp, P.A. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* **21**, 533-42 (2006).

96. Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J. & Nilsen, T.W. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 1102-7 (2006).
97. Nottrott, S., Simard, M.J. & Richter, J.D. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 1108-14 (2006).
98. Kim, J. et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 360-5 (2004).
99. Nelson, P.T., Hatzigeorgiou, A.G. & Mourelatos, Z. miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *Rna* **10**, 387-94 (2004).
100. Bagga, S. et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* **122**, 553-63 (2005).
101. Liu, J. et al. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* **7**, 1261-6 (2005).
102. Ding, L., Spencer, A., Morita, K. & Han, M. 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**, 437-47 (2005).
103. Behm-Ansmant, I. et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* **20**, 1885-98 (2006).
104. Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J. & Parker, R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* **7**, 719-23 (2005).
105. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D. & Izaurralde, E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* **27**, 3970-81 (2007).
106. Schmitter, D. et al. Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res* **34**, 4801-15 (2006).
107. Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. & Izaurralde, E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 9-22 (2007).
108. Wu, L., Fan, J. & Belasco, J.G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4034-9 (2006).
109. Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N. & Shiekhattar, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **123**, 631-40 (2005).
110. Miyoshi, K., Okada, T.N., Siomi, H. & Siomi, M.C. Characterization of the miRNA-RISC loading complex and miRNA-RISC formed in the *Drosophila* miRNA pathway. *Rna* **15**, 1282-91 (2009).
111. Johnston, M., Geoffroy, M.C., Sobala, A., Hay, R. & Hutvagner, G. HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol Biol Cell* **21**, 1462-9.
112. Miyoshi, T., Takeuchi, A., Siomi, H. & Siomi, M.C. A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol*.
113. Iwasaki, S. et al. Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Mol Cell*.
114. Chan, S.P. & Slack, F.J. Ribosomal protein RPS-14 modulates let-7 microRNA function in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **334**, 152-60 (2009).

115. Hammell, C.M., Lubin, I., Boag, P.R., Blackwell, T.K. & Ambros, V. nhl-2 Modulates microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **136**, 926-38 (2009).
116. Schwamborn, J.C., Berezikov, E. & Knoblich, J.A. The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell* **136**, 913-25 (2009).
117. Hock, J. et al. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* **8**, 1052-60 (2007).
118. Landthaler, M. et al. Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *Rna* **14**, 2580-96 (2008).
119. Page, A.P. & Johnstone, I.L. in *The Cuticle* (WormBook, ed, 2007).
120. Heo, I. et al. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell* **32**, 276-84 (2008).
121. Heo, I. et al. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* **138**, 696-708 (2009).
122. Vella, M.C. & Slack, F.J. in *C. elegans microRNAs 1-9* (2005).
123. Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J. & Nissen, P. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* **5**, 1137-41 (2004).
124. Sengupta, J. et al. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 957-62 (2004).
125. Lankelma, J.M. et al. Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci* **86**, 225-33.
126. Haque, A., Banik, N.L. & Ray, S.K. New insights into the roles of endolysosomal cathepsins in the pathogenesis of Alzheimer's disease: cathepsin inhibitors as potential therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**, 270-7 (2008).
127. Zaidi, N., Maurer, A., Nieke, S. & Kalbacher, H. Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun* **376**, 5-9 (2008).
128. Zaidi, N. & Kalbacher, H. Cathepsin E: a mini review. *Biochem Biophys Res Commun* **367**, 517-22 (2008).
129. Yasukochi, A., Kawakubo, T., Nakamura, S. & Yamamoto, K. Cathepsin E enhances anticancer activity of doxorubicin on human prostate cancer cells showing resistance to TRAIL-mediated apoptosis. *Biol Chem*.
130. Iwasaki, S., Kawamata, T. & Tomari, Y. *Drosophila* argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell* **34**, 58-67 (2009).
131. Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M. & Voinnet, O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol* **11**, 1143-9 (2009).
132. Lee, Y.S. et al. Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking. *Nat Cell Biol* **11**, 1150-6 (2009).
133. Siomi, H. & Siomi, M.C. RISC hitchhikes onto endosome trafficking. *Nat Cell Biol* **11**, 1049-51 (2009).
134. Iwasaki, S. & Tomari, Y. Argonaute-mediated translational repression (and activation). *Fly (Austin)* **3**, 204-6 (2009).
135. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J.A. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* **7**, 1545-9 (2008).
136. Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C. & Zamore, P.D. Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* **2**, E98 (2004).

137. McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D. & Yarwood, S.J. The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol* **62**, 1261-73 (2002).
138. Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X. & Graves, P.R. Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J* **413**, 429-36 (2008).
139. Gehrke, S., Imai, Y., Sokol, N. & Lu, B. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* **466**, 637-41.