

Université de Sherbrooke

Étude du mécanisme de rétrotransposition des ARN hY dans les cellules humaines

Par

Anne-Marie Lamontagne

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada

Août 2011

Membres du jury d'évaluation

Jean-Pierre Perreault (Biochimie), Gilles Boire (Médecine), Claude Asselin (Anatomie et
biologie cellulaire) et Nathalie Bissonnette (Biochimie)



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-90984-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-90984-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

RÉSUMÉ

Étude du mécanisme de rétrotransposition des ARN hY dans les cellules humaines

par
Anne-Marie Lamontagne
Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Chez l'humain, il y a présence de quatre petits ARN Y; soit les ARN hY1, hY3, hY4 et hY5. La longueur de ces ARN varie entre 84 (hY5) à 112 (hY1) nucléotides. Ces ARN forment une longue structure tige boucle pouvant être liée par une protéine nommée Ro60. Les ribonucléoprotéines Ro (Ro RNP) résultent de la liaison de Ro60 ainsi que celle de la protéine La aux ARN hY. Ces Ro RNP sont la cible d'auto-anticorps chez des patients atteints de pathologies du tissu conjonctif, comme le lupus érythémateux systémique. Les connaissances sur le rôle de ces petits ARN non-codants sont limitées. Cela rend leur étude d'autant plus importante. Par contre, quelques évidences suggèrent leur implication dans la réplication chromosomale.

Récemment, environ mille pseudogènes Y ont été découverts dans le génome humain; leur présence suggère un mécanisme de rétrotransposition. L'étude des séquences adjacentes aux pseudogènes a permis d'identifier une signature de la machinerie des Long Interspersed Nuclear Elements 1 (LINE-1), suggérant un nouvel élément mobile similaire à Alu. De plus, la majorité des pseudogènes Y présentaient des mutations précises aux sites de liaison de plusieurs protéines, dont Ro60. Cela nous a amenés à explorer les différents aspects du mécanisme de rétroposition présumé des ARN hY. Pour ce faire, nous avons adapté un essai de rétrotransposition L1 dans les cellules HeLa. Notre principale hypothèse était de vérifier si l'absence de protéines liées à l'ARN Y pouvait influencer la rétrotransposition de l'ARN en question. La méthode de détection par dénombrement de colonies s'est avérée peu profitable puisqu'elle manquait de sensibilité. Les niveaux très faibles et le taux élevé de variation entre les différents essais ne permettaient pas d'émettre des conclusions claires et précises. Par la suite, nous avons développé une seconde méthode de détection basée sur la PCR quantitative en temps réel. Il s'agit d'une nouvelle application pour l'étude des événements de rétrotransposition. Celle-ci nous a permis de démentir notre hypothèse : la perte de liaison de certaines protéines ne favoriserait pas la prise en charge de l'ARN hY par la machinerie L1.

Mots-clés : ARN non-codant, ARN hY, rétrotransposition, Ro60, qPCR

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	II
Table des matières.....	III
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des abréviations.....	IX
Introduction.....	1
1. <i>Les ARN non-codants</i>	1
1.1 L'ARN vient en plus de trois saveurs.....	1
1.1.1 Les petits ARN nucléaires.....	2
1.1.2 Les petits ARN nucléolaires.....	2
1.1.3 Les petits ARN régulateurs.....	3
1.1.4 Autres ARN non-codants.....	4
2. <i>Les ribonucléoprotéines Ro</i>	6
2.1 La protéine Ro.....	6
2.1.1 Résistance aux u.v.	8
2.1.2 Contrôle de qualité de l'ARN.....	8
2.1.3 Autres rôles de la protéine Ro.....	9
2.2 La protéine La.....	9
2.2.1 Caractéristiques générales.....	9
2.2.2 Maturation des ARNt.....	10
2.2.3 Terminaison de l'ARN polymérase III.....	10
2.2.4 Traduction dépendante de site <i>IRES</i> et autres rôles.....	12
2.3 Les autres protéines.....	12
2.3.1 La protéine hnRNP K.....	13
2.3.2 PTB.....	13
2.3.3 RoBP1.....	14
2.3.4 ApoBEC3G.....	14
2.3.5 Autres (Ro52, calréticuline et nucléoline).....	15

3. <i>Les ARN Y</i>	15
3.1 Fonctions et implications.....	16
3.1.1 Fonctions hypothétiques.....	16
3.1.2 Réplication de l'ADN.....	16
3.1.3 Inhibition de l'activité de Ro.....	17
3.2 Expression et localisation des ARN Y.....	17
3.2.1 Y comme dans cYtoplasme.....	18
3.2.2 L'ARN hY5 et la controverse.....	19
3.3 Structure et sites de liaison aux protéines.....	19
3.4 Répartition des gènes hY dans le génome.....	20
4. <i>Les pseudogènes Y</i>	22
4.1 Duplications et rétrotransposition.....	22
4.2 La rétrotransposition.....	22
4.2.1 Mécanisme de rétrotransposition par L1.....	23
4.2.2 L'élément répété Alu.....	24
4.3 Les ARN hY sont rétrotransposés.....	26
5. <i>Objectifs de la recherche</i>	27
a. Objectif général.....	28
b. Objectifs spécifiques.....	28
Matériels et méthodes	29
1. Plasmides.....	29
1.1 Construction des mutants hY1.....	29
2. Culture cellulaire et transfection.....	31
3. Extraction d'ARN et buvardage northern.....	31
4. Transcription inverse (RT) et PCR quantitative (qPCR) : RT-qPCR.....	32
4.1 Courbes standards.....	34
5. Synthèse d'ARN.....	34
6. Marquage en 5' de l'ARN.....	35
7. Extraits cellulaires et sérum.....	36
8. Retard de migration d'ARN radiomarqué en gel natif (EMSA).....	36
9. PCR quantitative en temps réel.....	37
9.1 Courbes standards.....	38

Résultats.....	39
<i>Chapitre 1 Constructions et évaluation de l'essai de rétrotransposition L1.....</i>	39
1. <i>Identification d'une méthode permettant la quantification d'événement de rétrotransposition.....</i>	39
1.1 Essai de rétrotransposition L1.....	39
1.2 Dénombrement de colonies.....	40
2. <i>Caractérisation des constructions.....</i>	42
2.1 Constructions.....	42
2.2 Expression des ARN.....	44
2.2.1 Buvardage northern.....	44
2.2.2 RT-qPCR.....	48
3. <i>Analyse des constructions avec l'essai de rétrotransposition.....</i>	53
3.1 La rétrotransposition de l'élément Alu et de HBB.....	53
3.2 La rétrotransposition des ARN hY et des mutants hY1.....	55
<i>Chapitre 2 Nouvelle méthode de détection.....</i>	58
1. <i>Approche par qPCR.....</i>	58
1.1 Optimisation de la technique par qPCR.....	58
1.1.1 Design des amorces.....	59
1.1.2 Courbes standards.....	63
1.2 Rétrotransposition des différentes constructions détectée avec la qPCR.....	65
1.2.1 Validation de la nouvelle méthode de détection par qPCR.....	65
1.2.2 Détection de la rétrotransposition des ARN hY et des mutants hY1 par qPCR.....	67
Discussion.....	70
1. <i>Fondement de l'étude de la rétrotransposition des ARN hY chez l'humain.....</i>	70
1.1 Observations et objectif.....	71
1.1.1 Les mutants hY1 et la rétrotransposition.....	71
2. <i>Persévérance et dénouement.....</i>	73
2.1 Le stage de perfectionnement dans le laboratoire du Dr Roy-Engel.....	73
2.2 Alternative de détection.....	75

2.3	Qu'aurait-on pu faire autrement?.....	76
2.4	Solution : nouveaux mutants hY1!.....	77
3.	<i>Autres perspectives</i>	80
3.1	Le décompte absolu du nombre d'événements de rétrotransposition.....	80
3.2	Effet de la localisation cellulaire sur la rétrotransposition.....	80
4.	<i>Exploration</i>	81
4.1	La découverte de petits ARN hY1.....	81
	Conclusion	84
	Remerciements	85
	Références	86

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1	Structure du complexe RNP Ro.....	7
Figure 2	Reconnaissance de l'extrémité 3' de l'ARN par la protéine La.....	11
Figure 3	Séquences et structures secondaires des ARN hY.....	21
Figure 4	Le cycle de rétrotransposition.....	25

Résultats

Figure 5	Schéma représentant l'essai de rétrotransposition.....	41
Figure 6	Constructions $phY\ i\ neo^{TET}$ mutants.....	43
Figure 7	Buvardage northern des transcrits $hY\ neo^{TET}$ et Alu.....	45
Figure 8	Buvardage northern du transcrit $hY\ i\ neo^{TET}$ et de ses mutants.....	47
Figure 9	RT-qPCR des transcrits $hY\ neo^{TET}$ et des mutants hY1.....	49
Figure 10	Expression relative du transcrit neo^{TET} par rapport à <i>neo</i> pour chaque construction hY et hY1 mutants.....	52
Figure 11	Rétrotransposition de l'élément Alu et des ARN hY.....	54
Figure 12	Rétrotransposition de l'ARN hY1 et de ses mutants.....	57
Figure 13	Amorces pour la détection d'événements de rétrotransposition par qPCR.....	61
Figure 14	Optimisation des amorces pour la qPCR.....	62
Figure 15	Courbe standard <i>neo</i>	64
Figure 16	Analyses préliminaires.....	66
Figure 17	Rétrotransposition des ARN hY et des mutants hY1 détectée par qPCR.....	68

Discussion

Figure 18	Structures et séquences des nouveaux mutants hY1 et hY3.....	79
Figure 19	Analyse bio-informatique des petits ARN hY.....	83

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau 1	Petits ARN interférents chez différentes espèces et leur fonction.....	4
Tableau 2	Fonctions des ARN non-codants connus chez l'humain.....	5
Tableau 3	Protéines reconnues pour lier les ARN hY.....	13
Tableau 4	Nombre de séquences homologues de petits ARN non-codants retrouvées dans le génome humain.....	26

Matériels et méthodes

Tableau 5	Séquences des amorces utilisées pour la construction des mutants hY1 par mutagenèse dirigée.....	30
Tableau 6	Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR.....	34
Tableau 7	Séquences des amorces utilisées pour la qPCR.....	37

Résultats

Tableau 8	Séquences des amorces utilisées pour l'optimisation de la qPCR.....	60
-----------	---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C	degré celsius
Δ	delta
3'	extrémité 3'
3'OH	groupement hydroxyle en position 3' du ribose de l'ARN
5'	extrémité 5'
A	adénine
a.a.	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ADNnc	ADN non-codant
ApoBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing, Enzyme-Catalytic, polypeptide-like 3G</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non-codant
ARNr	ARN ribosomal
ARNsn	petit ARN nucléaire
ARNsno	petit ARN nucléolaire
ARNt	ARN de transfert
C	cytosine
casiARN	petit ARN interférant agissant en cis (<i>cis-acting siRNA</i>)
CLAP	inhibiteurs de protéase : <i>chymotrypsin, leupeptin, aprotinin, pepstatin</i>
cm	centimètre
CMV	cytomégalovirus
CPM	compte par minute
db	double brin
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
Endo	endogène
Exo	exogène
FIR	<i>FBP interacting repressor</i>
Fwd	sens (<i>forward</i>)
G	guanine
g	gramme
G418	gentamicine
h	heure
HBB	β-globine
HEAT	<i>Huntingtin elongation A subunit TOR</i>
hnRNP K	<i>heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein K</i>
hY	ARN cytoplasmique humain
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
kb	kilobase
kDa	kiloDalton

LAM	<i>La motif</i>
LINE1, L1	<i>Long Interspersed Nuclear Element 1</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
M	Molaire
mg	milligramme
miARN	microARN
min	minute
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	milliMolaire
natsiARN	<i>natural cis-acting siRNA</i>
neo	gène néomycine
neo ^{TET}	gène néomycine interrompu d'un intron Tet
ng	nanogramme
nt	nucléotide
NT	non transfecté
NTP	nucléotide triphosphate
ORF	cadre de lecture (<i>open reading frame</i>)
pb	paire de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
piARN	ARNpiwi
pmol	picomole
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
Pol	polymérase
polyA	polyadénylé
Pré-ARNm	ARNm précurseur
PTB	Polypyrimidine Tract Binding protein
P-TEFb	<i>Positive Transcription Elongation Factor b</i>
PUF60	<i>Poly U binding splicing Factor 60 kDa</i>
qPCR	PCR quantitative
Rev	antisens (<i>reverse</i>)
RISC	<i>RNA induced Silencing Complex</i>
RNP	ribonucléoprotéine
RNPnp	particules RNP nucléaires
RNP _{sca}	RNP de corps de Cajal
RoBP1	<i>Ro Binding Protein 1</i>
ROP-1	<i>Ro ribonucleoprotein family 1</i>
RPM	rotation par minute
RRM1	<i>RNA recognition motif 1</i>
Rsr	<i>Ro sixty related</i>
RT	Trancription inverse
SBF	sérum bovin fétal
SCD	site cible dupliqué
scnARN	<i>small scan RNA</i>
sec	seconde

siARN	petit ARN interférent
SINE	<i>Short Interspersed Nuclear Element</i>
snRNP	petit RNP nucléaire
snoRNP	petit RNP nucléolaire
SRP	<i>Signal recognition particle</i>
T	thymine
tasiARN	<i>trans-acting siARN</i>
TERC	<i>Telomerase RNA Component</i>
TET	intron <i>Tetrahymena thermophila</i>
U	uridine
U	unité
μg	microgramme
μl	microlitre
μm	micromole
UTR	région non traduite d'un ARNm (<i>UnTranslated Region</i>)
u.v.	ultraviolet

INTRODUCTION

1. Les ARN non-codants

À peine 2 % du génome humain est transcrit en ARN messagers, puis traduit en protéines. Les 98 % restant du génome ont souvent été qualifiés de « déchets génomiques » à cause de l'absence apparente d'utilité de cet ADN non codant (ADNnc). Cet ADN est-il vraiment inutile? Même si la majorité de l'ADN humain n'est pas codant, il est tout de même transcrit dans une grande majorité. Grâce aux nouvelles technologies de dernière génération, il est maintenant clair que jusqu'à 90 % des génomes eucaryotes sont transcrits, générant une gamme extraordinaire d'ARN sans capacité codante (Costa, 2010). D'ailleurs, de plus en plus d'études décrivent de nouvelles fonctions assignées à ces ARNnc (ENCODE Project Consortium et al., 2007). Les gènes d'ARNnc produisent des molécules d'ARN fonctionnelles qui ne sont pas traduites. Elles sont particulièrement abondantes pour des rôles qui requièrent la reconnaissance hautement spécifique d'acide nucléique sans catalyse complexe, notamment en dirigeant la régulation post-transcriptionnelle des gènes ou en dirigeant la modification des ARN.

1.1 L'ARN vient en plus de trois saveurs

L'ARN ne peut plus être catégorisé en tant que ribosomal, messenger ou de transfert. Nous retrouvons maintenant une panoplie de différents ARN, notamment les ARN non-codants. D'ailleurs, ceux-ci sont sous-divisés en plusieurs catégories, soit les petits ARN nucléaires (ARNsn), les petits ARN nucléolaires (ARNsno), les longs ARN non-codants, les petits ARN régulateurs, ainsi que plusieurs autres (Tableau 1). La découverte de nouveaux ARN non-codants et de nouvelles fonctions est en pleine effervescence.

1.1.1 Les petits ARN nucléaires

Les ARNsn constituent une classe majeure d'ARN cellulaire ayant une fonction de catalyse (Madhani et Guthrie, 1992). Ils sont responsables de l'épissage des ARNm, processus par lequel le pré-ARNm sera débarrassé de ses introns pour ne conserver que les exons. Il est à noter que très souvent, plusieurs combinaisons d'exons sont possibles. Cet épissage alternatif augmente le répertoire de protéines et les possibilités de régulation. Ces ARNsn varient entre 90 et 220 nucléotides et s'associent avec des protéines spécifiques pour former des particules ribonucléoprotéiques nucléaires (RNPnp) qui, une fois assemblées, se lient sur les pré-ARNm pour former un énorme complexe d'épissage (le *spliceosome*). Prenant pour exemple l'ARNsn U6, en s'hybridant à l'ARNm près de la jonction exon-intron, adopte une structure qui lui confère une activité catalytique d'épissage (Will et Luhrmann, 2001).

1.1.2 Les petits ARN nucléolaires

Les ARNsno représentent un groupe d'ARN non traduits principalement requis pour la maturation des ARN ribosomiaux (Enright et al., 1996). Ceux-ci nécessitent plusieurs modifications post-transcriptionnelles telles que la pseudouridylation et le 2'-O-méthylribosylation. Ces modifications facilitent le repliement adéquat et la stabilité de l'ARNr. Chez les eucaryotes, ces modifications sont effectuées par les snoRNP dans le nucléole. La classe de snoRNP à boîte C/D est responsable de la méthylation spécifique au site 2'-O du ribose tandis que la classe à boîte H/ACA catalyse l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine. Leur rôle ne s'arrête pas qu'aux ARNr, leurs cousins les RNPscA (ribonucléoprotéine de corps de Cajal) sont responsables de la modification chimique des ARNsn dans le corps de Cajal (Dieci et al., 2009; Kiss, 2002; Reichow et al., 2007). De plus, un groupe a démontré que de multiples ARNsno pouvaient entrer dans la voie de maturation des microARN, leur découvrant une nouvelle fonction en tant que répresseur post-transcriptionnel (Ender et al., 2008).

1.1.3 Les petits ARN régulateurs

Cette catégorie d'ARN non codant regroupe diverses classes et tailles d'ARN. Par contre, ils partagent une seule fonction dans la physiologie cellulaire, soit la régulation épigénétique de l'expression des gènes (Bartel, 2004). Le phénomène de l'ARN interférence a d'abord été découvert quand l'introduction de longs ARN double brin (db) dans *Caenorhabditis elegans* a déclenché la répression de gènes cibles. Cette découverte a valu le prix Nobel de physiologie et de médecine de 2006 aux professeurs Andrew Fire et Craig Mello et a complètement bouleversé notre façon de percevoir la régulation de la cellule, en particulier la régulation post-transcriptionnelle. Parmi les différents types de petits ARN, on retrouve les microARN, les siARN (*small interfering RNA*), les casiARN (*cis-acting siRNA*), les tasiARN (*trans-acting siRNA*), les natsiARN (*natural cis-acting siRNA*), les scnARN (*small-scarn RNA*) et les piARN (*Piwi-interacting RNA*). Pour ce qui est des microARN, des centaines de ces molécules mesurant à peine 20 nucléotides (nt) sont aujourd'hui connues, chacune servant de guide au complexe *RISC* (*RNA-induced silencing complex*) (Elbashir et al., 2001; Fire et al., 1998). Ces ARN ont initialement une structure de longue tige-boucle de complémentarité imparfaite et doivent préalablement être maturés par deux enzymes (Drosha et Dicer) avant leur incorporation dans le complexe *RISC* sous forme de microARN. Ensuite, ils exercent leur fonction d'inhibition de la traduction en s'hybridant à l'ARNm complémentaire ciblé. Ces ARN ont également pour cible le génome. Ils peuvent masquer ou modifier un génotype, soit la manifestation d'un phénotype que la génétique n'explique pas complètement. Ces microARN influenceraient l'architecture du génome qu'on identifie maintenant comme des modifications épigénétiques. Cependant, ce ne sont pas tous les petits ARN qui sont ubiquitaires. Par exemple, les piARN exercent leur pouvoir dans les cellules germinales seulement. Ils sont exprimés à partir de loci bien précis, ayant un biais envers un certain brin d'ADN. Les piARN ont comme mandat de réprimer les transposons pendant la spermatogénèse et de maintenir les cellules souches germinales (Chu et Rana, 2007). Le Tableau 1 résume la quasi-totalité des petits ARN interférents connus jusqu'à présent, retrouvés chez différentes espèces ainsi que leurs fonctions.

Tableau 1. Petits ARN interférents chez différentes espèces et leur fonction.

Nom	Organisme	Longueur (nt)	Fonction
miARN	Algue, animaux, plantes, protistes, virus	20-25	Régulation de la stabilité des ARNm, traduction
casiARN	Plantes	24	Modification de la chromatine
tasiARN	Plantes	21	Régulation post-transcriptionnelle
natsiARN	Plantes	21, 22 et 24	Régulation des gènes de réponse au stress
Exo-siARN	Animaux, fungi, protistes	~21	Régulation post-transcriptionnelle, défense antivirale
	Plantes	21 et 24	
Endo-siARN	Algue, animaux, fungi, plantes, protistes	~21	Régulation post-transcriptionnelle de transcrits et transposons, répression transcriptionnelle
piARN	Métazoaires excluant <i>Trichoplax adhaerens</i>	24-30	Régulation de transposons
piARN-like	<i>Drosophila melanogaster</i>	24-30	Inconnue
21U-ARN	<i>Caenorhabditis elegans</i>	21	Régulation de transposons
26G ARN	<i>Caenorhabditis elegans</i>	26	Inconnue

Adapté de (Ghildiyal et Zamore, 2009)

1.1.4 Autres ARN non-codants

Il y a de nombreux autres ARN non-codants (Presutti et al., 2006). Un exemple très connu est certainement l'ARN 7SL qui, avec six protéines, fait partie de la particule de reconnaissance du signal (SRP) impliquée dans la trafic protéique (Walter et Blobel, 1982). Cet ARN d'environ 300 nt est essentiel à l'interaction avec le ribosome et aurait un rôle structural pour joindre toutes les composantes du complexe (Keenan et al., 2001). À l'opposé, les petits ARN d'environ 80 nt qui font partie des particules Vault n'ont toujours pas de fonction connue (van Zon et al., 2003). Un autre type de petit ARN fait l'objet de cette étude, soit les ARN cytoplasmiques (ARN Y) qui n'avaient, jusqu'à tout récemment, aucune fonction connue. Par contre, il est certain que plusieurs types d'ARN demeurent inconnus. Le tableau 2 contient un bon nombre de petits ARN non-codants et résume leurs différentes fonctions.

Tableau 2. Fonctions des ARN non-codants connus chez l'humain.

ARN non-codants	Fonction
Maturation de l'ARN	
ARNsn	Épissage des pré-ARNm
ARNsn U7	Formation de l'extrémité 3' des pré-ARNm des histones
ARNsno C/D	2' O-méthylation des ARNr, ARNsn, ARNt; maturation des ARNr
ARNsno H/ACA	Pseudouridylation des ARNr, ARNsn; maturation des ARNr
ribonucléase P	Maturation des pré-ARNt
Transcription	
ARN 7SK	Contrôle de l'élongation médiée par P-TEFb (<i>Positive Transcription Elongation Factor b</i>)
Traduction	
ARNt	Traduction des ARNm
ARNr	Traduction des ARNm
Livraison des protéines	
ARN SRP	Translocation des protéines au réticulum endoplasmique
Régulation de l'expression génique	
siARN	Répression génique; coupure d'ARN viraux ou autre
miARN	Répression génique; répression de la traduction
piARN	Répression des éléments transposables
Stabilité du génome	
TERC	Synthèse des télomères
Autres	
ARN de Vault	Fonction inconnue (retrouvés dans la particule de Vault)
ARN hY (ARN cYtoplasmique humain)	Fonction inconnue (trouvés dans les RNP Ro)
Adapté de (Matera et al., 2007)	

2. Les ribonucléoprotéines Ro

Il y a déjà plus de cinquante ans que les anticorps antinucléaires sont connus et utilisés pour diagnostiquer des maladies auto-immunes (Holborow et al., 1963; Provost et Reichlin, 1981; van Venrooij et Pruijn, 1995). Ces autoanticorps ont permis plusieurs grandes découvertes. En effet, en tentant de comprendre quels étaient les antigènes reconnus, le groupe de Joan Steitz a découvert les snRNP (Lerner et Steitz, 1979), puis les RNP Ro, trouvées plus particulièrement chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED) ou du syndrome de Sjögren (Alspaugh et Tan, 1975; Hardin et al., 1982; Lerner et al., 1981). Comme le suggère leur nom, ces complexes RNP Ro se composent de la protéine Ro60 et d'un ARN Y, ainsi que de la protéine La. La figure 1A illustre la disposition des protéines Ro60 et La sur l'ARN Y, ainsi que le site putatif de quelques autres protéines liant les ARN Y.

2.1 La protéine Ro

La protéine Ro humaine a un poids moléculaire de 60 kDa (Ro60). Elle est peu abondante et localisée au cytoplasme et au noyau (Prujn et al., 1997). Des orthologues du complexe humain Ro/ARN Y ont été décrits chez plusieurs mammifères, ainsi que chez la grenouille *Xenopus laevis*, le nématode *Caenorhabditis elegans* et l'eubactérie *Deinococcus radiodurans*. Plusieurs d'entre eux ont été étudiés plus extensivement. Au cytoplasme, Ro s'associe avec un ARN hY par un domaine constitué de répétitions HEAT (*huntingtin elongation A subunit TOR*), un site permettant la liaison, possiblement aussi à d'autres ARN. Ce domaine a une surface relativement grande permettant la liaison de protéine à la tige conservée des hY (Stein et al., 2005). La figure 1B illustre le site de liaison de l'ARN hY à la protéine Ro60. Plusieurs fonctions ont été associées à la protéine Ro60 et sont décrites dans les prochains paragraphes.

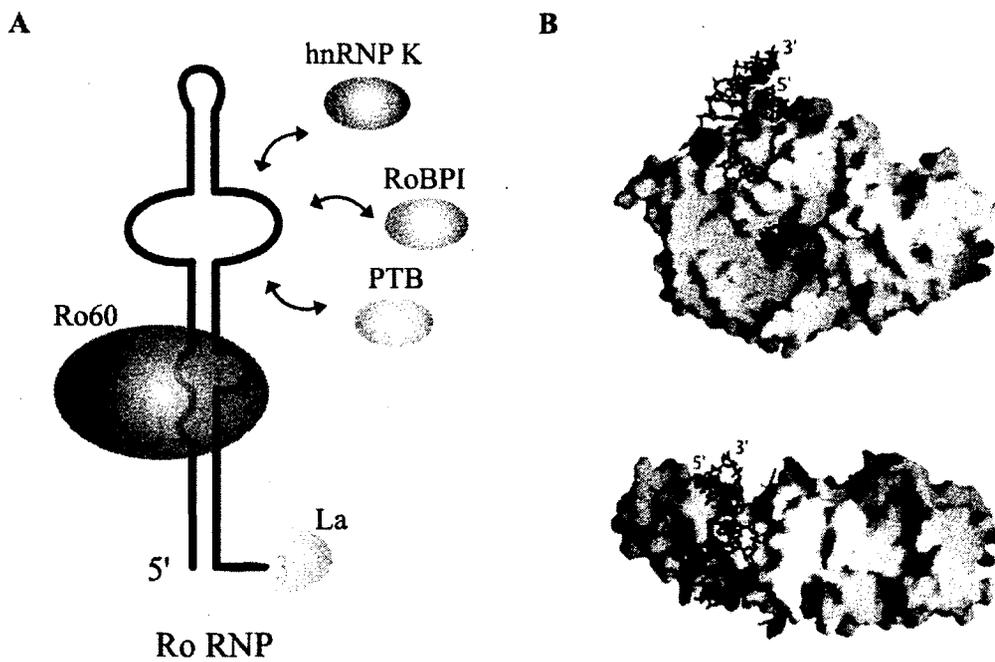


Figure 1 : Structure du complexe RNP Ro

(A) Structure du complexe RNP Ro composé des protéines Ro60 et La ainsi que d'un ARN Y. Les sites de liaisons hypothétiques des protéines hnRNP K, hnRNP I et RoBPI sont aussi représentés. (B) Deux vues de la structure de Ro à 90° l'une par rapport à l'autre, avec l'ARN en rose. Un fragment d'ARN Y est lié sur la surface extérieure de la protéine Ro60 alors qu'un fragment simple brin est lié dans la cavité centrale. Le motif MIDAS, un site de liaison aux cations divalents, est montré en bleu. Figure adaptée de Stein A. J., 2005.

2.1.1 Résistance aux u.v.

Une des premières fonctions attribuées à cette protéine est la résistance aux rayons ultraviolets (u.v.). L'étude de Rsr (*Ro sixty related*), l'orthologue de Ro60 chez *Deinococcus radiodurans*, a révélé son importance dans l'extraordinaire résistance aux rayonnements u.v. de cet organisme (Chen et al., 2000). Un lien avec la résistance aux u.v. a également été démontré dans les cellules de mammifères (Chen et al., 2003) et chez des souris dont le gène pour la protéine Ro60 a été délesté (Xue et al., 2003).

2.1.2 Contrôle de qualité de l'ARN

Le mécanisme par lequel la protéine Ro influencerait l'impact des rayonnements u.v. demeure totalement inconnu. Cependant, il semble que cette protéine exercerait dans ces conditions et, possiblement dans un contexte plus large, un contrôle de qualité de l'ARN. L'étude des ARN liant Ro chez *Xenopus laevis* a permis de découvrir l'ARNr 5S, mais plus précisément un 5S mutant qui adopte une structure alternative (Fuchs et al., 2006; O'Brien et Wolin, 1994; Shi et al., 1996). Cette liaison de Ro60 serait vraisemblablement l'étape préalable à la dégradation de ces ARN défectueux. Chez *C. elegans*, ce contrôle de l'ARNr 5S par ROP-1 (*RO ribonucleoProtein family 1*) existe également (Labbé et al., 2000). Ce rôle ne semble toutefois pas limité à l'ARN 5S, car un snARN U2 mutant a aussi été trouvé lié par Ro (Chen et al., 2003). Il semblerait en effet, que Ro soit en mesure de lier une vaste gamme d'ARN, dont la reconnaissance est basée sur seulement quelques pré-requis structuraux relativement fréquents (Fuchs et al., 2006). Plus récemment, l'implication de Rsr (orthologue de Ro) a été démontrée dans la maturation du précurseur de l'ARN ribosomal 23S chez *Deinococcus radiodurans* (Chen et al., 2007). La liaison de Rsr à l'ARNr permet la maturation de l'extrémité 3' par des exonucléases, sans que ces dernières dégradent tout l'ARNr. De façon générale, la protéine Ro a une fonction de contrôle de qualité de l'ARN.

2.1.3 Autres rôles de la protéine Ro

D'autres rôles moins bien caractérisés ont été suggérés pour la protéine Ro. Il semblerait que cette protéine soit reliée à une forme de protection contre l'auto-immunité. En effet, des souris dépourvues de Ro60 ont une forte prédisposition à des maladies auto-immunes (Xue et al., 2003). Il est évidemment très probable que les fonctions mentionnées plus tôt, soit la résistance aux u.v. et le contrôle de qualité de l'ARN, soient impliquées dans l'auto-immunité. Néanmoins, un autre rôle très différent est attribué à Ro : un inhibiteur de la traduction de l'ARNm produisant la protéine ribosomale L4, via sa liaison à la région 5' non traduite (5' UTR) (Pellizzoni et al., 1998).

Hormis Ro, d'autres protéines sont présentes dans ces complexes, telle que la protéine La retrouvée dans la plupart des RNP Ro (Mamula et al., 1989). Aussi, les protéines PTB (*Polypyrimidine Tract Binding*), hnRNP K, RoBP1 et quelques unes moins bien caractérisées peuvent lier certains types de RNP Ro (Bouffard et al., 2000; Fabini et al., 2001; Fouraux et al., 2002).

2.2 La protéine La

La protéine La est une composante protéique très importante des RNP Ro. Les ARN Y sont très fréquemment liés à cette protéine en plus de Ro. Bien que certaines études tendent à démontrer que La se dissocie rapidement des ARN Y à leur sortie du noyau (Simons et al., 1994), on considère généralement que La peut être associée de façon stable aux RNP Ro (Boire et Craft, 1989; Pruijn et al., 1997). Tout comme Ro, celle-ci est ciblée par les auto-anticorps de patients souffrant de désordres auto-immuns. Quoique nécessaire chez les métazoaires, elle peut cependant être supprimée chez les levures à fission et bourgeonnantes, permettant l'étude de cette protéine plus en profondeur (Bayfield et al., 2010).

2.2.1 Caractéristiques générales

La est une protéine très abondante : on trouve environ 2×10^7 copies par cellules, un niveau comparable à celui des protéines ribosomales (Gottlieb et Steitz, 1989). Bien qu'elle soit présente dans toute la cellule, elle est beaucoup plus abondante dans le noyau, autant dans le nucléoplasme que dans le nucléole (Wolin et Cedervall, 2002). La est constituée de 408 acides aminés (a. a.) pour une masse de 47 kiloDalton (kDa) (Wolin et Cedervall, 2002). L'ARNm de cette protéine génère deux isoformes qui diffèrent par leur 5'UTR. Une des deux isoformes possède une structure *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*) permettant une traduction indépendante de la coiffe (Wolin et Cedervall, 2002). La protéine La lie majoritairement la séquence 3'-UUU-OH d'ARN transcrits par la polymérase (pol) III. Un co-cristal de l'extrémité N-terminale de cette protéine en présence d'un court ARN terminé par trois uridines a permis d'élucider les différentes interactions entre ces deux molécules. Ces interactions sont illustrées à la figure 2 (Bayfield et al., 2010).

2.2.2 Maturation des ARNt

La fonction la mieux caractérisée de La est probablement la protection des transcrits synthétisés par l'ARN polymérase III. De plus, ceci facilite son implication dans la maturation des extrémités 3' des ARNt (Wolin et Cedervall, 2002). Des études chez la levure ont montré que La est importante pour une maturation efficace des ARNt, bien que l'absence de La ne soit létale qu'en combinaison avec d'autres mutations (Yoo et Wolin, 1994). Cette protéine est cependant importante au développement complet des embryons de souris (Park et al., 2006).

2.2.3 Terminaison de l'ARN polymérase III

Le rôle suggéré mais certainement le plus controversé de cette protéine abondante est celui associé à la terminaison de la transcription par l'ARN polymérase III (Wolin et Cedervall, 2002). Plusieurs groupes ont proposé que La, en liant l'extrémité 3'-UUU-OH

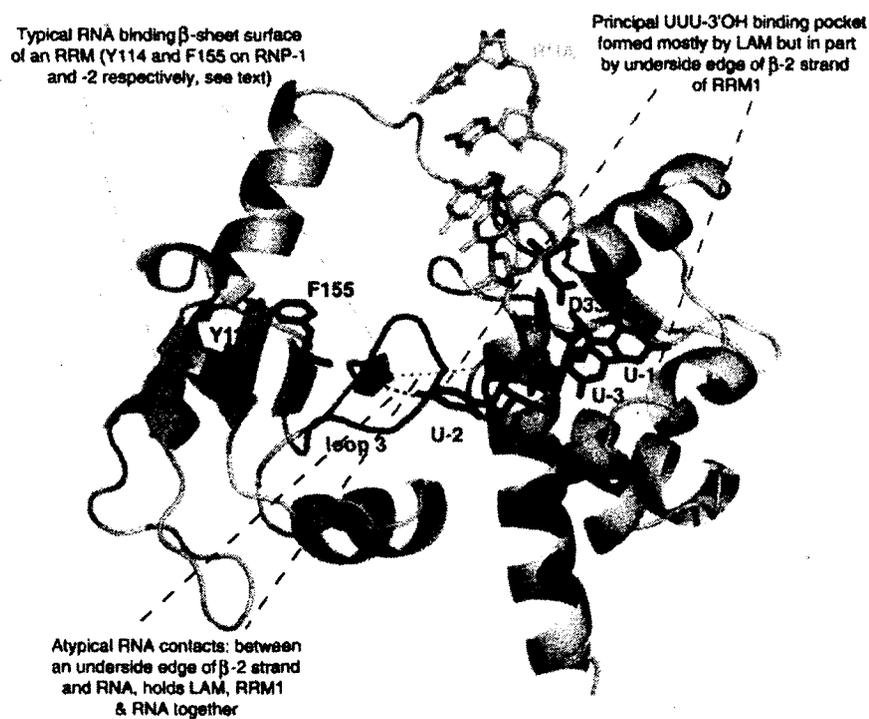


Figure 2 : Reconnaissance de l'extrémité 3' de l'ARN par la protéine La.

Le motif de reconnaissance à l'ARN 1 (RNA recognition motif 1, RRM1) de La lie l'ARN à partir de deux surfaces; i) à l'interface entre le RRM et le motif La (LAM), responsable de l'interaction dépendante de UUU-3'-OH (l'ARN correspondant à U-3 à U-1 en rouge) et ii) la boucle 3 du RRM1 (bleu), importante pour l'interaction indépendante de UUU-3'-OH des ARN cibles. La chaîne latérale D33 (dans le LAM) interagit avec les groupements 2'- et 3'-OH de la dernière U de l'ARN (bleu). Figure tirée de Bayfield M.A. 2010

(Mathews et Francoeur, 1984), entraîne la terminaison de transcription et la réutilisation immédiate de la polymérase (Wolin et Cedervall, 2002). D'autres groupes ont toutefois été incapables de déceler une telle activité (Lin-Marq et Clarkson, 1998). Apparemment, d'importantes différences existent au sein des divers organismes étudiés pour ce rôle, ce qui alimente ainsi la controverse (Wolin et Cedervall, 2002).

2.2.4 Traduction dépendante de site *IRES* et autres rôles

D'autres fonctions de La qui ne sont pas limitées aux ARN transcrits par la polymérase III ont été découvertes. Plusieurs études supportent un rôle de La dans la traduction de quelques ARNm cellulaires qui dépendrait de la présence de leur site *IRES*. Ce phénomène a surtout été démontré pour l'ARN de virus tel que le virus de l'hépatite C (VHC), le poliovirus et le coxsackievirus (Costa-Mattioli et al., 2004; Kim et al., 2001; Wolin et Cedervall, 2002). De façon plus générale, La aurait une activité de chaperon moléculaire (Belisova et al., 2005). Il a aussi été suggéré que La serait impliquée dans l'ARN interférence, ou du moins l'affecterait (Costa-Mattioli et al., 2004).

2.3 Les autres protéines

Les protéines présentes dans une RNP Ro donnée dépendront de l'identité de l'ARN Y dans le complexe, ainsi que d'autres facteurs moins bien définis. Le tableau 3 résume quelques caractéristiques de ces protéines quant à leur liaison aux différents hY. Ces différentes protéines comportent de nombreux domaines de liaison de l'ARN ainsi nommés RRM pour *RNA Recognition Motif*.

Tableau 3. Protéines reconnues pour lier les ARN hY.

Protéines	Se lie à	Site de liaison	Fonction
Ro60	hYs	Tige des hYs (C9 et G10 importantes)	Résistance aux U.V. Contrôle qualité
La	hYs	3'-UUU-OH	Chaperon moléculaire
hnRNP K	hY1 et hY3	Boucle de polypyrimidine	Impliquée dans l'expression des gènes
PTB	hY1 et hY3	Boucle de polypyrimidine	Répression de l'épissage alternatif
RoBP1	hY5	Boucle de polypyrimidine	Facteur d'épissage
ApoBEC3G	hYs		Cytidine deaminase Prévient la rétrotransposition
Ro52	Indirect	Ro60	Rôle anti-viral
Calréticuline	hYs		Chaperon moléculaire
Nucléoline	hY1 et hY3	Boucle de polypyrimidine	Transcription

2.3.1 La protéine hnRNP K

La protéine hnRNP K lie la boucle riche en polypyrimidine des ARN hY1 et hY3 (Fabini et al., 2001). Les RNP Ro qui contiennent hY5 ou hY4 ne comprennent presque jamais hnRNP K (Briere, 2003; Fabini et al., 2001). Les trois domaines KH de cette protéine aux multiples isoformes lui permettent de lier divers ARN, et faciliteraient son implication dans la traduction de certains ARNm (Ostareck-Lederer et Ostareck, 2004). En plus de posséder un domaine de transport bidirectionnel entre le noyau et le cytoplasme (Michael et al., 1997), hnRNP K peut subir plusieurs phosphorylations qui affecteront sa capacité de lier l'ARN (Ostrowski et al., 2000). Il semblerait que hnRNP K soit également impliquée dans la traduction de l'ARNm de Myc dépendante du signal *IRES* (Notari et al., 2006). Ses fonctions sont très diversifiées et, via son interaction avec l'ARN, avec l'ADN ou d'autres partenaires protéiques, semblent englober de près toutes les étapes de l'expression des gènes : transcription, épissage, stabilité de l'ARNm (Bomszyk et al., 2004).

2.3.2 PTB

Pour ce qui est de la participation de la *Polypyrimidine Tract Binding protein* (PTB) aux RNP Ro, elle comporte une répartition semblable à hnRNP K et interagit avec les complexes composés de hY1 et hY3 seulement (Briere, 2003; Fabini et al., 2001). Comme son nom l'indique, PTB a une préférence pour les suites de cytosine et d'uridine (Singh et al., 1995; Spriggs et al., 2005). Cette protéine a un rôle important dans la répression de l'épissage alternatif (Spellman et al., 2005). Il semblerait que cette protéine soit aussi impliquée dans la traduction de plusieurs ARNm via des *IRES* contenant le motif (CCU)_n (Spriggs et al., 2005).

2.3.3 RoBP1

Contrairement à PTB et hnRNP K, la protéine RoBP1 n'interagit pas avec les particules RNP Ro qui contiennent hY1 et hY3, mais plutôt avec celles qui contiennent hY5, et hY4 dans une moindre mesure (Bouffard et al., 1999; Bouffard et al., 2000). Cette protéine de 60 kDa contient trois RRM lui permettant d'interagir avec l'ARN et possède une grande homologie avec le facteur d'épissage U2AF65 (Bouffard et al., 2000). Deux autres isoformes du gène de RoBP1 sont connus : FIR (*FBP-interacting repressor*) (Liu et al., 2000) et PUF60 (*poly-U binding splicing factor 60KDa*) (Page-McCaw et al., 1999), qui seraient respectivement un répresseur de transcription et un facteur d'épissage.

2.3.4 ApoBEC3G

Des ARN hY ont été retrouvés dans un volumineux complexe contenant ApoBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G*) (Chiu et al., 2006). Cette protéine possède principalement deux activités : une activité cytidine déaminase engendre des mutations nuisibles à la réplication de rétrovirus (Chiu et Greene, 2006), et une seconde activité qui consiste à lier des ARN ayant un potentiel de rétroposition (concept qui sera détaillé plus loin) pour former un imposant complexe ribonucléique prévenant la rétroposition en question (Chiu et al., 2006).

2.3.5 Autres protéines (Ro52, calréticuline et nucléoline)

Quelques protéines supplémentaires ont été détectées dans les RNP Ro, quoique leur participation à cette RNP n'est pas universellement reconnue. La calréticuline et Ro52 (protéine Ro de 52 kDa) feraient partie de certaines RNP Ro, bien que l'interaction entre Ro52 et l'ARN hY semble indirecte (Cheng et al., 1996). La calréticuline a un rôle de chaperon moléculaire de glycoprotéines (Williams, 2006). Ro 52 aurait un rôle antiviral, entre autres via une interaction avec la partie constante des IgG. La nucléoline participerait également aux RNP Ro (Fouraux et al., 2002). Cette protéine est principalement impliquée dans la transcription (Mongelard et Bouvet, 2007).

De façon générale, les principales protéines trouvées dans les RNP Ro ont des sites de liaison à l'ARN leur permettant de lier directement les hY, à l'exception des protéines mentionnées ci-haut. De plus, La, PTB et hnRNP K auraient des activités de chaperons moléculaires pour l'ARN (Belisova et al., 2005). Aussi, si Ro60 et La sont bien connues pour être retrouvées simultanément sur la même molécule hY, le phénomène ne se reproduit pas dans toutes les situations. Bien que PTB lie plus facilement l'ARN en absence de Ro, il semble que PTB et hnRNP K peuvent interagir simultanément avec la même RNP Ro, qui comprendrait déjà Ro, La et un hY (Briere, 2003). Ces quatre protéines peuvent aussi lier les ARN hY1 et hY3 et n'ont besoin d'aucune autre protéine pour ce faire (Briere, 2003).

3. Les ARN Y

Cette classe de petits ARN cytoplasmiques non-codants qui est peu étudiée est retrouvée chez plusieurs métazoaires comme l'humain, la souris, le rat, *Caenorhabditis elegans*, ainsi que chez une bactérie, *Deinococcus radiodurans*. Récemment, 57 gènes d'ARN Y ont été identifiés parmi 27 génomes de différents organismes (Perreault et al., 2007). Ceux-ci varient en taille, en nombre et en séquence chez ces différentes espèces. Chez l'humain, on retrouve quatre ARN Y, soit hY1 (Y1 humain), hY3, hY4 et hY5. Pour ce qui est de hY2, il est maintenant reconnu pour être un produit de dégradation de hY1. Ces petits ARN non-

codants sont transcrits par l'ARN polymérase III et sont colocalisés au chromosome 7 (Maraia et al., 1996; Maraia et al., 1994; Wolin et Steitz, 1983). Leur longueur varie de 84 à 112 nt et les ARN sont présents dans le cytoplasme sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Comme vu précédemment, ces complexes sont formés de la protéine Ro60 et de la protéine La, ainsi que parfois de quelques autres protéines.

3.1 Fonctions et implications

3.1.1 Fonctions hypothétiques

Comme mentionné précédemment, aucune fonction n'était connue pour les ARN Y jusqu'à tout récemment. Plusieurs résultats laissent entendre qu'ils ne sont pas essentiels. Une lignée de souris où Ro60 est aboli a un niveau d'ARN Y pratiquement indétectable et n'a pourtant pas de phénotype très marqué (Xue et al., 2003). Un des principaux phénotypes observables, une sensibilité aux u.v., est certainement lié à l'absence de la protéine Ro elle-même. Malgré qu'on ne puisse exclure que la susceptibilité à une auto-immunité soit due à une diminution de la quantité d'Y dans l'organisme, il est probable qu'elle soit liée à l'absence de Ro. À l'instar de la souris, le nématode *C. elegans* invalidé pour Ro (Labbé et al., 1999; Labbé et al., 1999) a une diminution marquée de l'ARN Y. Dans un autre ordre d'idée, notre laboratoire a suggéré un rôle des ARN hY dans l'épissage alternatif. En dépit de résultats mitigés, les hY pourraient exercer un effet subtil favorisant certaines isoformes (Noël, 2006).

3.1.2 Réplication de l'ADN

En 2006, un groupe de recherche sur la réplication de l'ADN a découvert que les ARN Y étaient requis, dans leur système, pour la réplication des chromosomes (Christov et al., 2006). Des noyaux arrêtés en G1 ont été mis en présence de diverses fractions cytoplasmiques semi-purifiées pour initier la réplication. Une des fractions permettant la réplication de

l'ADN contenait les ARN Y. Dans une série d'expériences, ces ARN ont été dégradés des fractions, puis ajoutés aux noyaux pour démontrer leur implication. De plus, il semble que ce rôle soit indépendant de la protéine Ro puisque des mutations empêchant sa liaison aux ARN Y n'ont pas affecté la capacité de ces derniers à réinitier la réplication. Puis en 2010, ce même groupe démontre que la présence des RNP Ro et RNP nucléoline n'est pas nécessaire à la réplication *in vitro* de l'ADN et que celle-ci n'était pas influencée par leur surexpression (Langley et al., 2010). D'autre part, ils ont aussi confirmé la surexpression des ARN Y dans certaines tumeurs et leur nécessité pour la prolifération cellulaire. Les ARN Y ont été dégradés par ARN interférence afin de vérifier si leur présence était essentielle à la prolifération et à la survie cellulaire (Christov et al., 2008). En analysant le nombre de cellules en phase S et la mortalité cellulaire, ils ont conclu qu'il y avait en effet une inhibition de la réplication cellulaire, ce qui engendrait la diminution de la prolifération cellulaire, mais sans causer la mort de la cellule.

3.1.3 Inhibition de l'activité de Ro

Par ailleurs, l'étude des « RNP Ro » chez *Deinococcus radiodurans* a montré que l'ARN Y de cette bactérie inhibe la liaison de Rsr (l'orthologue de Ro de cette bactérie) à l'ARNr (Chen et al., 2007). Ainsi, un rôle des ARN Y chez cet organisme serait de maintenir Rsr inactif jusqu'à ce que le besoin soit présent, tout simplement en occupant le « site actif » de la protéine. La raison de cette inhibition, de même que les mécanismes qui la relèveraient, demeure toutefois obscure. Bien que ces travaux apportent une certaine lumière sur le rôle des ARN Y, aucune étude depuis n'a pu extrapoler cette conclusion aux métazoaires.

3.2 Expression et localisation des ARN Y

L'ARN polymérase III transcrit les ARN Y via un promoteur de classe III externe, c'est-à-dire que, contrairement aux ARNt, il est entièrement situé en amont de la position +1 (Hendrick et al., 1981; Shastry, 1993). En ce sens, il est analogue au promoteur du snARN U6

(Kunkel et Danzeiser, 1992). Comme la majorité des ARN transcrits par la polymérase III, les ARN Y sont plutôt abondants. On trouve environ 10^5 copies d'hY par cellule, ce qui représente environ 1 % de l'ARN ribosomal, de loin le plus abondant (Wolin et Steitz, 1984). Cela signifie que la masse totale des hY correspond approximativement à 0,02 % de tout l'ARN d'une cellule. À titre de comparaison, l'ARNm moyen a moins de 10^3 copies par cellules et représente moins de 0,002 % de l'ARN cellulaire.

La quantité d'ARN Y varie cependant d'un type cellulaire à l'autre. Les érythrocytes expriment seulement les ARN hY1 et hY4 (O'Brien et Harley, 1990; Rader et al., 1989) alors que les plaquettes n'expriment que hY1 et hY3 (Itoh et Reichlin, 1991). À l'opposé, l'ARN hY5 est abondamment exprimé dans de nombreux autres types cellulaires (Boire et Craft, 1989; Fraire-Velazquez et al., 1999; Itoh et al., 1990). L'abondance respective des RNP Ro dans différents tissus humains semble également trouver une équivalence chez le cobaye (Itoh et al., 1990).

3.2.1 Y comme dans cYtoplasme

Le nom des ARN Y a pour origine la deuxième lettre du mot « cytoplasme » ; ils sont d'ailleurs fréquemment nommés « *Y scRNA* » pour « *Y small cytoplasmic RNA* ». Leur localisation est donc majoritairement cytoplasmique (Peek et al., 1993; Wolin et Steitz, 1984). D'autres études rapportent toutefois une localisation périnucléolaire pour une fraction dénudée de protéines des ARN hY1, hY3 et hY5 (Matera et al., 1995), alors qu'une autre fraction d'hY se trouve dans le nucléoplasme sous forme de RNP Ro (Farris et al., 1997), la majorité demeurant néanmoins cytoplasmique. La protéine Ro60 apparaît comme essentielle à l'exportation des ARN Y vers le cytoplasme dans des oocytes de *Xenopus laevis* (Simons et al., 1994). Ro60 est cependant insuffisante pour exporter les ARN Y hors du noyau. Une autre protéine non identifiée qui lierait la tige en bordure de la grande boucle interne de tous les hY serait essentielle à leur localisation cytoplasmique (Rutjes et al., 2001). À l'opposé, la protéine La semble capable de retenir au noyau des ARN Y

modifiés. Elle serait responsable de la lenteur de l'exportation des ARN Y, soit 8 heures en comparaison à 30 minutes pour un ARNt (Pruijn et al., 1997; Simons et al., 1994).

Sans faire une revue exhaustive sur la localisation cellulaire des RNP Ro, certains détails intéressants supplémentaires à ce sujet doivent être cités. L'ARN hY1 possède un motif, une « minihélice », qui permet une exportation compétitionnant avec l'exportation de l'ARN VA1 de l'adénovirus (Gwizdek et al., 2001). Aussi, la localisation cellulaire de Ro60 et La change lorsque la cellule est soumise à certains stress. À titre d'exemple, l'apoptose (induite, entre autres, par des u.v.) localise Ro60 dans des « bulles apoptotiques » (*apoptotic blebs*) et La dans des « particules apoptotiques » (*apoptotic bodies*) (Lawley et al., 2000). Une surexpression de Ro60 entraîne une localisation principalement nucléolaire. Enfin, plusieurs types d'infections virales induisent une localisation cytoplasmique de La, qui est d'ordinaire majoritairement nucléaire (Pruijn et al., 1997).

3.2.2 L'ARN hY5 et la controverse

Les hY sont souvent identifiés comme cytoplasmiques, bien que certaines études les aient détectés, dans une faible proportion, dans le noyau. Une étude de notre laboratoire a pourtant pu démontrer que hY5 était largement présent au noyau et peu abondant dans le cytoplasme de cellules HeLa et de cellules de souris NIH 3T3 transfectées pour exprimer hY5 (Gendron et al., 2001). Des indices circonstanciels lors d'une étude de localisation nucléaire de hY5 ont permis d'observer que celui-ci est absent des cellules sans noyau comme les érythrocytes et les plaquettes. De plus, hY4 et hY5 ont été observés dans les noyaux de cellules d'embryon (Fraire-Velazquez et al., 1999).

3.3 Structure et sites de liaison aux protéines

Les ARN Y adoptent une structure de tige boucle incluant quelques renflements qui est bien conservée (Farris et al., 1999). La figure 3 illustre les structures secondaires des quatre

ARN Y humains telles que déterminées par des expériences de protection de l'ARN et par analyse de covariation (Farris et al., 1999; Teunissen et al., 2000; Wolin et Steitz, 1984). Cette structure est constituée d'une tige joignant les extrémités 5' et 3' de l'ARN Y, mais laissant deux à quatre uridines simple brin en 3', qui constituent le site de liaison de la protéine La (Chang et al., 1994; Mathews et Francoeur, 1984). La caractéristique sans doute la plus importante de la structure des ARN Y est cependant une cytosine saillante à la position 9. Cette dernière, dans le contexte de sa tige, est essentielle à la liaison de la protéine Ro (Green et al., 1998; Wolin et Steitz, 1984). La séquence de la tige a aussi son importance, bien que la liaison avec Ro puisse supporter plusieurs séquences différentes dans la mesure où la tige est formée (Green et al., 1998). Plusieurs autres protéines auraient la capacité de lier les ARN hY. Les protéines PTB et hnRNP K se lieraient plutôt dans la partie centrale des ARN hY1 et hY3 (Briere, 2003; Fabini et al., 2001). En effet, une suite de plus de neuf pyrimidines, correspondant bien au motif lié par PTB, est retrouvée dans cette portion. Quant à hnRNP K, elle lierait la même région selon des mutants de délétion (Fabini et al., 2001). Cependant, l'interaction simultanée observée par notre groupe suggère un site différent, bien qu'à proximité (Briere, 2003).

3.4 Répartition des gènes hY dans le génome

Une autre caractéristique particulière des ARN Y est la présence de séquences homologues éparpillées dans le génome. L'existence de tels « pseudogènes Y » chez l'homme et la souris est connue depuis plusieurs années (O'Brien et Harley, 1992; Weiner et al., 1986). Seulement quelques-uns de ces pseudogènes avaient été étudiés (Crouch et Liebke, 1989; Jurka et al., 1988; O'Brien et Harley, 1992). Cependant, le séquençage du génome humain complet en 2001 a permis d'étudier en profondeur la présence de pseudogènes Y dans le génome humain (Perreault et al., 2005).

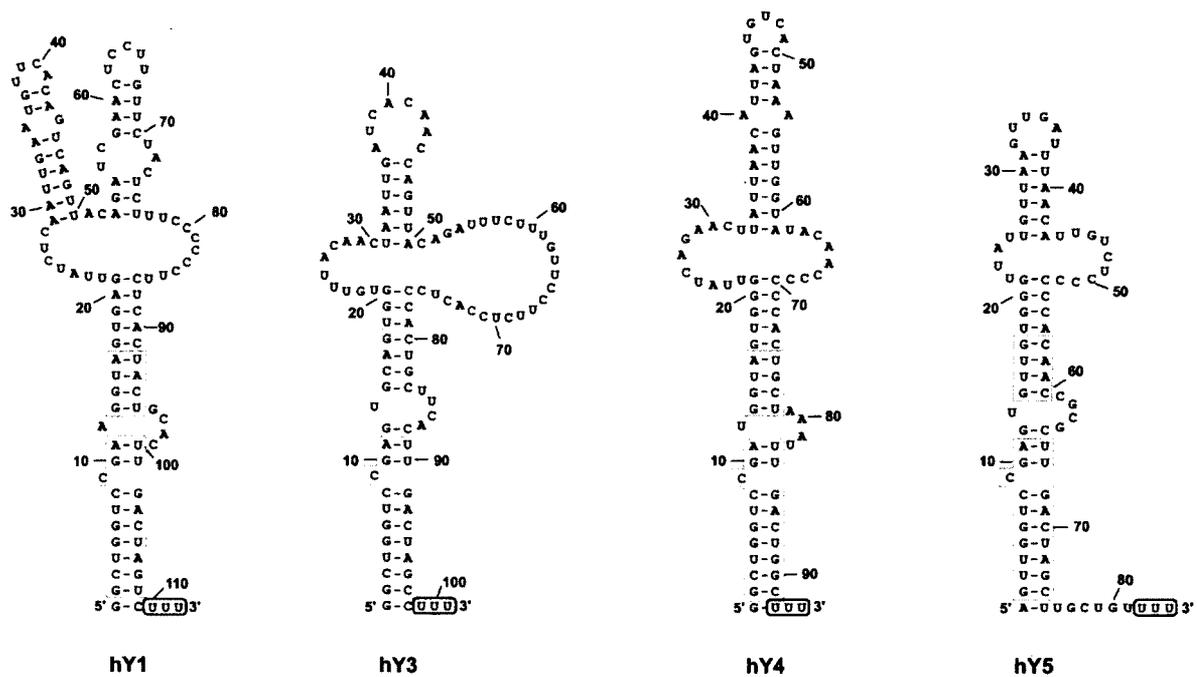


Figure 3 : Séquences et structures secondaires des ARN hY

Structure secondaire proposée pour les quatre ARN hY. L'encadré correspond au site de liaison de la protéine La (3'-UUU-OH). L'encadré gris correspond au site de liaison de la protéine Ro60, on y remarque particulièrement bien la cytosine saillante à la position 9. Figure adaptée de Perreault J., 2005.

4. *Les pseudogènes Y*

Un pseudogène est une séquence ayant une ressemblance marquée avec un gène, mais qui présente plusieurs signes d'inactivité : absence de promoteur ou de terminateur, codons de terminaison fréquents (dans le cas de gènes codant des protéines) ou présence de toute autre mutation susceptible de causer un tort important à l'activité du gène connu (Vanin, 1985). Les pseudogènes sont trouvés dans les génomes de nombreux organismes et ne sont habituellement pas exprimés. Ils ont principalement deux origines : la duplication et la rétrotransposition.

4.1 Duplications et transposition

La transposition est un mécanisme par lequel un fragment d'ADN (le transposon) s'excise et se réinsère à un autre endroit. Il n'y a pas de multiplication de l'élément et, par conséquent, ces éléments n'occupent qu'approximativement 3 % du génome humain (Lander et al., 2001). La rétrotransposition est quant à elle généralement reconnue, du moins chez les mammifères, comme la principale source de pseudogènes et de séquences dites « poubelles ». Néanmoins, la duplication a également eu un rôle important à jouer pour façonner notre génomique. De petits fragments de chromosomes (moins de 10 kb) sont parfois dupliqués, créant ainsi une copie de tout gène se trouvant dans cette région. Des mutations subséquentes qui inactiveraient un des deux gènes paralogues feraient de celui-ci un pseudogène. À l'opposé, les mutations subies pourraient permettre l'émergence d'une nouvelle fonction. Ainsi, il semblerait que le génome des vertébrés aurait subi deux duplications complètes dans de lointains ancêtres, créant de cette façon un terrain fertile à l'apparition de nouveaux gènes (Dehal et Boore, 2005).

4.2 La rétrotransposition

Malgré le rôle majeur des duplications dans notre génome, la rétrotransposition est aujourd'hui la principale raison de l'accroissement de la taille du génome des mammifères (Deininger et al., 2003; Lander et al., 2001; Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002). Le nombre de copies extrêmement élevé des rétrotransposons, ainsi que leur activité continue sur des dizaines de millions d'années a permis cette expansion. Les événements de rétrotransposition survenant dans les cellules germinales a donné lieu à une évolution de la structure et de la fonction du génome humain. Les événements survenant dans les cellules somatiques quant à eux, induisent des variations inter-individu, maintenant étudiées afin d'investiguer l'histoire évolutive de l'homme, sa structure de population et sa démographie. Ils peuvent aussi causer des instabilités génétiques locales par leur insertion dans un gène codant, la formation de cassures double brins et de microsatellites ainsi que par la conversion de gène (Cordaux et Batzer, 2009).

Il existe plusieurs types d'éléments transposés. Les éléments LTR (*Long Terminal Repeat*) sont généralement des vestiges de rétrovirus qui se sont intégrés dans le génome. La plupart de ces éléments sont aujourd'hui inactifs, mais certains se sont multipliés à la suite de la transcription inverse de leur ARN et à l'insertion de cet ADNc dans le génome hôte (Ostertag et Kazazian, 2001). Les éléments LINE1 (*Long Interspersed Nuclear Element 1*), ou L1, se rétrotransposent de façon similaire. Ils l'ont fait avec beaucoup de succès avec leurs quelque 500 000 copies (Lander et al., 2001).

4.2.1 Mécanisme de rétrotransposition par L1

La séquence de L1 mesure environ 6 kb et contient un promoteur interne pol II, c'est-à-dire en aval du +1, deux cadres de lectures (*ORF*, *Open Reading Frame*) et se termine avec un signal de polyadénylation, suivi d'une queue polyA. La protéine de l'*ORF2* possède les activités endonucléase et transcriptase inverse (RT) tandis que l'autre est une protéine liant l'ARN agissant ainsi en tant que chaperon moléculaire (Martin et al., 2008). Avant même que ces protéines soient entièrement synthétisées, elles lieraient leur propre ARN L1. Subséquemment, ce complexe serait importé dans le noyau, puis l'information génétique

insérée dans le génome suite à la coupure par l'endonucléase de L1 et à la synthèse d'un ADNc par sa RT (Ostertag et Kazazian, 2001). La spécificité de l'endonucléase L1 pour son site de coupure est très flexible, mais sa préférence consiste en 5'-TTAAA-3', ou YYRRRR de façon plus générale (Jurka, 1997). Un schéma décrivant le mécanisme d'insertion de L1 est présenté à la figure 4. La coupure s'effectue sur le brin opposé, après la deuxième base du site (3'-AA/TTTT-5'). La transcriptase inverse synthétiserait alors l'ADNc en utilisant comme amorce l'extrémité 3' de l'ADN chromosomique qui vient d'être clivé. L'autre brin d'ADN génomique sera coupé environ 15 bases plus loin, produisant ainsi des extrémités cohésives qui sont à l'origine des courtes répétitions trouvées de chaque côté des éléments L1 suite à leur remplissage (Ostertag et Kazazian, 2001). Le site de reconnaissance de l'endonucléase, la séquence poly(A) de l'ARNm et les répétitions qui flanquent l'insertion permettent donc de déduire l'implication de L1 dans une insertion observée. Ce type d'événement est plutôt circonstanciel.

4.2.2 L'élément répété Alu

Cette signature de L1 est également observable pour plusieurs autres petites insertions appelées les SINEs (*Short Interspersed Nuclear Element*). Ces derniers sont des ARN non-codants de moins de 300 nt qui utilisent les protéines de L1 pour leur propre propagation dans le génome (Ostertag et Kazazian, 2001). On parle alors de rétrotransposition non autonome, aussi nommée rétroposition (Emerson et al., 2004). Ces éléments sont nombreux et souvent constitués de gènes qui ont subi des modifications, tels que des ARNt avec une séquence ajoutée en 3' (Ohshima et al., 1993). L'exemple sans doute le plus connu est l'élément Alu, un dérivé de l'ARN 7SL. Ce dernier aurait subi une délétion suivie d'une duplication de la portion restante et de l'insertion d'une courte séquence (Ostertag et Kazazian, 2001; Schmid, 1998). On trouve un million de copies de cet élément chez l'humain représentant 11 % de notre génome à lui seul (Lander et al., 2001). Comme il utilise les protéines de L1 pour se rétroposer, la même signature sera observable. Malgré cela, la répartition des séquences Alu dans le génome contraste grandement avec celle de L1, ce

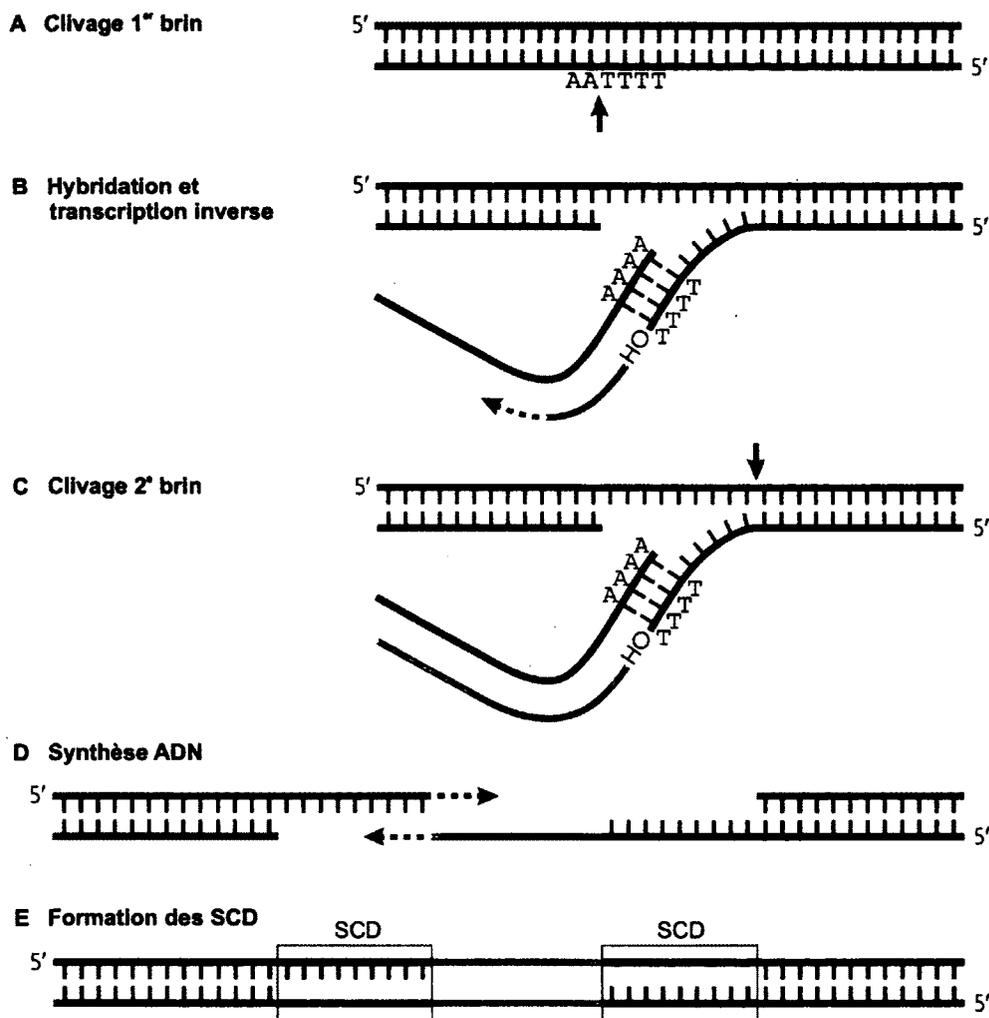


Figure 4 : Le cycle de rétrotransposition

Modèle du mécanisme de transcription inverse utilisant l'extrémité cohésive comme amorce. (A) L'endonucléase coupe un brin de l'ADN génomique à son site de reconnaissance, créant une extrémité 3'-OH. (B) L'ARN du rétrotransposon (*en rouge*) est utilisé comme matrice par la transcriptase inverse, produisant ainsi un ADNc (*en vert*). (C) L'endonucléase coupe le deuxième brin de l'ADN. (D) Le second brin d'ADN est synthétisé. (E) Cette dernière produit des répétitions de chaque côté de la séquence insérée, les Sites Cibles Dupliqués (SCD). Figure modifiée de Cordaux R., 2009.

dernier étant trouvé dans des régions AT riches et pauvres en gènes alors qu'Alu est trouvé dans des régions riches en GC et en gènes (Lander et al., 2001).

4.3 Les ARN hY sont rétrotransposés

En 2005, notre laboratoire a identifié environ 1000 pseudogènes hY ayant 75 % d'identité de séquence sur au moins 50 % de l'ARN correspondant, représentés dans le tableau 4 (Perreault et al., 2005). L'assemblage du génome humain a été retrouvé dans ENSEMBL (http://www.ENSEMBL.org/Homo_sapiens; version 18.34.1).

Tableau 4. Nombre de séquences homologues de petits ARN non-codants retrouvées dans le génome humain.

Table 1. Number of small non-coding RNAs homologous sequences in the human genome^a

Pseudogenes	Number
hY1	368
hY3	442
hY4	148
hY5	8
U1	91
U2	46
U3	45
U4	70
U5	29
U6	1085
tRNA ^{Arg}	5
tRNA ^{Lys}	35
5S rRNA	659

^aMegaBlast results using requirements for >75% identity of sequence relative to at least 50% of the length of the corresponding RNA gene, excluding full-length sequences that are 100% identical.

Plusieurs évidences suggéraient l'implication des Long Interspersed Nuclear Elements 1 (LINE-1) dans la formation de ces pseudogènes. Une signature caractéristique a été

identifiée à proximité de l'ensemble des pseudogènes hY, dont le site consensus de clivage par l'endonucléase (TTAAAA), deux sites cibles dupliqués à chaque extrémité du pseudogène ainsi qu'une séquence poly(A) en 3'. Ceci suggérerait un type de rétrotransposition non autonome semblable à celui utilisé par les éléments Alu. De plus, nous avons noté quelques particularités présentes au niveau de presque tous les pseudogènes. La tige des hY représentée par les extrémités de l'ARN et surtout la cytosine 9 saillante est très importante dans la liaison de la protéine Ro60. Chez plus de 80 % des pseudogènes hY1, hY3 et hY4, les nucléotides C9 et/ou G10 avaient subi une mutation ponctuelle, ce qui viendrait affecter la liaison de Ro60 à l'ARN. Également, un taux de mutation de 80 % chez les résidus formant la région riche en polypyrimidine au centre de l'ARN hY1, une région impliquée dans la liaison d'hnRNP K et PTB, a été constaté. Par la suite, ils ont remarqué que chez certains pseudogènes hY, les uridines à l'extrémité 3' étaient absentes, empêchant la liaison de la protéine La (Perreault et al., 2005). Était-ce une coïncidence que de retrouver un taux de mutations si élevé aux sites de liaison protéique? Nous voulions explorer la voie de rétrotransposition des hY et ainsi nous pencher sur ces observations.

5. Objectifs de la recherche

Bien que les ARN hY aient suscité l'attention de multiples chercheurs, ils restent assez mystérieux. Ils pourraient posséder quelques fonctions éparses, mais rien de très définis. C'est dans cet ordre d'idée que nous voulions approfondir nos connaissances sur ces petits ARN non-codants.

Les travaux de Jonathan Perreault discutés dans cette introduction ont été le point de départ de ce projet. La découverte d'environ 1000 pseudogènes Y dans le génome humain ayant la signature L1 nous a amenés à étudier le mécanisme de rétrotransposition chez les hY. De plus, le fait que ces pseudogènes contenaient plusieurs mutations à des endroits spécifiques, soit aux sites de liaison de plusieurs protéines, a fait naître une hypothèse précise. La présence de protéines liées aux hY générerait le mécanisme de rétrotransposition par L1. Soit

par la modification de la structure de l'ARN et des protéines, de la localisation cellulaire ou par la proximité d'autres protéines. Ainsi, des ARN contenant ces mutations ne se retrouveraient plus dans des complexes anti-rétroposition et pourraient être pris en charge par la machinerie de L1 et rétrotransposés plus facilement.

a. Objectif général

Étudier l'effet sur le mécanisme de rétrotransposition des ARN hY par l'absence des sites permettant la liaison des protéines sur les ARN hY.

b. Objectifs spécifiques

- i. Identifier une technique permettant le dénombrement d'événement de rétrotransposition pour les hY dans les cellules humaines;
- ii. Concevoir les constructions nécessaires à l'application de cette technique;
- iii. Vérifier s'il y a perte de liaison des protéines aux constructions créées et
- iv. Déterminer si l'absence de liaison à certaines protéines influence le mécanisme de rétrotransposition.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Plasmides

Le plasmide *Alu-neo^{TET}* contenant la séquence *enhancer* en amont de 7SL, la séquence de l'ARN Alu, suivi de la cassette autocatalytique *neo^{TET}*, ainsi qu'une suite de 44 adénines et de 4 thymines agissant comme terminateur pol III (Dewannieux et al., 2003), a été un généreux cadeau du Dr. Thierry Heidmann. Les plasmides contenant les différents gènes hY ont été construits à partir du plasmide *Alu-neo^{TET}* et ont été obtenus du Dr. Astrid Roy-Engel. Les constructions contenant les différents hY (*hY1neo^{TET}*, *hY3neo^{TET}*, *hY4neo^{TET}* et *hY5neo^{TET}*) possèdent la séquence de leur propre promoteur en amont (Krouter et al., 2009). Le plasmide contrôle *HBB-neo^{TET}* comprend le gène de la bêta globine de lapin sous le contrôle du promoteur fort du cytomégalo virus (CMV) contenant la cassette *neo^{TET}* dans l'exon 3 : celui-ci a aussi été acquis du Dr. Thierry Heidmann. Le plasmide pBud-ORF2opt, qui contient la séquence codante pour la protéine ORF2 de L1 optimisée, a été obtenu du Dr. Astrid Roy-Engel.

1.1 Construction des mutants hY1

La construction des mutants hY1 a été réalisée à partir du plasmide sauvage *hY1neo^{TET}*. L'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) du gène hY1 incluant son promoteur a permis l'insertion des mutations par mutagenèse dirigée, ainsi que l'ajout de sites de restriction à chaque extrémité de l'insert. Les réactions PCR ont été faites dans 100 μ l contenant 10 ng de plasmide, 2 μ M de chaque amorce, 200 μ M dNTPs, 2 mM MgSO₄, 1X tampon ThermoPol (20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 19 mM KCl et 0,1 % Triton X-100) et 2 μ l de polymérase provenant de la bactérie thermophile *Pyrococcus furiosus* (Pfu) purifiée au laboratoire. Les amorces utilisées pour les différentes constructions se retrouvent dans le tableau 5.

Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour la construction des mutants hY1 par mutagenèse dirigée.

Mutants	Sites de restriction	Amorces
		hY1 For BamHI GCTCGGATCCGTCACAG hY1 Rev SpeI GACGTCAAGACTAGTCAAGTGC
D9		D9 For GGCTGGTCTGAAGGTAGTGAG D9 Rev CTCACTACCTTCGACCAGCC
hY1 D10		D10 For GGCTGGTCCAAGGTAGTGAG D10 Rev CTCACTACCTTGGACCAGCC
D9, 10	<i>BamHI - SpeI</i>	D9-10 For GGCTGGTCAAGGTAGTGAG D9-10 Rev CTCACTACCTTGACCAGCC
D9, 10, 79-83		D9-10, 79-83 Rev GACGTCAAGACTAGTCAAGTGCAGTAGTGAGA AGAAAGAGTAGAACAAG

Le programme PCR utilisé comportait une première étape de dénaturation de 5 minutes (min) à 94 °C suivi de 30 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 55 °C et 1 min à 72 °C puis d'une étape finale de 5 min à 72 °C. Par la suite, les produits PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % puis purifiés à l'aide de colonnes Spin-X (Costar, Corning). Premièrement, les bandes ont été extraites et mises dans des tubes Spin-X, puis placées à -20 °C pendant 30 min. Ensuite, les bandes ont été décongelées et découpées en petits morceaux, auxquelles on ajoute 100 µl d'eau stérile. Les colonnes sont centrifugées à 13 000 RPM pendant 20 min, puis l'éluat est précipité à l'éthanol. Chaque fragment et le plasmide hY1*neo*^{TET} sont digérés avec les enzymes de restriction *Bam*HI et *Spe*I, puis purifiés sur gel d'agarose comme décrit précédemment. Les fragments sont ensuite ligués dans le plasmide digéré à l'aide de la T4 DNA ligase. Les réactions de ligation sont réalisées dans le tampon 1X T4 DNA Ligase Reaction Buffer (NEB) (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM dithiothreitol, pH 7.5). Les produits de ligation sont transformés dans les bactéries compétentes *E. coli DH5a*. Tous les plasmides ont été préparés avec le PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen). Chaque construction a été séquencée afin de s'assurer de l'exactitude de la séquence.

2. Culture cellulaire et transfection

Les cellules HeLa ont été cultivées dans le milieu Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) additionné de 10 % sérum bovin fœtal (SBF), 1 mM pyruvate et 1X antibiotique-antimycotique (EMEM complet). Elles ont crû dans un incubateur humidifié, à 37 °C et 5 % CO₂. Pour les transfections, les cellules HeLa ont étéensemencées dans des flasques T75 à une densité de 1 x 10⁶ cellules/flasque, 24 h auparavant. Les transfections ont été effectuées à l'aide de la Lipofectamine LTXTM et le PlusTM Reagent suivant les instructions du manufacturier (Invitrogen), avec 3 µg de plasmide SINE-*neo*^{TET} et 1 µg pBud-ORF2opt. Quatre heures suivant la transfection, le milieu a été remplacé par du EMEM complet. Pour les essais de rétrotransposition traditionnelles, 24 h après la transfection, du milieu supplémenté de 400 µg/mL Geneticine/G418 (Wisent) a été ajouté aux cellules afin de sélectionner les cellules résistantes pour une période de 14 jours. Puis, une coloration au cristal violet (0.2 % cristal violet dans 5 % acide acétique et 2.5 % isopropanol) a été faite afin de révéler les colonies résistantes au G418. Le taux de rétrotransposition a été déterminé par le nombre de colonies visibles résistantes au G418 sur 1 x 10⁶ cellules transfectées. Pour les analyses par PCR quantitative, les cellules ont été récoltées 72 h après transfection (sans sélection) et l'ADN génomique a été extrait avec le DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) en suivant les procédures du manufacturier, puis quantifié avec le Nanovue spectrophotomètre (GE Healthcare). Pour les analyses de northern et de RT-qPCR sur l'ARNm SINE-*neo*^{TET}, les cellules ont été transfectées avec 3 µg du plasmide SINE-*neo*^{TET} seul. Elles ont été récoltées après 48 h afin que l'ARN soit extrait.

3. Extraction d'ARN et buvardage northern

L'extraction de l'ARN total d'un flasque T75, 48 h post-transfection, a été faite par TriPure Reagent (Roche) en suivant les instructions du manufacturier. Brièvement, les cellules sont lavées au PBS puis 3 mL de Tripure sont ajoutés directement sur les cellules et laissés à température ambiante 5 min. Ensuite, 200 µl de chloroforme pour chaque mL du réactif TriPure sont ajoutés, le tout est mélangé 15 sec et laissé à température ambiante 5 min. Une

centrifugation de 15 min à 12 000 x g, à 4° C est effectuée, puis la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et l'ARN précipité à l'isopropanol. L'ARN total est par la suite quantifié avec le Nanovue spectrophotomètre (GE Healthcare). Cet ARN est utilisé à la fois pour le buvardage northern et le RT-qPCR. Lors du buvardage northern comparant l'ARN hY1 non-muté et ceux muté, une étape supplémentaire a été effectuée. Une purification des ARNm a été faite avec le kit PolyATtract® System 1000 de promega selon les instructions du fabricant. Ensuite, 10 µg d'ARN sont ensuite séparés sur gel d'agarose 2 % et transféré sur membrane de nylon Nytran N (Whatman). L'ARN a été réticulé à la membrane par lumière uv (Startalinker, Stratagene) et préhybridé avec une solution Church (1 mM EDTA, 0,5 M NaPhosphate, 7 % SDS, 1 g/100 ml BSA) à 65° C pour 1 h. L'extrémité 3' du gène de la néomycine a été amplifiée par PCR comme décrit précédemment utilisant les amorces suivantes Neo sondeF : GAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAG et T7Neo sondeR : TAATACGACTCACTATAGGGAGGACGAGGCAGCGGGCTAT. Le produit PCR isolé a été utilisé en tant que matrice d'ADN afin de générer une sonde ARN spécifique radiomarquée par incorporation du nucléotide ³²P-UTP (Perkin Elmer) à l'aide du système MAXIcript T7 kit (Ambion) en suivant le protocole du fabricant. La sonde ARN a été purifiée sur une colonne G25. L'hybridation se fait dans la solution Church (0,5 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 7 % SDS, pH 7.2) à 65° C pendant 8 h. Deux lavages de 15 min ont été réalisés à stringence élevée (2x SSC, 0,1 % SDS) à 68° C, suivis de deux autres lavages à plus faible stringence (0,1 SSC, 0,1 % SDS). Les résultats du buvardage ont été évalués avec un Typhoon Phosphorimager (Amersham Biosciences) et le programme ImageQuant.

4. Transcription inverse (RT) et PCR quantitative (qPCR) : RT-qPCR

Une digestion de l'extrait d'ARN à la DNase RQ1 (RNase-free, Promega) a été effectuée sur tous les échantillons d'ARN afin d'éliminer la présence d'ADN contaminant. Brièvement, 1 µg d'ARN a été digéré avec 1 U de DNase RQ1 dans le tampon 1X RQ1 RNase-Free DNase (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgSO₄ and 1 mM CaCl₂), à 37° C

pour 30 min. La réaction a été arrêtée avec 1 μ l de RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EGTA (pH 8.0)) et incubée à 65° C pour 10 min. La réaction de transcription inverse a été réalisée avec la Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche Applied Science). Une réaction contenant 200 ng d'ARN total, préalablement digéré à la DNase, a été faite dans un volume de 20 μ l. La réaction de transcription inverse contient 3,2 μ g d'oligo dégénéré (p(dN)₆), le tampon Transcriptor RT 1X (50 mM Tris-HCl, 30 mM KCl et 8 mM MgCl₂), 20 U de RNaseOUT (Invitrogen 40 U/ μ l), 1 mM dNTPs et 10 U d'enzyme Transcriptor Reverse Transcriptase. Les réactions ont été incubées 10 min à 25° C, 30 min à 55° C et 5 min à 85° C, puis placées sur glace. Un volume de 20 μ l d'eau nanopure stérile a été ajouté à chaque réaction afin d'utiliser 2 μ l de celle-ci (10 ng d'ADNc) par réaction de qPCR de 10 μ l utilisant le FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science) et le Corbett Research Rotor-Gene 3000. Le programme PCR est 10 min à 95° C, 50 cycles de 10 sec à 95° C, 15 sec à 60° C et 20 sec à 72° C, suivi d'une courbe de dénaturation débutant avec 15 sec à 60° C jusqu'à 95° C en 20 min avec une lecture à chaque degré puis 15 sec à 95° C. Après amplification, les produits de réactions ont été analysés sur gel d'agarose 1 % afin de vérifier qu'un seul produit de bonne taille est obtenu. Les amorces utilisées pour l'ARNm *neo* (l'ARN épissé), *tet* (l'ARN non épissé) et pour l'ARNm de la *GAPD* (contrôle) sont présentées dans le tableau 6. Les analyses furent réalisées suivant la méthode Pfaffl dont la formule est représentée ici-bas (Pfaffl, 2001). Cette méthode prend en compte l'efficacité de PCR du gène cible et du gène de référence. Le ratio d'expression relative d'un gène cible entre un échantillon et un contrôle est calculé. L'efficacité de PCR pour notre gène est calculée à partir de la construction d'une courbe de calibration en utilisant la formule $E = 10^{[-1/\text{pente}]}$. Cette méthode donne une bonne estimation de l'efficacité.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{cible}})^{\Delta C_{\text{cible}}(\text{contrôle-échantillon})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{ref}}(\text{contrôle-échantillon})}}$$

Tableau 6. Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR.

Gène	Amorces	
	Sens	Antisens
<i>GAPD</i>	AATCCCATCACCATCTTCCAG	AAATGAGCCCCAGCCTTC
<i>NEO</i>	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	CTGCCTCGTCCTGAGTTCA
<i>TET</i>	GAATACATCTTCCCCGACCG	GAAACTTTGAGATGGCCTTGC

4.1 Courbes standards

Trois courbes standards ont été réalisées soit pour la *GAPD*, le transcrit épissé (*neo*) et le transcrit non épissé (*neo*^{TET}). Pour chaque paire d'amorces, une première amplification a été effectuée afin d'obtenir un amplicon correspondant. Ceux-ci fut ensuite dilués suivant 3 dilutions consécutives (1 : 100) dans l'eau, la dernière contenant de l'ARNt de levure (10 mg/ml). À partir de l'amplicon, plusieurs dilutions en série ont été effectuées afin d'obtenir 5 dilutions différentes (10^{-12} à 10^{-16}), ces dilutions sont réalisées dans l'ARNt de levure. Chaque courbe a été accomplie avec 3 séries de dilutions indépendantes analysées en duplicata afin d'obtenir une moyenne pour chaque point et une efficacité d'amplification supérieure à 95%. L'analyse des résultats pour les différents échantillons s'effectue à partir de l'équation de la courbe standard respective.

5. Synthèse d'ARN

Pour obtenir la matrice d'ADN, une PCR a été effectuée à partir d'oligonucléotides complémentaires en partie comportant le promoteur T7 ou T3. Les ARN ont été transcrits dans un volume total de 100 μ l contenant 20 U RNaseOUT (Invitrogen), 6,25 mM de chaque NTP, 80 mM HEPES-KOH pH 7.5, 24 mM MgCl₂, 2 mM spermidine, 40 mM DTT, 0.01 U de pyrophosphatase de levure (Roche Diagnostic) et 14 μ g d'ARN polymérase T7 ou T3 purifiée au laboratoire, le tout incubé à 37° C pour 1h30. Par la suite, 4 U de RQ1 RNase-Free DNase (Promega) ont été ajoutées à la réaction et remis à 37° C

pour 30 min afin de dégrader la matrice. Dans le but d'éliminer les protéines et les débris, une extraction au phénol/chloroforme suivi d'une précipitation à l'acétate de sodium/éthanol a été effectuée. L'ARN a ensuite été resuspendu dans 50 μ l d'eau, puis 50 μ l de tampon de chargement (95 % formamide, 10 mM EDTA, 0.025 % bleu de bromophénol et 0.025 % de xylène cyanol) sont ajoutés avant la migration sur gel d'acrylamide dénaturant 8 % (ratio 19:1 acrylamide: bisacrylamide, 7 M urée), dont la migration s'effectue dans un tampon Tris Borate EDTA (TBE) 1X (89 mM Tris Base, 89 mM acide borique, 2 mM EDTA). Les produits ont été visualisés par ombrage aux u.v. avant de découper les bandes et d'éluer durant la nuit dans une solution de 0.5 M ammonium acétate et 0.1 % SDS. L'ARN a ensuite été précipité à l'acétate de sodium/éthanol. Après un lavage dans l'éthanol 70 % et le séchage, les culots ont été resuspendus dans l'eau stérile et quantifiés avec le Nanovue spectrophotomètre (GE Healthcare).

6. Marquage en 5' de l'ARN

Pour commencer, 50 pmol d'ARN purifié ont été déphosphorylés dans un volume de 10 μ l contenant 5 U d'antarctique phosphatase (NEB) dans son tampon 1X (50 mM Bis-Tris-Propane-HCl (pH 6.0), 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂), pendant 30 min. L'enzyme est par la suite inactivée à 65° C pendant 5 min. Un volume de 1 μ l (5 pmol) de la réaction de déphosphorylation est ensuite radiomarké en 5' dans un volume final de 10 μ l contenant 3.2 pmol de [γ -³²P]ATP (6000 Ci/mmol; New England Nuclear), 3 U de T4 polynucléotide kinase (USB), 20 U RNaseOUT (Invitrogen) et 1X de tampon T4 PNK (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoéthanol), 1 h à 37° C. Les réactions ont été arrêtées par l'ajout de 20 μ l de tampon de chargement. Les ARN ont ensuite été purifiés sur gel d'acrylamide dénaturant 8 %. Les bandes ont été visualisées par autoradiographie, puis découpées, éluées et l'ARN a été précipité à l'éthanol avec 20 μ g de glycogène comme molécule porteuse pour la précipitation.

7. Extraits cellulaires et sérum

Des cellules HeLa ont été récoltées par digestion à la trypsine et centrifugées à $1000 \times g$ puis suspendues dans un tampon Net-2 (10 mM Tris-HCL (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 mM PMSF et un cocktail d'inhibiteur de protéases (CLAP 10 $\mu\text{g/ml}$: *chymotrypsin, leupeptin, aprotinin, pepstatin*) à une concentration de 1×10^7 cellules /ml. Après le traitement à la sonication (soniqué 4 fois pendant 20 sec (Branson Digital sonifier)), le surnageant a été recueilli par centrifugation à 13 000 RPM pendant 20 min à 4° C. Les extraits ont ensuite été concentrés à l'aide de colonne Amicon Ultra 5K (Millipore) suivant les instructions du fabricant, soit centrifugés entre 15 et 30 min à $4000 \times g$. Des extraits nucléaires (4.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ont été obtenus du laboratoire du Dr. Benoît Chabot. Des sérums de patients possédant les anticorps soit contre la protéine Ro en présence ou en absence de la protéine La ainsi qu'un sérum provenant d'une personne saine ont été obtenus de la banque du Dr. Gilles Boire.

8. Retard de migration d'ARN radiomarqué en gel natif (EMSA)

Afin de visualiser la liaison protéique aux ARN hY, des gels de retard de migration ont été effectués. Un extrait nucléaire (1 μl) ou un extrait protéique total de cellule HeLa (5 μl) est mis en présence de 2400 comptes par minute (CPM) d'ARN radiomarqué auxquels sont ajoutés 4 volumes de tampon Net-2 (150 mM NaCl, 0.05 % Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl pH 7.4) contenant 0.4 mg/ml d'ARNt de levure, 3.25 % d'alcool polyvinylique (Sigma) et 1 mM de dithiothréitol (DTT). Le mélange est incubé 15 min sur glace puis on y ajoute un volume de 40 % sucrose contenant 1 mg/ml d'héparine et 0.25 % de colorant xylène cyanol. Pour former un complexe de super rétention, 1 μl de sérum approprié est ajouté à l'échantillon après 5 min d'incubation puis l'incubation est continuée 10 min sur glace. La migration s'effectue sur un gel natif (10 cm X 10 cm X 1 mm) composé de 8 % polyacrylamide (acrylamide : bis-acrylamide; 80 :1) dans un tampon 50 mM glycine, 50 mM Tris à pH 8.8 et polymérisé à l'aide de 10 μl de persulfate d'ammonium (10 %) en présence de 0.6 μl de TEMED (N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine) pour chaque ml de

gel. L'électrophorèse est effectuée dans un tampon 50 mM glycine, 50 mM Tris à pH 8.8 à 150 V pour une durée d'environ 2 h sur un montage miniVE (Amersham Biosciences). À la fin de la migration, le gel est visualisé sur un écran PhosphorImager (Molecular Dynamics) à l'aide du Typhoon TRIO (GE Healthcare) et du programme ImageQuant, après une exposition d'une nuit à 4°C.

9. PCR quantitative en temps réel

Dix ng d'ADN génomique ont été utilisés dans une réaction PCR de 10 μ l utilisant le FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science) et le Corbett Research Rotor-Gene 3000. Le programme PCR est 10 min à 95°C, 50 cycles de 15 sec à 95°C, 30 sec à 60°C et 30 sec à 72°C, suivi d'une courbe de dénaturation de 15 sec à 95°C, 15 sec à 60°C jusqu'à 95°C en 20 min avec une lecture à chaque degré puis 15 sec à 95°C. De multiples ensembles d'amorces ont été testés pour l'amplification du gène *neo* afin de déterminer celles permettant la discrimination entre le plasmide (avec intron) et la séquence rétrotransposée (sans intron). Après amplification, les produits de réactions ont été analysés sur gel d'agarose 1 % afin de vérifier qu'un seul produit de bonne taille est obtenu. Les amorces utilisées pour le gène *neo* et pour le gène de la bêta-globine sont retrouvées dans le tableau 7. Toutes les amorces dessinées ont été vérifiées avec l'outil SciTools RealTime PCR sur le site de IDT pour les dimères d'amorces, les tiges boucles, le pourcentage en GC et la température de dénaturation. Les analyses ont toutes été faites avec le logiciel qBase (Hellemans et al., 2007).

Tableau 7. Séquences des amorces utilisées pour la qPCR.

Gène	Amorces	
	Sens	Antisens
<i>NEO</i>	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	CTGCCTCGTCCTGAGTTCA
<i>HBB</i>	GCTTCTGACACAACTGTGTTCAGTAC	CACCAACTTCATCCACGTTCCACC

9.1 Courbes standards

Des dilutions en série de l'ADN génomique de cellules HeLa non transfectées et des dilutions en série du plasmide contenant le gène *neo* (pcDNA3) en présence de 10 ng d'ADNg HeLa ont été utilisées pour établir les courbes standard bêta-globine et *neo*, respectivement. L'évaluation du nombre de copies de plasmide a été faite avec cette formule :

$$c = \left(n \times \frac{1 \text{ mole}}{6.023 \times 10^{23} \text{ molécules (pb)}} \times \frac{660 \text{g}}{1 \text{ mole}} \right) \times N$$

La concentration (c) du plasmide en g/ μ l représentant le nombre de copies voulu est calculée en multipliant ce nombre de copies (N) par la masse d'une molécule de plasmide. La masse d'une molécule de plasmide se calcule par la multiplication du nombre de paires de bases (n) avec le nombre d'Avogadro et le poids moléculaire d'une molécule d'ADN db (660 g/mole). La quantification relative des résultats a été accomplie à l'aide du logiciel qBase (Hellemans et al., 2007). Les résultats sont illustrés comme le nombre de copies *neo* des différentes constructions par rapport à la construction hY1 (hY1 = 1).

RÉSULTATS

Chapitre 1 Constructions et évaluation de l'essai de rétrotransposition L1

1. Identification d'une méthode permettant la quantification d'événement de rétrotransposition

Afin de quantifier l'efficacité de rétrotransposition des ARN hY, nous devons trouver une méthode permettant aux événements d'avoir lieu, mais aussi nous permettant de les quantifier. La technique utilisée est basée sur la rétrotransposition des éléments LINE-1, une construction comportant un gène rapporteur est à la base de l'essai. Ceci permet la détection de cellules ayant subi un événement de rétrotransposition et leur quantification.

1.1 Essai de rétrotransposition L1

Un seul vecteur d'expression est à la base de l'essai et comporte les éléments suivants : la séquence du rétrotransposon L1 sous le contrôle du promoteur CMV, suivi du gène de la résistance à la néomycine (*mneoI*) qui est retrouvé dans le sens opposé à la séquence de L1. Cette construction est représentée dans la figure 5A. Le gène *neo* est sous le contrôle du promoteur SV40 et est interrompu par un intron du gène de la gamma-globine flanqué de sites d'épissages, qui est dans le même sens que l'élément L1. Deux transcrits sont possibles : le premier découlant du promoteur CMV donnera un long transcrit comportant tous les éléments et le second provenant du promoteur SV40 pour le gène *mneoI*. Lorsque ce dernier est transcrit à partir du plasmide, le gène *neo* ne pourra pas être actif puisqu'il est interrompu par un intron inséré dans le sens opposé, ne permettant pas son épissage. Par contre, la transcription induite par le promoteur CMV permettra l'épissage de l'intron.

Seulement dans une situation où il y a rétrotransposition de cette séquence dans le génome, la séquence du gène *neo* réinsérée pourra être transcrite sans intron donnant un gène actif pour ainsi conférer aux cellules une résistance à la néomycine. Afin de révéler les colonies dont un événement de rétrotransposition a eu lieu, une sélection à la néomycine (G418) est réalisée suivant la transfection.

Nous avons utilisé cet essai quelque peu modifié en changeant le gène L1 pour un gène transcrit par la polymérase III (pol III). Ce protocole a été utilisé à plusieurs reprises afin d'étudier la rétrotransposition de l'élément Alu en cellules (Dewannieux et al., 2003; Khatua et al., 2010; Wallace et al., 2008). Quelques modifications furent apportées à la construction de départ : le gène de l'élément Alu est sous le contrôle de son propre promoteur pol III, l'intron auto-catalytique provient de *Tetrahymena thermophila* et une séquence polyT est ajoutée en tant que signal de terminaison de la transcription pol III. La figure 5B illustre la nouvelle construction pour l'étude de l'élément Alu ainsi que les étapes de réinsertion. Dans ce cas-ci, l'intron sera épissé automatiquement après la transcription et le transcrit pourra être pris en charge par les protéines L1. Dans le cas des transcrits pol III, il a été démontré qu'ils nécessitent seulement la protéine ORF2 pour qu'il y ait rétrotransposition (Wallace et al., 2008). Alors, nous devons ajouter un plasmide contenant le gène ORF2 de L1 au moment de la transfection. La sélection débute 24 h après la transfection pour une durée de 14 jours. Ensuite, nous procédons de la même façon pour détecter la quantité d'événements de rétrotransposition survenus, soit par coloration au cristal violet. Le déroulement de l'expérience est montré à la figure 5C.

1.2 Dénombrement de colonies

Cette approche se base sur la résistance à la néomycine conférée aux cellules par l'insertion du gène *neo* lors de la rétrotransposition de l'élément dans le génome. Nous effectuons une sélection à la G418 pour une période de 14 jours afin d'éliminer les cellules n'ayant pas subi de rétrotransposition et ainsi permettre aux cellules résistantes de former des colonies. Puis, un décompte du nombre de colonies est effectué afin d'avoir le nombre d'événements

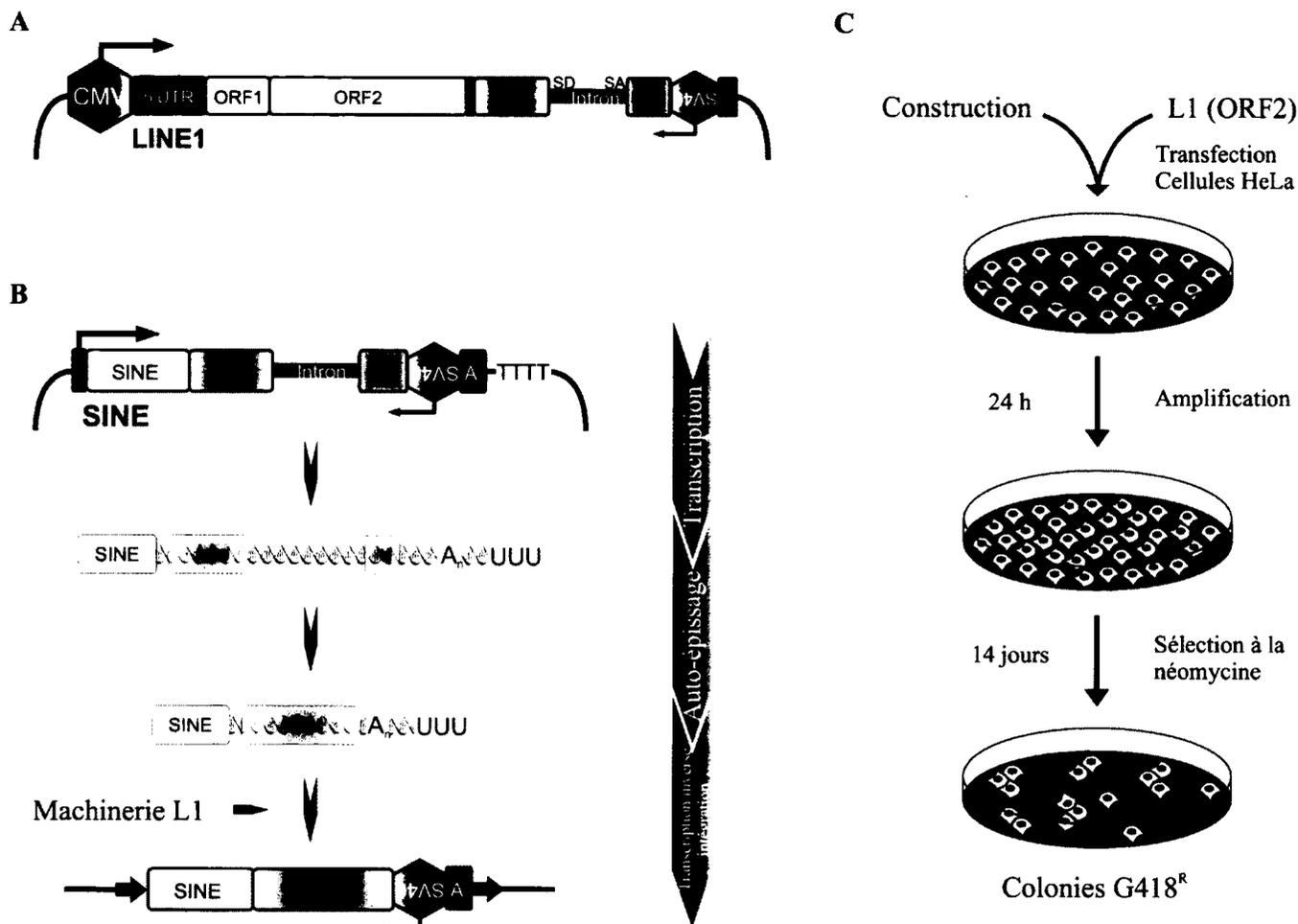


Figure 5 : Schéma représentant l'essai de rétrotransposition

(A) Représentation schématique de la construction utilisée pour l'essai de rétrotransposition L1 comportant l'élément L1 marqué d'une cassette *mneoI* dont le gène *neo* est positionné dans le sens opposé et rendu inactif par la présence d'un intron γ -globin. (B) Construction pour l'essai sur les SINEs (l'élément Alu et les ARN hY). Une cassette *neo*^{TET} correspondant au gène *neo* dans le sens opposé possédant son propre promoteur et interrompu par l'intron auto-catalytique de *Tetrahymena* (Tet), suit l'élément SINE. L'intron sera auto-épissé après une première transcription puis une réinsertion par la machinerie L1 permettra la transcription du gène *neo* actif et la détection d'événements de rétrotransposition. (C) Procédure expérimentale pour la détection d'événements de rétrotransposition par les SINEs induit par l'expression de L1. Des cellules HeLa sont co-transfectées avec la construction désirée et un vecteur exprimant la machinerie nécessaire L1. Vingt-quatre heures post-transfection, une sélection à la G418 permet la détection des événements après une période de 14 jours.

de rétrotransposition sur un nombre connu de cellules transfectées, si l'on admet une efficacité de transfection avoisinant 100 %.

2. Caractérisation des constructions

2.1 Constructions

Afin d'explorer le mécanisme de rétrotransposition des ARN hY, nous avons tout d'abord besoin de constructions comportant les gènes de ces ARN. Des plasmides contenant chaque gène hY incluant son promoteur, ainsi que l'étiquette *neo*^{TET} ont été obtenus de notre collaboratrice, le Dr Astrid Roy-Engel (Kroutter et al., 2009). Les ARN transcrits à partir de ces constructions sont illustrés dans la figure 6A, ainsi que l'ARN épissé après l'auto-épissage. Remarquez la taille de l'ARN hY par rapport au reste du transcrit. De plus, une construction contenant le gène Alu et son étiquette en tant que contrôle positif a été analysée afin de confirmer le bon fonctionnement de l'essai. D'autre part, un contrôle négatif a aussi été employé, soit une construction contenant le gène de la bêta-globine de lapin ainsi que l'étiquette *neo*^{TET}. Celui-ci n'est pas rétrotransposé par la machinerie de L1. Ces deux plasmides ont été obtenus du laboratoire du Dr. Thierry Heidmann (Dewannieux et al., 2003).

Afin d'analyser notre hypothèse suivant laquelle les protéines liées aux différents ARN hY interfèrent avec la rétrotransposition pouvant avoir lieu par le biais des protéines L1, la création de constructions contenant le gène du hY comportant des mutations spécifiques a été réalisée. Il est connu que la protéine Ro60 lie les ARN hY à un site très spécifique sur la tige des hY et que la cytosine 9 saillante est particulièrement importante (Perreault et al., 2005). Il a aussi été démontré que la liaison de Ro60 aux hY est nécessaire à leur exportation au cytoplasme (Rutjes et al., 2001). De plus, plusieurs autres protéines peuvent être liées aux hY dont PTB, hnRNP K et RoBP1 qui lient pour la plupart une séquence

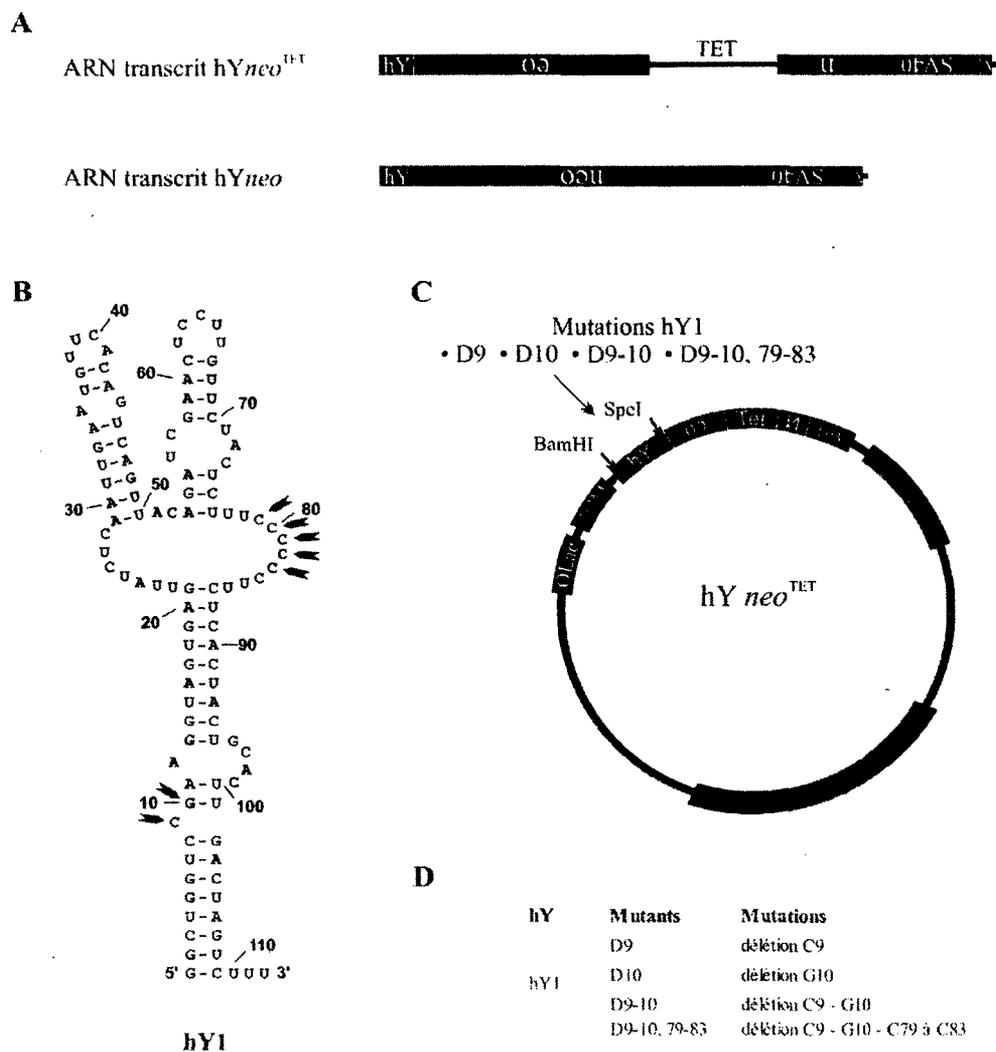


Figure 6 : Constructions hY1 neo^{TET} mutants

(A) ARN transcrit à partir des constructions hY neo^{TET} et transcrit épissé obtenu. (B) Structure secondaire et séquence de l'ARN hY1. Les sites des mutations analysés sont représentés par les flèches noires (\blacktriangleright). (C) Le plasmide hY1 neo^{TET} illustrant les sites de restriction utilisés afin d'obtenir les constructions hY1 mutantes se situe à droite de la figure. (D) Le tableau détaille les mutations spécifiques identifiées sur le schéma.

riche en pyrimidines sur hY1 et hY3 qui se situe dans la boucle 2 de l'ARN. En se basant sur les observations de Jonathan Perreault sur les pseudogènes retrouvés dans le génome humain, des mutations pouvant affecter la liaison de ces protéines à l'ARN ont été introduites pour vérifier leur effet sur la rétrotransposition (Perreault et al., 2005). Puisque plus de 80 % des pseudogènes possédaient des mutations ponctuelles à la cytosine 9 et à la guanine 10, des constructions ayant des mutations délétères soit de la cytosine 9 et/ou de la guanine 10 (D9, D10, D9-10) de l'ARN hY1 ont été produites. Jonathan Perreault a aussi observé des mutations ponctuelles fréquentes dans la boucle de poly pyrimidines de hY1, ce qui pourrait entraîner l'altération de la liaison pour certaines protéines. Dans ce cas-ci, une construction, dont une partie de la boucle de poly-pyrimidines de l'ARN hY1 est délétée (D9-10, 79-83), a aussi été produite. Tous les mutants décrits ci-dessus sont illustrés dans les figures 6B à 6D.

2.2 Expression des ARN

Afin de vérifier la stabilité des transcrits produits par nos constructions, l'expression de l'ARN en cellule a été analysée. De plus, il fallait vérifier si nous obtenions pour les constructions hY1 neo^{TET} et ses mutants (D9, D10, D9-10, D9-10 79-83) des quantités semblables d'ARN puisqu'elles possèdent le même promoteur. Pour ceci, la transfection de chaque construction en absence de la machinerie L1 dans des cellules HeLa a été faite et après 48 h, l'extraction de l'ARN total a été effectuée. Ensuite, les ARN ont été analysés par buvardage northern et par RT-qPCR.

2.2.1 Buvardage de northern

L'expression des différents ARN en cellules a été analysée par la migration sur gel d'agarose d'un extrait d'ARN total de chacune des transfactions suivi de leur transfert sur membrane de nylon. Les ARN ont été recueillis 48 h après la transfection, car il a été démontré que le niveau du gène y exprimé à son plus haut niveau et diminuait suivant cette

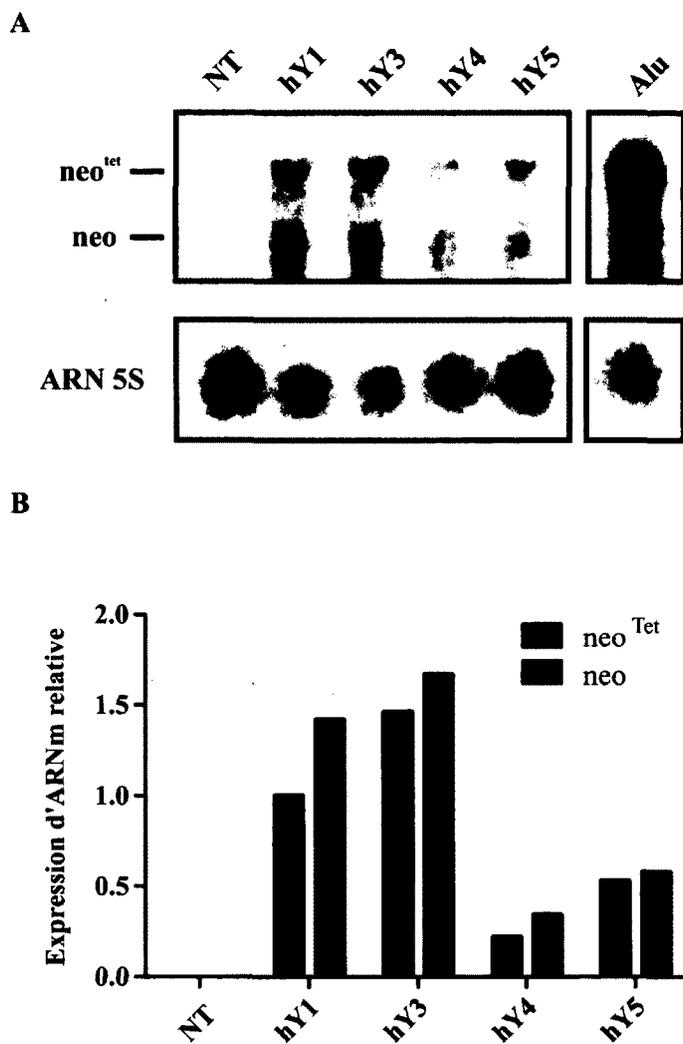


Figure 7 : Buvarpage northern des transcrits hY neo^{TET} et Alu

(A) Buvarpage northern à partir d'extraits d'ARN totaux de cellules HeLa transfectées avec les constructions neo^{TET} , migrés sur un gel d'agarose 1%. Les ARN hY neo^{TET} et Alu ont été détectés par une sonde ciblant la partie 3' de la séquence neo, permettant la détection des transcrits épissés et non-épissés. L'ARN 5S a été utilisé afin de normaliser la quantité d'ARN appliquée dans le gel. Les résultats représentent une expérience. (B) Représentation graphique des niveaux d'expression des transcrits neo^{TET} et neo pour chaque ARN (hYs) normalisés sur l'expression de l'ARN 5S et rapportés sur l'expression de l'ARN hY1 neo^{TET} .

période (Krouter et al., 2009). Une sonde contre la partie 3' de l'ARN *neo* nous a permis de détecter le transcrit long non épissé (neo^{TET}) et le transcrit court épissé (*neo*). La figure 7A illustre les résultats obtenus du buvardage northern pour les différents transcrits hY et celui de Alu. Ici, le niveau d'expression des transcrits Alu est beaucoup plus élevé que ceux des différents hY, ce qui peut s'expliquer par la présence de différents promoteurs. Le promoteur du gène de l'élément Alu est le même que celui du gène de l'ARN 7SL, qui est reconnu pour être un promoteur très fort. De plus, la construction Alu neo^{TET} utilisée possède une séquence amplificatrice en amont du gène ce qui accroît encore plus la transcription. Pour ce qui est des transcrits hY, leur expression est considérablement plus faible. Cette différence d'expression des ARN peut être reflétée dans le taux de rétrotransposition survenant dans les cellules. Leurs ratios, calculés à partir du buvardage northern et normalisés avec l'expression de l'ARN 5S, se retrouvent dans le graphique à la figure 7B. Ceux-ci ont été calculés par rapport à l'ARN neo^{TET} de hY1. Dans la littérature il est reconnu que, dans la majorité des types cellulaires, l'ARN hY3 serait le plus abondant, suivi de l'ARN hY1 puis de l'ARN hY4 et hY5 (Christov et al., 2008). Nos observations corroborent suivant le fait que hY3 est le plus transcrit, suivi de hY1. Par contre, nous observons que l'ARN hY5 serait plus faiblement transcrit que l'ARN hY4, mais cet écart est plutôt mince. Lorsqu'on regarde le ratio d'expression des deux transcrits, soit celui non épissé (neo^{TET}) et celui épissé (*neo*), nous pouvons remarquer une quantité un peu plus élevée du transcrit épissé (*neo*) pour tous les hY. Ceci permet de conclure que l'épissage de l'intron auto-catalytique se fait efficacement et que l'ARN est disponible pour la machinerie de L1. Les expériences de buvardage northern étant plutôt difficiles à effectuer avec ces ARN peu abondants, ne peuvent être prises avec beaucoup d'assurance. Des analyses par RT-qPCR ont donc été entreprises afin d'appuyer ces conclusions.

La vérification de l'expression des mutants hY1 en comparaison avec hY1 non-muté a aussi été réalisée, afin de s'assurer que ces différentes constructions produisaient des niveaux d'ARN semblables en cellule. La figure 8A représente les résultats de buvardage northern pour les différents mutants hY1 en comparaison avec hY1. Les ratios d'expression illustrés en 8B ont été calculés en premier lieu par la normalisation avec l'ARN de la cyclophiline, puis en rapportant les valeurs recueillies sur celle de l'ARN hY1 non-muté.

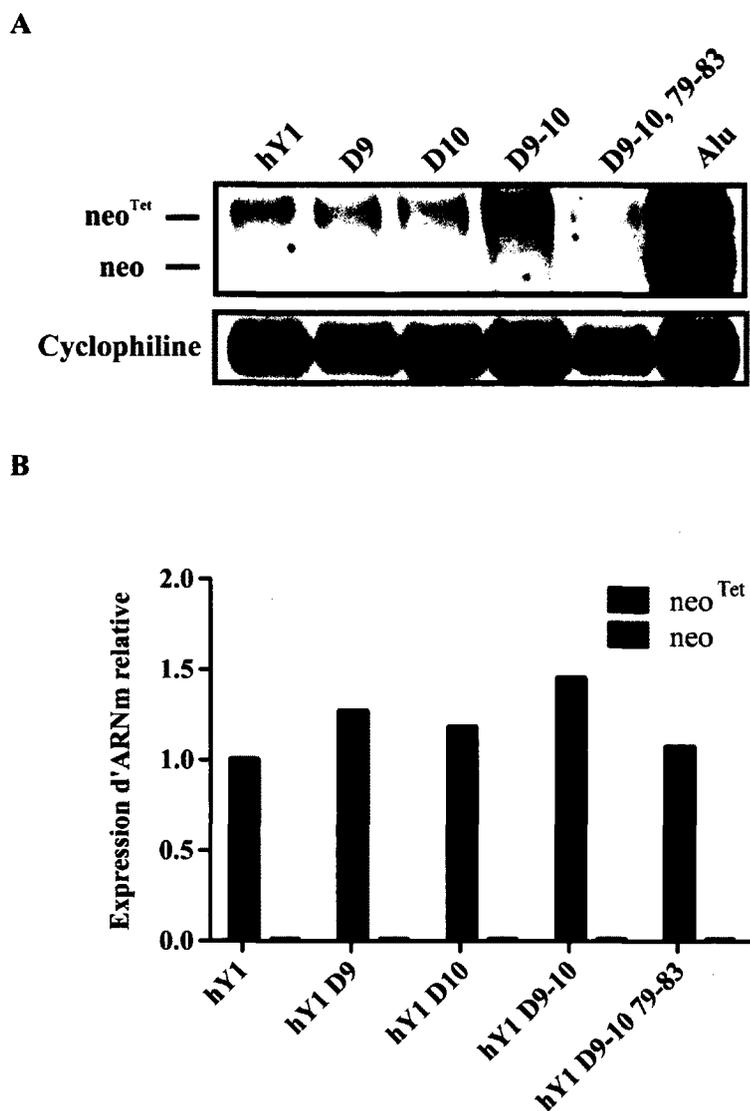


Figure 8 : Buvarbage northern du transcrit hY1neo^{TET} et de ses mutants

(A) Buvarbage northern à partir d'extraits d'ARN totaux de cellules HeLa transfectées avec les constructions neo^{TET}, dont les ARNm ont été purifiés et migré sur un gel d'agarose 1%. L'ARN hY1neo^{TET} et ses mutants ont été détectés par une sonde contre la partie 3' de la séquence neo, permettant la détection des transcrits épissés et non-épissés. L'ARN de la cyclophiline a été utilisé à des fins de normalisation. Les résultats représentent une expérience. (B) Représentation graphique des niveaux d'expression des transcrits neo^{TET} et neo pour chaque ARN (hY1 et ses mutants) normalisés sur l'expression de la cyclophiline et rapportés sur l'expression de l'ARN hY1neo^{TET}.

On remarque des niveaux d'ARN très semblables pour les mutants hY1 et hY1 non-muté, ce qui nous indique que l'expression de ces constructions est relativement semblable en cellule. Par contre, ici on peut voir que l'épissage du transcrit semble beaucoup plus faible, ce qui pourrait être dû à la méthode de préparation des ARN qui diffère de celle utilisée ultérieurement. Lors de la préparation des ARN, une étape de purification des ARNm a aussi été faite. Cette étape supplémentaire pourrait avoir diminué la quantité d'ARN de nos échantillons et conséquemment mener à la perte de la détection des ARN épissés par rapport au bruit de fond. Alternativement, ceci peut résulter d'une faible expression des ARN.

2.2.2 RT-qPCR

Puisque l'analyse par buvardage northern était plus fastidieuse à exécuter et moins précise pour des ARN faiblement exprimés, nous voulions utiliser une technique plus sensible et plus rapide. L'usage de la RT-qPCR a donc été exploité. Premièrement, par le biais d'une transcription inverse, nous avons produit de l'ADN complémentaire (ADNc) pour chaque extrait d'ARN total. Ceux-ci provenaient de transfections du même genre que celles effectuées pour les buvardages northern. Puis, une réaction de qPCR sur ces ADNc à l'aide de 3 paires d'amorces différentes soit pour la *GAPD*, le transcrit *neo*^{TET} (non-épissé) ou le transcrit *neo* (épissé) ont été employées. Les amorces utilisées sont représentées schématiquement dans la figure 9A. Les valeurs obtenues pour l'ARNm de la *GAPD* nous permettent de normaliser celles obtenues pour nos transcrits cibles. Celui-ci est couramment utilisé à cette fin lors d'analyse d'ARNm. Dans le but de différencier les transcrits possédant l'intron et ceux sans intron, deux paires d'amorces ciblant des séquences spécifiques ont été dessinées. Les amorces pour le transcrit *neo* ont été dessinées de façon à ce qu'elles chevauchent les deux exons. Ceci empêche l'amplification du transcrit possédant encore l'intron. Les amorces pour le transcrit *neo*^{TET} amplifient une séquence de 144 nt au centre de l'intron. Pour ce qui est des amorces pour la *GAPD*, celles-ci ont été conçues pour discriminer le transcrit épissé du pré-ARNm.

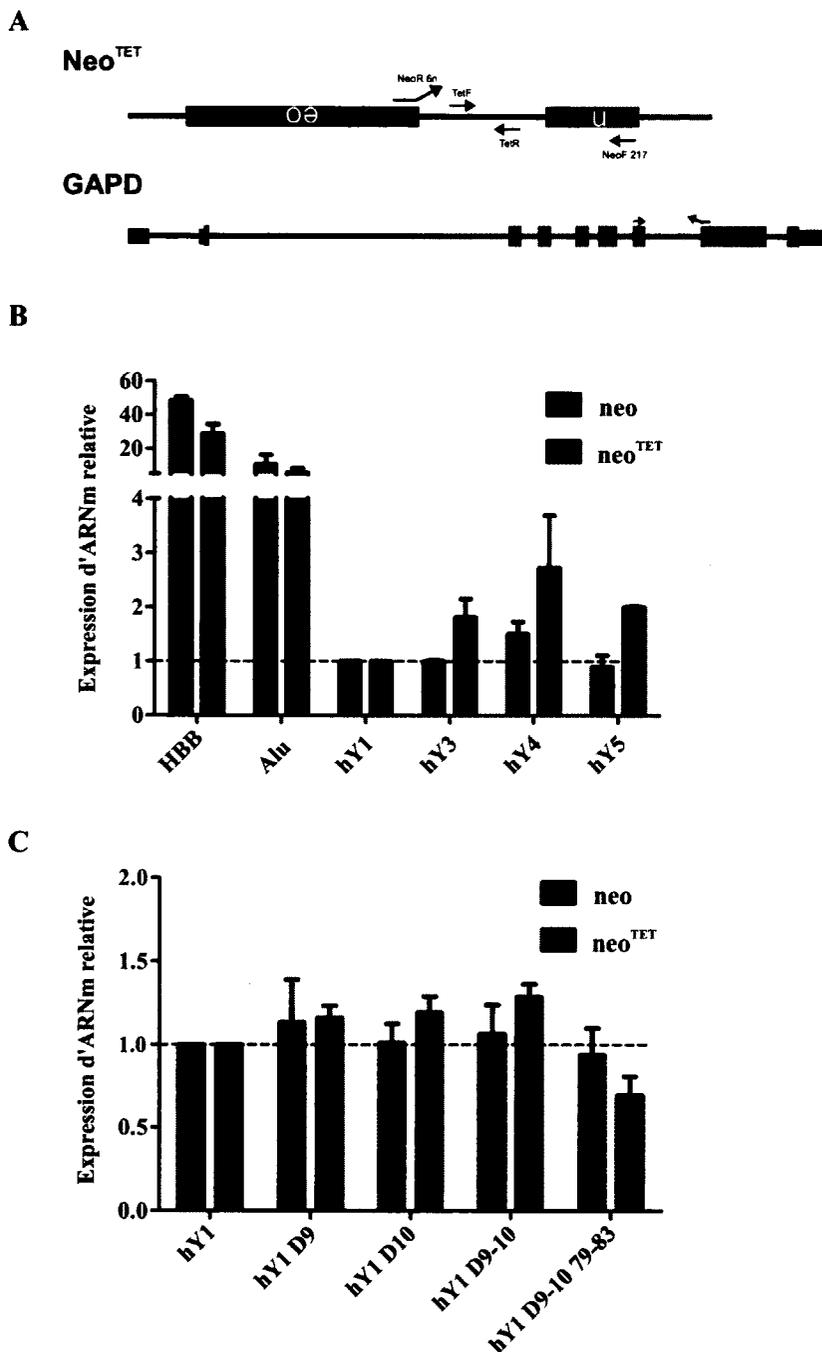


Figure 9 : RT-qPCR des transcrits hY neo^{TET} et des mutants hY1

(A) Représentation de l'ARNm neo^{TET} et $GAPD$ ainsi que la position des amorces utilisées pour les différents transcrits durant la RT-qPCR. (B) Représentation graphique des niveaux d'expression obtenus par analyse RT-qPCR des transcrits neo^{TET} et neo pour les ARN HBB, Alu et hYs. Les niveaux d'ARN ont été normalisés à l'ARNm de la $GAPD$ et rapportés sur l'expression de l'ARN correspondant (neo et neo^{TET}) hY1. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences indépendantes. (C) Représentation graphique des niveaux d'expression obtenus par analyse RT-qPCR des transcrits neo^{TET} et neo pour les ARN hY1 et ses mutants. La même analyse a été appliquée pour ces ARN.

La figure 9B représente les résultats obtenus des analyses RT-qPCR pour l'expression de l'ARNm des transcrits *neo*^{TET} (non-épissé) et *neo* (épissé) pour les constructions HBB, Alu et les hYs. L'expression des ARNm est normalisée à l'expression de la *GAPD* et relativisée à celle de leur transcrit respectif soit *neo*^{TET} ou *neo* hY1. Le gène *HBB* sous le contrôle du promoteur pol II CMV, reconnu pour être un promoteur fort, est le plus exprimé en comparaison avec les transcrits hY1. L'obtention d'un nombre extrêmement faible de rétrotransposition nous permet de dire que celui-ci est un bon contrôle négatif, puisque la machinerie de L1 ne permet pas la prise en charge de n'importe quel ARNm.

Pour ce qui est de l'expression de l'ARN Alu, utilisé en tant que contrôle positif, on observe aussi une forte expression, qui concorde bien avec son efficacité de rétrotransposition. La forte expression est attendue puisqu'une séquence *enhancer* est retrouvée en amont du gène. En ce qui concerne les ARN hY, ceux-ci sont considérablement moins exprimés, ce qui est reconnu dans la littérature. Ces résultats ne concordent pas vraiment avec ceux obtenus par buvardage northern. Par contre, la sensibilité beaucoup plus accrue de cette technique, la RT-qPCR, nous amène à croire que ceux-ci sont plus valables. De plus, les transcrits épissés sont en quantité relativement semblable. Donc les niveaux de rétrotransposition devraient eux aussi être semblables.

Une analyse par RT-qPCR comparant les niveaux d'expression des constructions hY1 mutants avec celui de hY1 non-muté a aussi été réalisée, afin de s'assurer qu'ils avaient une expression similaire puisqu'ils ont tous le même promoteur. Le tout est illustré dans la figure 9C. De la même façon, l'expression des ARNm est normalisée à l'expression de la *GAPD* et relativisée à celle de leur transcrit respectif soit *neo*^{TET} ou *neo* hY1. Les résultats recueillis indiquent que les constructions hY1 sont toutes exprimées de façon comparable. Par conséquent, les différences dans les niveaux de rétrotransposition ne seraient pas causées par une expression inégale. Ceci est vrai pour les deux transcrits, primordialement pour le transcrit épissé (*neo*), puisque celui-ci est utilisé par la machinerie L1 pour la rétrotransposition.

D'autre part, lorsque les niveaux des transcrits sont tous rapportés à celui de hY1 *neo*, on dénote une présence du transcrit *neo*^{TET} beaucoup plus grande. Les ratios pour les ARN hY sont présentés à la figure 10. Les transcrits *neo*^{TET} des ARN hY1 et hY1 mutants sont comparables entre eux, mais sont 6 fois plus présents que leur transcrit *neo*. Il semble que peu importe l'expression du transcrit primaire, le taux d'épissage est relatif afin d'avoir un certain niveau d'ARN épissé, puisque dans notre cas ceux-ci sont tous ressemblants.

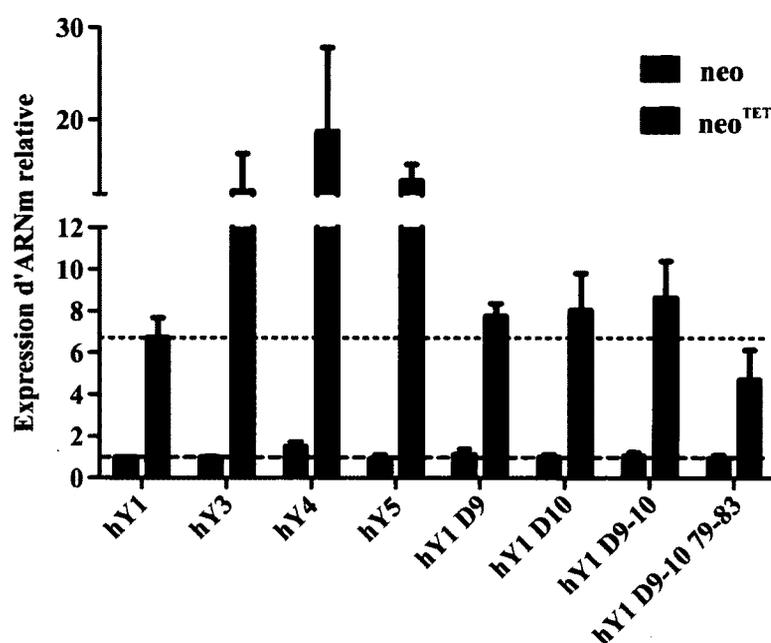


Figure 10 : Expression relative du transcrit neo^{TET} par rapport à neo pour chaque construction hY et hY1 mutants

Représentation graphique des niveaux d'expression obtenus par analyse RT-qPCR des transcrits neo^{TET} et neo pour les ARN hY et les mutants hY1. Les niveaux d'ARN ont été normalisés à l'ARNm de la *GAPD* et rapportés sur l'expression de l'ARN hY1 neo . Les résultats représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.

3. Analyse des constructions avec l'essai de rétrotransposition

L'essai de rétrotransposition fut testé, afin de valider son fonctionnement, avec la construction Alu *neo*^{TET}, un élément reconnu pour son niveau de rétrotransposition élevé. Par la suite, les constructions décrites précédemment ont été analysées par rapport à Alu afin d'apporter une réponse à notre hypothèse de départ. Cette dernière étant que la liaison des protéines sur les ARN hY interfère dans le mécanisme de rétrotransposition pouvant avoir lieu avec les protéines de L1.

3.1 La rétrotransposition de l'élément Alu et de HBB

Au départ, il fallait s'assurer que l'essai fonctionnait. Alors, ceci a été vérifié avec la construction comportant l'élément Alu. Il est bien connu que cet élément est rétrotransposé par la machinerie L1 à un niveau très élevé et qu'on retrouve plus d'un million de copies dans le génome humain. Afin de s'assurer que nous observions réellement des événements de rétrotransposition, un contrôle négatif représentant un gène commun a aussi été utilisé. Le gène en question est celui de la bêta-globine, interrompu par la cassette *neo*^{TET}, sous le contrôle d'un promoteur pol II (HBB *neo*^{TET}). Un second contrôle négatif, soit la construction Alu *neo*^{TET} sans la machinerie L1 co-transfectée, a aussi été employé afin de veiller à ce que l'effet soit dû à la présence des protéines L1. Brièvement, des cellules HeLa ont été co-transfectées avec la construction voulue et la machinerie des L1. Il a été démontré que seule la protéine ORF2, ayant une activité transcriptase inverse et endonucléase, était nécessaire à ce qu'il y ait rétrotransposition de plusieurs transcrits pol III (Kroutter et al., 2009). Donc, la construction portant seulement le gène de la protéine ORF2 a été utilisée. Vingt-quatre heures suivant la transfection, la sélection à la G418 a débuté pour se terminer 14 jours plus tard. Les colonies G418 résistantes, donc ayant subi un événement de rétrotransposition, ont été colorées au cristal violet afin de faire leur dénombrement. Le nombre de colonies résistantes a été calculé par rapport au nombre de cellules transfectées, soit 1×10^6 cellules. Les résultats obtenus pour les constructions Alu, avec et sans machinerie L1, et HBB sont représentés dans la figure 11. Un taux de

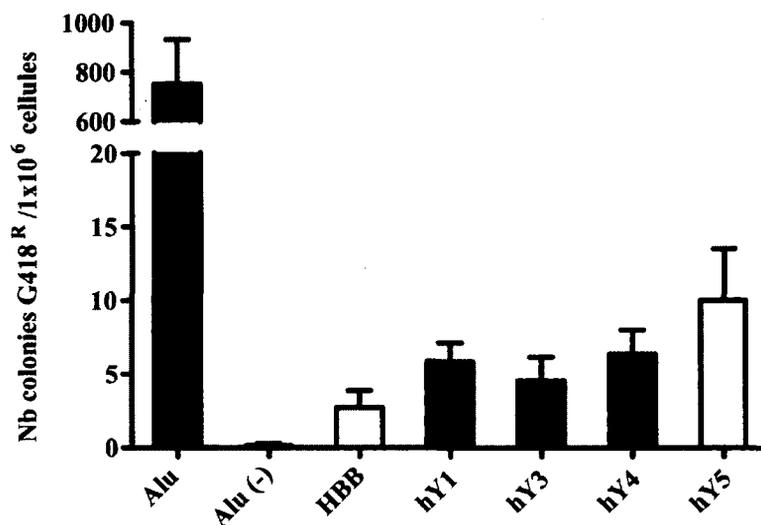


Figure 11 : Rétrotransposition de l'élément Alu et des ARN hY

Nombre d'événements de rétrotransposition représenté par le nombre de colonies de cellules résistantes à la G418. Les résultats regroupent 10 différents essais. Un million de cellules HeLa ont été transfectées avec 3 μg de plasmide *neo*^{TET} (Alu, HBB et hYs) et 1 μg de plasmide pBud-ORF2opt et sélectionnées pendant 14 jours à la G418.

rétrotransposition très élevé pour notre contrôle positif l'élément Alu a été noté, soit près de 800 colonies par million de cellules transfectées. Ce qui concorde avec les données publiées dans la littérature sur cet élément (Dewannieux et al., 2003; Krutter et al., 2009). De plus, les deux contrôles négatifs ne permettent pas, ou presque pas l'occurrence d'événements de rétrotransposition. Ceci justifie l'usage de l'essai de rétrotransposition L1 pour l'analyse de l'élément Alu.

3.2 La rétrotransposition des ARN hY et des mutants hY1

À présent, il nous fallait confirmer la fonctionnalité de l'essai pour les quatre constructions hY neo^{TET} . Le même protocole a été suivi pour ainsi obtenir les résultats que l'on retrouve dans la figure 12. D'ailleurs, seulement la protéine ORF2 a été utilisée dans ces essais puisque l'ajout de la protéine ORF1 n'affectait pas les niveaux de rétrotransposition (résultats non montrés). Le nombre de colonies résistantes au G418 obtenu à partir de 1×10^6 cellules transfectées pour les constructions hY neo^{TET} est très faible. Aucun des résultats recueillis n'est significativement plus élevé que la valeur du contrôle HBB neo^{TET} . Puisque cet essai avait déjà été testé avec les constructions hY neo^{TET} par un autre groupe et qu'il parvenait à avoir des valeurs raisonnables (Krutter et al., 2009), nous voulions continuer notre analyse avec les constructions hY1 neo^{TET} mutants. Quatre constructions hY1 neo^{TET} possédant des mutations dans la séquence du hY ont été faites. Les mutations affectent soit la liaison de la protéine Ro60 à la tige boucle ou la liaison de protéines à la boucle de poly-pyrimidine de l'ARN. Les différents mutants ont été décrits dans la figure 6, précédemment. Il n'y a aucune différence significative entre les valeurs obtenues pour les constructions hY1 mutantes et celle de hY1 non-muté. Les résultats de rétrotransposition de l'ARN hY1 en comparaison avec ses mutants sont présentés dans la figure 12. Dans ce cas-ci, les mutations effectuées aux sites de liaison de protéines à l'ARN Y ne favoriseraient pas la prise en charge de l'ARN par la machinerie des L1.

Ceci dit, puisque le nombre d'événements de rétrotransposition se produisant à partir des ARN hY est très faible, il a été conclu que la méthode de détection utilisée n'était pas assez

sensible. D'ailleurs, cette méthode comporte plusieurs désavantages : elle est premièrement très longue, durant plus de 2 semaines, et elle n'est pas adaptée aux ARN à bas niveau de rétrotransposition comme les ARN hY. Les ARN hY ont des niveaux d'expression très faible en comparaison avec l'ARN Alu. On ne peut donc pas espérer avoir la même fréquence d'événements de rétrotransposition en cellule. Puisque le nombre d'événements est très bas, il est très compliqué d'arriver à une conclusion en comparant les différents mutants avec la construction non-mutée. De plus, beaucoup d'éléments peuvent apporter une grande variation entre les multiples essais; rapportés sur une quantité d'événements très bas, ceci empêche de confirmer notre hypothèse. D'autre part, on ne peut compter les événements survenus dans la même cellule, ce qui pourrait biaiser le nombre réel d'événements de rétrotransposition pour un ARN donné. Cette méthode est très répandue dans le domaine scientifique des éléments mobiles. Cependant, elle ne semble pas convenir pour ce type d'analyse. Alors, nous devons trouver une autre technique plus précise, permettant de détecter des niveaux très bas de rétrotransposition, de façon spécifique.

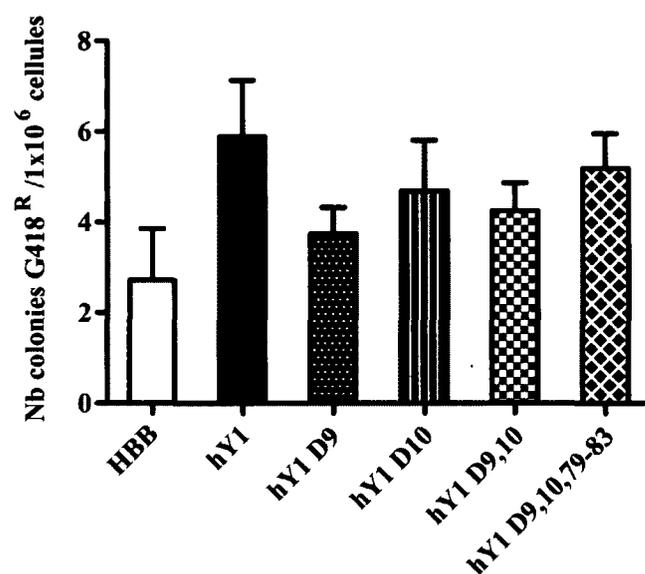


Figure 12 : Rétrotransposition de l'ARN hY1 et de ses mutants

Nombre d'événements de rétrotransposition représenté par le nombre de colonies de cellules résistantes à la G418. Les résultats regroupent 8 différents essais. Des cellules HeLa (1×10^6) ont été transfectées avec 3 μg de plasmide *neo*^{TET} (hY1 et ses mutants) et 1 μg de plasmide pBud-ORF2opt et sélectionnées pendant 14 jours à la G418.

Chapitre 2 Nouvelle méthode de détection

1. Approche par qPCR

Une nouvelle stratégie a été développée et a paru dans la revue « *Experimental cell research* » à l'été 2010. Les auteurs ont comparé trois techniques différentes afin d'analyser le niveau de rétrotransposition de L1 dans une lignée de neuroblastome, dont la PCR quantitative en temps réel (qPCR) sur l'ADN génomique (ADNg) (Del Re et al., 2010). Ils ont dénombré les événements de rétrotransposition par l'amplification du gène EGFP nouvellement inséré dans le génome. Le même type de construction que la nôtre est utilisé pour cette approche et ils utilisent comme stratégie la présence de l'intron au centre de leur gène de référence, afin de discriminer entre le plasmide et les nouvelles insertions dans l'ADN génomique. Dans ce cas-ci, l'intron provient de la gamma-globine et fait 901 pb en longueur. Cependant, il n'est pas suggéré d'amplifier un fragment aussi long en qPCR (Del Re et al., 2010). En conséquence, la qPCR n'amplifie que les nouvelles insertions. Pour ce qui est de nos constructions, celles-ci contiennent un intron autocatalytique de seulement 414 pb et un fragment de cette taille peut être amplifié par qPCR. Conséquemment, une optimisation afin de trouver les bonnes amorces était nécessaire et a été effectuée.

1.1 Optimisation de la technique par qPCR

Puisque cette technique a été utilisée par un groupe travaillant sur L1, un transcrit pol II, nous devons faire quelques modifications afin de l'appliquer à nos propres constructions, des transcrits pol III. Le principal défi était de trouver une façon de discriminer entre le plasmide, pouvant être extrait avec la méthodologie utilisée, et la nouvelle insertion dans le génome.

1.1.1 Design des amorces

De multiples paires d'amorces ont été testées afin d'obtenir une paire apte à discriminer entre la séquence du plasmide et celle de la nouvelle insertion. Au départ, nous avons vérifié la possibilité que la longueur de l'intron du plasmide puisse interférer dans l'amplification du fragment puisqu'il est recommandé de ne pas amplifier des fragments de plus de 300 pb avec la qPCR (Del Re et al., 2010). Alors, trois premières paires d'amorces ont été essayées, exploitant cette propriété du qPCR. Celles-ci sont représentées dans la figure 13 et leurs séquences se retrouvent dans le tableau 8. Les amorces font des fragments de 127 nt, 217 nt et 291 nt sans intron et avec intron 541 nt, 631 nt et 705 nt respectivement. Une réaction qPCR a été faite pour vérifier la spécificité des amorces : celles-ci ont été mises en présence soit du plasmide pcDNA3, ayant le gène *neo* ne contenant pas l'intron ou pAlu-*neo*^{TET}, celui-ci contenant l'intron, ainsi que 50 ng d'ADNg de cellules non transfectées. Ce premier design d'amorce n'a pas fonctionné. Nous avons obtenu une amplification des fragments ne contenant pas l'intron aussi bien que les fragments avec intron, comme on peut le voir dans la figure 14A. Alors, un deuxième principe a été appliqué, soit celui de faire des amorces qui chevauchent les deux exons (Brosseau et al., 2010). La figure 13 illustre ce principe. Un minimum de 2 nt et un maximum de 6 nt saillant en 3' ont été essayés afin d'avoir une bonne spécificité et permettre de discriminer entre le plasmide et la nouvelle insertion dans le génome. Ces amorces ont été utilisées avec l'amorce sens 217. Les résultats de l'amplification avec ces amorces sont illustrés à la figure 14B. Aucune de ces paires d'amorces n'amplifiaient un fragment spécifique à partir du plasmide pAlu-*neo*^{TET}. La paire d'amorces donnant les meilleurs résultats, dont un produit spécifique de la bonne longueur et une bonne sensibilité lors de l'amplification, est Neo Fwd217-NeoR qPCR 6n.

Tableau 8. Séquences des amorces utilisées pour l'optimisation de la qPCR.

Amorces sens Séquence	Amorces antisens Séquence	Fragment (nt)	
		sans intron	avec intron
Neo Fwd127 GCCCCGGTTCTTTTTGTCAAG	Neo Rev127 TTCAGTGACAACGTCGAGC	127	541
Neo Fwd217 CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	Neo Rev217 TTCAGTGACAACGTCGAGC	217	631
Neo Fwd291 GCTATTCGGCTATGACTGGG	Neo Rev291 GATGGATACTTTCTCGGCAGG	291	705
	NeoR qPCR 6n CTGCCTCGTCCTGAGTTCA	152	566
	NeoR qPCR 5n CTGCCTCGTCCTGAGTTC	152	566
Neo Fwd217 CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	NeoR qPCR 4n GCTGCCTCGTCCTGAGTT	153	567
	NeoR qPCR 3n CGCTGCCTCGTCCTGAGT	154	568
	NeoR qPCR 2n GCGCTGCCTCGTCCTGAG	155	569

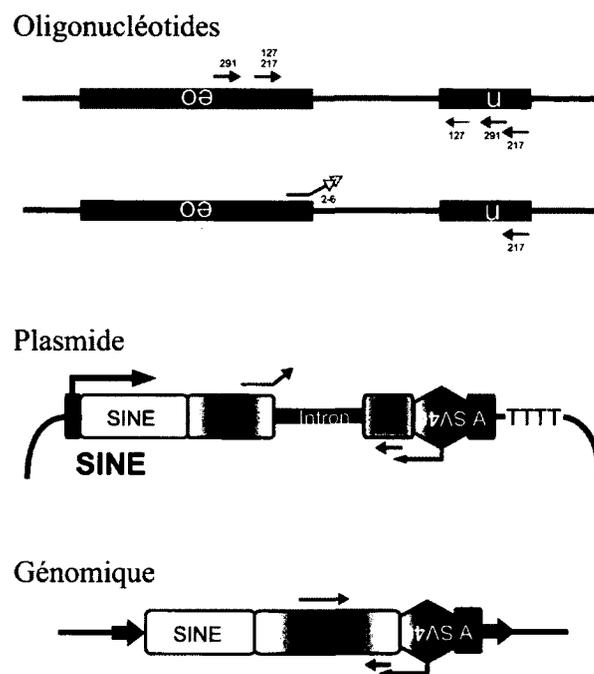


Figure 13 : Amorces pour la détection d'événements de rétrotransposition par qPCR

Représentation schématique du positionnement des amorces utilisées pour la qPCR sur l'ADN plasmidique et génomique.

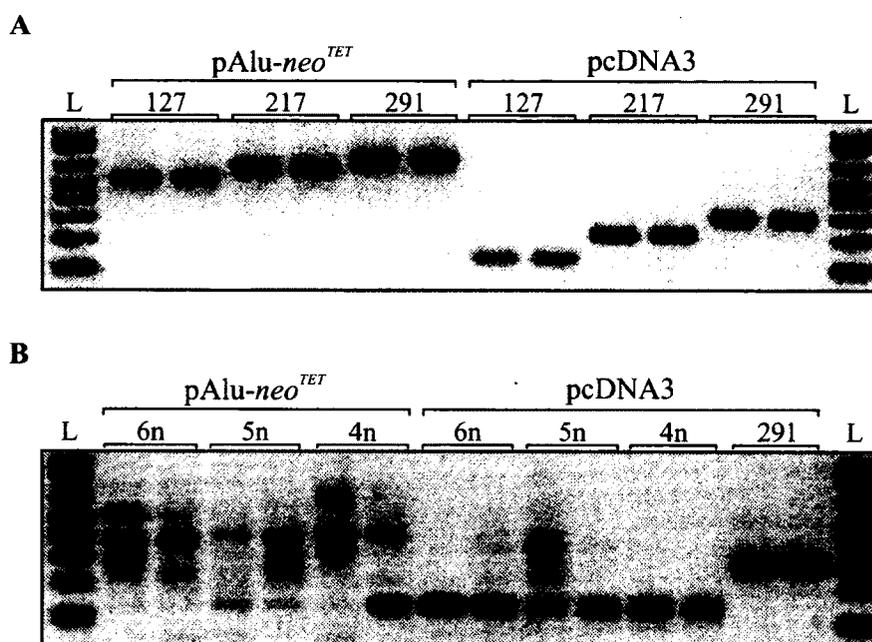


Figure 14 : Optimisation des amorces pour la qPCR

Produits d'amplification de la qPCR pour les différentes amorces vérifiées, migrés sur gel d'agarose 1%. Les amorces ont été testées avec le plasmide pAlu-*neo*^{TET} (neo avec intron) et pcDNA3 (neo sans intron). (A) Résultats des premières paires d'amorces 127, 217 et 291. (B) Résultats de la deuxième stratégie d'amplification soit avec les d'amorces 2n à 6n antisens utilisées avec l'amorce 217 sens.

1.1.2 Courbes standards

Pour les analyses par qPCR, nous devions faire deux courbes standard, soit une pour déterminer la quantité de transcrit *neo* retrouvée dans le génome après l'essai et une sur un gène de référence afin de normaliser les résultats obtenus pour *neo*. Celles-ci servent à établir l'efficacité de l'amplification qui correspond à la valeur de « E » soit à la pente de l'équation. La courbe standard *neo* est faite à partir de dilutions en série d'un plasmide contenant le gène *neo* sans intron (pcDNA3) avec les amorces optimisées précédemment. Le nombre de copies est calculé avec la formule décrite plus tôt, de manière à savoir la quantité de plasmide nécessaire pour une courbe standard à cinq points. Les réactions qPCR contiennent les différentes concentrations de plasmide pcDNA3, 10 ng d'ADNg de cellules HeLa non transfectées afin d'avoir le même bruit de fond que les échantillons, 1 μ M des amorces et 1x FastStart Universal SYBR Green Master (Rox). La figure 15A contient les résultats bruts des courbes de fluorescence obtenues pour chaque dilution. Une courbe de dissociation est effectuée à la fin des cycles d'amplification afin de vérifier la spécificité par la présence d'un seul amplicon comme le démontre la figure 15B. Une courbe spécifique est obtenue pour chaque produit amplifié, ce qui apporte un appui à la spécificité de la technique. Puis, la courbe standard est présentée à la figure 15C, incluant le coefficient de corrélation (R), la moyenne des pentes (M), l'efficacité d'amplification, ainsi que l'équation de la courbe. Le R obtenu est très près de 1 indiquant une très forte corrélation entre les deux variables. La M de -3,49 Ct nous permet d'avoir une efficacité de 93 %. Une pente entre -3.3 et -3.8 est acceptable, où -3,3 donne une efficacité à 100 %. Les efficacités d'amplification furent obtenues à partir du logiciel d'analyse du Rotor-gene 3000.

Pour ce qui est du gène de référence pour la seconde courbe standard, la bêta-globine (HBB) a été utilisée. Les amorces ont été dessinées afin de permettre l'amplification de son ADN génomique donc, survolant un intron. Des dilutions en série d'ADNg de cellules HeLa non transfectées ont été effectuées et analysées dans l'intention d'avoir une courbe

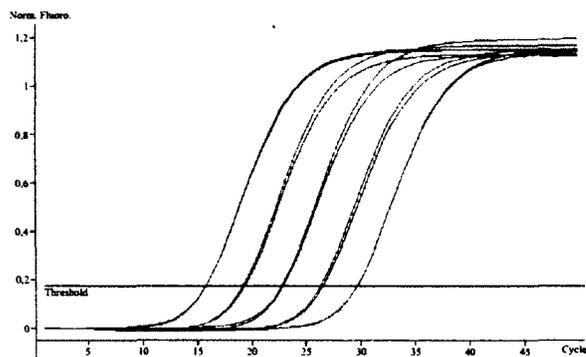
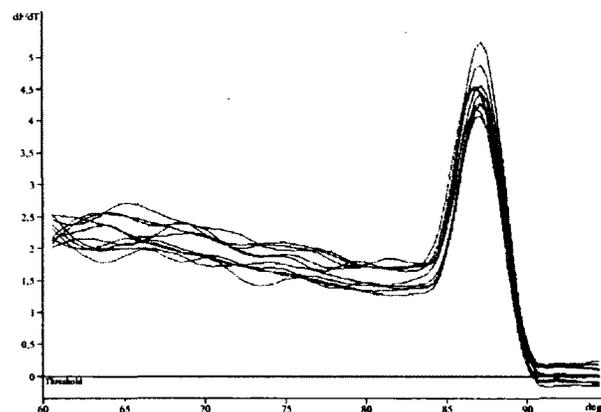
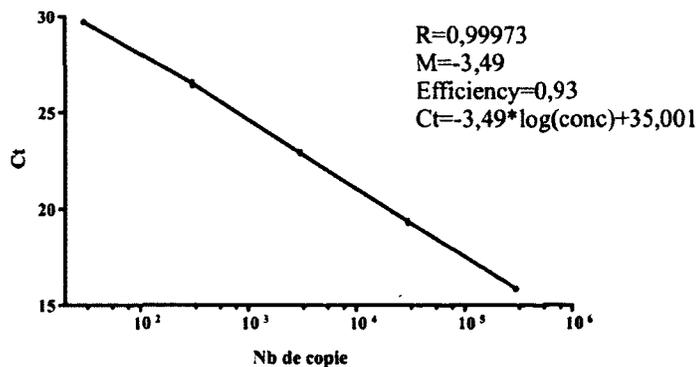
A**B****C**

Figure 15: Courbe standard *neo*

Courbe standard *neo* à partir du plasmide pcDNA3 contenant le gène *neo* sans interruption. Les amorces 217 sens et 6n antisens ont été utilisées sur des dilutions en série de 10^{-6} à 10^{-10} du plasmide. (A) Courbes d'amplification des différentes dilutions. (B) Courbes de dénaturation. (C) Courbe standard de la valeur en Ct par rapport au nombre de copie *neo*.

standard de notre gène de référence. Celle-ci a été réalisée par Mathieu Durand et Philippe Thibault à la Plateforme RNomique du Laboratoire de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Sherbrooke, ainsi que l'analyse des données brutes à l'aide du logiciel qBase (Hellemans et al., 2007).

1.2 Rétrotransposition des différentes constructions détectée avec la qPCR

1.2.1 Validation de la nouvelle méthode de détection par qPCR

Afin de valider notre nouveau système de détection par qPCR, quelques essais préliminaires ont été effectués. Puis, chaque construction a été analysée à nouveau afin d'avoir des données plus précises vu la sensibilité de la technique. En premier lieu, des cellules HeLa ont été transfectées avec différentes concentrations du plasmide hY1neo^{TET} dans l'intention de trouver la plus faible quantité de plasmide à transfecter afin d'observer un bon niveau de rétrotransposition. Toutes les valeurs sont normalisées à l'ADNg de HBB endogène et relativisées à celle de la transfection de 3 μ g. Les résultats sont présentés à la figure 16A. Le niveau de rétrotransposition semble corrélé à la quantité de plasmide transfectée. À 3 μ g, le seuil de saturation est pratiquement atteint, indiquant que cette quantité semble appropriée pour avoir un bon nombre d'événements sans trop affecter la survie des cellules. La figure 16B représente le niveau de rétrotransposition en relation avec le temps d'extraction de l'ADNg post-transfection. Des cellules HeLa furent transfectées avec 3 μ g du plasmide hY1neo^{TET} ainsi que 1 μ g de pBud-ORF2opt puis l'extraction de l'ADNg a été faite à différents temps après celle-ci. Toutes les données ont été rapportées à celle de 24 h. Pour ce qui est des temps 15, 18 et 24 h post-transfection, on ne remarque aucune différence au niveau de la rétrotransposition. Ceci pourrait être dû au fait que les événements de rétrotransposition ont déjà eu lieu et que les cellules se rétablissent tranquillement du choc de la transfection et des événements de rétrotransposition avant qu'elles puissent se répliquer. Par la suite, on observe une baisse d'environ 50 % après 48 h et ce, après chaque 24 h additionnelle indiquant que les cellules sont rétablies et se répliquent. L'efficacité de transfection des cellules n'est pas de 100 % et celles qui sont

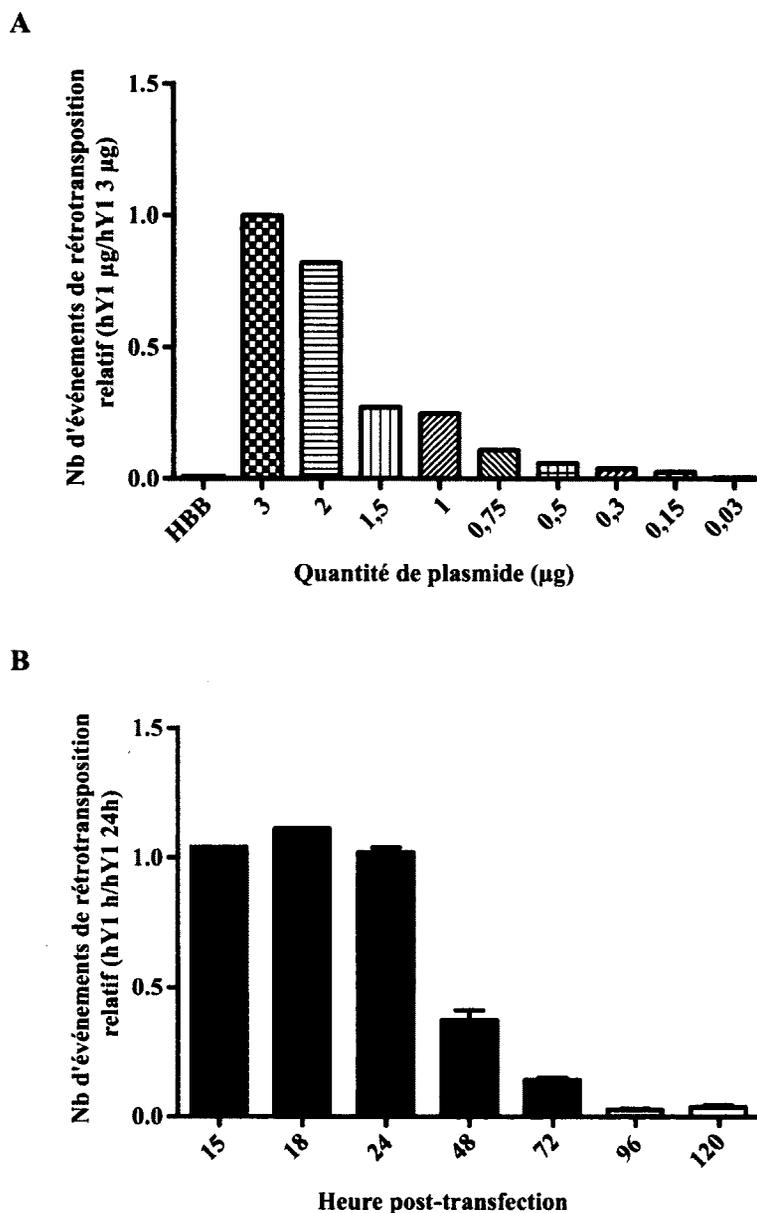


Figure 16 : Analyses préliminaires

Analyses préliminaires de la quantité de plasmide à transférer et du temps d'attente entre la transfection et l'extraction de l'ADNg. (A) Niveaux de rétrotransposition par rapport à la quantité de plasmide hY1neo^{TET} transférée. Des cellules HeLa (1×10^6 cellules) ont été transfectées avec différentes quantités de plasmide hY1neo^{TET} et 1 μg de plasmide pBud-ORF2opt. Les données brutes des différents échantillons ont été rapportées sur celles de notre gène de référence d'ADNg (HBB). Les valeurs pour les différentes quantités de plasmide ont ensuite été relativisées à celle de 3 μg. (B) Niveaux de rétrotransposition en relation avec le temps d'extraction post-transfection. Les cellules HeLa (1×10^6) ont été transfectées avec 3 μg de plasmide hY1neo^{TET} et 1 μg de plasmide pBud-ORF2opt, puis l'ADNg extrait à différents temps post-transfection. Les valeurs des différents temps d'extraction ont été relativisées à celle de 24 h.

transfectées ne subissent pas nécessairement un événement de rétrotransposition. Ceci conduit à une dilution du signal par les cellules n'ayant pas subies de rétrotransposition. Celles qui sont moins endommagées auraient plus de facilité à croître, augmentant le ratio entre elles et celles ayant eu des occurrences. La conclusion apportée était que les cellules seraient transfectées avec 3 μ g de plasmide *neo*^{TET} et que leur ADNg serait extrait après un temps déterminé fixe pour chaque essai afin de limiter les variations non désirées, soit 72 h post-transfection. Pour ce qui est de la détection par qPCR, nous croyons que les résultats des essais préliminaires appuient l'utilisation de cette technique, puisque nous pouvons faire la comparaison entre deux conditions ayant de très faibles niveaux de rétrotransposition, faisant ressortir la très grande sensibilité de la technique.

1.2.2 Détection de la rétrotransposition des ARN hY et des mutants hY1 par qPCR

Chaque construction hY a été analysée avec cette technique de détection par la qPCR. Comme expliqué précédemment, 3 μ g de chaque construction ont été co-transfectés avec 1 μ g de pBud-ORF2opt dans des cellules HeLa. Soixante-douze heures post-transfection, l'ADNg des cellules a été extrait afin de l'analyser par qPCR pour les gènes *neo* et HBB (gène de référence endogène). L'utilisation de notre contrôle négatif HBB*neo*^{TET} est encore possible dans ce cas, puisque nous comparons le nombre de gènes *neo* de notre construction à celui de HBB humain. De plus, le gène HBB contenu dans le plasmide *neo*^{TET} provient du lapin, ne permettant pas son amplification par les amorces du gène HBB humain endogène. La figure 17A regroupe 3 essais indépendants faits en duplicata et les valeurs obtenues sont rapportées à celle de hY1. L'analyse des niveaux de rétrotransposition pour les différents gènes hY démontre qu'ils ont tous le même potentiel de rétrotransposition. La séquence de l'ARN hY ne faisant qu'une très petite partie de l'ARN transcrit par ces constructions, peut expliquer les niveaux semblables d'événement; ceux-ci n'apporteraient pas assez de variation significative afin d'observer une différence. De plus, les éléments importants pour qu'il y ait rétrotransposition ne sont pas apportés par l'ARN hY mais par la construction de base elle-même.

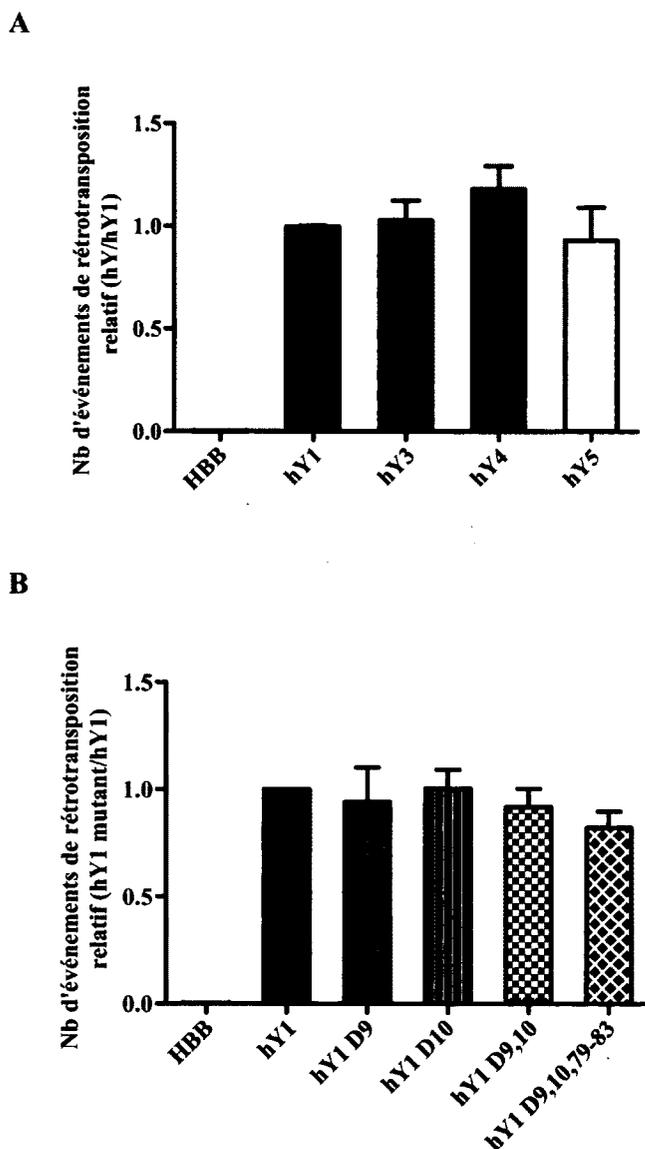


Figure 17 : Rétrotransposition des ARN hY et des mutants hY1 détectée par qPCR

Niveaux d'événements de rétrotransposition relatif obtenu par l'analyse de l'ADNg avec la qPCR. Les résultats regroupent 3 différents essais effectués en duplicata. Des cellules HeLa (1×10^6) ont été transfectées avec 3 μg de plasmide *neo*^{TET} (Alu, HBB et hYs) et 1 μg de plasmide pBud-ORF2opt, dont l'ADNg a été extrait après 72 h. Les données brutes des différents échantillons ont été rapportées sur celles de notre gène de référence d'ADNg (HBB). Les valeurs pour les différentes constructions ont ensuite été relativisées à celle de hY1. (A) Résultats pour les constructions HBB et hYs. (B) Résultats pour les constructions HBB, hY1 et les mutants hY1.

Pour ce qui est des mutants hY1, on observe le même phénomène. Les différentes mutations introduites dans l'ARN hY1 n'ont pas affecté le pouvoir de rétrotransposition de cet ARN. Que ce soit le site de liaison de la protéine Ro ou bien de la boucle de poly-pyrimidine ou les deux ensemble, il n'y a pas d'effet sur le niveau de rétrotransposition.

Ces résultats sont décrits dans la figure 17B, chaque mutant hY1 est comparé à la construction sauvage hY1. Ces résultats regroupent 3 essais indépendants faits en duplicata.

La méthode de détection par qPCR est une technique très sensible et spécifique, capable de déceler de faibles variations d'amplification entre deux échantillons. Ce qui nous a permis d'arriver à la conclusion que les quelques mutations effectuées pour hY1 n'affectaient pas la rétrotransposition de l'ARN. Plusieurs raisons pourraient être en cause, soit l'ajout de toute l'artillerie du gène rapporteur et de la queue polyA à l'ARN. Les mutations testées ne supprimait peut-être pas la liaison protéine-ARN, mais ne faisaient que l'affaiblir ou bien le niveau de rétrotransposition observé est dû à la construction elle-même et pas grâce à l'ARN hY.

DISCUSSION

L'étude des ARN Y ne prend pas une grande place dans le domaine de la recherche scientifique, par contre de plus en plus de recherches indépendantes retrouvent ces ARN impliqués dans le mécanisme qu'ils étudient. Ces ARN ont d'abord été découverts lorsque liés à la protéine Ro60, celle-ci étant un autoantigène chez les patients atteints de certaines maladies auto-immunes. Maintenant, les ARN hY servent de biomarqueurs pour la détection de ces maladies (Lee et al., 1996; Lerner et al., 1981; Peene et al., 2002; Provost et Reichlin, 1981). Aussi, un groupe a démontré un lien entre les ARN hY et la réplication de l'ADN (Christov et al., 2006). D'autre part, de petits ARN provenant des ARN hY1 et hY3 ont été décelés à partir d'analyses de séquençage à haut débit dans des échantillons de tissus tumoraux et de sérums humains sains (Meiri et al., 2010). Ceci ouvre une tout autre perspective sur l'importance de ces ARN.

Dans notre cas, la présence de pseudogènes dans le génome humain a soulevé notre intérêt. Le fait qu'environ 1000 pseudogènes Y aient été retrouvés dans le génome humain, marqués de la signature caractéristique des éléments L1, apporte une nouvelle hypothèse. Les ARN hY seraient-ils rétrotransposés par les éléments L1? Cette question a été quelque peu étudiée par le laboratoire du Dr. Roy-Engel en 2009. Plusieurs ARN transcrits par la pol III avaient été testés afin de vérifier leur taux de rétrotransposition en présence des protéines ORF de l'élément L1, dont les ARN hY (Kroutter et al., 2009). De faibles niveaux de rétrotransposition avaient été détectés pour les ARN hY, nous encourageant à analyser un peu plus en profondeur le mécanisme lui-même.

1. Fondement de l'étude de la rétrotransposition des ARN hY chez l'humain

Les rétrotransposons représentent un certain danger pour le génome. La plupart de ces éléments sont insérés dans des régions non codantes de notre génome, donc pourraient en majorité être inoffensifs. Par contre, de temps à autre, certaines insertions peuvent affecter l'intégrité du génome de façons positives ou négatives. Les insertions des pseudogènes Y peuvent avoir été conservées à travers l'évolution, soit puisqu'ils sont inoffensifs ou bien parce qu'ils contribuent à l'évolution du génome. On pourrait penser à l'apport d'un nouveau site d'épissage alternatif, puisque ces ARN comportent déjà des sites de liaisons pour certaines protéines impliquées dans l'épissage (Perreault, 2007). D'un autre côté, les pseudogènes Y, en mimant les RNP Ro, pourraient être la cause de la production d'autoanticorps contre les RNP Ro. L'expression d'un ARN anormal capable de lier Ro serait reconnue en tant que RNP étranger par les anticorps, ceux-ci pouvant ensuite cibler les RNP Ro saines, déclenchant une auto-immunité.

1.1 Observations et objectif

Les analyses bio-informatiques effectuées par M. Jonathan Perreault lui ont permis de faire quelques généralisations. Tout d'abord, 80% des ARN Y rétroposés avaient perdu au moins une uridine à l'extrémité 3' de l'ARN, empêchant la liaison de la protéine La. Deuxièmement, la mutation d'au moins un nucléotide aux positions 9 et 10, un site important pour la liaison de la protéine Ro60, chez 80 % des pseudogènes correspondant aux ARN hY1, hY3 et hY4. Finalement, un taux de mutation de 80 % des résidus formant la boucle de poly-pyrimidines au centre de l'ARN est observé. Chez les pseudogènes Y1, cette région est liée par plusieurs protéines comme hnRNP K et PTB. Ces observations nous ont amené à émettre l'hypothèse que ces différentes mutations empêcheraient la liaison des protéines, ce qui augmenterait la disponibilité de l'ARN à la rétrotransposition par L1. Nous voulions analyser l'effet de ces mutations plus en détail.

1.1.1 Les mutants hY1 et la rétrotransposition

La construction des mutants a été réalisée en tenant compte des observations décrites ci-haut. Au départ, nous voulions évaluer l'effet des mutations les plus fréquentes pour l'ARN hY1, puisque celui-ci comportait le plus grand nombre de mutations. En conséquence, des mutations de la cytosine 9, la guanine 10, ainsi que de cinq cytosines consécutives dans la boucle de poly-pyrimidine de l'ARN hY1 ont été effectuées. En vue de trouver réponse à notre hypothèse, nous devons faire en sorte de perdre la liaison des protéines à l'ARN hY. Il a été démontré que la délétion de la cytosine saillante en position 9 de l'ARN Y supprimait la liaison de Ro60 (Green et al., 1998). De plus, la délétion de la boucle de poly-pyrimidines abolit la liaison de plusieurs protéines, dont la nucléoline et PTB (Fabini et al., 2000; Fabini et al., 2001; Fouraux et al., 2002). Pour vérifier cette propriété avec nos mutants, des analyses de retard de migration ont été effectuées. Malheureusement, on ne notait aucune différence significative entre l'ARN hY1 non-muté et les mutants D9, D10 et D9-10 (résultats non montrés). Pour ce qui est du mutant D9-10, 79-83, la perte d'une bande de retardement sur le gel a été observée (résultats non montrés). Une analyse plus détaillée des liaisons encore possibles ou perdues sur nos mutants hY1 serait nécessaire pour confirmer le tout. L'utilisation de sérums contenant des anticorps contre les protéines Ro et/ou La serait pratique pour former des complexes de super retardement dans le but de spécifier les protéines liées. La liaison des protéines à l'ARN de la construction, contenant la cassette de sélection devrait aussi être étudiée.

Pour ce qui est des événements de rétrotransposition, après un grand nombre de tentatives, nous n'avons jamais obtenu de décomptes de colonies, c'est-à-dire un niveau de rétrotransposition, significativement plus élevé que notre contrôle négatif, que ce soit pour les ARN hY ou pour les mutants hY1. Ces résultats sont représentés aux figures 11 et 12 du chapitre 1. Par contre, le fait que notre contrôle positif Alu nous donne un niveau de rétrotransposition élevé est encourageant, ce qui permet de dire que l'essai est fonctionnel. Plusieurs aspects de cette technique doivent être discutés pour éclairer notre impossibilité d'obtenir des conclusions définitives. L'élément Alu est reconnu pour son nombre élevé dans le génome humain qui pourrait être causé par son activité de transcription élevée, sa proximité avec la machinerie de traduction lorsque en complexe SRP, sa structure et par la présence d'une séquence riche en adénine (Hasler et Strub, 2006). La construction Alu

utilisée dans cet essai a été optimisée afin d'avoir un niveau de transcription important, ce qui pourrait influencer le nombre de rétrotransposition final pour cet ARN. L'intensité de transcription de l'ARN Alu en comparaison avec celles des ARN hY est aussi très différente, soit d'environ 10 fois plus élevée. Le fait que nous ayons un nombre de copies d'ARN beaucoup plus faible par cellule pour les ARN hY peut jouer sur leur niveau de rétrotransposition, lors de l'utilisation de cette technique. Conséquemment, un nombre d'événements de rétrotransposition plutôt faible complique l'analyse des résultats. La comparaison des résultats de la construction non-mutée avec celles des mutants est presque impossible puisque les valeurs obtenues ne surpassent pas significativement celle du contrôle négatif. Cette faible expression avait été anticipée et nous avons décidé de changer le promoteur de nos constructions pour un promoteur plus fort. Par contre, cette tentative ne parvenait pas à augmenter les niveaux de rétrotransposition de façon significative (résultats non montrés). De plus, comme plusieurs variables peuvent avoir affecté le résultat de l'essai, lorsque nous étudions un nombre d'événements plutôt faible, ceci crée un bruit de fond qui peut être considérable. D'autre part, on ne peut savoir s'il est possible qu'une cellule soit l'hôte de plusieurs événements en même temps, car la coloration d'une colonie équivaut à un événement. Ceci apporte un certain biais si nous essayons de compter le nombre absolu d'événements de rétrotransposition pour une construction donnée. Dès lors, cette technique nous semblait de moins en moins attrayante pour analyser nos constructions.

2. Persévérances et dénouement

Puisque cette technique de rétrotransposition en cellule n'était pas utilisée dans les laboratoires environnants, et qu'elle est plutôt difficile à établir, nous nous sommes alors tournés vers un laboratoire plus expérimenté dans ce type d'analyse, et en avons tiré quelques conclusions.

2.1 Le stage de perfectionnement dans le laboratoire du Dr Roy-Engel

Le laboratoire du Dr. Roy-Engel étudie diverses fonctions en rapport avec l'élément Alu en utilisant de façon routinière la méthode de rétrotransposition menée par LI. Ils ont entre autres rapporté le seul article montrant la rétrotransposition des ARN hY avec cette technique (Kroutter et al., 2009). Nous avons alors demandé conseil auprès de son laboratoire dans le but de déterminer les différences possibles entre nos protocoles et les erreurs que nous pourrions avoir commises. Après révision, il ne semblait pas y avoir de différences majeures entre les deux protocoles, du moins rien qui pourrait affecter l'essai. Il a alors été décidé que j'aille faire un stage dans ce laboratoire, dans l'intention de maîtriser la technique. Neuf essais de rétrotransposition, (tous faits en duplicata) sur les hY, les mutants hY1 ainsi qu'Alu ont été effectués lors de ce stage. Toutes ces manipulations ont été faites avec le matériel du laboratoire d'accueil incluant les cellules, et sous la supervision du Dr. Roy-Engel. De plus, elles ont toutes été faites de manière constante suivant un seul protocole. Trois de ces expériences n'ont pas fonctionné, c'est-à-dire que le contrôle positif ne donnait pas un nombre convenable de colonies ou l'on ne voyait pas de colonies. Lorsqu'on compare les six autres essais, on observe une variabilité considérable entre ceux-ci, représentée par un écart-type très grand. En tant qu'exemple, pour l'ARN Alu, nous obtenons une valeur moyenne de 728 colonies par million de cellules transfectées. Par contre, l'écart-type de 275 est extrêmement élevé rendant sa comparaison avec d'autres données plus ardue. Un grand écart-type est incompatible avec le faible niveau de rétrotransposition rapporté pour les ARN hY, comme on peut le voir aux figures 11 et 12. Cette technique n'est donc pas assez précise pour permettre l'observation de petites variations dans le taux de rétrotransposition, lorsqu'on tient compte de l'écart-type très élevé. Cette variabilité leur apparaissait relativement normale, m'expliquant que le tout dépendait beaucoup de « l'humeur » des cellules. Ce concept de cellules en état de rétrotransposition compétentes est retenu par leur équipe. Ils sont arrivés à la conclusion que les essais devaient être exécutés lorsque les cellules étaient capables de subir une rétrotransposition. Si les cellules ne répondaient plus correctement, de nouvelles cellules étaient reparties. D'ailleurs, quand les cellules sont compétentes, tous les essais sont réalisés rapidement pour obtenir des valeurs moins variables.

Ceci nous a amené à nous questionner sur la validité de cet essai. Mais qu'est-ce qui apporte toute cette variabilité? Est-ce parce que les cellules HeLa, étant à 100 % aneuploïdes, ne se comportent pas toutes de la même manière? Ou bien la technique elle-même est-elle propice aux erreurs et aux variations apportées par le manipulateur? Il se peut aussi que les cellules ne répondent pas de la même façon au traitement à la G418, affectant le nombre de colonies observé.

2.2 Alternative de détection

La solution apportée à un des problèmes de cette technique a été de changer de méthode de détection d'événements de rétrotransposition. L'approche par qPCR développée au chapitre 2 a grandement amélioré et accéléré le processus de détection. Un des points positifs est la diminution du temps d'attente après la transfection, passant de 14 à 3 jours. En conséquence, l'essai peut être effectué en 5 jours en comparaison à 16 jours pour la méthode traditionnelle. De plus, la qPCR est une technique très sensible et spécifique. De très faibles quantités d'ADN peuvent être détectées dans un échantillon permettant de déceler d'infimes variations. Lorsque l'optimisation de la technique de PCR est accomplie, l'obtention d'un produit spécifique avec chaque amplification se produit. Alors, dans le cas où nous obtiendrions un événement de rétrotransposition, la spécificité et la sensibilité de l'essai permettraient de le détecter. Ainsi, une différence d'un petit nombre d'événements serait décelable. Pour ce qui est de la concentration de plasmide utilisée, nous avons déterminé qu'elle devait être de 3 μg afin d'obtenir le plus d'événements de rétrotransposition. Par contre, afin de comparer deux constructions il est questionnable d'utiliser une concentration de plasmide près de la région de saturation. Un effet aurait été peut-être plus facile à déceler avec une plus faible concentration de plasmide, soit dans la région linéaire de la courbe.

Avec cette nouvelle technique, nous avons déterminé avec plus de précision que la mutation des nucléotides C9, G10 et C79-83 n'affectait pas le taux de rétrotransposition de hY1. Ceci est constaté au chapitre 2, à la figure 17. De plus, même les niveaux de

rétrotransposition des différents hY étaient semblables. Ceci a soulevé la possibilité que l'ARN Y ne soit pas responsable de l'événement de rétrotransposition, mais plutôt la construction elle-même. À la base, celle-ci comporte en effet tous les éléments importants pour permettre la rétrotransposition par L1.

2.3 Qu'aurait-on pu faire autrement?

Pendant cette maîtrise, toutes les méthodes, les alternatives et les combinaisons auxquelles je pensais ont été essayées afin d'obtenir des niveaux de rétrotransposition convenables et significativement élevés. Dont, changer de type cellulaire, vérifier la quantité de plasmides à transférer, déterminer quelles protéines doivent être transfectées, utiliser un autre vecteur d'expression, changer de méthode de transfection, etc. Dans ce paragraphe, j'aimerais discuter de certains aspects critiquables plus généraux de la méthode employée pour répondre à notre hypothèse. L'essai de rétrotransposition mené par L1 se base sur une construction spécifique, représentée dans la figure 5 de l'introduction. Ce vecteur a fait ses preuves en ce qui concerne l'élément Alu. Par contre, on ne pourrait pas dire la même chose pour les ARN hY. D'abord, les ARN hY d'approximativement 100 nt de long adoptent une structure très stable de tige boucle. On ajoute à l'extrémité 3' de cette structure une cassette d'environ 2000 nt. L'impact de cette addition sur la conformation de l'ARN n'a jamais été vérifié, de même que son effet sur la liaison des protéines aux hY. Ce type d'analyse a été développé pour l'ARN Alu, un élément de rétrotransposition relativement bien caractérisé. De plus, les ARN hY n'ont pas de séquence polyadénylée à leur extrémité 3', que l'on retrouve chez Alu et qui est importante pour le mécanisme de rétrotransposition L1. À la construction employée, nous ajoutons une séquence polyA afin d'optimiser la rétrotransposition de l'ARN. Mais, ceci ne représente pas nécessairement la conformation des ARN hY cellulaires. L'analyse des constructions hY, afin de s'assurer que c'est bien l'ARN lui-même qui est important pour la rétrotransposition et non la construction, n'a jamais été faite. L'essai semblait bien fonctionner dans le laboratoire du Dr. Roy-Engel, mais nous n'avons pas vraiment pu la reproduire. L'usage de cette méthode pour les ARN hY est non démontré.

Je crois que pour étudier la rétrotransposition des ARN hY, il faudrait développer un essai qui permettrait d'utiliser les ARN sans l'ajout d'une cassette. Avec la nouvelle méthode de détection, nous pouvons déceler de très faibles variations entre différentes conditions. En surexprimant les ARN hY avec l'ajout des protéines L1, nous pouvons analyser la variation entre l'état basal et la surexpression, permettant l'étude de l'ARN sauvage. Il n'est pas certain qu'il y aurait des événements de rétrotransposition chez les ARN hY avec cette méthode, mais du moins ils seraient dus à l'ARN en question.

2.4 Solution : nouveaux mutants hY1!

Puisque nous n'observons pas d'effet en déléant les nucléotides C9, G10 et C79-83, nous avons pensé à d'autres mutants qui pourraient avoir un effet, en prenant compte non pas des pseudogènes, mais de la conformation de la liaison protéine-ARN. Ces mutants sont représentés dans la figure 18. Ces nouveaux mutants n'ont pas pu être testés avec la nouvelle méthode de détection : ils représenteraient donc la suite du projet. Un variant dont la cytosine 9 saillante est perturbée par la formation d'une boucle plus large pourrait être intéressant. Également, un autre mutant concernant la liaison de Ro60 aux hY serait intéressant à faire, soit l'inversion des nucléotides d'une section de la tige afin de déterminer si l'effet sur la rétrotransposition serait plus marqué. Aussi, la substitution d'une partie de la boucle de poly pyrimidines des ARN hY1 et hY3 dans le but de maintenir l'intégrité de la boucle tout en perturbant la liaison aux protéines. Ces nouveaux mutants pourraient élargir notre champ de vision sur le lien entre la liaison des protéines aux ARN hY et la rétrotransposition.

Une question importante subsiste : pourquoi les pseudogènes possèdent plusieurs mutations ponctuelles récurrentes. Dans nos expériences, la délétion de ces nucléotides n'affectait pas la susceptibilité de l'ARN à être rétrotransposé. Alors, pour quelle raison retrouve-t-on ces mutations spécifiques? Celles-ci peuvent déstabiliser la liaison entre l'ARN et la protéine sans toutefois la supprimer, permettant aux protéines L1 d'utiliser l'ARN plus facilement

pour sa rétrotransposition. Nous pourrions émettre comme hypothèse que les ARN hY mutants ne permettent pas la liaison des protéines d'exportation ou inhibent l'exportation efficace de ces ARN au cytoplasme. Certaines évidences suggèrent que la nucléoline et la protéine Ro60 étaient nécessaires à leur exportation (Fouraux et al., 2002; Rutjes et al., 2001). Ainsi, lors de la rétrotransposition d'un élément L1 ou d'un autre ARN, il y aurait un transfert de matrice permettant la rétrotransposition de l'ARN hY muté qui serait resté au noyau (Buzdin et al., 2007). Par contre, ces mutations au cours de l'évolution pourraient être devenues silencieuses, diminuant l'impact de la rétrotransposition de ces ARN dans le génome ainsi que leur impact fonctionnel.

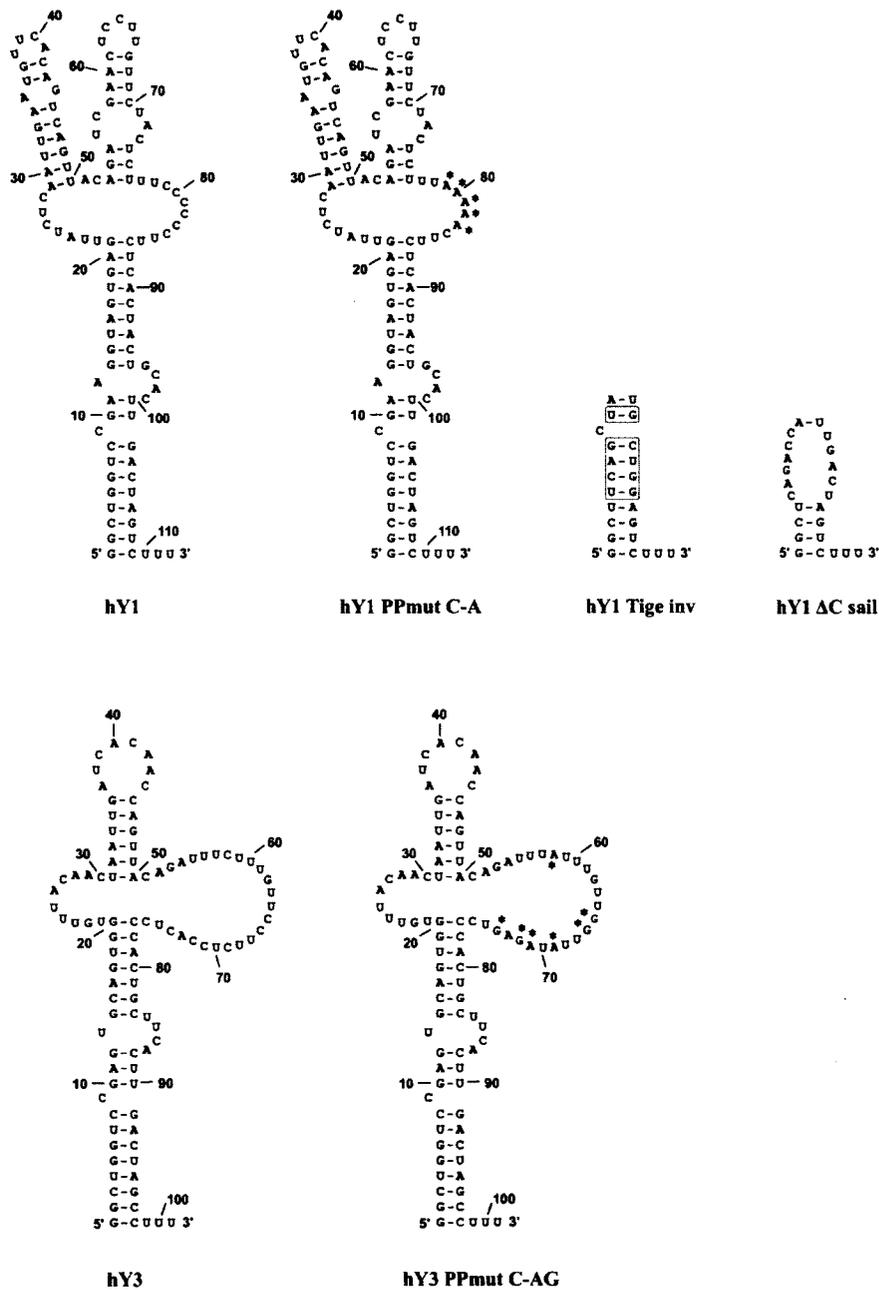


Figure 18 : Structures et séquences des nouveaux mutants hY1 et hY3

Structures secondaires et séquences des nouveaux mutants dessinés pour les ARN hY1 et hY3. Le mutant hY1 PPmut C-A exhibe cinq adénines au lieu des C79 à 83, hY1 tige inv est constitué de plusieurs nucléotides inversés dans sa tige et hY1 ΔC sail possède une boucle élargie autour de la cytosine 9 saillante. Le mutant hY3 PPmut C-AG a plusieurs mutations dans la boucle de poly-pyrimidines dont les cytosines sont interchangeées pour des adénines ou des guanines.

3. *Autres perspectives*

3.1 Le décompte absolu du nombre d'événements de rétrotransposition

La méthode de détection par qPCR nous permet d'obtenir des valeurs en ratio pour la rétrotransposition de nos ARN. Nous voulions obtenir des nombres absolus de rétrotransposition par million de cellules. En faisant une courbe standard du gène de la bêta-globine retrouvé dans le génome humain qui serait comparée à un standard commercial, nous aurions une courbe permettant de déterminer le nombre de génomes retrouvé dans notre échantillon. Avec cette approche, il est possible de déterminer si plusieurs événements peuvent survenir dans la même cellule. La seule contrainte est qu'il faut s'assurer que le gène soit unique dans le génome des cellules. Pour ce qui est des cellules HeLa, ceci est très difficile puisqu'elles sont aneuploïdes; elles ont un nombre de chromosome anormal. Une tentative de calculer les nombres absolus de rétrotransposition lors de nos essais a été réalisée. Des échantillons d'ADNg ont été analysés par qPCR et les nombres absolus ont été calculés par rapport au nombre de génomes. Par contre, les résultats s'avéraient peu concluants, puisque nous obtenions environ une cinquantaine d'événements par cellule. Très peu d'articles ont déjà fait ce type d'analyse. Celles répertoriées obtiennent plutôt des résultats de moins d'un par génome (Kano et al., 2009). Une vérification du gène de référence pour la courbe standard serait essentielle afin d'obtenir des résultats plus convaincants.

3.2 Effet de la localisation cellulaire sur la rétrotransposition

Les ARN hY ont été identifiés en tant qu'ARN cYtoplasmique, d'où leur nom. Par contre, l'ARN hY5 a été retrouvé dans la portion nucléaire des cellules HeLa (Gendron et al., 2001). Est-ce que cette localisation nucléaire pourrait affecter le niveau de rétrotransposition de cet ARN avec l'essai utilisé? Des évidences suggéraient un niveau de rétrotransposition plus élevé dans les cellules HeLa pour les ARN hY5 avec la méthode conventionnelle (Kroutter et al., 2009). Pour cette raison, nous avons émis l'hypothèse que

la localisation cellulaire de l'ARN pouvait influencer la probabilité de rétrotransposition. En étant au noyau, la machinerie de rétrotransposition serait à proximité de l'ARN, facilitant leur association. La comparaison du taux de rétrotransposition pour l'ARN hY5 chez différentes lignées cellulaires a été accomplie. Nous n'avons observé la localisation nucléaire de hY5 que chez les cellules HeLa. Les niveaux de rétrotransposition de l'ARN hY5 ne concordaient pas avec notre hypothèse, puisque nous observions le ratio le plus bas dans les cellules HeLa, alors qu'on s'attendrait au contraire (résultats non montrés). Il est probable que la cassette ajoutée à l'extrémité 3' de l'ARN influence largement la structure ainsi que la localisation de cet ARN. Il faudrait déterminer si la localisation nucléaire de l'ARN hY5 est conservée dans les cellules HeLa malgré cet ajout.

4. Exploration

L'hypothèse que les ARN hY pourraient en fait être des précurseurs de microARN a déjà été énoncée dans la thèse de Jonathan Perreault (2007). Lorsqu'on évalue la structure des ARN hY, nous pouvons observer plusieurs caractéristiques structurales semblables aux microARN dont la structure tige boucle.

4.1 La découverte de petits ARN hY

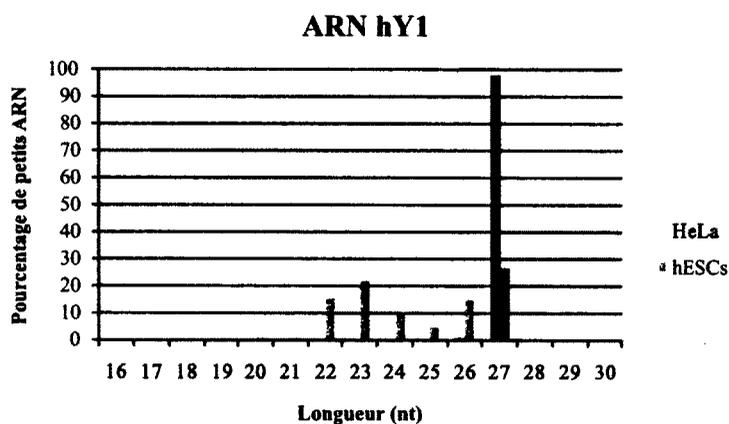
Afin de déchiffrer ce mystère, l'analyse de banques de données de séquençage à haut débit de petits ARN retrouvés dans des cellules humaines a été réalisée dans notre laboratoire. Ces analyses ont été effectuées sur les cellules HeLa et des cellules souches embryonnaires. Un tableau du nombre de lectures pour les ARN hY, le microARN Let-7 ainsi que pour l'ARN 5S est représenté dans la figure 19A. Plusieurs milliers de séquences ont été découvertes représentant surtout les ARN hY1 et hY4. Une comparaison avec le microARN Let-7 a été faite pour vérifier la plausibilité de nos résultats. Celui-ci est un microARN très répandu, impliqué dans divers mécanismes de régulation cellulaire (Boyerinas et al., 2010). De plus, en tant que contrôle négatif, la vérification d'un ARN très

abondant dans la cellule, l'ARN 5S, a été faite et démontre un faible nombre de lectures. Ceci nous indique la possibilité de la présence de petits ARN dérivés des ARN hY dans les cellules humaines. Nous avons aussi noté la présence de petits ARN mY dans des analyses de banques de données chez la souris (résultats non montrés). Un groupe a aussi publié la présence de ces petits ARN dans des tissus tumoraux (Meiri et al., 2010). D'autre part, la distribution des petits ARN dérivés des ARN Y selon leur taille est illustrée à la figure 18B et 18C. Pour les cellules HeLa, il semble y avoir un enrichissement de petits ARN de 27 nt, tandis que pour les cellules embryonnaires ces petits ARN sont distribués de 22 à 27 nt de long. Avec ces trouvailles, il serait important d'explorer cette nouvelle voie reliée aux ARN hY, révélant une nouvelle fonction de petit ARN régulateur. Beaucoup de travail reste à faire, soit la vérification de la présence de ces petits ARN en cellules ainsi que leur caractérisation.

A

	HeLa	hESCs (H19)
# de lecture	684 901	3 702 817
hY1	15 525	7 278
hY3	1 845	429
hY4	4 211	2 976
hY5	729	225
let-7	7 775	13 260
ARN 5S	209	1 307

B



C

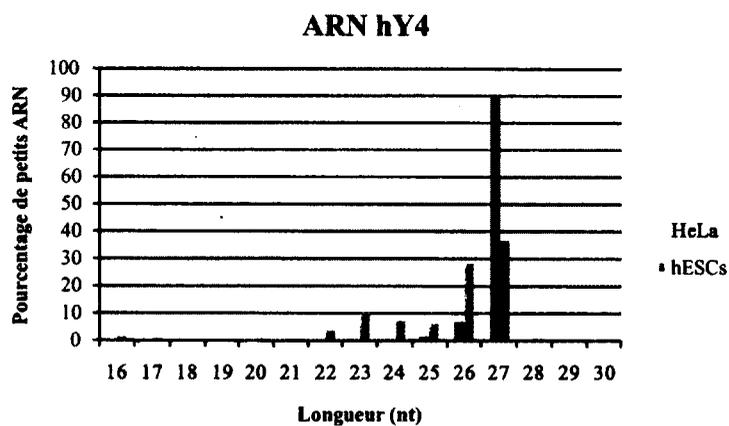


Figure 19 : Analyse bio-informatique des petits ARN hY

(A) Tableau représentant le nombre de lectures d'ARN hY retrouvé dans des banques de données de petits ARN de cellules HeLa et embryonnaires. (B) Graphique des différentes longueurs des petits ARN retrouvées dans les cellules HeLa et embryonnaires pour les ARN hY1 (C) et hY4.

CONCLUSION

Ce projet a suscité plus de questions que de réponses. Une question simple était posée au départ, sans que l'on se doute de la difficulté du parcours. Cela dit, à la place d'une analyse entre différentes conditions, une chasse à la méthode d'analyse adéquate a plutôt eu lieu. L'optimisation d'une nouvelle technique de détection pour l'essai de rétrotransposition menée par L1 pour les constructions transcrites par la pol III a été réalisée. Avec celle-ci, nous avons pu répondre en partie à notre hypothèse de départ. D'abord, nous pouvons affirmer que les ARN hY sont rétrotransposés à un niveau moindre que l'ARN Alu. Cependant, les mutations les plus retrouvées chez les pseudogènes hY1 ne semblent pas affecter la liaison de l'ARN aux protéines, ni leur susceptibilité à être rétrotransposé par L1. De plus, certains éléments évoqués dans cette discussion suscitent un certain doute sur la méthode de détection. Beaucoup d'avenues restent encore inexplorées en ce qui concerne les ARN hY afin de vraiment comprendre leurs rôles cellulaires. Pensons à leur fonction potentielle en tant que petit ARN régulateur, qui est un domaine de recherche dont la progression est rapide actuellement. Les résultats de l'analyse bio-informatique sont encourageants pour la suite de l'approfondissement de nos connaissances sur les ARN hY.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mes co-directeurs de recherche, les Drs Jean-Pierre Perreault et Gilles Boire d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de réaliser ma maîtrise sous leur direction. Merci à Jean-Pierre de m'avoir accueillie dans son laboratoire il y a trois ans, ce qui s'avérait être le début d'un grand cheminement pour moi. Merci à Gilles pour tous ses conseils et son soutien. Merci pour la liberté et la confiance que vous m'avez accordées pendant ma maîtrise. Cette aventure m'a permis d'évoluer d'un point de vue de la science et en tant que personne.

Je suis très heureuse d'avoir pu découvrir ce grand monde de l'ARN. Commenant par celui des ARN hY, en passant par celui des ARN catalytiques et des viroïdes. Les ARN hY vont continuer à m'intriguer puisqu'ils restent jusqu'à maintenant encore très mystérieux. J'espère que le futur pourra nous éclairer sur ce sujet.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du laboratoire. Plus particulièrement, François Bolduc pour les discussions et l'aide qu'il m'a apportée pendant mon projet. Merci à Dominique, Tamara, Samuel, Michel et Jean-Denis pour tous vos conseils et d'avoir créé une ambiance de travail motivante et agréable. Aussi, je pense à Julie qui a été une vraie amie, me conseillant tant pour mon projet de recherche que dans ma vie personnelle. Merci aux anciens membres du laboratoire, tous les gens du département de biochimie et du groupe de l'ARN de Sherbrooke.

Également, merci aux membres du jury : Dr Jean-Pierre Perreault, Dr Gilles Boire, Dre Nathalie Bissonnette et Dr Claude Asselin.

Enfin, un gros merci à ma famille et mes amis qui m'ont supportée pendant ces dernières années remplies de périples et d'émotions.

RÉFÉRENCES

- Alspaugh, M. A. et Tan, E. M. (1975). Antibodies to cellular antigens in sjogren's syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 55(5), 1067-1073.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Bayfield, M. A., Yang, R. et Maraia, R. J. (2010). Conserved and divergent features of the structure and function of la and la-related proteins (LARPs). *Biochimica et biophysica acta*, 1799(5-6), 365-378.
- Belisova, A., Semrad, K., Mayer, O., Kocian, G., Waigmann, E., Schroeder, R. et Steiner, G. (2005). RNA chaperone activity of protein components of human ro RNPs. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(7), 1084-1094.
- Boire, G. et Craft, J. (1989). Biochemical and immunological heterogeneity of the ro ribonucleoprotein particles. analysis with sera specific for the RohY5 particle. *The Journal of clinical investigation*, 84(1), 270-279.
- Bomszyk, K., Denisenko, O. et Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: One protein multiple processes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 26(6), 629-638.
- Bouffard, P., Barbar, E., Briere, F. et Boire, G. (2000). Interaction cloning and characterization of RoBPI, a novel protein binding to human ro ribonucleoproteins. *RNA (New York, N.Y.)*, 6(1), 66-78.
- Bouffard, P., Briere, F., Wellinger, R. J. et Boire, G. (1999). Identification of ribonucleoprotein (RNP)-specific protein interactions using a yeast RNP interaction trap assay (RITA). *BioTechniques*, 27(4), 790-796.
- Boyerinas, B., Park, S. M., Hau, A., Murmann, A. E. et Peter, M. E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-related cancer*, 17(1), F19-36.
- Briere, F. (2003). *Recherche et caractérisation de partenaires cellulaires interagissant avec les ARN hY3*. Université de Sherbrooke, Sherbrooke.
- Brosseau, J. P., Lucier, J. F., Lapointe, E., Durand, M., Gendron, D., Gervais-Bird, J., Tremblay, K., Perreault, J. P. et Elela, S. A. (2010). High-throughput quantification of splicing isoforms. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(2), 442-449.
- Buzdin, A., Gogvadze, E. et Lebrun, M. H. (2007). Chimeric retrogenes suggest a role for the nucleolus in LINE amplification. *FEBS letters*, 581(16), 2877-2882.

- Chang, Y. N., Kenan, D. J., Keene, J. D., Gatignol, A. et Jeang, K. T. (1994). Direct interactions between autoantigen Ia and human immunodeficiency virus leader RNA. *Journal of virology*, 68(11), 7008-7020.
- Chen, X., Quinn, A. M. et Wolin, S. L. (2000). Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of deinococcus radiodurans to ultraviolet irradiation. *Genes & development*, 14(7), 777-782.
- Chen, X., Smith, J. D., Shi, H., Yang, D. D., Flavell, R. A. et Wolin, S. L. (2003). The ro autoantigen binds misfolded U2 small nuclear RNAs and assists mammalian cell survival after UV irradiation. *Current biology : CB*, 13(24), 2206-2211.
- Chen, X., Wurtmann, E. J., Van Batavia, J., Zybailov, B., Washburn, M. P. et Wolin, S. L. (2007). An ortholog of the ro autoantigen functions in 23S rRNA maturation in D. radiodurans. *Genes & development*, 21(11), 1328-1339.
- Cheng, S. T., Nguyen, T. Q., Yang, Y. S., Capra, J. D. et Sontheimer, R. D. (1996). Calreticulin binds hYRNA and the 52-kDa polypeptide component of the Ro/SS-A ribonucleoprotein autoantigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(11), 4484-4491.
- Chiu, Y. L. et Greene, W. C. (2006). Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends in immunology*, 27(6), 291-297.
- Chiu, Y. L., Witkowska, H. E., Hall, S. C., Santiago, M., Soros, V. B., Esnault, C., Heidmann, T. et Greene, W. C. (2006). High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict alu retrotransposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15588-15593.
- Christov, C. P., Gardiner, T. J., Szuts, D. et Krude, T. (2006). Functional requirement of noncoding Y RNAs for human chromosomal DNA replication. *Molecular and cellular biology*, 26(18), 6993-7004.
- Christov, C. P., Trivier, E. et Krude, T. (2008). Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation. *British journal of cancer*, 98(5), 981-988.
- Chu, C. Y. et Rana, T. M. (2007). Small RNAs: Regulators and guardians of the genome. *Journal of cellular physiology*, 213(2), 412-419.
- Cordaux, R. et Batzer, M. A. (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature reviews.Genetics*, 10(10), 691-703.
- Costa, F. F. (2010). Non-coding RNAs: Meet thy masters. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 32(7), 599-608.

- Costa-Mattioli, M., Svitkin, Y. et Sonenberg, N. (2004). La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Molecular and cellular biology*, 24(15), 6861-6870.
- Crouch, D. et Liebke, E. H. (1989). The molecular cloning of a mouse ro RNA, my1-like sequence. *Nucleic acids research*, 17(12), 4890.
- Dehal, P. et Boore, J. L. (2005). Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS biology*, 3(10), e314.
- Deininger, P. L., Moran, J. V., Batzer, M. A. et Kazazian, H. H., Jr (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current opinion in genetics & development*, 13(6), 651-658.
- Del Re, B., Marcantonio, P., Capri, M. et Giorgi, G. (2010). Evaluation of LINE-1 mobility in neuroblastoma cells by in vitro retrotransposition reporter assay: FACS analysis can detect only the tip of the iceberg of the inserted L1 elements. *Experimental cell research*, 316(20), 3358-3367.
- Dewannieux, M., Esnault, C. et Heidmann, T. (2003). LINE-mediated retrotransposition of marked alu sequences. *Nature genetics*, 35(1), 41-48.
- Dieci, G., Preti, M. et Montanini, B. (2009). Eukaryotic snoRNAs: A paradigm for gene expression flexibility. *Genomics*, 94(2), 83-88.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W. et Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & development*, 15(2), 188-200.
- Emerson, J. J., Kaessmann, H., Betran, E. et Long, M. (2004). Extensive gene traffic on the mammalian X chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5657), 537-540.
- ENCODE Project Consortium, Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., Andrews, R. M., Flicek, P., Boyle, P. J., Cao, H., Carter, N. P., Clelland, G. K., Davis, S., Day, N., Dhami, P., Dillon, S. C., Dorschner, M. O., Fiegler, H., Giresi, P. G., Goldy, J., Hawrylycz, M., Haydock, A., Humbert, R., James, K. D., Johnson, B. E., Johnson, E. M., Frum, T. T., Rosenzweig, E. R., Karnani, N., Lee, K., Lefebvre, G. C., Navas, P. A., Neri, F., Parker, S. C., Sabo, P. J., Sandstrom, R., Shafer, A., Vetrie, D., Weaver, M., Wilcox, S., Yu, M., Collins, F. S., Dekker, J., Lieb, J. D., Tullius, T. D., Crawford, G. E., Sunyaev, S., Noble, W. S., Dunham, I., DENOEU, F., REYMOND, A., KAPRANOV, P., ROZOWSKY, J., ZHENG, D., CASTELO, R., FRANKISH, A., HARROW, J., GHOSH, S., SANDELIN, A., HOFACKER, I. L., BAERTSCH, R., KEEFE, D., DIKE, S., CHENG, J., HIRSCH, H. A., SEKINGER, E. A., LAGARDE, J., ABRIL, J. F., SHAHAB, A., FLAMM, C., FRIED, C., HACKERMULLER, J., HERTEL, J., LINDEMAYER, M., MISSAL, K., TANZER, A., WASHIETL, S., KORBEL, J., EMANUELSSON, O., PEDERSEN, J. S., HOLROYD, N., TAYLOR, R., SWARBRECK, D., MATTHEWS, N.,

Dickson, M. C., Thomas, D. J., Weirauch, M. T., Gilbert, J., Drenkow, J., Bell, I., Zhao, X., Srinivasan, K. G., Sung, W. K., Ooi, H. S., Chiu, K. P., Foissac, S., Alioto, T., Brent, M., Pachter, L., Tress, M. L., Valencia, A., Choo, S. W., Choo, C. Y., Ucla, C., Manzano, C., Wyss, C., Cheung, E., Clark, T. G., Brown, J. B., Ganesh, M., Patel, S., Tammana, H., Chrast, J., Henrichsen, C. N., Kai, C., Kawai, J., Nagalakshmi, U., Wu, J., Lian, Z., Lian, J., Newburger, P., Zhang, X., Bickel, P., Mattick, J. S., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Weissman, S., Hubbard, T., Myers, R. M., Rogers, J., Stadler, P. F., Lowe, T. M., Wei, C. L., Ruan, Y., Struhl, K., Gerstein, M., Antonarakis, S. E., Fu, Y., Green, E. D., Karaoz, U., Siepel, A., Taylor, J., Liefer, L. A., Wetterstrand, K. A., Good, P. J., Feingold, E. A., Guyer, M. S., Cooper, G. M., Asimenos, G., Dewey, C. N., Hou, M., Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J. I., Loytynoja, A., Whelan, S., Pardi, F., Massingham, T., Huang, H., Zhang, N. R., Holmes, I., Mullikin, J. C., Ureta-Vidal, A., Paten, B., Seringhaus, M., Church, D., Rosenbloom, K., Kent, W. J., Stone, E. A., NISC Comparative Sequencing Program, Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, Washington University Genome Sequencing Center, Broad Institute, Children's Hospital Oakland Research Institute, Batzoglou, S., Goldman, N., Hardison, R. C., Haussler, D., Miller, W., Sidow, A., Trinklein, N. D., Zhang, Z. D., Barrera, L., Stuart, R., King, D. C., Ameer, A., Enroth, S., Bieda, M. C., Kim, J., Bhinge, A. A., Jiang, N., Liu, J., Yao, F., Vega, V. B., Lee, C. W., Ng, P., Shahab, A., Yang, A., Moqtaderi, Z., Zhu, Z., Xu, X., Squazzo, S., Oberley, M. J., Inman, D., Singer, M. A., Richmond, T. A., Munn, K. J., Rada-Iglesias, A., Wallerman, O., Komorowski, J., Fowler, J. C., Couttet, P., Bruce, A. W., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Langford, C. F., Nix, D. A., Euskirchen, G., Hartman, S., Urban, A. E., Kraus, P., Van Calcar, S., Heintzman, N., Kim, T. H., Wang, K., Qu, C., Hon, G., Luna, R., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., Aldred, S. F., Cooper, S. J., Halees, A., Lin, J. M., Shulha, H. P., Zhang, X., Xu, M., Haidar, J. N., Yu, Y., Ruan, Y., Iyer, V. R., Green, R. D., Wadelius, C., Farnham, P. J., Ren, B., Harte, R. A., Hinrichs, A. S., Trumbower, H., Clawson, H., Hillman-Jackson, J., Zweig, A. S., Smith, K., Thakkapallayil, A., Barber, G., Kuhn, R. M., Karolchik, D., Armengol, L., Bird, C. P., de Bakker, P. I., Kern, A. D., Lopez-Bigas, N., Martin, J. D., Stranger, B. E., Woodroffe, A., Davydov, E., Dimas, A., Eyras, E., Hallgrimsdottir, I. B., Huppert, J., Zody, M. C., Abecasis, G. R., Estivill, X., Bouffard, G. G., Guan, X., Hansen, N. F., Idol, J. R., Maduro, V. V., Maskeri, B., McDowell, J. C., Park, M., Thomas, P. J., Young, A. C., Blakesley, R. W., Muzny, D. M., Sodergren, E., Wheeler, D. A., Worley, K. C., Jiang, H., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., Graves, T., Fulton, R., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Clamp, M., Cuff, J., Gnerre, S., Jaffe, D. B., Chang, J. L., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., Koriabine, M., Nefedov, M., Osoegawa, K., Yoshinaga, Y., Zhu, B. et de Jong, P. J. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447(7146), 799-816.

Ender, C., Krek, A., Friedlander, M. R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N. et Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Molecular cell*, 32(4), 519-528.

Enright, C. A., Maxwell, E. S., Eliceiri, G. L. et Sollner-Webb, B. (1996). 5'ETS rRNA processing facilitated by four small RNAs: U14, E3, U17, and U3. *RNA (New York, N.Y.)*, 2(11), 1094-1099.

Fabini, G., Raijmakers, R., Hayer, S., Fouraux, M. A., Pruijn, G. J. et Steiner, G. (2001). The heterogeneous nuclear ribonucleoproteins I and K interact with a subset of the ro ribonucleoprotein-associated Y RNAs in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 276(23), 20711-20718.

Fabini, G., Rutjes, S. A., Zimmermann, C., Pruijn, G. J. et Steiner, G. (2000). Analysis of the molecular composition of ro ribonucleoprotein complexes. identification of novel Y RNA-binding proteins. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(9), 2778-2789.

Farris, A. D., Koelsch, G., Pruijn, G. J., van Venrooij, W. J. et Harley, J. B. (1999). Conserved features of Y RNAs revealed by automated phylogenetic secondary structure analysis. *Nucleic acids research*, 27(4), 1070-1078.

Farris, A. D., Puvion-Dutilleul, F., Puvion, E., Harley, J. B. et Lee, L. A. (1997). The ultrastructural localization of 60-kDa ro protein and human cytoplasmic RNAs: Association with novel electron-dense bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3040-3045.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. et Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.

Fouraux, M. A., Bouvet, P., Verkaart, S., van Venrooij, W. J. et Pruijn, G. J. (2002). Nucleolin associates with a subset of the human ro ribonucleoprotein complexes. *Journal of Molecular Biology*, 320(3), 475-488.

Fraire-Velazquez, S., Herrera-Esparza, R., Villalobos-Hurtado, R. et Avalos-Diaz, E. (1999). Ontogeny of ro hYRNAs in human heart. *Scandinavian journal of rheumatology*, 28(2), 100-105.

Fuchs, G., Stein, A. J., Fu, C., Reinisch, K. M. et Wolin, S. L. (2006). Structural and biochemical basis for misfolded RNA recognition by the ro autoantigen. *Nature structural & molecular biology*, 13(11), 1002-1009.

Gendron, M., Roberge, D. et Boire, G. (2001). Heterogeneity of human ro ribonucleoproteins (RNPS): Nuclear retention of ro RNPS containing the human hY5 RNA in human and mouse cells. *Clinical and experimental immunology*, 125(1), 162-168.

Ghildiyal, M. et Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: An expanding universe. *Nature reviews Genetics*, 10(2), 94-108.

Gottlieb, E. et Steitz, J. A. (1989). The RNA binding protein Ia influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *The EMBO journal*, 8(3), 841-850.

Green, C. D., Long, K. S., Shi, H. et Wolin, S. L. (1998). Binding of the 60-kDa ro autoantigen to Y RNAs: Evidence for recognition in the major groove of a conserved helix. *RNA (New York, N.Y.)*, 4(7), 750-765.

Gwizdek, C., Bertrand, E., Dargemont, C., Lefebvre, J. C., Blanchard, J. M., Singer, R. H. et Doglio, A. (2001). Terminal minihelix, a novel RNA motif that directs polymerase III transcripts to the cell cytoplasm. terminal minihelix and RNA export. *The Journal of biological chemistry*, 276(28), 25910-25918.

Hardin, J. A., Rahn, D. R., Shen, C., Lerner, M. R., Wolin, S. L., Rosa, M. D. et Steitz, J. A. (1982). Antibodies from patients with connective tissue diseases bind specific subsets of cellular RNA-protein particles. *The Journal of clinical investigation*, 70(1), 141-147.

Hasler, J. et Strub, K. (2006). Alu RNP and alu RNA regulate translation initiation in vitro. *Nucleic acids research*, 34(8), 2374-2385.

Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. et Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), R19.

Hendrick, J. P., Wolin, S. L., Rinke, J., Lerner, M. R. et Steitz, J. A. (1981). Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of la ribonucleoproteins: Further characterization of the ro and la small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Molecular and cellular biology*, 1(12), 1138-1149.

Holborow, E. J., Asherson, G. L., Johnson, G. D., Barnes, R. D. et Carmichael, D. S. (1963). Antinuclear factor and other antibodies in blood and liver diseases. *British medical journal*, 1(5331), 656-658.

Itoh, Y., Kriet, J. D. et Reichlin, M. (1990). Organ distribution of the ro (SS-A) antigen in the guinea pig. *Arthritis and Rheumatism*, 33(12), 1815-1821.

Itoh, Y. et Reichlin, M. (1991). Ro/SS-A antigen in human platelets. different distributions of the isoforms of Ro/SS-A protein and the Ro/SS-A-binding RNA. *Arthritis and Rheumatism*, 34(7), 888-893.

Jurka, J. (1997). Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1872-1877.

Jurka, J., Smith, T. F. et Labuda, D. (1988). Small cytoplasmic ro RNA pseudogene and an alu repeat in the human alpha-1 globin gene. *Nucleic acids research*, 16(2), 766.

Kano, H., Godoy, I., Courtney, C., Vetter, M. R., Gerton, G. L., Ostertag, E. M. et Kazazian, H. H., Jr (2009). L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Genes & development*, 23(11), 1303-1312.

- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M. et Walter, P. (2001). The signal recognition particle. *Annual Review of Biochemistry*, 70(755-775).
- Khatua, A. K., Taylor, H. E., Hildreth, J. E. et Popik, W. (2010). Inhibition of LINE-1 and alu retrotransposition by exosomes encapsidating APOBEC3G and APOBEC3F. *Virology*, 400(1), 68-75.
- Kim, Y. K., Back, S. H., Rho, J., Lee, S. H. et Jang, S. K. (2001). La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic acids research*, 29(24), 5009-5016.
- Kiss, T. (2002). Small nucleolar RNAs: An abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*, 109(2), 145-148.
- Kroutter, E. N., Belancio, V. P., Wagstaff, B. J. et Roy-Engel, A. M. (2009). The RNA polymerase dictates ORF1 requirement and timing of LINE and SINE retrotransposition. *PLoS genetics*, 5(4), e1000458.
- Kunkel, G. R. et Danzeiser, D. A. (1992). Formation of a template committed complex on the promoter of a gene for the U6 small nuclear RNA from the human requires multiple sequence elements, including the distal region. *The Journal of biological chemistry*, 267(20), 14250-14258.
- Labbé, J. C., Burgess, J., Rokeach, L. A. et Hekimi, S. (2000). ROP-1, an RNA quality-control pathway component, affects caenorhabditis elegans dauer formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), 13233-13238.
- Labbé, J. C., Hekimi, S. et Rokeach, L. A. (1999). The levels of the RoRNP-associated Y RNA are dependent upon the presence of ROP-1, the caenorhabditis elegans Ro60 protein. *Genetics*, 151(1), 143-150.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczký, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Showkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R.

S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y. J. et International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.

Langley, A. R., Chambers, H., Christov, C. P. et Krude, T. (2010). Ribonucleoprotein particles containing non-coding Y RNAs, Ro60, Ia and nucleolin are not required for Y RNA function in DNA replication. *PLoS one*, 5(10), e13673.

Lawley, W., Doherty, A., Denniss, S., Chauhan, D., Pruijn, G., van Venrooij, W. J., Lunec, J. et Herbert, K. (2000). Rapid lupus autoantigen relocalization and reactive oxygen species accumulation following ultraviolet irradiation of human keratinocytes. *Rheumatology (Oxford, England)*, 39(3), 253-261.

Lee, L. A., Alvarez, K., Gross, T. et Harley, J. B. (1996). The recognition of human 60-kDa ro ribonucleoprotein particles by antibodies associated with cutaneous lupus and neonatal lupus. *The Journal of investigative dermatology*, 107(2), 225-228.

Lerner, M. R., Boyle, J. A., Hardin, J. A. et Steitz, J. A. (1981). Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4480), 400-402.

Lerner, M. R. et Steitz, J. A. (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(11), 5495-5499.

- Lin-Marq, N. et Clarkson, S. G. (1998). Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in xenopus extracts depleted of la protein. *The EMBO journal*, 17(7), 2033-2041.
- Liu, J., He, L., Collins, I., Ge, H., Libutti, D., Li, J., Egly, J. M. et Levens, D. (2000). The FBP interacting repressor targets TFIIF to inhibit activated transcription. *Molecular cell*, 5(2), 331-341.
- Madhani, H. D. et Guthrie, C. (1992). A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell*, 71(5), 803-817.
- Mamula, M. J., Silverman, E. D., Laxer, R. M., Bentur, L., Isacovics, B. et Hardin, J. A. (1989). Human monoclonal anti-la antibodies. the la protein resides on a subset of ro particles. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 143(9), 2923-2928.
- Maraia, R., Sakulich, A. L., Brinkmann, E. et Green, E. D. (1996). Gene encoding human ro-associated autoantigen Y5 RNA. *Nucleic acids research*, 24(18), 3552-3559.
- Maraia, R. J., Sasaki-Tozawa, N., Driscoll, C. T., Green, E. D. et Darlington, G. J. (1994). The human Y4 small cytoplasmic RNA gene is controlled by upstream elements and resides on chromosome 7 with all other hY scRNA genes. *Nucleic acids research*, 22(15), 3045-3052.
- Martin, S. L., Bushman, D., Wang, F., Li, P. W., Walker, A., Cumiskey, J., Branciforte, D. et Williams, M. C. (2008). A single amino acid substitution in ORF1 dramatically decreases L1 retrotransposition and provides insight into nucleic acid chaperone activity. *Nucleic acids research*, 36(18), 5845-5854.
- Matera, A. G., Frey, M. R., Margelot, K. et Wolin, S. L. (1995). A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *The Journal of cell biology*, 129(5), 1181-1193.
- Matera, A. G., Terns, R. M. et Terns, M. P. (2007). Non-coding RNAs: Lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(3), 209-220.
- Mathews, M. B. et Francoeur, A. M. (1984). La antigen recognizes and binds to the 3'-oligoridylate tail of a small RNA. *Molecular and cellular biology*, 4(6), 1134-1140.
- Meiri, E., Levy, A., Benjamin, H., Ben-David, M., Cohen, L., Dov, A., Dromi, N., Elyakim, E., Yerushalmi, N., Zion, O., Lithwick-Yanai, G. et Sitbon, E. (2010). Discovery of microRNAs and other small RNAs in solid tumors. *Nucleic acids research*, 38(18), 6234-6246.

Michael, W. M., Eder, P. S. et Dreyfuss, G. (1997). The K nuclear shuttling domain: A novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *The EMBO journal*, 16(12), 3587-3598.

Mongelard, F. et Bouvet, P. (2007). Nucleolin: A multiFACeTed protein. *Trends in cell biology*, 17(2), 80-86.

Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M. R., Brown, D. G., Brown, S. D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R. D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A. T., Church, D. M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F. S., Cook, L. L., Copley, R. R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K. D., Deri, J., Dermitzakis, E. T., Dewey, C., Dickens, N. J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D. M., Eddy, S. R., Elnitski, L., Emes, R. D., Eswara, P., Eyas, E., Felsenfeld, A., Fewell, G. A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W. N., Fulton, L. A., Fulton, R. S., Furey, T. S., Gage, D., Gibbs, R. A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T. A., Green, E. D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R. C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L. W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D. B., Johnson, L. S., Jones, M., Jones, T. A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E. K., Karolchik, D., Kasprzyk, A., Kawai, J., Keibler, E., Kells, C., Kent, W. J., Kirby, A., Kolbe, D. L., Korf, I., Kucherlapati, R. S., Kulbokas, E. J., Kulp, D., Landers, T., Leger, J. P., Leonard, S., Letunic, I., Levine, R., Li, J., Li, M., Lloyd, C., Lucas, S., Ma, B., Maglott, D. R., Mardis, E. R., Matthews, L., Mauceli, E., Mayer, J. H., McCarthy, M., McCombie, W. R., McLaren, S., McLay, K., McPherson, J. D., Meldrim, J., Meredith, B., Mesirov, J. P., Miller, W., Miner, T. L., Mongin, E., Montgomery, K. T., Morgan, M., Mott, R., Mullikin, J. C., Muzny, D. M., Nash, W. E., Nelson, J. O., Nhan, M. N., Nicol, R., Ning, Z., Nusbaum, C., O'Connor, M. J., Okazaki, Y., Oliver, K., Overton-Larty, E., Pachter, L., Parra, G., Pepin, K. H., Peterson, J., Pevzner, P., Plumb, R., Pohl, C. S., Poliakov, A., Ponce, T. C., Ponting, C. P., Potter, S., Quail, M., Reymond, A., Roe, B. A., Roskin, K. M., Rubin, E. M., Rust, A. G., Santos, R., Sapojnikov, V., Schultz, B., Schultz, J., Schwartz, M. S., Schwartz, S., Scott, C., Seaman, S., Searle, S., Sharpe, T., Sheridan, A., Shownkeen, R., Sims, S., Singer, J. B., Slater, G., Smit, A., Smith, D. R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C., Suyama, M., Tesler, G., Thompson, J., Torrents, D., Trevaskis, E., Tromp, J., Ucla, C., Ureta-Vidal, A., Vinson, J. P., Von Niederhausern, A. C., Wade, C. M., Wall, M., Weber, R. J., Weiss, R. B., Wendl, M. C., West, A. P., Wetterstrand, K., Wheeler, R., Whelan, S., Wierzbowski, J., Willey, D., Williams, S., Wilson, R. K., Winter, E., Worley, K. C., Wyman, D., Yang, S., Yang, S. P., Zdobnov, E. M., Zody, M. C. et Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520-562.

Noël, J. F. (2006). *Identification de rétroseudogènes dérivés des ARN hY et étude de leur fonction dans l'épissage alternatif chez l'humain et recherche d'un homologue de la protéine RoBPI chez la levure *saccharomyces cerevisiae**. Université de Sherbrooke, Sherbrooke.

Notari, M., Neviani, P., Santhanam, R., Blaser, B. W., Chang, J. S., Galletta, A., Willis, A. E., Roy, D. C., Caligiuri, M. A., Marcucci, G. et Perrotti, D. (2006). A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. *Blood*, 107(6), 2507-2516.

O'Brien, C. A. et Harley, J. B. (1990). A subset of hY RNAs is associated with erythrocyte ro ribonucleoproteins. *The EMBO journal*, 9(11), 3683-3689.

O'Brien, C. A. et Harley, J. B. (1992). Association of hY4 pseudogenes with alu repeats and abundance of hY RNA-like sequences in the human genome. *Gene*, 116(2), 285-289.

O'Brien, C. A. et Wolin, S. L. (1994). A possible role for the 60-kD ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes & development*, 8(23), 2891-2903.

Ohshima, K., Koishi, R., Matsuo, M. et Okada, N. (1993). Several short interspersed repetitive elements (SINES) in distant species may have originated from a common ancestral retrovirus: Characterization of a squid SINE and a possible mechanism for generation of tRNA-derived retroposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13), 6260-6264.

Ostareck-Lederer, A. et Ostareck, D. H. (2004). Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: The function of hnRNPs K and E1/E2. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 96(6), 407-411.

Ostertag, E. M. et Kazazian, H. H., Jr (2001). Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 35501-538.

Ostrowski, J., Schullery, D. S., Denisenko, O. N., Higaki, Y., Watts, J., Aebersold, R., Stempka, L., Gschwendt, M. et Bomsztyk, K. (2000). Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogenous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. *The Journal of biological chemistry*, 275(5), 3619-3628.

Page-McCaw, P. S., Amonlirdviman, K. et Sharp, P. A. (1999). PUF60: A novel U2AF65-related splicing activity. *RNA (New York, N.Y.)*, 5(12), 1548-1560.

Park, J. M., Kohn, M. J., Bruinsma, M. W., Vech, C., Intine, R. V., Fuhrmann, S., Grinberg, A., Mukherjee, I., Love, P. E., Ko, M. S., DePamphilis, M. L. et Maraia, R. J. (2006). The multifunctional RNA-binding protein Ia is required for mouse development and for the establishment of embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*, 26(4), 1445-1451.

Peek, R., Pruijn, G. J., van der Kemp, A. J. et van Venrooij, W. J. (1993). Subcellular distribution of ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *Journal of cell science*, 106 (Pt 3)(Pt 3), 929-935.

- Peene, I., Meheus, L., Veys, E. M. et De Keyser, F. (2002). Diagnostic associations in a large and consecutively identified population positive for anti-SSA and/or anti-SSB: The range of associated diseases differs according to the detailed serotype. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61(12), 1090-1094.
- Pellizzoni, L., Lotti, F., Rutjes, S. A. et Pierandrei-Amaldi, P. (1998). Involvement of the *xenopus laevis* Ro60 autoantigen in the alternative interaction of Ia and CNBP proteins with the 5'UTR of L4 ribosomal protein mRNA. *Journal of Molecular Biology*, 281(4), 593-608.
- Perreault, J. (2007). *Étude génomique des ARN hY et exploration de leur biologie et de leur application potentielle*. Université de Sherbrooke, Sherbrooke.
- Perreault, J., Noel, J. F., Briere, F., Cousineau, B., Lucier, J. F., Perreault, J. P. et Boire, G. (2005). Retropseudogenes derived from the human Ro/SS-A autoantigen-associated hY RNAs. *Nucleic acids research*, 33(6), 2032-2041.
- Perreault, J., Perreault, J. P. et Boire, G. (2007). Ro-associated Y RNAs in metazoans: Evolution and diversification. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1678-1689.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
- Presutti, C., Rosati, J., Vincenti, S. et Nasi, S. (2006). Non coding RNA and brain. *BMC neuroscience*, 7 Suppl 1S5.
- Provost, T. T. et Reichlin, M. (1981). Antinuclear antibody-negative systemic lupus erythematosus. I. anti-ro(SSA) and anti-la(SSB) antibodies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 4(1), 84-89.
- Pruijn, G. J., Simons, F. H. et van Venrooij, W. J. (1997). Intracellular localization and nucleocytoplasmic transport of ro RNP components. *European journal of cell biology*, 74(2), 123-132.
- Rader, M. D., Coddling, C. et Reichlin, M. (1989). Differences in the fine specificity of anti-ro (SS-A) in relation to the presence of other precipitating autoantibodies. *Arthritis and Rheumatism*, 32(12), 1563-1571.
- Reichow, S. L., Hamma, T., Ferre-D'Amare, A. R. et Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic acids research*, 35(5), 1452-1464.
- Rutjes, S. A., Lund, E., van der Heijden, A., Grimm, C., van Venrooij, W. J. et Pruijn, G. J. (2001). Identification of a novel cis-acting RNA element involved in nuclear export of hY RNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(5), 741-752.

Schmid, C. W. (1998). Does SINE evolution preclude alu function? *Nucleic acids research*, 26(20), 4541-4550.

Shastry, B. S. (1993). Gene expression: Surprises from the class III side. *Molecular and cellular biochemistry*, 124(1), 85-89.

Shi, H., O'Brien, C. A.; Van Horn, D. J. et Wolin, S. L. (1996). A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the ro and la autoantigens. *RNA (New York, N.Y.)*, 2(8), 769-784.

Simons, F. H., Pruijn, G. J. et van Venrooij, W. J. (1994). Analysis of the intracellular localization and assembly of ro ribonucleoprotein particles by microinjection into xenopus laevis oocytes. *The Journal of cell biology*, 125(5), 981-988.

Singh, R., Valcarcel, J. et Green, M. R. (1995). Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5214), 1173-1176.

Spellman, R., Rideau, A., Matlin, A., Gooding, C., Robinson, F., McGlincy, N., Grellscheid, S. N., Southby, J., Wollerton, M. et Smith, C. W. (2005). Regulation of alternative splicing by PTB and associated factors. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 3), 457-460.

Spriggs, K. A., Mitchell, S. A. et Willis, A. E. (2005). Investigation of interactions of polypyrimidine tract-binding protein with artificial internal ribosome entry segments. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 6), 1483-1486.

Stein, A. J., Fuchs, G., Fu, C., Wolin, S. L. et Reinisch, K. M. (2005). Structural insights into RNA quality control: The ro autoantigen binds misfolded RNAs via its central cavity. *Cell*, 121(4), 529-539.

Teunissen, S. W., Kruithof, M. J., Farris, A. D., Harley, J. B., Venrooij, W. J. et Pruijn, G. J. (2000). Conserved features of Y RNAs: A comparison of experimentally derived secondary structures. *Nucleic acids research*, 28(2), 610-619.

van Venrooij, W. J. et Pruijn, G. J. (1995). Ribonucleoprotein complexes as autoantigens. *Current opinion in immunology*, 7(6), 819-824.

van Zon, A., Mossink, M. H., Scheper, R. J., Sonneveld, P. et Wiemer, E. A. (2003). The vault complex. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60(9), 1828-1837.

Vanin, E. F. (1985). Processed pseudogenes: Characteristics and evolution. *Annual Review of Genetics*, 19, 253-272.

Wallace, N., Wagstaff, B. J., Deininger, P. L. et Roy-Engel, A. M. (2008). LINE-1 ORF1 protein enhances alu SINE retrotransposition. *Gene*, 419(1-2), 1-6.

Walter, P. et Blobel, G. (1982). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, 299(5885), 691-698.

Weiner, A. M., Deininger, P. L. et Efstratiadis, A. (1986). Nonviral retroposons: Genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annual Review of Biochemistry*, 55:631-661.

Will, C. L. et Luhrmann, R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Current opinion in cell biology*, 13(3), 290-301.

Williams, D. B. (2006). Beyond lectins: The calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*, 119(Pt 4), 615-623.

Wolin, S. L. et Cedervall, T. (2002). The la protein. *Annual Review of Biochemistry*, 71:375-403.

Wolin, S. L. et Steitz, J. A. (1983). Genes for two small cytoplasmic ro RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell*, 32(3), 735-744.

Wolin, S. L. et Steitz, J. A. (1984). The ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: Identification of the antigenic protein and its binding site on the ro RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(7), 1996-2000.

Xue, D., Shi, H., Smith, J. D., Chen, X., Noe, D. A., Cedervall, T., Yang, D. D., Eynon, E., Brash, D. E., Kashgarian, M., Flavell, R. A. et Wolin, S. L. (2003). A lupus-like syndrome develops in mice lacking the ro 60-kDa protein, a major lupus autoantigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 7503-7508.

Yoo, C. J. et Wolin, S. L. (1994). La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: A yeast homolog of the la autoantigen is dispensable for growth. *Molecular and cellular biology*, 14(8), 5412-5424.