

Université de Montréal

Éponges à microARN, artificielles ou naturelles, dans le contexte de la transformation tumorale

par
Lian Mignacca

Département de biochimie et médecine moléculaire
Université de Montréal

Thèse présentée à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de docteur
en biochimie et médecine moléculaire

Août 2020

© Lian Mignacca, 2020

Résumé

La sénescence se caractérise par un arrêt en phase G1/S du cycle cellulaire et peut être induit par une variété de stress tels que des télomères trop courts, l'activation d'oncogène ou encore à cause de stress oxydatifs. Cette réponse cellulaire s'accompagne de profonds changements au niveau de l'expression génique et les ARN non codants sont d'importants acteurs de ceux-ci. Bien que cette catégorie d'ARN ait longtemps été considérée comme un sous-produit non fonctionnel de la transcription, on sait maintenant qu'ils sont impliqués dans une pléthore de fonctions essentielles à l'homéostasie de la cellule.

Les microARN (miR), de petits ARN non codants d'une vingtaine de nucléotides, sont souvent diminués ou surexprimés dans les maladies, soulignant leurs rôles importants dans le développement de celles-ci. C'est le cas notamment de deux oncomirs, miR-19 et miR-155, qui s'accumulent de manière aberrante dans les cancers hématopoïétiques. En condition normale, STAT5A, qui est souvent dérégulé dans ces cancers, induit SOCS1 qui agit comme un frein sur cette voie de signalisation afin de prévenir une prolifération incontrôlée. Des travaux conduits dans notre laboratoire montrent que SOCS1 est aussi impliqué dans la sénescence, car il est capable d'activer p53, un important suppresseur tumoral. SOCS1 peut être ciblé par les deux oncomirs et nos résultats montrent qu'une inhibition de ces derniers à l'aide d'éponges artificielles favorisait l'accumulation d'un p53 actif. De plus, en intégrant le ribozyme à tête de marteau dans la conception des éponges, nous avons créé une nouvelle génération d'outils (éponges catalytiques) qui sont plus efficaces. Effectivement, l'utilisation de ces éponges contre miR-155 résultait en une diminution de la prolifération, de formation de colonie ainsi que de la migration de cellule de myélome multiple.

En second lieu, nous nous sommes penchés sur l'étude d'éponges naturelles dans le contexte de la sénescence. Il existe en effet quelques exemples de lARNnc (Long Non-Coding RNA) qui peuvent agir de la sorte pour un miR donné. Nous pensons que c'est par ce mécanisme de régulation que miR-146a, un miR impliqué dans la réponse anti-inflammatoire, peut s'accumuler dans la sénescence induite par RAS sans toutefois sembler être pleinement actif. Effectivement, les cellules sénescents sécrètent une variété de facteurs pro-inflammatoires. À l'aide d'une nouvelle technique nommée miR-CLIP, nous avons pu étudier l'interactome de miR-146a et avons identifié plusieurs lARNnc qui selon des outils de prédiction, semblent s'hybrider de manière extensive en région 3' du miR. Ceci est requis pour l'initiation d'un TDMD (Target-

Directed miR Degradation) et nous avons donc investigué la possibilité d'un tel évènement dans la régulation de miR-146a. Nos résultats montrent que la surexpression de *XXBAC-B444P24.13* mène à une diminution des niveaux de miR-146a qui n'est pas due à une baisse de sa transcription.

Bien que le premier article illustre les avantages d'une éponge catalytique artificielle, le second article suggère que cette stratégie pourrait déjà être en place dans les systèmes biologiques, et ce, de manière naturelle. En effet, une fois miR-146a lié à *XXBAC-B444P24.13*, ce dernier induirait la dégradation du miR par un TDMD. Ceci ouvre donc la porte au développement d'outils qui pourraient être plus performants à des niveaux d'expression plus bas.

Mots-clés: miR, lARNnc, sénescence, SOCS1, p53, miR-19, miR-146a, miR-155, miR-CLIP, éponges artificielles, éponges naturelles, TDMD

Abstract

Cellular senescence is characterized by a cell cycle arrest in the G1/S phase and can be induced by a variety of stresses which include telomere shortening, oncogene activation or oxidative stress. Its establishment is known to require changes in the genetic expression program and non-coding RNA play an important part in this phenomenon. For a long time, this RNA subtype was considered to only be a transcriptional byproduct, but we now know that they are involved in a plethora of functions which are essential to cell homeostasis.

Various diseases display aberrant expression of microRNA (miR), small non-coding RNA of 18-22 nucleotides, suggesting they are involved in their development. Such is the case for miR-19 and miR-155, two oncomirs which are found to be overexpressed in hematopoietic cancers. In normal conditions, STAT5A, which is often found dysregulated in those cancers, induces SOCS1 which acts as a retro-inhibitor of this signaling pathway, preventing uncontrolled proliferation. Furthermore, our lab has shown that SOCS1 can also be involved in senescence by facilitating p53 activation. SOCS1 can be targeted by both oncomirs and our results show that artificial sponges, that inhibit miR-19 or miR-155's functions, lead to the activation of p53. Also, we have incorporated the hammerhead ribozyme in the miR binding sites in the sponge, creating a sponge 2.0 (catalytic sponges). Expressing the latter in a multiple myeloma cell line (RPMI8226) resulted in less proliferation, colony formation and migration.

Secondly, we aimed at studying natural sponges in the context of senescence. Indeed, there are quite a few examples of lncRNA (Long Non-Coding RNA) acting as a miRNA inhibitor by quenching them. We think that this mode of regulation could provide an explanation as to how an anti-inflammatory miR, miR-146a, can accumulate in senescence even though it is a pro-inflammatory response. Using a novel technique called miR-CLIP, we were able to study specifically miR-146a's interactome and have found that it can interact with many lncRNAs. Interestingly, using computational tools, we noticed that miR-146a was predicted to interact with extensive 3' end hybridization with a number of these lncRNA. This characteristic is known to be required to induce TDMD (Target-Directed miR Degradation). Indeed, when we overexpressed *XXBAC-B444P24.13*, miR-146a levels went down and this is not caused by a decrease in transcription of the miR.

In the first part of this thesis, we show that artificial catalytic sponges have an advantage over a more “classical” design. This is further supported by the fact that this strategy seems to be employed in nature. Indeed, we might have uncovered a lncRNA that when bound to by miR-146a would lead to its degradation using TDMD. This could be taken advantage of in the development of new tools for miR inhibition that would be more powerful and could be potentially used at lower levels of expression.

Keywords: miR, lncRNA, senescence, SOCS1, p53, miR-19, miR-146a, miR-155, miR-CLIP, artificial sponges, natural sponges, TDMD

Table des matières

RESUME	II
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIERES	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE D'ABREVIATIONS	XII
REMERCIEMENTS.....	XVIII
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Les microARN	1
1.1.1 Biogenèse des microARN	1
1.1.2 Fonctions des microARN	5
1.2 Inflammation	9
1.2.1 Cellules composant le système immunitaire.....	9
1.2.2 La sénescence et le SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype)	12
1.2.3 L'axe p53-SOCS1.....	14
1.2.4 MiR dans la sénescence	15
1.2.5 MiR-155.....	16
1.2.6 MiR-19.....	20
1.2.7 MiR-146a	23
1.2.8 CeRNA	26
1.3 Les longs ARN non codants.....	32
1.3.1 Biogenèse et fonctions.....	32
1.3.2 Micropeptides	36
1.4 Objectifs de la thèse.....	37
2. SPONGES AGAINST MIR-19 AND MIR-155 REACTIVATE THE P53-SOCS1 AXIS IN HEMATOPOIETIC CANCERS	38

2.1	Présentation de l'article 1	39
2.2	Article 1	40
2.2.1	Abstract.....	41
2.2.2	Introduction.....	42
2.2.3	Results.....	43
2.2.4	Discussion.....	51
2.2.5	Materials and methods.....	53
2.2.6	References.....	57
3.	MIR-146A'S FUNCTION IS REGULATED BY THE LNCRNA SAMIT IN RAS-INDUCED SENESCENCE	60
3.1	Présentation de l'article 2	61
3.2	Article 2	62
3.2.1	Abstract.....	63
3.2.2	Introduction.....	64
3.3.3	Results.....	66
3.3.4	Discussion.....	75
3.3.5	Materials and methods.....	77
3.3.6	References.....	82
4.	DISCUSSION	87
4.1	Discussion du chapitre 2	87
4.1.1	Résumé des résultats présentés dans le chapitre 2.....	87
4.1.2	Implication de miR-19 et miR-155 dans l'axe antitumoral p53/socs1.....	88
4.1.3	Dasatinib et anti-miR-155, une combinaison gagnante dans les traitements anti-cancer?.....	89
4.1.4	Une éponge 2.0?.....	91
4.2	Discussion du chapitre 3	91
4.2.1	Résumé des résultats présentés dans le chapitre 3.....	91

4.2.2 MiR-146a régule plusieurs lARNnc dans la sénescence induite par RAS.....	92
4.2.3 Plusieurs lARNnc pourraient à leur tour réguler miR-146a dans la sénescence induite par RAS	94
4.2.4 Relation de miR-146a et de son transcrit primaire; un loop d'autorégulation?	98
4.3. Conclusion	100
ANNEXE 1 – PHOSPHORYLATION OF SOCS1 INHIBITS THE SOCS1–P53 TUMOR SUPPRESSOR AXIS	102
BIBLIOGRAPHIE	I

Liste des tableaux

Tableau 1.1 MiR liés à l'inflammation	10
Tableau 1.2 MiR-155 dans la résistance aux traitements contre le cancer	20
Tableau 1.3 Les membres du polycistron miR-17-92 dans le développement, les cancers et autres maladies	23
Supplementary Table 2.1 (S2.1) Forward and reverse primers used for qPCR.....	55
Table 3.1 Predicted transcripts to interact with miR-146a	70

Liste des figures

Chapitre 1 Introduction

Figure 1.1 Caractéristiques d'un pre-miARN.....	2
Figure 1.2 Type de liaison du <i>seed</i> avec sa cible.....	6
Figure 1.3 Impact de la région après le « <i>seed</i> » dans la répression d'une cible pour un miR donné.....	7
Figure 1.4 Cellules du système immunitaire.....	10
Figure 1.5 MiR impliqués dans la sénescence ainsi que leurs cibles.....	16
Figure 1.6 MiR-17-92 et ses paralogues.....	21
Figure 1.7 Facteurs de transcription qui régulent la famille miR-146.....	24
Figure 1.8 Modèle proposé par Denzler et al. et Bosson et al. afin d'illustrer les conditions requises pour un possible effet ceRNA.....	29
Figure 1.9 Classification des longs ARN non codants selon leur origine dans le génome.....	33

Chapitre 2 Article 1

Figure 2.1 A constitutively active form of STAT5A induces miR-19 and miR-155.	44
Figure 2.2 LPS treatment induces STAT5A, miR-19 and miR-155 in Raw264.7 cells.	45
Figure 2.3 MicroRNA sponges against miR-19 or miR-155 stabilize SOCS1 protein and increase p53 phosphorylation and activity in response to doxorubicin and LPS.....	47
Figure 2.4 Catalytic sponges against miR-155 inhibit the transformed phenotype of human myeloma cells.	49
Figure 2.5 The catalytic sponge effect is dependent on the p53 pathway.	50
Figure 2.6 MiRNA sponges restore normal balance between growth inhibitory and growth promoting pathways.....	52

Chapitre 3 Article 2

Figure 3.1 MiR-146a regulates many lncRNAs in RAS senescence.....	67
Figure 3.2 Purification of miR-146a interactome by the miR-CLIP technique.....	69
Figure 3.3 Bootstrap analysis for miR-CLIP data.....	70
Figure 3.4 MiR-146a interacts with many lncRNA through extensive 3' end binding.....	72

Figure 3.5 MiR-146a's function in RAS senescent cells is inhibited by lncRNA that induces the TDMD response.....	74
Figure S3.1 MiR-146a is enriched by RIP-AGO and the miR-CLIP technique.....	86

Chapitre 4 Discussion

Figure 4.1 Ligation du miR à sa cible dans la méthode CLASH.....	96
Figure 4.2 Comparatif de la distribution des sites de liaisons pour les miR sur les lARNnc ou les ARNm.	97
Figure 4.3 MIR3142HG contient un site de liaison pour miR-146a prédit par l'outil bio-informatique <i>RNA hybrid</i>	98

Liste d'abréviations

3'UTR	<i>3' Untranslated Region</i>
ADAR	<i>Adenosine Deaminase Acting on RNA</i>
AGO	<i>Protein Argonaute</i>
AIB1	<i>Amplified in Breast Cancer 1 protein</i>
Aicda	<i>Activation Induced Cytidine Deaminase</i>
AIRN	<i>Antisense of IFGR2 non-protein coding RNA</i>
Akt	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>
ALL	<i>Acute lymphocytic leukemia</i>
AML	<i>Acute Myeloid leukemia</i>
ANRIL	<i>Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ATLL	<i>Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	<i>Adénosine triphosphate</i>
AVL	<i>Avian Leukosis Virus</i>
BACE1AS	<i>Beta-Secretase 1 antisense</i>
BCL-2	<i>B-Cell CLL/Lymphoma 2</i>
BCL-W	<i>BLC2 Like 2</i>
BCL-XL	<i>BCL2 Like 1</i>
BIC	<i>B-cell Integration Cluster</i>
BRAF	<i>B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>
BRAFP1	<i>BRAF pseudogene 1</i>
CAF1	<i>CCR4-Associated Factor 1</i>
CBX7	<i>Chromobox Protein Homolog 7</i>
CCL18	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 18</i>
CCR4	<i>Chemokine (C-C) Receptor 4</i>
CD13	<i>Aminopeptidase N</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CDK4/6	<i>Cyclin dependent kinase 4/6</i>
CDKN2B	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B</i>
CDR1as	<i>CDR1 Antisense RNA</i>
ceRNA	<i>Competing Endogenous RNA</i>
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP Synthetase</i>
circRNA	<i>Circular RNA</i>
ciRS-7	<i>Circular RNA Sponge for miR-7</i>
CLASH	<i>Crosslinking, ligation, and sequencing of hybrids</i>

CLL	<i>Chronic lymphocytic leukemia</i>
CSR	<i>Class Switch Recombination</i>
CTCL	<i>Cutaneous T-Cell lymphoma</i>
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindol</i>
DBR1	<i>Debranching RNA Lariat 1</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesion Molecules</i>
dCas9	<i>Dead Cas9</i>
DCP1	<i>Decapping mRNA 1A</i>
DCP2	<i>Decapping mRNA 2</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i>
DLBCL	<i>Diffuse Large B-Cell lymphoma</i>
DLBCL	<i>Diffuse Large B-Cell Lymphoma</i>
DNMT3a	<i>DNA Methyltransferase 3 alpha</i>
DRT	<i>Derepression Threshold</i>
EC	<i>Endometrial Cancer</i>
EDC4	<i>Enhancer of mRNA Decapping 4</i>
eGFP	<i>Enhanced green fluorescence protein</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
EZH2	<i>Enhancer of Zest Homolog 2</i>
gRNA	<i>Guide RNA</i>
GSK3b	<i>Glycogen Synthase Kinase 3b</i>
HCMV	<i>Human Cytomegalovirus</i>
HDAC1	<i>Histone Deacetylase 1</i>
HDAC3	<i>Histone deacetylase 3</i>
HITS-CLIP	<i>High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslink immunoprecipitation</i>
HMCV	<i>Human Cytomegalovirus</i>
HMW-RISC	<i>High molecular weight RISC</i>
hnRNPA1	<i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1</i>
HNRNPL	<i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L</i>
HOXB8	<i>Homeobox B8</i>
HPS90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
HSC70	<i>Heat Shock Cognate 71 kDa protein</i>
HVS	<i>Herpesvirus saimiri</i>
IC ₅₀	<i>Concentration inhibitrice médiane</i>
IFN-g	<i>Interferon gamma</i>
Igf2r	<i>Insulin Like Growth Factor 2 Receptor</i>

IL-1 β	<i>Interleukin-1 beta</i>
IRAK1	<i>Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 1</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
LIN28B	<i>Protein Lin-28 Homolog B</i>
linc-MD1	<i>Long Intergenic non-coding RNA, Muscle Differentiation 1</i>
Linc-RoR	<i>Long Intergenic non-coding RNA Regulator of Reprogramming</i>
lincRNA-EPS	<i>LincRNA erythroid prosurvival</i>
LMW-RISC	<i>Low molecular weight RISC</i>
lncRNA	<i>Long Non-Coding RNA</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAML1	<i>Mastermind Like Protein 1</i>
MAPK/ERK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MEF2C	<i>Myocyte Enhancer Factor 2C</i>
miR	<i>microARN</i>
miR*	<i>Passenger strand</i>
MIR3142HG	<i>MIR3142 Host Gene</i>
miRDE	<i>microRNA decay element</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MRE	<i>microRNA Recognition Site</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NANOG	<i>Nanog Homeobox</i>
ncRNA	<i>Non-coding RNA</i>
NEAT1	<i>Nuclear Enriched Abundant Transcript 1</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NIFK-AS1	<i>NIFK Antisense RNA 1</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NMSL	<i>Non-miRNA Stem Loop</i>
NoBody	<i>Non-Annotated P-body dissociating polypeptide</i>
NORAD	<i>Non-coding RNA activated by DNA damage</i>
NSCLC	<i>Non-Small-Cell Lung Carcinoma</i>
Nt	<i>Nucléotide</i>
NTA	<i>Non-templated nucleotide addition</i>
OCT4	<i>Octamer -Binding Protein 4</i>
ORF	<i>Open Reading Frsame</i>
p38 MAPK	<i>p38 Mitogene Activated Protein Kinase</i>
PABPC	<i>Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic 1</i>
PAN2	<i>PAN Deadenylation Complex Subunit 2</i>

PAN3	<i>PAN Deadenylation Complex Subunit 3</i>
Pb	<i>Paire de base</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PRC1	<i>Polycomb Repressive Complex 1</i>
PRC2	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
Pre-miRNA	<i>microARN précurseur</i>
Pri-miRNA	<i>microARN primaire</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PTENP1	<i>Phosphatase and Tensin Homolog Pseudogene 1</i>
PUM1	<i>Pumilio-1</i>
PUM2	<i>Pumilio-2</i>
PVT1	<i>Plasmacytoma Variant Translocation 1</i>
Qki	<i>Protéine Quacking</i>
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
SA- β -Gal	<i>Senescence associated β-galactosidase</i>
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatin foci</i>
SAPD	<i>Senescence associated protein degradation</i>
SASP	<i>Senescence associated secretory phenotype</i>
SerpinE1	<i>Serpin Family E member 1</i>
SHARP	<i>SMART/HDAC1-Associated Repressor Protein</i>
SHIP1	<i>Src Homology 2 domain containing Inositol polyphosphate 5'-phosphatase 1</i>
SHM	<i>Somatic Hypermutation</i>
shRNA	<i>Small Hairpin RNA</i>
SLERT	<i>Small nucleolar RNA (snoRNA)-ended lncRNA that enhances pre-ribosomal RNA transcription</i>
SMRT	<i>Nuclear Receptor Corepressor 2</i>
SNHG16	<i>Small Nucleolar RNA Host Gene 16</i>
snoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
SOX2	<i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
SPAR	<i>Small regulatory Polypeptide of Amino acid Response</i>
ssRNA	<i>Single Stranded RNA</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STING	<i>Stimulator of Interferon Genes</i>
TA _{app}	<i>Apparent Target Abundance</i>
TAM	<i>Tumor associated macrophages</i>

TDMD	<i>Target Directed miRNA Degradation</i>
Th1	<i>T Helper cells</i>
TNF-a	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TRAF6	<i>TNF Receptor Associated Factor 6</i>
Treg	<i>Regulatory T-Cell</i>
TRNC6	<i>Trinucleotide Repeat Containing 6A</i>
TUT1	<i>Terminal Uridyltransferase 1</i>
TUT2	<i>Terminal Uridyltransferase 2</i>
TUT3	<i>Terminal Uridyltransferase 3</i>
TUT4	<i>Terminal Uridyltransferase 4</i>
TUT7	<i>Terminal Uridyltransferase 7</i>
VAD	<i>Very Long Antisense to Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>
Xist	<i>X inactive specific transcript</i>
XRN1	<i>5'-3' Exoribonuclease 1</i>
YYI	<i>Yin and Yang 1</i>

Je dédie cette thèse à mes parents

Remerciements

Le doctorat est un processus long et fastidieux, cependant, malgré les moments difficiles avec lesquels il faut composer, notre parcours est parsemé de personnes extraordinaires qui rendent l'expérience inoubliable.

J'aimerais commencer par remercier mon directeur de recherche, Gerardo Ferbeyre. Mon parcours dans votre labo a commencé par un stage d'été et tout de suite j'ai su que je voulais continuer dans cet environnement très stimulant, avec une atmosphère de travail plus qu'agréable et avec une équipe dynamique. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir donné cette opportunité, d'avoir cru en moi et en mon projet ainsi que d'avoir partagé avec moi votre enthousiasme pour la science. Nous sommes passés par des moments pas toujours évidents, mais votre optimisme a toujours su me redonner espoir. Votre mémoire exceptionnelle pour tout ce que vous lisez dans les papiers me laissera toujours pantoise et j'ai beaucoup d'admiration pour la manière dont vous arrivez à gérer les projets de tous avec un si gros labo.

Véro, toi qui m'accompagnes depuis le tout début, un gros merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Je ne peux imaginer quelle différence cela aurait fait si tu n'avais pas fait partie de mon cheminement. Tes précieux conseils ainsi que ton esprit critique hors du commun ont été des atouts importants dans la progression de mes projets. Ce labo est vraiment chanceux de t'avoir parmi ses membres!

Mon cher Stéphane, j'aimerais débiter en te disant que tout est une question de contexte! Tu dois être une des personnes avec qui j'ai eu le plus de fous rires dans le labo, merci pour ces beaux moments qui sont si importants quand le moral y est moins. C'est dommage que dans mes derniers moments au labo, le déménagement m'ait enlevé un si bon voisin de bench... Tu es quelqu'un de très brillant et je te souhaite beaucoup de succès pour la suite des choses!

Marie-Camille, ça m'a vraiment fait plaisir d'avoir fait un bout de chemin avec toi! Ton excellent esprit scientifique m'a toujours impressionné, tu travailles fort et je suis sûre que l'avenir ne te réserve que du bon. Merci pour ta bonne humeur et pour tes conseils!

Ana, quelle joie d'avoir pu travailler à tes côtés! Ton humour et ton rire communicatif ont égayé bien de mes journées! Tu n'as pas un projet facile, mais tu es persévérante et je suis sûre

que tous tes efforts seront grandement récompensés. Je te souhaite beaucoup de succès pour la suite!

Neylen, j'espère que la vie te mènera là où tu le souhaites, merci d'avoir mis de la vie dans le laboratoire ainsi que pendant les soirées karaoké! ☺

Séb, merci pour ton esprit critique ainsi que pour nos longues conversations sur divers sujets. Je ne te souhaite que le meilleur pour la suite des choses.

Merci à ceux que j'ai côtoyés, mais moins longtemps. Paloma, je ne te souhaite que le meilleur pour la suite des choses et merci pour les belles découvertes culinaires brésiliennes! Tony, tu as un projet super et j'espère que ça te mènera à de belles découvertes. Jacob, j'espère que la vie te mènera à accomplir les projets que tu souhaites, bonne continuation. Guillaume, merci pour ta passion pour la science ainsi que pour celle du cirque. Ce fut un plaisir de te côtoyer! Camille, merci pour les discussions sur absolument tout et rien. Ta bonne humeur et ton humour ont grandement contribué à rendre le laboratoire moins vide après le déménagement au CHUM.

Merci aux anciens du laboratoire. Xavier, pour ta bonne humeur contagieuse ainsi que pour ta passion pour la science. Mathieu, merci de m'avoir initié au monde de la bench et de m'avoir accordé de ton temps. Geneviève, merci pour ton humour sarcastique à souhait et pour nos longues discussions. Benji, merci pour tes nombreux conseils. Merci à Marie-France, Olga et Maxime.

Emma, ma belle amie. Mon parcours n'aurait pu être le même sans toi. Nous avons partagé le même quotidien pendant plusieurs années et je ne peux t'exprimer à quel point ton amitié m'est chère! Tu es une scientifique que j'admire beaucoup et je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée. Merci aussi pour tous ces beaux moments que nous avons partagés (au lab, mais aussi en dehors) et merci pour les belles aventures de camping, de hiking et ainsi que pour les beaux voyages au Guatemala et en Europe de l'Est.

Mariana, toi qui as guidé mes premiers pas pour les western blots! ☺ Tu m'impressionneras toujours par ta force de caractère ainsi que ta résilience. Ce que tu as accompli pendant ton doc tout en gérant tout ce qui se passait dans ta vie personnelle me laissera toujours sans voix, tu es une personne que j'admire beaucoup! Ton petit Lucca est bien chanceux d'avoir une maman telle que toi! Je vous aime beaucoup!

Fred, par où commencer? Nous sommes arrivés dans le labo à peu près en même temps. Je ne savais pas encore à ce moment à quel point nous serions chanceux de t'avoir. Tu es vraiment un scientifique hors pair et j'ai vraiment apprécié pouvoir travailler à tes côtés pendant ces quelques années. J'admire beaucoup ta rigueur et ton esprit scientifique et je ne te souhaite que le meilleur pour la suite de ta carrière. Ton humour laissera aussi sa marque, tes jokes crues du matin, mon café à peine entamé, me manqueront beaucoup! ☺ Merci pour tout!

Merci aussi à tous les autres qui ont rendu ces années beaucoup plus agréables. Je pense à Maxime, Charline, Aurélien, Sam, Nasim, Florence, Thomas, Étienne, Éric. Sans vous, les partys n'auraient pu être les mêmes, merci pour tous ces beaux souvenirs. Fadi, merci d'avoir été là, d'avoir écouté mes milliards d'histoires de trapèze, d'avoir écouté mes découragements de toutes mes tentatives de miR-CLIP échouées, d'avoir toujours (ou presque) su quoi me dire pour me redonner le moral! C'est vraiment précieux d'avoir eu quelqu'un comme toi avec qui vivre cette aventure.

Mention spéciale au labo d'enseignement avec qui j'ai pu vivre des belles expériences ainsi que travailler sur ma croissance personnelle. Merci de m'avoir donné ces opportunités!

Je voudrais aussi remercier ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée dans ce processus. Papa, maman, votre enthousiasme face à ce gros projet que je termine enfin a fait toute la différence du monde et vos nombreux encouragements m'ont toujours donné le petit « boost » dont j'avais besoin. Je suis vraiment chanceuse de vous avoir à mes côtés! Sophie, merci pour tes encouragements et nos séances de trapèze!

Merci aussi à ma belle-famille qui m'a soutenue tout au long de mon parcours. Vous avoir dans ma vie est un vrai bonheur!

David, tu resteras la plus belle rencontre de toutes dans tout ce parcours. Merci pour ton soutien indéfectible tout au long de ce processus. Merci de croire en moi et d'être là pour moi à toute heure de la journée. Plein de beaux projets nous attendent pour la suite, j'ai hâte de vivre ça avec toi!

1. Introduction

1.1 Les microARN

Pendant longtemps, même s'ils composent la majorité de notre génome, les ARN non codants étaient considérés comme un sous-produit non fonctionnel de la transcription. On sait maintenant qu'ils sont essentiels au bon fonctionnement de la cellule et qu'ils sont impliqués dans une pléthore de fonctions cellulaires. En effet, plusieurs études montrent qu'une mauvaise régulation de leurs fonctions peut être impliquée dans diverses maladies ainsi que dans des défauts du développement. Il est prédit que plus de 60% des gènes qui codent pour des protéines chez l'humain ont des sites de liaison pour les miR, il est clair donc qu'ils sont cruciaux pour l'homéostasie de la cellule (1, 2).

1.1.1 Biogenèse des microARN

Les microARN (miR) sont de petits ARN non codants de 18-24 nucléotides (nt). Ils sont généralement transcrits par l'ARN polymérase II afin de produire un miR primaire (pri-miR) qui peut être long d'une centaine de nucléotides, mais qui atteint parfois plusieurs kilobases. Puisqu'il est produit par l'ARN polymérase II, ce transcrit contiendra une coiffe et possiblement une queue PolyA bien que dans plusieurs cas il n'y en ait pas puisque la transcription est couplée au processus de maturation (1, 3). Le miR primaire sera clivé, au noyau, par le microprocesseur composé d'une RNase de type III nommée DROSHA ainsi que de son cofacteur DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) afin de donner lieu à un miR précurseur (pre-miR) d'environ 70 nt de long. C'est le microprocesseur qui déterminera si une tige-boucle doit ou non poursuivre la voie de maturation des miR. Pour ce faire, plusieurs caractéristiques seront prises en compte. Tout d'abord, la tige devra avoir une longueur de 35 ± 1 paires de bases (pb) et devra être principalement exempte de mésappariements quoique certains seront tolérés. Les régions adjacentes à la tige devront être simple brin. Finalement, quatre motifs différents favoriseront sa maturation; 1) un UG à la base de la tige, 2) un GHG contenant un mésappariement central en position 8 de la tige (où H représente n'importe quelle base sauf un G), 3) un UGU apical et 4) un motif CNNC flanquant la tige. Le microprocesseur clivera la tige-boucle aux positions des nt 13 et nt 11 calculées à partir de la jonction ssARN (single-stranded RNA)-tige (4, 5).

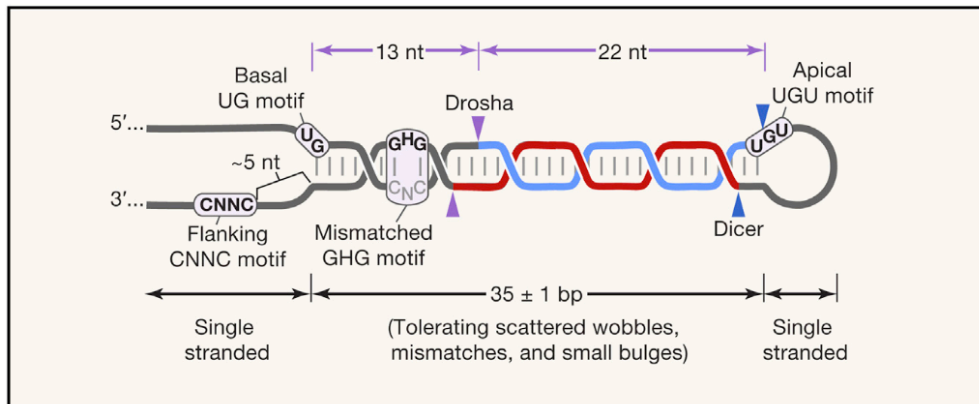


Figure 1.1 Caractéristiques d'un pre-miARN

Caractéristiques d'une tige-boucle qui seront reconnues par les protéines impliquées dans le processus de maturation d'un miR. Figure tirée de Bartel, 2018 (1)

Ce pre-miARN sera par la suite exporté vers le cytoplasme par Exportin-5 couplé à RAN-GTP où il y sera ultimement clivé par DICER, une RNase de type III. Ceci donnera lieu à un intermédiaire d'ARN double-brin qui sera chargé dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) à l'aide des protéines chaperons HSP90/HSC70 (Heat Shock Protein 90/Heat Shock Cognate 71 kDa protein) (1, 2, 6, 7). Avec l'aide de l'ATP, ces dernières aideront Argonaute (AGO), un membre du complexe RISC, à adopter une conformation ouverte afin d'accueillir le chargement de l'ARN double-brin. Le retour à la conformation fermée expulsera du complexe le brin passager (miR*) et le brin restant (brin guide) pourra guider la machinerie vers ses différentes cibles (1, 8). Le choix du brin guide versus le brin passager sera déterminé par la stabilité thermodynamique en 5' : le brin ayant le moins de stabilité sera choisi (9, 10).

Bien qu'on les retrouve principalement dans des régions intergéniques, environ un tiers des miR sont encodés dans les introns de gènes codant pour des protéines. Toutefois, une portion de ces miR suivra une voie de maturation un peu différente et sera catégorisée sous le nom de mirtron (11-13). Le pre-miR proviendra d'un intron « lasso » qui sera linéarisé par DBR1 (Debranching RNA Lariat 1), une enzyme de débranchement. La première étape de clivage par le microprocesseur ne sera donc pas requise. Dans certains cas, les mirtrons contiendront une queue qui sera enlevée par des nucléases avant de poursuivre le processus de maturation. L'exosome sera responsable des queues en 3' alors que les nucléases requises pour enlever les queues en 5' ne sont

pas connues. Une fois ces étapes accomplies, la tige-boucle suivra les mêmes étapes de maturation que pour un miR canonique (13).

Tout au long de leur maturation, les miR pourront être clivés de manière alternative, soit par DROSHA ou par DICER, créant des variants de différentes longueurs qu'on appelle isomiR. De surcroît, ces isomiRs pourront aussi être produits par un phénomène nommé NTA (Non-Templated nucleotide Addition) qui consiste principalement en l'ajout d'adénosine ou d'uridine en 3' du miR (2). Les enzymes catalysant ces ajouts sont les TUT (Terminal Uridyltransferase); TUT2 (adénylation), TUT4 (uridylation), TUT3 (adénylation), TUT7 (uridylation) et TUT1 (adénylation ou uridylation) (14). Finalement, un changement de séquence A→I généré par l'enzyme ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA) est aussi impliqué dans la production d'isomiR. Des changements en 5' du miR créeront des séquences de « seed alternatif » qui pourront changer les ARNm ciblés tandis que les changements en 3' du miR affecteront la stabilité de l'interaction des miR avec leurs cibles (2). Ces changements peuvent affecter entièrement la réponse cellulaire comme c'est le cas pour miR-222. En effet, les travaux de Yu et al. montrent qu'il y a une grande hétérogénéité dans la longueur de miR-222 qui est associé avec AGO; la taille de ceux-ci varie de 2-4 nt à l'extrémité 3'. Leurs résultats montrent que bien que tous les différents isomiRs induisent un arrêt de prolifération lorsque que transfecté, seul l'isomiR le plus long (miR-222CUCU) peut engendrer un effet apoptotique (15). De plus, il semblerait que différents profils d'isomiRs correspondraient à des types de cancers spécifiques; cela suggère qu'ils pourraient être utilisés comme biomarqueurs. Cependant, ce volet d'étude est encore préliminaire et plus de travail sera nécessaire afin de confirmer la valeur réelle de ces isomiRs.

Une fois le loci transcrit, les miR peuvent être soumis à une variété de mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. Il semble que la boucle terminale du miR soit un élément important dans la régulation de la maturation puisqu'elle sert de plateforme permettant la liaison de différentes protéines pouvant réguler l'activité du microprocesseur. C'est notamment le cas de LIN28B (Protein Lin-28 Homolog B) qui peut lier la boucle de pre-let-7 et ainsi empêcher le bon recrutement du microprocesseur. Cela mène à la diminution de la production d'un let-7 mature (16, 17). De manière similaire, HNRNPA1 (Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein A1) peut aussi agir sur la maturation de let-7 en se liant à cette boucle. Par contre, HNRNPA1 peut avoir l'effet contraire et favoriser la maturation de miR-18a de manière spécifique. Malgré le fait que ce dernier est encodé dans un polycistron contenant cinq autres membres, la liaison de HNRNPA1 au

miR-18a n'accroît la maturation que de ce dernier en relaxant sa structure proche du site de clivage de DROSHA (18). La séquence des miR peut aussi jouer un rôle primordial, c'est pourquoi la réaction de déamination catalysée par l'enzyme ADAR peut être impliquée dans la régulation de la maturation. Par exemple, une modification A-à-I dans la tige de miR-142 diminue le clivage par DROSHA et donc la maturation subséquente du miR (19). Une déamination dans la tige peut aussi mener à une diminution du clivage par DICER comme dans le cas de miR-151 (20). Par ailleurs, la localisation des différents intermédiaires des miR peut aussi jouer un rôle dans le processus de maturation. Il est connu qu'EXPORTIN-5 est limitant; ainsi, certains pre-miARN resteront au noyau, entravant le reste de la maturation (21-23). Des modifications post-traductionnelles peuvent aussi influencer l'activité des facteurs impliqués dans la voie de maturation des miR. Par exemple, DGCR8, DROSHA et AGO peuvent être phosphorylés, ubiquitinés ou même sumoylés (2, 24). Ces modifications peuvent influencer la localisation de ces protéines, comme c'est notamment le cas pour DROSHA, qui doit être phosphorylé par GSK3 (β Glycogen Synthase Kinase 3) afin de localiser au noyau (25, 26). DGCR8 peut être déacétylé par HDAC1 (Histone Deacetylase 1) ce qui résulte en une affinité accrue de ce dernier pour les pri-miR (27). Finalement, il faut tenir compte de diverses voies de signalisation dans cette fine régulation. Par exemple, il a été montré que p53, une protéine de suppression tumorale, pouvait promouvoir la maturation d'un sous-ensemble spécifique de miR (28, 29).

Les niveaux des miR peuvent également être finement régulés au niveau de leur stabilité. Comme mentionné plus tôt, le phénomène de NTA peut influencer celle-ci. C'est le cas notamment de miR-122 qui est monoadénylé par l'enzyme TUT2, une poly(A) polymérase cytoplasmique, ce qui mène à une stabilité accrue du miR (30). Dans certains cas, l'inverse se produit et l'adénylation mène à une déstabilisation du miR comme c'est le cas pour miR-21 (31). En revanche, l'uridylation mène plus généralement à une déstabilisation du miR (2). Par exemple, l'uridylation de miR-26b médiée par TUT4 résulte en atténuation de la régulation des cibles de ce miR (32). Une fois le miR chargé dans le complexe RISC, sa stabilité est grandement accrue, car ses extrémités sont protégées de la dégradation par les nucléases. Il est connu que les niveaux d'AGO sont limitants dans la cellule et donc que les niveaux de celui-ci peuvent aussi affecter la stabilité des miR (33). Finalement, selon l'étendue de l'hybridation en région 3' du miR avec sa cible, une réaction de dégradation du miR enclenchée par la cible nommée TDMD ou *Target-Induced miRNA degradation* pourra se mettre en branle. Ce phénomène fut caractérisé pour la première fois chez

la drosophile ainsi que dans des cellules de mammifères (34). À ce jour, il est connu que certains éléments sont requis afin d'engendrer ce mécanisme de dégradation des miR : le « *seed* » du miR doit être apparié, ceci doit être suivi par un renflement de moins de six nucléotides chez le miR et finalement, la région 3' du miR doit être appariée de manière extensive. C'est le cas notamment de *CYRANO* qui peut initier la dégradation de miR-7 et ainsi influencer l'activité neuronale (35). Il a aussi été montré que *libra/Nrep* pouvait cibler miR-29b affectant ainsi le comportement des poissons-zèbres ainsi que des souris (36). De manière intéressante, les ARN viraux peuvent aussi tirer avantage de ce mécanisme afin de déstabiliser certains miR cellulaires. Par exemple, HVS (*Herpesvirus saimiri*) peut cibler miR-27 et mener à sa dégradation par un processus de TDMD et ainsi favoriser sa propagation. En effet, ce miR est connu pour réguler des gènes qui sont importants pour l'activation des cellules T, un composant crucial dans la génération d'une réponse antivirale (37, 38). Certaines études montrent que le TDMD peut s'accompagner du « *tailing* » des miR et que ceci peut être catalysé par les enzymes TUT décrites plus haut. L'accumulation d'espèces raccourcies en leur extrémité 3' suggèrent aussi que les miR assujettis au TDMD pourraient passer par un processus de « *trimming* ». Différentes exonucléases pourraient être impliquées dans ce processus notamment PNPase, PARN et DIS3L2 (pour une dégradation 3'→5') et XRN-1 (pour une dégradation 5'→3') (39). Il n'est cependant pas clair si ces intermédiaires plus longs (auxquels on a ajouté une queue par du « *tailing* ») sont absolument requis pour la bonne génération d'une réponse TDMD. En effet, il a été montré que *CYRANO* pouvait être adénylé lors du TDMD. Cette adénylation serait catalysée par l'enzyme TUT2 et la perte de cette dernière préviendrait l'ajout de groupement adénosine au miR-7, mais ne changerait pas la proportion des miR plus courts (*trimmed*) ni n'affecterait les niveaux de miR-7. Ceci suggère que l'ajout de A ou U pourrait ne pas être requis pour générer un TDMD (35).

1.1.2 Fonctions des microARN

La fonction des miR est dépendante de leur interaction avec leurs cibles. Ils les reconnaissent principalement à travers leur région « *seed* » qui se trouve entre les nucléotides 2 à 8 (40). La plupart des sites de reconnaissance des miR (MRE) pour leurs cibles se retrouvent dans le 3'UTR (3' Untranslated Region) de celles-ci. Plusieurs différents types de liaisons du « *seed* » avec leurs cibles sont décrites:

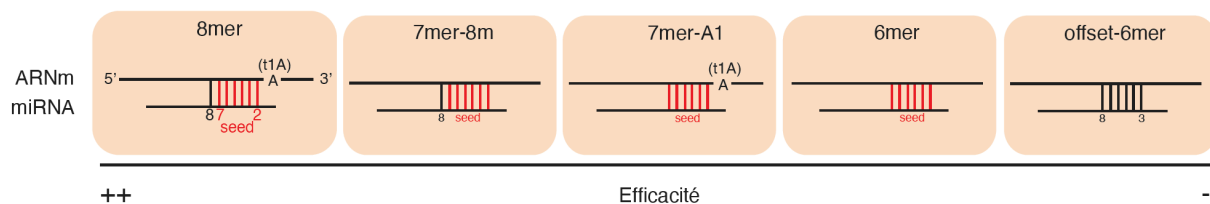


Figure 1.2 Type de liaison du *seed* avec sa cible

Un miR reconnaît sa cible par sa région *seed* et celle-ci peut s’hybrider de manière différente avec un site de reconnaissance donné. L’appariement avec le plus d’affinité est le 8-mer où l’on retrouve le *seed* (nt2-7) et le nt 8 qui sont appariés ainsi qu’une adénosine dans l’ARNm en position 1 du miR. Plus on réduit ces éléments de reconnaissance, moins efficace devient le site de liaison. Inspiré de Bartel, 2009 (41).

Il existe une préférence pour un résidu A en position opposée au nt 1 du miR (t1A) qui par sa présence augmente l’affinité du miR pour sa cible. Le nucléotide t1A augmente en fait la stabilité de l’interaction AGO2:cible et ce, une fois que le contact *seed*:cible est effectué (42). En effet, AGO2 contient une poche qui permet d’accommoder le nucléotide t1 (peu importe lequel), mais qui ne crée spécifiquement des liaisons hydrogène qu’avec le résidu N6 d’une adénosine. Ce sont ces liaisons qui augmentent la stabilité de l’interaction avec l’ARNm (42, 43). La région « *seed* » est la portion la plus conservée d’un miR (44). Puisque c’est une petite séquence, un miR pourra reconnaître une multitude de cibles et ces dernières pourront être reconnues par une variété de miR. Si ces sites se retrouvent de 8 à 40 nt l’un de l’autre, les miR pourront même agir de manière coopérative (45, 46). Bien que la région « *seed* » soit cruciale pour la reconnaissance des cibles, la région 3’ d’un miR peut aussi, quoique de manière modérée, contribuer à celle-ci et dans certains cas compenser pour un « *seed* » plus court ou pour un « *seed* » contenant des mésappariements. Néanmoins, un appariement extensif en région 3’ du miR sans liaison du « *seed* » n’est généralement pas suffisant pour induire une régulation du transcrite (1, 41, 47). De plus, il a été montré que c’est la région 3’ du miR qui guide ceux-ci à un réservoir de cibles bien précis. C’est ainsi que des membres d’une même famille, soit des miR qui partagent un même « *seed* », ne ciblent pas nécessairement les mêmes ARNm (48). Les travaux de Yan et al. ont mis en lumière l’importance de différentes régions en 3’ du miR dans l’habileté d’un miR à réprimer une cible donnée. Afin d’étudier l’impact d’un appariement dans la région après le « *seed* », les auteurs ont divisé celle-ci en quatre modules différents :

Comme mentionné plus tôt, le mode principal de régulation d'ARNm par les miR chez les mammifères ne requiert pas de complémentarité complète avec la cible et mène à une inhibition de la traduction ainsi qu'à la déstabilisation de l'ARNm par une activité exonucléase (1, 43, 53). Celle-ci est initiée par le recrutement par AGO (Protein Argonaute) de TNRC6 (Trinucleotide Repeat Containing 6A) qui interagira avec PABPC (Poly(A) Binding Protein Cytoplasmic 1). Les déadénylases d'ARNm PAN2-PAN3 (PAN Deadenylation Complex Subunit 2 and 3) et CCR4-NOT (Chemokine (C-C) Receptor 4 and CCR4-Associated Factor 1) pourront être à leur tour recrutées et il en résultera un raccourcissement de la queue Poly(A) qui mènera à l'enlèvement de la coiffe par DCP1:DCP2 (Decapping mRNA 1A and Decapping mRNA 2) et à une dégradation subséquente du transcrite par une activité exonucléase 5'→3' de XRN1 (5'-3' Exoribonuclease 1) (1, 53).

La répression de la traduction est un effet bien connu de la régulation des ARNm par les miR et elle s'enclenche très tôt dans le processus. Cependant, son effet reste plutôt faible et la dégradation du transcrite est l'effet dominant de la régulation par les miR chez les mammifères (66% à >90%) (54, 55). Chez les plantes, les miR ont généralement une complémentarité plus extensive avec leurs cibles et ceci résulte en une activité endonucléase des protéines AGO du complexe RISC, on parle alors ici d'activité « slicer ». Bien que ce soit un mode de régulation très utilisé chez les plantes, il est plutôt rare de l'observer chez les mammifères (2, 50). Néanmoins, quelques exemples existent, c'est le cas notamment de miR-196 qui peut lier le transcrite du gène *HOXB8* (Homeobox B8) de manière presque parfaite à l'exception d'une paire de bases qui suit les règles de l'appariement wobble (G : U). Cela mène à la dégradation endonucléasique de l'ARNm de *HOXB8* (56). Hansen et al. ont mis en lumière le rôle de miR-671 dans la régulation d'un ARN circulaire, *CDRIAS* (CDR1 Antisense RNA), qui est exprimé dans le cerveau chez l'humain et la souris. L'appariement presque parfaite du miR pour ce transcrite mène à sa dégradation due à l'activité « slicer » d'AGO2 (57).

De manière intéressante, Dallaire et al. ont montré que le même miR peut avoir différentes fonctions selon les stades du développement ainsi que le contexte cellulaire dans lequel il est exprimé. Par exemple, miR-228 et miR-35 ont un effet stabilisateur sur leurs cibles dans des cellules germinales alors que ces mêmes miR, dans des cellules somatiques, ont un effet déstabilisateur. Leurs travaux suggèrent que ces différences d'effets seraient dues à une composition distincte des protéine qui interagissent avec miRISC (58).

1.2 Inflammation

L'inflammation est la réponse du système immunitaire à une panoplie de stimuli néfastes. Ces derniers peuvent inclure des pathogènes, des dommages cellulaires ou encore une exposition à des composés toxiques. Généralement, une exposition à ces facteurs contribuera à générer une réponse inflammatoire aiguë qui aura pour but de restaurer l'homéostasie du tissu (59). Cependant, cette réponse peut devenir incontrôlée et l'on observera alors une transition à de l'inflammation chronique qui sera à l'origine d'une variété de maladies telles que les cancers, le diabète, l'obésité ainsi que des maladies cardiovasculaires, pulmonaires ou encore neurologiques (60).

1.2.1 Cellules composant le système immunitaire

Le système immunitaire se divise en deux catégories : inné et adaptatif. Le système inné représente notre première ligne de défense contre les pathogènes et cette réponse implique les neutrophiles, les macrophages et les monocytes. Le système adaptatif quant à lui consiste en une réponse antigène spécifique qui s'établit par l'action des lymphocytes T ou B. Cette réponse est souvent plus lente que celle générée par le système inné (elle peut prendre plusieurs jours voire même semaines afin de se développer), elle a cependant l'avantage de conserver une mémoire des antigènes rencontrés. Ainsi les réponses subséquentes à ces derniers seront beaucoup plus rapides.

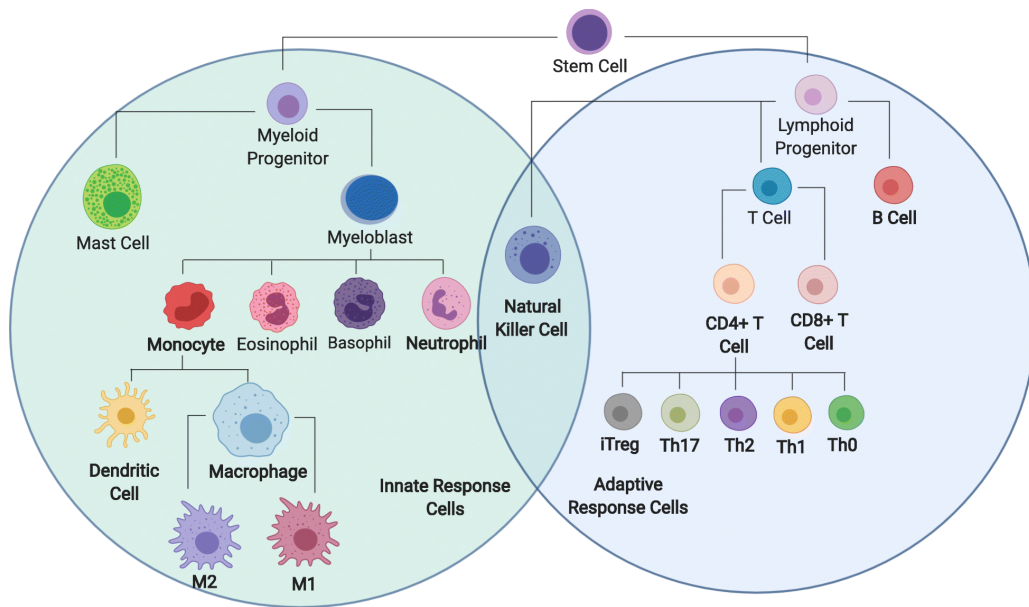


Figure 1.4 Cellules du système immunitaire

Représentation des cellules formant le système immunitaire. Les cellules souches hématopoïétiques se différencieront en cellules progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes avant de se différencier davantage pour donner lieu aux cellules impliquées dans la réponse immunitaire innée ou adaptative. Tiré de Torang et al., 2019 (61).

Les miR jouent des rôles cruciaux dans le système immunitaire. Ils sont en effet impliqués dans une multitude de facettes telles que dans le développement, la maturation, l'activation, le bon fonctionnement ainsi que le vieillissement de diverses cellules immunitaires (62). Comme mentionné plus tôt, la réponse immunitaire doit être finement régulée afin de prévenir les effets néfastes que pourrait avoir une inflammation persistante et plusieurs miR sont impliqués dans cette régulation :

Tableau 1.1 MiR liés à l'inflammation

(adapté de Nejad et al., 2018 (63))

miRNA	Targets	Anti/pro-inflammatory
let-7a	IL-6	Anti
let-7b	TLR4, IL6, IGF2BP2	Both
let-7e	TLR4	Anti
let-7i	TLR4	Anti
miR-9	p50, JAK1	Anti

Tableau 1.1 (Suite)

miRNA	Targets	Anti/pro-inflammatory
miR-10	IRAK4, TAK1 AND BTRC	Anti
miR-17/20a	SIRP α , IL-8, TRAF2, cIAP1, cIAP2, USP2, PSMD13, VLDLR	Both
miR-18	PIAS3, TNFAIP3	Pro
miR-19	TNFAIP3, RNF11, KDM2, ZBTB16, SOCS3, TNF α , PTEN, SOCS1, A20, ABCA1, BIM	Both
miR-21	PTEN, GSK3 β , PDCD4, IL-12p35	Both
miR-23a	IKK α	Anti
miR-23b	IKK α , TAB2, TAB3	Anti
miR-24	p110 δ , CHI3L1	Both
miR-26	MALT1, HMGA1, PTEN, TAK1, TAB3, HMGB1, COX-2	Both
miR-27	MCPIP1	Both
miR-33	HIF1 α , ABCA1, ABCG1	Pro
miR-34a	RCAN1, FoxOs	Anti
miR-124	p65, TRAF6, C/EBP- α , PU.1	Anti
miR-126	CYLD, TOM1, CXCL12	Both
miR-132	AChE, SIRT1	Both
miR-145	TIRAP, ADAM17, CD40	Both
miR-146a	TRAF6, IRAK1, IRAK2, FADD, IRAK4, RNF11	Both
miR-146b	TRAF6, IRAK1, IRAK2, MyD88, TLR4	Anti
miR-155	TAB2, MyD88, IKK ϵ , Ripk1, C/EBP β , eNOS, p65, SHIP1, SOCS1	Both
miR-181a	IL-1 α , ephrins (EphA5, EphA7, EphB)	Both
miR-181b	Importin-a3, TNF α , CYLD, ephrins (EphA5, EphA7, EphB)	Both
miR-203	MyD88, TNF α , IL-24, SOCS3	Anti
miR-221/222	TNFAIP3, SOCS1, SOCS3, IRF-2	Pro
miR-223	IKK α , granzyme B, Roquin, STAT3, Pknox1, NLRP3	Anti
miR-301	NKRF, CD69, PIAS3	Pro
miR-302b	IRAK4	Anti
miR-302d	IRF9	Anti
miR-320	NOD2, MMP13	Both
miR-340	JAK1, BCL1, Cyclin-D1, MMP2, IL-4	Anti
miR-674	MBNL13, PGM2L1, ENTPD6, MBNL3, CAMK1D, ALDH18A1	Pro
miR-1246	ACE2, PRKAR1A, PPP2CB, IGF2BP1	Both

*Les miR en **gras** sont impliqués dans l'inflammation ainsi que dans la sénescence.

Les facteurs pro-inflammatoires sont cruciaux dans la coordination des différents types cellulaires requis pour l'organisation de la réponse inflammatoire. Bien que les cellules qui composent le système immunitaire soient une source importante de ces facteurs, il n'en reste pas moins que d'autres types cellulaires peuvent aussi les sécréter. Par exemple, selon un stress donné, une cellule pourra entrer en sénescence et cet état est connu comme étant accompagné d'un profil sécrétoire qui est pro-inflammatoire (64).

1.2.2 La sénescence et le SASP (Senescence-Associated Secretary Phenotype)

La sénescence fut décrite pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorhead. Ces derniers avaient observé que des cellules gardées en culture sur une période prolongée ne proliféraient pas de manière infinie (65). Ce type de sénescence, que l'on nomme sénescence répllicative, s'enclenche lorsque les télomères, des structures que l'on retrouve au bout des chromosomes et qui raccourcissent à chaque division cellulaire, deviennent trop courts. Afin de préserver l'intégrité de l'information génétique, la cellule cessera de proliférer. Divers autres facteurs peuvent enclencher de manière prématurée ce mécanisme antitumoral. C'est le cas notamment des drogues cytotoxiques, de stress oxydatifs, des dommages à l'ADN et de l'activation d'oncogène (66). La sénescence se caractérise par un arrêt en phase G1/S du cycle cellulaire et est une réponse cellulaire dynamique qui comporte différents stades. La première phase que l'on nomme sénescence initiale, s'établit lorsque les voies de signalisation p16/Rb et/ou p53/p21 sont activées de manière robuste et prolongée ce qui se traduit par un arrêt du cycle cellulaire. La progression à un stade plus avancé, ou sénescence complète, requiert la diminution de la lamine B ce qui permet un remodelage de la chromatine et la production subséquente du SASP. Finalement, si ces cellules ne sont pas éliminées par le système immunitaire, elles peuvent atteindre un état de sénescence profond, lequel nécessite des changements génétiques et épigénétiques additionnels (67, 68).

En plus de la sénescence, l'apoptose, une mort cellulaire programmée, est un autre moyen par lequel la cellule pourra répondre à un stress donné. Le choix vers l'un ou l'autre semblerait dépendre de la sévérité ainsi que de la durée du stress inducteur. Par exemple, une exposition à un stress sévère induirait de l'apoptose alors qu'un stress plus modéré mènerait à de la sénescence. En effet, Spallarossa et al. ont montré que des cellules de cancer du sein (MCF7) entrent en

sénescence lorsque traitées avec de basses doses de doxorubicine, mais font de l'apoptose si exposées à de hautes doses (69). En fait, le choix de la réponse cellulaire semblerait dépendre des niveaux d'induction de p53, de sa cinétique ainsi que de son activité transcriptionnelle (70, 71). En outre, p53 serait plutôt impliqué dans l'établissement de la sénescence alors que la voie p16/Rb aurait un rôle dans la maintenance de cette réponse cellulaire. En effet, les niveaux de p53 diminuent une fois la sénescence induite alors que les niveaux de p16 restent élevés (71).

Un des effecteurs les plus importants de p53 est p21, un inhibiteur des CDK (Cyclin Dependent Kinase). Ce dernier est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et sa capacité à inhiber l'apoptose est aussi une fonction cruciale dans l'établissement de la sénescence. Par exemple, des traitements de cellules du cancer du côlon avec de hautes doses de doxorubicine induisent de l'apoptose et ces cellules expriment de bas niveaux de p21. Ces bas niveaux d'expression seraient le résultat d'une régulation négative initié par p53 à travers DNMT3a (DNA Methyltransferase 3 alpha). Ce dernier pourrait recruter HDAC1 au promoteur de p21 menant en une baisse subséquente des niveaux des groupements acétyle associés aux histones H3 et H4 (72). De manière intéressante, p21 peut aussi être activé de manière indépendante de p53. Effectivement, Aliouat-Denis et al. ont montré que CHK2 pouvait induire la transcription de p21 dans un contexte où p53 est non fonctionnel (HeLa; cancer du col de l'utérus, SK-BR-3; cancer du sein et HaCaT; lignée cellulaire de kératinocyte immortalisée spontanément) et que ceci pouvait induire de la sénescence (73).

La sénescence s'accompagne généralement d'un profil sécrétoire qui est riche en cytokines et chimiokines pro-inflammatoires nommé le SASP. Ce dernier est très hétérogène et varie selon le type d'induction de la sénescence ainsi que selon le type cellulaire qui le produit (74). De plus, son activation est liée à la réponse des dommages à l'ADN (75). De manière intéressante, son effet peut être bénéfique (recrutement du système immunitaire aux lésions pré-malignes, promotion de la réparation des tissus endommagés et renforcement de la sénescence de manière autocrine et paracrine) tout comme il peut être délétère (promotion de la prolifération, angiogenèse et inflammation) (64, 76). La sénescence induit plusieurs acteurs qui convergent vers l'activation de NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), un régulateur principal du SASP. Par exemple, suite à une exposition à un stress menant à la sénescence, p38MAPK est induit et favorise la transcription de plusieurs facteurs du SASP à travers NF- κ B (77). Les cellules sénescents ont aussi moins de lamine B réduisant ainsi l'intégrité de la membrane nucléaire. Ceci résulte en une accumulation

aberrante de fragments de chromatine dans le cytoplasme et mène à une activation subséquente de la voie cGAS/STING (Cyclic GMP-AMP Synthetase / Stimulator of Interferon Genes). La signalisation par cette voie peut ensuite jouer un rôle dans la production du SASP par l'activation de NF- κ B (78-80). Il est intéressant de noter que p53 contribue au SASP en induisant certains facteurs qui seront sécrétés, mais il est généralement considéré comme étant un régulateur négatif de ce phénotype. De surcroît, p53 atténue les caractéristiques oncogéniques (transition épithélio-mésenchymateuse, invasivité des cellules cancéreuses, stimulation de la prolifération des cellules pré-maligne/maligne) du SASP de manière cellulaire non autonome (81).

1.2.3 L'axe p53-SOCS1

Une exposition aux cytokines engendre la dimérisation des récepteurs tyrosine-kinase JAK (Janus Kinase) et favorise ainsi leur cross-phosphorylation et subséquente activation. Les groupements phosphates agissent comme site d'ancrage pour les protéines STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) qui une fois liées aux récepteurs JAK, pourront être activés pour ensuite transloquer au noyau en dimère afin d'activer la transcription de leurs gènes cibles. Ces derniers comprennent la famille SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) qui est composée de huit membres différents, SOCS1-7 et CIS, et qui sont d'importants régulateurs négatifs de cette cascade de signalisation (82).

Des travaux menés dans notre laboratoire ont montré que dans la sénescence induite par une forme constitutivement active de STAT5A, SOCS1 peut agir en tant que protéine adaptatrice entre ATM et p53 et ainsi faciliter l'activation de ce dernier en favorisant sa phosphorylation en sérine 15 par ATM (83). Des travaux plus récents menés par Saint-Germain et al. ont montré que l'interaction p53-SOCS1 est régulée par la phosphorylation en tyrosine 80 de SOCS1. Cette modification post-traductionnelle serait catalysée par la famille des kinases SRC et elle résulterait en une inhibition de l'interaction avec p53. Ce mécanisme de régulation de l'axe p53/SOCS1 par la famille des SRC pourrait expliquer pourquoi certaines tumeurs expriment de hauts niveaux de SOCS1 tout en ayant un p53 fonctionnel. C'est le cas notamment dans les lymphomes DLBCL (Diffuse Large B-Cell Lymphoma) où les auteurs montrent, par immunohistochimie sur des microréseaux de tissu, que SOCS1 est fortement phosphorylé en tyrosine 80 et que ces lymphomes expriment aussi les kinases SRC de manière plus marquée que dans les tissus normaux. Les auteurs montrent aussi que des traitements avec des inhibiteurs des SRC dans des cellules de DLBCL (SU-

DHL4) peuvent favoriser l'interaction p53/SOCS1. En outre, leurs résultats suggèrent que la phosphorylation en Y80 pourrait favoriser la formation de dimères de SOCS1 et que c'est par ce mécanisme que l'interaction avec p53 pourrait être prévenue (84).

De manière intéressante, SOCS1 pourrait aussi jouer un rôle dans la production du profil sécrétoire associé à la sénescence. Il est connu que SOCS1 peut inhiber NF- κ B, un facteur bien connu comme étant un régulateur maître du SASP, en se liant directement à p65 résultant en la dégradation de ce dernier (85, 86). Une étude conduite au laboratoire révèle que SOCS1 pourrait aussi réguler le SASP à travers p53. Effectivement, nous avons montré que SOCS1 pouvait influencer le patron d'expression génique contrôlé par p53 et que ce nouveau profil inclurait plusieurs facteurs qui seront sécrétés (87).

1.2.4 MiR dans la sénescence

Tel que mentionné plus tôt, les miR sont impliqués dans une myriade de fonctions cellulaires et la sénescence n'y fait pas exception. Il y a en effet plusieurs miR qui sont impliqués dans différentes facettes de la sénescence, que ce soit dans la voie p16/Rb, la voie p53/p21 ou encore dans la régulation du SASP. Voici un résumé des miR impliqués dans la sénescence ainsi que les cibles qu'ils régulent dans cette réponse cellulaire :

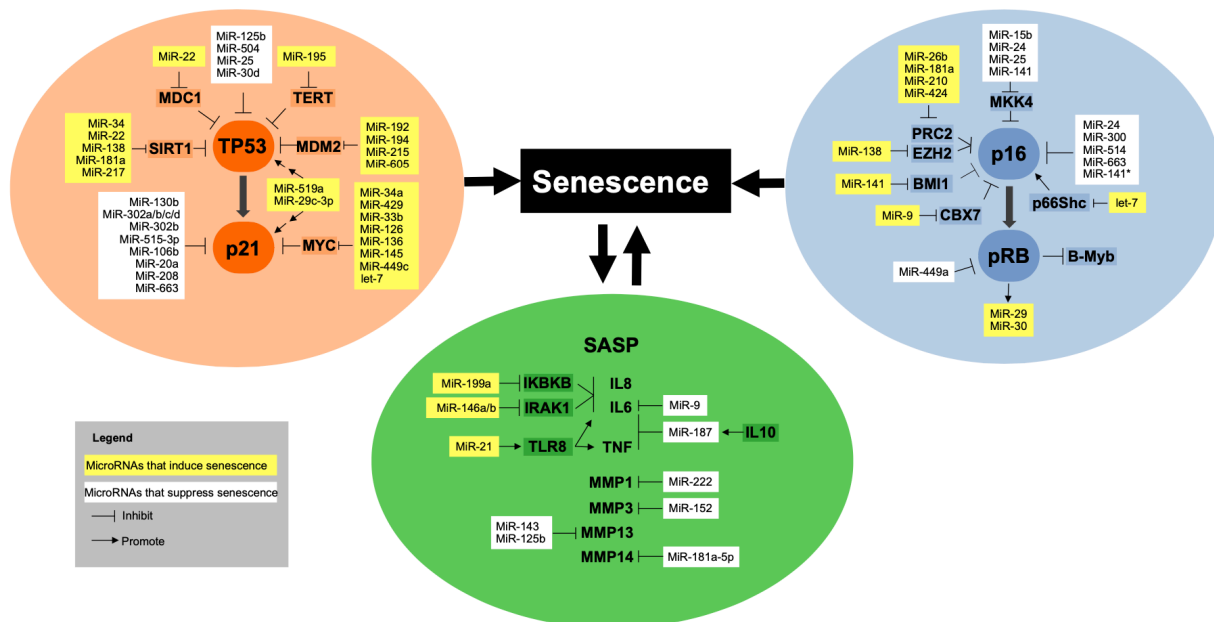


Figure 1.5 MiR impliqués dans la sénescence ainsi que leurs cibles.

Plusieurs miR jouent des rôles importants dans divers facettes de la sénescence. Ces miR peuvent intervenir dans deux voies de signalisation qui sont cruciales dans l'établissement ou le maintien de la sénescence (p53/p21 ou p16/Rb). Ils peuvent aussi réguler des membres importants impliqués dans le SASP, un phénotype sécrétoire pro-inflammatoire qui accompagne la sénescence. Tiré de Munk et al., 2017 (88).

1.2.5 MiR-155

Origine et fonctions

MiR-155 est encodé dans la région *BIC* (B-cell Integration cluster) du chromosome 21. Ce site était auparavant connu comme étant un site commun d'intégration rétrovirale d'AVL (Avian Leukosis Virus) causant des lymphomes des cellules B chez les poulets. Un peu plus tard, son homologue fut identifié chez l'humain et la souris. Ce fut la première démonstration qu'un ncRNA (non-coding RNA ou ARN non codant) pouvait être impliqué dans le processus de transformation puisque la caractérisation du transcrite a permis de démontrer qu'il ne contenait aucun ORF (Open Reading Frame). Par ailleurs, c'est par miR-155 que le transcrite *BIC* accomplit son action oncogénique, car c'est la partie la plus conservée du transcrite et miR-155 n'est exprimé que dans les cellules qui expriment aussi *BIC* (89, 90).

Ce miR est impliqué dans une pléthore de fonctions notamment dans l'immunité, autant innée qu'adaptative. En effet, diverses études montrent que miR-155 est induit suite à l'activation des lymphocytes B et T. Rodriguez et al. ont généré un modèle de souris déficientes pour Bic/miR-155 et ont observé que, bien que les souris étaient viables, elles avaient tendance à développer des pathologies reliées aux poumons (fibrose, remodelage des voies aériennes couramment associé avec des problèmes d'inflammation chronique, augmentation du nombre de leucocytes détectés par collecte des cellules non adhérentes des poumons) ainsi que de l'inflammation entérique. Ces observations suggèrent une fonction de miR-155 dans l'homéostasie du système immunitaire. De plus, l'immunité adaptative de ces souris est compromise, car un vaccin contre la bactérie *S. typhimurium* ne les protégeait pas contre cette infection, comme ce fut le cas pour les souris contrôles. Les auteurs ont montré que ce phénomène était le résultat des cellules dendritiques qui ne pouvaient accomplir leur fonction de présentation d'antigènes (91). Une autre étude dans des cellules de macrophages de souris (RAW 264.7) montre qu'une fois stimulées avec du LPS (Lipopolysaccharide), un composé que l'on retrouve sur la membrane externe des bactéries gram-négatives, les niveaux de miR-155 augmentent. Les auteurs observent aussi une augmentation de ce miR suite à des injections de LPS dans des souris C57BL/6 de type sauvage (92). Il semblerait que miR-155 jouerait un rôle dans la production de TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) en intervenant au niveau de l'ARNm. Les auteurs spéculent que cet effet serait le résultat d'une stabilité accrue du transcrite de TNF- α grâce à miR-155 (92). Ce miR est aussi impliqué dans la polarisation des macrophages. Ces derniers répondent aux signaux environnementaux en adoptant deux types de profils : le profil M1 qui est dit classique et qui est pro-inflammatoire et le profil M2 qui est dit alternatif et qui est anti-inflammatoire. MiR-155 est augmenté dans le profil M1 alors qu'il est réduit dans le profil M2 (93, 94). Il semble jouer un rôle pro-inflammatoire, car il régule environ 650 gènes pour ce phénotype. De plus, il est induit de manière rapide, lui permettant ainsi de cibler des régulateurs négatifs de l'inflammation tels que SOCS1 (Suppressor of Cytokine Signalling 1) et SHIP1 (Src Homology 2 domain containing Inositol polyphosphate 5'-phosphatase 1). À un stade plus avancé de la réponse inflammatoire, l'expression de miR-155 sera réprimée par la cytokine IL-10 (95).

Les premières indications montrant que miR-155 est oncogénique remontent à une quinzaine d'années avec une étude conduite par Metzler et al. qui montrait que ce miR était fortement exprimé dans des échantillons de lymphome de Burkitt chez l'enfant (96). Peu après,

une autre étude, par Eis et al., analysa différents échantillons provenant de patients atteints de DLBCL (Diffuse large B-cell lymphoma), CLL (Chronic lymphocytic leukemia) ou de lymphome des cellules B de la zone marginale. Les niveaux de miR-155 furent étudiés et il s'avéra que d'un patient à l'autre, les niveaux augmentaient, allant de deux à une cinquantaine fois plus élevé (90). Une étude de la même année reliait miR-155 au cancer du sein et depuis, plusieurs autres études mirent en lumière son rôle dans divers cancers hématologiques (DLBCL, Lymphome folliculaire, CLL, lymphome Hodgkinien, AML (Acute myeloid leukemia)) de même que dans des cancers « solides » (cancer du poumon, du colon, cervical, du pancréas) (97, 98).

Bien que son rôle soit oncogénique, il semblerait que son effet dépende de ses niveaux. Effectivement, les travaux de Narayan et al. montrent que selon les niveaux d'expression de miR-155 dans les cas d'AML, cela résulte en deux situations bien distinctes. De hauts niveaux d'expression mènent à une activation accrue de gènes pro-inflammatoires ainsi qu'à une diminution de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. En revanche, si miR-155 est exprimé à des niveaux intermédiaires, il aurait un rôle plus oncogénique. En effet, à ce niveau d'expression, les auteurs observent une diminution des gènes impliqués dans la différenciation des cellules myéloïdes, tels que *Cebpb*, *Spi1* et *Maf*, ainsi qu'une diminution des gènes qui sont souvent associés avec une perte de fonction dans les cas d'AML (*Pml* par exemple). De surcroît, une analyse des niveaux d'expression de miR-155 chez une cohorte de patients pédiatriques atteints d'AML révèle que l'expression moyenne de miR-155 atteint davantage des niveaux intermédiaires plutôt que de hauts niveaux, supportant un rôle oncogénique pour des niveaux intermédiaires de miR-155 (99). Un autre exemple qui soutient le fait que miR-155 cible différents ARNm selon ses niveaux totaux est celui de la stimulation par le LPS des macrophages de souris (RAW264.7). Suite à ces traitements, les niveaux de miR-155 augmentent sur une période de 48H. Une cible confirmée de miR-155 est *Qki* (Protéine Quacking) et comme attendu, elle diminue de manière assez rapide après les traitements au LPS. Cependant, passé une douzaine d'heures, ses niveaux reviennent au stade préstimulation, et ce même si miR-155 continue d'être augmenté. De surcroît, un antisense contre miR-155 augmente l'expression de *Qki* tôt après la stimulation, mais n'a plus d'effet lorsqu'administré plus tard (100).

MiR-155 joue aussi un rôle dans la réponse immunitaire contre le cancer. Selon le type cellulaire dans lequel il sera exprimé, sa présence à de hauts niveaux sera ou non délétère pour les cellules cancéreuses. En effet, il a été montré que miR-155 est impliqué dans l'accumulation des

MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) au sein des tumeurs. De plus, en ciblant *SOCS1* et *SHIP1* dans ce type cellulaire, miR-155 favoriserait une activité aberrante de STAT3 résultant en une prolifération cellulaire accrue ainsi que la croissance des tumeurs (101). Par ailleurs, une accumulation de miR-155 dans les Treg (Regulatory T-Cell), un autre type cellulaire qui crée un environnement immunosuppresseur au sein de la tumeur, serait requis pour un bon développement de ces cellules. En revanche, de hauts niveaux seraient bénéfiques dans le cas des TAM (Tumor associated macrophages) pour la polarisation de type M1 qui aurait des propriétés anti-tumorigéniques. Cette polarisation passerait par l'inhibition de la signalisation par IL-13, car miR-155 peut cibler son récepteur. En outre, ce miR cible aussi des effecteurs impliqués dans la polarisation de type M2 tels que *SOCS1*, *DC-SIGN* (Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesion Molecules), *CCL18* (C-C Motif Chemokine Ligand 18), *CD13* (Aminopeptidase N) et *SERPINE1* (Serpine Family E member 1). MiR-155 a également des effets bénéfiques chez les cellules dendritiques (DC) qui sont infiltrées dans la tumeur. Cet effet est dû à une bonne activation des cellules T chez lesquelles les DC favorisent une réponse antitumorale (102). Chez les cellules NK (Natural Killer), une bonne expression de miR-155 résulte en une production d'IFN- γ (Interféron gamma) dans le micro-environnement tumoral. L'IFN- γ participe à l'activation de l'immunité innée ainsi qu'acquise. Cette cytokine sert entre autres à recruter CD4⁺ (Th ou T Helper) et CD8⁺ (CTL ou Cytotoxic T Lymphocyte) dans ce micro-environnement. Les CD4⁺ seront impliquées dans l'élimination de la tumeur ainsi que dans l'activation des CD8⁺ afin qu'elles aussi agissent contre la tumeur. MiR-155 est aussi impliqué dans le bon fonctionnement des cellules CD8⁺ et ses niveaux sont cruciaux dans la réponse antitumorale de ces cellules (103).

Rôle dans la résistance aux traitements contre les cancers

Soit par divers mécanismes génétiques, épigénétiques ou par des changements dans le micro-environnement tumoral, le traitement des cancers peut donner lieu à de la résistance à ces traitements. MiR-155 est documenté comme étant impliqué dans le processus de résistance à différents traitements contre le cancer, et ce, dans une variété de cancers tels que le cancer du sein, de la prostate et CLL (97, 104-106).

Tableau 1.2 MiR-155 dans la résistance aux traitements contre le cancer

(adapté de Bayraktar et Van Roosbroeck, 2018 (97))

Target / Pathway	Cancer Type	Effect on resistance	Therapeutic agent
TP53	Lung cancer and leukemia cell	Induces chemoresistance	Cisplatin and doxorubicin
APAF1	Lung cancer	Induces chemoresistance	Cisplatin
WEE1	Endocervical adenocarcinoma	Induces chemoresistance	Cisplatin
FOXO3A	Breast cancer	Induces chemoresistance	Paclitaxel and doxorubicin
SMAD2	Cervical cancer	Induces chemosensitivity	Cisplatin
AKT et ERK	Lung cancer	Induces chemoresistance	Doxorubicin
GATA3	Prostate cancer cells	Induces chemoresistance	Paclitaxel
NRF2	Lung cancer	Increases arsenic trioxide resistance	Arsenic trioxide
FOXO3A	Lung cancer	Induces radioresistance	Irradiation
FOXO3A	Colorectal cancer	Induces radioresistance	Irradiation
HK2	Lung Cancer	Induces radioresistance	Irradiation
UBQLN1	Nasopharyngeal carcinoma	Induces radioresistance	Irradiation
RAD51	Triple-negative breast cancer	Reduces radioresistance	Irradiation
SMAD2	Lung cancer	Increases gefitinib resistance	Gefitinib
FOXO3A	Lung cancer	Increases gefitinib resistance	Gefitinib
SOCS6/STAT3	Breast cancer	Induces tamoxifen resistance	Tamoxifen

Par ailleurs, un anti-miR-155 est actuellement en essais cliniques en phase 2 pour le CTCL (Cutaneous T-Cell Lymphoma) (NCT03837457) et en phase 1 pour ATLL (Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma), DLBCL et CLL (NCT02580552) (107).

1.2.6 MiR-19

Polycistron miR-17-92

Le polycistron miR-17-92 se trouve sur le chromosome 13 et encode six miR différents appartenant à quatre familles différentes : miR-17 et miR-20a de la famille miR-17, miR-18a de la famille miR-18, miR-19a et miR-19b de la famille miR-19 ainsi que miR-92a de la famille miR-92. Il existe deux paralogues à ce polycistron (miR-106b-25, encodé sur le chromosome 7 et miR-106a-363, encodé sur le chromosome X) pour lesquels les différents miR respectifs appartiennent aussi aux quatre différentes familles de miR énumérées plus tôt (108). MiR-17-92 est soumis à la

régulation transcriptionnelle de différents facteurs tels que NF-kB, les membres de la famille E2F ainsi que de c-myc et n-myc (108, 109). Il est intéressant de noter que miR-17 et miR-20a interviennent dans une boucle de rétroaction négative en ciblant la famille des facteurs transcriptionnels E2F (109). En plus de la régulation du polycistron au niveau transcriptionnel, ce dernier peut aussi être régulé au niveau de sa maturation. Il a été montré que le pri-miR-17-92 adopte une structure secondaire de forme globulaire compacte et que celle-ci est possible grâce à l'interaction de NMSL (Non-miRNA stem-loop) et de la tige-boucle de miR-19b. Ceci résulte en l'internalisation de miR-18a, miR-19b et de miR-92a qui sont donc moins accessible pour un clivage par DROSHA pour créer leur pre-miR respectif (110, 111).

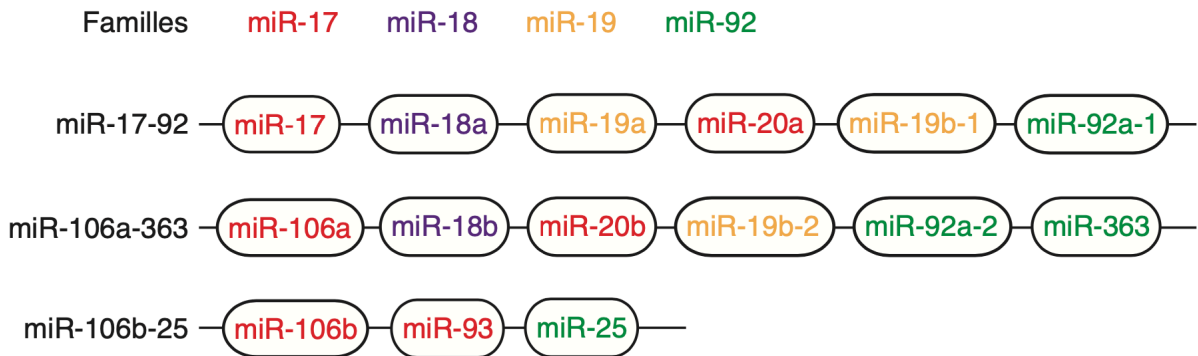


Figure 1.6 MiR-17-92 et ses paralogues

Il existe deux paralogues au polycistron miR-17-92 : miR-106a-363 et miR-106b-25. À eux trois, les miR qu'ils encodent appartiennent à quatre familles (miR partageant le même *seed*) différentes soit celles de miR-17, miR-18, miR-19 et miR-92.

Le polycistron miR-106a-363 n'est pas exprimé lors du développement embryonnaire, ce n'est donc pas étonnant que sa délétion chez la souris ne génère pas de défauts majeurs lors de ce processus. miR-106b-25 est exprimé lors de l'embryogenèse et le knockout séparé ou simultané de miR-106b-25 et de miR-106a-363 n'affecte pas le développement des souris. Cependant, le knockout simultané de miR-17-92 et de miR-106b-25 résulte en un fœtus non viable présentant de sévères défauts cardiaques et une grande activité apoptotique dans les cellules du foie du fœtus, du système nerveux central ainsi que dans l'éminence ganglionnaire latérale. Puisque miR-106b-25 n'encode pas de miR appartenant à la famille de miR-18 et de miR-19, il est possible que ces deux familles jouent un rôle crucial dans le processus du développement (108, 112).

Le polycistron miR-17-92 est impliqué dans une grande variété de processus biologiques comme par exemple dans le développement où il est d'abord grandement exprimé dans les cellules embryonnaires alors que ses niveaux diminueront dans des cellules en différenciation terminale (113). Le modèle de souris miR-17-92^{-/-} est létal dans la période périnatale. Les embryons présentent de graves défauts squelettiques au niveau des pattes, sont de plus petite taille et présentent des microcéphalies. De plus, ils ont des défauts cardiaques ainsi que des poumons sous-développés (112). Ces défauts développementaux sont très similaires aux défauts observés chez des patients qui sont atteints du syndrome de Feingold. Ce fut la première démonstration de l'implication des miR dans un syndrome développemental chez l'humain (108, 114). MiR-17-92 est aussi impliqué dans une variété d'autres processus biologiques tels que le développement et la survie des cellules B, dans les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et immunitaires ainsi que dans les cancers (108).

MiR-19 dans les cancers

Le polycistron miR-17-92 joue un rôle oncogénique dans bien des cas. Bien que les différents membres du polycistron aient divers rôles dans la transformation tumorale, c'est miR-19 qui est le composant oncogénique principal de ce transcrit. En effet, des études dans un modèle de souris Eμ-Myc, qui réplique le lymphome de Burkitt, montrent que miR-19 spécifiquement coopère avec Myc dans la formation de lymphome des cellules B. Ce rôle oncogénique pour miR-19 passe par la répression d'une de ses cibles, *Pten*, qui résulte en une activité accrue de la voie de signalisation AKT-mTOR (AKT Serine/Threonine Kinase 1 – Mammalian Target of Rapamycin) (115, 116). De surcroît, il a été montré que dans les cancers colorectaux, miR-19 était surexprimé et qu'il ciblait *CTGF* (Connective Tissue Growth Factor) favorisant ainsi l'angiogenèse (117).

De manière intéressante, le rôle protumoral de miR-19 pourrait être contrebalancé par miR-92a. Effectivement, l'expression d'une forme tronquée du polycistron à laquelle il manquerait miR-92a présenterait une activité oncogénique plus marquée. De plus, si miR-92a est surexprimé seul, il favorisera la prolifération des cellules B. Il semble donc qu'il faut que les deux soient exprimés de pair afin que miR-92a puisse exercer un effet antitumoral et cet effet est dépendant d'une voie de signalisation intègre de p53 (118). Selon le contexte, certains de ses membres peuvent avoir des rôles de suppression tumorale. Par exemple, en ciblant *AIB1* (Amplified in Breast Cancer 1 protein), miR-17 intervient en tant que suppresseur de tumeur dans les cancers du

sein (119). Dans certains cas de carcinome hépatocellulaire, miR-20a est diminué, ce qui permet une prolifération cellulaire accrue (120).

Ceci démontre à quel point la dynamique des différents membres est complexe et comment leurs rôles peuvent être très dépendant du contexte dans lequel ils sont exprimés.

Tableau 1.3 Les membres du polycistron miR-17-92 dans le développement, les cancers et autres maladies
(adapté de Mogilyansky et Rigoutsos, 2013 (108))

miRNA	Development				Hematopoietic cancers								Solid cancers										Other diseases									
	Normal skeletal formation / Feingold syndrome	Lung and heart development	B-cell development	T-cell development	B-cell Lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma	B-cell CLL	MLL-rearrangements	AML t(8;21)	AML t(15;17)	T-cell lymphoma	T-cell ALL	Multiple myeloma	Retinoblastoma	Colorectal cancer	Head and neck cancer	Pancreatic cancer	Breast cancer	Ovarian cancer	Lung cancer	Renal cancer	Hepatocellular carcinoma	Osteosarcoma	Gastric cancer	Nasopharyngeal cancer	Urothelial cancer	Autoimmunity	Cardiovascular diseases	Alzheimer's disease	Multiple sclerosis	Aging	
miR-17	•	•	•	•	↑	↑	↑	↑	↓		↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓
miR-118a	•	•			↑	↑	↑				↑				↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
miR-19a	•	•			↑	↑	↑				↑				↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↑				↑	↑	↑	↑	↑	
miR-20a	•	•			↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑				↑	↑	↓	↓	↓	↓
miR-19b	•	•	•	•	↑	↑	↑	↑			↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑				↑	↑	↑	↑	↑	↓
miR-92a	•	•				↑	↑	↑	↓		↑		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑				↑	↑	↑	↑	↓	

*Une flèche rouge indique que le miR est augmenté dans la maladie. Une flèche verte indique que le miR est diminué dans la maladie. Un point noir signifie que le miR est impliqué dans un processus développemental donné.

1.2.7 MiR-146a

Origine et fonctions de miR-146

La famille miR-146 est composée de deux membres, soit miR-146a qui est encodé sur le chromosome 5 et miR-146b qui se trouve sur le chromosome 10. MiR-146a fut identifié pour la première fois par Lagos-Quintana et al. dans les tissus cardiaques de souris (121). Il aura fallu attendre quatre années avant que son homologue humain soit confirmé par Taganov et al. (122). Bien que les deux membres soient très similaires en termes de séquence (ils ne diffèrent que par deux nucléotides dans leur région 3') leur régulation transcriptionnelle ainsi que leur maturation semblent être des processus qui sont régulés de manière spécifique pour chacun d'eux. Effectivement, leur transcription n'est pas toujours synchronisée ou temporellement coordonnée, ni nécessairement régulée par les mêmes facteurs ou cofacteurs. En fait, selon les différents tissus, ils ne suivent pas le même patron d'expression (123). Par exemple, il a été montré que suite à des

traitements au LPS, les deux miRs sont produits. Cependant, seulement miR-146a s'accumule sous la forme mature (122). De même, leur production n'est pas stimulée par les mêmes cytokines; miR-146a peut être induit par IL-1 β (Interleukin-1 beta) tandis que miR-146b l'est par TNF- α (124).

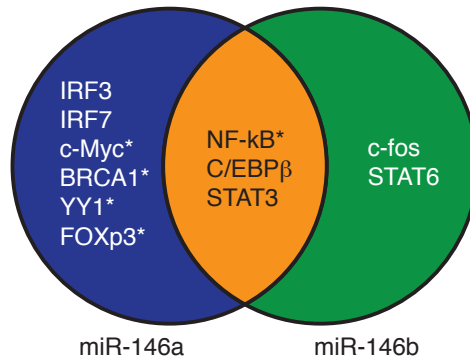


Figure 1.7 Facteurs de transcription qui régulent la famille miR-146

*Ces facteurs de transcription ont été validés par ChIP ou mutagenèse

Il est connu que miR-146a est impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire, car il agit en tant que rétro-inhibiteur de la voie de NF-kB en ciblant *TRAF6* (TNF Receptor Associated Factor 6) et *IRAK1* (Interleukin-1 Receptor Associated Kinase 1). Il est induit lors de stimulation au LPS par NF-kB (122). Il peut aussi jouer un rôle dans l'immunité acquise en intervenant dans l'activation des cellules T. Les lymphocytes T régulateurs (Treg ; Regulatory T-Cell) sont essentiels dans le maintien de l'homéostasie de la réponse immunitaire et une déficience en miR-146a résulte en une augmentation du nombre de cellules Treg. Toutefois, leurs fonctions seront compromises. Dans un modèle où miR-146a est délété, les cellules Treg perdent de leur effet immunosuppresseur en produisant plus d'IFN- γ et cet effet passe par une augmentation de la voie de signalisation STAT1. Cette production non régulée d'IFN- γ mène à une réponse immunitaire aberrante des Th1 (T Helper 1) (125).

NF-kB est au cœur de l'interface entre l'inflammation et les cancers. En effet, une augmentation de la signalisation par NF-kB résulte en une accumulation de cytokines pro-inflammatoires qui contribuent à un micro-environnement propice à la tumorigenèse et miR-146 est intimement lié à ce phénomène (126, 127). Bhaumik et al. ont été les premiers à clairement lier miR-146a au cancer. Ils ont montré que l'expression de miR-146a/b dans des MDA-MB-231, des

cellules du cancer du sein métastatique, atténuait les niveaux protéiques de IRAK1 et de TRAF6 menant à une diminution subséquente de la signalisation par NF- κ B. Les cellules exprimant miR-146a/b montraient aussi une capacité réduite de leur motilité ainsi que d'invasion (127). Des travaux de Zhong et al. suggèrent que miR-146a serait important dans la répression de la migration transendothéliale des cellules cancéreuses. Ce processus d'extravasation est requis pour établir des métastases et peut passer par E-selectin, une molécule d'adhérence cellulaire exprimé par les cellules endothéliales. Les auteurs ont montré que miR-146a est induit par les voies de signalisation de p38, ERK et JNK et peut réprimer l'expression de *E-SELECTIN* à travers une inhibition de la voie NF- κ B (128).

MiR-146a est aussi impliqué dans le syndrome 5q- qui est caractérisé par une délétion du bras long du chromosome 5 sur lequel il se trouve. De pair avec miR-145, qui est aussi délété dans ce syndrome, leur absence mène à une augmentation de TIRAP et de TRAF6, ce qui résulte en une augmentation des niveaux d'IL-6 circulant. Les auteurs ont montré que c'est cette cytokine qui est en partie responsable des caractéristiques du syndrome 5q- (dysplasie mégakaryocytaire et thrombocytose) (129).

Il a été montré qu'un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP : Single Nucleotide Polymorphism) de miR-146a, rs2910164 (G/C), est associé avec une diminution des niveaux du précurseur ainsi que de la forme mature de ce dernier. Ce SNP est positionné dans le brin passager et est associé à un risque plus élevé pour divers cancers (cancer du sein, hépatocellulaire ou cancer papillaire de la thyroïde) ainsi que pour quelques maladies inflammatoires (maladies coronariennes et maladie de Behçet) (130, 131). De manière intéressante, des études chez des patients atteints de cancer papillaire de la thyroïde ou encore chez des patients ayant la maladie de Behçet montrent que la forme hétérozygote du SNP (GC) serait délétère, mais la forme homozygote (CC ou aussi GG pour le cancer de la thyroïde) aurait des propriétés protectives (132, 133). Des études plus approfondies mené par Jazdzewski et al. révèlent que la forme hétérozygote produit en fait trois miR matures soit miR-146a, miR-146a*G et miR-146a*C. Comme le SNP se retrouve dans la région « *seed* » du brin passager de miR-146a, cela affecte les transcrits ciblés par ceux-ci changeant par le fait même, le transcriptome des cellules qui sont hétérozygotes des celles qui sont homozygotes (134).

L'expression de miR-146a est diminuée dans nombre de cancers et divers mécanismes qui expliquent cette diminution ont été décrits. Sa transcription peut être perturbée par la méthylation de son promoteur aux îlots CpG comme c'est le cas dans les carcinomes hépatocellulaires ainsi que dans les cancers de la prostate (135, 136). Il a été montré que *PVT1* (Plasmacytoma Variant Translocation 1), un lARNnc (Long Non-Coding RNA), intervenait dans cette méthylation des îlots CpG dans les cancers de la prostate. Le mécanisme par lequel cela s'effectue reste cependant nébuleux et les auteurs suggèrent que ce n'est probablement pas dû à un effet « direct » de *PVT1* (137). Les modifications d'histones peuvent aussi réguler l'expression de miR-146a notamment par l'acétylation de l'histone H3 dans les macrophages ou encore par la tri-méthylation de H3 par EZH2 (Enhancer of Zest Homolog 2), lui-même recruté par YY1 (Yin and Yang 1) dans les cancers de la prostate (138, 139). Enfin, miR-146a peut aussi être régulé au niveau de sa fonction en interagissant avec des lARNnc. Dans les TAM des cancers endométriaux, *NIFK-AS1* (NIFK Antisense RNA 1), un lARNnc avec lequel miR-146a interagit, est diminué, ce qui permet à miR-146a de cibler NOTCH1 et d'ainsi promouvoir la polarisation de type M2 de ces TAM. Cette polarisation est associée avec une augmentation de la migration ainsi que de l'invasion des cellules d'EC (Endometrial Cancer) (140). Dans les cas de NSCLC (Non-Small-Cell Lung Carcinoma), le lARNnc *SNHG16* (Small Nucleolar RNA Host Gene 16) est augmenté et séquestre miR-146a ce qui permet la progression de la maladie (141).

1.2.8 CeRNA

L'activité des miR peut être régulée de manière variée et une de ces manières se nomme ceRNA (Competing Endogenous RNA). Cette théorie stipule qu'une augmentation des sites de liaison pour un miR donné diminuerait la disponibilité de ce dernier et résulterait en un relâchement subséquent de la régulation d'autres transcrits qui contiennent des MRE pour ce miR (142). Toutefois, deux visions s'opposent quant à la validité de cette hypothèse et différents modèles sont proposés dans la littérature.

Afin d'étudier l'effet de ceRNA sur l'activité de répression de miR-122, un miR hautement exprimé dans les hépatocytes, Denzler et al. ont utilisé une construction qui surexprime l'Aldolase A (*AldoA*), une cible connue de miR-122. En modulant la quantité de MRE ajoutée par cellule, ils concluent que pour exercer un effet, les ceRNA doivent dépasser le DRT (Derepression Threshold; valeur à laquelle les cibles d'un miR donné sont déréprimés de 10% de la répression totale

lorsqu'aucun MRE additionnel n'est présent) et que ce dernier est assez élevé et est indépendant du niveau du miR à l'étude. Le miR doit cependant être exprimé à des niveaux suffisants pour avoir un effet sur ses cibles et ainsi être sujet à l'effet ceRNA. Afin d'étudier l'effet ceRNA sur l'ensemble des cibles prédites de miR-122, les auteurs ont effectué un RNA-seq sur des hépatocytes primaires transfectés avec différents MOI (Multiplicity of infection) d'*AldoA* (MOI de 2, 20 ou 200). Ils observent une dérégulation des cibles de miR-122 à des MOI de 20 et de 200. Ces valeurs équivalent à une augmentation respective des transcrits de 6-12% et de plus de 50% de la population totale des ARNm. Cependant, si l'on compare ces valeurs avec celles du contributeur le plus élevé dans ces cellules, celui-ci ne représente que 1.6% des transcrits totaux. Les auteurs concluent donc qu'il est peu probable qu'en conditions physiologiques, un ceRNA atteigne ces niveaux (143).

Ce groupe complète leur étude dans un second article qui utilise cette fois des constructions-rapporteurs contenant un ou trois sites de liaison en région 3'UTR (Untranslated Region) de mCherry pour différents miRs. Les auteurs montrent que l'IC₅₀ (Concentration inhibitrice médiane) d'un miR est environ égal au TA_{app} (Apparent Target Abundance) qui est la somme des sites de liaison 6-, 7-, et 8-mer dans la région 3'UTR. Ils montrent que les 7-mer et les 6-mer sont efficaces à 50% et 20% respectivement dans leur habileté à compétitionner lorsque comparés à un site 8-mer. Les auteurs affirment donc que même si les sites 6-mer sont beaucoup moins efficaces comme site, ceux-ci contribuent davantage au bassin effectif de sites de liaison qu'attendu, malgré leur efficacité marginale dans la répression des cibles. Ils concluent donc que le TA_{app} est une bonne approximation de la population des sites effectifs endogènes pour un miR donné. De plus, les auteurs se penchent sur la coopération des sites de liaison entre eux et sur l'effet que cela pourrait avoir sur le DRT. Leurs résultats suggèrent que des ceRNA qui contiennent des sites qui coopèrent (sites qui favorisent la liaison d'un autre miR à un site qui se trouve entre 8 et 60 nucléotides de distance) ne requièrent que 20%-50% du nombre normalement requis. Ceci est dépendant du type de site qui coopère; plus le site est de basse affinité (6-mer), moins la coopération a d'effet sur le DRT. Malgré tout, les auteurs concluent que ça n'est toujours pas suffisant pour observer un effet ceRNA dans des conditions physiologiques. En résumé, leur modèle d'affinité mixte stipule que la population d'un miR donné est distribuée de manière indépendante sur tous les types de sites (8-, 7- et 6-mer) et qu'afin d'observer un effet ceRNA, il

faut que les niveaux de ce dernier se rapprochent du TA, ce qui serait peu probable en conditions physiologiques (144).

En réponse à ce modèle, Bosson et al. proposent un modèle hiérarchique dans lequel ce n'est non pas le nombre de cibles disponibles qui dicte la susceptibilité à l'effet ceRNA mais bien le ratio miR:cibles. Dans leur modèle, le réservoir de sites cibles total est divisé en groupes basés sur l'affinité de ceux-ci. Il est important de noter que ces cibles ne compétitionnent pas de manière équivalente, c'est-à-dire qu'un site avec une plus grande affinité sera lié de manière préférentielle. Ainsi, plus le ratio miR:cibles sera petit, plus le miR en question sera lié aux cibles de grande affinité alors que plus le ratio sera grand, plus les liaisons du miR avec ses cibles se propagera à des sites de moindre affinité. De cette manière, un grand ratio miR:cibles sera moins sensible à l'effet ceRNA dû à une grande capacité tampon permis par de hauts niveaux de miR. À l'inverse, un petit ratio sera plus sensible à une augmentation de MRE de grande affinité, car les plus bas niveaux de miR seront plus facilement titrés. Les auteurs ajoutent que le ratio miR:cibles est vraiment crucial afin de déterminer si un miR sera sensible ou non à l'effet ceRNA mais la concentration absolue du réservoir de cibles est aussi important. Effectivement, miR-293 a un ratio miR:cibles suffisamment élevé pour lier des 6-mers. Cependant, la taille absolue du réservoir de cibles est assez petite pour qu'un effet ceRNA en conditions physiologiques puisse être observé (145).

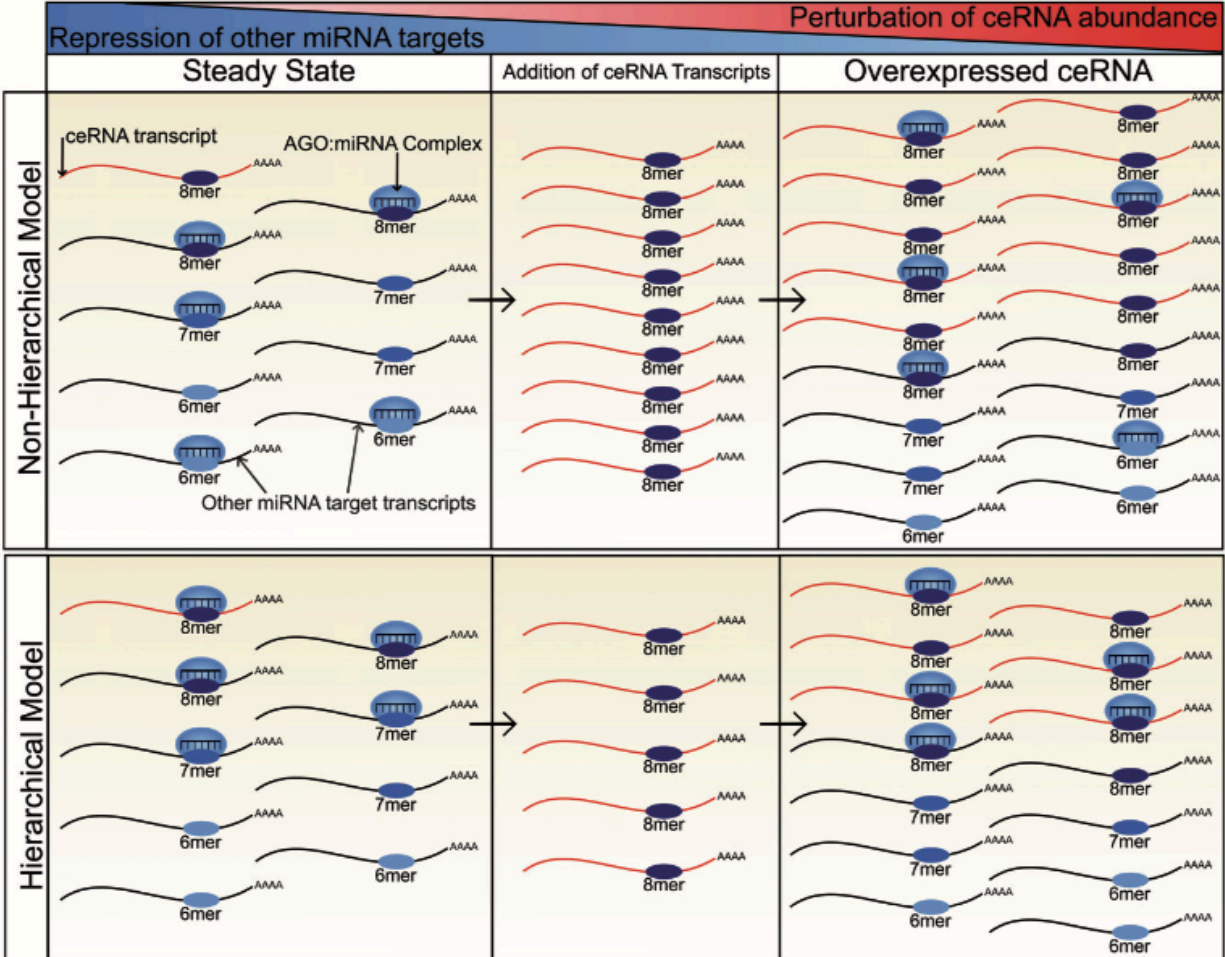


Figure 1.8 Modèle proposé par Denzler et al. et Bosson et al. afin d'illustrer les conditions requises pour un possible effet ceRNA

Le modèle non-hiérarchique proposé par Denzler et al. proposent que les miR lient autant des sites de grande affinité que des sites de plus petite affinité. Leur modèle suggère qu'il faudrait ajouter un nombre presque équivalent au réservoir de cibles totale afin de générer un effet de compétition. En opposition, Bosson et al. proposent un modèle hiérarchique où les miR lient des sites de grande affinité avant de lier ceux de plus petite affinité. Selon leurs travaux, ce serait le ratio miR :cibles qui serait le plus indicatif si un miR pourra être soumis à un effet ceRNA ou non. En effet, un plus petit ratio serait requis pour être affecté par les ceRNA tandis qu'un grand ratio ne le serait pas dû à une plus grande capacité tampon du système. Figure adaptée de Smilie et al. (2018).

Bien que des doutes persistent quant à l'aspect physiologique de l'hypothèse ceRNA, il existe différentes démonstrations de cet effet dans la littérature. Notamment, avec le concept d'éponge artificielle à miR, introduit pour la première fois par Ebert et al. en 2007. Ces

constructions consistent en une série de sites de liaison pour un miR donné qui contiennent un mésappariement aux nucléotides 9-12 du miR afin d'éviter une dégradation qui requiert l'activité slicer (146). Depuis, plusieurs groupes ont utilisé cet outil, et ce, dans divers contextes. Par exemple, Huang et al. se sont intéressés au rôle de miR-204 dans la différenciation de cellules souches mésenchymateuses. Ils ont montré qu'une inhibition de ce dernier à l'aide d'une éponge exprimée par un vecteur rétroviral favorisait une différenciation ostéogénique plutôt qu'une différenciation adipogénique (147). Certains groupes ont aussi adapté cette technologie pour des études *in vivo*. C'est le cas de Carè et al. qui ont utilisé un vecteur adénoviral contenant des sites de liaison en tandem pour miR-133 dans le 3'UTR de la eGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) afin d'étudier son rôle dans l'hypertrophie cardiaque (148).

Les éponges restent des outils artificiels et certains pourraient prétendre que les niveaux d'expression requis afin d'observer un effet ne rencontrent pas des conditions physiologiques. Néanmoins, il existe des exemples endogènes de ceRNA notamment avec des pseudogènes. Ces derniers ne peuvent produire de protéine fonctionnelle et c'est pourquoi pendant longtemps, ils ont été considérés comme étant de « l'ADN déchets ». Cependant, ces pseudogènes peuvent produire un transcrite d'ARN qui sera très similaire à celui du gène parental et par conséquent, pourra partager différents sites de liaison pour les mêmes miR. Par exemple, le pseudogène *BRAFPI* (BRAF pseudogene 1) joue un rôle oncogénique en ayant un effet ceRNA sur BRAF (B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase), car *BRAFPI* est capable de séquestrer des miRs qui ciblent aussi BRAF, réduisant l'inhibition de ce dernier et menant ainsi à une activation subséquente de la voie de signalisation des MAPK/ERK (Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase). De surcroît, l'effet de ce pseudogène passe vraiment par son transcrite d'ARN et non pas par de possibles micropeptides, car il n'est pas associé avec des ribosomes actifs pour la traduction. Fait intéressant, les auteurs notent qu'en présence du pseudogène de Braf de souris (*Braf-rs1*), un rapporteur luciférase montre une meilleure dépression lorsque de plus petites quantités de mimiques (1 nM vs 10 nM) sont transfectées (149). Cette observation va de pair avec le modèle proposé par Bosson et al. qui suggère qu'un plus petit ratio miR:cibles est plus sujet à l'effet ceRNA (145). De manière similaire, le pseudogène de *PTEN* (Phosphatase and Tensin Homolog), nommé *PTENP1* (Phosphatase and Tensin Homolog Pseudogene 1), exerce un effet de suppression tumorale sur son gène parental. En effet, la surexpression du 3'UTR de *PTENP1* favorise une accumulation de l'ARNm ainsi que de la protéine de PTEN ce qui se traduit par une

diminution de la prolifération (150). De manière intéressante, ces deux études nous montrent que les niveaux de ces deux pseudogènes n'ont pas besoin d'atteindre des niveaux faramineux avant d'exercer un effet sur leur gène parental. En effet, tous deux sont exprimés à des niveaux bien en deçà de leur gène parental respectif. Ces observations vont donc à l'encontre du modèle proposé par Denzler et al. qui suggère qu'il faut ajouter un nombre similaire de cibles au nombre de cibles déjà présentes pour observer un effet ceRNA, (144, 149, 150).

Une autre classe de transcrits pouvant agir comme des éponges à miR, et donc générer un effet ceRNA, sont les ARN circulaires (circRNA). Ceux-ci sont produits par un phénomène nommé « backsplicing » qui prend place lorsqu'un site donneur en 5' d'un exon attaque un site accepteur en 3' d'un exon en aval de ce site donneur (151). Il existe différents exemples de circRNA qui agissent comme éponge pour un ou des miR donnés, entre autres, *ciRS-7* (Circular RNA Sponge for miR-7), aussi nommé *CDRI-AS* (Cerebellar degeneration-related protein 1-antisense), qui contient 73 sites de liaisons pour miR-7 chez l'humain. Cet ARN circulaire contient aussi un site de liaison pour miR-671. Cependant, ce dernier s'y lie avec une complémentarité extensive ce qui mène à une dégradation de *ciRS-7*. Il agit donc comme un régulateur indirect pour miR-7 en abaissant les niveaux de l'éponge pour ce dernier (57).

Comment peut-on ainsi réconcilier toutes ces observations? Bien que supportés par des expériences en conditions biologiques et non seulement par des simulations *in silico*, les deux modèles proposés par Denzler et Bosson ne tiennent pas compte de plusieurs facteurs importants de la dynamique des miR. Par exemple, il est possible que les miR ou les cibles soient concentrés en certains endroits dans le cytoplasme et que ces concentrations locales pourraient rendre l'effet ceRNA possible (152). Les auteurs prennent aussi en compte le réservoir total des miRs alors que différents groupes ont montré que ce ne sont pas les niveaux totaux des miR qui sont significatifs, mais plutôt la portion qui est associée avec RISC qui est la plus indicative (153, 154). Par ailleurs, les miR trouvent leur cible en parcourant celles-ci avec une sous-région du *seed* (nt 2-4/5). Si une cible donnée contient beaucoup de ce type de séquence, il se pourrait qu'elle soit plus susceptible à être liée par ce miR qu'attendu. En effet, si cette cible avait été classée seulement selon les caractéristiques des sites de liaison, elle aurait pu être considérée comme étant une moins bonne ou même une mauvaise cible (155). Finalement, il semblerait aussi que les caractéristiques qui dictent si une cible sera liée par un miR ou non ne soient pas totalement connues. En effet, certains

miRs se lieraient préférentiellement à des cibles données qui ne sont pas nécessairement exprimées à de hauts niveaux ni ne contiennent un nombre particulièrement élevé de sites de liaison (156).

1.3 Les longs ARN non codants

1.3.1 Biogenèse et fonctions

Les longs ARN non codants (lARNnc) sont une autre catégorie d'ARN qui ne codent pour aucune protéine, mais qui se distinguent des miR. Ils sont généralement longs de plus de 200 nucléotides et peuvent contenir une coiffe ainsi qu'une queue PolyA. Ils sont généralement peu conservés au niveau de leur séquence primaire, c'est pourquoi pendant longtemps ces ARN n'étaient perçus que comme un sous-produit peu important de la transcription. On sait maintenant qu'ils peuvent montrer une conservation de position dans le génome, de motif de courte séquence ou encore de structure secondaire. Bien qu'ils soient généralement exprimés à de faibles niveaux et que leur patron d'expression soit tissu-dépendant, il est maintenant clair qu'ils jouent un rôle crucial dans l'homéostasie de la cellule (157, 158). Puisque peu de choses sont connues sur les lARNnc, ces derniers sont classifiés selon leur origine dans le génome plutôt que selon leur fonction. Il existe cinq grandes catégories : sense, antisense, bidirectionnel, intronique ou intergénique (159).

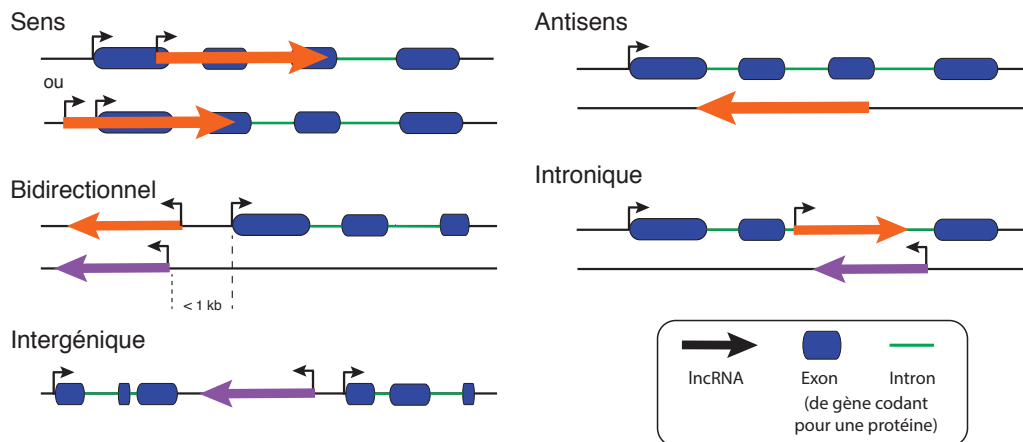


Figure 1.9 Classification des longs ARN non codants selon leur origine dans le génome

Sens, le lARNnc chevauche le brin sens d'un gène. **Antisens**, le lARNnc se retrouve sur le brin antisens et chevauche un gène. **Bidirectionnel**, la transcription du lARNnc résulte de la transcription bidirectionnelle et il doit se trouver à moins de 1 kb du promoteur d'un à. **Intronique**, le lARNnc se trouve dans un intron d'un gène. **Intergénique**, se retrouve entre deux gènes.

De manière générale, les lARNnc ont tendance à localiser préférentiellement au noyau de la cellule. Il faut cependant souligner que bien qu'ils aient une propension à se retrouver à cet endroit, certains d'entre eux sont plus abondants dans le cytoplasme en termes de nombre de copies (157, 160). Leurs fonctions touchent donc une myriade de processus cellulaires tels que la régulation de la transcription, des corps nucléaires, de la traduction et de l'action des miR en agissant comme éponges (161, 162). On pourrait diviser les fonctions des lARNnc en deux grandes catégories: fonctions en *cis* ou en *trans*.

Les modes d'action en *cis* comportent différentes sous-catégories. Tout d'abord, il y a ce qu'on peut appeler des lARNnc fonctionnels pour lesquels la séquence et/ou la structure est importante dans l'accomplissement de la fonction (158). Par exemple, *XIST* (X inactive specific transcript), qui est impliqué dans l'inactivation du chromosome X dans le phénomène de compensation de dosage génétique, est produit par le chromosome X qui sera inactivé. *XIST* est capable de recruter SHARP (SMART/HDAC1-Associated Repressor Protein) qui à son tour pourra recruter SMRT (Nuclear Receptor Corepressor 2) et HDAC3 (Histone deacetylase 3). Ceci

résultera en une déacétylation subséquente des histones, un des événements initiateurs dans l'inactivation du chromosome X (163). La fonction des lARNnc peut aussi être accomplie à travers l'action de sa transcription/épissage et dans ce cas-ci, la séquence du lARNnc n'est pas importante. C'est notamment le cas du lARNnc *Airn* (Antisense of IFGR2 non-protein-coding RNA) dont la séquence, qui se retrouve sur le brin antisens, chevauche le gène codant pour *Igf2r* (Insulin Like Growth Factor 2 Receptor) en son promoteur ainsi que dans une partie de sa portion codante (gene body). Les auteurs montrent que c'est bien l'acte de transcription de ce lARNnc qui empêche celle du gène *Igf2* puisque des mutants de tailles différentes et qui ne chevauchent plus le promoteur n'empêchent plus la transcription de *Igf2*. La fonction de ce lARNnc s'établit donc par une compétition pour la transcription plutôt que dans la séquence de son transcrit (164). Finalement, les lARNnc peuvent être totalement non fonctionnels (ni l'action de sa transcription ou le transcrit lui-même n'est important) : ce sont plutôt des éléments de leur contexte dans le génome qui exercent une fonction sur les gènes environnants. *Linc-p21* peut exercer son rôle selon plusieurs modes de régulation. En effet, il peut agir en *trans*, et en *cis*. De manière intéressante, *Linc-p21* avait d'abord été catégorisé comme étant un lARNnc agissant en *trans* sur le locus *CKDNA* (165), puis en *cis* (166), avant qu'un groupe en 2016 montre que ce sont en fait les éléments amplificateurs qui sont responsables de l'expression de gènes environnants. En effet, une délétion du locus de *Linc-p21* a pour effet de diminuer la transcription de gènes locaux, et ce, même dans les tissus qui ne produisent généralement pas de *Linc-p21* (167).

Les lARNnc peuvent aussi agir en *trans* de trois manières générales. Tout d'abord, ils peuvent être impliqués dans la régulation de l'état de la chromatine ou encore dans la régulation de l'expression génique à des régions qui sont distantes de leur site de transcription en recrutant d'autres facteurs. Par exemple, il a été montré que le recrutement de HNRNPL (Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein L) aux promoteurs de gènes impliqués dans la réponse immunitaire dans les macrophages se fait par l'entremise de *lincRNA-EPS* (lincRNA erythroid prosurvival), ce qui résulte en une répression subséquente de l'expression de ces gènes (168). Il est intéressant de noter que les lARNnc peuvent aussi agir sur la transcription de gènes sous la régulation d'autres ARN polymérasés. C'est notamment le cas de *SLERT* (Small nucleolar RNA (snoRNA)-ended lncRNA that enhances pre-ribosomal RNA transcription) qui par interaction directe avec DDX21, un répresseur de Pol I, est capable de stimuler la transcription par ce dernier (169). Deuxièmement, les lARNnc peuvent aussi être impliqués dans l'organisation de l'architecture nucléaire. En effet,

NEATI (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1) est impliqué dans la formation et la maintenance de corps nucléaires nommés « paraspeckles » (170, 171). Ces derniers sont impliqués dans la régulation de gènes au niveau post-transcriptionnel ; ils peuvent en effet retenir des transcrits au noyau (172). Il a été montré que *NEATI* servait d'ARN d'échafaudage pour la formation de ces corps nucléaires (173). En troisième lieu, les lARNnc peuvent interagir avec des ARN et/ou des protéines afin de réguler la fonction de ceux-ci. Les travaux de Lee et al. montrent que *NORAD* (Non-coding RNA activated by DNA damage) est capable de séquestrer les protéines PUM1/PUM2 (Pumilio-1/Pumilio-2) ce qui résulte en une inactivation subséquente de ces dernières. PUM1/PUM2 sont impliqués dans la régulation de facteurs jouant un rôle dans la stabilité génomique en favorisant la déadénylation ainsi qu'un enlèvement de la coiffe de ses cibles. Une absence de *NORAD* mènera à une hyperactivation de PUM1/PUM2 ainsi qu'à une instabilité génomique (174). Finalement, les lARNnc peuvent aussi agir en tant qu'éponges pour les miR comme dans le cas de *CDRI-AS* décrit précédemment (57).

Néanmoins, ce ne sont pas seulement les ARN circulaires ou les pseudogènes qui peuvent agir comme éponges : les lARNnc plus « classiques » le peuvent aussi. Effectivement, les travaux de Cesana et al., furent les premiers à montrer qu'un lARNnc pouvait agir en tant qu'éponge à miR en mettant en lumière le rôle d'éponge de *linc-MDI* (Long Intergenic non-coding RNA, Muscle Differentiation 1) pour miR-133 et miR-135. L'inhibition de ces derniers favorisait une accumulation subséquente de MAML1 (Mastermind Like Protein 1) et MEF2C (Myocyte Enhancer Factor 2C), deux facteurs de transcription responsables de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation musculaire (175). *Linc-ROR* (Long Intergenic non-coding RNA Regulator of Reprogramming) est un lARNnc qui est grandement exprimé dans les cellules souches embryonnaires et qui est sous le contrôle transcriptionnel de OCT4 (Octamer -Binding Protein 4), SOX2 (SRY-Box Transcription Factor 2) et NANOG (Nanog Homeobox). *Linc-ROR* est en retour capable de stabiliser les niveaux de ces derniers, car il agit comme éponge pour miR-145, un miR connu pour cibler ces facteurs de transcription. Cette boucle de régulation est importante dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires humaines (176). De manière intéressante, les lARNnc peuvent aussi compétitionner avec les miRs pour un même ARNm. Par exemple, *BACEIAS* (Beta-Secretase 1 antisense) est capable de stabiliser le transcrit de *BACE1* en se liant à ce dernier. Cette interaction prévient la liaison de miR-485-5p avec *BACE1*, car le MRE pour ce dernier est en partie caché par le lARNnc (177).

1.3.2 Micropeptides

Environ 80% de notre génome est transcrit, seulement moins de 2% de ces transcrits codent pour des protéines; une grande proportion des transcrits ne seront donc pas traduits (178). Néanmoins, des analyses bio-informatiques révèlent qu'une partie des lARNnc contiennent de petits cadres de lecture ouverts et de récentes études de Ribo-seq montrent que certains de ces lARNnc sont associés avec des ribosomes. Ceci suggère que ces petits cadres de lecture ouverts pourraient résulter en la production de micropeptides (des peptides d'environ une centaine d'acides aminés ou moins). En revanche, ce n'est pas parce qu'un transcrit est associé avec des ribosomes qu'il est nécessairement traduit. C'est pourquoi nombre de Ribo-seq sont complétés par de la spectrométrie de masse afin de valider la présence de micropeptides (178, 179). Quelques micropeptides ont été caractérisés dans la littérature. Parmi ceux-ci, on retrouve chez l'humain et la souris le micropeptide SPAR (Small regulatory Polypeptide of Amino acid Response). Ce dernier est traduit de *LINC00961* qui est grandement exprimé dans les muscles squelettiques. Matsumoto et al. ont montré que SPAR jouait un rôle dans la régulation de l'activité de mTORC1 et qu'en cas de blessure aiguë du muscle, le micropeptide devait être inactivé afin de permettre la régénération musculaire (180). Les travaux de D'Lima et al. montrent que *LINC01420* encode un micropeptide nommé NoBody (Non-Annotated P-body dissociating polypeptide) qui interagit avec EDC4 (Enhancer of mRNA Decapping 4), une protéine impliquée dans l'enlèvement de la coiffe dans le processus de la dégradation de l'ARNm. Les auteurs montrent que les niveaux de NoBody corrélaient de manière inverse avec la quantité de foci cytoplasmiques appelés corps P (Processing bodies ou P-bodies) et que ce micropeptide pourrait jouer un rôle négatif dans la régulation de la dégradation de l'ARNm à médiation non-sens (181).

1.4 Objectifs de la thèse

La sénescence est un mécanisme important de suppression tumorale qui peut être induit par une variété de stress. Bien que ce phénomène soit étudié depuis plusieurs décennies, il reste encore beaucoup de travail afin d'avoir une vue d'ensemble sur cette complexe réponse cellulaire. On sait que la sénescence requiert des changements majeurs au niveau des programmes d'expression génique et nous pensons que les miR et les lARNnc font partie intégrante de ceux-ci (88, 182).

La protéine STAT5A est connue comme ayant la capacité de réguler des ensembles de gènes qui ont des fonctions antagonistiques ; ils peuvent être pro-prolifératifs ou encore, ils peuvent être impliqués dans l'induction de la sénescence (183). Une signalisation normale par cette voie inclut l'induction de SOCS1 qui veillera à prévenir une prolifération incontrôlée et qui pourra induire la sénescence grâce à sa capacité d'activer la voie p53. Les leucémies présentent souvent une activité aberrante pour STAT5A et nous pensons que dans ce contexte, cette dernière peut induire les oncomirs miR-19 et miR-155. SOCS1 est une cible connue de ces derniers et nos travaux visent à comprendre l'implication que ces oncomirs pourraient avoir sur la régulation de l'axe p53/SOCS1 dans les cancers. Afin d'étudier leurs rôles dans ce contexte cellulaire, nous utiliserons des éponges artificielles ciblant ces deux miR.

La stratégie d'éponge à miR artificielle a été mise au point par Ebert et al. en 2007. Depuis, c'est un outil largement employé dans l'étude des fonctions des miR dans des situations données. Il existe cependant aussi des éponges naturelles qui, par un effet de ceRNA, peuvent réguler la fonction des miR. Nous pensons que celles-ci pourraient jouer un rôle important dans la régulation de miR-146a dans la sénescence. En effet, il est connu que les cellules sénescents sécrètent une multitude de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Cependant, miR-146a, un miR qui a des fonctions anti-inflammatoires, s'accumule à de hauts niveaux dans la sénescence par RAS. Nous pensons donc que sa fonction pourrait être régulée dans ce contexte par des lARNnc qui agiraient en tant qu'éponges naturelles.

L'objectif de cette thèse est donc de mieux comprendre les interdépendances entre les ARN non codants et différentes facettes de la sénescence. Les deux prochains chapitres présentent les résultats sous forme d'articles scientifiques qui ont été obtenus en lien avec ce but.

2. Sponges Against miR-19 and miR-155 Reactivate the p53-Socs1 Axis in Hematopoietic Cancers

2.1 Présentation de l'article 1

Des études conduites dans notre laboratoire montrent que SOCS1 est impliqué dans l'activation du suppresseur de tumeur p53 en agissant en tant qu'adaptateur moléculaire avec ce dernier et ATM. Il est connu que deux oncomirs, miR-19 et miR-155, peuvent cibler SOCS1. Ce premier article avait donc pour but de mieux comprendre leur implication dans la régulation de l'axe de suppression tumorale p53/SOCS1. Nous avons mis au point une éponge nouvelle génération qui intègre le ribozyme tête à marteau. Celle-ci a l'avantage d'être dynamique, car elle mène à la dégradation du miR qui s'y lie et peut donc être réutilisée par la suite. Grâce à ces outils, nous avons pu montrer qu'une inhibition de miR-155 résultait en la restauration d'une réponse antitumorale dans des cellules de myélome multiple (RPMI8226).

Cet article a été publié dans le journal *Cytokine* en juin 2016 (Mignacca et al., Sponges against miR-19 and miR-155 reactivate the p53-Socs1 axis in hematopoietic cancers, *Cytokine*, 82, 80-86) (184).

Ma contribution est la principale pour cet article. J'ai fait tous les clonages d'éponges (classiques et catalytiques) ainsi que les essais luciférase. J'ai effectué la plupart de la culture cellulaire, des qPCR et des western blots. Emmanuelle Saint-Germain a aidé avec la culture cellulaire et a fait quelques-uns des qPCR. Elle a aussi fait des western blots ainsi que les essais de croissance, de colonies et de migration dans les RPMI8226. Alexandre Benoit a aidé avec la mise au point des essais luciférase. Véronique Bourdeau a aidé dans la conception des expériences. Alejandro Moro a aidé à processor des échantillons d'ARN.

2.2 Article 1

Sponges Against miR-19 and miR-155 Reactivate the p53-Socs1 Axis in Hematopoietic Cancers

Lian Mignacca¹, Emmanuelle Saint-Germain¹, Alexandre Benoit¹, Véronique Bourdeau¹, Alejandro Moro¹, Gerardo Ferbeyre^{1,2}.

1) Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

2) CRCHUM, 900 Saint-Denis, bureau R10.432, Montréal, Québec, H2X 0A9, Canada, Electronic address: g.ferbeyre@umontreal.ca.

2.2.1 Abstract

Normal cell proliferation is controlled by a balance between signals that promote or halt cell proliferation. Micro RNAs are emerging as key elements in providing fine signal balance in different physiological situations. Here we report that STAT5 signaling induces the miRNAs miR-19 and miR-155, which potentially antagonize the tumor suppressor axis composed by the STAT5 target gene SOCS1 (suppressor of cytokine signaling-1) and its downstream effector p53. MiRNA sponges against miR-19 or miR-155 inhibit the functions of these miRNAs and potentiate the induction of SOCS1 and p53 in mouse leukemia cells and in human myeloma cells. Adding a catalytic RNA motif of the hammerhead type within miRNA sponges against miR-155 leads to decreased miR-155 levels and increased their ability of inhibiting cell growth and cell migration in myeloma cells. The results indicate that antagonizing miRNA activity can reactivate tumor suppressor pathways downstream cytokine stimulation in tumor cells.

2.2.2 Introduction

Cytokine signaling converges into the activation of key transcription factors which control the expression of genes allowing for the expansion of certain lineages of hematopoietic cells [1]. Many genes coding for transcription factors and cytokine signaling proteins are mutated or overexpressed in hematopoietic cancers. Another layer of gene regulation altered in these cancers involves small regulatory RNAs known as miRNAs [2,3]. MiRNAs control gene expression at the post-transcriptional level [2], so their effects can further modify the gene expression pattern initially laid down by transcription factors.

One key transcription factor whose activity is deregulated in multiple hematopoietic cancers is STAT5 [1]. In normal cells, STAT5 activation does not cause neoplastic transformation. Tumor suppressor genes activated by STAT5 signaling avoid uncontrolled cell proliferation and neoplastic transformation. STAT5 can induce the expression of the suppressor of cytokine signaling SOCS1, which can exert tumor suppression by two mechanisms. First, SOCS1 controls JAK kinases signaling downstream of cytokine receptors preventing constitutive cytokine stimulation [4]. Second, SOCS1 can bind p53 facilitating its activation by DNA damage signaling [5–8]. However, SOCS1 expression is often silenced in hematopoietic cancers by DNA methylation [9–12]. In addition, miRNA-mediated repression is emerging as an important mechanism to prevent SOCS1 expression in cancer [7,13–17]. One important question is whether it is possible to restore SOCS1 expression and its ability to engage the p53 tumor suppressor pathway by targeting miRNAs in hematopoietic cancers. Here we show that targeting miR-155 or miR-19 in mouse and human hematopoietic cancer cell lines increases SOCS1 levels, leading to enhanced p53 activity and inhibition of the transformed phenotype.

2.2.3 Results

A constitutively active form of STAT5A induces miR-19 and miR-155

To characterize how STAT5 activity regulates the expression of SOCS1 and miRNAs that target SOCS1, we introduced a constitutively active allele of STAT5A (caSTAT5A) in normal human fibroblasts IMR90. In these cells, caSTAT5A induces an antiproliferative response known as cellular senescence [5] characterized by a reduction in the proliferation marker KI67 (Fig. 2.1A). CaSTAT5A also induces high levels of SOCS1 (Fig. 2.1B) which we showed previously required for p53 activation and senescence [5]. caSTAT5A induces the expression of miRNAs of the cluster miR17-92 (including miR-19) (Fig. 2.1C), and miR-155 (Fig. 2.1D). We also expressed caSTAT5A in the murine leukemia cell line Raw264.7 and observed no increase in already well-expressed mature miR-19 (Fig. 2.1E) but a significant induction of miR-155 (Fig. 2.1F). Both miR-19 [16] and miR-155 target *SOCS1* [7,14,15]. As shown for normal human fibroblasts, expression of caSTAT5A in Raw264.7 cells induced a growth arrest (Fig 2.1G). In Raw264.7 cells expressing caSTAT5A, both miR-19 and miR-155 were more active as measured using miRNA reporters containing binding sites for miR-19 or miR-155 in the 3'UTR of a luciferase mRNA (Fig 2.1H and I).

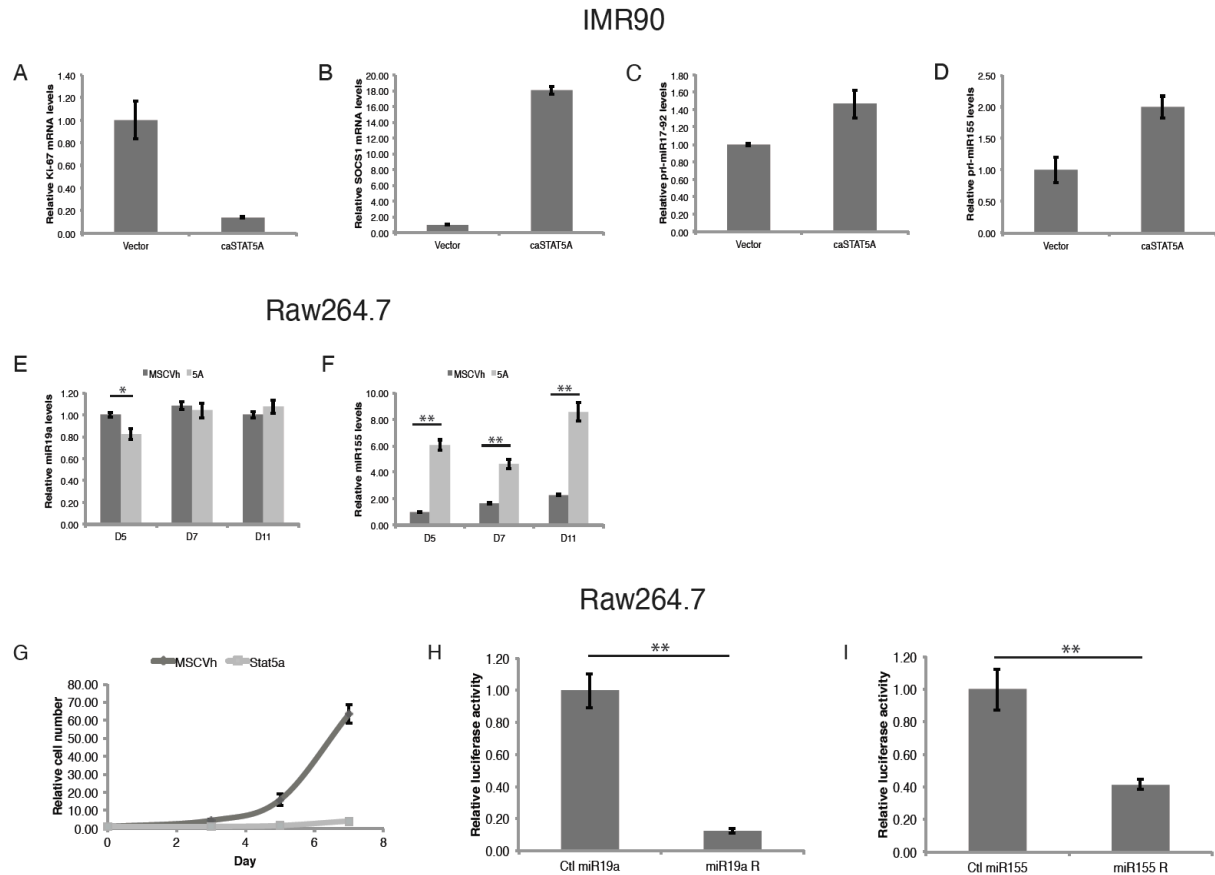


Figure 2.1 A constitutively active form of STAT5A induces miR-19 and miR-155.

QPCR for (A) KI-67, (B) SOCS1, (C) primary miR17-92 and (D) primary miR-155 of IMR90 expressing either an empty vector control or ca-STAT5A. (E and F) qPCR for miR-19a (E) and miR-155 (F) of Raw264.7 expressing either an empty vector control (MSCVh) or ca-STAT5A at 5, 7 or 11 days post-infection. (G) Growth curves of Raw264.7 cells infected with an empty control vector or ca-STAT5A. Data are presented as mean \pm SD of triplicates. (H and I) Luciferase activity from Raw264.7 cells stably expressing ca-STAT5A and transfected with miR-19 or miR-155 luciferase reporters (R). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$

MiRNA sponges can inhibit miR-19 and miR-155 activity in Raw264.7 cells

The action of miRNAs can be inhibited by RNA sponges, which are multimerized miRNA binding sites. Sponges can be expressed in cells to titrate any desired miRNA. Kluiver and colleagues generated miRNA sponges against miR-19 and miR-155 [19]. To investigate the functional importance of the SOCS1-p53 axis in a system that engages endogenous molecules, we treated Raw264.7 cells expressing these sponges with LPS, which is known to induce STAT5 in these cells [25]. The use of LPS thus helps to capture the dynamics of miRNA induction and activity shortly after perturbing the cells. We treated Raw264.7 cells with a combination of LPS

and doxorubicin to simultaneously study the interactions between SOCS1 (induced by LPS) and p53 (induced by doxorubicin). We first investigated whether treatment of Raw264.7 with LPS could induce miR-19 and miR-155. We expected this because there are STAT5 binding sites in the promoters of miR-155 [26] and the cluster of miRNAs miR-17-92 that contains miR-19 [27]. We first confirmed that treatment of Raw 264.7 cells with LPS induced phosphorylation of endogenous STAT5A (Fig. 2.2A). We also found that LPS induced miR-19a (Fig. 2.2B) and miR-155 (Fig. 2.2C) in Raw264.7 cells although with different kinetics. The miR-19 family of miRNAs was induced at four hours after treatment and remained elevated for 24 h. The induction of miR-155 also started at 4 h after treatment and remained elevated for 24 h but it was more substantial than that of miR-19, reaching 200 fold. Expression of miRNA reporters containing binding sites for miR-19 or miR-155 in the 3'UTR of a luciferase gene revealed that these miRNAs are active in Raw 264.7 cells treated with LPS (Fig. 2.2D and E).

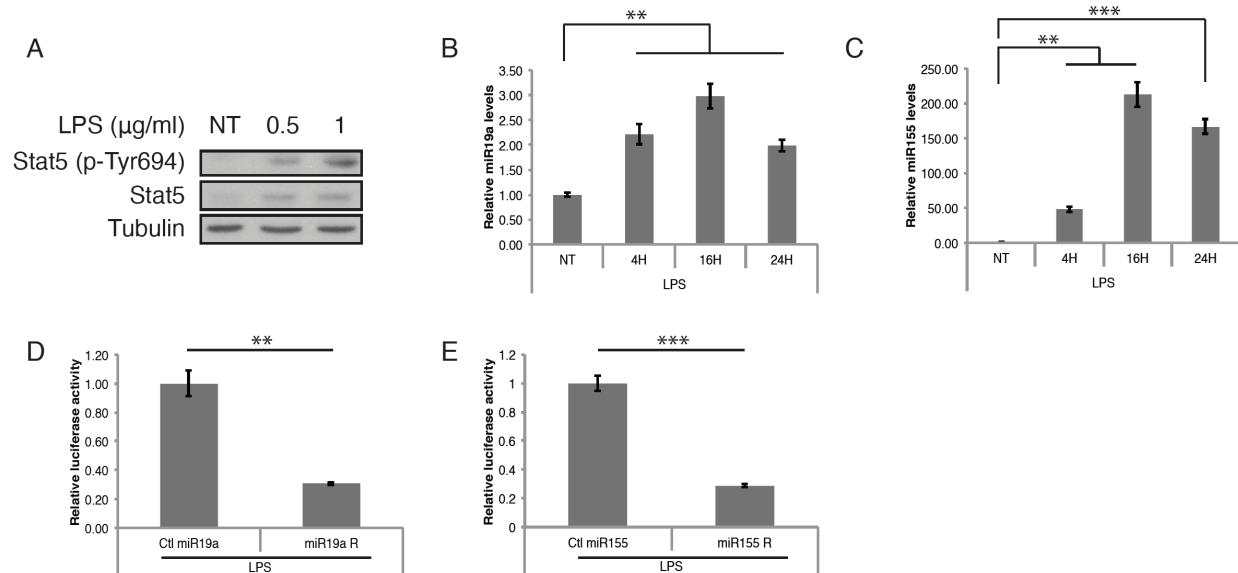


Figure 2.2 LPS treatment induces STAT5A, miR-19 and miR-155 in Raw264.7 cells.

(A) Immunoblots for phosphorylated STAT5 (Tyr694) and total STAT5 using cell lysates from Raw264.7 cells stimulated with LPS. (B-C) qPCR for miR-19a and miR-155 induced in Raw264.7 cells by LPS. (D and E) Luciferase activity from LPS treated Raw264.7 cells transfected with miR-19 or miR-155 luciferase reporters (R). **p < 0.01 and ***p < 0.001

Since *SOCS1* is among miR-19 and mir-155 targets [7,14,15], we reasoned that inhibiting their functions should lead to higher SOCS1 levels in Raw 264.7 cells treated with LPS. We thus

expressed anti-miR-19 and anti-miR-155 sponges in Raw 264.7 cells treated with LPS to induce STAT5 and SOCS1 and doxorubicin to activate p53. The presence of miRNA sponges increased the induction of SOCS1 protein levels by LPS (Fig. 2.3A). We reported a few years ago that SOCS1 facilitates phosphorylation of p53 at serine 15 by binding both p53 and activated ATM/ATR as part of DNA damage signaling [5]. As expected from this mechanism, LPS and doxorubicin treatments stimulate phosphorylation of p53 at serine 15. However, miRNA sponges enabled an increase in time and intensity of the phosphorylation of p53 at serine 15 (Fig. 2.3B). It is known that the dynamics of p53 induction affect target gene expression, suggesting that miRNAs can modulate the p53 response via this mechanism [28]. Consistent with this explanation, sponges against miR-155 indeed increased the expression of the p53 target gene p21 (Fig. 2.3C). We also measured the effect of the sponges on the levels of miR-19 and miR-155. We did not find any reduction in miRNA levels in cells expressing miRNA sponges (Fig. 2.3D and E), suggesting that they act by competitively titrating miRNAs out of their targets.

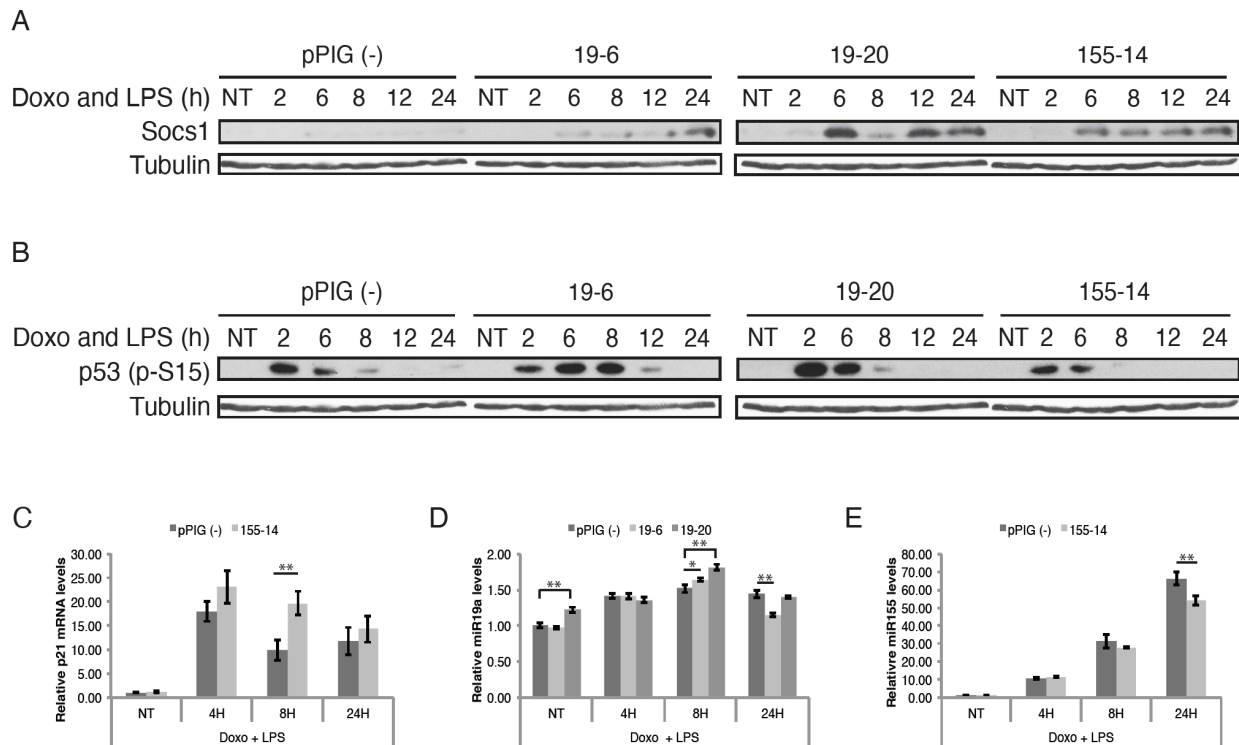


Figure 2.3 MicroRNA sponges against miR-19 or miR-155 stabilize SOCS1 protein and increase p53 phosphorylation and activity in response to doxorubicin and LPS.

(A) Immunoblots for SOCS1 using cell lysates from Raw264.7 cells stably expressing an anti-miR-19 sponge or an anti-miR-155 sponge and stimulated with doxorubicin (doxo) and LPS. pPIG is the control vector. (B) Immunoblots for phosphorylated p53 (Ser15) using cell lysates as in A. (C) QPCR for p21 using cell extracts as in A. (D) QPCR for miR-19a of Raw264.7 stably expressing anti-miR-19 sponges and stimulated with doxo and LPS. (E) QPCR for miR-155 of Raw264.7 stably expressing an anti-miR-155 sponge and stimulated with doxo and LPS. * $p < 0.05$ and ** < 0.01

The next generation of miRNA sponges

We next tested a novel sponge formulation where a catalytic RNA motif of the hammerhead type was added to the RNA sponge. It is expected that the hammerhead ribozyme will cleave the mature miRNA (Fig. 2.4A). We performed this study in a human myeloma cell line, which is more relevant for human cancer and expresses high levels of miR-155. Expression of sponges with 14 binding sites for miR-155 in the human myeloma cell line RPMI8226 reduced the levels of miR-155 and this reduction was more pronounced when a hammerhead catalytic RNA motif was included in each miRNA-binding site in sponges with either 14 or 18 binding sites (Fig.

2.4B, left). We also measured the level of the non-guide (passenger) strand of the miR-155 precursor and observe only a moderate reduction by the catalytic sponges with 18 miR-155 binding sites (Fig. 2.4B, right). The catalytic sponges were also the most effective in reducing cell growth in these cells (Fig. 2.4C). In a long-term proliferation assay on cells plated on methylcellulose, sponges reduced colony formation and again the catalytic sponges were more effective (Fig. 2.4D and E). We also tested sponges on the ability of RPMI8226 to migrate in a transwell assay. Once again catalytic sponges reduced cell migration in comparison with the control vectors or the non-catalytic sponge, which had an intermediate effect (Fig. 2.4F). Catalytic sponges were very effective in inducing levels of *SOCS1* mRNA, consistent with their ability to inhibit miR-155 (Fig. 2.4G). The levels of RNAs coding for the sponges were reduced in comparison with the control sponge likely because cells with the highest levels of sponges are counter selected. It is also possible that endogenous miRNAs can decrease sponge levels in the same way they can reduce mRNA target levels [29].

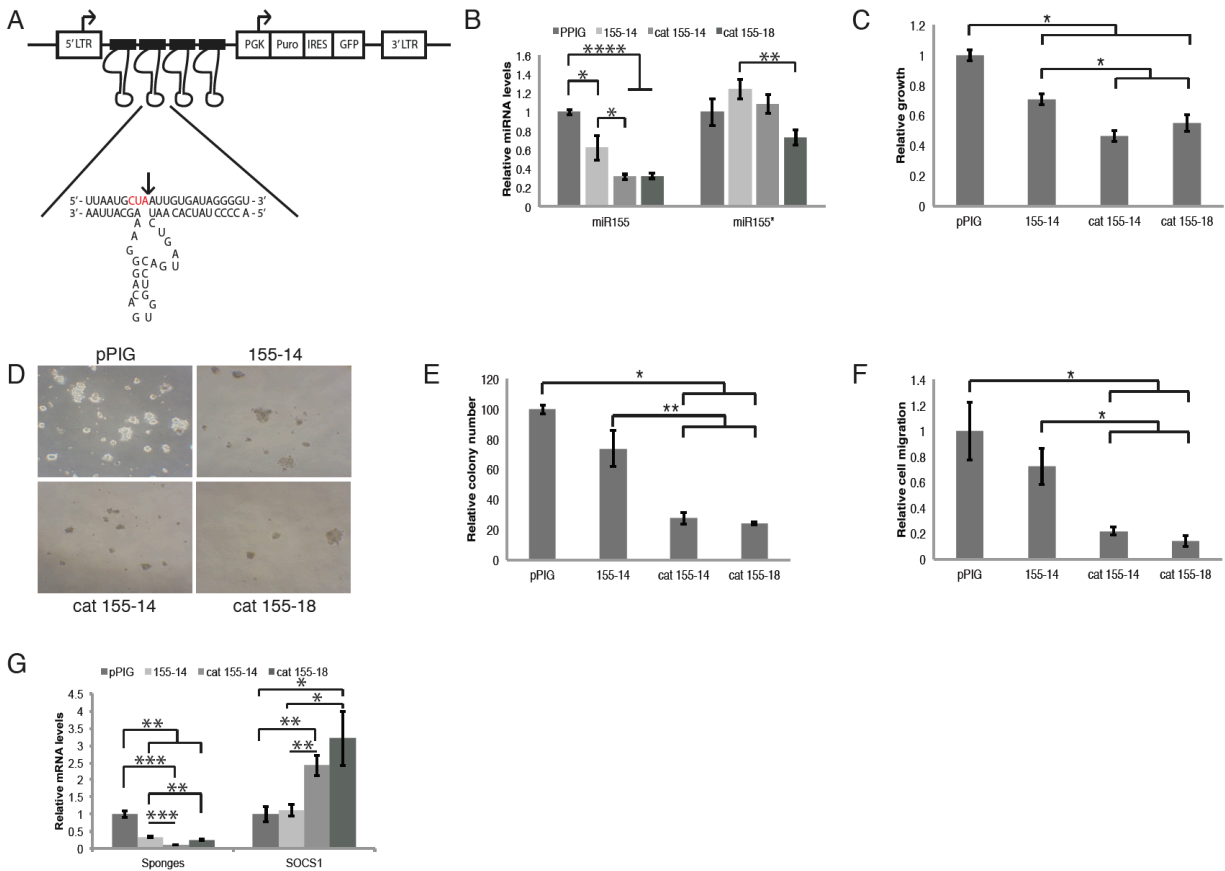


Figure 2.4 Catalytic sponges against miR-155 inhibit the transformed phenotype of human myeloma cells.

(A) Retroviral vector expressing a catalytic sponge. The hammerhead ribozyme motif and the cleavage site on the target are indicated. Hammerhead ribozymes cleave the target after the consensus sequence NUX, where X is everything but a G. (B) QPCR for miR155 (mature, guide strand) or miR155' (passenger strand) of RPMI8226 stably expressing an anti-miR-155 sponge or its catalytic version. pPIG is the control vector. (C) Growth assay performed on RPMI8226 cells stably expressing normal or catalytic sponges against miR-155. The number of colonies was quantified one week after seeding. (D and E) Methylcellulose colony formation assays were performed using the same cells as described in C. (F) Migration assay performed with the same cells as in (C) using Transwell plates (see Section 2). Migration counts were done 24 h after plating. (G) QPCR for the sponges and *SOCS1* using the same cell extracts as in (B).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$

Next, we studied whether inhibition of miR-155 in RPMI8226 engaged the p53 pathway as in Raw264.7 cells. Catalytic sponges increased the levels of phosphorylated p53 at serine 15

and the p53 target p21 better than non-catalytic sponges in RPMI8226 (Fig. 2.5A). P53 targets *NOXA*, *GADD45B* and *ABHD4* were also moderately induced while the p53-repressed gene *BCAT1* was also slightly reduced (Fig. 2.5B). More importantly, p53 knockdown by a validated shRNA restored the ability of these cells to form colonies when plated on methylcellulose (Fig. 2.5D) indicating that the growth defect of cells expressing anti-miR-155 sponges was p53 dependent. However, the migration capacity of the p53-depleted cells that expressed the sponges was not enhanced suggesting that miR-155 controls cell migration by another pathway (Fig 2.5E).

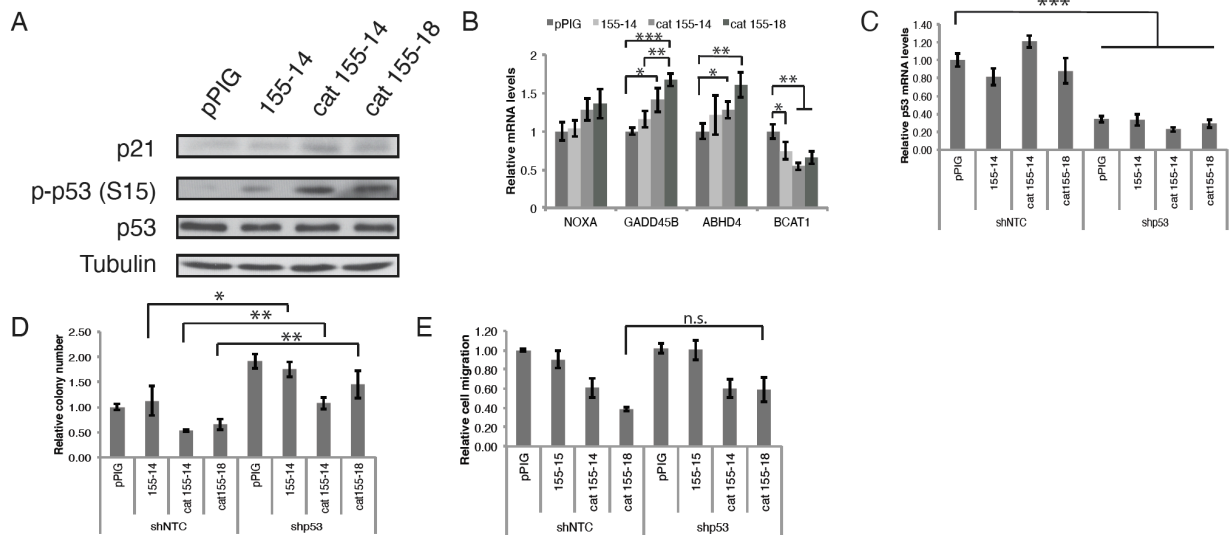


Figure 2.5 The catalytic sponge effect is dependent on the p53 pathway.

(A) Immunoblots of RPMI8226 cells expressing the regular sponge or the catalytic sponges. (B) QPCR for p53 targets in RPMI8226 using the same cell extracts as in A. (C) QPCR for *p53* in RPMI8226 cells stably expressing the regular sponge or its catalytic version in combination with an shRNA against p53 or a control shRNA (shNTC). (D) Methylcellulose colony formation assay performed with the same cells as described in C. (E) Migration assay of RPMI8226 stably expressing the indicated sponges in combination with an shRNA against p53 or a shRNA control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

2.2.4 Discussion

The treatment of hematopoietic malignancies is mostly based on cytotoxic chemotherapy, which can be effective in some patients but is limited by toxicity and the development of resistance. Recently, novel therapies targeting specific genetic alterations in cancer cells have been introduced exemplified by the highly successful use of BCR-ABL inhibitors in chronic myelogenous leukemia [30]. It is hoped that identifying additional therapeutic targets in cancer cells can lead to equally effective treatments. MiRNAs have been proposed as therapeutic targets in cancer [31]. Several transcription factors with deregulated activity in hematopoietic cancers drive the expression of miRNAs [32]. Here we report that the miRNAs miR-19 and miR-155 control the outcome of STAT5 stimulation. High levels of these miRNAs modulate the activation of the SOCS1-p53 axis acting downstream of STAT5 to limit tumorigenesis [5,7]. The effects of miRNAs seem to affect the fine dynamics of p53 induction and phosphorylation, which is emerging as an important factor in the control of the p53 response [28]. These dynamics are difficult to study in non-synchronized cell cultures but the use of LPS and doxorubicin might have allowed us to capture it in a cell population.

To inhibit miRNAs, we used miRNA sponges of two kinds. First we used “traditional” sponges where the miRNA binding sites were multimerized and which act by titrating miRNAs. Second, we improved this formulation by adding catalytic RNA motifs of the hammerhead type within the miRNA binding site, which can potentially promote miRNA turnover and reduce miRNA levels. Although further studies are required to optimize catalytic RNA sponges, we were able to show that they reduce the steady state levels of mature miRNA targets in comparison with conventional sponges.

Inhibition of miR-19 and miR-155 activity can reactivate the expression of tumor suppressor genes such as SOCS1 and subsequently p53, which can then inhibit cell proliferation, cell migration and block tumor progression. However, we acknowledge that in addition to *SOCS1*, other targets of miR-19 and miR-155 are expected to be upregulated by sponges against these miRNAs and they could contribute to the phenotypic effects observed. However, since the kinetic of induction of these two miRNAs is not the same after treatment with LPS, it suggests that their simultaneous inhibition should bring a higher effect on their common targets. The identification of oncogenic miRNAs as potential targets to restore tumor suppression functions in cancer cells shows potential for cancer therapy. One interesting aspect of miRNAs functions in cancer is that

they change the normal balance between signals that stimulate or antagonize cell growth (Fig. 2.6). Therefore, inhibition of miRNAs can restore a normal physiological balance with little toxicity to normal cells. The possibility of translating our findings to the clinics is encouraged by clinical studies with locked nucleic acids [33] which could be used to target miR-19 and miR-155 in hematopoietic cancers.

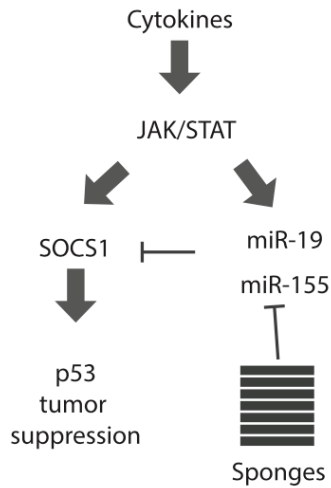


Figure 2.6 MiRNA sponges restore normal balance between growth inhibitory and growth promoting pathways.

Cytokine signaling induces both growth inhibitors (i.e. SOCS1) and miRNAs that modulate their expression (miR-19 and miR-155). These miRNAs are overexpressed in cancer cells but their inhibition with sponges restores a normal physiological equilibrium.

2.2.5 Materials and methods

Cell lines and reagents. Raw264.7 (ATCC TIB-71) a murine leukemia cell line transformed with the Abelson leukemia virus and IMR90 (ATCC CCL-186) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in DMEM (GIBCO, Burlington, ON, Ca). RPMI8226 (ATCC CCL-155) was purchased from ATCC and cultured in RPMI-1640 (GIBCO). Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada). LPS (TLR4 ligand) from Escherichia coli strain 055:B5 re-extracted by phenol chloroform (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) was used at a concentration of 500 ng/ml. Doxorubicin (Sigma) was used at a concentration of 1 μ M.

Plasmid constructions. Ca-STAT5A was described in [18]. Multimerized microRNA binding sites (RNA sponges) in the retroviral vector pPIG were kindly provided by Kluiver et al. [19]. Two constructs target miR-19 and contain either 6 miRNA binding sites (MBS) or 20 MBS. One construct targets miR-155 and contains 14 MBS. For the catalytic sponge, the hammerhead ribozyme sequence was embedded within the MBS (Table SI). Synthetic double-stranded oligonucleotides (GeneArt, ThermoFischer Sc.) containing two copies of the catalytic sponge sequence (Supplemental Table I) were digested with SanD1 and cloned into pPIG according to Kluiver et al. [19]. We made two catalytic constructs against miR-155, one containing 14 MBS and the other 18 MBS. For the luciferase reporter, four binding sites for either miR-19 or miR-155 were cloned in the 3'UTR of the firefly luciferase gene encoded in the pmirGLO reporter system. Binding sites were replaced by their reverse-complement as a control. The shRNA against p53 was from [20].

Retroviral infection of cells. Retroviral-mediated gene transfer was performed as previously described [21]. For RPMI8226, 293T cells were transfected with 15 μ g vector DNA and 15 μ g of packaging vector pCL10A1 (a kind gift of Dr. Moshe Talpaz). Media of 293T cells were changed 24 h post-transfection. Half the viral soup was then added to 2×10^6 cells in a 6 well-plate. Spin-infections were performed by centrifugation of the cells at 3200 rpm with the viral soup for three hours at 32 °C. An equal volume of fresh medium was then added to the cells for an overnight incubation. The next day, medium of the infected cells was changed and selections started 6–8h later. Infected cell populations were selected with either puromycin (2.5 μ g/ml, 3

days) or hygromycin (100 µg/ml, 5 days).

Preparation of cell extracts and analysis by Western blotting. Cells were washed twice using PBS, harvested in 500 µl of RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8, and 5 mM EDTA), incubated on ice for 5 min and sonicated for 10 s. Protein samples were prepared in 4X Laemmli buffer and heated at 95 °C for 5 min. SDS-PAGE and western blotting were performed as described previously [22]. Proteins were loaded on a 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). The primary antibodies used were as follows: anti-phospho-STAT5^{Y694} (#9314; 1:1000; Cell signaling, Danvers, MA, USA), anti-STAT5 (#9363; 1:1000; Cell signaling), anti-SOCS1 (4H1; 1:1000; MBL, Woburn, MA, USA), anti-phospho-p53^{S15} (#9284; 1:1000; Cell signalling), anti-p21 (clone C-19; SC-397; 1:750; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), anti-p53 (clone DO-1; SC-126; 1:1000; Santa Cruz) and anti-TUBULIN (B-512; 1:20000; Sigma-Aldrich). Signals were revealed with secondary antibodies coupled to peroxidase (BioRad, Mississauga, ON, Canada) by using ECL or ECL prime (GE healthcare, Baie d'Urfé, Qc, Canada).

Luciferase assays. Twenty-four hours before transfection, Raw264.7 were seeded at 200,000 cells per well in a 12-wells plate. The pmirGLO vector (100 ng) was transfected using Xtreme GENE HP (Sigma) with a transfection reagent-reporter ratio of 2:1. The medium was changed after 24 h. For experiments that required LPS treatment, the latter was added to fresh medium and cells were incubated for a further four hours. Luciferase activity was assayed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA).

Real-time quantitative PCR. Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen). Reverse transcription and real-time PCR was performed as previously described [23]. The mRNA expressions were measured relative to those of b-actin and TBP mRNA. For miRNA detection, a polyA tail was added to 2 µg of total RNA extract using 2.5 U of E.coli PolyA polymerase (NEB). Tailed total RNA was reverse transcribed using an anchor primer as described by Luo et al. [24]. cDNA was generated using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). The qPCR reaction was carried in a final volume of 10 µl and contained 1 µl reverse transcription products diluted 120-fold, 10 µM forward primer, 10 µM universal reverse PCR primer, 1 µl 10X PCR buffer, 200 µM of each dNTP, 0.5 U of JumpStart Taq DNA polymerase, and 0.05 µM of universal TaqMan probe. The mixture was incubated as

described by Luo et al. [24]. Data were normalized using endogenous controls miR-191 and U6. All forward and reverse primers are listed in Supplementary Table 1 (S2.1).

Supplementary Table 2.1 (S2.1) Forward and reverse primers used for qPCR

Primers	Sequence	
TaqMan probe	5'(FAM)-TCTCCTCGGTATCGAGTCGCACT-3'(TAMRA)	
Universal reverse PCR primer	5'-CGACTCGATCCAGTCTCAGGGTCCGAGGTATTTCGATCCTAACCTCTCCTCGGTATCGAGTCGCACTTTTTTTTTTTT-3'	
Universal TaqMan probe primer	5'-CCAGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC-3'	

qPCR primers	Forward	Reverse
KI-67	5'-AGAAGACAGTACCGCAGATGA-3'	5'-CGGCTCACTAATTTAACGCTGG-3'
SOCS1	5'-GGTCCCCTGGTTGTTGTA-3'	5'-TAGGAGGTGCGAGTTCAGGT-3'
pri-miR17-92	5'-ACATGGACTAAATTCCTTTAAATG-3'	5'-AATCTTCAGTTTTACAAGGTGATG-3'
pri-miR155	5'-CCACCAATGGAGATGGCTCTA-3'	5'-TTGGAGGCAAAAACCCCTATCA-3'
miR-155	5'-GTGCCGTTAATGCTAATCGTGATAG-3'	
miR-155* (passenger strand)	5'-GTGCCGCTCTACATATTAGCATTAAC-3'	
hsa Sponges	5'-CTCTGCAGAATGGCCAACCTTT-3'	5'-CTTCCCAGGTCACGATGTAGGG-3'
Noxa	5'-GAAGAAGGCGCGCAAGAACG-3'	5'-TGAGTAGCACACTCGACTTCCA-3'
GADD45B	5'-TGCATTGTCTCCTGGTCACGAA-3'	5'-CCC GGCTTTCTTCGCACTAG-3'
ABHD4	5'-GGAAGCCAGGATCCTCCAGTGTCT-3'	5'-CCAAGGGGGTGC GGTCGTTT-3'
BCAT1	5'-TGGCTCTGGTACAGCCTGTGTT-3'	5'-GGACCATTCTCCATAGTTGGAA-3'
TP53	5'-GCAGCCAGACTGCCTCCGG -3'	5'-GGGACGCAAGGGGACAGA-3'
TBP	5'-GCTGGCCCATAGTATCTTTGC-3'	5'-CTTACACGCCAAGAAACAGTGA-3'
HMBS	5'-GGCAATGCGGTGCAA -3'	5'-GGGTACCCACGCGAATCAC-3'
miR-19a	5'-GTGCCGTGTGCAAAATCTATGCAAAA-3'	
miR-155	5'-GTGCCGTTAATGCTAATTTGTGATAG-3'	
miR-191	5'-GTGCCGCAACGGAATCCAAAAAG-3'	
mmu U6	5'-CACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCAT-3'	
p21	5'-CACAGCTCAGTGGACTGGAA-3'	5'-ACCCTAGACCCACAATGCAG-3'
beta-Actine	5'-TCCTAGCACCATGAAGATCAAGATC-3'	5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'
Tbp	5'-GTTTCTGCGGTGCGTCATTTT-3'	5'-TCTGGGTTATCTTACACACCATGA-3'

Growth curves and Methylcellulose assay. Either empty MSCVhygro- or ca-STAT5A-expressing Raw264.7 cells were seeded at a concentration of 2500 cells/ml and grown in six well-plates in triplicate for one week. Cells were washed with PBS and fixed with a 1% glutaraldehyde solution in PBS. Cells were then stained with 0.5% crystal violet and rinsed several times with water before being left to dry. Retained dye was extracted with two ml of 10% acetic acid and 200 μ l of extracted dye was used for absorbance measurements at 590 nm using a 96-wells plate and a microplate reader. RPMI8226 cells were seeded at a concentration of 5,000 cells/mL and grown in cell culture flasks in triplicate for one week. Cells were regularly counted with a cell counter.

Colony formation capacity was measured for RPMI8226 by performing a methylcellulose assay. RPMI8226 cells were stably transduced by retroviral infection with empty vector, normal sponge against miR-155 or catalytic sponges against miR-155. 4000 cells were diluted into 250 μ l of methylcellulose solution (R&D Systems Inc. catalogue #HSC001), final concentration 1.27% in RPMI1640 medium supplemented with 20% FBS. Cells were then plated in 24-wells plate, in

triplicates, and grown in semi-solid medium for two weeks at 37 °C with 5% CO₂. Colonies with more than 50 cells were counted under a light microscope.

Migration assay. Cell migration was measured in vitro by using Transwell chambers (8 μm pore size, Corning #C3422) inserted in a 24-wells plate and 3×10^5 stably infected cells were then plated in the top chamber in 100 μL of RPMI1640 medium supplemented with 10% FBS. In the bottom chamber, we placed 600 μL of RPMI1640 medium supplemented with 20% FBS. Cells were incubated for 24 h and the cells in the bottom compartment (migrated cells) were counted. Every condition was done in triplicate.

2.2.6 References

- [1] G. Ferbeyre, R. Moriggl, The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1815 (2011) 104–114.
- [2] G. Marcucci, K. Mrozek, M.D. Radmacher, R. Garzon, C.D. Bloomfield, The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia, *Blood* (2010).
- [3] J. Chen, O. Odenike, J.D. Rowley, Leukaemogenesis: more than mutant genes, *Nat. Rev. Cancer.* 10 (2010) 23–36.
- [4] S. Ilangumaran, R. Rottapel, Regulation of cytokine receptor signaling by SOCS1, *Immunol. Rev.* 192 (2003) 196–211.
- [5] V. Calabrese, F.A. Mallette, X. Deschenes-Simard, S. Ramanathan, J. Gagnon, A. Moores, et al., SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence, *Mol. Cell.* 36 (2009) 754–767.
- [6] F.A. Mallette, V. Calabrese, S. Ilangumaran, G. Ferbeyre, SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence, *Aging (Albany NY)* 2 (2010) 445–452.
- [7] H. Bouamar, D. Jiang, L. Wang, A.P. Lin, M. Ortega, R.C. Aguiar, MicroRNA 155 control of p53 activity is context dependent and mediated by Aicda and Socs1, *Mol. Cell. Biol.* 35 (2015) 1329–1340.
- [8] K. Shimada, S. Serada, M. Fujimoto, S. Nomura, R. Nakatsuka, E. Harada, et al., Molecular mechanism underlying the antiproliferative effect of suppressor of cytokine signaling-1 in non-small-cell lung cancer cells, *Cancer Sci.* 104 (2013) 1483–1491.
- [9] O. Hatirnaz, U. Ure, C. Ar, C. Akyerli, T. Soysal, B. Ferhanoglu, et al., The SOCS-1 gene methylation in chronic myeloid leukemia patients, *Am. J. Hematol.* 82 (2007) 729–730.
- [10] C.G. Ekmekci, M.I. Gutierrez, A.K. Siraj, U. Ozbek, K. Bhatia, Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia, *Am. J. Hematol.* 77 (2004) 233–240.
- [11] C.S. Chim, K.Y. Wong, F. Loong, G. Srivastava, SOCS1 and SHP1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway, *Leukemia* 18 (2004) 356–358.

- [12] T.C. Liu, S.F. Lin, J.G. Chang, M.Y. Yang, S.Y. Hung, C.S. Chang, Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in chronic myeloid leukaemia, *Br. J. Haematol.* 123 (2003) 654–661.
- [13] L.F. Lu, T.H. Thai, D.P. Calado, A. Chaudhry, M. Kubo, K. Tanaka, et al., Foxp3- dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein, *Immunity* 30 (2009) 80–91.
- [14] S. Jiang, H.W. Zhang, M.H. Lu, X.H. He, Y. Li, H. Gu, et al., MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene, *Cancer Res.* 70 (2010) 3119–3127.
- [15] O. Merkel, F. Hamacher, R. Griessler, L. Grabner, A.I. Schiefer, N. Prutsch, et al., Oncogenic role of miR-155 in anaplastic large cell lymphoma lacking the t(2;5) translocation, *J. Pathol.* 236 (2015) 445–456.
- [16] F. Pichiorri, S.S. Suh, M. Ladetto, M. Kuehl, T. Palumbo, D. Drandi, et al., MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 (2008) 12885–12890.
- [17] N. Kobayashi, H. Uemura, K. Nagahama, K. Okudela, M. Furuya, Y. Ino, et al., Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer, *Oncotarget* 3 (2012) 1455–1471.
- [18] F.A. Mallette, M.F. Gaumont-Leclerc, G. Huot, G. Ferbeyre, Myc down- regulation as a mechanism to activate the Rb pathway in STAT5A-induced senescence, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 34938–34944.
- [19] J. Kluiver, J.H. Gibcus, C. Hettinga, A. Adema, M.K. Richter, N. Halsema, et al., Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition, *PLoS ONE* 7 (2012) e29275.
- [20] T.R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami, A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells, *Science* 296 (2002) 550–553.
- [21] G. Ferbeyre, E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives, S.W. Lowe, PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence, *Genes. Dev.* 14 (2000) 2015–2027.
- [22] F.A. Mallette, O. Moiseeva, V. Calabrese, B. Mao, M.F. Gaumont-Leclerc, G. Ferbeyre, Transcriptome analysis and tumor suppressor requirements of STAT5-induced senescence, *Ann. N Y Acad. Sci.* 1197 (2010) 142–151.

- [23] X. Deschenes-Simard, M.F. Gaumont-Leclerc, V. Bourdeau, F. Lessard, O. Moiseeva, V. Forest, et al., Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation, *Genes. Dev.* 27 (2013) 900–915.
- [24] X.Z.J. Luo, H. Wang, Y. Du, L. Yang, F. Zheng, D. Ma, PolyA RT-PCR-based quantification of microRNA by using universal TaqMan probe, *Biotechnol. Lett.* 34 (2012) 627–633.
- [25] M.A. Lokuta, M.A. McDowell, D.M. Paulnock, Identification of an additional isoform of STAT5 expressed in immature macrophages, *J. Immunol.* 161 (1998) 1594–1597.
- [26] K.L. Kopp, U. Ralfkiaer, L.M. Gjerdrum, R. Helvad, I.H. Pedersen, T. Litman, et al., STAT5-mediated expression of oncogenic miR-155 in cutaneous T-cell lymphoma, *Cell Cycle* 12 (2013) 1939–1947 (Georgetown, Tex.).
- [27] Y. Feuermann, G.W. Robinson, B.M. Zhu, K. Kang, N. Raviv, D. Yamaji, et al., The miR-17/92 cluster is targeted by STAT5 but dispensable for mammary development, *Genesis* 50 (2012) 665–671.
- [28] J.E. Purvis, K.W. Karhohs, C. Mock, E. Batchelor, A. Loewer, G. Lahav, P53 dynamics control cell fate, *Science* 336 (2012) 1440–1444.
- [29] I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, E. Izaurralde, mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes, *Genes. Dev.* 20 (2006) 1885–1898.
- [30] G.K. Lambert, A.K. Duhme-Klair, T. Morgan, M.K. Ramjee, The background, discovery and clinical development of BCR-ABL inhibitors, *Drug Discov. Today* 18 (2013) 992–1000.
- [31] A. Lujambio, S.W. Lowe, The microcosmos of cancer, *Nature* 482 (2012) 347–355. [32] G. Marcucci, K. Mrozek, M.D. Radmacher, R. Garzon, C.D. Bloomfield, The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia, *Blood* 117 (2011) 1121–1129.
- [33] H.L. Janssen, H.W. Reesink, E.J. Lawitz, S. Zeuzem, M. Rodriguez-Torres, K. Patel, et al., Treatment of HCV infection by targeting microRNA, *N Engl. J. Med.* 368 (2013) 1685–1694.

3. miR-146a's function is regulated by the lncRNA SAMIT in RAS-induced senescence

3.1 Présentation de l'article 2

Dans ce second article, nous nous sommes intéressés à la régulation de la fonction de miR-146a dans la sénescence. Effectivement, il est connu que cette réponse cellulaire est accompagnée d'un profil sécrétoire riche en facteurs pro-inflammatoires alors que miR-146a, qui s'accumule aussi, est un miR anti-inflammatoire. Nous avons émis l'hypothèse que l'activité de ce dernier pourrait être régulée par des lARNnc qui agiraient en tant qu'éponge naturelle. Nos résultats suggèrent que *XXBAC-B444P24.13* pourrait inhiber miR-146a en générant un TDMD une fois ce miR lié.

Cet article sera soumis à la revue *Nucleic Acid Research*.

Ma contribution pour cet article est la principale. J'ai généré les échantillons avec les antagonistes contre miR-146a que nous avons utilisés pour le séquençage des ARN. J'ai effectué toute la mise au point pour la méthode du miR-CLIP. J'ai aussi généré les échantillons miR-CLIP que nous avons envoyés à la plateforme pour du RNA-seq. J'ai extrait les données pertinentes des analyses bio-informatique pour les deux séries d'expériences avec le RNA-seq. J'ai fait la culture cellulaire ainsi que tous les qPCR. Emmanuelle Saint-Germain a aidé avec la mise au point de l'immunoprécipitation d'AGO2. Rami Shukr a cloné *XXBAC-B444P24.13*. Fatema Jafary a clone le mutant de *XXBAC-B444P24.13*. Yifei Yan a effectué les analyse bootstrap.

3.2 Article 2

miR-146a's function is regulated by the lncRNA SAMIT in RAS-induced senescence

Lian Mignacca¹, Emmanuelle Saint-Germain¹, Rami Shukr¹, Fatema Jafary¹, Yifei Yan² et Gerardo Ferbeyre^{1,3}

1) Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

2) Cancer Research Program, Research Institute of the McGill University Health Centre, 1001 Decarie Blvd, Montreal, QC, H4A 3J1, Canada.

3) CRCHUM, 900 Saint-Denis, bureau R10.432, Montréal, Québec, H2X 0A9, Canada, Electronic address: g.ferbeyre@umontreal.ca.

3.2.1 Abstract

Senescence induced by oncogene activation is a powerful anti-tumor barrier. This cellular response is known to be associated with a strong pro-inflammatory secretory phenotype, termed the SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype). Intriguingly, in RAS-induced senescence, miR-146a can accumulate but doesn't seem to be fully active since the latter is known to carry anti-inflammatory functions. Using a novel technique called miR-CLIP, we were able to characterize miR-146a interactome and we have found that several lncRNAs are miR-146 partner. Among them, the cancer-associated lncRNA *XXBAC-B444P24.13* interacts with extensive hybridization in the 3' end region of miR-146a suggesting that it can mediate the process of Target RNA Directed miRNA Degradation (TDMD). Consistent with this mechanism, expression of this lincRNA that we renamed *SAMIT* (Senescence Associated miRNA Trimmer) lead to a decrease in miR-146 and an increase in the expression of its target genes.

3.2.2 Introduction

Several oncogenic stimuli trigger an anti-tumoral mechanism called cellular senescence, which consists in a proliferation arrest mediated by the p16/Rb and the p53/p21 tumor suppressor pathway. Senescent cells adopt a flattened and enlarged morphology, are resistant to apoptosis and display a secretory phenotype that is rich in pro-inflammatory factors named SASP (senescence-associated secretory phenotype) (1, 2). In order to engage this anti-tumoral response, the cell must reprogram its gene expression program, and this can be achieved in part by the actions of microRNA (miR) and long non-coding RNAs (lncRNAs) (3), known to be involved in a plethora of functions that are crucial for cell homeostasis (4, 5). miR are ~22 nt long but they initially contact their targets through nucleotides 2-8 a region known as the seed. Their function is accomplished through translation inhibition and/or target degradation (5-8). In turn, lncRNAs (>200 nt) can be targeted by miRs but they can also act as miRs-sponges, alleviating miR regulation on other targets (4, 9-11). miR-sponges act in a concentration dependent manner (12) suggesting that any endogenous RNA having this function must be highly expressed. Some mRNAs have been proposed to act as specific miRNAs sponges and therefore capable of upregulating the expression of other mRNAs sharing the same miRNA binding sites (13). Experimental validation of this ceRNA (competitive endogenous RNA) hypothesis concluded that it is only valid in specific contexts where the miRNA:targets ratio is very low (14).

miR-146a is induced in RASV12 senescent cells by NF- κ B and is known to be involved in the retro-inhibition of the inflammatory response by targeting IRAK1 and TRAF6 (15, 16). miR-146a's induction controls the magnitude of the SASP and may have an impact on the paracrine effects of senescent cells (17). The composition and magnitude of the SASP varies depending on the cell type and senescence inducer being markedly amplified during RAS-induced senescence (18, 19). One possibility is that specific RNAs expressed in RAS-senescent cells acts as sponges for miR-146 preventing its binding to pro-inflammatory targets. Here we combine transcriptome analysis after miR-146a inhibition by antagomirs and miR-146a RNA interactome analysis by miR-Clip (20) during RAS-induced senescence to discover and characterize both targets and RNA sponges for this miRNA. Our work shows that while miR-146a can accumulate in senescent cells, it is bound to a multitude of lincRNAs that can collectively act as a sponge network. In addition, we found that miR-146a functions are inhibited by a novel lncRNA identified as *XXBAC-B444P24.13* that we have named *SAMIT* (Senescence Associated MiRNA Trimmer). *SAMIT* acts

as a “super-sponge” for miR-146 triggering its degradation through TDMD (Target-Directed miR Degradation) (21). In this context, it is not the miR that acts upon its target but rather the target that acts on the miR in a catalytic manner, precluding the need for high expression as a condition for inhibiting miRNAs functions.

3.3.3 Results

Many lncRNAs are under miR-146a's control in RAS senescence

MiR-146a is known to be involved in the retro-inhibition of the inflammatory response by targeting IRAK1 and TRAF6 (15, 16). Intriguingly, RAS senescent IMR90 cells display a secretory phenotype that is rich in pro-inflammatory cytokines and chemokines despite showing high levels of miR-146a (Fig. 3.1A). This led us to investigate what could prevent miR-146a's function in those cells. We were looking for natural endogenous sponges for miR-146a and we reasoned that with time, miR-146 binding to its sponges would lead to their degradation (5, 8). Thus, by inhibiting miR-146a activity with an antagomir, we sought to investigate which RNAs levels would go up and therefore are targeted by miR-146. The activity of the antagomir was first tested in RAS senescent cells by analyzing by RT-qPCR the effect on its known targets. As expected, in the presence of the anti-miR-146a, target levels went up, confirming the inhibition of miR-146a function (Fig. 3.1B). We next extracted total RNA from RAS senescent cells expressing an anti- miR-146a or the control antagomir and performed RNA-sequencing using the Illumina NextSeq 500 at the genomic platform of IRIC (Institute for Research in Immunology and Cancer, Qc) (GSE150325). For all the samples, more than 77% of the reads could be uniquely mapped. As anticipated, the levels of several mRNAs increased with the anti-miR-146a (Fig. 3.1C). Surprisingly, we observed that the levels of many lncRNAs increased as well (Fig. 3.1C). Data from the RNA-sequencing for the lncRNA candidates was validated by RT-qPCR (Fig. 3.1D).

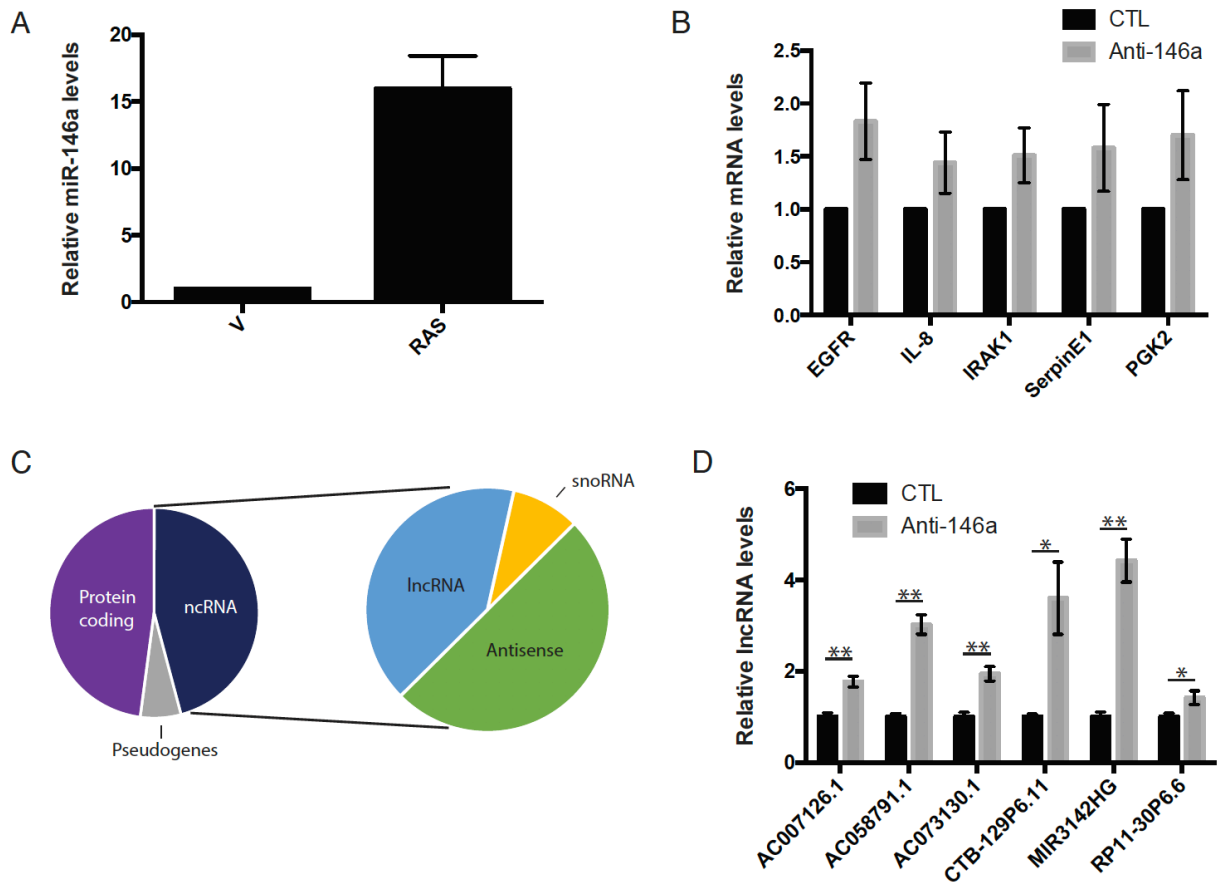


Figure 3.1 MiR-146a regulates many lncRNAs in RAS senescence

A) RT-qPCR of miR-146a in IMR90 RAS senescent cells. An empty vector was used as a control. Graph shows the mean of normalized values for three different biological replicates. B) RT-qPCR of known miR-146a targets in IMR90 RAS senescent cells transfected with an anti-miR-146a. A non-targeting antagomir was used as a control. Graph show the mean of normalized values for three different biological replicates. C) Transcript population from RNA-seq of IMR90 RAS senescent cells expressing an antagomir against miR-146a. Included transcripts had at least a 2-fold induction and a p-value <0.05. D) Validation by RT-qPCR of lncRNAs identified by RNA-seq from B). *p < 0.05 and **p < 0.01

miR-146a interactome in RAS senescence reveals interaction with multiple lncRNAs

The binding of miRs to their targets highly depends on the small seed region while the rest of the miR can accept many mismatches. As a result, each miR targets many different transcripts with a wide range of cellular functions (22). Therefore, the modulation of lncRNA's levels we have seen in cells transfected with an anti-miR-146 could be due to an indirect effect. Thus, to

identify the miR-146a interactome in RAS senescence, we used a technique called miR-CLIP that was first published by Imig and al. (20). This technique requires that the miR of interest be modified with a psoralen (in order to crosslink it with its targets) and a biotin (to purify it specifically). Before performing this miR-CLIP, we wanted to make sure that the modifications on the miR did not affect the biological activity of miR-146a. To do so, an unmodified miR-146a (146a WT) or a miR-146a bearing a psoralen and a biotin (146a P/B) were transfected in IMR90-RAS and their activity was assessed by looking by RT-qPCR at the effect on its known targets. As shown, both probes seem to have similar activity suggesting that the modifications do not impede normal miR-146a biological activity (Fig. 3.2B). We put this modified miR in IMR90-RAS and first performed an immunoprecipitation of AGO2, a component of RISC (RNA-induced silencing complex), followed by an affinity purification of biotin/streptavidin. qPCR showing enrichment for miR-146a after the RIP-AGO or the whole miR-CLIP procedure was done in order to ensure both purification steps work well (Fig. S3.1). The RNA pulled down by this procedure was sequenced and transcripts with at least two-fold of enrichment over the input RNA were considered (GSE150326). Of note, more than 88% of the reads could be uniquely mapped. As expected, we observed many mRNAs in the miR-146a interactome but we also observed numerous lncRNAs (Fig. 3.2C). This result supports our previous observation that many lncRNAs are under miR-146a's regulation (Fig. 3.1C). There is not much overlap between the lncRNA upregulated in the presence of a miR-146a antagomir versus the lncRNA interacting with miR-146a. This could be explained by the fact that miR-146a could regulate the lncRNA from the first RNA-seq by degrading them. Thus, these candidates might be absent from our miR-CLIP results since their degradation might occur too rapidly for them to be captured.

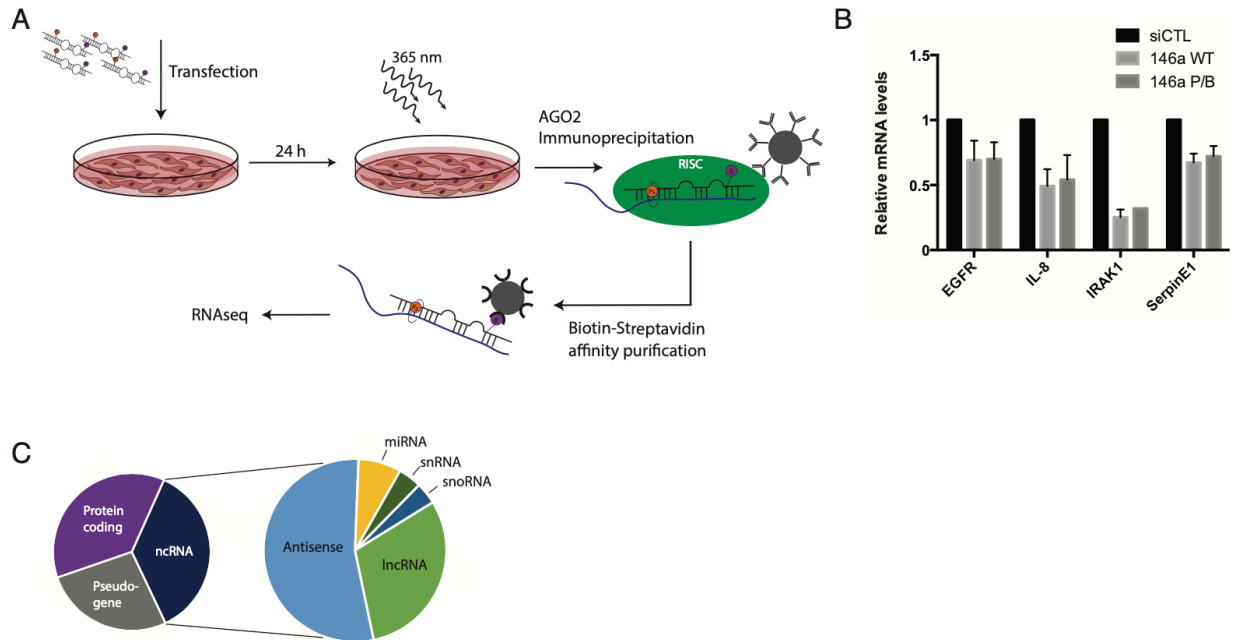


Figure 3.2 Purification of miR-146a interactome by the miR-CLIP technique

A) Schematic representation of the main steps of the miR-CLIP. A modified, miR-146a (psoralen and biotin) is transfected in IMR90 RAS cells and 24h after, crosslinked at 365 nm. Extracts are then purified twice, first by performing a RIP against AGO and second, by doing a biotin-streptavidin affinity purification. Samples were then sent for RNA-sequencing. B) RT-qPCR of known miR-146a targets of IMR90 RAS senescent cells transfected with the unmodified miR-146a (WT) or with miR-146a containing a psoralen and a biotin (P/B). Total RNA was harvested 24h post-transfection. A non-targeting siRNA was used as a control. C) Transcript population of the miR-146a interactome purified from IMR90 RAS senescent cells using the miR-CLIP method. Included transcripts had at least a 2-fold enrichment.

We were then interested to see if the lncRNAs that we had identified could have all been predicted through available miRNA-target prediction tools. To do so, we ran our lncRNA list through various tools and have then looked at the percentage of lncRNA that were left unaccounted for (Table I). Interestingly, about a quarter of the lncRNAs were left out and are probably novel interactions that could have not been predicted by any of the available tools. In order to test if this was statistically significant, we used the bootstrapping method. We first performed an analysis comparing the percentage of all lncRNA from the miR-CLIP RNA-seq which are predicted to interact with miR-146a by at least one of the tools from table 3.1. We obtained a mean of 71% (Fig. 3.3, blue line) compared to 79% (Fig. 3.3, red line) from lncRNA enriched by at least 2-fold

in our miR-CLIP. The Z-score between these two means is 6.8 with a p-value of 0.000001. We then performed a second bootstrap analysis using all the lncRNA identified by a miR-CLIP against miR-106a (20). As shown in fig. 3.3, the mean is just below 50% and it greatly differs from our miR-CLIP results. We thus concluded that the lncRNAs identified by our miR-CLIP are likely part of the miR-146a interactome.

Table 3.1 Predicted transcripts to interact with miR-146a

	miR-CLIP (1425 transcripts)	
		%
miRWalk	215	15
Miranda	1013	71
RNA hybrid	889	62
TargetScan	215	15
Diana LncBase	47	3
RNA22	146	10
Unaccounted for	304	21

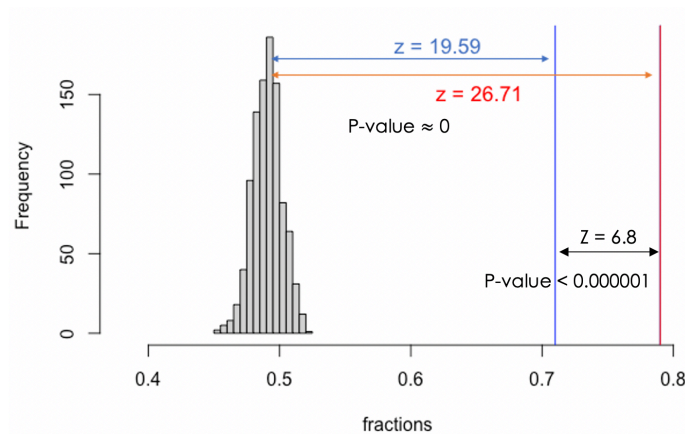


Figure 3.3 Bootstrap analysis for miR-CLIP data

Two bootstrap analysis were carried and are represented in this figure. The first analysis compared all lncRNA present in the miR-CLIP RNA-seq (blue line) with enriched lncRNA (2-fold or more) in miR-CLIP (red line). The second bootstrap analysis compared all lncRNA from miR-106a miR-CLIP to our miR-CLIP against miR-146a. Resampling for the bootstrap was done 10,000 times.

SAMIT (Xxbac-B444P24.13) regulates miR-146a activity in RAS senescent cells by triggering TDMD

We next investigated how miR-146a was predicted to bind with some of the top hits of the miR-CLIP. Interestingly, we noted that for multiple lincRNAs, miR-146a was interacting with them through extensive 3'end pairing (Fig 3.4A). This feature is known to be important to engage a TDMD (Target-directed microRNA degradation) response (21). In this case, instead of the miR acting on its target to repress it, it's actually the target that acts upon the microRNA resulting in the degradation of the latter (21, 24). Prediction of pairing between miR-146a and top lincRNAs was done using a tool called Inta-RNA (25). Among the lincRNA that bind *AC007663.4 (XXBAC-B444P24.13*, accession ENSG00000273343) was chosen for further analysis based on its high expression in liver hepatocarcinoma, a tumor where miR-146 is often downregulated (Fig. 3.4B). In contrast in uterine corpus endometrial carcinoma, this lincRNA is downregulated while miR-146 is upregulated (Fig 3.4C). Of note, miR-146a is also predicted to bind homologs of *XXBAC-B444P24.13* in several species (Fig. 3.4D). Furthermore, using the prediction tool mfold (26), we were able to see that the region in *XXBAC-B444P24.13* predicted to be bound by miR-146a was accessible for the latter to do so (Fig. 3.4E).

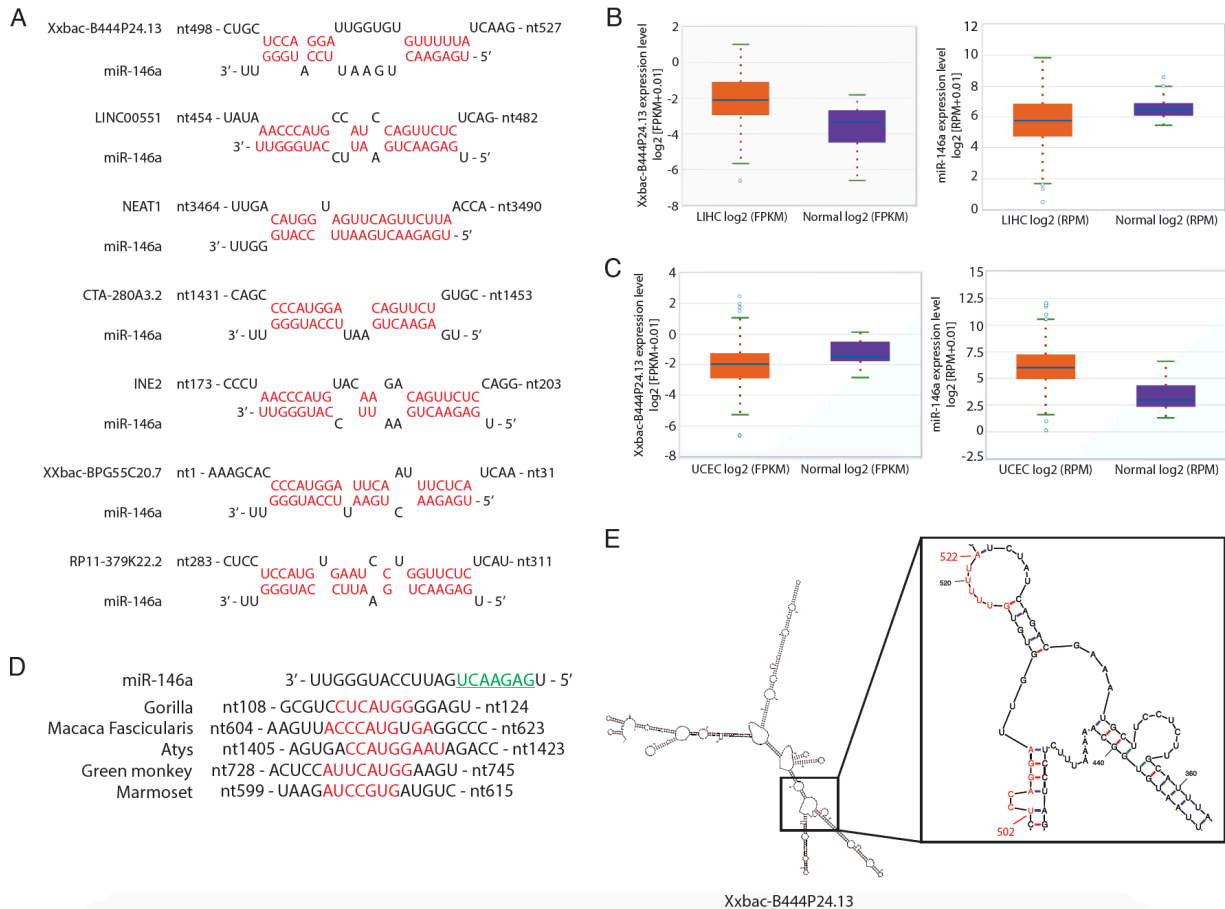


Figure 3.4 MiR-146a interacts with many lncRNA through extensive 3' end binding

A) miR-146a binding to *SAMIT* as predicted by the IntaRNA tool. B) Expression levels of *SAMIT* or miR-146a in LIHC (Liver Hepatocellular Carcinoma). Data was taken from the ENCORI database. C) Expression levels of *SAMIT* or miR-146a in UCEC (Uterine Corpus Endometrial Carcinoma). Data was taken from the ENCORI database. D) miR-146a binding to *SAMIT* primate homologs as predicted by the IntaRNA tool. Homolog sequences were taken from SyntDB. The green highlights miR-146a's seed. Nucleotides in red show residues predicted to interact with miR-146a. E) Predicted secondary structure of *XXBAC-B444P24.13* as predicted by mfold. miR-146a is predicted to bind at nucleotides 502-522. In red, are the nucleotides predicted to interact with miR-146a.

We cloned *XXBAC-B444P24.13* in order to overexpress it in IMR90-RAS to see if this lncRNA could have an effect on miR-146a levels. We first tested if we could detect the overexpression of the lncRNA, which we could using RT-qPCR (Fig. 3.5A). As shown earlier, miR-146a is induced in RAS senescent cells but when we overexpressed *XXBAC-B444P24.13*, miR levels drastically dropped (Fig. 3.5B). In order to examine whether this reduction is due to

degradation or to a decrease of transcription, we looked at levels of its primary transcript, *MIR3142HG* (MIR3142 host gene). We observed a non-significant decrease that is not enough to explain the decrease in miR-146a (Fig. 3.5C). Next, to confirm that the decrease in miR-146a correlated with less activity, we looked by RT-qPCR at the levels of some lncRNAs that we had identified in the antagomir RNA-seq. As shown in figure 3.5D, in RAS expressing cells, where miR-146a levels are high, you can see low levels of these lncRNAs which then increase when *XXBAC-B444P24.13* is overexpressed. The decrease of miR-146a levels in the presence of *XXBAC-B444P24.13* could also be explained by an effect at the processing level. To test if this could be the case, we have used a mimic of miR-146a, thus bypassing all maturation steps. The mimic was transfected into IMR90 expressing either a control or *XXBAC-B444P24.13* and qPCR were done to assess miR-146a levels. As seen in figure 3.5E, miR-146a levels decrease in presence of the lncRNA suggesting that it can act directly on the mature form of miR-146a. Furthermore, we generated a mutant form of *XXBAC-B444P24.13* which cannot bind to miR-146a. This mutant could not reduce the levels of miR-146a (Fig. 3.5E). These results are consistent with the hypothesis that *XXBAC-B444P24.13* functionally inactivates miR-146a by decreasing its levels. We have decided to name this lncRNA SAMIT (Senescence-Associated microRNA Trimmer).

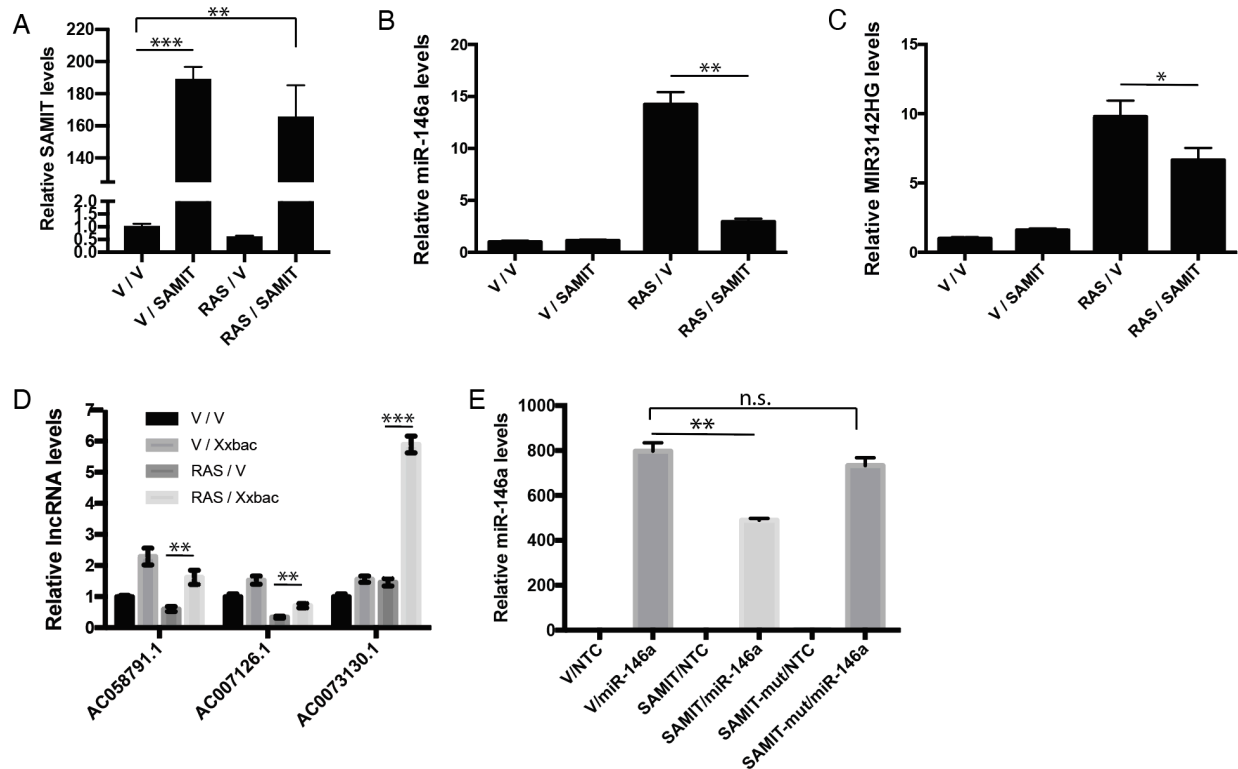


Figure 3.5 MiR-146a's function in RAS senescent cells is inhibited by lncRNA that induces the TDMD response.

A) RT-qPCR for *XXBAC-B444P24.13* in IMR90 overexpressing RASV12 and /or *SAMIT*. Empty vectors (pBABE and/or MSCV) were used as a control. Graph shows representative values for three different biological replicates. B) qPCR for miR-146a with same cells as in A. C) RT-qPCR for *MIR3142HG* with the same cell as in A. D) RT-qPCR for lncRNA identified in the antagonomir RNA-seq in the same cells as in A. E) A mimic for miR-146a was transfected in IMR90 expressing *SAMIT* or a mutant form of *SAMIT* (which cannot bind to miR-146a). RT-qPCRs were then performed to assess miR-146a levels. Empty vector (MSCV) or a siRNA control (NTC) were used as controls. Graph shows representative values for three different biological replicates.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$

3.3.4 Discussion

LncRNAs are a class of transcripts that has been proposed to be able to create a ceRNA (competing endogenous) effect by acting as sponges for miRNAs (4). CeRNA arises when an increase in the number of binding site for a given miR would decrease the availability of the latter resulting in regulation alleviation on other transcripts sharing binding site for this same miR (27). While some studies have shown that the number of added binding sites far exceed physiological conditions (28, 29), there are numerous examples of endogenous non-coding transcript that are not highly expressed and that can still create a ceRNA effect (30, 31). For instance, PTEN pseudogene 1 (*PTENP1*) expression is able to increase PTEN levels by quenching a variety of miR which can target both. Authors have shown that in some cancers, you have a loss of *PTENP1* which also correlates with less PTEN suggesting an anti-tumoral role for the pseudogene. Interestingly, *PTENP1* levels are lower than those of its cognate gene highlighting the fact that you don't need to add a high number of binding sites in order to generate a ceRNA effect (30).

Regulation of miR-146a's activity by lncRNAs acting as sponges has been previously described. Indeed, in intervertebral disc degeneration, the lncRNA *HCG18* sequesters miR-146a leading to an increased inflammatory response and progression of the disease (32). In endometrial cancer, *NIFK-AS1* blocked miR-146a activity which resulted in a blockade of M2 polarization and further reduced the oncogenic potential of endometrial cancer cells (33). Our work might shed light on a possible additional layer of regulation by these lowly expressed lncRNAs. Indeed, our results showed that in the context of RAS induced senescence, miR-146a activity is regulated by the lncRNA *SAMIT*. Since miR-146a binds the latter with extensive base pairing in its 3' end, the lncRNA can induce TDMD, a process known to result in subsequent degradation of the miR. This regulation is achieved through degradation of the mature form of the miR, not by a decrease in transcription (34). To our knowledge, this is the first time that an endogenous lncRNA was shown to regulate miR-146a's activity in RAS-induced senescence. This could explain why senescent cells display a pro-inflammatory phenotype but still can accumulate such high levels of miR-146a, a well-characterized anti-inflammatory miR. We do not exclude the fact that other lncRNAs might participate in the regulation of miR-146a activity. Indeed, we have found many other lncRNAs in the miR-146a interactome. Some of them also display extensive binding in the 3' end region of miR-146a suggesting that they could act in a similar manner to *SAMIT*.

Interestingly, predicted hybridization between miR-146a and *SAMIT* do not follow typical TDMD rules. Indeed, various study have shown that more than two mismatches in the 3'end of the miR can cause a significant decrease in the TDMD efficiency (24, 35, 36). However, prediction for our lncRNA and miR-146a shows that there are some mismatches in the 3'end and our data shows that miR-146a can still be subjected to TDMD regulation. This could suggest that the pattern of binding required for TDMD to be triggered might tolerate more mismatch than formerly thought. Thus, TDMD might be a more widely used strategy to regulate miR activity than previously appreciated.

Limitations

To assess if TDMD could be the mechanism leading to a loss of miR-146a it would be interesting to investigate the tailing and trimming status of miR-146a. Tailing involves the addition of non-templated nucleotides, usually U's or A's in this case, and trimming is characterized by 3' end shortening of the miR (34). Using northern blots, we could see if the presence of *SAMIT* changes the profile of shorter or longer forms of miR-146a. For a more precise characterization of these isomiRs, we could overexpress *SAMIT* in RAS senescent cells and then performed small RNA-seq. Using this technique would allow us to know if isomiRs and which ones are produced in the presence of *SAMIT* (24). Furthermore, it would be important to confirm that knocking down *SAMIT* with an shRNA leads to the accumulation of miR-146a. It would also be interesting to confirm that by isolating specifically *SAMIT*, we can detect miR-146a.

Finally, by inhibiting miR-146a, *SAMIT* could potentially be involved in the regulation of the SASP. To examine this possibility, we could investigate the effect *SAMIT* expression has on SASP factors. This could be achieved by looking at their transcript levels by RT-qPCR complemented with an analysis of secreted cytokines and chemokines.

In conclusion, our work hints at a network of lncRNAs expressed in senescent cells that regulate miR-146a's activity and suggests that one of these lincRNAs may do so by engaging a TDMD.

3.3.5 Materials and methods

Cell lines. Normal human diploid fibroblasts IMR90 were purchased from the Coriell Institute (Camden, New Jersey, USA). They were culture in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent, Montréal, Qc, Canada), 2 mM L-Glutamine (Wisent) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (Wisent).

Plasmid construction and retroviral infections of cells. pBABE-RASV12 was described in (37). The lncRNA *SAMIT* was amplified by PCR from cDNA of IMR90 RAS cells (oligos 1 and 2) and subcloned between *BglII/XhoI* restriction sites to create MSCVh-*SAMIT*. The mutant of *SAMIT* was generated from MSCVh-*SAMIT*. Briefly, two separated PCR were performed (PCR#1 with oligos 1 and 3, PCR#2 with oligos 2 and 4), amplifying before and after the sequence to mutate. Oligos 3 and 4 contains overhang that are the mutated sequence to be introduced into *SAMIT*. These overhangs allow us to anneal both fragment for the third PCR. For the latter, fragments from PCR#1 and PCR#2 were mixed in equimolar ratios and the following program was used to amplify the whole mutated gene: 1) 98C, 30s 2) 98C, 10s 3) 52C, 30s 4) 72C, 30s, repeat 2-4 10 times, 5) add oligos 1 and 2 6) 98C, 10s 7) 52C, 30s 8) 72C, 30s, repeat 6-8 25 times, 9) 72C, 5min. Retroviral-mediated gene transfers were performed as described previously (37). For single selection, puromycin was used at 3 µg/ml for 3 days. When used in combination, puromycin was used at 1.5 µg/ml for 3 days and hygromycin at 50 µg/ml for 5 days.

Name	Sequence
1 – Fwd_ <i>SAMIT</i>	AGTTAGATCTctccagacaacctgggtggt
2 – Rev_ <i>SAMIT</i>	AGTTCTCGAGtggaattcaagtgactgtaattca
3 – Rev_ mutant- <i>SAMIT</i>	CCTGGAGCATTGGTGTCAAAAATagatggacactgcctgcctct
4 – Fwd_ mutant- <i>SAMIT</i>	ATTTTTGACACCAATGCTCCAGGtcaagaatggatggtgatttgg

Real-time quantitative PCR. Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen, #15596026). Reverse transcription was carried on 2 µg of total RNA with the 5X all-in-one RT MasterMix (Abmgood) as recommended by the manufacturer. cDNAs were diluted 10-fold with pure water before being used for qPCR. qPCR reactions for 96-wells were performed using SYBR Green

technologies with 1 μ l of cDNA, 1 μ M of each primer, 25 mM of MgCl₂ and 0.25 units of JumpStart Taq DNA polymerase (MiliporeSigma, #D9307) in a total volume of 10 μ l. The LightCycler 96 Real-Time PCR system (Roche) was used to detect the amplification levels and was programmed to an initial step at 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95 °C, 30 seconds at 55 °C and 30 seconds at 42 °C. Then a melting analysis was carried. The mRNA expressions were measured relative to the mRNA levels of two housekeeping genes; *HMBS* (Hydroxymethylbilane synthetase) and *TBP* (TATA-binding protein). Quantification of target genes was carried using the $\Delta\Delta$ CT method. For the quantification of miR-146a, we have followed a TaqMan assay as described previously (38). All forward and reverse primers are listed below:

Gene	Forward	Reverse
<i>EGFR</i>	AAACCGGACTGAAGGAGCTGCC	ATGCTCTCCACGTTGCACAGGG
<i>IL-8</i>	GGCACAAACTTTCAGAGACAGCA	GGCAAAACTGCACCTTCACACA
<i>IRAK1</i>	GCCATCTCCAGCCCCTTCTTCT	GTGCCCCGGGAAATCTCACAGA
<i>SERPINE1</i>	CGGTCAAGCAAGTGGACTTTTC	GGCTCCTTCCCAAGCAAGTT
<i>PGK2</i>	TGCTGGACAAAGTCAATGAGATGA	TCATCAAACAGGGAAGCACCAA
<i>AC007126.1</i>	ATCTTCATGGCAGCCCCTCCCA	CACCAAGTCCCTAGGCTGCACA
<i>AC058791.1</i>	GCAGAGGTCGCTAACTACAAGAA	AGAAGACCTGCACCAGTGAACGG
<i>AC073130.1</i>	ACTGCTGTGAACACCTCTATGCACT	TCCTGGTTCAATCTTGGGAGGT
<i>CTB-129P6.11</i>	CAGAAGTAACCAGTGGAAAGGGGA	ACTAAACAGTGTGGGAGCGGGC
<i>MIR3142HG</i>	ACCGAGGTTTACTGAGTGCCCA	TGTCCCCGTTTTCCAGATGAGGC
<i>RP11-30P6.6</i>	GTTCAAGGCTGGTTGTGGTGCC	GGCTTGTCTCGAATTCCTGGGCT
<i>XXBAC-B444P24.13</i>	CAGAAGGCAGGCAGTGTCCAT	TCATCTCAAGAGCTGCCGAAAA
<i>miR-146a</i>	gtgccgTGAGAACTGAATTCCAT	CCAGTCTCAGGGTCCGAGGTATTC
<i>HMBS</i>	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC
<i>TBP</i>	GCTGGCCCATAGTGATCTTTGC	CTTCACACGCCAAGAAACAGTGA

Antagomir against miR-146a. IMR90 RAS senescent cells were plated on day 10 post-infection at 800,000 cells/10-cm. The next day, 3.5 nmol of antagomirs (500 nM) were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, #11668-019). 16h-18h after, media were changed and cells were harvested in Trizol (Invitrogen, #15596026) following an additional 6-8h hours of incubation. Total RNA was extracted as stated by the manufacturer and was further prepared for real-time

quantitative PCR. The control antagomir and the anti-146a were purchased from Dharmacon (control: IH-300630-05-0020 and anti-146a: CN-001000-01-20).

miR-CLIP

Cell preparation and probes transfection:

IMR90 overexpressing RASV12 were seeded at day 10 post-infection at 800,000 cells/10-cm and were transfected 24 hours after with 252 pmol (at 36 nM) with the psoralen/biotin-modified probes (P/B) (Dharmacon). Prior to transfection, the probes were annealed with miR-146a-3p in TE (10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA pH 8.0) by incubating 1 μ M of each probe in boiling water that was let to cool down to room temperature on the bench. For every 20 pmol of probe that was transfected, 1 μ l of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, #11668-019) was used as the transfection agent. 24 hours post-transfection, cells were washed twice with PBS 1X and then crosslinked using an UV lamp at 365 nm for 1.5 min on ice. Excess PBS was then removed and cells were harvested in cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM EGTA, 1% Triton-X100, PhosSTOP (Roche, #04906837001), Complete (Roche, #11836145001), 0.4U/ μ l RNaseOUT (Invitrogen, #10777019)) and centrifuge for 10 min at 4 °C at 13,000 rpm. Supernatant was transferred to a clean tube.

RIP-AGO2:

Total proteins were quantified using the Bradford technique. The RIP-AGO2 was performed on 25 mg of total protein. Pre-clearing of the sample was achieved for 1h at 4 °C on a rotating device with Dynabeads Protein G (Thermofisher, #1003D). Pre-cleared lysates were then incubated overnight at 4 °C, on a rotating wheel, with anti-AGO2 (Milipore, clone 9E8.2, #06-642) at a dilution of 1:75. 80 μ l of dynabeads protein G were used to performed the IP for 2 hours at 4 °C. Beads were washed four times with cell lysis buffer and then incubated with 200 μ l of digestion buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 12.5 mM EDTA pH 8.0, 400 ng of Proteinase K (Sigma-Aldrich, #P2308-25MG)) at 65 °C for 20 min. Then, 500 μ l of Trizol (Invitrogen, #15596026) was added to each sample. RNA extraction was performed as stated by the manufacturer. The RNA pellet was resuspended in 20 μ l of water.

Biotin/Streptavidin affinity purification:

Dynabeads MyOne Streptavidin C1 beads (Invitrogen, #65001) were prepared for RNA applications as stated by the manufacturer before being resuspended in binding and washing buffer (B&W buffer; 5 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 nM EDTA pH 8.0 and 1M NaCl). 800 µl of B&W buffer supplemented with 0.8U/ul of RNaseOUT were added to the RNA samples and purification was achieved for 45 minutes, at 4 °C on a rotating wheel. Beads were then treated with DNaseI (Sigma-Aldrich, #AMPD1) for 15 minutes at room temperature. Reaction was stopped by adding the Stop solution with a 10 min incubation at 70 °C. Beads were then washed four times with the B&W buffer. Elution was performed at 65 °C for two minutes with 50 µl of elution buffer (95% formamide and 10 mM EDTA pH 8.2). This step was performed twice, and the eluates were then combined. RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen) and sample were sent to the Genomic platform of IRIC for Illumina sequencing. Significantly enriched transcripts in the miR-CLIP versus input were extracted using DESeq2.

Bootstrap analysis:

Six different prediction tools were used to detect the presence of miR-146 target sites within the identified lncRNA sequence. When a target site is detected by at least one software tool, the lncRNA is considered as a miR-146a target. To show that our miR-CLIP had enriched for miR-146a targets in the detected sequences, we performed bootstrap analysis as follows: since 1425 miR-146 targets were detected among ~7000 lncRNAs present in our RNA-seq, we generated bootstrap samples by randomly drawing the same amount of transcripts (1425) from a list of lncRNAs identified in a miR-CLIP-seq experiment that did not use miR-146a as bait (miR-CLIP against miR-106a). Ten thousand Bootstrap samples were generated and a distribution of the fraction of miR-146 targets was constructed. The mean, and standard deviation were derived by modeling the distribution as Gaussian. The z-scores of the fractions of miR-146 target lncRNAs obtained either using miR-146 as bait or using the 2X cutoff line as enrichment method in analysis were calculated using two-tailed z-test. The dataset used for bootstrapped sample distribution was obtained from Imig and al. (20). All bootstrapping and statistical tests were performed in R (R script available via GitHub: https://github.com/c7master/miRCLIP_Bootstrap).

miR-146a mimic transfection. IMR90-*SAMIT* or IMR90-mut-*SAMIT* cells were plated at 300,000 cells/6-cm. The next day 4 pmol (at 1 nM) of miR-146a mimic or of an siRNA control was transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, #11668-019). For every 20 pmol of mimic that was transfected, 1 μ l of Lipofectamine was used. 24h after, media were changed and cells were harvested in Trizol (Invitrogen, #15596026) following an additional 48h of incubation. Total RNA was extracted as stated by the manufacturer and was further prepared for real-time quantitative PCR. The control siRNA was purchased from Sigma (#SIC001) and miR-146a mimic was purchased from Dharmacon.

3.3.6 References

1. Alejandra Hernandez-Segura JN, Marco Demaria. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* 2018;28(6):436-53.
2. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P., & Ferbeyre, G. The Senescence-Associated Secretory Phenotype and Its Regulation. *Cytokine.* 2019;117:15-22.
3. Puvvula PK. LncRNAs Regulatory Networks in Cellular Senescence. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):2615.
4. Run-Wen Yao YW, Ling-Ling Chen. Cellular Functions of Long Noncoding RNAs. *Nat Cell Biol.* 2019;21(5):542-51.
5. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):21-37.
6. DP B. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(215-33).
7. Eichhorn SW GH, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, Hsu SH, Ghoshal K, Villén J, Bartel DP. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell.* 2014;56(1):104-15.
8. Guo H IN, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010;466(7308):835-40.
9. Ebert MS NJ, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods.* 2007;4(9):721-6.
10. Dan Xu FT, Yumiko Hino, Saori Fukunaga, Yasusei Kudo, Aya Tamaki, Junko Matsunaga, Ryou-U Takahashi, Takashi Takata, Akira Shimamoto, Takahiro Ochiya, Hidetoshi Tahara. miR-22 Represses Cancer Progression by Inducing Cellular Senescence. *J Cell Biol.* 2011;193(2):409-24.
11. Lijun Zhao KH, Jianzhong Cao, Pan Wang, Jun Li, Kewu Zeng, Xiaodong He, Peng-Fei Tu, Tanjun Tong, Limin Han. lncRNA miat Functions as a ceRNA to Upregulate sirt1 by Sponging miR-22-3p in HCC Cellular Senescence. *Aging.* 2019;11(17):7098-122.
12. Mukherji S, Ebert, M. S., Zheng, G. X., Tsang, J. S., Sharp, P. A., & van Oudenaarden, A. MicroRNAs Can Generate Thresholds in Target Gene Expression. *Nat Genet.* 2011;43(9):854-9.
13. Yvonne Tay JR, Pier Paolo Pandolfi. The Multilayered Complexity of ceRNA Crosstalk and Competition. *Nature.* 2014;505(7483):344-52.

14. Bosson AD ZJ, Sharp PA. Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Mol Cell*. 2014;56(3):347-59.
15. Taganov KD BM, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(33):12481-6.
16. Bhaumik D SG, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*. 2008;27(42):5643-7.
17. Dipa Bhaumik GKS, Shiruyeh Schokrpur, Christopher K Patil, Arturo V Orjalo, Francis Rodier, Gordon J Lithgow, Judith Campisi. MicroRNAs miR-146a/b Negatively Modulate the Senescence-Associated Inflammatory Mediators IL-6 and IL-8. *Aging*. 2009;1(4):402-11.
18. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008;6(12):2853-68.
19. Sun Y, Coppe JP, Lam EW. Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends Mol Med*. 2018.
20. Imig J, Brunschweiler, A., Brümmer, A., Guennewig, B., Mittal, N., Kishore, S., Tsikrika, P., Gerber, A. P., Zavolan, M., & Hall, J. miR-CLIP Capture of a miRNA Targetome Uncovers a lincRNA H19-miR-106a Interaction. *Nat Chem Biol*. 2015;11(2):107-14.
21. Stefan L Ameres MDH, Jui-Hung Hung, Jia Xu, Megha Ghildiyal, Zhiping Weng, Phillip D Zamore. Target RNA-directed Trimming and Tailing of Small Silencing RNAs. *Science*. 2010;328(5985):1534-9.
22. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51.
23. Preethi Krishnan FS, Nicole Jiyun Kang, Raghavendra G Mirmira, Carmella Evans-Molina. Profiling of RNAs From Human Islet-Derived Exosomes in a Model of Type 1 Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5903.
24. de la Mata M, Gaidatzis, D., Vitanescu, M., Stadler, M. B., Wentzel, C., Scheiffele, P., Filipowicz, W., & Großhans, H. Potent Degradation of Neuronal miRNAs Induced by Highly Complementary Targets. *EMBO Rep*. 2015;16(4):500-11.
25. Martin Mann PRW, Rolf Backofen. IntaRNA 2.0: Enhanced and Customizable Prediction of RNA-RNA Interactions. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1).

26. M. Z. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3406-15.
27. Leonardo Salmena LP, Yvonne Tay, Lev Kats, Pier Paolo Pandolfi. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell.* 2011;146(3):353-8.
28. Denzler R AV, Stefano J, Bartel DP, Stoffel M. Assessing the ceRNA hypothesis with quantitative measurements of miRNA and target abundance. *Mol Cell.* 2014;54(5):766-76.
29. Denzler R MS, Title AC, Agarwal V, Bartel DP, Stoffel M. Impact of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression. *Mol Cell.* 2016;64(3):565-79.
30. Laura Poliseno LS, Jiangwen Zhang, Brett Carver, William J Haveman, Pier Paolo Pandolfi. A Coding-Independent Function of Gene and Pseudogene mRNAs Regulates Tumour Biology. *Nature.* 2010;465(7301):1033-8.
31. Karreth FA RM, Ruocco A, Ng C, Chapuy B, Léopold V, Sjöberg M, Keane TM, Verma A, Ala U, Tay Y, Wu D, Seitzer N, Velasco-Herrera Mdel C, Bothmer A, Fung J, Langellotto F, Rodig SJ, Elemento O, Shipp MA, Adams DJ, Chiarle R, Pandolfi PP. The BRAF pseudogene functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma in vivo. *Cell.* 2015;161(2):319-32.
32. Yanhai Xi TJ, Weiheng Wang, Jiangming Yu, Yang Wang, Xueming Wu, Yunfei He. Long Non-Coding HCG18 Promotes Intervertebral Disc Degeneration by Sponging miR-146a-5p and Regulating TRAF6 Expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):13234.
33. Yun-Xiao Zhou WZ, Li-Wei Mao, Yan-Li Wang, Li-Qun Xia, Min Cao, Jie Shen, Jun Chen. Long Non-Coding RNA NIFK-AS1 Inhibits M2 Polarization of Macrophages in Endometrial Cancer Through Targeting miR-146a. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;104:25-33.
34. Fuchs Wightman F, Giono, L. E., Fededa, J. P., & de la Mata, M. Target RNAs Strike Back on MicroRNAs. *Front Genet.* 2018;9:435.
35. Ghini F, Rubolino, C., Climent, M., Simeone, I., Marzi, M. J., & Nicassio, F. Endogenous Transcripts Control miRNA Levels and Activity in Mammalian Cells by Target-Directed miRNA Degradation. *Nat Commun.* 2018;9(1):3119.
36. June Hyun Park S-YS, Chanseok Shin. Non-canonical Targets Destabilize microRNAs in Human Argonautes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(4):1569-83.

37. Ferbeyre G, de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., & Lowe, S. W. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* 2000;14(16):2015-27.

38. Mignacca L, Saint-Germain E, Benoit A, Bourdeau V, Moro A, Ferbeyre G. Sponges against miR-19 and miR-155 reactivate the p53-Socs1 axis in hematopoietic cancers. *Cytokine.* 2016;82:80-6.

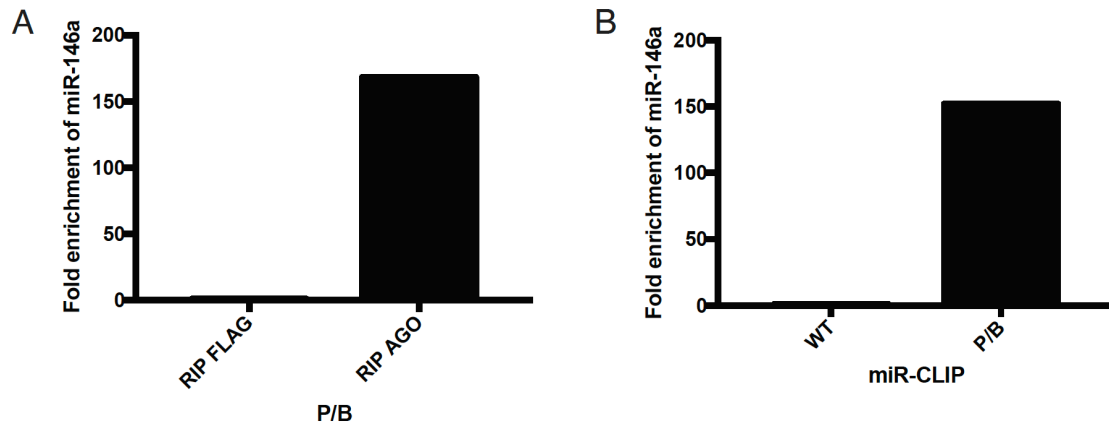


Figure S3.1 MiR-146a is enriched by RIP-AGO and the miR-CLIP technique.

A) MiR-146a modified with the psoralen and the biotin (P/B) was transfected in IMR-RAS and RNA was collected after the first purification step of the miR-CLIP technique (RIP-AGO). QPCR was performed to quantify miR-146a. A control RIP was done using an anti-FLAG antibody. B) QPCR was performed to quantify miR-146a after the whole miR-CLIP procedure (RIP-AGO and biotin-streptavidin affinity purification). As a control, the unmodified miR-146a (WT) was used for a miR-CLIP done in parallel.

4. Discussion

Au cours du temps, de nombreux facteurs peuvent altérer le génome par le biais de mutations. L'accumulation de celles-ci peut avoir des conséquences délétères et mener à une prolifération incontrôlée de la cellule. Heureusement, cette dernière est dotée de mécanismes qui lui permettent de contrer cet effet et ainsi empêcher la transformation tumorale. Un de ces mécanismes se nomme la sénescence cellulaire et elle se caractérise par un arrêt de prolifération en phase G1/S du cycle cellulaire. Des changements majeurs au niveau du programme d'expression génique accompagnent cette réponse cellulaire et nous pensons que ces changements peuvent être en partie attribués aux miR et aux lARNnc.

Les objectifs de cette thèse étaient en premier lieu d'étudier les mécanismes de régulation de l'axe p53-SOCS1 à l'aide d'éponges artificielles contre miR-19 et miR-155. En second lieu, nous voulions identifier ainsi que caractériser des lARNnc qui agiraient en tant qu'éponge endogène pour miR-146a.

4.1 Discussion du chapitre 2

4.1.1 Résumé des résultats présentés dans le chapitre 2

L'activation d'oncogènes fait partie des mécanismes qui peuvent induire une sénescence prématurée. Par exemple, une activité aberrante de RAS engendre une phase d'hyperprolifération suivie par une sortie du cycle cellulaire initié par un stress réplicatif induit par des fourches de réplication arrêtées (185, 186). Dans notre modèle d'étude, nous avons utilisé une forme constitutivement active de STAT5A afin d'investiguer la réponse cellulaire suite à une signalisation aberrante par les cytokines. Ce trait est effectivement une caractéristique de diverses maladies ainsi que dans le vieillissement (187, 188).

Notre laboratoire a montré que la sénescence induite par une forme constitutivement active de STAT5A passe par SOCS1 qui agit en tant que protéine adaptatrice entre ATM (Ataxia telangiectasia mutated) et p53 et qui facilite l'activation de ce dernier à travers la phosphorylation en sérine 15 par ATM. Puisque SOCS1 est une cible de miR-19 et de miR-155, deux miR oncogéniques qui sont surexprimés dans nombre de cancers hématopoïétiques, nous avons voulu étudier si l'inhibition de ces miR pouvait restaurer une réponse antitumorale. Nous avons utilisé une lignée de macrophages de souris (RAW264.7) qui grâce à des traitements au LPS

(Lipopolysaccharide) nous permettait d'induire de manière endogène STAT5A, miR-19 ainsi que miR-155. Afin d'inhiber l'activité de ces deux miR, nous avons pris avantage des éponges à miR. Nos résultats montrent que ces dernières sont capables d'activer la voie de suppression tumorale p53/p21 dans les RAW264.7. De plus, une éponge nouvelle génération qui intègre le ribozyme « hammerhead », ou ribozyme à tête de marteau, nous permet d'induire cette réponse de manière encore plus marquée.

4.1.2 Implication de miR-19 et miR-155 dans l'axe antitumoral p53/socs1

Les centres germinaux sont des structures qui se retrouvent dans les tissus lymphoïdes secondaires et qui sont cruciales pour l'immunité adaptative. C'est en effet dans ces structures que les lymphocytes B peuvent maturer afin de donner lieu aux plasmocytes ou encore aux cellules B à mémoire. On nomme ce processus : réaction des centres germinaux (189, 190). Le changement de classe par recombinaison (CSR; Class Switch Recombination) et l'hypermutation somatique (SHM; Somatic Hypermutation) sont importants dans cette réaction et impliquent la mutagenèse de l'ADN ainsi que des bris double-brin de l'ADN (190). Il est connu qu'AICDA (Activation-induced cytidine deaminase) est requis et est essentiel pour le CSR et le SHM (191). Ces événements sont généralement finement régulés dans la cellule afin de maintenir l'intégrité du génome. Cependant, dans ce cas particulier, afin de compléter le processus de maturation des anticorps, il est important de laisser cours à la réaction en n'engageant pas de manière excessive les points de contrôle du cycle cellulaire tout en s'assurant que le génome restera intègre. Les travaux de Bouamar et al. ont montré que miR-155 jouait un rôle particulièrement important dans ce processus et que cela passait par l'axe p53/SOCS1. Ils sont le premier groupe à lier miR-155 à cet axe de signalisation. Leurs résultats montrent que miR-155 contrôle deux aspects de cette réaction : tout d'abord, il limite la magnitude ainsi que la durée de CSR et de SHM en régulant Aicda. En second lieu, en inhibant Socs1, il limite par le fait même la fonction de p53. Ceci résulte en une baisse des points de contrôle, ce qui est requis pour une réaction GC fructueuse.

Nos travaux lient aussi miR-155 à l'axe p53/SOCS1 cependant, nous le faisons dans le contexte du cancer. Nous avons montré que l'inactivation de miR-155 dans une lignée de myélome multiple résultait en une accumulation de SOCS1 ainsi qu'en une activation accrue de p53. Ceci s'accompagne d'une baisse de la formation de colonies en milieux semi-solide ainsi qu'en une baisse de la migration de ces cellules. Au moment de la publication de ces résultats, aucune

littérature ni prédiction par des outils bio-informatique ne liait directement miR-155 à p53. Cependant, en 2017, les travaux de van Roosbroeck et al. ont mis en lumière une boucle de rétroaction dans laquelle, miR-155 peut réguler p53 en se liant directement dans sa région 3'UTR (192). De même, p53 peut aussi réguler négativement l'expression de miR-155. En prenant en considération ces connaissances, il serait intéressant de caractériser davantage notre système en utilisant un shRNA contre SOCS1. En effet, si dans nos conditions expérimentales, une inhibition de miR-155 à l'aide d'éponge résulte bien en une activation accrue de p53 et que cela passe par SOCS1, un shRNA contre ce dernier devrait abroger cette activation. Les cellules devraient donc retrouver leur capacité à former des colonies sur méthylcellulose et devraient aussi arriver à migrer (Fig. 2.4). De plus, dans la sénescence où SOCS1 est impliqué dans l'activation du facteur de transcription p53, Saint-Germain et al. ont montré que l'induction de plusieurs gènes par ce dernier était dépendante de SOCS1 (87). Nous pourrions donc compléter les expériences avec un shRNA contre SOCS1 d'une caractérisation par RT-qPCR des cibles de p53 identifiées comme étant SOCS1- dépendantes. Si l'inhibition de miR-155 augmente la signalisation par p53 et que cela passe bel et bien par SOCS1, nous devrions donc observer une augmentation des gènes dont l'activation par p53 dépend de SOCS1.

4.1.3 Dasatinib et anti-miR-155, une combinaison gagnante dans les traitements anti-cancer?

Tel que mentionné plus tôt, miR-155 joue un rôle prépondérant dans la résistance dans les thérapies du cancer. Plusieurs études *in vitro* montrent qu'une inhibition de miR-155 augmentait l'apoptose et réduisait la capacité de prolifération, de migration et/ou de formation de colonies dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome, de myélome multiple, de glioblastome multiforme et de carcinome de l'endomètre (97). De plus, les travaux de Van Roosbroeck et al. suggèrent que la boucle de rétroaction négative entre p53 et miR-155 est souvent impliquée dans les mécanismes de résistance contre une variété d'agents chimiothérapeutiques dans divers types de tumeurs (192).

En outre, des travaux dans notre laboratoire montrent que SOCS1 peut activer p53 en agissant en tant qu'adaptateur moléculaire avec ATM (83). L'interaction p53/SOCS1 peut être régulée par une phosphorylation de la tyrosine 80 de SOCS1 par la famille des kinases SRC. Cette modification oncogénique pourrait expliquer pourquoi on retrouve de hauts niveaux de SOCS1 dans DLBCL, les lymphomes de Burkitt ainsi que dans les lymphomes folliculaires alors que les

taux de mutation de p53 sont plutôt faibles. En effet, on pourrait penser que SOCS1 pourrait activer les fonctions de suppression tumorale de p53, mais des analyses par IHC de tumeurs de patients atteints de DLBCL révèlent que celles-ci montrent une accumulation des kinases SRC actives et que donc SOCS1 serait inactivé par une phosphorylation en Y80 (Annexe 1, fig. 6A, 6B et fig. 5C-E). De surcroît, les travaux de Saint-Germain et al. montrent que la surexpression de SOCS1 combinée à une inhibition des SRC dans des cellules primaires de fibroblastes résulte en augmentation accrue de l'activité de p53, une diminution de la prolifération ainsi qu'une proportion accrue des cellules qui sont positives pour le marqueur de sénescence β -Gal (Annexe 1, fig. 4B-D). En outre, des traitements avec un inhibiteur des kinases SRC ainsi qu'avec un réactivateur de p53 (PRIMA-1) dans les SUDHL-4 (lignée de DLBCL) favorisent une interaction p53/SOCS1 (Annexe 1, fig. 6D et 6E). Il serait intéressant de voir si une inhibition de miR-155 dans ces conditions pourrait augmenter l'issue des traitements anti-cancer. En effet, miR-155 s'accumule dans DLBCL, et même si l'on favorise une interaction p53/SOCS1 afin de réactiver les capacités de suppresseur de tumeur de cet axe, les hauts niveaux de miR-155 pourraient tout de même impacter de manière négative dans cette signalisation en diminuant les niveaux de SOCS1. Ainsi, une inhibition de miR-155 pourrait renforcer la signalisation par p53/SOCS1. D'ailleurs, il est intéressant de souligner que des essais cliniques en phase 1 sont en cours pour un anti-miR-155 dans les DLBCL (NCT02580552).

Bien que nombre d'études montrent que miR-155 exerce une fonction oncogénique dans nombre de cancers, une étude conduite par Huffakar et al. suggèrent que l'inhibition de miR-155 doit se faire de manière parcimonieuse. En effet, leurs résultats suggèrent que miR-155 jouerait un rôle important pour le bon fonctionnement des propriétés anticancéreuses des cellules du système immunitaire. Plus précisément, en réprimant Ship1, ce miR promouvrait l'expression de l'IFN γ chez les lymphocytes T CD4⁺. De plus, les auteurs montrent que des xéno greffes de cellules de lymphome ou de mélanome génèrent des tumeurs plus grosses chez les souris miR-155^{-/-} que chez les souris contrôles (193). Il est donc crucial que des thérapies contre le cancer qui se basent sur une inhibition de miR-155 soient capables de cibler ce dernier spécifiquement dans les cellules cancéreuses afin de ne pas créer d'effets indésirables sur la réponse antitumorale générée par le système immunitaire.

4.1.4 Une éponge 2.0?

Les éponges artificielles sont des outils qui ont été mis au point par Ebert et al. en 2007 (146). Depuis, de nombreuses études font l'utilisation de ces constructions afin d'étudier les rôles d'un miR donné (194). Nous avons incorporé, dans la conception de ces éponges, un ARN catalytique, le ribozyme à tête de marteau, afin de générer une éponge qui sera « recyclable ». En effet, une fois le miR lié à son site de reconnaissance, le ribozyme pourra cliver ce dernier menant ainsi à sa dégradation ainsi qu'à la libération subséquente du site de liaison. D'autres miR pourront donc s'y lier, répétant à l'infini ce cycle de liaison – dégradation – libération.

Bien que les éponges soient des outils très utilisés pour des études *in vitro*, leur application *in vivo* pour le traitement de maladie est plus limitée due aux moyens encore peu efficaces que nous avons afin de délivrer celles-ci aux cellules appropriées. De plus, une fois sa destination atteinte, l'éponge doit être « produite » par l'hôte, ce qui requiert l'utilisation de vecteurs viraux qui sont connus comme étant très immunogènes et toxiques. De plus, si l'on observe les stratégies employées pour l'inhibition des miR qui sont présentement en essai clinique, aucune éponge ne s'y retrouve. Le design que nous avons développé se prête donc peut-être mieux aux études *in vitro* que pour des applications dans les thérapies de maladie. Cependant, il serait intéressant de voir si le ribozyme à tête de marteau pourrait bien s'incorporer dans un design d'antisense contre des miR. Ces molécules sont généralement une courte séquence qui est complémentaire au miR d'intérêt et qui inhibe ce dernier en s'y liant l'empêchant ainsi de lier ses autres cibles.

4.2 Discussion du chapitre 3

4.2.1 Résumé des résultats présentés dans le chapitre 3

Les cellules qui entrent en sénescence subissent d'importants changements au niveau de leur profil d'expression génique. Une des manifestations de ces changements est le SASP, un sécrétome riche en cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Étonnamment, la sénescence induite par RAS résulte aussi en une augmentation marquée des niveaux de miR-146a, un miR connu comme étant impliqué dans l'atténuation de la réponse inflammatoire. Nous pensons que bien qu'il soit présent, ce miR ne serait pas tout à fait actif dû à la présence de lncRNA qui pourraient agir en tant qu'éponge naturelle. Afin d'identifier ces dernières, nous avons utilisé une technique nommée le miR-CLIP qui nous permet d'isoler l'interactome de miR-146a

spécifiquement. Nos résultats montrent que miR-146a interagit avec plusieurs lARNnc différents et que nombre d'entre eux contiennent des caractéristiques d'interaction qui sont requises pour qu'une régulation par TDMD soit initiée. Un plasmide d'expression nous a permis de surexprimer un de ces lARNnc et effectivement, nous pouvons observer une corrélation inverse entre les niveaux du lARNnc avec ceux de miR-146a.

4.2.2 MiR-146a régule plusieurs lARNnc dans la sénescence induite par RAS

De manière canonique, les miR régulent principalement des ARNm en se liant dans leur 3'UTR ce qui résulte en une subséquente inhibition de la traduction et/ou dégradation du transcrite (2). De manière intéressante, un antagomir contre miR-146a (anti-miR-146a) semble prévenir une dégradation qui est dépendante de miR-146a de nombre de lARNnc dans des cellules sénescents par RAS. Puisque les miR reconnaissent principalement leurs cibles à travers leur région « seed » et que celle-ci est une très courte séquence, un miR pourra avoir une multitude de cibles différentes (2). Les transcrits qui peuvent donc s'accumuler davantage ou qui au contraire diminuent en présence d'un anti-miR-146a pourraient être le résultat d'une régulation indirecte de ce miR. Ainsi, les nombreux lARNnc que nous voyons augmenter lorsque l'on inhibe miR-146a ne pourraient qu'être le résultat d'une régulation à travers d'autres joueurs. Cependant, avec une technique nommée le miR-CLIP, nous avons pu isoler spécifiquement l'interactome de miR-146a. Brièvement, cette technique utilise un miR-146a modifié avec un psoralène ainsi qu'une biotine qui sera introduit dans la cellule par transfection transitoire. Il y aura une première étape de purification à l'aide d'une immunoprécipitation d'AGO2 suivie d'une seconde purification par affinité avec streptavidine/biotine (195). En comparant les différentes catégories de transcrits en interaction directe avec miR-146a, nous avons pu constater qu'une grande proportion de ceux-ci appartenaient à la catégorie des lARNnc, confirmant ainsi nos résultats du RNA-sequencing avec l'antagomir contre miR-146a. Nous ne sommes pas les seuls à obtenir de tels résultats, en fait, Imig et al., qui ont mis au point la technique du miR-CLIP, ont aussi observé que seulement 30-50% des lectures sont liés à des ARNm (195). En revanche, des analyses par la méthode CLASH (Crosslinking, ligation, and sequencing of hybrids) montrent que seulement 0.4% des miR purifiés par une immunoprécipitation d'AGO1 est lié à des lncRNA (196). La technique de CLASH se base sur une immunoprécipitation d'AGO et qui est suivie d'une étape de ligation afin de lier les miR avec leurs cibles. Les chimères sont ensuite séquencées et les résultats obtenus permettent

d'identifier les cibles d'un miR donné ainsi que son site de liaison au nucléotide près avec cette cible (196). Il se pourrait que ces différences de pourcentage soient attribuables au fait que la technique de CLASH ne soit pas tout à fait efficace au niveau de la liaison du miR et sa cible. En effet, il semblerait que seulement 2% des lectures soient des chimères composées du miR et de sa cible. Une grande partie des interactions pourraient alors être perdues (196, 197). De manière similaire, dans les débuts de la méthode de HITS-CLIP (High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslink immunoprecipitation), les transcrits non codants ne faisaient pas partie des catégories très étudiées. Ces derniers sont donc souvent passés sous le radar. Toutefois, des réanalyses de ces données montrent que les lARNnc font partie intégrante des transcrits ciblés par les miARN (198). Puisque cette dynamique d'interaction est confirmée à l'aide de différentes techniques, cela suggère que ce n'est sans doute pas une aberration due au système d'étude.

Un des rôles les plus probables pour ces interactions serait la régulation de la fonction des lARNnc avec lesquels miR-146a interagit en menant à leur dégradation. On sait que les lARNnc peuvent avoir une myriade de rôles dans la cellule et ce mode de régulation par les miR pourrait être impliqué dans le contrôle de ces fonctions. Il existe déjà plusieurs cas de figure dans la littérature notamment avec miR-671 qui par son interaction extensive avec *CDR-1*, mène à sa dégradation (57). Ce cas reste probablement un mécanisme rare, car on sait que chez les mammifères, il est peu commun qu'un miR dégrade sa cible à travers un clivage endonucléolytique (2). Un autre exemple de régulation des lARNnc par un miR est celui de *MALAT1* (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) et miR-9. Leucci et al. ont montré que *MALAT1* contenait deux sites de liaison pour miR-9 et que ses niveaux au noyau étaient régulés par une interaction directe avec miR-9 (199).

La fonction d'un lARNnc pourrait aussi être régulée de manière indépendante de ses niveaux; le miR pourrait prévenir des interactions avec des partenaires donnés du lARNnc qui sont nécessaires à sa fonction. En effet, Sethuraman et al. ont observé que l'introduction d'un mimique d'un miR ne réduit pas nécessairement les niveaux de tous les lARNnc avec lesquels il interagit (198). À l'inverse, il se pourrait aussi que ces interactions miR- lARNnc aient pour but de réguler l'activité d'un miR donné. En effet, les lARNnc pourraient agir en tant qu'éponge à miR et ainsi inhiber leurs fonctions. Tel que mentionné dans l'introduction, *CDR-1* contient plusieurs sites de liaison pour miR-7. Hansen et al. ont montré que cet ARN non codant circulaire pouvait atténuer la régulation des cibles de miR-7 par ce dernier. Les lARNnc adoptant cette conformation

circulaire sont aussi intéressants, car ils sont résistants à la dégradation exonucléolytique (57). Finalement, on peut aussi spéculer que les lARNnc pourraient servir de réservoir à miR afin de rapidement répondre aux stimuli environnants. En effet, La Rocca et al. ont montré que dans la majorité des tissus humains, les miR se trouvent en complexe avec AGO seulement. En d'autres mots, ils sont dans des complexes RISC « incomplets » qui fractionnent dans de petits poids moléculaires (LMW-RISC; Low molecular weight RISC) et qui ne sont pas liés aux cibles des miR et sont donc inactifs. Lorsque la cellule doit répondre à un stimulus, le complexe RISC s'assemble (HMW-RISC; High molecular weight RISC) et peut par la suite réguler les cibles d'un miR donné. Ceci serait indépendant des niveaux des miR puisque le passage de LMW-RISC à HMW-RISC peut se faire sans variations des niveaux de ceux-ci. Les auteurs proposent qu'ainsi, la cellule pourrait garder en réserve une sélection de miR afin de répondre rapidement à un stimulus donné (200).

De surcroît, les travaux de Flores et al. montrent que les miR peuvent se lier à leurs cibles sans avoir recours au complexe RISC (153). Différents exemples dans la littérature ainsi que nos travaux montrent que les miR peuvent lier les lARNnc. On pourrait alors penser qu'un autre mécanisme possible par lequel la cellule pourrait garder des miR en réserve serait par la liaison de ces derniers à des lARNnc. Ces interactions résulteraient en une stabilité accrue des miR, favorisant leur accumulation et ainsi, la cellule pourrait répondre rapidement à différents stimuli.

4.2.3 Plusieurs lARNnc pourraient à leur tour réguler miR-146a dans la sénescence induite par RAS

Afin d'étudier spécifiquement l'interactome de miR-146a dans la sénescence induite par RAS, nous avons utilisé la technique du miR-CLIP. Tel que mentionné plus tôt, nous avons observé qu'une grosse proportion des transcrits avec lesquels ce miR interagit appartient à la catégorie des ARN non codants. De manière intéressante, plusieurs des prédictions d'interaction entre ces lARNnc et miR-146a contiennent une hybridation extensive en 3' du miR. Ceci est une caractéristique requise pour l'induction d'un TDMD. En effet, les caractéristiques générales requises afin de déclencher la dégradation d'un miR par une cible sont : liaison de la région « seed » du miR, un mésappariement central du miR de moins de six nucléotides ainsi qu'une liaison extensive en 3' du miR (8-12 nucléotides) (39). *SAMIT*, le lARNnc que nous avons identifié comme étant capable d'induire la dégradation de miR-146a à travers un TDMD, ne semble

toutefois pas être le candidat typique puisqu'il ne répond pas à tous ces critères (figure 3.4A). Cependant, les règles énumérées plus haut ne semblent pas être universelles. Il y a en effet des exemples de transcrits qui ne suivent pas tous ces requis et qui peuvent tout de même engendrer la dégradation d'un miR avec lequel il se lie. C'est le cas notamment d'un ARN synthétique qui peut lier un miR sauf dans la région « seed », mais qui génère tout de même un TDMD *in vitro* (201). Il y a aussi le cas des éponges artificielles pour les miR. Le design des éponges utilisées dans mon premier article se basait sur les travaux de Kluvier et al. qui ont mis au point une technique rapide et efficace pour le clonage de ces éponges contre un miR donné (202). Ce design incluait un mésappariement aux nucléotides 9-11 afin de limiter la dégradation endonucléolytique par AGO2 (146). Curieusement, ces éponges s'hybrident de manière extensive dans la région 3' du miR mais cela ne mène qu'à une dégradation modeste des miR qui s'y lient. De manière similaire, Ebert et al. n'observaient pas non plus de changements drastiques des niveaux de miR lorsque leur éponge correspondante était exprimée dans la cellule (146). Peut-être que cette observation peut s'expliquer par le fait que le TDMD pourrait avoir un potentiel plus élevé dans des cellules neuronales que non neuronales (203). Afin de susciter un TDMD, le miR doit s'hybrider de manière extensive dans sa région 3'. Les travaux de de la Mata et al. ont montré qu'aussi peu que deux nucléotides non appariés en fin du miR suffisaient à réduire l'efficacité du TDMD de 3.33 fois (203). Toutefois, il a été montré que *HCMV* (Human cytomegalovirus) contient un ARN non codant capable de diminuer spécifiquement les niveaux de miR-17 et de miR-20a du polycistron miR-17-92 par un TDMD. De manière intéressante, la dégradation de ces deux miR se fait de manière assez efficace bien que trois de leurs derniers nucléotides soient non appariés (204). Ce qui diffère entre ces deux études est le renflement central; dans la première étude, il comprend quatre mésappariements alors que dans la deuxième étude, il n'en comprend que deux (203, 204). Il est clair que beaucoup de travail reste à faire afin de bien cerner toutes les caractéristiques requises afin de mettre en branle ce mécanisme de dégradation. Ceci explique peut-être pourquoi le lARNnc que nous avons identifié et qui engendre un TDMD pour miR-146a peut le faire sans suivre tous les requis pour engendrer cette réponse cellulaire.

Sethuraman et al. se sont intéressés aux interactions miR- lARNnc. Leurs travaux se basaient sur des analyses de la méthode CLASH qui a l'avantage de pouvoir identifier autant les cibles canoniques que non-canoniques pour un miR donné. Avec cette méthode, la ligation du miR

avec sa cible peut se faire de deux manières différentes: soit en 5' de la cible (5' miRNA), soit en 3' de la cible (3' miRNA).

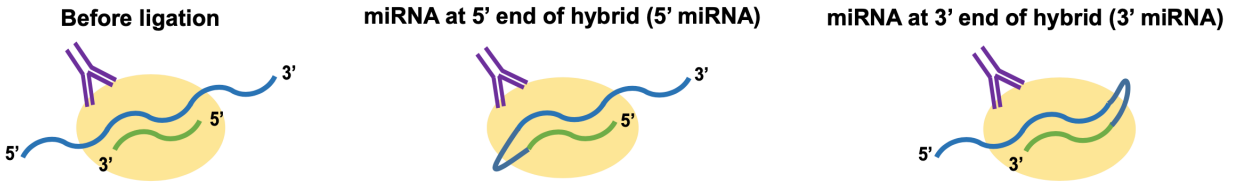


Figure 4.1 Ligation du miR à sa cible dans la méthode CLASH

Lors de la méthode CLASH, à l'étape de ligation, le miR peut se lier de manière différente à sa cible créant deux types de chimères : des chimères « 5' miRNA » lorsque le miR se lie en 5' de sa cible ou des chimères « 3' miRNA » lorsque le miR se lie en 3' de sa cible. Tiré de Sethuraman et al., 2018 (198)

De manière surprenante, les lARNnc semblent produire plus de chimères de type « 3' miRNA » que les ARNm. Les auteurs proposent que ceci pourrait être dû au fait que la flexibilité et/ou les propriétés stériques de RISC lié aux lARNnc diffèrent de celles pour les ARNm. Une analyse plus approfondie montre que pour les ARNm, peu importe si la chimère produite résulte en un 5' miRNA ou un 3' miRNA, la distribution de tous les sites de liaison pour les miR est uniforme tout au long du transcrit. Ce n'est cependant pas le cas pour les lARNnc. Effectivement, les chimères « 5' miRNA » suivent aussi cette distribution constante, cependant, les chimères « 3' miRNA » semblent plus lier la région 3' du lARNnc. Puisque ce biais est absent pour les ARNm, les auteurs suggèrent que la liaison des miR sur un lARNnc est régie par différentes règles que pour les ARNm (198).

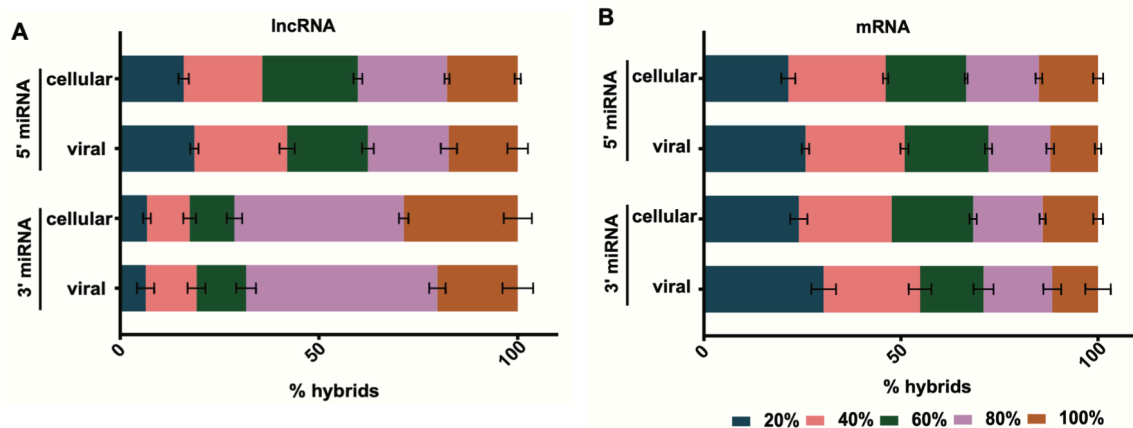


Figure 4.2 Comparatif de la distribution des sites de liaisons pour les miR sur les lARNnc ou les ARNm.

Puisque la taille des lARNnc peut différer énormément de celle des ARNm, les transcrits ont été séparés selon le premier 20% de la longueur totale, de 20-40%, de 40-60%, etc. Ce qui nous intéresse ici ce sont les transcrits cellulaires. Tiré de Sethuraman et al., 2018 (198).

Finalement, les auteurs se sont intéressés au type de liaison miR-transcrit. Pour ce faire, les interactions ont été divisées dans différentes catégories basées sur le type de « seed » impliqué : 7mer (nt 2-8), 6mer (nt 2-7), 7mer-1mm (nt 2-8 + 1 mésappariement, le mésappariement n'est pas possible en nt 8), 7mer-2mm (nt 2-8 + 2 mésappariements) ou autre. Il est intéressant de noter que plus de 40% des interactions appartiennent à la catégorie « autre », autant pour les lARNnc que pour les ARNm. Ceci suggère que les interactions non canoniques ne sont pas des événements rares dans la cellule. Par ailleurs, il semblerait que les lARNnc génèrent plus de ces interactions non canoniques que les ARNm et que plus l'interaction du « seed » est faible, plus il y a d'hybridation en région 3' du miR afin de compenser. Nous ne pouvons exclure alors que les lARNnc que nous avons identifiés dans notre miR-CLIP et qui interagissent avec une hybridation extensive en 3' du miR ne serait qu'une caractéristique propre aux interactions miR- lARNnc. C'est pourquoi il sera important de confirmer que d'autres lARNnc de notre liste soient aussi capables de mener à la dégradation de miR-146a.

Avec tous ces éléments mis ensemble, il est clair que les règles qui régissent les interactions des miR avec ses cibles ne sont pas les mêmes pour les lARNnc que pour les ARNm. Il est tentant de spéculer que les caractéristiques d'interaction requises afin de générer un TDMD sont alors

peut-être légèrement différentes selon si c'est un ARNm ou un lARNnc qui l'initie. D'autre part, il nous est impossible de mettre de côté l'hypothèse que la diminution des niveaux du miR-146a mature que nous observons pourrait être due à une diminution de la maturation de ce dernier. Afin de tester cette hypothèse, nous voulions quantifier les niveaux du brin passager de miR-146a à l'aide d'un essai qPCR (Quantitative PCR) : si ce n'était pas une régulation au niveau de la maturation, les niveaux de ce brin passager ne devraient pas changer selon si *SAMIT* est présent ou non. Toutefois, ce dernier ne semblait pas s'accumuler assez dans notre système d'étude afin que nous puissions le quantifier.

4.2.4 Relation de miR-146a et de son transcrit primaire; un loop d'autorégulation?

MiR-146a est encodé dans le deuxième exon d'un lARNnc nommé *MIR3142HG* (MIR3142 Host Gene) (123). De manière surprenante, nos résultats de RNA-seq montrent que lorsque l'on inhibe la fonction de miR-146a à l'aide d'un antagonir, les niveaux de son transcrit primaire (*MIR3142HG*) augmentent. En outre, à l'aide d'outils de prédiction (RNA hybrid), il semblerait que *MIR3142HG* contienne un site de liaison pour miR-146a (205, 206). Ceci pourrait suggérer que miR-146a aurait la possibilité d'autoréguler sa propre expression.

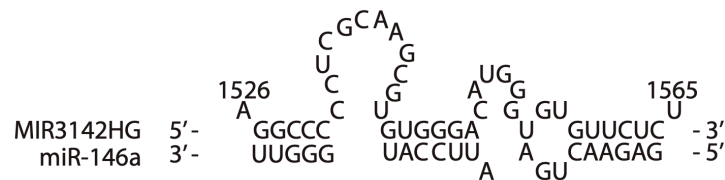


Figure 4.3 *MIR3142HG* contient un site de liaison pour miR-146a prédit par l'outil bio-informatique *RNA hybrid*.

Prédiction de la liaison de miR-146a dans son transcrit primaire (*MIR3142HG*) au nucléotide 1526 dans ce dernier (205, 206). Ce site n'est pas celui qui correspond au brin 3p de miR-146a, qui lui se retrouve plutôt aux nucléotides 280 – 301.

Il y a encore très peu de littérature sur ce lARNnc, mais une étude récente, conduite par Hadjicharalambous et al., suggère que ce lARNnc pourrait avoir des fonctions en dehors du miR qu'il encode. Les auteurs montrent que dans un modèle de fibrose pulmonaire idiopathique, *MIR3142HG* serait requis pour la sécrétion d'IL-8 et de CCL2 lors d'une stimulation par IL-1beta. Puisque miR-146a est connu comme ayant un rôle anti-inflammatoire, il est possible de spéculer que l'effet pro-inflammatoire de *MIR3142HG* dans ce contexte serait dû à des fonctions du

lARNnc qui seraient indépendantes de miR-146a (207). Ça ne serait pas le premier exemple d'autorégulation chez les miR. En effet, notre laboratoire a montré que miR-17 et miR-20 sont induits par les facteurs de transcription E2F1-3 et qu'à leur tour, les miR peuvent réprimer la production de ces protéines en agissant directement sur leur transcrit (109). Les miR peuvent aussi se lier directement au transcrit primaire d'autres miR prévenant ainsi la production de la forme mature de ce dernier. C'est le cas notamment de miR-361 qui peut lier le pri-miR-484 et ainsi empêcher la progression de la maturation de ce dernier (208). Par ailleurs, let-7 chez *C. elegans* peut se lier à son propre transcrit primaire et ainsi favoriser sa maturation (209). Nos données de miR-CLIP montrent que *MIR3142HG* n'est pas enrichi dans l'interactome de miR-146a (facteur d'induction de 0.61). Ceci pourrait suggérer deux choses : 1) miR-146a pourrait réguler son transcrit primaire à travers des intermédiaires ou 2) miR-146a peut effectivement interagir directement avec son transcrit et mener à sa dégradation. Dans le deuxième cas de figure, si miR-146a se lie à *MIR3142HG*, ceci pourrait résulter en une dégradation rapide du transcrit nous empêchant par le fait même de capturer cette interaction par la méthode du miR-CLIP. Afin de confirmer ou non si les deux interagissent, différentes méthodes pourraient être utilisées. Tout d'abord, il pourrait être possible de purifier spécifiquement *MIR3142HG* et voir s'il y a interaction avec miR-146a avec la méthode de qPCR. De cette manière, nous arriverons peut-être à capturer *MIR3142HG* avant qu'il ne soit dégradé et ainsi voir si miR-146a co-purifie. En deuxième lieu, il serait possible de tester s'il y a colocalisation entre les deux transcrits avec la technique du PLA (Proximity Ligation Assay). En effet, nous pourrions utiliser une forme inactive de Cas9 (dCas9 : dead Cas9) avec un gRNA (Guide RNA) qui s'hybriderait dans le lARNnc. Nous avons aussi déjà en notre possession, une forme biotinylée de miR-146a. Avec des anticorps contre Cas9 et biotine, la méthode du PLA pourrait être employée. Finalement, il serait aussi possible de refaire un miR-CLIP dans des conditions où l'on inhiberait la dégradation des transcrits initiée par les miR. Cette inhibition pourrait se faire à l'aide d'un shRNA contre des transcrits codant pour des protéines impliquées dans la déadenylation des ARNm, par exemple CAF1 ou encore NOT1 (210).

4.3. Conclusion

En conclusion, cette thèse nous a permis de mieux comprendre l'implication de miR-155 et de miR-19, deux miR oncogéniques, dans l'axe de suppression tumorale p53/SOCS1. Nos résultats montrent qu'ils sont induits par une activité aberrante de STAT5A et qu'ils peuvent prévenir l'induction de la sénescence en ciblant *Socs1* et ceci résulte en une baisse de l'activité de p53. Nous avons aussi mis au point une éponge nouvelle génération qui inclut le ribozyme à tête de marteau dans le site de liaison pour un miR donné. Ceci permet de recycler l'éponge, car une fois le miR lié à son site de reconnaissance, il y sera clivé et subséquentement dégradé laissant la place libre afin qu'un autre miR puisse venir s'y lier. C'est donc un outil dynamique qui permet un effet à des plus bas niveaux d'expression de l'éponge.

En second lieu, nous nous sommes penchés sur le mode de régulation par des éponges naturelles de miR-146a dans la sénescence par RAS. À l'aide d'un antagoniste contre miR-146a, nous avons pu observer une augmentation de plusieurs lARNnc. En étudiant de plus près l'interactome de ce miR à l'aide d'une technique nommée miR-CLIP, nous avons pu confirmer que miR-146a régulait directement plusieurs de ces lARNnc. En outre, il est prédit que plusieurs de ces lARNnc pourront interagir avec miR-146a avec une hybridation extensive en région 3' de ce dernier. Nous avons donc investigué une possible implication du TDMD comme mode de régulation de miR-146a. Nos résultats suggèrent que *SAMIT* pourrait réguler la fonction de miR-146a possiblement en générant un effet TDMD sur ce dernier et que ceci résulterait en une baisse de l'activité de miR-146a dans la sénescence permettant ainsi au SASP de s'exprimer.

Les travaux présentés dans cette thèse suggèrent que l'utilisation des éponges qui seraient recyclables aurait un avantage sur un design plus classique. En effet, dans le premier article, nous avons mis au point une éponge artificielle qui intègre un ribozyme et nous avons montré que cette éponge catalytique avait un effet plus marqué sur les niveaux du miR qu'elle ciblait, sur la croissance, sur la formation de colonies ainsi que sur la migration de cellules de myélome multiple. De même, dans mon second article, une stratégie similaire d'éponge recyclable semble être utilisée de manière naturelle dans les systèmes biologiques. Nous avons en effet découvert un lARNnc qui agit sur la fonction de miR-146a possiblement en initiant sa dégradation par un TDMD. Bien que les caractéristiques qui sont requises afin de générer celle-ci ne sont pas encore bien comprises, nos travaux suggèrent que les règles d'hybridation requises sont peut-être différentes pour les lARNnc que pour les ARNm. De plus, une fois que ces règles seront mieux cernées, il serait

intéressant de les incorporer dans la conception d'une éponge nouvelle génération qui pourrait devenir un outil plus performant.

Annexe 1 – Phosphorylation of SOCS1 Inhibits the SOCS1–p53 Tumor Suppressor Axis

Dans cette annexe se retrouve la version intégrale d'un article de recherche publié par notre laboratoire dans lequel je suis deuxième auteur. Cet article se penche sur le rôle de la phosphorylation de SOCS1 en tyrosine 80 dans la régulation de son interaction avec le suppresseur de tumeur p53 dans la sénescence.

Le manuscrit est publié dans la revue *Cancer Research* (84)

Lien à l'article complet : [10.1158/0008-5472.CAN-18-1503](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1503)

Phosphorylation of SOCS1 Inhibits the SOCS1-p53 Tumor Suppressor Axis

Emmanuelle Saint-Germain¹, Lian Mignacca¹, Geneviève Huot¹, Mariana Acevedo¹, Karine Moineau-Vallée¹, Viviane Calabrese¹, Véronique Bourdeau¹, Marie-Camille Rowell^{1,2}, Subburaj Ilangumaran³, Frédéric Lessard¹, and Gerardo Ferbeyre^{1,2}



Abstract

Expression of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) is inactivated in hematopoietic and solid cancers by promoter methylation, miRNA-mediated silencing, and mutations. Paradoxically, SOCS1 is also overexpressed in many human cancers. We report here that the ability of SOCS1 to interact with p53 and regulate cellular senescence depends on a structural motif that includes tyrosine (Y)80 in the SH2 domain of SOCS1. Mutations in this motif are found at low frequency in some human cancers, and substitution of Y80 by a phosphomimetic residue inhibits p53-SOCS1 interaction and its functional consequences, including stimulation of p53 transcriptional activity, growth arrest, and cellular senescence. Mass spectrometry confirmed SOCS1 Y80 phosphorylation in cells, and a new mAb was generated to detect its presence in tissues by IHC. A tyrosine kinase library screen identified the

SRC family as Y80-SOCS1 kinases. SRC family kinase inhibitors potentiated the SOCS1-p53 pathway and reinforced SOCS1-induced senescence. Samples from human lymphomas that often overexpress SOCS1 also displayed SRC family kinase activation, constitutive phosphorylation of SOCS1 on Y80, and SOCS1 cytoplasmic localization. Collectively, these results reveal a mechanism that inactivates the SOCS1-p53 senescence pathway and suggest that inhibition of SRC family kinases as personalized treatment in patients with lymphomas may be successful.

Significance: These findings show that SOCS1 phosphorylation by the SRC family inhibits its tumor-suppressive activity, indicating that patients with increased SOCS1 phosphorylation may benefit from SRC family kinase inhibitors.

Introduction

SOCS1 is a 211-amino acid protein composed of a central SH2 (src homology) domain and a C-terminal domain called the SOCS box (1). The SH2 domain of SOCS1 recognizes target proteins that are ubiquitinated and targeted to the proteasome by the E3 ligase complex bound to the SOCS box (2). SOCS1 also binds to the tumor suppressor p53 but does not stimulate its degradation (3–5). The SH2 domain of SOCS1 interacts with the N-terminal transactivation domain of p53, while the C-terminal domain of SOCS1, containing the SOCS Box, mediates interaction with the DNA damage-regulated kinases ATM/ATR. SOCS1 thus serves as an adaptor

for ATM/ATR-dependent phosphorylation of p53 and the activation of its tumor-suppressive functions (3, 5–7).

SOCS1 expression is reduced in human cancers due to DNA methylation or miRNA-mediated silencing (4, 8–15). In addition, in some patients with primary mediastinal B-cell lymphoma (16), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL; ref. 17) and many patients (61%) with Hodgkin lymphoma, SOCS1 is mutated (18, 19). In addition, enforced expression of SOCS1 in many different tumor cell types leads to a potent antiproliferative activity (3, 20). Taken together, the data referred above denote that SOCS1 is a tumor suppressor gene. On the other hand, SOCS1 can also exert oncogenic activities, as shown by its increased levels in colorectal cancer, melanoma, and in a mouse model of FTL3-induced myeloproliferative disease (21–23). The molecular mechanisms explaining how SOCS1 displays contrasting activities in tumors remain to be identified.

One hallmark of tumor cells is their ability to sustain cell proliferation, typically by activating tyrosine kinase signaling pathways (24). Tyrosine kinases altered in cancers include receptor tyrosine kinases that initiate signal transduction pathways via both serine/threonine kinases and non-receptor tyrosine kinases (25). These kinases may phosphorylate and inhibit the function of tumor suppressors (26). Here we report that SOCS1 interacts with p53 using a novel protein-protein interaction motif that comprises amino acids F79, Y80, and W81 of SOCS1. Phosphorylation of Y80 in this motif was confirmed by mass spectrometry and kinase assays and was found to be carried out by the SRC family of non-receptor

¹Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ²CRCHUM, Montréal, Québec, Canada. ³Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Authors: Gerardo Ferbeyre, University of Montréal, 2900 Edouard Montpetit, Roger Gaudry E515, Montréal, Québec H3C3J7, Canada. Phone: 514-343-7571; Fax: 514-343-2210; E-mail: g.ferbeyre@umontreal.ca; Frédéric Lessard, frederic.lessard@umontreal.ca

Cancer Res 2019;79:3306–19

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1503

©2019 American Association for Cancer Research.

tyrosine kinases. Importantly, Y80 phosphorylation interfered with p53 binding and induction of senescence but treatment with SRC-family tyrosine kinase inhibitors restored p53 binding and potentiated the senescence response to SOCS1 expression. Development of a phospho-specific mAb against phosphorylated SOCS1 (Y80) allowed us to observe by IHC an increase in SOCS1 phosphorylation at Y80 in human lymphomas in correlation with increased activation of SRC family kinases and a cytosolic localization of SOCS1.

Materials and Methods

Cell lines, reagents, and retroviral gene transfer

See Table 1 for cell lines used and culture conditions. Adherent cells were trypsinized using 0.25X Trypsin-EDTA (Life Technologies, catalog no. 15090-046). Doxorubicin (Sigma) was used at a concentration of 300 ng/mL. Serum starvation experiments were performed by culturing the cells in medium without serum for 16 hours before treating with 100 ng/mL EGF (Life Technologies). Dasatinib (#S1021) and saracatinib (#S1006) were purchased from Selleckchem and resuspended in DMSO and ethanol, respectively. Cells were treated with the selected compounds at doses ranging from 1 nmol/L to 80 nmol/L for long-term treatments, the drug being changed every two days. For signaling experiments, cells were treated with 100 nmol/L dasatinib for 2 hours prior to cell collection. IFN β was a kind gift of Biogen and was used at a final concentration of 1,000 U/mL.

Retroviral-mediated gene transfer was performed as described previously (28). Infected cell populations were selected with either puromycin (2.5 μ g/mL, 3 days) or hygromycin (80 μ g/mL, 5 days). For U2OS cells infected with pWZneo containing the kinases in combination with pLPC-SOCS1, cells were selected with G418 (600 μ g/mL, 7 days) and puromycin (2 μ g/mL, 3 days). All vectors are described in Supplementary Information.

Colony assays, growth curves, and senescence-associated β -galactosidase staining

For colony assays, U2OS cells were transiently transfected using the calcium phosphate method with 20 μ g of each vector. Cells were selected with 1.5 μ g/mL of puromycin for 3 days, counted, and plated in 6-well plates (10,000 cells per well). Cells were fixed with 1% glutaraldehyde at day 0 to account for plating and at day 10 of growth and then colored with crystal violet. The cell-retained dye was resuspended in 10% acetic acid and quantified using a

Table 2. Protocol

Antibody	Company	Cat #	Dilution	Incubation	Species	Beads
p53	Cell signaling	9282	1:200	O/N 4°C	Rabbit	Sepharose 4B Protein A, Sigma # P9424
p73	Bethyl	A300-126A	1:200	O/N 4°C	Rabbit	
c-YES	Santa Cruz Biotechnology	sc-14	1:200	O/N 4°C	Rabbit	
Cyclin A	Santa Cruz Biotechnology	sc-596	1:200	O/N 4°C	Rabbit	
IgG Unstimulated	NEB		1:200	O/N 4°C	Rabbit	

spectrophotometer. For growth curves, IMR90-infected cells were counted and plated after selection in 12-well plates (10,000 cells per well) and fixed every 2–3 days for the indicated number of days. Cells were fixed, stained, and quantified as described for colony assays. Senescence-associated β -galactosidase staining was done as described in ref. 29.

Coimmunoprecipitation

U2OS cells were collected in cell lysis buffer [20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L β -glycerol phosphate and a cocktail of protease inhibitors (Roche)]. Two milligrams of cell extract from each condition was used for IP and 50 μ g was loaded as input (whole cell lysate). The protocol (Table 2) was used as described previously (3).

For the SOCS1 dimerization experiment, three 10-cm petri dishes of each condition were transfected with 10 μ g 6x-Myc-SOCS1 and 10 μ g of FLAG-SOCS1 or FLAG-SOCS1 Δ BOX using the calcium phosphate method. When the constructs were transfected alone, an empty pLPC vector was used to keep the quantity of transfected DNA constant. Media were changed 24 hours posttransfection and cells were harvested 48 hours posttransfection. Cells were lysed using cell lysis buffer, as described above, and sonicated twice for 30 seconds on ice. FLAG-M2 affinity gel (Sigma-Aldrich #A2220) were blocked for 1 hour at 4°C in cell lysis buffer containing 2.5% BSA, 0.16 μ g/ μ L salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich) and 0.16 μ g/ μ L *E. coli* tRNA (Sigma-Aldrich), and then washed twice with cell lysis buffer. FLAG immunoprecipitation was performed using 50 μ L of FLAG-M2 affinity gel for 45 minutes at 4°C. Beads were then washed three times for 10 minutes under agitation at 4°C and resuspended in 2 \times Laemmli buffer. Beads were heated for 10 minutes at 100°C prior to loading on an SDS-PAGE gel for Western blotting.

GST pull-down

BL21 *E. coli* strain harboring each of the p53-GST-fusion vectors were used to produce the recombinant proteins in YTA 2X medium (16 g/L tryptone, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl) and induced with 0.4 mmol/L IPTG. The following buffers were used: STE buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl) supplemented with DTT (5 mmol/L) and a Protease Inhibitor Cocktail (Roche), NETN buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40). Bacteria were lysed with 1 mg/mL lysozyme and glutathione Sepharose-4B beads (Amersham) were used for the GST pull-down assay. The whole procedure was done as described previously (3). ³⁵S] methionine was used to label SOCS1 and the pull-downs were loaded onto an SDS gel for electrophoresis and autoradiography. In one case, radioactive detection was substituted for Western blotting with the FLAG antibody (for SOCS1 construct detection).

Table 1. Cell lines and culture conditions

Cell lines	Origin	Cat #	Culture media	Serum	Antibiotics	2 mmol/L L-Glutamine
SU-DHL4	ATCC	CRL-2957	RPMI1640, Wisent (350-000-CL)	10% FBS, Wisent	1% Penicillin G/Streptomycin (Wisent)	Yes
MEFs	Dr. S. Ilangumaran	(27)	DMEM, Wisent cat #310-015-CL			No
U2OS	ATCC	HTB-96				Yes
IMR90	Cornell Institute	190-79				No
H1299	ATCC	CRL-5803		5% FBS (Wisent), 5% NCS (Wisent)		Yes
293T	ATCC	CRL-1573				Yes
Phoenix Ampho	Dr. S. Lowe					Yes

Saint-Germain et al.

Tissue microarrays

IHC against pSOCS1Y80 and pSRCY416 was performed on a lymphoma human tissue microarray purchased from US Biomax (#LY2086a). This tissue microarray contains 208 samples, 192 lymphomas, and 16 normal lymph nodes. Two independent scorers quantified and scored the staining. Each scorer made three separate counts of 100 cells for every tumor and for every type of staining. Three separate staining patterns were analyzed: cytoplasmic staining, perinuclear staining, and nuclear staining. The immunoreactive score was chosen to grade the samples. This score considers the number of stained cells and the intensity of staining, where the final score is comprised between 0 and 12. Statistics were performed by using the SPSS software (IBM). Spearman correlation between the two independent scorers was 0.935, $P < 0.0001$. Mann-Whitney U test was used to show significant differences between conditions: cytoplasmic normal versus cytoplasmic lymphomas, $U = 740$, $P < 0.0001$ (sig < 0.05 two-tailed), showing a statistically significant difference between both conditions; nuclear normal versus nuclear lymphomas, $U = 1,115.5$, $P < 0.009$ (sig < 0.05 two-tailed), showing a significant difference; and perinuclear normal versus perinuclear lymphomas, $U = 1291$, $P < 0.257$ (sig < 0.05 two-tailed), showing no significant difference for perinuclear staining. Correlations in expression between pSOCS1 staining and pSRC family staining were calculated using Pearson correlation [Pearson correlation = 0.557, $P < 0.0001$ (sig < 0.01 two-tailed)].

Mass spectrometry

Twenty micrograms of proteins were separated on a 4%–12% precast NuPAGE gel (Invitrogen). The gel was Coomassie-stained with 0.1% Coomassie R250 (B7920, Sigma) in 40% methanol/10% acetic acid. Gel pieces were destained in ACN 50%, reswelled in 50 mmol/L ammonium acetate (Sigma), and reduced with 5 mmol/L tris (2-carboxyethyl)phosphine (TCEP; Pierce). Alkylation was performed by adding chloroacetamide to a final concentration of 55 mmol/L. One microgram of Asp-N was added and the digestion was performed for 4 hours. One microgram of trypsin was added and the digestion was carried out overnight. Peptide extraction was performed with 90% acetonitrile. Samples were dried down in a Speed-Vac and reconstituted in 40 μ L of formic acid (0.2%).

Peptides were loaded on a C18 stem trap from New Objective and separated on a home-made C18 column (15 cm \times 150 μ m id) at a flow rate of 600 nL/minute with a gradient of 5%–30% of acetonitrile (buffer B). Reverse-phase solvents were: buffer A (formic acid 0.2%) and buffer B (formic acid 0.2% in acetonitrile). The analytical column was coupled to a Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific). The resolution was set at 70,000 for the survey scan and 17,500 for the tandem mass spectrum acquisition. A maximum of 12 precursors were sequenced for each duty cycle. AGC target values for MS and MS/MS scans were set to 3e6 (max fill time 50 ms) and 2e4 (max fill time 150 ms), respectively. The precursor isolation window was set to m/z 1.6 with a high-energy dissociation normalized collision energy of 25. The dynamic exclusion window was set to 30 seconds. Tandem mass spectra were searched against the UniProt mouse database using PEAKS 7.0 with carbamidomethylation (C) as fixed modifications, deamidation (NQ) oxidation (M) acetylation (N-term), and phosphorylation (STY) as variable modifications. Tolerance was set at 10 ppm on precursor mass and 0.01 kDa on the

Table 3. Missed cleavages

Missed cleavages	0	1	2	3	4+
Sample 1	59	7	0	0	0
Sample 2	127	13	2	0	0
Sample 3	62	10	1	2	0

fragments. Missed cleavages were in low proportion and are given in Table 3.

Proximity ligation assay

SU-DHL4 cells (7×10^6) were seeded at 5.83×10^5 cells/mL and treated with either 12.5 μ mol/L PRIMA-1 (catalog no. A13581, Adooq Bioscience) for 24 hours, 200 nmol/L dasatinib (catalog no. S1021, Selleckchem) for 6 hours or with both compounds. Cells were harvested and fixed in suspension with PFA 4% at 37°C for 10 minutes. In parallel, an area of 1 cm² was delimited with a pap-pen (Liquid blocker super pap-pen), coated with FBS (Wisent), and allowed to air dry. Fixed cells were resuspended in 1 \times PBS/20% FBS (Wisent), applied to the serum-coated area and allowed to deposit for 10 minutes. Then, slides were centrifuged at 800 \times g for 5 minutes and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (BioShop) for 15 minutes at room temperature. Cells were washed twice for 5 minutes with 1 \times PBS and then blocked with the blocking solution (Duolink In Situ PLA probes kit, catalog no. DUO92001 or catalog no. DUO92005) for 1 hour at 37°C. Then, cells were incubated with primary antibodies in antibody diluent (Duolink In Situ PLA probes kit) overnight at 4°C. Antibodies were: anti-SOCS1 mouse monoclonal (1:100, clone 4H1, catalog no. K0175, MBL Life Science) and/or anti-p53 rabbit polyclonal (1:1,000, catalog no. A300-247A, Bethyl Laboratories). Cells were washed twice with wash buffer A (catalog no. DUO-82049, Sigma-Aldrich) for 5 minutes followed by an incubation with probe-conjugated secondary antibody in antibody diluent. Probe-conjugated secondary antibodies used for the proximity ligation assay (PLA) experiment: Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse PLUS (catalog no. DUO92001, Sigma-Aldrich) and Anti-Rabbit MINUS (catalog no. DUO92005, Sigma-Aldrich) with the detection reagents Green (catalog no. DUO92014, Sigma-Aldrich). The ligation and amplification steps were carried as detailed in the manufacturer's protocol from the detection reagents Green kit. Cells were finally washed twice for 10 minutes with 1 \times wash buffer B (catalog no. DUO-82049, Sigma-Aldrich) and once for 1 minute with 0.01 \times wash buffer B. Slides were mounted with ProLong Gold with DAPI (Molecular Probes). Images were acquired with a Zeiss Axio Imager Z2 upright microscope with a Prime sCMOS Camera (Photometrics) and ZEN 2 Imager (version 2.0.14283.302), using the EC Plan-Neofluar 100 \times /1.3 Oil Pol M27 objective.

Additional methods

For details, see Supplementary Information

Results**SOCS1 interacts with a hydrophobic motif found in the transcriptional activation domain 2 of p53 and other transcription factors**

We sought to get more insights into the mechanisms by which SOCS1 binds and regulates p53 (3, 5–7). The SH2 domain of SOCS1 constitutes a protein–protein interaction domain allowing target recognition. Previous work concluded that the SH2 domain of SOCS1 (residues 79–170) mediates the interaction

with the N-terminal domain of p53 (residues 1–72; ref. 3). The N-terminus of p53 contains two tandem transcriptional activation domains known as TAD1 (residues 1–34) and TAD2 (residues 35–67). Using GST pull-down assays and ³⁵S-labeled SOCS1 produced by *in vitro* translation, we found that p53 interacts with SOCS1 via the TAD2 (Fig. 1A). The p53 TAD2 binds to the pleckstrin homology (PH) domain of the general transcription factor GTF2H1 (also named p62) using three hydrophobic residues (F54, W53, and I50) and two acidic residues (E51 and E56; ref. 30). It also contains an important phosphorylation site (S46) that regulates p53-dependent gene expression and enhances binding to both p62 and Tfb1 (30). Mutations in S46 or S46 combined with E51 or E56 did not significantly alter the binding of the p53 TAD2 to SOCS1 in GST pull-down assays (Fig. 1B). However, changing W53 to S or F54 to S strongly reduced the binding between the TAD2 and SOCS1 while changing all three residues 50–52 (I-E-N) to A did not inhibit the binding (Fig. 1B).

The TAD2 of p53 shares a structural similarity to many other transcriptional activation domains (Supplementary Fig. S1A), suggesting that SOCS1 may also modulate other transcription factors containing similar hydrophobic motifs. SOCS1 was reported to bind NFκB (31) and KAP1 (32) and we show here that it also binds p73 (Supplementary Fig. S1B). The biological significance of SOCS1 binding to transcription factors may depend on context and imply the presence of a specific domain in SOCS1 that binds and modulates transcriptional activation domains.

A novel interaction pocket in the SH2 domain of SOCS1 mediates interaction with p53

The interaction of SOCS1 with p53 required the SH2 domain of SOCS1 (3), which is proposed to recognize phosphotyrosine-containing motifs via its conserved arginine at position 105 (104 in human; ref. 33). However, the p53 TAD2 does not contain tyrosine and R105K SOCS1 mutant was still able to bind and activate p53 (3). In addition to R105, other positively charged residues of SOCS1 may assist phosphotyrosine binding (34). Still, the mutants R110A, R128A, K119A, and K119E were able to bind p53 (Fig. 1C). The SH2 domain of SOCS1 has an N-terminal extension of 24 residues that are also important for binding to JAK2 (35). Intriguingly, several point mutations and deletions toward the end of this region were found in DLBCL and Hodgkin disease, including amino acid substitutions of F79, Y80, and W81 (Supplementary Fig. S2A). We recreated some of these mutations and found that the mutants of SOCS1 Y80D, Y80S, W81R, and the double mutant 79C/81R all lost their ability to interact with p53 (Fig. 1D). SOCS1 also interacts with tyrosine phosphorylated JAK2 (36), inhibiting JAK2-dependent STAT1 phosphorylation in response to interferon stimulation. We found that wild-type SOCS1 reduces STAT1 phosphorylation while most of the mutants in the SH2 domain N-terminal extension were defective (Supplementary Fig. S3A–B), indicating that the region around Y80 also controls this event.

Consistent with the p53 dependence of SOCS1 antiproliferative effects (3), SOCS1 mutants that cannot bind p53 lost their ability to inhibit cell proliferation in U2OS cells (Fig. 1E). As expected, neither SOCS1 nor the mutants G78S, Y80D, or W81R inhibited growth in p53-null H1299 cells (Supplementary Fig. S3C and S3D). In contrast, the mutant SOCS1 Y80F inhibited colony formation in U2OS cells in a comparable manner with

wild-type SOCS1, while conserving its ability to bind to p53 (Supplementary Fig. S3E and S3F). Next, we studied the ability of SOCS1 to cooperate with the DNA-damaging drug doxorubicin to activate a luciferase reporter with the p53-responsive p21 promoter. We found that the phosphomimetic SOCS1 Y80D mutant was not able to cooperate with doxorubicin to stimulate transcription from this promoter (Fig. 1F–G). Taken together, these results indicate that the region of SOCS1 containing amino acids Y80 and W81 mediates binding to p53 and its functional activation, and that a phosphomimetic substitution of SOCS1 at Y80 inhibits this function.

Subsequently, we investigated whether SOCS1 mutations that inhibit p53 binding also reduce its ability to induce p53-dependent senescence in normal human fibroblasts. Expression of SOCS1 in normal human fibroblasts IMR90 induced senescence but knockdown of p53 with a specific shRNA totally prevented the effect (Fig. 2A–C). The SOCS1-mutant Y80D was defective in inducing senescence (Fig. 2A) and growth arrest (Fig. 2C), while the mutant SOCS1 Y80F behaved as the wild-type (Fig. 2A–C). Quantification of the effects of SOCS1 wild-type and Y80 mutants on additional senescence markers show significant defects in the ability of SOCS1 Y80D to induce the senescence biomarkers α -fucosidase (*FUCA*; ref. 37) and *Serpin E1* (38) and the p53 target genes *p21* and *GADD45A* (Fig. 2D–G). Consistent with previous work (3), the ability of wild-type SOCS1 to induce senescence correlated with the stimulation of phosphorylation of p53 on serine 15. However, the mutant SOCS1Y80D lost this ability, while it was retained by the Y80F mutant (Fig. 2H). In summary, the p53-dependent pro-senescent function of SOCS1 is inhibited by a phosphomimetic mutation of the p53-interacting pocket of SOCS1.

SOCS1 is phosphorylated at Y80 by SRC family kinases

To investigate whether SOCS1 is phosphorylated at Y80, we incubated purified mouse SOCS1 with whole-cell lysates from three different cell types (BV173, HepG2, and IMR90) and then performed mass spectrometry on the SOCS1 protein band obtained after SDS-PAGE. The analyzed peptides included peptides phosphorylated on Y80 as indicated with the mass spectra in Fig. 3A. The sequence of the identified phosphorylated peptide is shown in Fig. 3B.

To identify candidate kinases that can phosphorylate SOCS1 and inhibit its interaction with p53, we used a bank of activated tyrosine kinases pooled in five groups of 4–5 kinases each. Kinases in group 1 reduced p53–SOCS1 interaction (Fig. 3C) and were further analyzed. Among the kinases in this group, the SRC family kinase YES1 appreciably reduced p53–SOCS1 interaction (Fig. 3D). Also, endogenous YES1 coimmunoprecipitated with SOCS1 in U2OS cells overexpressing SOCS1 (Fig. 3E). To further investigate the implication of SRC family kinases in SOCS1 phosphorylation at Y80, we generated a mAb capable of recognizing SOCS1 phosphorylated at Y80. To validate this antibody, we first stimulated wild-type or SOCS1-null MEFs with EGF and performed IHC. We could detect a strong signal in wild-type MEFs stimulated with EGF, but not in SOCS1-null MEFs under similar conditions (Fig. 3F). Next, we used purified SOCS1 and performed *in vitro* kinase assays with either YES1 or the related kinase SRC. The antibody recognized SOCS1 in immunoblots after incubation of SOCS1 with these kinases in the presence of ATP and the signal was decreased by the mutation of Y80F (Fig. 3G). Interestingly, after *in vitro* phosphorylation reactions, SOCS1

Saint-Germain et al.

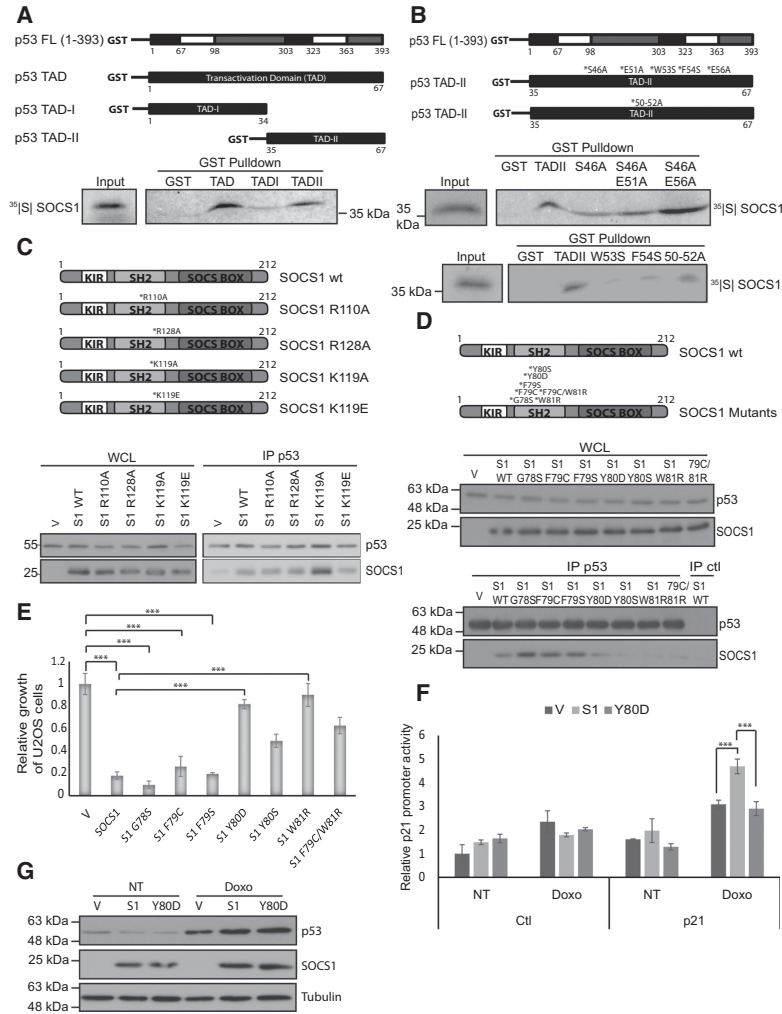


Figure 1. Identification of a novel interaction mechanism between SOCS1 and p53. **A–D**, Each panel shows a schematic representation of the GST-p53 fusion proteins (**A** and **B**) or of SOCS1 variants (**C** and **D**) and the resulting *in vitro* interaction between SOCS1 and p53. Mutations are indicated by an * followed by the corresponding amino acid change. **A**, Interaction of ³⁵S-labeled-SOCS1 with GST-p53 TAD, GST-p53 TAD-I, and GST-p53 TAD-II. **B**, Interaction of ³⁵S-labeled-SOCS1 with GST-p53 TADII mutants of hydrophobic residues. **C**, SOCS1 (S1) does not interact with p53 via the same amino acids with which it interacts with JAKs. Coimmunoprecipitation of p53 or control IP (anti-Cyclin A: IP CA) was performed in U2OS cells transiently transfected with the SOCS1 wild-type (S1 WT) or mutants and treated with doxorubicin (300 ng/mL) for 16 hours. Lysates and immunoprecipitates were immunoblotted for the indicated proteins. WCL, whole-cell lysates; V, control vector. **D**, SOCS1-p53 interaction is decreased when SOCS1 is mutated on Y80 or W81. Coimmunoprecipitation was performed in U2OS as described in **C**. **E**, SOCS1 mutated on Y80 or W81 loses its ability to arrest growth of cancer cells. Colony assays were performed in U2OS cells transiently transfected with the various constructs described in **D**. **F**, Luciferase assays in U2OS cells cotransfected with pGL3-promoter control vector (Ctl) or pGL3 p21-promoter vector in combination with a control vector (V), a vector expressing SOCS1 (S1), or a SOCS1 mutant for Y80D. Cells were either untreated (NT) or treated with 300 ng/mL doxorubicin (Doxo) for 24 hours. **G**, Western blots showing the levels of p53 and SOCS1 in cells as in **F**. Tubulin was used as loading control. ***, *P* < 0.005.

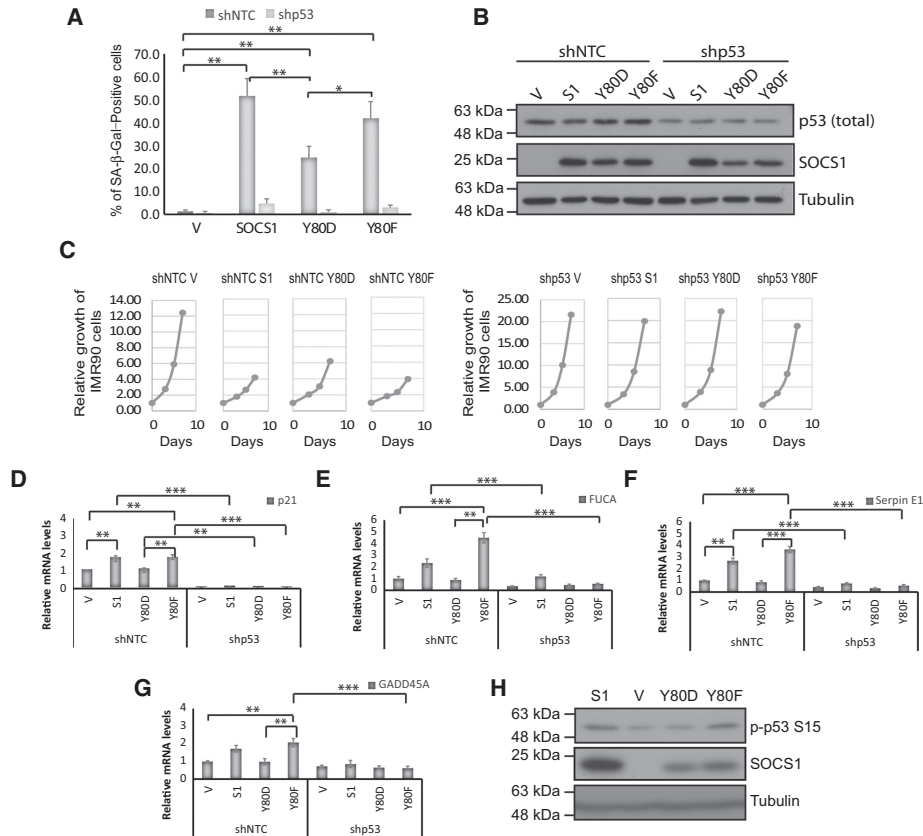


Figure 2. SOCS1 phosphomimetic and unphosphorylatable mutants impact cellular senescence in normal human fibroblasts. **A**, Senescence-associated β -galactosidase assay (SA- β -gal) of cells expressing an empty vector (V), wild-type SOCS1 (SOCS1wt), SOCS1 Y80D, or SOCS1 Y80F in combination with either a nontargeting shRNA (shNTC) or a shRNA against p53 (shp53). **B**, Immunoblots of indicated proteins performed on cells as in **A**. **C**, Growth curves of IMR90 cells as in **A**. Data are presented as means normalized to day 0 of each condition. **D-G**, qPCR for the indicated genes performed on reverse transcribed total RNA extracted from cells as in **A**. **H**, Immunoblots of the indicated proteins showing that SOCS1 mutation Y80D loses its ability to stimulate p53 phosphorylation. IMR90 cells were infected with empty vector (V) or derivatives expressing wild-type SOCS1 (S1), SOCS1 Y80D, or SOCS1 Y80F. All experiments were performed three times; error bars indicate the SD of triplicates. *, $P < 0.05$, using two tailed Student t test; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$.

migrated at a molecular weight corresponding to a dimer unless the protein extracts were heated in 8 mol/L urea (Fig. 3H), suggesting that phospho-SOCS1 efficiently forms very stable dimers or that mainly SOCS1 dimers are phosphorylated by YES1. We confirmed that this dimeric form of SOCS1 exists in cells by doing a coimmunoprecipitation between a FLAG-tagged SOCS1 and a MYC-tagged SOCS1 (Fig. 3I). Moreover, a mutant of SOCS1 without the SOCS box domain tagged with FLAG was able to interact with MYC-tagged SOCS1, indicating that the SH2

domain is sufficient for dimerization (Fig. 3J). We conclude that the SRC family kinase phosphorylates SOCS1 on Y80 inhibiting its interaction with p53 and favoring the formation of SOCS1 dimers.

SRC family kinase inhibitors potentiate p53 activation and senescence in SOCS1-expressing cells

SRC family kinase (SFK) inhibitors have been developed and are under clinical evaluation as cancer therapeutics (39).

Saint-Germain et al.

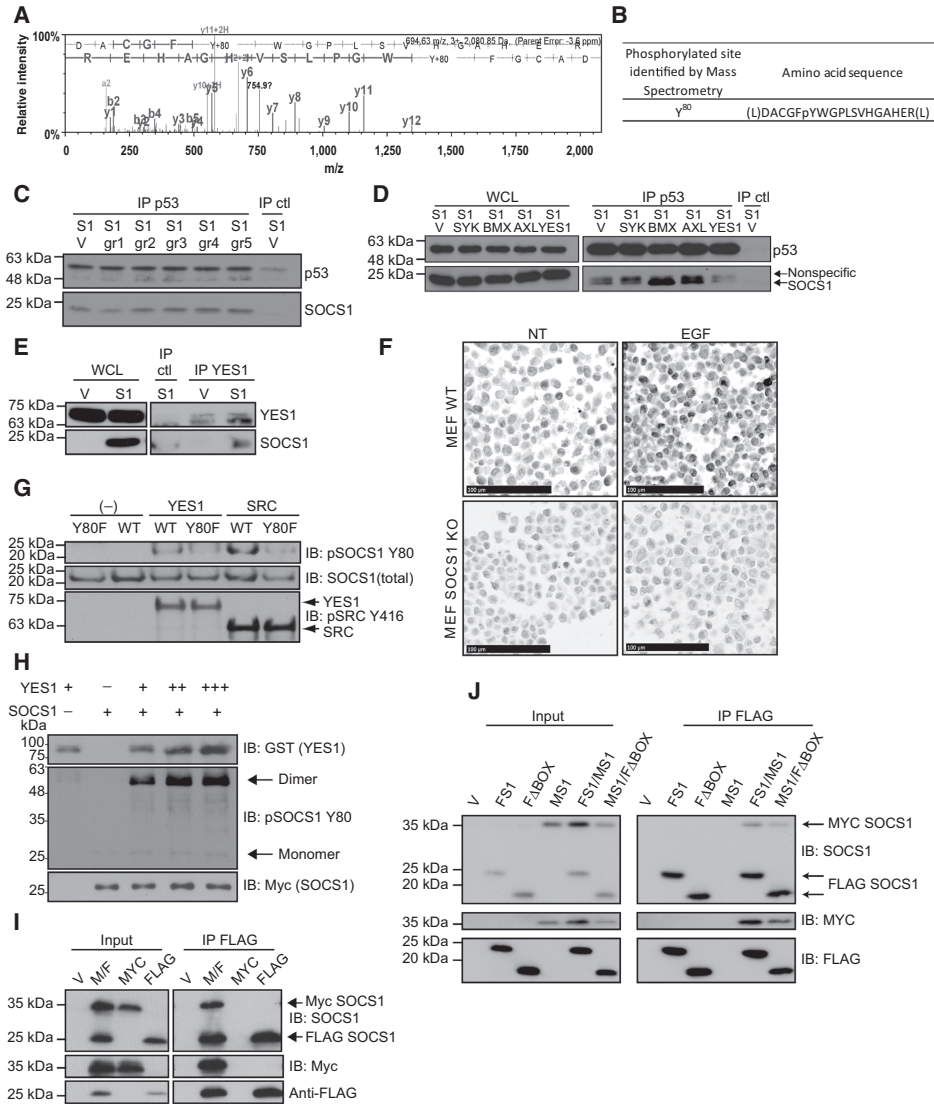


Figure 3. SOCS1 is phosphorylated on Y80 by SRC family kinase members SRC and YES1. **A**, Mass spectra obtained for a typical peptide showing phosphorylation of Y80. Whole-cell lysates from three cell lines (IMR90, HepG2, and BV173) were each incubated with *in vitro* purified GST-SOCS1 to test whether phosphorylation occurs in different cell types. Extracts were then loaded onto an SDS-PAGE gel and the band corresponding to SOCS1 was analyzed by mass spectrometry. **B**, Sequence of the phosphorylated peptide identified by mass spectrometry. **C**, Immunoblots of indicated proteins following coimmunoprecipitation of SOCS1 (S1) with p53 in cells expressing a control vector (V) or pools of activated tyrosine kinases (gr1–gr5). (Continued on the following page.)

These inhibitors could potentially reactivate the SOCS1-p53 pathway in tumors overexpressing SOCS1, triggering anti-tumor responses. First, we confirmed that SFK inhibitors could block the phosphorylation of SOCS1 by SRC in an *in vitro* kinase assay using purified SOCS1 incubated with SRC kinase and different concentrations of dasatinib (4 nmol/L or 100 nmol/L). SOCS1 was phosphorylated in the absence of dasatinib, but the drug strongly decreased SOCS1 phosphorylation at a concentration of 100 nmol/L (Fig. 4A). To investigate whether SFK inhibitors can potentiate the SOCS1-p53 pathway, we first evaluated their effect on p53-dependent senescence triggered by SOCS1 in normal human fibroblasts. Introduction of SOCS1 in IMR90 cells reduced cell growth and induced senescence, turning around 40% of the cells SA- β -gal positive (Fig. 4B). Combining SOCS1 with 20 nmol/L or higher of SFK inhibitors dasatinib or saracatinib increased the percentage of senescent cells (Fig. 4B). This effect correlated with higher levels of serine 15 phosphorylation of p53 (Fig. 4C). The reinforcement of SOCS1-induced senescence translated into an improvement of the growth arrest induced by SOCS1 in the cell population (Fig. 4D). We also found that SFK inhibitors did not reinforce senescence induced by a mutant of SOCS1 that cannot be phosphorylated at Y80 (Fig. 4E). Hence, the cooperation of SOCS1 with SFK inhibitors depended on Y80.

SOCS1 is phosphorylated at Y80 in human cancers

The presence of SOCS1 mutations in some patients with DLBCL and Hodgkin disease is consistent with a tumor suppressor role for SOCS1 in these cancers. However, gene expression analysis revealed an unexpected increase in SOCS1 expression in DLBCL, Burkitt lymphoma, and follicular lymphoma (Fig. 5A and B; Supplementary Fig. S4A). This is surprising because p53 mutations are not common in DLBCL (Supplementary Fig. S4B) and SOCS1 could activate p53 and halt tumor progression. In fact, SOCS1 and p53 mutations are mutually exclusive along several types of cancers signifying that they act in a common pathway (Supplementary Fig. S4C). We thus reasoned that for most cases of DLBCL that overexpress SOCS1, SOCS1 Y80 phosphorylation could avoid p53 activation. Consistent with this idea, YES1, the SRC family kinase we identified in our SOCS1 Y80 kinase screen, is highly expressed in DLBCL (Supplementary Fig. S4D). To investigate whether SOCS1 phosphorylation at Y80 is increased in DLBCL, we performed IHC in tissue microarrays containing samples from

several patients with lymphoma (Supplementary Fig. S5A). We identified four degrees of staining (negative, mild, moderate, and strong; Fig. 5C) in three different cellular compartments (nuclear, perinuclear, and cytoplasmic; Supplementary Fig. S5B). We found a high percentage of strong and moderate cytoplasmic and perinuclear staining in DLBCL and other lymphomas, while normal lymph nodes never stained strong and have a higher percentage of moderate nuclear staining (Fig. 5D and E). These results are consistent with the idea that SOCS1 phosphorylation at Y80 acts as an oncogenic modification that avoids the tumor suppressor functions of SOCS1.

Next, we studied the status of the SRC family kinase in the same tissue microarrays using an antibody that reacts with activated SRC family members. We found that in general, lymphomas stained positive for these kinases while normal tissues were mostly negative (Fig. 6A and B). In addition, there was a significant correlation between the staining for activated SRC family and for SOCS1 phosphorylation at Y80 (Pearson correlation 0.557). Because B cells and their neoplasias express high levels of several SRC-family kinases, we investigated whether LCK, LYN, and BLK could phosphorylate SOCS1 at Y80. We found that these kinases were all able to phosphorylate SOCS1 at Y80 to different levels (Fig. 6C). Of note, BLK and LYN expression is higher in DLBCL than either YES1 or SRC, although there is a large variability in the expression of these kinases at the mRNA level (Supplementary Fig. S6A-S6D). These results imply that to restore SOCS1 tumor suppression activity in DLBCL, drugs should efficiently target B-cell-specific SRC family members.

Finally, to demonstrate that drugs targeting SRC family kinases can reactivate the SOCS1-p53 axis in B-cell lymphoma cells, we used the B-cell lymphoma cell line SU-DHL4. These cells express both SOCS1 and a mutant p53 allele (R273C) that can be reactivated by the compound PRIMA-1, which binds covalently to the core domain of p53 (40). To capture the complex between p53 and SOCS1 in these tumor cells after treatment with dasatinib, we used the proximity ligation assay (Duolink), which is more sensitive than coimmunoprecipitation to detect protein interactions at endogenous levels. Dasatinib alone did not significantly increase p53-SOCS1 interactions as measured by this assay. However, upon reactivation of endogenous p53 with PRIMA-1, we were able to reveal numerous foci representing p53-SOCS1 complexes in these cells (Fig. 6D and E; Supplementary Fig. S7). Together, these results

(Continued.) Group 1 (AXL, BMX, SYK, and YES1), group 2 (TEC, LCK, TYK2, BTK), group 3 (FGFR1, HCK, TNK2, and EphA4), group 4 (BLK, FRK, TIE1, and FGR), and group 5 (MATH, ITK, and RET). **D**, YES1 kinase overexpression decreases the interaction between p53 and SOCS1. Immunoblots showing coimmunoprecipitation of SOCS1 (S1) with p53 in cells expressing a control vector (V) or each of the kinases of group 1. WCL, whole-cell lysates. **E**, YES1 and SOCS1 interact together. Whole-cell lysates and immunoprecipitates were immunoblotted for indicated proteins following immunoprecipitation of YES1 or control (ctl) in U2OS cells overexpressing SOCS1 (S1) or a control vector (V). **F**, Validation of a novel antibody against phospho-Y80 SOCS1 by IHC on wild-type MEFs or SOCS1 knockout MEFs either untreated or stimulated with EGF following serum starvation. **G**, *In vitro* kinase assay shows that GST-YES1 and SRC-His phosphorylate SOCS1. Active GST-YES1 and SRC-His were incubated with purified FLAG-SOCS1 wild-type (WT) or FLAG-SOCS1 Y80F *in vitro*. After denaturation in 8 mol/L urea, phosphorylation was assessed by Western blot with the mAb specific to phosphorylated SOCS1 at Y80 (pSOCS1 Y80). SRC kinases are detected with phospho-SRC Y416 (pSRC Y416). **H**, Majority of phosphorylated SOCS1-Myc-FLAG is found as a dimer when no denaturation in 8 mol/L urea is used. Immunoblots of GST-YES1, SOCS1-Myc-Flag, and phospho-SOCS1 (pSOCS1 Y80) of *in vitro* kinase assays using purified SOCS1-Myc-FLAG and increasing concentrations of purified GST-YES1 in absence of urea. **I**, SOCS1 dimerizes in cells. U2OS cells were transfected with empty vector (V), 6 \times MYC-SOCS1, and FLAG-SOCS1 (M/F), 6 \times MYC-SOCS1 alone (MYC) or FLAG-SOCS1 alone (FLAG) and immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. Lysates (Input) and immunoprecipitates were immunoblotted for the indicated proteins. **J**, SOCS1 SH2 domain is sufficient for dimerization. U2OS cells were transfected with control vector (V), different combinations of 6 \times MYC-SOCS1 (MS1) and FLAG-SOCS1 (FS1) or FLAG-SOCS1 Δ BOX (FABOX) and immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. Lysates and immunoprecipitates were immunoblotted for indicated proteins.

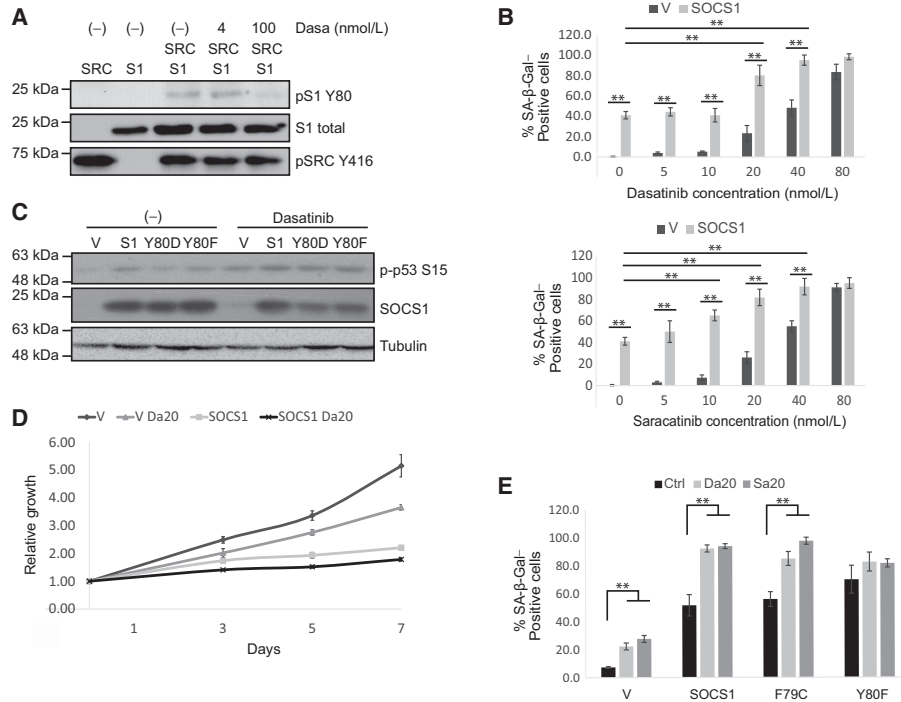


Figure 4. Inhibiting the SRC family enhances SOCS1 tumor suppressor activity. **A**, Dasatinib inhibits SOCS1 phosphorylation in *in vitro* kinase assays. Kinase assay was performed as described previously using purified proteins but adding to the reaction the SRC inhibitor dasatinib at either 4 nmol/L or 100 nmol/L. S1, SOCS1; pS1 Y80, phospho-SOCS1 Y80; pSRC Y416, phospho-SRC family Y416. **B**, SRC family inhibitors cooperate with SOCS1 to induce a stronger senescence. IMR90 cells infected with an empty vector (V) or SOCS1 were treated with increasing doses of dasatinib (top) or saracatinib (bottom), ranging from 0 to 80 nmol/L for one week. Senescence-associated-β-galactosidase (SA-β-gal) staining was then performed to quantify the number of senescent cells. **C**, Immunoblots for the indicated proteins on cell lysates from IMR90 cells infected with empty vector (V), wild-type SOCS1 (S1), SOCS1 Y80D, or SOCS1 Y80F and treated or not with 100 nmol/L dasatinib for 24 hours. P-p53 S15, phosphorylated p53 at serine 15. **D**, IMR90 cells infected with an empty vector (V) or SOCS1 were treated with 20 nmol/L dasatinib (Da20) for one week, the dose showing the best effect in **B** before being counted and plated for a growth curve. **E**, SA-β-gal staining in cells expressing either a control vector (V), wild-type SOCS1, or SOCS1 mutants F79C or Y80F and treated with dasatinib 20 nmol/L (Da20) or saracatinib 20 nmol/L (Sa20). All experiments were performed three times; error bars indicate the SD of triplicates. **, $P < 0.01$, using one-way ANOVA followed by Tukey HSD test (**B**) or the Student *t* test (**E**).

show that SRC family kinase inhibitors can reactivate the SOCS1-p53 tumor suppressor axis when used alone in cells with wild-type p53 or in combination with compounds that can reactivate mutant p53 in cells that express such mutants.

Discussion

Tumor suppressors are often disabled in cancer cells by mutations or expression silencing. However, cancer cells over-express enzymes that catalyze protein posttranslational mod-

ifications, some of which could also inactivate tumor suppressors (41). Here, we report that the functions of the tumor suppressor SOCS1 are inhibited by phosphorylation on Y80 catalyzed by the SRC family of protein tyrosine kinases. We found that Y80 in SOCS1 is part of a motif that mediates interaction with p53. Mutations in this motif are found with low frequency in human cancers where paradoxically most patients display high levels of SOCS1 expression. Our analysis of samples from several cases of human lymphomas indicates a frequent SOCS1 phosphorylation on Y80, suggesting a

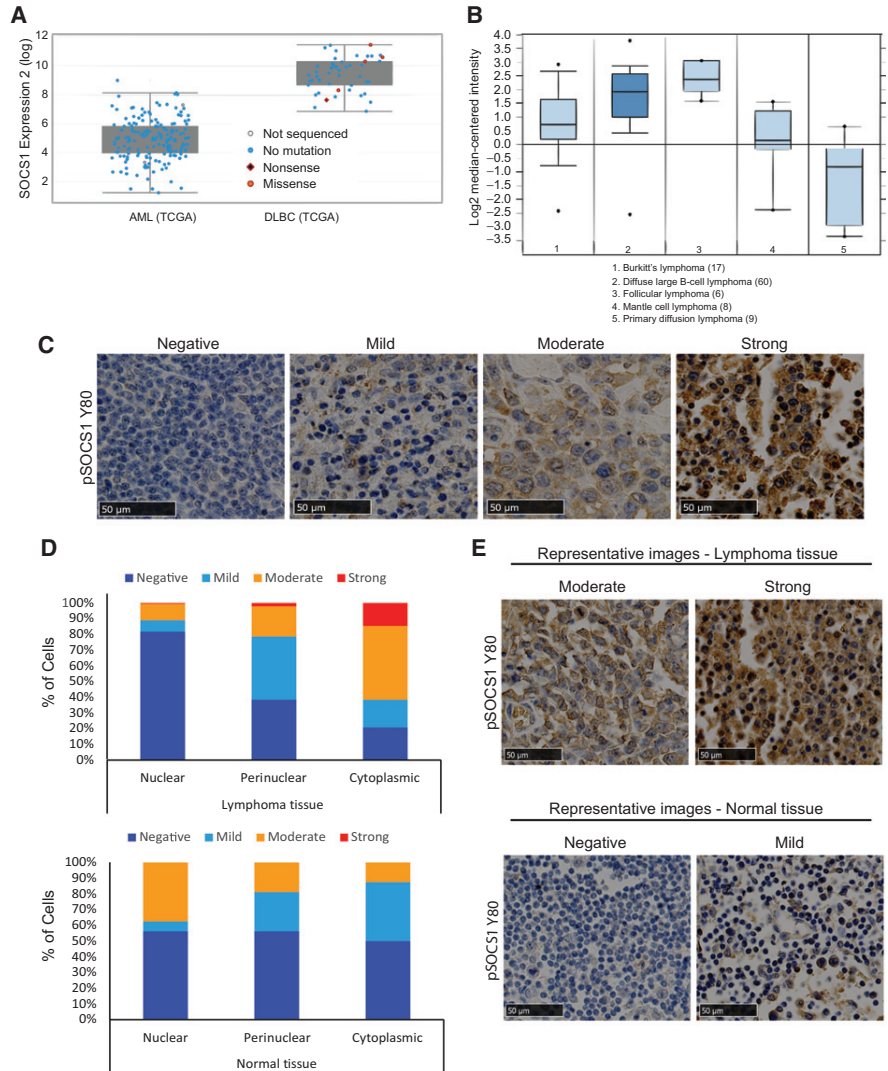


Figure 5. Phosphorylated SOCS1 at Y80 is deregulated in human DLBCL. **A**, SOCS1 expression levels (RNA-seq data from cBioPortal) in two types of hematopoietic cancers, acute myeloid leukemia (AML) and DLBCL. **B**, OncoPrint analysis of SOCS1 expression levels in different types of lymphomas shows DLBCL lymphomas have among the highest expression levels of SOCS1. **C**, Scale of staining intensity calculated with the immunoreactivity scoring method for phosphorylated SOCS1 Y80 in IHC on tissue microarrays of human DLBCL patients (LY2086a, US Biomax). **D**, Staining of pSOCS1 Y80 is increased in the cytoplasm of lymphoma tissues compared with normal lymph nodes. Analysis of pSOCS1 Y80 staining in human DLBCL samples from the tissue microarrays (LY2086a). Top, lymphoma tissues; bottom, normal lymph nodes. Nuclear, perinuclear, and cytoplasmic staining were analyzed and quantified. Results are shown in graphics comparing the percentage of cells stained in each category and the intensity of staining. **E**, Images of the most representative phenotypes obtained in patients with DLBCL (top) and normal lymph nodes (bottom) for pSOCS1 Y80.

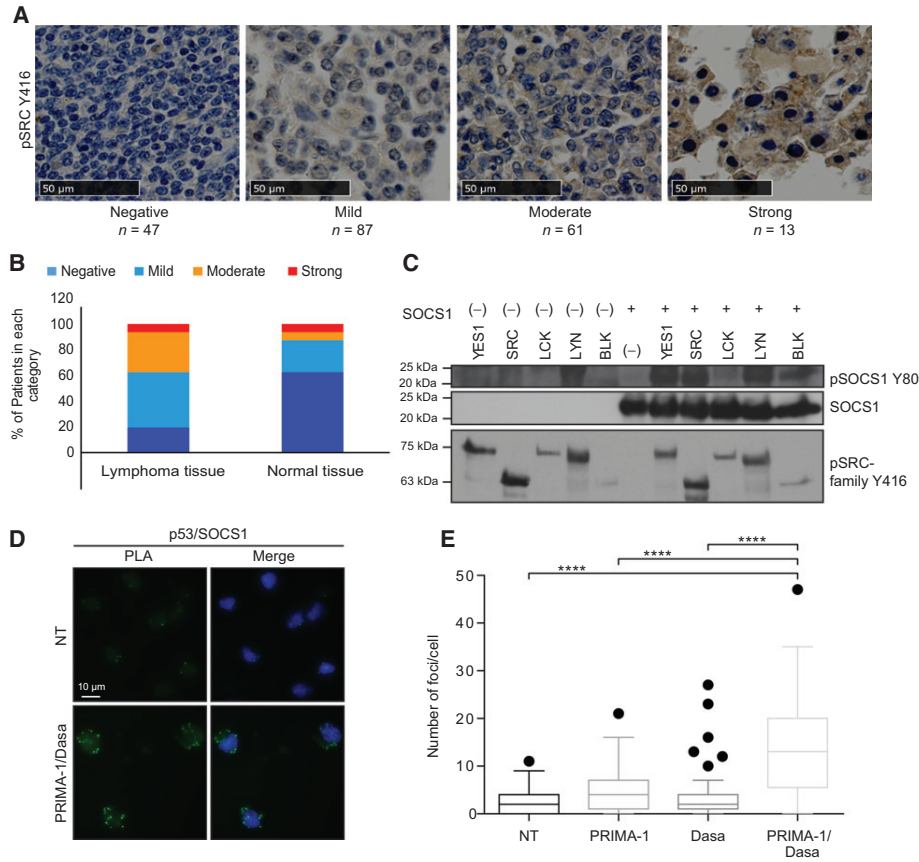


Figure 6. SRC family kinases phosphorylate SOCS1 on Y80 and inhibit endogenous SOCS1-p53 interaction in lymphomas. **A**, Example of the four different categories of staining defined for pSRC-family Y416 (pSRC Y416): negative, mild, moderate, and strong. Number of samples staining for each category is indicated. **B**, Comparison of relative number of patients staining in each category is shown for lymphoma samples versus normal lymph nodes. Lymphomas stain more strongly for pSRC staining. **C**, Kinase assays using SRC family members important in B or T cells (LYN, BLK, and LCK) compared with YES1 and SRC were performed to compare levels of monomeric phosphorylated SOCS1. After kinase reactions, extracts were heated in 8 mol/L urea to visualize monomeric SOCS1. **D**, PLA for SOCS1 and p53 in SU-DHL4 cells following treatments with the combination of 12.5 μmol/L PRIMA-1 for 24 hours and 200 nmol/L dasatinib (Dasa) for 6 hours. Not treated (NT) cells were used as controls. Scale bar, 10 μm. DAPI DNA counterstain is visualized in the merge images. **E**, PLA quantification of the number of foci per cell for SU-DHL4 cells treated with PRIMA-1, dasatinib (Dasa), or both compounds and compared with nontreated cells. The box plots represent the combination of the counts of foci from 45 cells, 15 cells from each of three independent experiments. Each box plot shows median number of PLA foci; boxes and whiskers were determined using the Tukey whisker method. ****, $P < 0.0001$, using one-sided ANOVA test.

mechanism that explains why these tumors retain high levels of SOCS1.

The SH2 domain is a phosphotyrosine-binding module originally described in the SRC family of tyrosine kinases (42). The motif that mediates the interaction between SOCS1 and p53 includes Y80 and W81 and is located at the N-terminal

extension of the SH2 domain of SOCS1. This motif is conserved in other SOCS family proteins, including SOCS3, which also binds to p53 (43). The tertiary structure of the SH2 domain of SOCS3 shows that the extended SH2 subdomain forms an amphipathic helix, with the hydrophobic side binding the phospho-tyrosine binding loop of the SH2

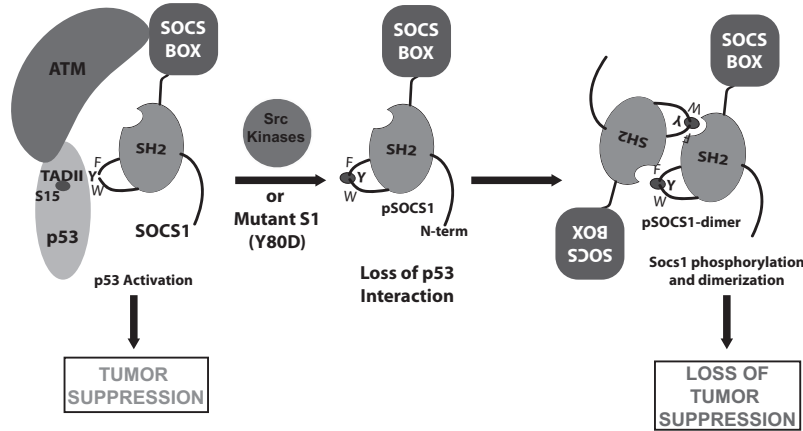


Figure 7.

Model showing the role of mutations and phosphorylation on the tumor suppressor role of SOCS1 in the p53 pathway. SOCS1 binds p53, facilitating its ATM-dependent phosphorylation on serine 15. SRC kinases phosphorylate SOCS1 on Y80, inhibiting its interaction with p53 and promoting SOCS1 dimerization. SOCS1 dimers are proposed to occur by recognition of phospho-Y80 by the phosphotyrosine binding motif in the SH2 domain of SOCS1.

domain (44). Y47 and W48 of SOCS3 (Y80 and W81 in SOCS1) lie to the C-terminal part of the extended subdomain forming a loop exposed to the protein surface (34, 44). Additional structural work will be required to characterize the noncanonical binding of SOCS1 to p53, which does not require phosphorylated tyrosine and binds hydrophobic patches present in the amphipathic alpha helix of the TAD2 of p53. Phosphorylation of Y80 in SOCS1 could interfere with protein-protein interactions directly via the negative charge of the phosphate or by preventing Y-mediated contacts with the interaction partner. It is also possible that phosphorylation on Y80 induces conformational changes in SOCS1 that disables its binding to other proteins. In particular, phospho-Y80 could bind the phosphotyrosine binding pocket of the same molecule of SOCS1 or bind to another SOCS1 molecule to form inactive dimers as our results suggest. Of note, SOCS1 Y80D mutant was unable to bind p53 or inhibit STAT1 phosphorylation in response to interferon, suggesting that tyrosine phosphorylation of SOCS1 at Y80 is a general mechanism to control its activity (Fig. 7).

Furthermore, previous studies have identified phosphorylation as a means of negative regulation of SOCS1. One group identified the fusion protein BCR-ABL, responsible for chronic myelogenous leukemia, as a SOCS1 kinase (45). Their publication identified Y155 and Y204 of SOCS1 as the main tyrosines phosphorylated by BCR-ABL. Phosphorylation of SOCS1 on these sites prevented the inhibition of the JAK/STAT pathway and mutation of both tyrosines to phenylalanine suppressed tumor growth (46). Their results also show that mouse Socs1 Y80F is less phosphorylated in response to BCR-ABL, indicating that this residue might be a target for this kinase even though they did not further study this particular tyrosine.

Our mass spectrometry results have allowed us to obtain peptides for three of the four tyrosine residues in SOCS1, but Y155 and Y204 were not phosphorylated in the three cell lines we looked at, whereas Y80 was phosphorylated.

Furthermore, in the context of cancer cells, phosphorylation of SOCS1 on Y80 can effectively block its tumor suppression activity. In DLBCL, mutations of SOCS1 and p53 are mutually exclusive (17) but most patients overexpress SOCS1 and have wild-type p53 (Fig. 5A and B; Supplementary Fig. S4). We propose that the SOCS1-p53 axis is mostly disabled by Y80 phosphorylation of SOCS1 in DLBCL and other lymphomas. This idea is supported by our data showing high levels of Y80-phosphorylated SOCS1 in the cytosol of cells from patients with DLBCL and its correlation with high levels of activated SRC-kinases. An important question is whether SRC family kinase inhibitors can be used to reactivate the SOCS1-p53 axis in tumors with constitutive phosphorylation of SOCS1 on Y80. In cell culture, the induction of p53 and senescence by SOCS1 was potentiated by SRC family kinase inhibitors. Also, in the lymphoma cell line SU-DHL4 a, SRC family kinase inhibitor promoted the interaction between SOCS1 and a mutant p53 protein reactivated by the compound PRIMA-1. Previous work found constitutively high SFK expression in B-cell lymphoma cell lines conferring sensitivity to SFK inhibitors (47). Data from Oncomine (Supplementary Fig. S6) show that DLBCLs express high levels of BLK, LYN, and YES1 and we found that these kinases are as efficient as SRC in phosphorylating SOCS1 at Y80. Despite the extensive preclinical evidence linking the SRC family to tumor progression, the results of using SRC family inhibitors in clinical trials have been disappointing in solid tumors (25). One reason for these results is the lack of biomarkers to select patients for

treatment. We suggest that SFK inhibitors can be effective in patients that have high levels of Y80 phosphorylated SOCS1 and either wild-type p53 or a mutant p53 that can be pharmacologically reactivated.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: E. Saint-Germain, L. Mignacca, V. Calabrese, V. Bourdeau, F. Lessard, G. Ferbeyre
Development of methodology: E. Saint-Germain, L. Mignacca, V. Calabrese, V. Bourdeau, F. Lessard, G. Ferbeyre
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): E. Saint-Germain, L. Mignacca, G. Huot, M. Acevedo, K. Moineau-Vallée, F. Lessard, G. Ferbeyre
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): E. Saint-Germain, L. Mignacca, G. Huot, K. Moineau-Vallée, S. Ilangumaran, F. Lessard, G. Ferbeyre
Writing, review, and/or revision of the manuscript: E. Saint-Germain, V. Bourdeau, S. Ilangumaran, F. Lessard, G. Ferbeyre

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): E. Saint-Germain, V. Bourdeau, M.-C. Rowell, G. Ferbeyre

Study supervision: F. Lessard, G. Ferbeyre

Acknowledgments

We thank Scott Lowe (MSK), David Bernard (Cancer Research Centre of Lyon), Caroline Saucier (U. Sherbrooke), James G. Omichinsky (U. Montréal) for comments and/or reagents, and Rémy Beaujois for technical assistance. We also thank all members of the Ferbeyre laboratory for their useful comments. Proteomics analyses were performed by the Center for Advanced Proteomics Analyses, a Node of the Canadian Genomic Innovation Network that is supported by the Canadian Government through Genome Canada. IHC of TMAs was performed at the IRIC Histology Platform. F. Lessard is supported by FRQS (Fonds de Recherche du Québec-Santé) and CRS (Cancer Research Society). G. Ferbeyre is supported by the CIBC chair for breast cancer research at the CRCHUM. This work was funded by a grant from the Canadian Institute of Health and Research (CIHR-MOP229774 to G. Ferbeyre).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received May 15, 2018; revised March 21, 2019; accepted May 13, 2019; published first May 17, 2019.

References

1. Beurivage C, Champagne A, Tobelaïm WS, Pomerleau V, Menendez A, Saucier C. SOCS1 in cancer: an oncogene and a tumor suppressor. *Cytokine* 2016;82:87–94.
2. Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG Jr., Conaway RC, et al. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 1998;12:3872–81.
3. Calabrese V, Mallette FA, Deschenes-Simard X, Ramanathan S, Gagnon J, Moores A, et al. SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell* 2009;36:754–67.
4. Bouamar H, Jiang D, Wang L, Lin AP, Ortega M, Aguiar RC. MicroRNA 155 control of p53 activity is context dependent and mediated by Aicda and Socs1. *Mol Cell Biol* 2015;35:1329–40.
5. Shimada K, Serada S, Fujimoto M, Nomura S, Nakatsuka R, Harada E, et al. Molecular mechanism underlying the antiproliferative effect of suppressor of cytokine signaling-1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci* 2013;104:1483–91.
6. Mallette FA, Calabrese V, Ilangumaran S, Ferbeyre G. SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence. *Aging* 2010;2:445–52.
7. Cui X, Shan X, Qian J, Ji Q, Wang L, Wang X, et al. The suppressor of cytokine signaling SOCS1 promotes apoptosis of intestinal epithelial cells via p53 signaling in Crohn's disease. *Exp Mol Pathol* 2016;101:1–11.
8. Zardo G, Tiirikainen MI, Hong C, Misra A, Feuerstein BG, Volik S, et al. Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat Genet* 2002;32:453–8.
9. Chim CS, Wong KY, Loong F, Srivastava G. SOCS1 and SHP1 hypermethylation in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway. *Leukemia* 2004;18:356–8.
10. Sutherland KD, Lindeman GJ, Choong DY, Wittlin S, Brentzell L, Phillips W, et al. Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas. *Oncogene* 2004;23:7726–33.
11. Hatirnaz O, Ure U, Ar C, Akyerli C, Soysal T, Ferhanoglu B, et al. The SOCS-1 gene methylation in chronic myeloid leukemia patients. *Am J Hematol* 2007;82:729–30.
12. Chevrier M, Bobbala D, Villalobos-Hernandez A, Khan MG, Ramanathan S, Saucier C, et al. Expression of SOCS1 and the downstream targets of its putative tumor suppressor functions in prostate cancer. *BMC Cancer* 2017;17:157.
13. Jiang S, Zhang HW, Lu MH, He XH, Li Y, Gu H, et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res* 2010;70:3119–27.
14. Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y, et al. Identification of miR-30d as a novel prognostic maker of prostate cancer. *Oncotarget* 2012;3:1455–71.
15. Zhao XD, Zhang W, Liang HJ, Ji WY. Overexpression of miR-155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3. *PLoS one* 2013;8:e56395.
16. Mestre C, Rubio-Moscardo F, Rosenwald A, Climent J, Dyer MJ, Staudt L, et al. Homozygous deletion of SOCS1 in primary mediastinal B-cell lymphoma detected by CGH to BAC microarrays. *Leukemia* 2005;19:1082–4.
17. Reddy A, Zhang J, Davis NS, Moffitt AB, Love CL, Waldrop A, et al. Genetic and functional drivers of diffuse large B cell lymphoma. *Cell* 2017;171:481–94.
18. Lennerz JK, Hoffmann K, Bubolz AM, Lessel D, Welke C, Ruther N, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 gene mutation status as a prognostic biomarker in classical Hodgkin lymphoma. *Oncotarget* 2015;6:29097–110.
19. Mottok A, Renne C, Willenbrock K, Hansmann ML, Brauninger A. Somatic hypermutation of SOCS1 in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood* 2007;110:3387–90.
20. Tagami-Nagata N, Serada S, Fujimoto M, Tanemura A, Nakatsuka R, Ohkawara T, et al. Suppressor of cytokine signalling-1 induces significant preclinical antitumor effect in malignant melanoma cells. *Exp Dermatol* 2015;24:864–71.
21. Tobelaïm WS, Beurivage C, Champagne A, Pomerleau V, Simoneau A, Chababi W, et al. Tumour-promoting role of SOCS1 in colorectal cancer cells. *Sci Rep* 2015;5:14301.
22. Reddy PN, Sargin B, Choudhary C, Stein S, Grez M, Muller-Tidow C, et al. SOCS1 cooperates with FLT3-ITD in the development of myeloproliferative disease by promoting the escape from external cytokine control. *Blood* 2012;120:1691–702.
23. Berzaghi R, Maia VS, Pereira FV, Melo FM, Guedes MS, Origgas CS, et al. SOCS1 favors the epithelial-mesenchymal transition in melanoma, promotes tumor progression and prevents antitumor immunity by PD-L1 expression. *Sci Rep* 2017;7:40585.
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.

25. Zhang S, Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci* 2012;33:122–8.
26. Polonio-Vallon T, Kirkpatrick J, Krijgsveld J, Hofmann TG. Src kinase modulates the apoptotic p53 pathway by altering HIPK2 localization. *Cell Cycle* 2014;13:115–25.
27. Ilangumaran S, Finan D, La Rose J, Raine J, Silverstein A, De Sepulveda P, et al. A positive regulatory role for suppressor of cytokine signaling 1 in IFN-gamma-induced MHC class II expression in fibroblasts. *J Immunol* 2002;169:5010–20.
28. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 2000;14:2015–27.
29. Deschenes-Simard X, Gaumont-Leclerc MF, Bourdeau V, Lessard F, Moiseeva O, Forest V, et al. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev* 2013;27:900–15.
30. Di Lello P, Jenkins LM, Jones TN, Nguyen BD, Hara T, Yamaguchi H, et al. Structure of the Tfb1/p53 complex: insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIF and the activation domain of p53. *Mol Cell* 2006;22:731–40.
31. Strebovsky J, Walker P, Lang R, Dalpke AH. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. *FASEB J* 2011;25:863–74.
32. Saint-Germain E, Mignacca L, Vernier M, Bobbala D, Ilangumaran S, Ferbeyre G. SOCS1 regulates senescence and ferroptosis by modulating the expression of p53 target genes. *Aging* 2017;9:2137–62.
33. DeSepulveda P, Okkenhaug K, Rose JL, Hawley RG, Dubreuil P, Rottapel R. Soes1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *EMBO J* 1999;18:904–15.
34. Giordanetto F, Kroemer RT. A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). *Protein Eng* 2003;16:115–24.
35. Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Morita Y, Saito H, Kajita T, et al. Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13130–4.
36. Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999;18:1309–20.
37. Hildebrand DG, Lehle S, Borst A, Haferkamp S, Essmann F, Schulze-Osthoff K. alpha-Fucosidase as a novel convenient biomarker for cellular senescence. *Cell Cycle* 2013;12:1922–7.
38. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 2006;8:877–84.
39. Dos Santos C, McDonald T, Ho YW, Liu H, Lin A, Forman SJ, et al. The Src and c-Kit kinase inhibitor dasatinib enhances p53-mediated targeting of human acute myeloid leukemia stem cells by chemotherapeutic agents. *Blood* 2013;122:1900–13.
40. Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB, Soderqvist M, Segerback D, Bergman J, et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell* 2009;15:376–88.
41. Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: from discovery to therapy. *Cancer Discov* 2016;6:353–67.
42. Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:587–95.
43. Kong X, Feng D, Wang H, Hong F, Bertola A, Wang FS, et al. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2012;56:1150–9.
44. Babon JJ, McManus EJ, Yao S, DeSouza DP, Mielke LA, Sprigg NS, et al. The structure of SOCS3 reveals the basis of the extended SH2 domain function and identifies an unstructured insertion that regulates stability. *Mol Cell* 2006;22:205–16.
45. Qiu X, Guo G, Chen K, Kashiwada M, Druker BJ, Rothman PB, et al. A requirement for SOCS-1 and SOCS-3 phosphorylation in Bcr-Abl-induced tumorigenesis. *Neoplasia* 2012;14:547–58.
46. Huang Y, Wang J, Cao F, Jiang H, Li A, Li J, et al. SHP2 associates with nuclear localization of STAT3: significance in progression and prognosis of colorectal cancer. *Sci Rep* 2017;7:17597.
47. Ke J, Chelvarajan RL, Sindhava V, Robertson DA, Lekakis L, Jennings CD, et al. Anomalous constitutive Src kinase activity promotes B lymphoma survival and growth. *Mol Cancer* 2009;8:132.

Bibliographie

1. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51.
2. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):21-37.
3. Yin S, Yu Y, Reed R. Primary microRNA processing is functionally coupled to RNAP II transcription in vitro. *Scientific Reports*. 2015;5:11992.
4. Fang W BD. The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes. *Mol Cell*. 2015;60(1):131-45.
5. Han J LY, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125(5):887-901.
6. Morlando M, Ballarino M, Gromak N, Pagano F, Bozzoni I, Proudfoot NJ. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2008;15(9):902-9.
7. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, et al. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell*. 2010;39(2):292-9.
8. Kawamata T, Tomari Y. Making RISC. *Trends Biochem Sci*. 2010;35(7):368-76.
9. Anastasia Khvorova AR, Sumedha D Jayasena. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*. 2003;115(2):209-16.
10. Dianne S Schwarz GH, Tingting Du, Zuoshang Xu, Neil Aronin, Phillip D Zamore. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.
11. Bartel DP, CZ. C. Micromanagers of gene expression- the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004;5(5):396-400.
12. Ambros V, Lee, RC., Lavanway, A., Williams, PT., Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2003;13(10):807-18.
13. Westholm JOaL, E.C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*. 2011;93(11):1897-904.
14. Yu S, & Kim, V. N. . A tale of non-canonical tails: gene regulation by post-transcriptional RNA tailing
. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(9):542-56.
15. Yu F PK, Neilsen CT, Toubia J, Lawrence DM, Tsykin A, Gantier MP, Callen DF, Goodall G, Bracken CP. Naturally existing isoforms of miR-222 have distinct functions. *Nucleic Acids Res*. 2017;24(19):11371-85.
16. Newman MA TJ, Hammond SM. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA*. 2008;14(8):1539-49.
17. Viswanathan SR DG, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008;320(5872):97-100.
18. Michlewski G GS, Semple CA, Cáceres JF. Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell*. 2008;32(3):383-93.
19. Yang W CT, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, Nishikura K. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(1):13-21.

20. Kawahara Y ZB, Chendrimada TP, Shiekhatar R, Nishikura K. RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO Rep.* 2007;8(8):763-9.
21. Wu K HJ, Pu W, Peng Y. The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2018;16(2):120-6.
22. Diederichs S JS, Rothenberg SM, Smolen GA, Mlody BG, Haber DA. Coexpression of Argonaute-2 enhances RNA interference toward perfect match binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(27):9284-9.
23. Grimm D SK, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature.* 2006;441(7092):537-41.
24. Ha M KV. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(8):509-24.
25. Tang X, Zhang, Y., Tucker, L., & Ramratnam, B. Phosphorylation of the RNase III enzyme Drosha at Serine300 or Serine302 is required for its nuclear localization. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(19):6610-9.
26. Tang X, Li, M., Tucker, L., & Ramratnam, B. Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) phosphorylates the RNAase III enzyme Drosha at S300 and S302. *Plos One.* 2011;6(6):e20391.
27. Wada T, Kikuchi, J., & Furukawa, Y. Histone deacetylase 1 enhances microRNA processing via deacetylation of DGCR8. *EMBO Rep.* 2012;13(2):142-9.
28. Suzuki HI YK, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature.* 2009;460(7254):529-33.
29. Feng Z ZC, Wu R, Hu W. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *J Mol Cell Biol.* 2011;3(1):44-50.
30. Katoh T, Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T., & Suzuki, T. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev.* 2009;23(4):433-8.
31. Boele J, Persson, H., Shin, J. W., Ishizu, Y., Newie, I. S., Søkilde, R., Hawkins, S. M., Coarfa, C., Ikeda, K., Takayama, K., Horie-Inoue, K., Ando, Y., Burroughs, A. M., Sasaki, C., Suzuki, C., Sakai, M., Aoki, S., Ogawa, A., Hasegawa, A., Lizio, M., Kaida, K., Teusink, B., Carninci, P., Suzuki, H., Inoue, S., Gunaratne, P. H., Rovira, C., Hayashizaki, Y., de Hoon, M. J. PAPP5-mediated 3' adenylation and subsequent degradation of miR-21 is disrupted in proliferative disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(31):11467-72.
32. Jones MR, Quinton, L. J., Blahna, M. T., Neilson, J. R., Fu, S., Ivanov, A. R., Wolf, D. A., & Mizgerd, J. P. Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nat Cell Biol.* 2009;11(9):1157-63.
33. Winter J, & Diederichs, S. Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biol.* 2011;8(6):1149-57.
34. Stefan L Ameres MDH, Jui-Hung Hung, Jia Xu, Megha Ghildiyal, Zhiping Weng, Phillip D Zamore. Target RNA-directed Trimming and Tailing of Small Silencing RNAs. *Science.* 2010;328(5985):1534-9.
35. Kleaveland B, Shi, C. Y., Stefano, J., & Bartel, D. P. A Network of Noncoding Regulatory RNAs Acts in the Mammalian Brain. *Cell.* 2018;174(2):350-62.
36. Bitetti A, Mallory, A. C., Golini, E., Carrieri, C., Carreño Gutiérrez, H., Perlas, E., Pérez-Rico, Y. A., Tocchini-Valentini, G. P., Enright, A. J., Norton, W., Mandillo, S., O'Carroll, D., &

- Shkumatava, A. MicroRNA degradation by a conserved target RNA regulates animal behavior. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(3):244-51.
37. Cazalla D, Yario, T., & Steitz, J. A. Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. *Science.* 2010;328(5985):1563-6.
 38. Guo YE, Riley, K. J., Iwasaki, A., & Steitz, J. A. Alternative capture of noncoding RNAs or protein-coding genes by herpesviruses to alter host T cell function. *Mol Cell.* 2014;54(1):67-79.
 39. Fuchs Wightman F, Giono, L. E., Fededa, J. P., & de la Mata, M. Target RNAs Strike Back on MicroRNAs. *Front Genet.* 2018;9:435.
 40. EC L. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet.* 2002;30(4):363-4.
 41. DP B. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(215-33).
 42. Schirle NT S-GJ, MacRae IJ. Structural basis for microRNA targeting. *Science.* 2014;346(6209):608-13.
 43. Schirle NT S-GJ, Chandradoss SD, Joo C, MacRae IJ. Water-mediated recognition of t1-adenosine anchors Argonaute2 to microRNA targets. *Elife.* 2015;4:e07646.
 44. Sheu-Gruttadauria J, Xiao, Y., Gebert, LF. and MacRae, IJ. Beyond the seed: structural basis for supplementary microRNA targeting by human Argonaute2. *The EMBO Journal.* 2019;38:e101153.
 45. Grimson A FK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 2007;27(1):91-105.
 46. Agarwal V BG, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015;4:e05005.
 47. Brennecke J SA, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005;3(3):e85.
 48. Broughton JP LM, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell.* 2016;64(2):320-33.
 49. Yan Y, Acevedo, M., Mignacca, L., Desjardins, P., Scott, N., Imane, R., Quenneville, J., Robitaille, J., Feghaly, A., Gagnon, E., Ferbeyre, G., & Major, F. The sequence features that define efficient and specific hAGO2-dependent miRNA silencing guides. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(16):8181-96.
 50. Shin C NJ, Farh KK, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell.* 2010;38(6):789-802.
 51. Quévillon Huberdeau M, Zeitler, D. M., Hauptmann, J., Bruckmann, A., Fressigné, L., Danner, J., Piquet, S., Strieder, N., Engelmann, J. C., Jannot, G., Deutzmann, R., Simard, M. J., & Meister, G. . Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for microRNA-guided gene silencing in vivo. *EMBO J.* 2017;36(14):2088-106.
 52. Golden RJ, Chen, B., Li, T., Braun, J., Manjunath, H., Chen, X., Wu, J., Schmid, V., Chang, T. C., Kopp, F., Ramirez-Martinez, A., Tagliabracci, V. S., Chen, Z. J., Xie, Y., & Mendell, J. T. . An Argonaute phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature.* 2017;542(7640):197-202.
 53. Jonas S IE. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.* 2015;16(7):421-33.
 54. Eichhorn SW GH, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, Hsu SH, Ghoshal K, Villén J, Bartel DP. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell.* 2014;56(1):104-15.

55. Guo H IN, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-40.
56. Yekta S SI, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 2004;304(5670):594-6.
57. Hansen TB JT, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*. 2013;495(7441):384-8.
58. Dallaire A, Frédérick, P. M., & Simard, M. J. Somatic and Germline MicroRNAs Form Distinct Silencing Complexes to Regulate Their Target mRNAs Differently. *Dev Cell*. 2018;47(2):239-47.
59. Chen L, Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. . Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017;9(6):7204-18.
60. Gupta SC, Kunnumakkara, A. B., Aggarwal, S., & Aggarwal, B. B. Inflammation, a Double-Edge Sword for Cancer and Other Age-Related Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:2160.
61. Torang A, Gupta, P., & Klinke, D. J., 2nd. An elastic-net logistic regression approach to generate classifiers and gene signatures for types of immune cells and T helper cell subsets. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(1):433.
62. Chandan K, Gupta, M., & Sarwat, M. Role of Host and Pathogen-Derived MicroRNAs in Immune Regulation During Infectious and Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2020;10:3081.
63. Nejad C, Stunden, H. J., & Gantier, M. P. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J*. 2018;285(20):3695-716.
64. Gorgoulis V, Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., ... Demaria, M. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019;179(4):813-27.
65. Hayflick L, Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961;25:585–621.
66. Nicolás Herranz JG. Mechanisms and Functions of Cellular Senescence. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1238-46.
67. Deursen JMv. The Role of Senescent Cells in Ageing. *Nature*. 2014;509(7501):439-46.
68. De Cecco M, Ito, T., Petrashen, A. P., Elias, A. E., Skvir, N. J., Criscione, S. W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E. M., Boeke, J. D., Le, O., Beauséjour, C., Ambati, J., Ambati, K., Simon, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., Slagboom, P. E., Helfand, S. L., Neretti, N., ... Sedivy, J. M. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*. 2019;566(7742):73-8.
69. Spallarossa P, Altieri, P., Aloï, C., Garibaldi, S., Barisione, C., Ghigliotti, G., Fugazza, G., Barsotti, A., & Brunelli, C. Doxorubicin induces senescence or apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes by regulating the expression levels of the telomere binding factors 1 and 2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(6):H2169-81.
70. Childs BG, Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*. 2014;15(11):1139-53.
71. Mijit M, Caracciolo, V., Melillo, A., Amicarelli, F., & Giordano, A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*. 2020;10(3):420.
72. Zhang Y, Gao, Y., Zhang, G., Huang, S., Dong, Z., Kong, C., Su, D., Du, J., Zhu, S., Liang, Q., Zhang, J., Lu, J., & Huang, B. DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells. *Int J Cancer*. 2011;128(3):551-61.

73. Aliouat-Denis CM, Dendouga, N., Van den Wyngaert, I., Goehlmann, H., Steller, U., van de Weyer, I., Van Slycken, N., Andries, L., Kass, S., Luyten, W., Janicot, M., & Vialard, J. p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res.* 2005;3(11):627-34.
74. Childs BG, Durik, M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424-35.
75. Rodier F, Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., & Campisi, J. . Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 2009;11(8):973-9.
76. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P., & Ferbeyre, G. The Senescence-Associated Secretory Phenotype and Its Regulation. *Cytokine.* 2019;117:15-22.
77. Freund A, Patil, C. K., & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 2011;30(8):1536-48.
78. Glück S, Guey, B., Gulen, M. F., Wolter, K., Kang, T. W., Schmacke, N. A., Bridgeman, A., Rehwinkel, J., Zender, L., & Ablasser, A. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol.* 2017;19(9):1061-70.
79. Dou Z, Ghosh, K., Vizioli, M. G., Zhu, J., Sen, P., Wangensteen, K. J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z., Capell, B. C., Xu, C., Xu, M., Kieckhafer, J. E., Jiang, T., Shoshkes-Carmel, M., Tanim, K., Barber, G. N., Seykora, J. T., Millar, S. E., ... Berger, S. L. Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature.* 2017;550(7676):402-6.
80. Faget DV, Ren, Q., & Stewart, S. A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(8):439-53.
81. Coppé JP, Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853-68.
82. Mallette FA, Calabrese, V., Ilangumaran, S., & Ferbeyre, G. . SOCS1, a novel interaction partner of p53 controlling oncogene-induced senescence. *Aging.* 2010;2(7):445-52.
83. Calabrese V, Mallette FA, Deschenes-Simard X, Ramanathan S, Gagnon J, Moores A, et al. SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell.* 2009;36(5):754-67.
84. Saint-Germain E, Mignacca, L., Huot, G., Acevedo, M., Moineau-Vallée, K., Calabrese, V., Bourdeau, V., Rowell, M. C., Ilangumaran, S., Lessard, F., & Ferbeyre, G. Phosphorylation of SOCS1 Inhibits the SOCS1-p53 Tumor Suppressor Axis. *Cancer Res.* 2019;79(13):3306-19.
85. Ryo A, Suizu, F., Yoshida, Y., Perrem, K., Liou, Y. C., Wulf, G., Rottapel, R., Yamaoka, S., & Lu, K. P. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell.* 2003;12(6):1413-26.
86. Strebovsky J, Walker, P., Lang, R., & Dalpke, A. H. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) limits NFkappaB signaling by decreasing p65 stability within the cell nucleus. *FASEB J.* 2011;25(3):863-74.
87. Saint-Germain E, Mignacca, L., Vernier, M., Bobbala, D., Ilangumaran, S., & Ferbeyre, G. SOCS1 regulates senescence and ferroptosis by modulating the expression of p53 target genes. *Aging.* 2017;9(10):2137-62.
88. Munk R, Panda, A. C., Grammatikakis, I., Gorospe, M., & Abdelmohsen, K. . Senescence-Associated MicroRNAs. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2017;334:177-205.

89. Tam W B-YD, Hayward WS. *bic*, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol Cell Biol.* 1997;17(3):1490-502.
90. Eis PS TW, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(10):3627-32.
91. Rodriguez A VE, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of *bic*/microRNA-155 for normal immune function. *Science.* 2007;316(5824):608-11.
92. Tili E MJ, Cimino A, Costinean S, Dumitru CD, Adair B, Fabbri M, Alder H, Liu CG, Calin GA, Croce CM. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol.* 2007;179(8):5082-9.
93. Curtale G, Rubino, M., & Locati, M. MicroRNAs as Molecular Switches in Macrophage Activation. *Front Immunol.* 2019;10:799.
94. Michaille JJ AH, Fortman EC, Efanov AA, Tili E. miR-155 expression in antitumor immunity: The higher the better? *Genes Chromosomes Cancer.* 2019;58(4):208-18.
95. Sylvia T Cheung EYS, David Chang, Andrew Ming-Lum, Alice L-F Mui. Interleukin-10 Inhibits Lipopolysaccharide Induced miR-155 Precursor Stability and Maturation. *PLoS One.* 2013;8(8):e71336.
96. Metzler M WM, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;39(2):167-9.
97. Bayraktar R VRK. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics. *Cancer Metastasis Rev.* 2018;37(1):33-44.
98. Iorio MV FM, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(16):7065-70.
99. Narayan N ML, Phipson B, Willis SN, Brumatti G, Eggers S, Lalaoui N, Brown LM, Kosasih HJ, Bartolo RC, Zhou L, Catchpole D, Saffery R, Oshlack A, Goodall GJ, Ekert PG. Functionally distinct roles for different miR-155 expression levels through contrasting effects on gene expression, in acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* 2017;31(4):808-20.
100. Tili E CM, Palmieri D, Brown M, Cui R, Fernandes C, Richmond T, Kim T, Sheetz T, Sun HL, Lagana A, Veneziano D, Volinia S, Rassenti L, Kipps T, Awad H, Michaille JJ, Croce CM. Quaking and miR-155 interactions in inflammation and leukemogenesis. *Oncotarget.* 2015;6(28):24599-610.
101. Chen S WL, Fan J, Ye C, Dominguez D, Zhang Y, Curiel TJ, Fang D, Kuzel TM, Zhang B. Host miR155 promotes tumor growth through a myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2015;75(3):519-31.
102. Testa U PE, Castelli G, Labbaye C. miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Noncoding RNA.* 2017;3(3):E22.
103. Diana Gulei LR, Elisabetta Broseghini, Manuela Ferracin, Ioana Berindan-Neagoe. The Extensive Role of miR-155 in Malignant and Non-Malignant Diseases. *Mol Aspects Med.* 2019;70:33-56.

104. Mikamori M YD, Eguchi H, Hasegawa S, Kishimoto T, Tomimaru Y, Asaoka T, Noda T, Wada H, Kawamoto K, Gotoh K, Takeda Y, Tanemura M, Mori M, Doki Y. MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2017;7:42339.
105. Santos JC LN, Sarian LO, Matheu A, Ribeiro ML, Derchain SFM. Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer. *Sci Rep.* 2018;8(1):829.
106. Li B JX, Meng H, Hu B, Zhang T, Yu J, Chen S, Guo X, Wang W, Jiang W, Wang J. Morin promotes prostate cancer cells chemosensitivity to paclitaxel through miR-155/GATA3 axis. *Oncotarget.* 2017;8(29):47849-60.
107. Seto AG BX, Lynch JM, Hermreck M, Tetzlaff M, Duvic M, Jackson AL. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2018;183(3):428-44.
108. Mogilyansky E RI. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ.* 2013;20(12):1603-14.
109. Sylvestre Y DGV, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem.* 2007;282(4):2135-43.
110. Chaulk SG XZ, Glover MJ, Fahlman RP. MicroRNA miR-92a-1 biogenesis and mRNA targeting is modulated by a tertiary contact within the miR-17~92 microRNA cluster. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(8):5234-44.
111. Chakraborty S MS, Patwardhan A, Krishnan Y. Pri-miR-17-92a transcript folds into a tertiary structure and autoregulates its processing. *RNA.* 2012;18(5):1014-28.
112. Ventura A YA, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkland SJ, Newman J, Bronson RT, Crowley D, Stone JR, Jaenisch R, Sharp PA, Jacks T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell.* 2008;32(5):875-86.
113. Xiaodan Bai SH, Junping Zhang, Shixin Xu The MicroRNA Family Both in Normal Development and in Different Diseases: The miR-17-92 Cluster. *Biomed Res Int.* 2019;2019:9450240.
114. de Pontual L YE, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S, Van Haeringen A, Geneviève D, Goldenberg A, Oufadem M, Manouvrier S, Munnich A, Vidigal JA, Vekemans M, Lyonnet S, Henrion-Caude A, Ventura A, Amiel J. Germline deletion of the miR-17~92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. *Nat Genet.* 2011;43(10):1026-30.
115. Mu P HY, Betel D, Yao E, Squatrito M, Ogradowski P, de Stanchina E, D'Andrea A, Sander C, Ventura A. Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev.* 2009;23(24):2806-11.
116. Olive V BM, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* 2009;23(24):2839-49.
117. Dews M, Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E., Furth, E. E., Lee, W. M., Enders, G. H., Mendell, J. T., & Thomas-Tikhonenko, A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet.* 2006;38(9):1060-5.
118. Olive V SE, Bennett MJ, De Jong CS, Biton A, McGann JC, Greaney SK, Sodikin NM, Zhou AY, Balakrishnan A, Foth M, Luftig MA, Goga A, Speed TP, Xuan Z, Evan GI, Wan Y, Minella AC, He L. A component of the mir-17-92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis. *Elife.* 2013;2:e00822.

119. Hossain A KM, Saunders GF. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol.* 2006;26(21):8191-201.
120. Fan MQ HC, Gu Y, Xiao Y, Sheng JX, Zhong L. Decrease expression of microRNA-20a promotes cancer cell proliferation and predicts poor survival of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2013;32(1):21.
121. Lagos-Quintana M RR, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002;12(9):735-39.
122. Taganov KD BM, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(33):12481-6.
123. Paterson MR KA. MiR-146a/b: a family with shared seeds and different roots. *Physiol Genomics.* 2017;49(4):243-52.
124. Kutty RK NC, Samuel W, Vijayasathy C, Jaworski C, Duncan T, Cameron JE, Flemington EK, Hooks JJ, Redmond TM. Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human retinal pigment epithelial cells by interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and interferon- γ . *Mol Vis.* 2013;19:737-50.
125. Lu LF BM, Chaudhry A, Lin LL, Taganov KD, Hanada T, Yoshimura A, Baltimore D, Rudensky AY. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell.* 2010;142(6):914-29.
126. Xia Y SS, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(9):823-30.
127. Bhaumik D SG, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene.* 2008;27(42):5643-7.
128. Zhong L, Huot, J., & Simard, M. J. . p38 activation induces production of miR-146a and miR-31 to repress E-selectin expression and inhibit transendothelial migration of colon cancer cells. *Sci rep.* 2018;8(1):2334.
129. Starczynowski DT KF, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, Hirst M, Hogge D, Marra M, Wells RA, Buckstein R, Lam W, Humphries RK, Karsan A. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q- syndrome phenotype. *Nat Med.* 2010;16(1):49-58.
130. Sun G YJ, Noltner K, Feng J, Li H, Sarkis DA, Sommer SS, Rossi JJ. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA.* 2009;15(9):1640-51.
131. Xiong XD CM, Cai XP, Cheng J, Jing X, Cen JM, Liu X, Yang XL, Suh Y. A common variant in pre-miR-146 is associated with coronary artery disease risk and its mature miRNA expression. *Mutat Res.* 2014;761:15-20.
132. Jazdzewski K ME, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(20):7269-74.
133. Ibrahim W SB, Obaya E, Ghonem H. MicroRNA-146a expression and microRNA-146a rs2910164 polymorphism in Behcet's disease patients. *Clin Rheumatol.* 2019;38(2):397-402.
134. Jazdzewski K, Liyanarachchi, S., Swierniak, M., Pachucki, J., Ringel, M. D., Jarzab, B., & de la Chapelle, A. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(5):1502-5.
135. Zhang Z ZY, Sun XX, Ma X, Chen ZN. microRNA-146a inhibits cancer metastasis by downregulating VEGF through dual pathways in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer.* 2015;14:5.

136. Wang X GH, Ren L, Gu J, Zhang Y, Zhang Y. Demethylation of the miR-146a promoter by 5-Aza-2'-deoxycytidine correlates with delayed progression of castration-resistant prostate cancer. *BMC Cancer*. 2014;14:308.
137. Liu HT FL, Cheng YX, Sun Q. LncRNA PVT1 regulates prostate cancer cell growth by inducing the methylation of miR-146a. *Cancer Med*. 2016;5(12):3512-19.
138. Gao J WD, Liu D, Liu M, Ge Y, Jiang M, Liu Y, Zheng D. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces the expression of proinflammatory cytokines in macrophages and re-educates tumor-associated macrophages to an antitumor phenotype. *Mol Biol Cell* 2015;26(18):3178-89.
139. Huang Y TT, Liu C, Guan H, Zhang G, Ling Z, Zhang L, Lu K, Chen S, Xu B, Chen M. Upregulation of miR-146a by YY1 depletion correlates with delayed progression of prostate cancer. *Int j Oncol*. 2017;50(2):421-31.
140. Zhou YX ZW, Mao LW, Wang YL, Xia LQ, Cao M, Shen J, Chen J. Long non-coding RNA NIFK-AS1 inhibits M2 polarization of macrophages in endometrial cancer through targeting miR-146a. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;104:25-33.
141. Han W DX, Liu M, Wang J, Sun L, Li Y. Increased expression of long non-coding RNA SNHG16 correlates with tumor progression and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Int J Biol Macromol*. 2019;121(270-8).
142. Leonardo Salmena LP, Yvonne Tay, Lev Kats, Pier Paolo Pandolfi. A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell*. 2011;146(3):353-8.
143. Denzler R AV, Stefano J, Bartel DP, Stoffel M. Assessing the ceRNA hypothesis with quantitative measurements of miRNA and target abundance. *Mol Cell*. 2014;54(5):766-76.
144. Denzler R MS, Title AC, Agarwal V, Bartel DP, Stoffel M. Impact of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression. *Mol Cell*. 2016;64(3):565-79.
145. Bosson AD ZJ, Sharp PA. Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Mol Cell*. 2014;56(3):347-59.
146. Ebert MS NJ, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007;4(9):721-6.
147. Huang J ZL, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*. 2010;28(2):357-64.
148. Alessandra Carè DC, Federica Felicetti, Désirée Bonci, Antonio Addario, Paolo Gallo, Marie-Louise Bang, Patrizia Segnalini, Yusu Gu, Nancy D Dalton, Leonardo Elia, Michael V G Latronico, Morten Høydal, Camillo Autore, Matteo A Russo, Gerald W Dorn 2nd, Oyvind Ellingsen, Pilar Ruiz-Lozano, Kirk L Peterson, Carlo M Croce, Cesare Peschle, Gianluigi Condorelli. MicroRNA-133 Controls Cardiac Hypertrophy. *Nat Med*. 2007;13(5):613-8.
149. Karreth FA RM, Ruocco A, Ng C, Chapuy B, Léopold V, Sjoberg M, Keane TM, Verma A, Ala U, Tay Y, Wu D, Seitzer N, Velasco-Herrera Mdel C, Bothmer A, Fung J, Langellotto F, Rodig SJ, Elemento O, Shipp MA, Adams DJ, Chiarle R, Pandolfi PP. The BRAF pseudogene functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma in vivo. *Cell*. 2015;161(2):319-32.
150. Laura Poliseno LS, Jiangwen Zhang, Brett Carver, William J Haveman, Pier Paolo Pandolfi. A Coding-Independent Function of Gene and Pseudogene mRNAs Regulates Tumour Biology. *Nature*. 2010;465(7301):1033-8.
151. Ling-Ling Chen LY. Regulation of circRNA Biogenesis. *RNA Biol*. 2015;12(4):381-8.

152. Sivakumar Sambandan GA, Lisa Kochen, Jennifer Rinne, Josefine Kahlstatt, Caspar Glock, Georgi Tushev, Beatriz Alvarez-Castelao, Alexander Heckel, Erin M Schuman. Activity-dependent Spatially Localized miRNA Maturation in Neuronal Dendrites. *Science*. 2017;355(6325):634-7.
153. Omar Flores EMK, Rebecca L Skalsky, Bryan R Cullen. Differential RISC Association of Endogenous Human microRNAs Predicts Their Inhibitory Potential. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(7):4629-39.
154. Gavriel Mullokandov AB, Albert Ruzo, Anitha D Jayaprakash, Navpreet Tung, Benjamin Israelow, Matthew J Evans, Ravi Sachidanandam, Brian D Brown. High-throughput Assessment of microRNA Activity and Function Using microRNA Sensor and Decoy Libraries. *Nat Methods*. 2012;9(8):840-6.
155. Stanley D Chandradoss NTS, Malwina Szczepaniak, Ian J MacRae, Chirlmin Joo. A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting. *Cell*. 2015;162(1):96-107.
156. Stanislas Werfel SL, Benjamin Ruprecht, Bernhard Kuster, Stefan Engelhardt. Preferential microRNA Targeting Revealed by in Vivo Competitive Binding and Differential Argonaute Immunoprecipitation. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(17):10218-28.
157. Jeffrey J Quinn HYC. Unique Features of Long Non-Coding RNA Biogenesis and Function. *Nat Rev Genet*. 2016;17(1):47-62.
158. Florian Kopp JTM. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*. 2018;172(3):393-407.
159. Jasdeep Kaur Dhanoa RSS, Ramneek Verma, Jaspreet Singh Arora, Chandra Sekhar Mukhopadhyay. Long Non-Coding RNA: Its Evolutionary Relics and Biological Implications in Mammals: A Review. *J Anim Sci Technol*. 2018;60:25.
160. Joana Carlevaro-Fita RJ. Global Positioning System: Understanding Long Noncoding RNAs Through Subcellular Localization. *Mol Cell*. 2019;73(5):869-83.
161. Run-Wen Yao YW, Ling-Ling Chen. Cellular Functions of Long Noncoding RNAs. *Nat Cell Biol*. 2019;21(5):542-51.
162. M. S. Diverging RNPs: Toward Understanding lncRNA-Protein Interactions and Functions. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1203:285-312.
163. Colleen A McHugh C-KC, Amy Chow, Christine F Surka, Christina Tran, Patrick McDonel, Amy Pandya-Jones, Mario Blanco, Christina Burghard, Annie Moradian, Michael J Sweredoski, Alexander A Shishkin, Julia Su, Eric S Lander, Sonja Hess, Kathrin Plath, Mitchell Guttman. The Xist lncRNA Interacts Directly With SHARP to Silence Transcription Through HDAC3. *Nature*. 2015;521(7551):232-6.
164. Paulina A Latos FMP, Martha V Koerner, H Başak Şenergin, Quanah J Hudson, Roman R Stocsits, Wolfgang Allhoff, Stefan H Stricker, Ruth M Klement, Katarzyna E Warczok, Karin Aumayr, Pawel Pasierbek, Denise P Barlow. Airn Transcriptional Overlap, but Not Its lncRNA Products, Induces Imprinted Igf2r Silencing. *Science*. 2012;338(6113):1469-72.
165. Maite Huarte MG, David Feldser, Manuel Garber, Magdalena J Koziol, Daniela Kenzelmann-Broz, Ahmad M Khalil, Or Zuk, Ido Amit, Michal Rabani, Laura D Attardi, Aviv Regev, Eric S Lander, Tyler Jacks, John L Rinn. A Large Intergenic Noncoding RNA Induced by p53 Mediates Global Gene Repression in the p53 Response. *Cell*. 2010;142(3):409-19.
166. Nadya Dimitrova JRZ, Robyn M Jong, Dylan Soukup, Rebecca Resnick, Kavitha Sarma, Amanda J Ward, Arjun Raj, Jeannie T Lee, Phillip A Sharp, Tyler Jacks. LincRNA-p21 Activates p21 in Cis to Promote Polycomb Target Gene Expression and to Enforce the G1/S Checkpoint. *Mol Cell*. 2014;54(5):777-90.

167. Groff AF, Sanchez-Gomez, D. B., Soruco, M., Gerhardinger, C., Barutcu, A. R., Li, E., Elcavage, L., Plana, O., Sanchez, L. V., Lee, J. C., Sauvageau, M., & Rinn, J. L. In Vivo Characterization of Linc-p21 Reveals Functional cis-Regulatory DNA Elements. *Cell Rep.* 2016;16(8):2178-86.
168. Maninjay K Atianand WH, Ansuman T Satpathy, Ying Shen, Emiliano P Ricci, Juan R Alvarez-Dominguez, Ankit Bhatta, Stefan A Schattgen, Jason D McGowan, Juliana Blin, Joerg E Braun, Pallavi Gandhi, Melissa J Moore, Howard Y Chang, Harvey F Lodish, Daniel R Caffrey, Katherine A Fitzgerald. A Long Noncoding RNA lincRNA-EPS Acts as a Transcriptional Brake to Restrain Inflammation. *Cell.* 2016;165(7):1672-85.
169. Yu-Hang Xing R-WY, Yang Zhang, Chun-Jie Guo, Shan Jiang, Guang Xu, Rui Dong, Li Yang, Ling-Ling Chen. SLERT Regulates DDX21 Rings Associated With Pol I Transcription. *Cell.* 2017;169(4):664-78.
170. Christine M Clemson JNH, Sergio A Sara, Alexander W Ensminger, Archa H Fox, Andrew Chess, Jeanne B Lawrence. An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA: NEAT1 RNA Is Essential for the Structure of Paraspeckles. *Mol Cell.* 2009;33(6):717-26.
171. Yasnory T F Sasaki TI, Miho Sano, Toutai Mituyama, Tetsuro Hirose. MENepsilon/beta Noncoding RNAs Are Essential for Structural Integrity of Nuclear Paraspeckles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(8):2525-30.
172. Archa H Fox SN, Tetsuro Hirose, Charles S Bond. Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. *Trends Biochem Sci.* 2018;43(2):124-35.
173. Yizhu Lin BFS, Marcel P Bruchez, C Joel McManus. Structural Analyses of NEAT1 lncRNAs Suggest Long-Range RNA Interactions That May Contribute to Paraspeckle Architecture. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(7):3742-52.
174. Sungyul Lee FK, Tsung-Cheng Chang, Anupama Sataluri, Beibei Chen, Sushama Sivakumar, Hongtao Yu, Yang Xie, Joshua T Mendell. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell.* 2016;164(1-2):69-80.
175. Marcella Cesana DC, Ivano Legnini, Tiziana Santini, Olga Sthandier, Mauro Chinappi, Anna Tramontano, Irene Bozzoni. A Long Noncoding RNA Controls Muscle Differentiation by Functioning as a Competing Endogenous RNA. *Cell.* 2011;147(2):358-69.
176. Yue Wang I ZX, Junfeng Jiang, Chen Xu, Jiuhong Kang, Lei Xiao, Minjuan Wu, Jun Xiong, Xiaocan Guo, Houqi Liu. Endogenous miRNA Sponge lincRNA-RoR Regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Dev Cell.* 2013;25(1):69-80.
177. Mohammad Ali Faghihi MZ, Jia Huang, Farzaneh Modarresi, Marcel P Van der Brug, Michael A Nalls, Mark R Cookson, Georges St-Laurent 3rd, Claes Wahlestedt. Evidence for Natural Antisense Transcript-Mediated Inhibition of microRNA Function. *Genome Biol.* 2010;11(5):R56.
178. Jing Li CL. Coding or Noncoding, the Converging Concepts of RNAs. *Front Genet.* 2019;10:496.
179. Fouzia Yeasmin TY, Nobuyoshi Akimitsu. Micropeptides Encoded in Transcripts Previously Identified as Long Noncoding RNAs: A New Chapter in Transcriptomics and Proteomics. *Front Genet.* 2018;9:144.
180. Akinobu Matsumoto AP, Masaki Matsumoto, Riu Yamashita, Jacqueline Fung, Emanuele Monteleone, Alan Saghatelian, Keiichi I Nakayama, John G Clohessy, Pier Paolo Pandolfi. mTORC1 and Muscle Regeneration Are Regulated by the LINC00961-encoded SPAR Polypeptide. *Nature.* 2017;541(7636):228-32.

181. Nadia G D'Lima JM, Lauren Winkler, Qian Chu, Ken H Loh, Elizabeth O Corpuz, Bogdan A Budnik, Jens Lykke-Andersen, Alan Saghatelian, Sarah A Slavoff. A Human Microprotein That Interacts With the mRNA Decapping Complex. *Nat Chem Biol.* 2017;13(2):174-80.
182. Puvvula PK. LncRNAs Regulatory Networks in Cellular Senescence. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):2615.
183. Ferbeyre G, & Moriggl, R. The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1815(1):104-14.
184. Mignacca L, Saint-Germain E, Benoit A, Bourdeau V, Moro A, Ferbeyre G. Sponges against miR-19 and miR-155 reactivate the p53-Socs1 axis in hematopoietic cancers. *Cytokine.* 2016;82:80-6.
185. Di Micco R, Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P. G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P. G., & d'Adda di Fagagna, F. . Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 2006;444(7119):638-42.
186. Bartkova J, Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L. V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., Takaoka, M., Nakagawa, H., Tort, F., Fugger, K., Johansson, F., Sehested, M., Andersen, C. L., Dyrskjot, L., Ørntoft, T., Lukas, J., ... Gorgoulis, V. G. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 2006;444(7119):633-7.
187. A. VER. Aberrant cytokine signaling in leukemia. *Oncogene.* 2007;26(47):6738-49.
188. G. F. Aberrant signaling and senescence associated protein degradation. *Exp Gerontol.* 2018;107:50-4.
189. Stebegg M, Kumar, S. D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V. R., Linterman, M. A., & Graca, L. Regulation of the Germinal Center Response. *Front Immunol.* 2018;9:2469.
190. Xu Z, Zan, H., Pone, E. J., Mai, T., & Casali, P. . Immunoglobulin class switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(7):517-31.
191. Zan H, & Casali, P. Regulation of Aicda expression and AID activity. *Autoimmunity.* 2013;46(2):83-101.
192. Van Roosbroeck K FF, Setoyama T, Ivan C, Rodriguez-Aguayo C, Fuentes-Mattei E, Xiao L, Vannini I, Redis RS, D'Abundo L, Zhang X, Nicoloso MS, Rossi S, Gonzalez-Villasana V, Rupaimoole R, Ferracin M, Morabito F1, Neri A, Ruvolo PP, Ruvolo VR, Pecot CV, Amadori D, Abruzzo L, Calin S, Wang X, You MJ, Ferrajoli A, Orłowski R, Plunkett W, Lichtenberg TM, Davuluri RV, Berindan-Neagoe I, Negrini M, Wistuba II, Kantarjian HM1, Sood AK, Lopez-Berestein G, Keating MJ, Fabbri M, Calin GA. Combining Anti-Mir-155 with Chemotherapy for the Treatment of Lung Cancers. *Clin Cancer Res.* 2017;23(11):2891-904.
193. Huffaker TB, Hu, R., Runtsch, M. C., Bake, E., Chen, X., Zhao, J., Round, J. L., Baltimore, D., & O'Connell, R. M. . Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity. *Cell Rep.* 2012;2(6):1697-709.
194. Ebert MS, & Sharp, P. A. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA.* 2010;16(11):2043-50.
195. Imig J, Brunschweiler, A., Brümmer, A., Guennewig, B., Mittal, N., Kishore, S., Tsikrika, P., Gerber, A. P., Zavolan, M., & Hall, J. miR-CLIP Capture of a miRNA Targetome Uncovers a lincRNA H19-miR-106a Interaction. *Nat Chem Biol.* 2015;11(2):107-14.
196. Helwak A, Kudla, G., Dudnakova, T., & Tollervey, D. Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell.* 2013;153(3):654-65.

197. Broughton JP, & Pasquinelli, A. E. A Tale of Two Sequences: microRNA-target Chimeric Reads. *Genet Sel Evol.* 2016;48:31.
198. Sethuraman S, Thomas, M., Gay, L. A., & Renne, R. Computational Analysis of Ribonomics Datasets Identifies Long Non-Coding RNA Targets of γ -herpesviral miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(16):8574-89.
199. Leucci E, Patella, F., Waage, J., Holmstrøm, K., Lindow, M., Porse, B., Kauppinen, S., & Lund, A. H. microRNA-9 Targets the Long Non-Coding RNA MALAT1 for Degradation in the Nucleus. *Sci Rep.* 2013;3:2535.
200. La Rocca G, Olejniczak, S. H., González, A. J., Briskin, D., Vidigal, J. A., Spraggon, L., DeMatteo, R. G., Radler, M. R., Lindsten, T., Ventura, A., Tuschl, T., Leslie, C. S., & Thompson, C. B. In Vivo, Argonaute-bound microRNAs Exist Predominantly in a Reservoir of Low Molecular Weight Complexes Not Associated With mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(3):767-72.
201. June Hyun Park S-YS, Chanseok Shin. Non-canonical Targets Destabilize microRNAs in Human Argonautes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(4):1569-83.
202. Kluiver J, Gibcus, J. H., Hettinga, C., Adema, A., Richter, M. K., Halsema, N., Slezak-Prochazka, I., Ding, Y., Kroesen, B. J., & van den Berg, A. Rapid Generation of microRNA Sponges for microRNA Inhibition. *Plos One.* 2012;7(1):e29275.
203. de la Mata M, Gaidatzis, D., Vitanescu, M., Stadler, M. B., Wentzel, C., Scheiffele, P., Filipowicz, W., & Großhans, H. Potent Degradation of Neuronal miRNAs Induced by Highly Complementary Targets. *EMBO Rep.* 2015;16(4):500-11.
204. Lee S, Song, J., Kim, S., Kim, J., Hong, Y., Kim, Y., Kim, D., Baek, D., & Ahn, K. Selective Degradation of Host MicroRNAs by an Intergenic HCMV Noncoding RNA Accelerates Virus Production. *Cell Host Microbe.* 2013;13(6):678-90.
205. Krüger J, & Rehmsmeier, M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:W451-4.
206. Rehmsmeier M, Steffen, P., Hochsmann, M., & Giegerich, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA.* 2004;10(10):1507-17.
207. Hadjicharalambous MR, Roux, B. T., Feghali-Bostwick, C. A., Murray, L. A., Clarke, D. L., & Lindsay, M. A. Long Non-coding RNAs Are Central Regulators of the IL-1 β -Induced Inflammatory Response in Normal and Idiopathic Pulmonary Lung Fibroblasts. *Front Immunol.* 2018;9:2906.
208. Wang K, Sun, T., Li, N., Wang, Y., Wang, J. X., Zhou, L. Y., Long, B., Liu, C. Y., Liu, F., & Li, P. F. . Wang, K., Sun, T., Li, N., Wang, Y., Wang, J. X., Zhou, L. Y., Long, B., Liu, C. Y., Liu, F., & Li, P. F. . *PLoS Genet.* 2014;10(7):e1004467.
209. Zisoulis DG, Kai, Z. S., Chang, R. K., & Pasquinelli, A. E. Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute. *Nature.* 2012;486(7404):541-4.
210. Eulalio A, Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., & Izaurralde, E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA.* 2009;15(1):21-32.