

Université de Montréal

**Conception de miARN artificiels basée sur la
caractérisation de la boucle de régulation miR-20/E2F**

par

Vincent De Guire

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophia doctor*
en biochimie

Juillet 2009

© Vincent De Guire, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Conception de miARN artificiels basée sur la
caractérisation de la boucle de régulation miR-20/E2F**

présentée par :
Vincent De Guire

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

M. Luc Desgroseillers, président-rapporteur
M. Gerardo Ferbeyre, directeur de recherche
M. Pascal Chartrand, co-directeur
Mme. Pascale Legault, membre du jury
M. Patrick Provost, examinateur externe
Mme. Anne-Marie Mes-Masson, représentante du doyen

Résumé

La biologie moléculaire et, plus spécifiquement, la régulation de l'expression génique ont été révolutionnées par la découverte des microARN (miARN). Ces petits ARN d'une vingtaine de nucléotides sont impliqués dans la majorité des processus cellulaires et leur expression est dérégulée dans plusieurs maladies, comme le cancer. Un miARN reconnaît ses cibles principalement par son noyau, ce qui lui permet de réguler simultanément la traduction de centaines d'ARN messagers. Nos travaux ont montré l'existence d'une boucle de rétro-activation négative, entre deux miARN du polycistron miR-17-92 et trois facteurs de transcription de la famille E2F. E2F1, 2 et 3 induisent la transcription de miR-20 et miR-17 qui par la suite inhibent leur traduction. Nos résultats suggèrent l'implication de cette boucle dans la résistance à l'apoptose induite par E2F1 dans les cellules du cancer de la prostate, ce qui expliquerait en partie le potentiel oncogénique du polycistron miR-17-92. L'étude de ce motif de régulation nous a donc permis de réaliser le potentiel incroyable qu'ont les miARN à inhiber la traduction de plusieurs gènes. Basé sur les règles de reconnaissance des miARN, nous avons développé et validé MultiTar. Cet outil bioinformatique permet de trouver la séquence d'un miARN artificiel ayant le potentiel d'inhiber la traduction de gènes d'intérêts choisis par l'utilisateur. Afin de valider MultiTar, nous avons généré des *multitargets* pouvant inhiber l'expression des trois E2F, ce qui nous a permis de comparer leur efficacité à celle de miR-20. Nos miARN artificiels ont la capacité d'inhiber la traduction des E2F et de neutraliser leur fonction redondante de la progression du cycle cellulaire de façon similaire ou supérieur à miR-20. La fonctionnalité de notre programme, ouvre la voie à une stratégie flexible pouvant cibler le caractère multigénique de différents processus cellulaires ou maladies complexes, tel que le cancer. L'utilisation de miARN artificiels pourrait donc représenter une alternative intéressante aux stratégies déjà existantes, qui sont limitées à inhiber des cibles uniques. En plus d'élucider un réseau de régulation complexe impliquant les miARN, nous avons pu tirer profit de leur potentiel d'inhibition par la conception de miARN artificiels.

Mots-clés : miARN, miR-20, miR-17-92, E2F, boucle de rétroactivation négative, MultiTar

Abstract

miRNAs are powerful regulators of gene expression in mammals. These small RNAs of around 20 nucleotides are involved in several cellular processes and diseases. MiRNAs recognize their targets mainly by a region comprising nucleotides 2-8, known as the seed. This characteristic gives them the potential to inhibit hundreds of messenger RNAs. Our first goal was to better characterize the complex network involving miRNAs in the regulation of gene expression. To achieve this, we studied the relation between a family of transcription factors, the E2Fs, and a family of miRNAs, the miR-17-92 cluster. Our results suggest a negative feedback loop involving miR-17, miR-20a, E2F1, E2F2 and E2F3. In this loop E2F1, 2 and 3 activate the transcription of the two miRNAs that inhibit their translation in return. The inhibition of the antiapoptotic function of E2F1 by miR-17 and miR-20 in a prostate cancer context, could explain the oncogenic potential of the miR-17-92 cluster that was previously reported. Studying the miR-20/E2F feedback loop made us realize how powerful was the ability of miRNAs to inhibit several targets. To overcome the lack of efficient tools able to inhibit simultaneously the expression of multiple genes, our second goal was to develop MultiTar, an algorithm able to design artificial miRNAs that target a set of predetermined genes. MultiTar was validated *in silico*, using known targets of endogenous miRNAs and *in vivo*, taking advantage of our experience with the E2F context. We designed artificial miRNAs against E2F1-3 and expressed them both in normal human fibroblasts and prostate cancer cells where they inhibited cell proliferation and induced cellular senescence. The observed phenotypes were precisely those known for inhibiting E2F activities. Hence, MultiTar can efficiently design artificial micro RNAs able to target multiple genes and is thus a flexible tool that can address the issue of multigenic diseases and complex cellular processes. The use of multitargets could be an alternative to overcome the limits of drugs or siRNAs that are designed generally to regulate only one target.

Keywords : miRNA, miR-20, miR-17-92, E2F, negative feedback loop, MultiTar.

Table des matières

1.1	Caractéristiques des miARN.....	1
1.1.1	Découverte des miARN	1
1.1.2	Biogenèse des miARN.....	2
1.1.2.1	Localisation génomique et transcription des miARN.....	2
1.1.2.2	Production et maturation d'un miARN fonctionnel.....	3
1.1.3	Principes de reconnaissance d'un ARN messenger par un miARN.....	7
1.1.3.1	Le noyau du miARN, l'élément de reconnaissance principal	7
1.1.3.2	Types d'interactions possibles entre un miARN et son ARNm cible.....	9
1.1.3.3	L'importance du noyau: La réponse est dans la structure!.....	10
1.1.3.4	Importance du contexte du 3'UTR de l'ARNm dans la liaison du miARN....	12
1.1.3.4.1	Influence de la structure de l'ARNm à proximité du site de liaison d'un miARN	13
1.1.3.4.2	Influence des protéines de liaison à l'ARN sur la régulation de la traduction des cibles de miARN	14
1.1.3.4.3	Impact de la position du site de liaison dans la cible	15
1.1.3.5	Contribution des différents éléments de reconnaissance d'un miARN sur le niveau d'inhibition de la cible.....	16
1.1.4	Mécanisme de régulation de la traduction par les miARN chez les mammifères.....	18
1.1.4.1	L'inhibition de la traduction par les miARN : un mécanisme pré ou post-initiation?	18
1.1.4.2	Impact de l'inhibition d'un miARN sur les niveaux de l'ARNm ciblé	20
1.1.4.3	L'augmentation de la traduction: Une nouvelle fonction pour les miARN	22
1.1.5	Effets biologiques des miARN.....	23
1.1.5.1	Les miARN sont impliqués dans une multitude de processus cellulaires différents	23
1.1.5.2	Potentiel des miARN à inhiber simultanément des centaines de cibles.....	24
1.1.5.3	Classification de l'activité des miARN en fonction des effets et du nombre de cibles	25

1.1.5.4 L'effet concerté des miARN permet la régulation de processus biologiques complexes.....	29
1.1.6 Réseaux de régulation impliquant les miARN.....	30
1.1.6.1 Analogie entre les miARN et les facteurs de transcription.....	30
1.1.6.2 Les miARN et les facteurs de transcription sont impliqués dans des boucles de régulation complexe.....	33
1.1.7 La bioinformatique : un allié important dans l'identification des cibles des miARN.....	35
1.2 Le polycistron de miARN miR-17-92.....	38
1.2.1 Découverte du polycistron miR-17-92.....	38
1.2.2 Le potentiel oncogénique de miR-17-92.....	40
1.2.3 miR-20 inhibe l'expression des facteurs de transcription E2F.....	41
1.2.4 La propriété anti-apoptotique du polycistron miR-17-92.....	42
1.2.4.1 L'inhibition de E2F1 par miR-20, une explication de la propriété anti-apoptotique du polycistron.....	42
1.2.4.2 L'inhibition de Bim et PTEN par le polycistron miR-17-92 contribue à son potentiel oncogénique.....	43
1.2.5 Implication de miR-20 et miR-17 dans la régulation du cycle cellulaire.....	44
1.2.6 Le polycistron miR-17-92 : oncogène ou suppresseur tumoral ?.....	47
1.3 La famille de facteurs de transcription E2F.....	48
1.3.1 Généralités et caractéristiques des E2F.....	48
1.3.1.1 Membres de la famille des E2F et leurs structures.....	48
1.3.1.2 Les familles Rb et DP, des partenaires d'interaction essentiels à la fonction des E2F.....	49
1.3.2 Fonctions biologiques des E2F.....	51
1.3.2.1 Les E2F et la progression de la phase G1/S du cycle cellulaire.....	51
1.3.2.2 La fonction pro-apoptotique de E2F1.....	53
1.3.2.3 E2F1 et les points de restriction de dommages à l'ADN.....	54
1.3.3 Redondance vs spécificité transcriptionnelle des E2F.....	55
1.3.4 Facteurs influençant le dilemme fonctionnel de E2F1.....	57
1.3.4.1 Le modèle des seuils d'activité de E2F1.....	57
1.3.4.2 L'induction de l'apoptose par E2F1 implique plusieurs facteurs.....	58

1.3.4.3 Importance du contexte cellulaire dans l'induction de l'apoptose dépendante de E2F1	60
1.3.5 Implication des E2F dans le cancer	60
2. Résultats	62
2.1 Article 1	62
2.1.1 Mise en contexte	62
Note	63
2.1.2 Summary	65
2.1.3 Introduction	66
2.1.4 Experimental procedures	68
2.1.5 Results	71
2.1.5.1 Regulation of E2F1-3 expression by miR17/miR20 miRNAs.	71
2.1.5.2 Regulation of miR17/miR-20 gene expression by E2F1-3.	73
2.1.5.3 Functional consequences of the regulation of E2F1-3 by miR-17/miR-20.....	75
2.1.6 Discussion	77
2.1.7 References	80
2.1.8 Footnotes	82
2.1.9 Figures Legends	83
2.1.10 Figures	86
2.2 Article 2	94
2.2.1 Mise en contexte	94
Notes	95
Contribution des auteurs :	95
2.2.2 Abstract	97
2.2.3 Introduction	98
2.2.4 Materials and methods	99
2.2.5 Results and Discussion	102
2.2.7 Legend	116
2.2.8 Figures	118
3. Discussion	125

3.1 Caractérisation de la boucle de rétroactivation négative entre miR-20/miR-17 et les E2F	125
3.1.1 miR-20 inhibe la traduction des E2F	125
3.1.2 Les E2F activent la transcription du polycistron miR-17-92	129
3.1.3 La fonction anti-apoptotique du polycistron miR-17-92	132
3.1.3.1 miR-20 et miR-17 inhibent la fonction apoptotique de E2F1	132
3.1.3.2 Contribution de l'inhibition des E2F par miR-20 dans la fonction anti-apoptotique du polycistron miR-17-92	133
3.1.4 Implication de la fonction antiapoptotique de miR-20/miR-17 dans des contextes normaux	137
3.1.5 La fonction suppresseur tumorale de miR-20	138
3.1.6 La boucle de rétroactivation négative entre miR-20/miR-17 et les E2F.....	140
3.1.7 Implication potentielle de la boucle de rétroactivation négative miR-20/E2F au niveau du point de restriction G1/S	142
3.1.8 Mise en contexte de la boucle de rétroactivation positive	145
3.2 MultiTar	150
3.2.1 MultiTar : une alternative au manque d'outils efficaces permettant d'inhiber simultanément l'expression de plusieurs gènes	150
3.2.2 MultiTar : une stratégie basée sur le noyau du miARN.....	152
3.2.3 La règle de sélection du bon brin : un avantage ou une contrainte?.....	153
3.2.4 L'option de multiplicité.....	155
3.2.5 Importance de l'évaluation de l'accessibilité d'un miARN à sa cible.....	156
3.2.6 Localisation des sites des multitargets dans les ARNm ciblés.....	157
3.2.7 Validation in vivo et in silico de MultiTar.....	159
3.2.8 Les MultiTargets peuvent-ils causer des effets non-spécifiques?	162
3.2.9 MultiTar et le principe d'additivité.....	165
3.2.10 La technologie au service des MultiTargets.....	166
4. Conclusion	168
5. Bibliographie.....	169

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1. Caractéristiques des différents programmes de prédiction de cibles des miARN endogènes	37
---	----

Article 2

Table I: In silico validation of MultiTar	119
Table II: Sequences and characteristics of artificials miRNAs against E2F1, 2 and 3 compare to miR-20.....	120

Discussion

Tableau II. Caractéristiques des différentes interactions entre miR-20 et les E2F	129
---	-----

Liste des Figures

Introduction

Figure 1. Résumé de la biogenèse des miARN. Tirée de Winter et al. (2009).....	5
Figure 2. Résumé des éléments essentiels à la reconnaissance d'un ARNm par un miARN. Tirée de Filipowicz et al. (2008).	8
Figure 3. Types d'interactions potentielles entre un miARN et sa cible. Tirée de Sethupathy et al. (2006b).....	10
Figure 4. Modèle de nucléation d'un miARN à un ARNm cible. Tirée de Bartel. (2009) ..	11
Figure 5. Modèle d'accessibilité au site de liaison impliquant la contrainte du complexe RISC. tirée de Kertesz et al. (2007).....	13
Figure 6. Impact du type de liaison d'un miARN sur le degré d'inhibition de la traduction d'un ARNm A) Illustration des différents types de noyau. B) Efficacité relative des différents types de sites reconnus par les miARN. Tirée de Bartel (2009).....	17
Figure 7. Mécanismes potentiels d'inhibition de la traduction par les miARN. Tirée de Filipowicz et al. (2008).....	19
Figure 8. Relation entre l'intensité d'inhibition d'un miARN, l'impact biologique et le nombre de cibles. Tirée de Flynt and Lai (2008).	26
Figure 9. Incidence de l'intensité d'inhibition d'un ARNm par un miARN sur leurs co- expression potentielle. A. Tirée de Bartel et al. (2004) et B. tirée de Flynt et al. (2008)	27
Figure 10. Résumé des résultats de Cloonan et al. sur la régulation de la prolifération de miR-17 dans les cellules HEK293T. Tirée de Cloonan et al. (2008)	28
Figure 11. Comparaison des caractéristiques des miARN aux facteurs de transcription. Tirée de Hobert (2008).....	31
Figure 12. Impact du nombre de sites de miARN présents sur un ARNm par rapport au degré d'inhibition de la traduction. Tirée de Flynt et Lai (2008).....	31

Figure 13. Types de boucles de rétroactivation négative existant entre les facteurs de transcription et les miARN. Tirée de Martinez et al. (2008).....	33
Figure 14. Modèle de la fonction des boucles de régulation négatives dans le processus d'expression génique Tirée de Martinez et al. (2008).	35
Figure 15. Organisation génomique du polycistron miR-17-92 et des paralogues ainsi que leurs séquences. Tirée de Mendell. (2008).....	39
Figure 16. La surexpression de miR-17-19b accélère la lymphomagenèse induite par Myc. Tirée de He et al (2005a).....	41
Figure 17. Caractéristiques structurales primaires et propriétés des membres de la famille des E2F. Tirée de Iaquina and Lees (2007).....	49
Figure 18. Représentation des différents partenaires de liaison des E2F. Tirée de Attwooll et al. (2004).....	50
Figure 19. Régulation de A) l'expression des E2F dans le cycle cellulaire et B) leur activités transcriptionnelles. Tirée de Attwooll et al. 2004 et de Tsantoulis and Gorgoulis, 2005).....	52
Figure 20. Voies d'induction de l'apoptose par E2F1 dépendante et indépendante de p53. Tirée de Stanelle and Putzer (2006).....	54
Figure 21. Modèle proposé par Trimarchi et al. afin d'expliquer le choix entre la fonction pro-apoptotique ou pro-proliférative des E2F. Tirée de Trimarchi and Lees (2002)...	57
Figure 22. Signalisation en amont de E2F1 permettant l'induction de la prolifération ou de l'apoptose. Tirée de Polager and Ginsberg (2008).	59

Article 1

Figure 1. miR-20a regulates E2F expression.....	86
Figure 2. Western blot analysis of endogenous levels of E2F1 and E2F2.....	87
Figure 3. Induction of miR-20a expression by the E2F1-3 transcription factors.....	88
Figure 4. The E2F1-3 transcription factors activate the <i>miR-17-92</i> promoter.....	89
Figure 5. Effect of the inhibition of endogenous miR-20a.....	90
Figure 6: Inhibition of miR-20a increased the susceptibility of PC3 cells to cell death after doxorubicin treatment.....	91

Figure 7: miR-20a protects PC3 cells from doxorubicin-induced E2F-mediated cell death/apoptosis.....	92
Figure 8: Model for an auto-regulatory feedback loop between E2F and the <i>mir-17-92</i> cluster.....	93
Supplementary Figure 1: Luciferase activity from HeLa cells expressing a luciferase under the control of ORC-1 promoter.....	94

Article 2

Figure 1. Rules and steps of the algorithm MultiTar.....	121
Figure 2: MT-E2F target E2F1-3 luciferase reporter.....	122
Figure 3: MT-E2F target E2F1-3 endogenous protein.....	123
Figure 4: MT-E2F target E2F1-3 functions.....	124
Supplementary figure 1: MultiTar strategy.....	125

Discussion

Figure 23. Alignement, estimé par MultiTar, des interactions possibles entre miR-20 et les sites dans les 3'NTR des différents E2F.....	126
Figure 24. Modèle de la fonction anti-apoptotique de miR-20 par l'inhibition des E2F...	133
Figure 25. Mise en contexte de la boucle de rétroactivation négative miR-20/E2F avec A) Myc et B) Myc et Cycline D1	143
Figure 26. Modèle illustrant la place centrale de la boucle de rétroactivation négative miR-17-92/E2F dans l'intégration des signaux définissant la fonction des E2F.....	146
Figure 27. Impacte de la concentration d'un siRNA sur ses effets spécifiques et non-spécifiques (http://www.Dharmacon.com)	164

Liste des sigles et des abréviations

AGO : argonaute
ARN : acide ribonucléique
ASO : oligonucléotide antisens
ATM : ataxia telangiectasia mutated
DCP : decapping protein
DHFR : dihydrofolate réductase
E2F : adenovirus E2 promoter binding factor
FACS : cytométrie de flux
GFP : green fluorescent protein
HCV : hepatitis C virus
HDAC : histone déacétylase
IRES : internal ribosome entry site
MEF : mouse embryonic fibroblast
MLP : MSCV/LTRmiR30-PIG (plasmide)
miARN : micro-ARN
miR-20a : microRNA-20a
ntds : nucleotides
PC3 : prostate cancer 3
Pol : polymérase
Rb : Retinoblastoma protein
RISC : RNA-induced silencing complex
SBS : seed binding site
shRNA : short hairpin RNA
UTR : untranslated region
2'O-Me ASO : 2'O-methyl oligonucléotide antisens

*Aux deux femmes de ma vie Annie-Claude et
Naomie*

Remerciements

Cette section est probablement la plus importante puisqu'elle mentionne tous ceux qui m'ont permis de réaliser cette thèse. J'espère ne pas oublier personne et si c'est le cas, je suis certain que vous êtes conscient de ce que vous m'avez apporté.

Cette thèse n'est pas seulement la mienne, mais aussi celle de Gerardo mon directeur. Je vous remercie sincèrement pour la confiance que vous avez eu en moi et ce depuis le tout début. Ce qui me manquera sincèrement le plus sont toutes les discussions sur nos idées scientifiques, mais aussi sur la vie en général. Je suis persuadé que nous aurons la chance de rediscuter ensemble et même peut-être d'entreprendre une collaboration. Ne perdez jamais votre capacité à rebondir dans les moments difficiles, ce côté de vous est remarquable et nous a permis de passer à travers plusieurs obstacles qui venaient avec la frénésie des miARN.

J'ai eu la chance d'être doublement supervisé en ayant comme co-directeur Pascal Chartrand. Pascal, je te remercie infiniment pour le soutien que tu m'as apporté tout au long de mon doctorat et ce jusqu'à la fin. Tu as toujours su répondre à mes questions qui n'étaient pas toujours évidentes. Ta rigueur scientifique et ton efficacité a toujours été un exemple pour moi et m'a permis d'évoluer en tant que scientifique.

Si je suis maintenant biochimiste c'est grâce au Dr. Raymond Lepage qui a pris le temps de me présenter sa profession il y a de ça plusieurs années. Je ne serai jamais assez reconnaissant pour tout le temps que vous m'avez consacré et ce malgré votre horaire chargé. Toute nos rencontres à travers ces années ont été extrêmement précieuses pour moi puisque vous avez su répondre de façon judicieuse à mes questionnements et mes inquiétudes. Je crois sincèrement avoir trouvé un métier qui me passionne et qui concorde parfaitement avec ma personnalité et c'est grâce à vous. Merci mille fois.

Je me dois aussi de remercier tous les chercheurs qui m'ont donné généreusement de leur temps pour faire partie de mes comités de thèse, de mon pré-doctorat ou encore de ma défense. Premièrement merci au Dr. Léa Brakier Gingras qui a probablement été présente à toutes ces rencontres. Ça a été très motivant et utile de pouvoir avoir vos commentaires et opinions tout au long de mes études. Votre passion pour la science a été

inspirante pour moi. Merci aussi au Dr.Desgroseillers pour ces conseils judicieux, à François Major, au Dr.Aubry qui m'a permis d'enseigner dans son cours et tous les autres qui m'ont permis, de proche ou de loin, de devenir le scientifique que je suis maintenant. Merci au Dr. Legault ainsi qu'au Dr.Provost d'avoir pris part à mon jury de thèse.

Mon doctorat aurait été sûrement plus aride et difficile si je n'avais pas eu sur mon chemin deux collaborateurs qui sont devenus des amis, Yannick et Maxime. Yannick a été mon frère de combat pour l'épisode de miR-20. Une chose est certaine on ne l'a pas eu facile et je ne suis pas certain que je serais en train d'écrire des remerciements de thèse si nous n'avions pas eu la chance de travailler en équipe pour surmonter l'insurmontable!

Il y a eu ensuite plusieurs projets qui ont défilé pour finalement développer MultiTar avec Maxime. Ce projet stimulant m'a permis de terminer mon doctorat en force, et surtout de garder un bon moral jusqu'à la fin. Le mélange de la bioinformatique et de la biochimie a été un succès et j'ai hâte de voir quel avenir est réservé à nos MultiTargets.

Il y a ensuite tous mes amis et collègues du laboratoire. Viviane ma stagiaire préférée!! Ta ponctualité et ta motivation d'arriver à 7:00 reflète bien ta rigueur et ta qualité en tant que scientifique, n'y doute jamais. Au plaisir de te vous revoir toi, Martin et votre petit chérubin!

Laury oh mon Laury. Qui aurait cru que je ferais une partie de mon doctorat avec un de mes meilleurs amis. Ça été un plaisir de pouvoir travailler à côté de toi pendant ces années. J'en profite pour remercier deux autres de mes meilleurs amis Nick et Franck. Merci pour ces moments non scientifiques que je préfère ne pas détailler. J'espère ne jamais vous perdre de vue.

Un immense merci à Catherine qui m'a donné un gros coup de main pour terminer l'article de MultiTar. J'ai été vraiment chanceux de tomber sur une biologiste moléculaire aussi talentueuse qui en plus aime faire des clonages!!

Je ne dois pas oublier Marie-France qui est là depuis le début. Merci pour tous les dépannages de dernière minute et il y en a eu beaucoup. Tu as rendu mon doc plus facile. Ne perd jamais ton rire, il est unique!

Olga, you were there when I started and you're still there! Thanks for all the discussions we had together, it really was a pleasure working with you.

Véronique, Merci infiniment pour ton aide lorsque nous étions en détresse pour le papier de miR-20. Je suis vraiment content d'avoir eu la chance de travailler avec toi dans ces dernières années

Geneviève!!! Mon autre stagiaire préférée. Ah Geneviève que d'attitude pure et brute. Je vais m'ennuyer de tes regards d'arrogance. Bonne chance pour la suite! Je suis certain que tu y arriveras, tu as tellement bien été formée!!

Ah Xavier! Mon dernier stagiaire préféré! Sans blague j'ai beaucoup aimé t'avoir comme collègue de travail. Lâche pas! Tu es la preuve qu'un bacc en biologie peut servir, à condition de bifurquer en biochimie!

Vickram oooooh Vikram!! Que de dialogues scientifiques et intellectuels avons nous eu. Te demander ce qui ce passait à part de ça à été tellement enrichissant!

Mathieu te rencontrer à été un vrai plaisir. Que de conneries avons nous fait lors de ces journées de laboratoires un peu trop longue. Bonne chance pour la suite mon ami!!

À ceux qui sont partis du labo depuis déjà quelques années. Fredo a été mon superviseur dans tous les sens du terme. N'oublie jamais Fred, C'est la vie qui chante. Merci pour tous tes conseils. Ce sera un plaisir de te revoir, mais n'oublie surtout pas... ton garçon ne fréquentera jamais ma fille!

Adrien tu es une des personne la plus sympathique et sans malice que j'ai rencontré. J'espère que tu es toujours heureux à Concordia. Je me rappellerai toujours de ton arrivée à Montréal quand tu as crus que j'étais le patron! Good luck my friend.

UK thanks for your help for the miR-20 story. It was a pleasure to work with you and I wish you the best in Ontario.

Je dois aussi mentionner tous les membres du labo de Pascal qui a été mon labo d'adoption. Yannick bien sûr, mais aussi Francky, Pepito de son prénom. Ça a été un plaisir

de partager tous ces cafés, bière, vin et repas avec toi. Il faut croire que notre relation repose sur la nourriture! Es-tu français?? Bonne chance pour la suite et je suis persuadé que nous ne perdrons pas contact même lorsque tu retourneras en France. Merci aussi à Anne-Laure et tous ces bons conseils. Bonne chance avec le bébé. Thanks to Zhi-fa, your the king of the bicycle my friend. Merci à Olivia et Catherine et sans oublier Emmanuelle. Merci infiniment pour ton aide pour l'article de JBC et pour tous les conseils qui ont suivis par la suite.

Il est impossible de ne pas remercier tous les employés du département qui nous rendent la vie de tous les jours plus facile. Merci à vous! Un énorme merci à Sylvie Beauchemin. Ton aide à été plus que remarquable à travers les années et ce du début du Bacc jusqu'à la fin. Toujours avec le sourire tu nous guides à travers la complexité de la bureaucratie universitaire. Merci de nous rendre la vie plus facile!! Heureusement je pourrai te déranger encore pour deux autres années lors de mon DEPD.

Merci à tous mes amis du laboratoire d'enseignement. Daniel, André, Nathalie, Nicole et Elena. Ça été une des plus belles expériences de pouvoir enseigner lors de mon doctorat et c'est grâce à vous.

Merci à tous mes amis du département. Je suis persuadé que vous vous reconnaissez.

Je voudrais remercier le FRSQ pour ma bourse de doctorat, mais surtout pour mon congé de paternité.

Je dois absolument remercier mes parents, Louise et François qui m'ont donné le goût d'apprendre. Je suis conscient des sacrifices que vous avez fait pour nous afin de nous donner ce qu'il y avait de mieux. Je n'aurais pas pu me rendre si loin sans votre soutien. Merci pour tout vos encouragements et tout ce que vous m'avez permis d'accomplir. Si votre but était de me donner des bases solides, je crois que c'est réussi. Cette thèse est aussi la vôtre. Sans oublier ma soeur, la grande voyageuse et ma grand-mère qui est la plus exceptionnelle de toutes.

Merci aussi à ma belle famille (Jean-François, Nicole, David et Aurélie) qui m'a toujours encouragé et soutenu à travers les années. Je n'aurais pas pu mieux choisir ma famille d'adoption.

Je pense avoir le bonheur facile, mais je n'aurais jamais cru pouvoir être aussi heureux et avoir une aussi belle vie. Je dédie donc cette thèse à Annie-Claude, ma copine et la plus belle petite fille de toute la terre, Naomie qui m'apportent tellement de bonheur et d'amour jours après jours. Annie-Claude, je ne te dirai jamais assez comme je t'aime et comment ton support est important pour moi. Merci de m'avoir permis de passer à travers les moments plus difficiles et de m'avoir donné un si bel équilibre de vie. Rédiger ma thèse en votre compagnie a été probablement les plus beaux mois de ma vie, mais ça n'est probablement rien comparativement au congé de paternité qui s'en vient.

Encore une fois merci à vous tous...

1 Introduction

1.1 Caractéristiques des miARN

1.1.1 Découverte des miARN

Malgré les efforts soutenus des scientifiques pour trouver l'idée du siècle, les plus grandes découvertes se font parfois tout à fait par hasard. Ces découvertes fortuites ont le potentiel de secouer les dogmes existants qui orientent inconsciemment les travaux et les observations des chercheurs. Peu de scientifiques, il y a moins d'une décennie, auraient pu prédire que le monde de la régulation génique, qui était strictement protéique, devrait faire place à l'ARN. Les miARN ont été découverts par hasard en 1993 dans le laboratoire du Dr. Ambros sous le nom de petits ARN temporels (Lee et al., 1993). Le Dr. Ambros s'intéressait aux mécanismes responsables du développement temporel chez le vers *C.elegans*. Un criblage génétique avait permis d'identifier le gène *Lin-4* comme étant un répresseur de *lin-14*, un facteur essentiel de la phase L2 du développement embryonnaire. Malgré sa fonction évidente, *Lin-4* ne codait pas pour une protéine, mais plutôt pour deux petits ARN. L'un mesurait 22 nucléotides et l'autre, qui semblait être le précurseur, était 61 nucléotides de long. Le mécanisme d'inhibition semblait être de type antisens, puisque la séquence de 22 nucléotides avait une certaine complémentarité pour la région 3' non-traduite (3'NTR) de l'ARNm codant pour *Lin-41*. À ce moment, le phénomène de petits ARN temporels semblait être unique et spécifique à *C.elegans*. Ce n'est que cinq ans plus tard que le laboratoire du Dr. Mello, travaillant aussi chez *C.elegans*, identifia le phénomène de l'interférence à l'ARN. Ils démontrèrent que l'injection d'un ARN double brin exogène pouvait inhiber, de façon spécifique, l'expression d'un gène. Les niveaux d'inhibition suggéraient un mécanisme catalytique, puisque la faible quantité requise d'ARN double brin ne supportait pas une interférence de type stoichiométrique (Fire et al. 1998). Bien que *lin-4* soit le fondateur de la famille des miARN, ce n'est que sept ans plus tard que l'existence des miARN prit tout son sens (Reinhart et al., 2000). Le Dr. Ruvkun identifia *let-7*, qui était aussi un petit ARN de 21 nucléotides. Toutefois, ce petit ARN était

conservé à travers différentes espèces, incluant les vertébrés et, plus spécifiquement, la *Drosophila* et le poisson zébré (Pasquinelli et al., 2003). Cette conservation suggérait donc l'existence d'un mécanisme de régulation de l'expression génique conservé à travers l'évolution. Le clonage à grande échelle de ces petits ARN par différents groupes a ensuite permis de démontrer l'ampleur de la fonction de ces petits ARN chez différentes espèces comme *C.elegans*, les plantes, mais aussi chez la souris et l'humain (Bentwich et al., 2005; Lagos-Quintana et al., 2002; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Wang et al., 2004). Constituant presque 1% de tous les gènes prédits chez l'humain, le ver et la mouche, ces petits ARN font maintenant parties d'une des classes les plus abondantes de régulateurs de l'expression génique dans les cellules animales (Lai et al., 2003; Lim et al., 2003a; Lim et al., 2003b). Jusqu'à ce jour, plus de 400 miARN ont été identifiés chez l'humain et des études bioinformatiques suggèrent qu'ils contrôlèrent l'expression de plus du tiers des gènes (Krek et al., 2005; Lewis et al., 2005)

1.1.2 Biogenèse des miARN

1.1.2.1 Localisation génomique et transcription des miARN

Différentes étapes de maturation sont requises afin de produire un miARN mature. Les gènes codant pour les miARN sont transcrits initialement sous la forme de miARN primaires (pri-miARN), qui peuvent mesurer jusqu'à plusieurs milliers de nucléotides. La nature de l'ARN polymérase (pol) responsable de leur transcription n'a pas fait l'unanimité dès le départ. Les travaux de certains groupes suggéraient l'implication de l'ARN pol II, tandis que d'autres étaient en faveur de l'ARN pol III. Finalement, il semble que la majorité des pri-miARN possèdent la signature de l'ARN pol II. Cai et al. (2004) ont pu observer la présence de coiffe et de queue de poly (A), tandis que Lee et al. (2004) ont mesuré une diminution de l'expression de pri-miARN en présence α -amanitine, un inhibiteur de l'ARN pol II. (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). L'association directe de l'ARN pol II avec le

promoteur de certains miARN a été observée par immunoprécipitation à la chromatine (Lee et al., 2004). L'ARN pol III semble aussi être impliquée dans la biogénèse d'un certain nombre de miARN (Borchert et al., 2006). Une cinquantaine de miARN seraient localisés dans le génome au niveau de séquences entourées par des éléments répétitifs, qui sont des éléments de reconnaissance de l'ARN pol III. Borchert et al. (2006) ont détecté une interaction directe entre l'ARN pol III et certaines de ces séquences répétitives proximales et des expériences de transcription in vitro ont confirmé ces observations.

1.1.2.2 Production et maturation d'un miARN fonctionnel

La proportion des miARN possédant leur propre promoteur représente 50% des cas. Les autres sont principalement localisés dans des introns, ce qui les rend dépendant de la transcription du gène hôte (Saini et al., 2007). Une analyse bioinformatique des séquences proximales des miARN intergéniques chez l'homme, la souris, *A. thaliana* et *O. Sativa*, a permis à Zhou et al. (2007) de mieux caractériser le promoteur de ces petits ARN. Ils ont pu observer que 87,5% des promoteurs des miARN chez l'humain possèdent un promoteur caractéristique de la pol II. De plus, le promoteur minimal de la majorité des miARN se retrouverait dans les 500 premiers nucléotides en amont de la séquence du pré-miARN. Bien qu'une boîte TATA a pu être identifiée dans seulement 33% des cas, de nombreux éléments d'initiation de la transcription caractéristiques aux promoteurs des gènes codants pour les protéines ont pu être identifiés. Des microsatellites de répétitions CT ont aussi été observés et semblent être conservés à travers les quatre espèces étudiées. Bien que ces éléments semblent être impliqués dans la régulation de l'expression des miARN, des études plus poussées seront toutefois nécessaires afin de mieux cerner leurs fonctions. La majorité des promoteurs de miARN sont donc très similaires aux promoteurs régulant l'expression de gènes codants pour les protéines.

Indépendamment de la localisation génomique du miARN, tous les pri-miARN ont la caractéristique de se replier en une tige-boucle dans laquelle le miARN se retrouve dans un des brins de la tige. Cette structure permet l'entrée du pri-miARN dans la voie de maturation des miARN (Figure 1). La première étape est nucléaire et implique un complexe catalytique nommé Microprocesseur (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004). Le clivage du pri-miARN est induit par Drosha, une ribonucléase de type III (Lee et al., 2003). Bien que ce soit Drosha qui possède l'activité catalytique, DGCR8, une autre protéine du Microprocesseur, est aussi essentielle à la maturation (Han et al., 2004). La structure en tige-boucle des pri-miARN est généralement formée d'une tige d'environ 33 paires de bases, d'une boucle, ainsi que de régions simples brins adjacentes à la tige. La jonction appariée/non-appariée à la base de la tige serait reconnue par DGCR8, ce qui permettrait le positionnement de Drosha à environ 11 nucléotides de cette jonction (Han et al., 2006). Le clivage à cette position libère le précurseur du miARN (pré-miARN), une tige-boucle d'environ 65 à 70 nucléotides possédant la signature de clivage d'une RNase de type III, soit un groupement phosphate en 5' et une extrémité 3' possédant un groupement hydroxyle et un excédent de 2 nucléotides (Lee et al., 2003). Il est à noter que certains *pri-miARN* présents dans des introns, nommés mirtrons, contournent la voie de maturation par le microprocesseur. Ces *pri-miARN* utilisent plutôt la machinerie d'épissage et ne nécessitent donc pas de clivage par Drosha (Berezikov et al., 2007). Les précurseurs formés dans le noyau sont ensuite exportés vers le cytoplasme par un transporteur spécifique. L'Exportin-5 reconnaît la signature du clivage de type RNase III et transporte le précurseur dans le cytoplasme de façon GTP-dépendante (Lund and Dahlberg, 2006). Ce changement de localisation cellulaire permet la liaison de Dicer, une autre *RNase* de type III. Contrairement à Drosha, Dicer semble reconnaître et cliver le précurseur en absence de partenaires protéiques. Son domaine PAZ permet sa liaison à la base de la tige, positionnant

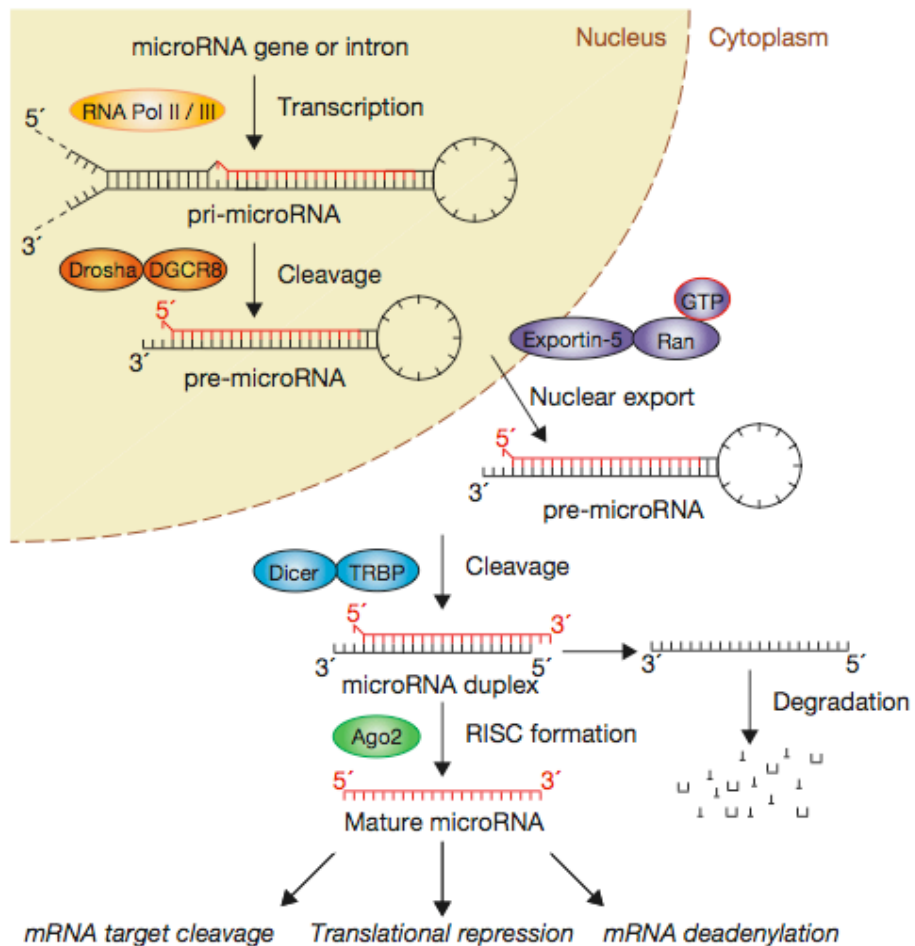


Figure 1. Résumé de la biogenèse des miARN. Tirée de (Winter et al., 2009)

le domaine *RNase* III de Dicer à environ une vingtaine de nucléotides (Macrae et al., 2006). Cette deuxième coupure permet la formation d'un duplexe de miARN possédant la signature de clivage des *RNase* III à chaque extrémité. Par la suite, la Transactivating response RNA-Binding Protein (TRBP) qui possède 3 domaines de liaison à l'ARN double brin, recruterait Argonaute 2 (Ago2), qui est la protéine principale du complexe RISC (RNA induced silencing complex) (Chendrimada et al., 2005). Par la suite, le brin du duplexe possédant la plus faible stabilité thermodynamique au niveau de son extrémité 5'

serait sélectionné et recruté par le complexe catalytique RISC, tandis que l'autre brin (miARN*) est généralement dégradé (Schwarz et al., 2003). L'analyse des séquences de bibliothèques de miARN clonés dans différents organismes a toutefois permis d'identifier plusieurs miARN* (Aravin et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2002; Lim et al., 2003b). Ces études suggéraient toutefois que l'abondance du miARN* était en général 100 fois inférieure au miARN guide de la tige-boucle. L'abondance relative corrélait aussi avec la règle de sélection de brin basée sur la thermodynamique. Cependant, les travaux du Dr. Yan ont remis en perspective l'importance des miARN*. Une analyse chez la souris et l'humain a montré que sur 969 miARN répertoriés, 117 étaient en fait des miARN complémentaires au brin guide, ce qui suggère l'existence de paires de miARN (Ro et al., 2007). Fait très intéressant, l'expression spécifique de chaque brin du précurseur serait tissu spécifique. Par exemple, miR-30e-3p s'accumule préférentiellement dans l'estomac, tandis que miR-30e-5p, provenant du brin complémentaire, s'accumulerait plutôt dans la rate. Puisque la thermodynamique à chaque extrémité du duplex de miARN ne change pas d'un type cellulaire à un autre, ces observations suggèrent l'existence d'un mécanisme de recrutement au complexe RISC supplémentaire. L'équipe du Dr. Khaitovitch a étudié la corrélation entre la composition des séquences des deux brins et leurs expressions relatives (Hu et al., 2009). Un U en 5' est retrouvé davantage dans le brin le plus fortement exprimé, comparativement à un C pour le brin complémentaire. De plus, il existe un enrichissement en purines dans les brins guides. Puisqu'aucune différence significative n'a pu être observée dans le cas où les deux miARN provenant du même précurseur sont exprimés à des niveaux similaires, ces règles semblent être plus représentatives que la règle de thermodynamique. Il est toutefois important de noter que cette analyse a été faite uniquement dans des extraits de cortex frontal et ces observations pourraient être tissu spécifique.

1.1.3 Principes de reconnaissance d'un ARN messager par un miARN

L'identification des cibles des miARN endogènes a été un obstacle majeur à la compréhension de leurs fonctions dans les cellules de mammifères. Le problème était moins complexe chez les plantes, puisque ces petits ARN ont une complémentarité presque parfaite avec leurs ARNm cibles, permettant une recherche de séquences complémentaires uniquement à l'aide d'un programme d'alignement de séquences tel BLAST. (Rhoades et al., 2002). Différents groupes ont caractérisé les éléments importants permettant la liaison d'un miARN à un ARNm spécifique dans les cellules humaines. Un résumé de ces caractéristiques de reconnaissance, qui seront discutées dans cette section, est illustré à la Figure 2 (Filipowicz et al., 2008).

1.1.3.1 Le noyau du miARN, l'élément de reconnaissance principal

L'étude des appariements existant entre des miARN endogènes et leurs cibles identifiées ne laisse aucun doute sur l'importance du noyau (ou région *seed*) dans le processus de reconnaissance. Constitué des nucléotides deux à huit dans l'extrémité 5' du miARN, cette région lie l'ARNm ciblé par appariement Watson-Crick (Lewis et al., 2005; Lewis et al., 2003). La définition de cette région a été possible par l'analyse des interactions endogènes, mais aussi par des expériences de mutagenèse mettant en lumière l'importance de chaque nucléotide du miARN.

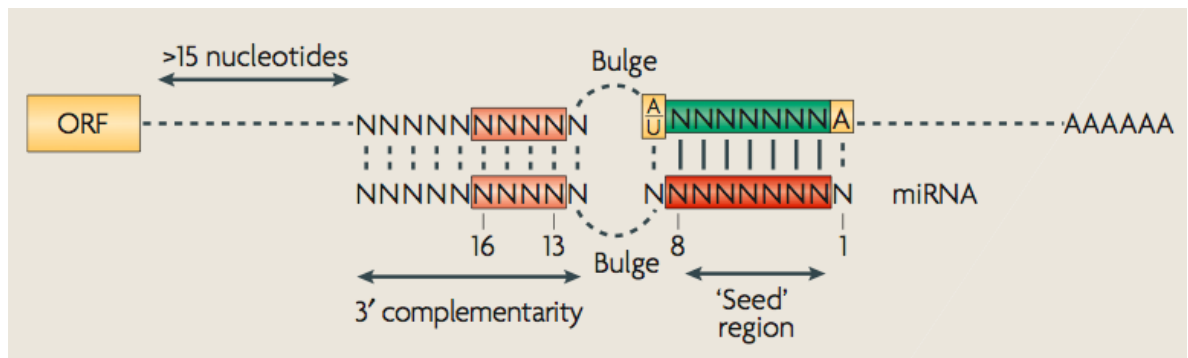


Figure 2. Résumé des éléments essentiels à la reconnaissance d'un ARNm par un miARN. Tirée (Filipowicz et al., 2008).

Après la liaison au niveau du noyau, il y a présence généralement d'un mésappariement entre les 9e au 12e nucléotides du miARN et l'ARNm ciblé. Des appariements impliquant les nucléotides 13 à 16 sont souvent observés puisqu'ils optimisent l'interaction, sans affecter la liaison du miARN à Ago2. Le site de liaison du miARN doit se trouver dans une région non-structurée et à une distance plus grande de 15 nucléotides du codon de terminaison. Brennecke et al. (2005) ont utilisé, chez la drosophile, des rapporteurs dans lesquels la séquence cible d'un miARN était placée en aval du gène fluorescent EGFP. La fluorescence dépend donc directement du potentiel d'inhibition du miARN qui est modulée par la mutation de chaque nucléotide de la séquence complémentaire au noyau. Cette stratégie a permis de déterminer le noyau minimal requis (Brennecke et al., 2005). Pour ce faire, ils ont co-exprimé, chez la drosophile, un miARN endogène, bantam, et un gène rapporteur contenant le 3'NTR de hid, son ARNm cible validé. Dans la région 5' du miARN, un mésappariement aux positions 1, 9 et 10 était toléré, mais une diminution significative pouvait être observée par la mutation individuelle des nucléotides 2 à 8. Ce résultat a aussi été vérifié sur un autre miARN, soit miR-278. Fait intéressant, ils ont pu observer que des mésappariements au niveau du noyau pouvaient être tolérés s'il y avait une compensation d'appariements dans l'extrémité 3' du miARN. Cette compensation nécessitait toutefois une série de 4 à 5 nucléotides appariés afin de permettre

la formation d'une hélice de longueur minimale entre le miARN et sa cible. Ces résultats sont importants, car ils suggèrent que le calcul de l'énergie libre, visant à estimer le potentiel d'interaction entre un miARN et sa cible, n'est pas suffisant. Il importe de tenir compte de la présence d'une hélice minimale, qui semble être requise au niveau du noyau. Par exemple, lors du calcul d'énergie libre, un appariement aux nucléotides 13, 14, 15, 16, 17 pourrait être considéré de façon identique à un appariement 13, 14, 16, 17, 18 si les nucléotides sont de même nature. Par contre, un mésappariement au nucléotide 15 aurait un impact sur la structure en double hélice sans toutefois modifier le calcul de l'énergie libre.

1.1.3.2 Types d'interactions possibles entre un miARN et son ARNm cible

Les interactions impliquant les extrémités 5' et 3' du miARN a permis à Brennecke et al. (2005) de classer le type d'interaction d'un miARN et sa cible en trois grandes familles qui sont présentées à la Figure 3. La première consiste en une interaction de type 5' dominant où le noyau est l'élément principal de reconnaissance et serait pratiquement suffisant à lui-seul (5'-dominant seed site). La deuxième est de type compensation en 3', où l'appariement de la région en 3' du miARN est essentiel afin d'inhiber la traduction de la cible, due à la présence d'un mésappariement important au niveau du noyau (3' compensatory site). Dû à cette compensation, des appariements non Watson-Crick, de type GU, sont aussi tolérés dans le noyau contrairement au type 5' dominant. Finalement, le dernier type de reconnaissance, qui est de type canonique, requiert

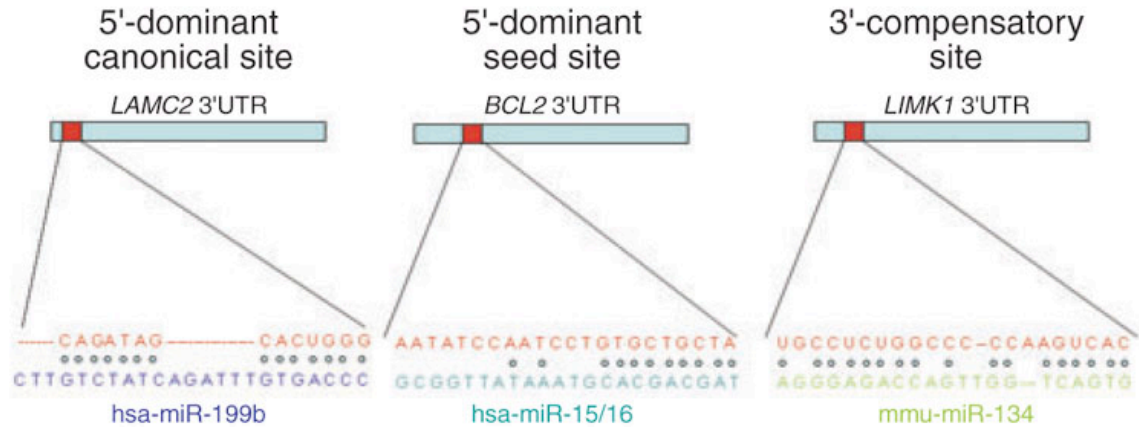


Figure 3. Types d'interactions potentielles entre un miARN et sa cible. (Sethupathy et al., 2006b)

les deux extrémités du miARN pour inhiber l'expression de l'ARNm cible de façon satisfaisante (5' dominant canonical site). Bien que ces trois types de sites soient fonctionnels, ils existent en proportions différentes chez les mammifères, où le type 5'-dominant prédomine. Par exemple, l'interaction compensatoire en 3' a été identifiée chez seulement 3% des interactions miARN : ARNm cibles répertoriées (Bartel, 2009). Ce qui ajoute aussi à l'importance au noyau est le fait que la portion du miARN la plus conservée chez les métazoaires est justement la portion 5' (Lim et al., 2003b).

1.1.3.3 L'importance du noyau: La réponse est dans la structure!

La notion de reconnaissance par le noyau a été déterminée à l'aide d'études de conservation, d'identification à grande échelle de cibles et d'utilisation de gènes rapporteurs comme mentionné précédemment. Ce sont toutefois les études structurales qui ont permis de comprendre pourquoi cette section du miARN était si importante. La résolution de la structure de Ago2 interagissant avec un petit ARN lié à sa séquence cible a

permis de comprendre comment le miARN se liait à la protéine et comment cette liaison influençait le mode de reconnaissance du miARN à sa cible (Ma et al., 2005; Parker et al., 2005). Ces travaux ont été effectués par les équipes de Ma et Parker. Il est, par contre, important de mentionner que ces derniers ont utilisé une liaison de complémentarité parfaite entre le petit ARN et la cible. Ils ont pu observer que le premier nucléotide à l'extrémité 5' interagissait directement avec une poche basique de Ago2, ce qui le rendait indisponible pour interagir avec l'ARNm ciblé (Ma et al., 2005; Parker et al., 2005). Les deux groupes suggèrent une étape initiale de liaison de la cible par le miARN nommée nucléation, qui consiste en la liaison des nucléotides du noyau à la cible formant une double hélice de type A. Wang et al. (2008b) ont aussi confirmé que la région disponible du miARN pour lier initialement la cible est l'extrémité 5', donc le noyau. Ils ont pour leur part bloqué le clivage de la cible induit par Ago2 en s'assurant qu'il y ait un mésappariement aux positions 10 et 11 du miARN, ce qui ressemble davantage à la reconnaissance par un miARN, comparativement à un siRNA comme dans les études des équipes de Ma et Parker (Ma et al., 2005; Parker et al., 2005). À la lumière de ces structures et des caractéristiques du noyau, un modèle de reconnaissance a été suggéré par le Dr. David Bartel, modèle qui est illustré à la Figure 4 (Bartel, 2009). Les nucléotides 2 à

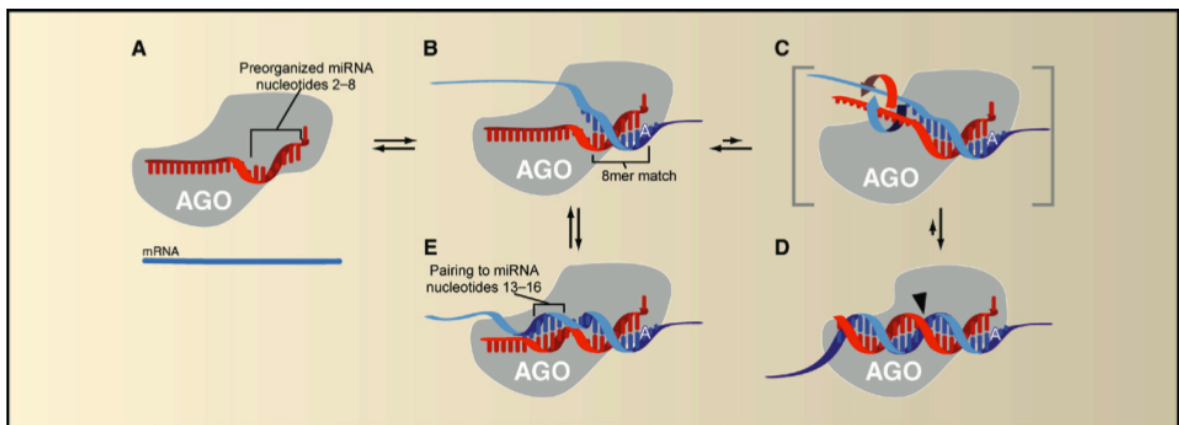


Figure 4. Modèle de nucléation d'un miARN à un ARNm cible. Tirée de (Bartel, 2009)

8 du miARN sont pré-organisés en structure d'hélice, tandis que le premier nucléotide interagit avec Ago2 et n'est donc pas disponible pour la cible (A). La structure en hélice fait en sorte que les nucléotides 9 à 11 sont positionnés du côté opposé au site de recrutement de la cible et donc dans une position défavorable à la liaison initiale, ce qui expliquerait la tolérance à des mésappariements à ces positions (B). L'autre moitié 3' du miARN interagit avec Ago2 et n'est pas positionnée de façon à pouvoir lier la cible. Il y a ensuite liaison de l'ARNm au site de nucléation (seed). La liaison s'initie donc du côté 5' et un changement de conformation majeur permet des appariements additionnels dans le 3' du miARN, ce qui force AGO2 à relâcher un peu son étreinte sur le miARN afin de former une structure en hélice de type A (C). Un appariement parfait tout au long du miARN, comme celui observé dans le cas des siRNA, induira le clivage de la cible dû à son bon positionnement vis-à-vis le site catalytique du domaine PIWI de Ago2 (D). Dans le cas d'une interaction de type miARN causant l'inhibition de la traduction, il est suggéré que, pour l'extrémité 3' du miARN, un appariement au niveau des nucléotides 13-16 du miARN formerait une courte boucle qui ne serait pas défavorable à l'interaction du miARN avec Ago2 (E). Cette suggestion est basée sur les travaux de Grimson et al. (2007) qui ont montré qu'un appariement avec la cible à cette position augmentait l'efficacité de liaison comparativement au noyau seul puisque le nombre d'appariement était augmenté sans affecter la liaison du miARN à Ago2 (Grimson et al., 2007).

1.1.3.4 Importance du contexte du 3'UTR de l'ARNm dans la liaison du miARN.

Si les travaux de Brennecke et al. (2005) ont permis une meilleure compréhension de l'importance des différentes régions du miARN, les travaux de Grimson et al. (2007) ont montré l'importance du contexte du 3'UTR dans lequel se trouve le site de liaison du

miARN. Quatre éléments importants pouvant augmenter le potentiel d'inhibition d'un miARN ont été identifiés et ce de façon indépendante à sa séquence.

1.1.3.4.1 Influence de la structure de l'ARNm à proximité du site de liaison d'un miARN

Les 30 nucléotides en amont et en aval de la séquence complémentaire au noyau du miARN sont plus riches en A et en U. La préférence pour ces nucléotides est principalement due au fait que des structures stables à proximité du site de liaison le rendrait moins accessible. L'importance du contexte dans lequel se retrouve un site de liaison est donc crucial, voir aussi important que le site lui-même. Ce point a été clairement démontré par l'insertion d'un site de liaison fonctionnel dans un 3' NTR dont la structure est différente. Farh et al. (2005) ont pu observer qu'un site permettant une inhibition efficace de la traduction perdait son potentiel d'inhibition lorsqu'il était transféré dans un autre 3'UTR qui ne possédait pas un contexte favorable à la liaison du miARN. De leur côté, Kertesz et al. (2007) ont amené une nouvelle dimension au niveau de l'accessibilité d'un site de liaison d'un miARN qui allait au-delà de la simple force d'interaction entre la

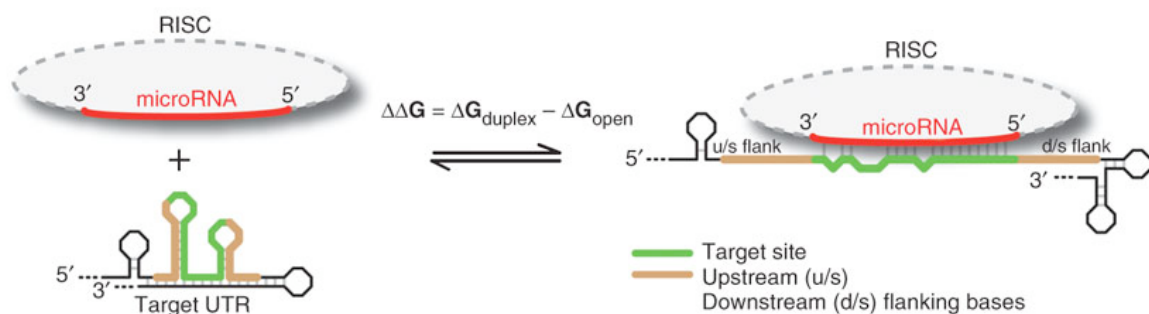


Figure 5. Modèle d'accessibilité au site de liaison impliquant la contrainte du complexe RISC. tirée (Kertesz et al., 2007).

séquence du miARN et la séquence du site de liaison de la cible. Leur modèle est illustré à la Figure 5. Ils ont introduit la notion de structure, non seulement au site de liaison, mais

aussi dans les régions flanquant le site de liaison. Les auteurs ont pu déterminer que le calcul de l'énergie libre était optimal lorsqu'une région couvrant les 17 nucléotides en amont du site de liaison du miARN et jusqu'à 13 nucléotides en aval était prise en considération. Ce calcul tiendrait donc compte, non seulement de l'accessibilité du miARN à la cible, mais aussi de l'accessibilité du complexe RISC qui est recruté par le miARN. De plus, tel que démontré dans la Figure, deux calculs de l'énergie libre sont inclus dans le calcul d'accessibilité du site de liaison. L'accessibilité, $\Delta\Delta G$, est donc calculée par la valeur d'énergie libre d'interaction au niveau de la liaison du miARN à la séquence cible moins l'énergie libre nécessaire pour défaire les structures rendant le site de liaison accessible.

1.1.3.4.2 Influence des protéines de liaison à l'ARN sur la régulation de la traduction des cibles de miARN

Un autre facteur pouvant influencer l'accessibilité d'un miARN à sa cible est la présence de protéines de liaison à l'ARN à proximité d'un site de liaison. Ce phénomène a été décrit pour la première fois chez *C.elegans* par l'équipe du Dr. Slack (Vella et al., 2004). Ils ont montré que la séquence de 27 nucléotides séparant les deux sites de liaison de Let-7 dans le 3'UTR de Lin-41 était essentielle pour que le miARN puisse inhiber la traduction de sa cible. La liaison d'un facteur inconnu semble être un mécanisme plausible puisque la structure ne serait pas en cause. Le laboratoire du Dr. Slack a ensuite montré que la protéine Puf-9 était requise pour la répression de la traduction de l'ARNm de hbl-1 par le miARN let-7 (Nolde et al., 2007).

La présence d'une protéine de liaison à l'ARN à proximité d'un site de liaison d'un miARN peut provoquer deux phénomènes. Il peut y avoir coopération avec le miARN pour l'inhibition de la traduction, mais il peut aussi y avoir compétition pour l'accessibilité du site de liaison. Il a été montré que l'inhibition de la traduction de l'ARNm de CAT-1 pouvait être renversée par la liaison de la protéine HuR en condition de stress (Bhattacharyya et al., 2006). Dans le même ordre d'idée, il existe une compétition entre miR-430 et la protéine Dead end 1 dans le 3'UTR de nanos1 chez le poisson zèbre (Kedde

et al., 2007). Cette compétition permet une expression spécifique de *nanos1* dans les cellules germinales. L'inhibition de l'action de miARN par Dead end-1 a aussi été observée pour miR-372 et sa cible *LATS2* ainsi que pour miR-221 et *p27* dans des cellules humaines tumorales (Kedde et al., 2007). Bien que l'implication des protéines de liaison à l'ARN soit encore limitée à quelques exemples, tout porte à croire qu'il puisse s'agir d'un mécanisme généralisé. Il a été montré que le tiers des sites de miARN sont suivis d'un motif riche en GC (Schmidt et al., 2009). L'existence de nombreux motifs dans les 3'NTR des ARNm ciblés par les miARN laisse présager l'existence de nombreux facteurs pouvant réguler la fonction des miARN.

1.1.3.4.3 Impact de la position du site de liaison dans la cible

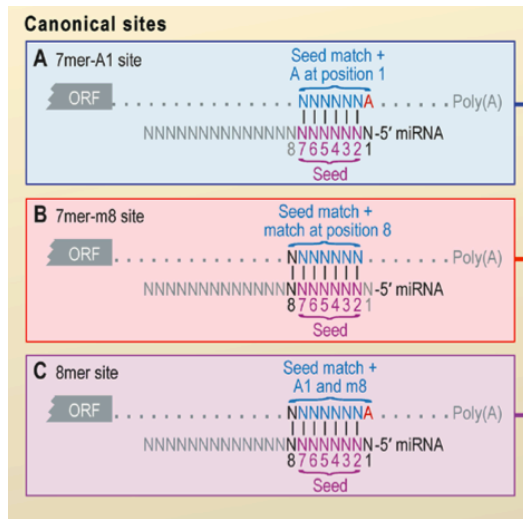
Le deuxième élément favorisant l'inhibition efficace par un miARN défini par Grimson et al. (2007) est l'impact de la localisation du site dans le 3'NTR ciblé. Il semblerait que des sites présents aux extrémités, soit au début ou à la fin, seraient plus propices à une inhibition par le miARN pour les 3'NTR plus longs. Dans ce même ordre d'idée, bien que la plupart des études suggèrent que les miARN lient leurs cibles au niveau de la région du 3'NTR, certains travaux proposent l'implication d'autres régions de l'ARNm. De façon artificiel, Kloosterman et al. (2004) ont démontré la capacité qu'a un miARN à inhiber la traduction malgré le fait que son site de liaison endogène normalement présent dans le 3'NTR soit déplacé au niveau de la région codante ou du 5'NTR. Plus récemment, quelques études ont confirmé l'existence de sites de liaisons endogènes de miARN à l'extérieur du 3'UTR. Forman et al. (2008) ont démontré la capacité de *let-7* à inhiber l'expression de *Dicer* en liant la région codante de son ARNm. Encore plus surprenant, Orom et al. (2008) ont montré que miR-10a augmentait la traduction de protéines ribosomales en se liant au niveau du 5'NTR et Henke et al. (2008) ont observé le même phénomène pour miR-122 et le virus HCV. Ces résultats ouvrent la porte à un nouvel univers dans lequel les miARN pourraient être autant des inhibiteurs que des activateurs de la traduction. Il est toutefois important de noter que le manque

d'observations de liaison ailleurs que dans le 3'UTR peut-être biaisé par le fait que les outils de prédictions bioinformatiques ciblent uniquement cette région des ARNm. De plus, un problème mécanistique s'ajoute au manque d'observations. Le passage du ribosome au niveau de la région codante pourrait déplacer le complexe RISC et empêcher une régulation efficace. Il est important de noter que la conception de siRNA exogènes cible préférentiellement la région codante. L'interaction entre les siRNA et sa cible est toutefois stabilisée par une complémentarité parfaite entre les deux ARN. De plus, le fait que l'ARNm soit clivé nécessite un séjour plus court du complexe RISC sur l'ARNm, comparativement aux miARN. L'observation que les sites de miARN endogènes ne favorisent pas les 15 premiers nucléotides après le codon stop va dans ce sens puisque, le ribosome interagirait avec ces nucléotides, ce qui déplacerait le complexe RISC (Grimson et al., 2007; Yusupova et al., 2001). Finalement, la proximité de plusieurs sites augmente l'intensité d'inhibition de façon synergique, selon le principe de coopération au niveau du recrutement des complexes RISC. Cet aspect a aussi été étudié par Saetrom et al. (2007) qui ont démontré que le phénomène de coopération était optimal si le début de chaque site était séparé par 13 à 35 nucléotides. Cet espacement permettrait une proximité des complexes RISC sans qu'il y est compétition pour les sites de liaisons.

1.1.3.5 Contribution des différents éléments de reconnaissance d'un miARN sur le niveau d'inhibition de la cible

La Figure 6 est un excellent résumé des différentes caractéristiques de reconnaissance d'un miARN qui ont été traitées dans cette section. Elle a été élaborée par le Dr. Bartel en fonction d'analyses quantitatives à grande échelle (Bartel, 2009). Ce modèle permet donc de déterminer la contribution des différents types de reconnaissance sur l'inhibition globale conférée par un miARN. L'intensité d'inhibition en fonction de la nature du noyau est représentée en A. Le noyau optimal serait formé d'une suite de 8 nucléotides appariés avec la cible. Bien que moins efficace au niveau de l'intensité de l'inhibition, une interaction de 7 nucléotides au niveau du noyau demeure fonctionnelle.

A)



B)

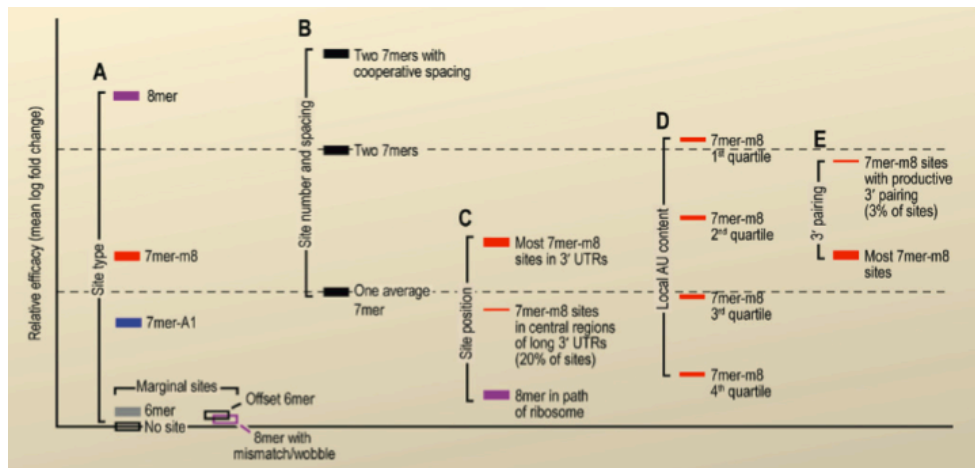


Figure 6. Impact du type de liaison d'un miARN sur le degré d'inhibition de la traduction d'un ARNm A) Illustration des différents types de noyau. B) Efficacité relative des différents types de sites reconnus par les miARN. Tirée de (Bartel, 2009).

Toutefois, l'inhibition semble être perdue en présence de seulement 6 appariements. Le principe de compensation par des appariements en 3' est bien illustré en E et montre que

cette compensation augmente les niveaux d'inhibition sans toutefois atteindre l'intensité d'un noyau interagissant au niveau de 8 nucléotides avec la cible. Fait intéressant, la présence de deux 7mer sans coopération ne serait pas suffisant pour inhiber la traduction à un niveau similaire d'un 8mer, ce qui démontre l'importance de l'interaction d'un nucléotide supplémentaire. Aussi, malgré le fait qu'un 8mer semble être plus performant, il perd tout son potentiel s'il est positionné à un endroit susceptible de rencontrer un ribosome (C). Finalement l'accessibilité du site par la proportion de nucléotides AU est bien illustré en D et démontre une perte d'inhibition dans un contexte hautement structuré.

1.1.4 Mécanisme de régulation de la traduction par les miARN chez les mammifères

1.1.4.1 L'inhibition de la traduction par les miARN : un mécanisme pré ou post-initiation?

La fonction du miARN est de recruter le complexe RISC à un ARNm en s'y liant de façon plus ou moins complémentaire. Bien que le complexe RISC soit responsable de l'activité d'inhibition, c'est le miARN qui définit le type de régulation par son degré de complémentarité avec la cible. Dans le cas d'une complémentarité parfaite, tel qu'observé pour un siRNA ou la plupart des miARN chez les plantes, il y aura clivage de la cible par Ago2, et par la suite, dégradation du transcrit (Song et al., 2004; Yekta et al., 2004). Ce mode d'action ne sera pas traité en détail, puisque c'est plutôt l'inhibition de la traduction qui prédomine chez les mammifères due à une diminution de la complémentarité entre le miARN et ses cibles. Le mécanisme exact par lequel les miARN inhibent la traduction est un débat de longue date. Certains travaux suggèrent un mécanisme d'inhibition au niveau de l'initiation de la traduction, tandis que d'autres semblent favoriser un type post-initiation. Il demeure difficile de déterminer si la divergence au niveau des résultats provient de la variabilité expérimentale ou de l'existence d'une multitude de mécanismes, mais cette dernière proposition semble être la plus probable (Eulalio et al., 2008). Les

différentes études qui ont été faites sont principalement basées sur des expériences de sédimentation sur gradients de glucose et les modèles suggérés sont illustrés à la Figure 7 (Filipowicz et al., 2008). La séparation sur gradient de sédimentation est en fonction de la

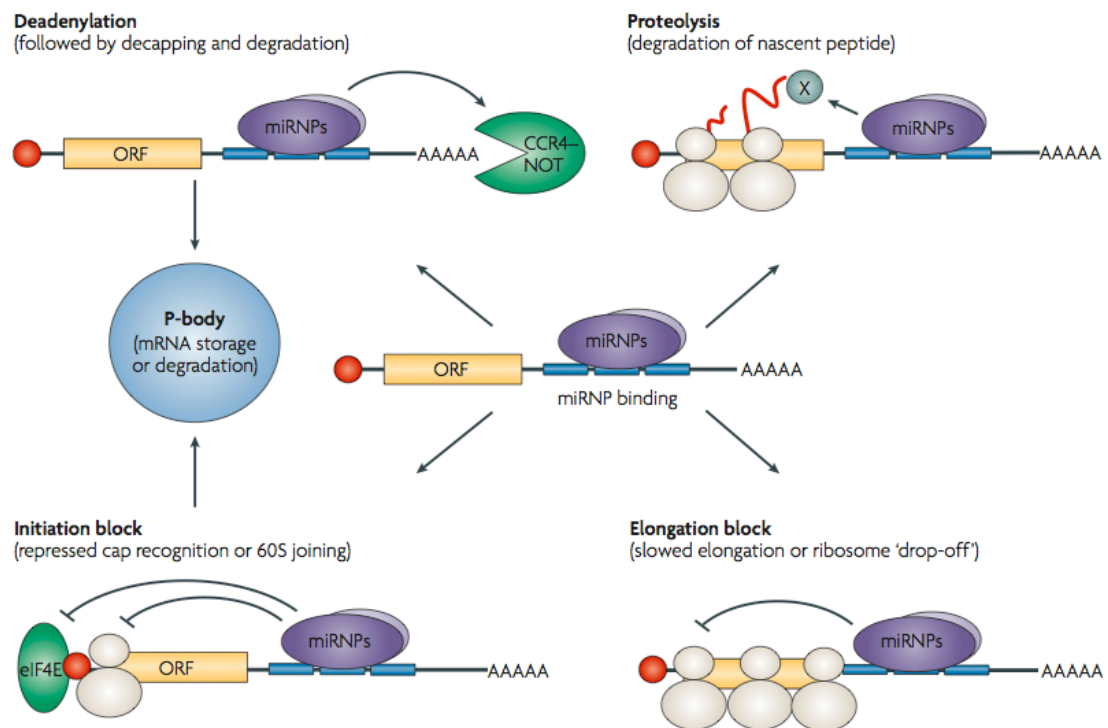


Figure 7. Mécanismes potentiels d'inhibition de la traduction par les miARN. Tirée de (Filipowicz et al., 2008).

grosseur des complexes. Les polysomes, qui sont signe de traduction, sont donc retrouvés dans le bas du gradient, tandis que les transcrits avec peu de ribosomes demeurent dans le haut. Les groupes de Maroney, Nottrott et Simard ont pu observer la présence de miARN et de leurs cibles au niveau de la fraction des polysomes, ce qui suggère un mécanisme d'inhibition après l'initiation de la traduction. De plus, ces polysomes semblent être actifs, puisqu'ils sont sensibles à différentes drogues qui inhibent la traduction (Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006). Le modèle post-initiation est aussi renforcé par l'observation que l'inhibition par les miARN serait indépendante de la présence d'un Internal Ribosome Entry Site (IRES) qui contourne la reconnaissance de la

coiffe, une étape nécessaire à l'initiation de la traduction (Petersen et al., 2006). Basé sur l'observation que les ribosomes se dissociaient plus rapidement lorsqu'ils étaient sur un transcrit possédant des sites de liaison aux miARN, Petersen et al. (2006) ont donc suggéré un mécanisme de dissociation prématurée des ribosomes ou « ribosome drop-off » (Petersen et al., 2006). À l'opposé, d'autres groupes ont observé une traduction résistante au contrôle des miARN en présence d'un IRES et l'absence de miARN et leurs cibles au niveau des polysomes (Mathonnet et al., 2007; Pillai et al., 2005). Fait intéressant, Kiriakidou et al. (2007) ont observé une similarité de séquence entre le facteur d'initiation de la traduction eIF4E et le domaine central des protéines Argonaute. Ils ont vérifié cette observation en démontrant que Ago2 pouvait lier une structure de type cap suggérant un phénomène de compétition avec eIF4E (Kiriakidou et al., 2007). En concordance à cette hypothèse, l'ajout de facteurs eIF4E dans une expérience *in vitro* diminuait l'effet d'inhibition des miARN, probablement par une compétition de la liaison des coiffes disponibles (Mathonnet et al., 2007).

1.1.4.2 Impact de l'inhibition d'un miARN sur les niveaux de l'ARNm ciblé

Un autre aspect qui a créé une certaine polémique par la divergence des observations est l'absence ou la présence d'une diminution des niveaux des ARNm ciblés par les miARN. Les premières études faites avec les miARN suggéraient fortement un mécanisme dans lequel les niveaux protéiques des cibles étaient diminués, sans que les ARNm soient affectés. Toutefois, plusieurs études ont démontré qu'une diminution des niveaux de l'ARNm ciblé pouvait accompagner l'inhibition de la traduction (Filipowicz et al., 2008). Schmitter et al. (2006) ont démontré, dans des cellules humaines, que l'inhibition de l'expression de Dicer ou de Ago2 provoquait l'augmentation de certains ARN messagers possédant des sites de liaisons pour des miARN. Fait intéressant, cette diminution des niveaux des ARNm par les miARN semble être cellule-spécifique. Par

exemple, let-7 diminuerait d'avantage les niveaux de certaines cibles dans les cellules HEK293 comparativement aux mêmes ARNm dans les cellules HeLa (Schmitter et al., 2006). De plus, ce phénomène semble être conservé, puisque les mêmes observations ont été faites chez le poisson zébré et la drosophile, qui sont des modèles de choix pour étudier la régulation par les miARN (Giraldez et al., 2006; Rehwinkel et al., 2006). Ces diminutions seraient induites par une accélération de la déadénylation ou du décoiffage du messager (Filipowicz et al., 2008; Wu et al., 2006).

La dégradation des ARNm implique deux voies distinctes impliquant une étape initiale commune de déadénylation. Il s'ensuit une dégradation par l'exosome dans l'orientation 3'-5' ou un décoiffage permettant une dégradation de type 5'-3' impliquant l'exonucléase XRN1 (Parker and Song, 2004). Le mécanisme exact de déstabilisation d'un ARNm inhibé par un miARN n'est pas encore bien caractérisé. Par contre, certaines études montrent une forte corrélation entre l'inhibition de la machinerie de déadénylation (CCR4-NOT), la machinerie de décoiffage (DCP1, DCP2) et la perte des diminutions des niveaux des ARNm régulés par les miARN (Behm-Ansmant et al., 2006). Deux modèles sont suggérés à la Figure 7 impliquant des mécanismes de déadénylation ou d'enlèvement de la coiffe en 5'. La délétion de ces facteurs n'influence toutefois pas l'inhibition de la traduction induite par les miARN, ce qui suggère deux mécanismes indépendants, et même probablement complémentaires dans certains cas. Une étude a permis de comparer à grande échelle l'impact d'un miARN au niveau de l'inhibition de la traduction comparativement à la déstabilisation de l'ARNm. Le groupe du Dr. Bartel a pu observer qu'en général, l'inhibition de la traduction permettait une diminution de l'expression des protéines ciblées à des niveaux inférieurs à 33% (Baek et al., 2008). Sur 305 cibles identifiées pour miR-223 l'expression de seulement 5 ARNm cibles était diminuée de plus de 33% lorsque l'inhibition de la traduction était le seul mécanisme utilisé. Bien que ces travaux soient basés sur un seul miARN endogène, ces résultats suggèrent que la dégradation des ARNm induite par les miARN est un mécanisme plus répandu que prévu.

Dans le même ordre d'idée, il serait important de mentionner l'existence des corps P qui pourraient être impliqués dans la régulation des miARN. Les corps P (ou *P bodies*) sont des granules localisés dans le cytoplasme des cellules eucaryotes qui sont enrichies de protéines impliquées dans la dégradation des ARNm (Parker and Sheth, 2007). La colocalisation de miARN et des protéines Ago dans ces structures ont suggéré l'implication des corps P dans le mécanisme d'action des miARN (Liu et al., 2005). Cette observation suggère donc l'existence d'une compartimentalisation potentielle de l'action des miARN. L'implication réelle et l'importance des corps P dans la régulation des miARN ne sont toutefois pas encore claires. Des études ont démontré que ces structures n'étaient pas essentiels à l'inhibition des miARN sur leurs cibles et le recrutement des ARNm pourrait donc être une conséquence plutôt qu'une cause (Eulalio et al., 2007).

1.1.4.3 L'augmentation de la traduction: Une nouvelle fonction pour les miARN

Les travaux de l'équipe du Dr. Steitz ont remis en question les croyances sur les mécanismes d'action des miARN. Tous s'entendaient pour dire que l'effet d'un miARN était limité à une diminution de l'expression de sa cible. Vasudevan et al. (2007) se sont intéressés aux mécanismes permettant l'augmentation de la traduction de messagers possédant des éléments de séquence riches en nucléotides A et U (Vasudevan and Steitz, 2007). Ils ont observé que Ago2 et FXR1, deux facteurs impliqués dans le mécanisme d'action des miARN, étaient essentiels au recrutement dans les polysomes de TNF α , un messenger possédant des éléments ERA dans son 3'NTR. Le lien entre les miARN et ce processus a été fait lors de la poursuite de leurs travaux. Ils ont pu montrer que lors d'un arrêt du cycle cellulaire, le recrutement de FXR1 et de Ago2 au 3'NTR de TNF α dépendait du miARN miR-369-3 (Vasudevan et al., 2007). Ils ont observé le même phénomène avec le miARN let-7 et sa cible HMGA2. Ce phénomène semble aussi exister lors de la quiescence, puisque l'arrêt de la division par inhibition de contact a aussi permis d'observer

ce phénomène (Vasudevan et al., 2008). Il est encore un peu tôt pour affirmer que ces observations sont généralisées à tous les miARN et leurs cibles. Il est toutefois évident que ces travaux donnent une nouvelle ouverture à l'étendue de la régulation des miARN sur les différents processus biologiques.

1.1.5 Effets biologiques des miARN

1.1.5.1 Les miARN sont impliqués dans une multitude de processus cellulaires différents

À ce jour, plusieurs cibles de miARN ont été identifiées et la variété des processus cellulaires impliqués démontre clairement l'importance de ces petits ARN. Il est maintenant évident qu'un miARN, dû à son mode de reconnaissance, a le potentiel d'inhiber simultanément la traduction de centaines de cibles. Toutefois, la majorité des études caractérisant les miARN endogènes montrent l'inhibition d'une seule cible dû à l'ampleur du travail nécessaire. Bien que réductionniste, cette approche a permis un avancement considérable au niveau de la compréhension de l'implication de ces petits ARN dans le bon fonctionnement de la cellule. Par exemple, Zhao et al (2005) ont démontré qu'un excès d'expression de miR-1 causait une diminution de la prolifération des cardiomyocytes ventriculaires, ce qui provoquait une malformation cardiaque. Ce phénomène a été expliqué par la capacité de miR-1 à inhiber la traduction de Hand2, un facteur de transcription impliqué dans ce processus. Il a aussi été démontré que miR-375 inhibait la sécrétion d'insuline en inhibant la Myotrophin (Poy et al., 2004). Les miARN sont aussi impliqués au niveau de la prolifération et de l'apoptose. Le potentiel suppresseur tumoral de miR-15a et miR-16-1 a été expliqué par leur capacité à inhiber l'expression de BCL-2, un gène anti-apoptotique exprimé dans différents types de cancer (Cimmino et al., 2005). De son côté, le miARN let-7 est aussi considéré comme un suppresseur tumoral en inhibant l'expression de l'oncogène HMGA2 (Lee and Dutta, 2007). Ces exemples ne sont qu'une infime partie du nombre des cibles identifiées et démontrent bien la variété des fonctions des miARN. Des

dizaines, voir des centaines d'exemples supplémentaires pourraient être énumérés, mais il ne s'agit pas du but de ce travail. Des exemples supplémentaires seront toutefois énoncés dans la section présentant le polycistron de miARN miR-17-92.

1.1.5.2 Potentiel des miARN à inhiber simultanément des centaines de cibles

Les avancements technologiques des dernières années ont permis de mesurer simultanément des milliers d'ARNm ou de protéines, ce qui nous donne une idée plus réelle et globale de la fonction des miARN. Par exemple, le développement des micropuces à miARN, ou *miarrays*, a permis un avancement significatif dans l'étude des réseaux de régulation impliquant les facteurs de transcription, mais aussi les miARN. Cette technique demeure toutefois limitée pour l'étude des miARN puisque, comme mentionné précédemment, une diminution des niveaux de l'ARNm n'accompagne pas nécessairement l'inhibition de la traduction. Lim et al. (2005) ont été les premiers à utiliser cette approche. Ils ont transfecté miR-124 dans les cellules HeLa, un miRNA préférentiellement exprimé dans le cerveau, et miR-1, préférentiellement exprimé dans les muscles. Les auteurs ont pu observer la diminution de l'expression d'une centaine de cibles possédant un site de liaison potentiel pour chaque miARN. Fait intéressant, le profil d'expression des ARNm était davantage caractéristique du type cellulaire dans lequel ces miARN sont normalement exprimés. Ces résultats montrent donc la puissance de ces petits ARN au niveau de la différenciation cellulaire et de l'établissement des profils d'expression déterminant la nature de chaque cellule. Les effets observés sont toutefois limités à la déstabilisation des niveaux d'ARNm et ne tiennent donc pas compte de l'inhibition de la traduction. Il est donc possible de penser qu'il devrait y avoir davantage de cibles pour ces miARN et que des effets observés de plus de deux fois reste une possibilité en combinant les effets dus à la dégradation du messager et à l'inhibition de la traduction.

Récemment, deux groupes ont pu mesurer de façon globale l'effet des miARN sur les niveaux protéiques. Les laboratoires des Drs. Bartel et Rajewsky ont utilisé un marquage d'acides aminés à l'aide d'isotopes stables couplé à la spectrométrie de masse permettant de mesurer les niveaux de milliers de protéines simultanément (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). Par exemple, le Dr. Bartel a pu observer dans les neutrophiles délétés de miR-223 une augmentation de 305 protéines possédant une séquence complémentaire au noyau du miARN. Il serait possible d'envisager un plus grand nombre de cibles pour miR-223 en considérant les cibles pouvant être reconnues de façon moins conventionnelle (Baek et al., 2008). De leur côté, le laboratoire du Dr. Rajewsky a identifié plus de 300 protéines diminuées de plus de 30% par let-7, ce qui démontre aussi la possibilité pour un miARN d'interagir simultanément avec des centaines de cibles (Selbach et al., 2008).

1.1.5.3 Classification de l'activité des miARN en fonction des effets et du nombre de cibles

Puisqu'un miARN a le potentiel d'inhiber des centaines de cibles, il est important de comprendre que l'effet biologique global induit par son expression dépend de l'addition des effets conférés à chacune de ses cibles. De plus, l'effet final d'un miARN est cellule spécifique, puisqu'il dépend de différents facteurs propres à chaque lignée cellulaire. Premièrement, le niveau d'expression du miARN et des cibles à une incidence directe sur le potentiel d'inhibition et, par le fait même, la co-expression de la cible et du miARN est essentielle. Il serait possible de classifier l'activité des miARN en trois catégories basées sur leur impact global et donc sur l'addition des effets sur chacune des cibles. Ces classes sont illustrées à la Figure 8 (Flynt and Lai, 2008). Flynt et al. (2008) ont fait une association très intéressante entre l'intensité de la répression, l'effet biologique global et le

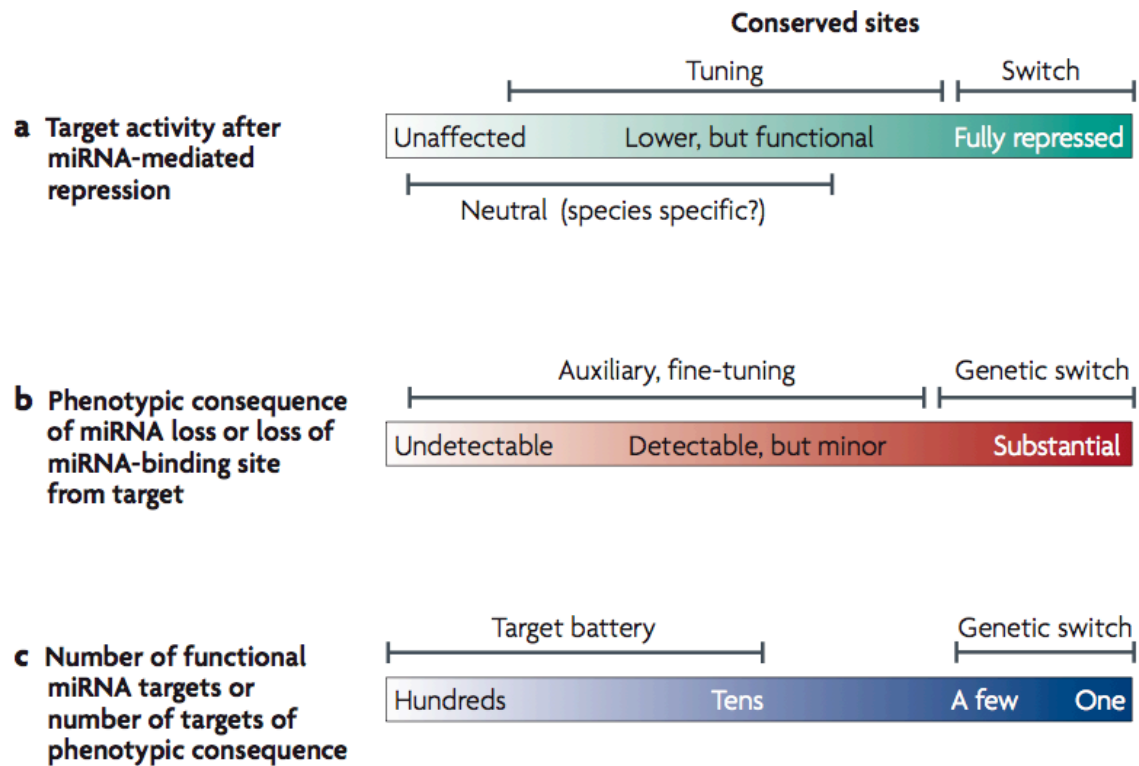


Figure 8. Relation entre l'intensité d'inhibition d'un miARN, l'impact biologique et le nombre de cibles. Tirée de (Flynt and Lai, 2008).

nombre de cibles inhibées par un miARN. La première classe est de type interrupteur. Ce mode de régulation implique une inhibition drastique de l'expression des gènes cibles par le miARN, ce qui induit une réponse biologique claire (B) due à la disparition quasi complète de la protéine ciblée. Le cas mentionné précédemment du miARN *lin-4* qui régule *lin-14* dans le développement de *C.elegans* constitue un bon exemple (Lee et al., 1993). Le mode de régulation interrupteur est souvent présent dans le développement et est caractérisé par une expression pratiquement exclusive de la cible ou du miARN (Figure 9A) (Bartel and Chen, 2004). Ce principe est aussi bien illustré à la Figure 9B, qui montre l'implication de

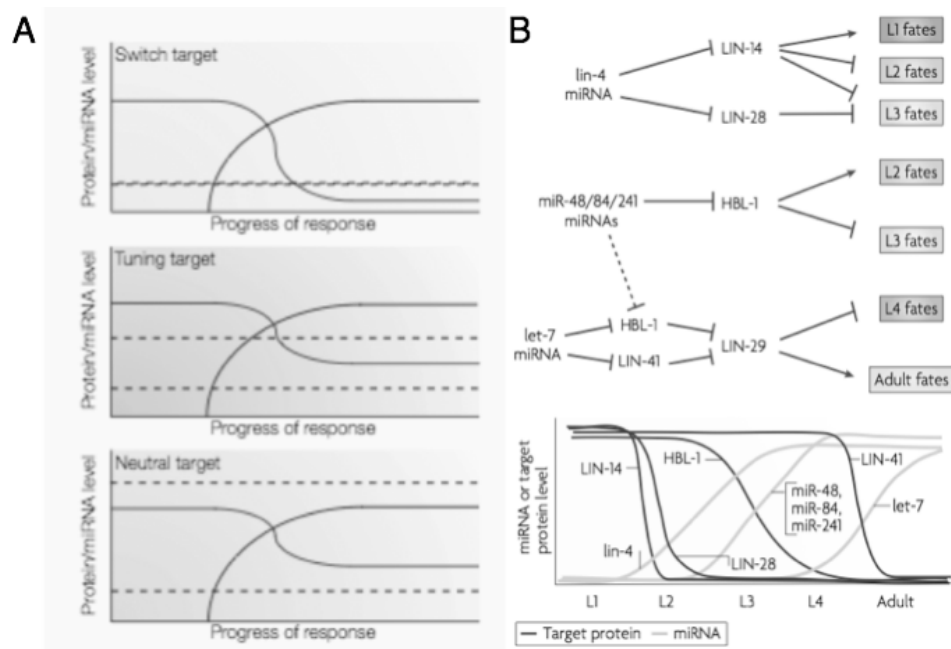


Figure 9. Incidence de l'intensité d'inhibition d'un ARNm par un miARN sur leurs co-expression potentielle. A. Tirée de Bartel et al. (2004) et B. tirée de Flynt et al. (2008)

A) corrélation de l'expression d'un miARN et sa cible en fonction du mode de régulation (Bartel and Chen, 2004) B) Implication des différents miARN interrupteurs dans la voie de développement hétérochronique chez *C. elegans*.

l'expression différentielle de différents miARN permettant le passage d'une phase de développement à une autre chez *C. elegans*. Pour les miARN de cette classe, l'effet biologique observé est la conséquence de l'inhibition très efficace d'une ou de quelques cibles (Figure 8C).

La deuxième classe représente le mode de régulation principal des miARN, soit l'effet tampon ou d'ajustement fin de l'expression de la cible. Dans ce type de régulation, le miARN n'inhibe pas complètement sa cible, mais contrôle ou limite son expression. Le miARN inhiberait de façon simultanée des dizaines voir des centaines de cibles différentes et l'effet biologique observée est la conséquence de l'addition de toutes ces diminutions.

Puisque l'inhibition des cibles n'est pas complète, il y aura co-expression du miARN et des protéines ciblées (Figure 9A). Cloonan et al. (2008) ont démontré de façon très convaincante la nécessité d'utiliser une approche du type biologie des systèmes afin d'avoir une vue globale et réaliste de l'effet d'un miARN. Ils ont étudié l'effet du miARN miR-17-5p sur la prolifération des cellules HEK293T. MiR-17-5p fait partie du polycistron de miARN miR-17-92 qui sera discuté en détails ultérieurement. Ce polycistron était connu pour avoir un effet pro-prolifératif, mais aussi anti-prolifératif dépendamment du contexte cellulaire (Mendell, 2008). La Figure 10 résume les résultats obtenus par Cloonan et al. et démontre bien la complexité de la régulation conférée par un miARN. Ils ont pu démontrer

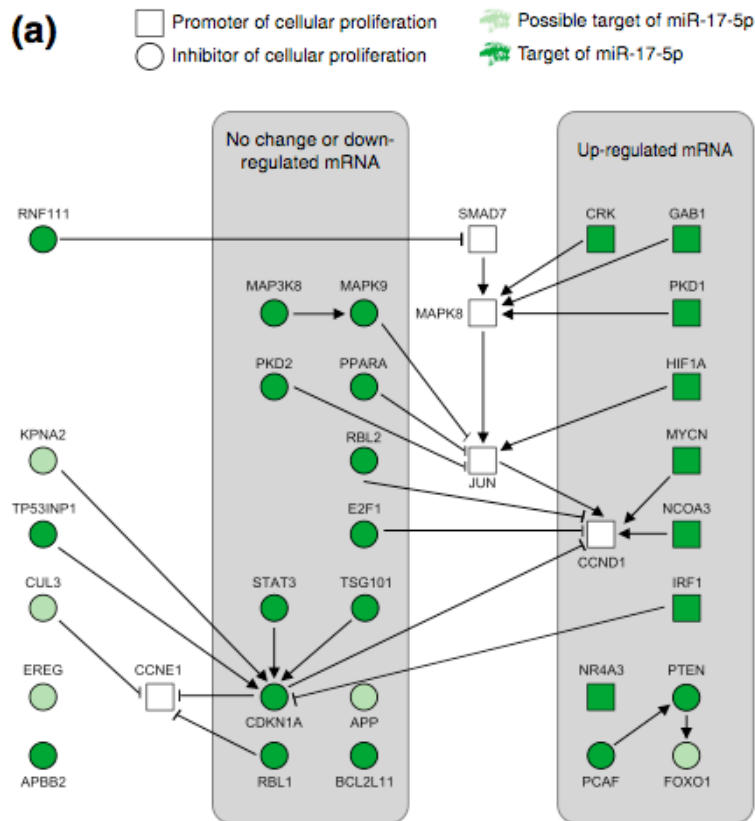


Figure 10. Résumé des résultats de Cloonan et al. sur la régulation de la prolifération de miR-17 dans les cellules HEK293T. Tirée de (Cloonan et al., 2008)

que dans les cellules HEK293T, miR-17-5p inhibait l'expression autant de gènes pro-prolifératif qu'anti-prolifératif. L'effet biologique observé représente donc l'addition de toutes les diminutions des cibles de ce miARN. Puisque, dans ce type cellulaire, l'inhibition des gènes anti-prolifératifs est plus marquée que l'inhibition des gènes pro-prolifératifs, l'effet biologique global de miR-17 est un avantage prolifératif. Ces travaux démontrent bien la nécessité d'études à grande échelle afin de bien cerner l'impact des miARN. Finalement, le type de régulation interrupteur ou tampon ayant une utilité pour la cellule représente donc des miARN et des sites de liaisons qui ont été conservés au cours de l'évolution.

À l'opposé, la dernière classe de cibles de miARN nommée neutre n'aurait pas d'impact réel sur la cellule et apparaît et disparaît au cours de l'évolution.

1.1.5.4 L'effet concerté des miARN permet la régulation de processus biologiques complexes

Le fait que les miARN puissent réguler l'expression de plusieurs cibles simultanément les place au centre de réseaux de régulations complexes. La voie hétérochronique de développement de la larve chez *C.elegans* est un très bon exemple et est illustrée à la Figure 9B. Pour former un ver adulte, la larve doit passer à travers plusieurs phases de développement qui nécessite l'inhibition de l'expression de facteurs clés. L'expression de différents miARN est donc synchronisée et permet l'inhibition de cibles à un moment précis. Dans ce processus, un miARN peut inhiber l'expression de plus d'un facteur. Par exemple, le miARN lin-4 permet la transition entre les phases L1 et L2 par l'inhibition des facteurs LIN-14 et LIN-28. D'un autre côté, plusieurs miARN peuvent être impliqués dans la régulation de l'expression d'une seule cible. Le passage de la phase L2 à L3 nécessite l'inhibition de HBL-1 par miR-48, miR-84 et miR-241. Le développement normal du ver requiert donc l'action de différents miARN qui coopèrent pour permettre le passage d'une phase à une autre. La voie hétérochronique n'est qu'un exemple parmi tant

d'autres permettant d'illustrer la complexité de l'implication des miARN dans la régulation de processus biologiques essentiels.

1.1.6 Réseaux de régulation impliquant les miARN

1.1.6.1 Analogie entre les miARN et les facteurs de transcription

Afin de bien saisir la complexité et l'importance des miARN dans la régulation de l'expression génique d'une cellule, il serait possible de les comparer aux facteurs de transcription. En fait, il existe plusieurs similarités quant à leurs mécanismes d'action qui sont illustrés à la Figure 11. La diminution de complémentarité entre un miARN et sa cible comparativement à un siRNA peut sembler être un désavantage, mais c'est loin de l'être. Ce mode de reconnaissance fait en sorte qu'un miARN peut réguler des centaines de cibles différentes à la manière des facteurs de transcription. De plus, bien que la nature des cibles soit différente, les miARN et les facteurs de transcription sont des régulateurs de type trans déterminant l'expression d'une multitude de gènes en liant des éléments de régulation en cis (Hobert, 2004). Il existe aussi un phénomène de coopération entre les différents facteurs de transcription, où l'intensité de la transcription résulte de la combinaison des facteurs liés au niveau du promoteur (Hobert, 2008). Ce mode de régulation impliquant la combinaison de l'action de différents miARN pouvant résulter en un effet de coopération existe aussi et est illustré à la Figure 12 (Flynt and Lai, 2008). Un ARNm peut donc posséder plusieurs sites pour le même miARN ou encore des sites uniques pour différents miARN. Ces deux situations ont la même conséquence, soit l'accumulation de plusieurs complexes RISC au niveau du 3'UTR d'un ARNm, ce qui amplifie l'effet d'inhibition. De plus, la proximité de 2 sites pour le même miARN ou des miARN différents peut résulter en un phénomène de coopération, où l'inhibition augmente de façon synergique (Saetrom et al., 2007).

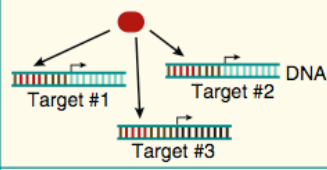
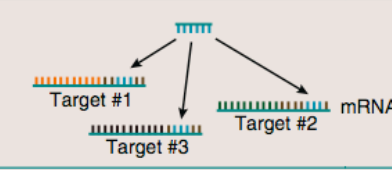
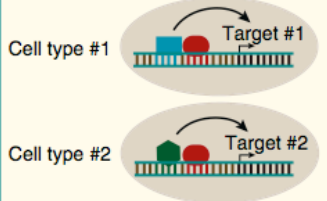

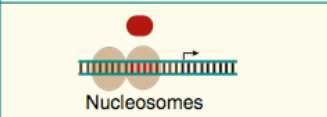
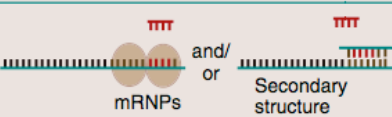
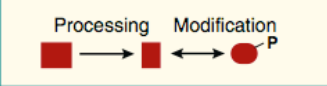
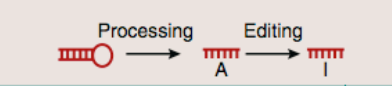


	Transcription factors	miRNAs
Pleiotropy		
Combinatorial and cooperative activity		
Accessibility		
Regulation		
Network motifs		

Figure 11. Comparaison des caractéristiques des miARN aux facteurs de transcription. Tirée de (Hobert, 2008).

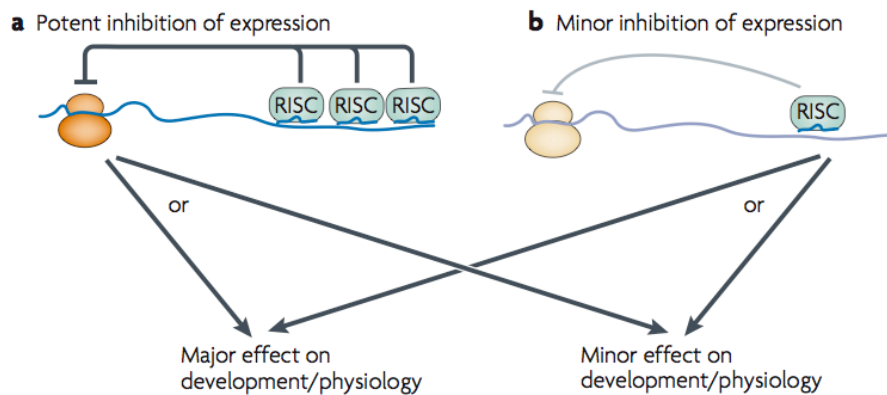


Figure 12. Impact du nombre de sites de miARN présents sur un ARNm par rapport au degré d'inhibition de la traduction. Tirée de (Flynt and Lai, 2008).

Une troisième ressemblance flagrante illustrée à la Figure 11 est la régulation de l'accessibilité des régulateurs à leurs cibles. Dans le cas des facteurs de transcription, il existe différents mécanismes bien caractérisés de remodelage de la chromatine qui peuvent permettre ou empêcher la liaison à la cible (Hirose, 1998). Dans le cas des miARN, il est évident que la structure du 3'UTR de la cible a un impact direct sur leur potentiel d'inhibition. La régulation de l'accessibilité des sites afin d'influencer l'action des miARN n'est pas un phénomène bien caractérisé. Toutefois, certains travaux suggèrent fortement l'existence d'un tel mécanisme pouvant moduler l'activité des miARN. Par exemple, Kedde et al. (2007) ont pu observer, dans une lignée cellulaire tumorale, que la protéine Dead End 1 avait la capacité de lier le 3'UTR de LATS2 et d'empêcher l'inhibition de miR-372 de façon allostérique.

Il est aussi bien établi que l'activité des facteurs de transcription est régulée par des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, l'acétylation et l'ubiquitination (Hobert, 2008). Étonnement, malgré le fait que les miARN soient formés d'ARN, il existe des modifications qui influencent leurs actions. Kawahara et al. (2007) ont démontré que le phénomène de l'édition de l'ARN pouvait modifier la séquence des miARN en substituant certaines adénosines en inosines. Par exemple, cette modification au niveau d'un nucléotide dans le noyau de miR-376 a le potentiel de rediriger le miARN vers d'autres cibles. Finalement, les résultats de Vasudevan et al. discutés précédemment permettent de faire une autre analogie avec les facteurs de transcription (Vasudevan et al., 2007; Vasudevan et al., 2008). Le fait que les miARN puissent augmenter la traduction lors d'un arrêt du cycle cellulaire permet aussi de les considérer comme des activateurs de l'expression génique. Comme les facteurs de transcription ils peuvent donc réguler de façon négative ou positive l'expression de leurs cibles.

1.1.6.2 Les miARN et les facteurs de transcription sont impliqués dans des boucles de régulation complexe

La régulation de l'expression des gènes d'une cellule est un processus extrêmement complexe et les facteurs de transcription ainsi que les miARN font partis de réseaux de régulation très organisés. Différents motifs de régulation existent donc dans la cellule permettant l'amplification d'une réponse ou encore la surveillance du degré d'expression de différents gènes. Par leurs fonctions en tant qu'inhibiteur, les miARN sont principalement impliqués dans des boucles de rétroactivation négatives. Comme illustré à

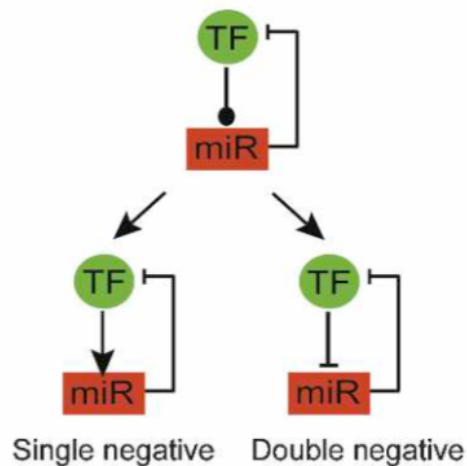


Figure 13. Types de boucles de rétroactivation négative existant entre les facteurs de transcription et les miARN. Tirée de (Martinez et al., 2008).

Figure 13, il existe deux types de boucles de rétro-activation négative dépendamment de l'effet du facteur de transcription sur le miARN. Lorsque le miARN est activé par un facteur de transcription qui est sa cible, il s'agit d'une boucle de rétro-activation négative simple puisqu'il n'y a qu'une inhibition. Lorsque le miARN inhibe l'expression d'un facteur de transcription qui le réprime aussi, il s'agit d'une boucle de rétro-activation négative double. Plusieurs boucles ont été identifiées, comme celle entre miR-9 et le récepteur nucléaire LTX; entre miR-27a et RunX1 au niveau de la megakaryopoïèse; entre miR-20 et la cycline D1 (Ben-Ami et al., 2009; Yu et al., 2008; Zhao et al., 2009). Les

études de Tsang et al. (2007) suggèrent aussi que ces réseaux de régulation sont communs chez les mammifères. Sur 45 miARN étudiés chez l'humain, 69% des miARN font partis d'une boucle de rétroactivation négative simple ou double. De leur côté, Martinez et al. (2008) ont identifié l'existence de 23 boucles de rétro-activation négatives chez *C.elegans* par la technique de simple-hybride chez la levure. La Figure 14 démontre bien l'énorme complexité des boucles de rétro-activation ainsi que l'effet de ces boucles sur le fonctionnement de la cellule. Fait intéressant, bien que ce soit deux types de boucles de rétroactivation négatives, une boucle simple dans laquelle le facteur de transcription active le miARN n'a pas le même effet final qu'une double boucle dans laquelle le facteur l'inhibe. Pour bien saisir le principe, il faut comprendre que le miARN et le facteur de transcription impliqués dans la boucle ont d'autres cibles respectives et sont aussi régulés par d'autres facteurs. Dans ce contexte, une boucle de rétro-activation négative double peut générer l'expression exclusive du facteur de transcription ou du miARN ainsi que de leurs cibles respectives (Figure 14A). Puisqu'exclusifs, deux états sont possibles. Le premier est l'expression du facteur de transcription agissant sur ces cibles et le second est l'expression du miARN et donc l'inhibition de ses cibles respectives. Ce sont les signaux en amont qui décideront de l'état préconisé par la cellule. Par exemple, l'activation initiale du facteur de transcription induira son expression et le premier état sera établi. À l'opposé, l'activation initiale du miARN forcera le système à atteindre le deuxième état. De l'autre côté, la boucle de rétro-activation négative simple permet une expression stable des deux composantes tout en assurant un niveau acceptable d'expression du facteur de transcription en s'opposant aux fluctuations trop intenses. Cette boucle permet donc l'oscillation de l'expression du facteur de transcription et ensuite du miARN sans que l'expression du facteur de transcription n'atteigne un niveau critique pour la cellule.

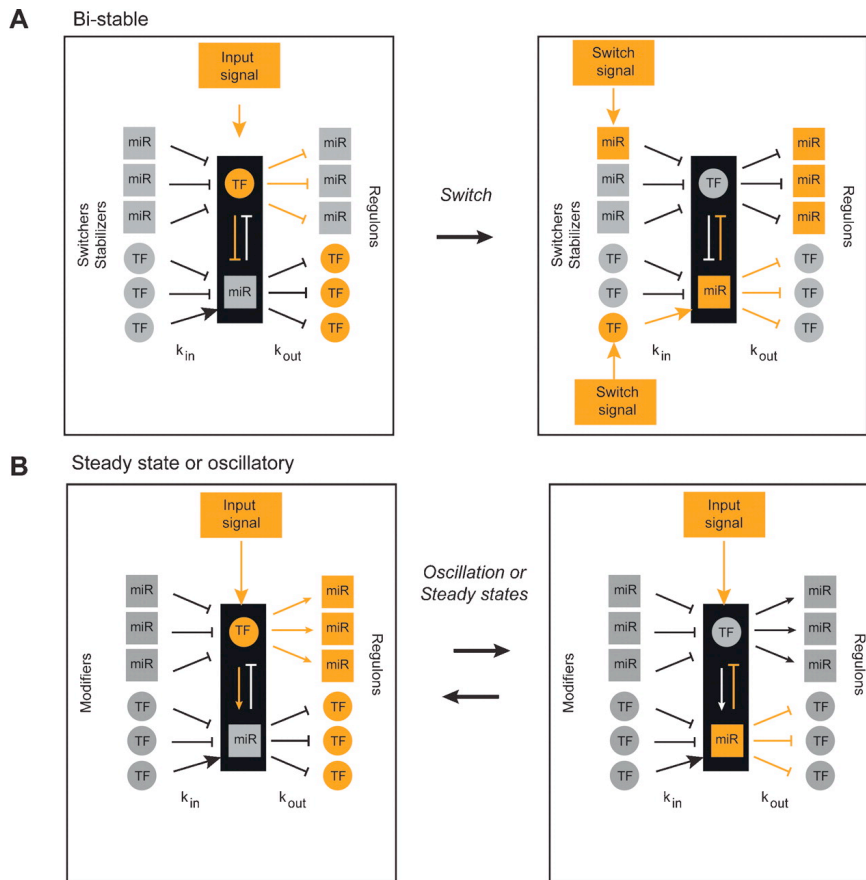


Figure 14. Modèle de la fonction des boucles de régulation négatives dans le processus d'expression génique. Tirée de (Martinez et al., 2008).

1.1.7 La bioinformatique : un allié important dans l'identification des cibles des miARN

La bioinformatique fait partie intégrante de la recherche sur les miARN et c'est en partie grâce à cette discipline que le domaine a évolué aussi rapidement. Le développement de programmes bioinformatiques a permis un avancement considérable au niveau de trois différents aspects. Premièrement, la structure en tige-boucle des précurseurs de miARN et sa conservation parmi les différentes espèces ont mené au développement d'outils

permettant l'identification de miARN potentiels dans différents génomes. L'avantage de cette approche est qu'elle fait fit de l'abondance relative du miARN, favorisant l'identification de miARN présents en abondance, ainsi qu'à l'expression spatiotemporelle des différents miARN, qui implique le clonage dans le bon type cellulaire et au bon moment. (Bentwich et al., 2005; Berezikov et al., 2005; Grad et al., 2003). Le deuxième aspect est au niveau de programmes permettant l'analyse d'une immense quantité d'informations obtenues par des études à grande échelle (Baek et al., 2008; Lim et al., 2005; Selbach et al., 2008). Ces programmes ont permis l'élaboration des différentes règles permettant d'expliquer l'interaction d'un miARN à l'ARNm ciblé. Cette approche est nécessaire à l'avancement des connaissances, mais peut biaiser les règles en mettant l'emphase sur les événements les plus fréquents. Par exemple, la communauté scientifique a considéré pendant longtemps que les miARN liaient leurs cibles uniquement au niveau de la région 3'NTR des ARNm. Les outils de prédiction ont mis l'emphase sur ces régions négligeant ainsi les sites de liaison au niveau du 5'NTR et de la région codante. Finalement, l'aspect qui nous intéresse le plus est le développement de programmes bioinformatiques permettant de prédire les cibles potentielles des miARN. Ces programmes sont tous basés sur les règles de reconnaissance d'un miARN pour ses cibles, mais ils ont chacun leurs différences. Les principaux programmes utilisés dans le domaine sont TargetScan (Enright et al., 2003; Kiriakidou et al., 2004; Krek et al., 2005; Lewis et al., 2005; Rehmsmeier et al., 2004). Les caractéristiques majeures de ces différents programmes sont illustrées dans le Tableau 1. Tiré de (Sethupathy et al., 2006b). La première différence majeure est que seuls Diana-MicroT et miRanda sont des programmes directement disponibles sur le web, comparativement aux autres qui sont des listes de prédictions pré-enregistrées. Diana MicroT et miRanda seraient donc les programmes de choix pour un utilisateur ayant identifié de nouveaux miARN. La stratégie de recherche de cibles potentielles pour un miARN donné est la même pour tous ces programmes. Elle consiste en la recherche d'une séquence complémentaire au noyau du miARN d'intérêt, mais chacun possèdent différents critères quant aux types d'interactions préconisées. Par exemple TargetScan cherche une

Tableau 1. Caractéristiques des différents programmes de prédiction de cibles des miARN endogènes. Tirée de (Sethupathy et al., 2006b).

Features	TargetScan	D-microT	miRanda	TargetScanS	PicTar
Sequence					
Perfect seed match rule	×			×	
Preference for perfect seed match ^a					×
Empirically determined binding rules		×			
Dynamic programming alignment score cutoff			×		
Seed 5' and/or 3' flank requirements				×	
Thermodynamics					
ΔG calculations based on traditional RNA folding programs	×	×	×		
ΔG calculations based on programs for short nucleic acid hybridizations					×
Conservation					
Only between human and rodent species		×	× ^b		
Among human, chimp, rodent, and dog	×		× ^b	×	×
Residing in an 'island' of conservation				×	

^aPicTar^{10,25} does predict targets with imperfect seed matches, but preferentially predicts targets with perfect seed matches. ^bmiRanda provides the option of running the program under both parameters. The comparative study presented in this paper uses the "only human and rodent" version of miRanda.

séquence parfaitement complémentaire aux nucléotides 2 à 7 du miARN, tandis que PicTar, miRanda et Diana-microT permettent des mésappariements. Ces deux derniers tiennent toutefois compte de l'énergie libre d'interaction entre le noyau du miARN et la cible afin que l'interaction soit suffisamment stable malgré la présence de mésappariements. Afin de diminuer le nombre de faux positifs, la conservation du site à travers les espèces est considérée. Pour qu'un ARNm soit considéré comme une cible potentielle par TargetScan et PicTar, le site de liaison doit être conservé à travers 5 espèces, tandis que MiRanda et DIANA-MicroT analysent uniquement les espèces humaine et murine. Finalement, les différents programmes prennent en considération l'accessibilité de la cible en calculant l'énergie libre du site potentiel. Ils utilisent tous des programmes déjà existant calculant le repliement de la structure secondaire de l'ARN, à l'exception de PicTar, qui utilise un programme basé sur l'hybridation d'un oligonucléotide à la cible. Basé sur les interactions validées expérimentalement et répertoriées dans TarBase, Sethupathy et al. ont calculé la sensibilité de chaque programme d'après leurs prédictions bioinformatiques (Sethupathy et al., 2006a; Sethupathy et al., 2006b). Les auteurs ont calculé la sensibilité en faisant le ratio des vrais positifs (vérifié expérimentalement trouvé par le programme) sur l'addition des

vrais positifs et faux négatifs (interaction expérimentalement non-trouvé par le programme). Une sensibilité d'environ 65% a été obtenue pour MiRanda, TargetScan et Pictar. Toutefois, le nombre d'interactions totales suggérées par MiRanda est pratiquement le double des deux autres. Cet aspect suggère la présence de plus de faux positifs, ce qui n'est pas tenue en compte par le calcul de la sensibilité. De son côté, Diana MicroT a obtenu un faible 13,1%. Fait intéressant, à l'aide des données recueillies par leurs expériences de protéomique à grande échelle, le Dr. Bartel a aussi mesurer l'efficacité de chaque programme basé sur les résultats obtenus par l'expérience de protéomique permettant d'identifier les cibles de miR-223 (Baek et al., 2008). TargetScanS et Pictar se sont encore une fois démarqués des autres programmes. Après analyse des différents programmes, Sethupathy et al. (2008) suggèrent un guide d'utilisation permettant de combiner l'utilisation des différents programmes, ce qui augmente l'efficacité des prédictions. Basé sur les 3 différents types d'interactions d'un miARN à sa cible, une interaction de type dominant en 5' sera préférentiellement prédite par TargetScanS et Pictar. Point intéressant le site Target Combo (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>) permet d'obtenir l'intersection des prédictions des 2 programmes, ce qui augmente la fiabilité des prédictions. De son côté, miRanda est plus sensible pour les interactions ayant une compensation de l'extrémité 3' du miARN. Il est aussi possible d'utiliser Target Combo afin de vérifier les solutions communes à tous les programmes présenté précédemment. La comparaison des prédictions suggérées par l'utilisation des différents programmes peut sembler fastidieuse, mais ce n'est rien à côté du temps perdu par la validation expérimentale d'un faux positif. Cette approche est donc chaudement conseillée à tous les nouveaux utilisateurs.

1.2 Le polycistron de miARN miR-17-92

1.2.1 Découverte du polycistron miR-17-92

Le polycistron de miARN miR-17-92 a été identifié en 2004 par Ota et al. ((Ota et al.,

2004b). Le laboratoire du Dr. Masao Seto s'intéressait à une amplification chromosomique sur le chromosome 13 au locus 13q31-q32 présent dans différents types de cancer, dont les lymphomes diffus à grande cellule B. Puisqu'une région amplifiée cache souvent la présence d'un oncogène, ils ont voulu cartographier davantage ce fragment du chromosome 13 afin d'identifier le gène responsable. Contrairement à ce qu'ils s'attendaient, le gène proximal GPC5 n'était pas surexprimé dans les différents types de cancer. L'amplification était plutôt au niveau d'un nouveau gène baptisé « chromosome 13 open reading frame 25 ». C13orf25 code pour deux transcrits, soit le transcrit A et le transcrit B, qui codent respectivement des polypeptides de 32 et 70 acides aminés. Les auteurs ont ensuite réalisé que le transcrit B codait plutôt pour un polycistron de miARN. Le polycistron miR-17-92 est donc formé de 6 miARN: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a-1, qui sont illustrés à la Figure 15 (Mendell, 2008). Cette Figure illustre aussi les polycistrons paralogues miR-106b-25, présents sur le chromosome 7, et miR-106a-363, présent sur le chromosome X, qui ont été formés par une duplication génique. Les

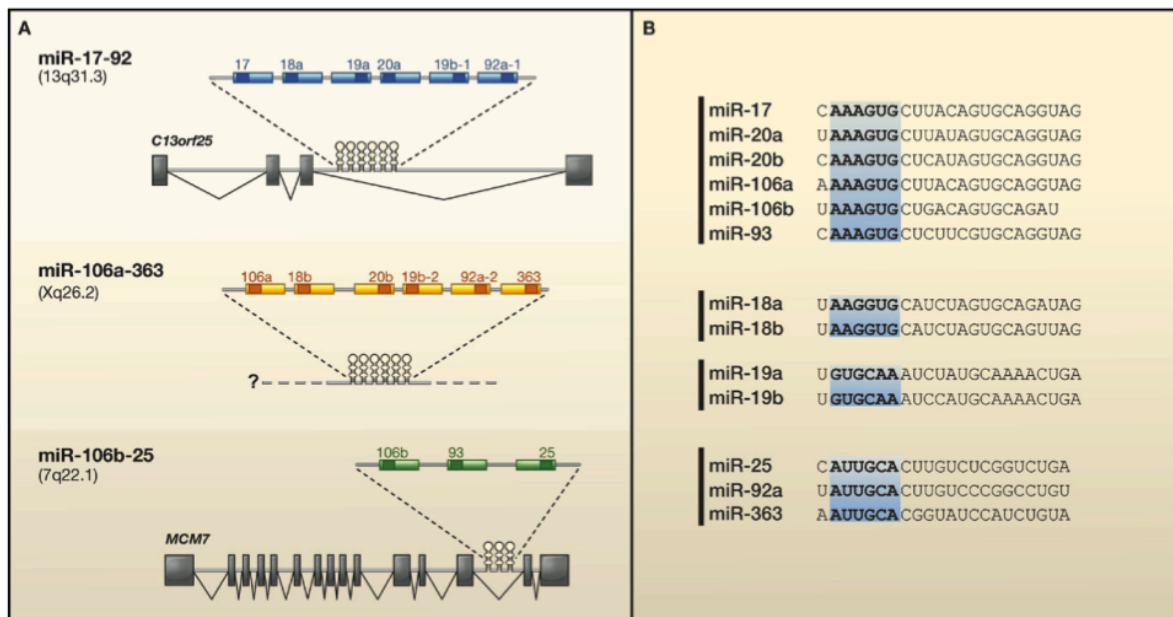


Figure 15. Organisation génomique du polycistron miR-17-92 et des paralogues ainsi que leurs séquences. Tirée de (Mendell, 2008).

polycistrons miR-17-92 et miR-106a ont été détectés dans plusieurs types cellulaires, contrairement au polycistron miR-106b. (Ventura et al., 2008). L'impossibilité de détecter l'expression de ce polycistron de façon significative reflète peut-être une fonction spatiotemporelle très spécifique. La délétion chez la souris des polycistrons miR-106a et miR-106b ne produit aucun phénotype clair, puisque la souris demeure fertile et aucune anomalie phénotypique n'a été détectée par Ventura et al. (Ventura et al., 2008). Ces deux paralogues ne seront pas discutés davantage, puisque nous mettrons l'emphase sur le polycistron miR-17-92, dont miR-20 fait parti.

1.2.2 Le potentiel oncogénique de miR-17-92

L'évidence directe que le polycistron de miARN miR-17-92 possède un potentiel oncogénique a été obtenue plus tard par le laboratoire du Dr. Hannon, à l'aide de souris transgéniques (He et al., 2005b). Ce groupe a utilisé un modèle de souris transgénique où l'expression inductible de l'oncogène c-myc permet la formation de tumeurs en 3 à 6 mois (Adams et al., 1985). Fait intéressant, l'expression des miARN individuels du polycistron ne permet pas l'accélération du développement de la maladie. À l'opposé, l'expression d'une forme tronquée du polycistron, miR-17-19b, provoquait la formation précoce de tumeurs à environ 54 jours dans 100% des cas, suivit de la mort à 65 jours (Figure 16). De plus, l'expression du polycistron semblait protéger les cellules cancéreuses de la mort cellulaire puisque, dans ce cas, les auteurs ont pu observer une diminution de l'apoptose. En effet, l'expression forcée de c-myc provoque un signal prolifératif très élevé, ce qui génère un certain niveau d'apoptose. Ce phénomène était toutefois absent chez les souris exprimant le polycistron et seul l'effet oncogénique de myc était observé. Fait intéressant, le laboratoire du Dr. Hammond a simultanément publié que la transcription du polycistron est activée par c-Myc (O'Donnell et al., 2005a). Sept sites de liaisons potentiels ont été trouvés dans le promoteur des miARN et un site a été validé par immunoprécipitation à la

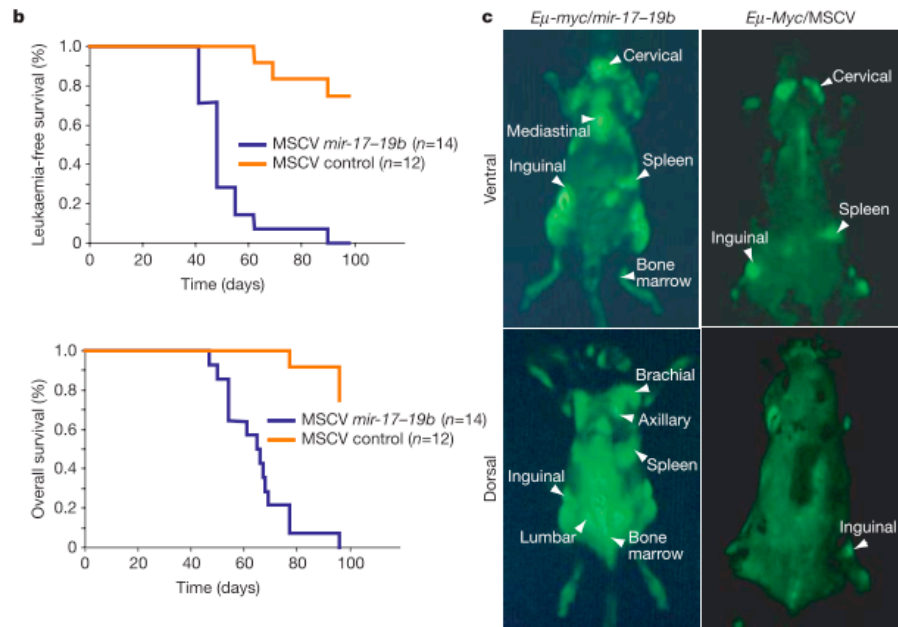


Figure 16. La surexpression de miR-17-19b accélère la lymphomagenèse induite par Myc. Tirée de (He et al., 2005b).

chromatine. Cette observation suggère que la souris contrôle de He al. (2005) exprimant uniquement c-Myc était déjà protégée de l'apoptose à un certain niveau par l'activation du polycistron. Il est aussi important de noter que la surexpression du polycistron n'est pas spécifique aux lymphomes, puisqu'elle est aussi détectée dans les tumeurs solides provenant du sein, du colon, des poumons, du pancréas, de la prostate ainsi que de l'estomac (Petrocca et al., 2008; Volinia et al., 2006b).

1.2.3 miR-20 inhibe l'expression des facteurs de transcription E2F

Dans leur article, O'Donnell et al. (2005) ont aussi identifié E2F1, un facteur de transcription impliqué dans la progression du cycle cellulaire, comme étant une cible de miR-17 et de miR-20a. Ces deux miARN du polycistron possèdent pratiquement la même

séquence et un noyau identique, ce qui suggère qu'ils ciblent les mêmes ARNm. Il a aussi été démontré qu'E2F1 était une cible transcriptionnelle de c-Myc (Fernandez et al., 2003; Leone et al., 1997). Ces résultats suggéraient donc un réseau de régulation où c-Myc avait la capacité d'augmenter les niveaux de E2F1 tout en induisant l'expression de son inhibiteur.

1.2.4 La propriété anti-apoptotique du polycistron miR-17-92

1.2.4.1 L'inhibition de E2F1 par miR-20, une explication de la propriété anti-apoptotique du polycistron

Matsubara et al. (2007) ont pu observer une inhibition de l'apoptose par le polycistron dans des cellules de cancer du poumon. L'inhibition de miR-17 et de miR-20a, dans des cellules de cancer du poumon exprimant fortement le polycistron, leur a permis d'induire l'apoptose. Il est important de noter qu'aucun phénotype n'a pu être observé avec l'inhibition de miR-18, miR-19 et miR-92, ce qui confirme la spécificité de miR-20 et miR-17 pour cette fonction. Les mêmes propriétés anti-apoptotiques ont pu être observées au niveau de la leucémie lymphoblastique des cellules T (Nagel et al., 2009). Ils ont expliqué les hauts niveaux d'expression du polycistron miR-17-92 par l'identification d'un autre activateur transcriptionnel hautement exprimé dans les cellules T-ALL, soit NKX2-5. Cet oncogène provenant de la famille de protéines de type homéodomaine NK-like n'avait pas de fonction pathologique associée. Ils ont donc pu montrer que l'augmentation des niveaux de miR-17 et miR-20 permettait de protéger ces cellules contre l'apoptose induite par l'etoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II. L'inhibition de la fonction anti-apoptotique de E2F1 par miR-20 semble aussi être présent dans un contexte normal comme dans les cellules germinales (Novotny et al., 2007). La maturation des cellules germinales nécessite un mode de mitose impliquant une recombinaison par « crossing-over » des chromatides sœurs. Ce processus produit une quantité importante de bris de l'ADN double-bris qui doit être géré par la cellule et pourrait ultimement mener à l'apoptose. Cette

induction de l'apoptose est modulée par ATM et passe par l'activation de E2F1 et de sa fonction pro-apoptotique (Bartkova et al., 2005). Novothy et al. (2007) ont démontré que l'expression du polycistron de miR-17-92 et E2F1 était inversement proportionnel dans les spermocytes. Ces observations suggèrent que l'inhibition de E2F1 par miR-17 et miR-20 permettrait le bon déroulement de la spermatogenèse en protégeant les cellules mitotiques de l'apoptose dépendante de E2F1.

Il semble aussi y avoir conservation de cette propriété auprès des paralogues de miR-17-92 puisque Petrocca et al. (2008) ont pu observer le même phénomène avec miR-106b. Comme mentionné précédemment, ce miARN possède le même noyau que miR-20 et sa séquence est presque identique. Petrocca et al. (2008) ont donc étudié le rôle du polycistron miR-106b-25, un paralogue du polycistron miR-17-92, dans les adénocarcinomes gastriques. Ils ont pu observer l'inhibition de E2F1 par miR-106b. De plus, l'inhibition de miR-106b, par des oligonucléotides antisens, augmentait l'apoptose induite par TGF- β .

1.2.4.2 L'inhibition de Bim et PTEN par le polycistron miR-17-92 contribue à son potentiel oncogénique

Récemment, Bim, un autre facteur pro-apoptotique, a été identifié par différents groupes comme étant une cible du polycistron miR-17-92. Xiao et al. (2008) ont étudié l'implication du polycistron miR-17-92 dans l'initiation de la lymphomagenèse. Pour ce faire, ils ont produit des souris transgéniques surexprimant le polycistron dans les lymphocytes à un niveau comparable à ce qui a été observé dans les lymphomes humains. Ils ont pu observer des effets similaires à ceux décrits par He al. (2005), soit une induction de la mort chez 92% des animaux, comparativement à l'absence de mortalité chez les souris contrôles. Une réaction autoimmune ainsi qu'une lymphoprolifération importante ont été notées chez ces souris. Afin de comprendre ces phénotypes, ils ont identifié 2 cibles supplémentaires du polycistron, soit PTEN pour miR-17 et miR-19a et Bim pour miR-92. L'inhibition de ces deux cibles expliquerait aussi l'augmentation de la prolifération et la

diminution de l'apoptose au niveau des lymphocytes. Il est important de mentionner qu'une souris hétérozygote avec un allèle mutée pour Bim et un allèle mutée pour PTEN reproduisait l'effet d'inhibition de miR-17-92 au niveau de l'expression de ces deux protéines. Toutefois, cette souris hétérozygote n'a pas permis d'observer des effets aussi drastiques que lors de la surexpression de miR-17-92. Xiao et al. (2008) soulignent donc l'importance de l'inhibition de la fonction apoptotique de E2F1 par miR-17 et miR-20 afin d'expliquer l'intensité du phénotype. La régulation de Bim par miR-92 a aussi été démontrée par Ventura et al. (2008) dans un contexte normal et non-tumoral, par la délétion du polycistron chez la souris. Un des phénotypes majeurs de la perte d'expression du polycistron est une diminution du nombre des cellules lymphocytes pré-B. Les auteurs ont pu éliminer la possibilité d'un changement au niveau de la progression du cycle cellulaire et ont identifié une augmentation de l'apoptose dans ces cellules. Ils ont pu identifier un site supplémentaire pour miR-19 en plus de miR-92 dans la région 3'NTR de l'ARNm codant pour Bim. L'inhibition efficace de Bim par le polycistron pourrait être expliquée par un phénomène de coopération puisque les sites de miR-19 et miR-92 sont séparés par seulement 42 nucléotides. Ces résultats impliquent donc le polycistron miR-17-92 dans la régulation de la survie des progéniteurs de cellules B en réprimant l'expression de gènes anti-apoptotiques à la transition des cellules pro à pré-B. Ces résultats n'excluent toutefois pas l'implication de l'inhibition de E2F1 par miR-20 et miR-17 dans ce phénomène. Ce point est renforcé par le fait que les auteurs ont pu mesurer un haut niveau de miR-20 dans les cellules pré-B comparativement aux cellules pro-B ou mature.

1.2.5 Implication de miR-20 et miR-17 dans la régulation du cycle cellulaire

Bien que Bim semble jouer un rôle important dans les lymphomes des cellules B, Inomata et al. (2009) se sont intéressés au fait que certains lymphomes très agressifs surexpriment le polycistron tout en ayant une délétion pour ce facteur apoptotique (Tagawa et al., 2005; Tagawa and Seto, 2005). Ce groupe a pu observer que l'expression de miR-17-

92 dans ces cellules conférerait un avantage prolifératif en facilitant la progression de la phase G1/S du cycle cellulaire (Inomata et al., 2009), sans toutefois influencer l'apoptose. Ils ont pu identifier p21 comme étant une cible de miR-17 et miR-20. En fait, p21 est reconnu pour induire un arrêt de la progression de la phase G1/S, ce qui concorde avec les observations précédentes. De plus, l'augmentation de p21 par l'inhibition de miR-17 et miR-20 diminuait les niveaux de CDK6 et cyclin D1, ce qui expliquerait pourquoi le polycistron augmente la prolifération. Le réseau de régulation des miARN étant extrêmement complexe et organisé, Yu et al. (2008) ont démontré que la cyclin D1 était aussi inhibée par miR-20 et miR-17 dans les cellules du cancer du sein. De plus, ils ont pu caractériser une boucle de rétro-activation négative puisque la cycline D1 a la capacité d'activer la transcription du polycistron miR-17-92. Pourquoi cette boucle protégeant les cellules contre une prolifération excessive n'est pas activée dans les lymphomes des cellules B demeure pour l'instant sans réponse. Il est toutefois important de mentionner que Yu et al. (2008) ont montré que l'expression du polycistron était diminuée dans ces cellules du cancer du sein et que miR-17 et miR-20 jouaient plutôt le rôle de suppresseurs tumoraux. L'inhibition de la traduction par les miARN semble donc être un processus sélectif où certains mécanismes déterminent les ARNm ciblés. Quoique très hypothétique, une mutation dans le 3'UTR de cycline D1 causant la perte d'un site de liaison pour miR-20 et miR-17-5p pourrait expliquer la perte de contrôle de la prolifération dans ces cellules.

Conolly et al. (2008) ont aussi fait les mêmes observations dans des cellules cancéreuses sans toutefois conclure que le polycistron ciblait p21. Ils ont inhibé les miARN du polycistron à l'aide d'oligonucléotides antisens dans des cellules provenant d'un carcinome hépatocellulaire étant positif pour une hépatite B primaire. Ils n'ont pas pu observer une variation de l'apoptose, mais plutôt une variation au niveau du cycle cellulaire. Lorsqu'ils ont inhibé miR-17 et miR-20 à l'aide d'oligonucléotides antisens, ils ont pu observer une diminution de la prolifération et une augmentation du nombre de cellule en G1. Ces résultats pourraient être expliqués par l'observation de Inomata et al., qui ont montré une inhibition de p21 par miR-17 et miR-20a.

Pickering et al. (2009) ont aussi étudié l'implication de miR-17 et de miR-20 au niveau du cycle cellulaire, mais dans un contexte normal et non tumoral. Dans une cellule normale, la progression du cycle cellulaire est régulée par des mécanismes de vérification permettant le passage ou non d'une phase à une autre. Des points de restriction sont induits à différents endroits tout au long du cycle afin de protéger la cellule en cas de problèmes. Le point de restriction en G1 implique E2F1 puisque son activité trop intense peut induire un arrêt du cycle cellulaire en activant des signaux de dommages à l'ADN, ce que nous verrons en détails plus tard. Puisque l'expression des E2F et du polycistron sont régulés par c-Myc, et que c-Myc s'accumule tôt en G1, les auteurs ont voulu observer si miR-17 et miR-20 avait un rôle physiologique dans la progression de la phase G1/S. Une inhibition de miR-20 et miR-17 dans des cellules synchronisées a permis d'observer un ralentissement de la prolifération au niveau de la phase G1/S du cycle cellulaire. Ce ralentissement de la phase G1/S était dû à une accumulation précoce de E2F1 causant l'induction du point de restriction en G1 dû à une accumulation de dommage à l'ADN. Les auteurs suggèrent donc que miR-17 et miR-20a permettent de maintenir les niveaux de E2F1 bas jusqu'à la transition G1/S lorsque de hauts niveaux sont tolérés. Cette étude et celle de Ionomata suggèrent donc fortement l'implication de miR-17 et miR-20 dans la régulation du cycle cellulaire.

À l'opposé, bien que l'explication mécanistique ne soit pas très convaincante, Poliseno et al. (2008) ont montré que la surexpression de miR-20 dans les fibroblastes embryonnaires de souris MEF induisait la sénescence prématurée. Ils ont identifié une autre cible de miR-20, soit l'oncogène LRF, qui est impliqué dans le développement des lymphomes de cellules T et B par une inhibition indirecte du suppresseur tumoral p53 (Maeda et al., 2005). La preuve que LRF soit la cible responsable de la sénescence induite par miR-20 est toutefois douteuse puisque les auteurs montrent eux-mêmes que l'expression de miR-20 dans des MEF LRF-null induit la sénescence prématurée de façon quasi identique que les MEFs normales. À la lumière des articles cités précédemment probablement que l'inhibition combinée des E2F et de cycline D1 participe grandement à

l'induction de la sénescence prématurée miR-20a dépendante. Sans traiter directement du sujet, les travaux de Wang et al. (2008) suggèrent une explication supplémentaire pour la sénescence prématurée induite par miR-20. Ils ont montré que miR-17 inhibe l'expression de p130 durant la différenciation des adipocytes lors du processus de l'adipogenèse. Fait intéressant, comme Rb l'est pour E2F1-3, p130 est l'inhibiteur de E2F4 et E2F5 (Cobrinik et al., 1993). Contrairement à E2F1-3, E2F4 et E2F5 sont des inhibiteurs du cycle cellulaire et inhibent les cibles permettant la progression de la phase G1/S du cycle cellulaire (Dyson, 1998a). Une inhibition de p130 par miR-17 et miR-20 permettrait donc une augmentation des niveaux de E2F4 et E2F5 actifs, ce qui pourrait participer à un ralentissement voir à l'arrêt du cycle cellulaire.

1.2.6 Le polycistron miR-17-92 : oncogène ou suppresseur tumoral ?

Bien que la plupart des études suggèrent que le polycistron miR-17-92 agit comme un oncogène, d'autres suggèrent plutôt une fonction en tant que suppresseur tumoral. Par exemple, Zhang et al. (2006) ont noté une diminution de l'expression du polycistron dans 16,5% des cancers des ovaires, 21,9% des cancers du sein et 21,9% des mélanomes. Hossain et al. (2006) ont aussi démontré que miR-17 agit en temps que suppresseur tumoral dans les cellules du cancer du sein. Le rétablissement de l'expression de miR-17 provoque une diminution de la prolifération ainsi qu'une diminution de la formation de colonies. Ils ont démontré que ce miARN agit en tant que suppresseur tumoral en inhibant l'expression de E2F1, mais aussi de AIB1 (amplified in breast cancer 1). AIB1 est un coactivateur transcriptionnel du récepteur à l'estrogène et est considéré comme un oncogène dans différents cancers en activant la transcription de gènes prolifératifs comme E2F1 et cyclin D1 (Louie et al., 2004; Planas-Silva et al., 2001).

1.3 La famille de facteurs de transcription E2F

1.3.1 Généralités et caractéristiques des E2F

1.3.1.1 Membres de la famille des E2F et leurs structures

La famille de facteurs de transcription E2F fascine la communauté scientifique depuis plus de 20 ans par sa complexité et ses paradoxes. Le membre fondateur de la famille des E2F, soit E2F1, a été identifié dans le milieu des années 80 comme étant un facteur de transcription régulant l'expression de l'adénovirus E2 (Kovesdi et al., 1986). Bien que ces facteurs de transcription aient faits l'objet d'études intensives depuis leur découverte, leurs implications réelles au niveau du fonctionnement de la cellule demeurent un casse-tête. Les E2F sont maintenant composés de 8 membres, soit E2F1-6, qui sont les membres les plus établis et E2F7 et 8 qui ont été récemment identifiés (de Bruin et al., 2003; Dyson, 1998a; Maiti et al., 2005). Il est possible de diviser les E2F en deux catégories, selon leur implication au niveau du cycle cellulaire. E2F1-3 sont considérés comme étant des activateurs transcriptionnels impliqués dans la progression de la phase G1/S. À l'opposé E2F4-8 sont plutôt des répresseurs transcriptionnels et ont comme fonction la sortie du cycle cellulaire et la quiescence (Polager and Ginsberg, 2008). E2F3b est généré à partir du même transcrit que E2F3a, mais depuis un promoteur alternatif (DeGregori and Johnson, 2006). Il est toutefois considéré comme étant un répresseur du cycle cellulaire et ne fait donc pas partie des E2F activateurs. Puisque nos travaux portent sur les E2F activateurs, ce sont plutôt ces membres de la famille qui seront décrits. Fidèles à leur redondance fonctionnelle, E2F1, 2 et 3 sont très similaires au niveau de leurs structures primaires tel qu'illustré à la Figure 17 (Iaquinta and Lees, 2007). Leur extrémité N-terminale est formée

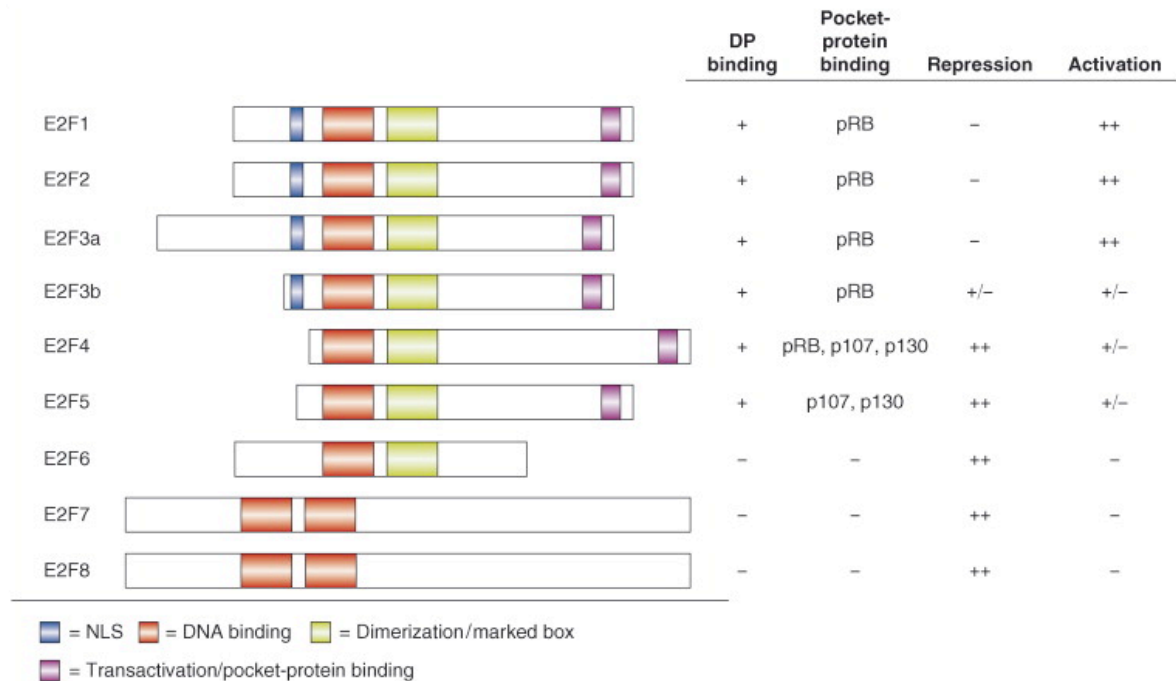


Figure 17. Caractéristiques structurales primaires et propriétés des membres de la famille des E2F. Tirée de (Iaquinta and Lees, 2007).

d'un domaine de liaison à la cycline A et d'un signal de localisation nucléaire. La partie centrale est formée d'un domaine de liaison à l'ADN et d'un domaine de dimérisation. Finalement, le domaine de transactivation, le site de liaison aux « Pocket proteins », se retrouve dans la section C-terminale. Pour leur part, E2F4 et 5 ont la caractéristique d'avoir un domaine d'exportation nucléaire.

1.3.1.2 Les familles Rb et DP, des partenaires d'interaction essentiels à la fonction des E2F

La fonction des E2F est intimement liée à leurs partenaires d'interaction, ce qui implique la famille Rb ou « Pocket proteins » ainsi que la famille des facteurs de transcriptions DP. Les différentes combinaisons possibles d'association sont illustrées à la

Figure 18. La famille Rb est formée de la protéine du Rétinoblastome, soit pRb, qui est le

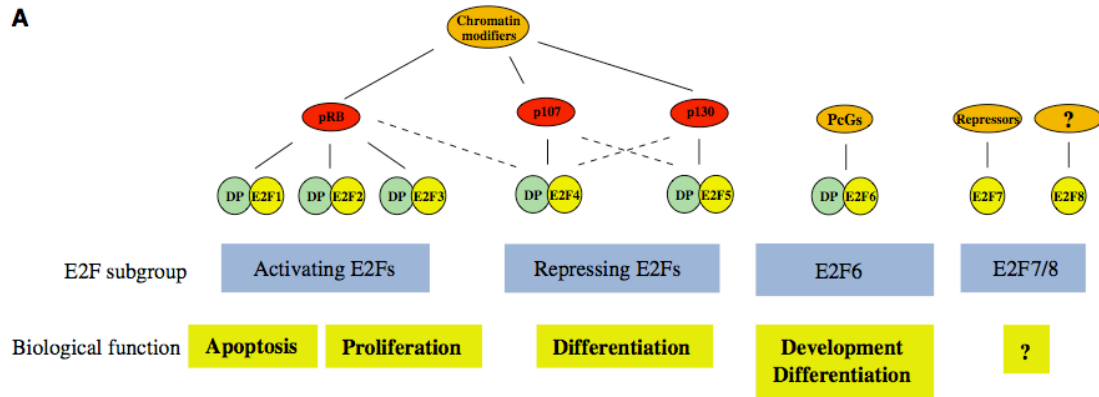


Figure 18. Représentation des différents partenaires de liaison des E2F. Tirée de (Attwooll et al., 2004).

membre principal ainsi que de p107 et p130 (Classon and Harlow, 2002; Cobrinik et al., 1993; Zhu et al., 1993). Bien que ces protéines lient différents membres des E2F, elles ont toutes la capacité de réguler le cycle cellulaire et d'induire un arrêt en G1 lorsqu'elles sont surexprimées (Lukas et al., 1995; Qin et al., 1992). L'activité des membres de la famille Rb est régulée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation. L'état hypophosphorylé est favorable à une liaison aux E2F, ce qui permet la modulation de l'activité de ces facteurs de transcription. Cette modulation se fait de deux façons. Premièrement, la liaison interfère avec le domaine de transactivation des E2F, ce qui inhibe leur capacité à activer la transcription. Deuxièmement, cette liaison permet aussi le recrutement d'histones déacétylases qui inactivent les promoteurs ciblés par les E2F en remodelant la structure de la chromatine, permettant ainsi une répression active (Ferreira et al., 1998). Comme illustré dans la Figure 18, il existe une spécificité de liaison entre les membres de la famille Rb et E2F. Rb régule uniquement l'activité de E2F1-3, tandis que E2F4 peut-être lié par les 3 membres de la famille Rb et E2F5 est lié uniquement par p130 (Dyson, 1998a). Dans des conditions précises, la phosphorylation de la famille Rb permet le relâchement et l'activation des E2F. E2F1-3 libres ont la capacité d'interagir avec des

histones acétyl transférase rendant accessible les promoteurs cibles afin d'activer leur transcription. (Brehm et al., 1998).

La dimérisation avec les membres de la famille DP est aussi essentielle à l'activité transcriptionnelle des E2F (Tsantoulis and Gorgoulis, 2005). La différence majeure entre DP1 et DP2 est la présence d'un signal de localisation nucléaire dans ce dernier. DP2 est responsable de l'importation dans le noyau des E2F répresseurs E2F4 et E2F5. Sa dissociation permet donc leur exportation à des moments spécifiques du cycle cellulaire (Magae et al., 1996). Pourquoi la famille DP est essentielle à l'activité des E2F activateurs n'est pas claire. Toutefois, il a été montré que leur association permet une augmentation de l'activité transcriptionnelle des E2F, et ce, de façon synergique (Bandara et al., 1993). Cependant, la spécificité de liaison aux promoteurs cibles dépendrait uniquement des E2F. (Wu et al., 1995).

1.3.2 Fonctions biologiques des E2F

1.3.2.1 Les E2F et la progression de la phase G1/S du cycle cellulaire

L'implication des différents E2F au niveau du cycle cellulaire a été démontrée par différentes études de surexpression ou de délétion des différents membres. Par exemple, l'expression des E2F activateurs dans des cellules quiescentes force leur entrée en phase S du cycle cellulaire (Johnson et al., 1993a). À l'opposé, une perte simultanée de E2F1-3 dans des fibroblastes embryonnaires de souris est suffisante pour empêcher l'entrée de la phase S, ce qui bloque de façon permanente la prolifération (Wu et al., 2001). Fidèles à leurs fonctions opposées, l'expression de E2F4 et 5 dans des cellules en quiescence n'induit pas la phase S et leur délétion empêche la cellule de répondre à certains signaux d'arrêt du cycle cellulaire (Gaubatz et al., 2000; Lukas et al., 1996; Mann and Jones, 1996). Il est maintenant évident que la régulation de l'expression et de l'activité des E2F est dépendante du cycle cellulaire (Figure 19). Les E2F répresseurs sont actifs principalement au niveau de la phase G0 et G1. Leur liaison aux membres de la famille Rb permet une répression active

des gènes cibles par le recrutement des HDAC et le remodelage de la chromatine. Lorsque le cycle cellulaire progresse à la fin de la phase G1, des complexes cdk/cycline phosphorylent pRb, p107 et p130 et les inactivent. Ce phénomène de phosphorylation débute par le complexe Cycline D/cdk4,6, pour ensuite passer au complexe Cycline E/cdk2

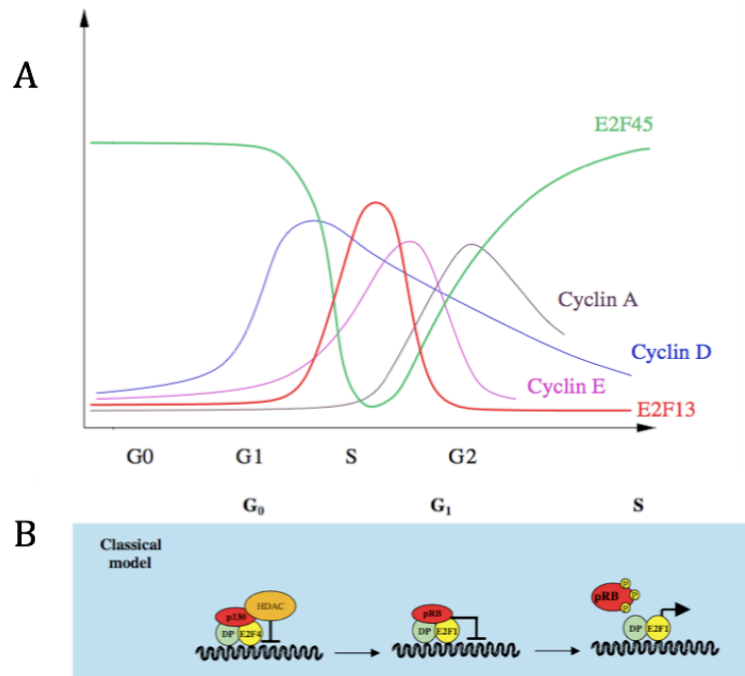


Figure 19. Régulation de A) l'expression des E2F dans le cycle cellulaire et B) leur activités transcriptionnelles. Tirée de (Attwooll et al., 2004; Tsantoulis and Gorgoulis, 2005)

(Kato et al., 1993; Lundberg and Weinberg, 1998). Les E2F répresseurs sont remplacés par les E2F activateurs au niveau des différents promoteurs cibles impliqués dans la progression de la phase G1/S. Ces cibles incluent les régulateurs du cycle cellulaire permettant l'entrée de la phase S (Cycline E, c-Myb, CDK2, cdc25), des protéines impliquées dans l'assemblage du complexe de pré-réplication (ORC, MCM2-7, Cdc6) ainsi que les enzymes directement impliquées dans la synthèse de l'ADN (ribonucleotide réductase, thymidine synthase, DHFR) (Stevaux and Dyson, 2002a; Tsantoulis and Gorgoulis, 2005).

1.3.2.2 La fonction pro-apoptotique de E2F1

Le lien entre l'apoptose et la famille des E2F a été fait il y a plus de 15 ans. DeGregori et al. (1997) ont suggéré que bien que les trois E2F activateurs aient une fonction redondante au niveau de la progression du cycle cellulaire, E2F1 était le seul à pouvoir induire l'apoptose. Certaines études ont tout de même démontré la capacité de E2F2 et E2F3 à induire un certain niveau de mort cellulaire (Dirks et al., 1998) (Vigo et al., 1999b; Ziebold et al., 2001). Il a toutefois été démontré, par la délétion de E2F1 dans des souris transgéniques, que l'apoptose induite par E2F3 dépendait totalement d'E2F1 (Lazzerini Denchi and Helin, 2005). Cette capacité d'E2F2 et 3 repose donc probablement sur le mécanisme de transactivation existant entre les différents membres. E2F1 a la capacité d'induire l'apoptose par différents moyens classés de façon dépendante ou indépendante de p53, et ces différentes voies sont illustrées à la Figure 20 (Stanelle and Putzer, 2006). L'induction dépendante de p53 implique différents mécanismes. Premièrement, E2F1 peut induire l'expression de p14ARF qui a la capacité d'inactiver Mdm2, l'inhibiteur principal de p53 (Bates et al., 1998). Deuxièmement, E2F1 peut activer p53 via la voie d'ATM, qui est la voie de réponse aux dommages à l'ADN (Powers et al., 2004; Rogoff et al., 2004). Troisièmement, une interaction directe a été montrée entre E2F1 et p53 qui se ferait potentiellement par le domaine de liaison à la Cycline A de E2F1 (Hsieh et al., 2002). Finalement, E2F1 induirait la transcription de cofacteurs de p53 impliqués dans l'induction de l'apoptose, tels que p53ASPP1, ASPP2, JMY et TP53INP1 (Hershko et al., 2005). L'induction de l'apoptose indépendante de p53 consiste principalement en l'activation de la transcription directe de gènes pro-apoptotiques. E2F1 a la capacité d'augmenter l'expression de p73, APAF-1, les caspases 8 et 9 ainsi que les membres pro-apoptotiques de la famille BCL2, ce qui induit de façon efficace la mort cellulaire (Furukawa et al., 2002b; Hershko and Ginsberg, 2004; Moroni et al., 2001; Nahle et al., 2002b; Stiewe and Putzer, 2000a). E2F1 bloque aussi le signal anti-apoptotique de NF-

kappa B (Phillips et al., 1999). Il est toutefois intéressant de noter que, dans certains cas, le domaine de transactivation de E2F1 n'est pas nécessaire à l'induction de l'apoptose (Hsieh et al., 2002; Nip et al., 2001; Phillips et al., 1999). Des études plus récentes ont démontré l'importance du domaine « marked box » de E2F1 au niveau de sa fonction apoptotique et de l'accumulation de p73 et p53 (Hallstrom and Nevins, 2003).

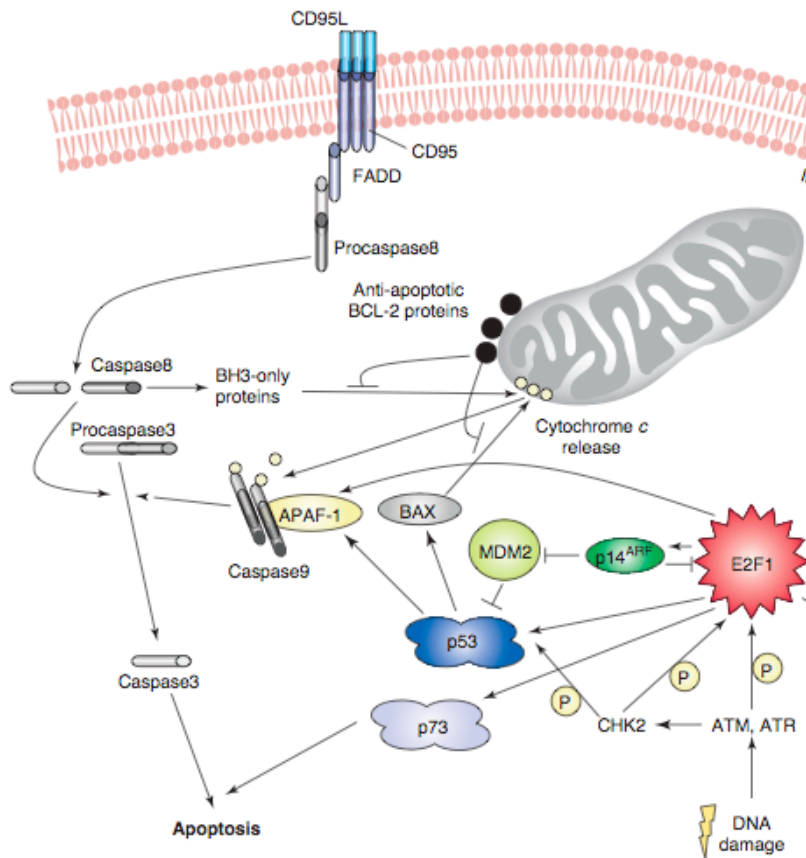


Figure 20. Voies d'induction de l'apoptose par E2F1 dépendante et indépendante de p53. Tirée de (Stanelle and Putzer, 2006).

1.3.2.3 E2F1 et les points de restriction de dommages à l'ADN

La progression du cycle cellulaire est sous haute surveillance par la présence de points de restriction permettant à la cellule de s'assurer qu'une étape soit bien complétée

avant le début de la suivante. Un point de restriction peut aussi être activé lors du signalement d'une anomalie, comme, par exemple, la détection d'un dommage à l'ADN. Deux choix sont donc envisagés par la cellule : l'arrêt de la progression du cycle, afin de réparer les dommages, ou encore l'induction de l'apoptose dans le cas de dommages trop importants. Ces mécanismes sont donc essentiels à la viabilité de l'organisme et sont souvent inactivés dans les différents types de cancer où les cellules montrent une accumulation de mutations (Kastan and Bartek, 2004). Compte tenu de la double fonction de E2F1, la cellule semble avoir opté pour un mécanisme efficace et rapide en l'impliquant au niveau du point de restriction G1/S. Le lien entre les E2F et les points de restriction de dommage à l'ADN a été fait par des études à grandes échelles permettant d'établir le portrait global des cibles transcriptionnelles de ces facteurs de transcription (Ishida et al., 2001; Muller et al., 2001b). Différents promoteurs de gènes impliqués dans ce processus de protection cellulaire sont activés par E2F1, ce qui suggère un rôle central dans ce mécanisme de défense cellulaire. De plus, il a été observé que les niveaux protéiques de E2F1 augmentent de façon significative lorsque les cellules sont traitées avec des agents induisant des dommages à l'ADN (Huang et al., 1997; Lin et al., 2001b; Stevens and La Thangue, 2004). Cette augmentation serait due à une stabilisation de la protéine par phosphorylation impliquant les kinases ATR, ATM ou encore Chk2, qui sont les principaux médiateurs de la réponse aux dommages à l'ADN (Lin et al., 2001b; Stevens and La Thangue, 2003). La capacité d'E2F1 d'induire la progression de la phase G1/S ou l'apoptose prend tout son sens lorsque le contexte du dommage à l'ADN est abordé. Ces deux fonctions, bien que contradictoires, font en sorte qu'E2F1, étant présent en G1/S, est au centre de l'intégration des signaux lui permettant de réagir rapidement en cas de problèmes.

1.3.3 Redondance vs spécificité transcriptionnelle des E2F

La redondance fonctionnelle des E2F au niveau de la progression du cycle cellulaire

est évidente et a été démontrée par plusieurs groupes utilisant différentes stratégies. Par exemple, les combinaisons des délétions E2F1/E2F3, E2F2/E2F3 ou E2F1/E2F2 dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) provoquent une réduction de l'entrée du cycle cellulaire, sans toutefois provoquer un arrêt complet (DeGregori, 2002b). Toutefois, la délétion simultanée des trois E2F empêche les MEFs d'entrer dans le cycle cellulaire et cause un arrêt complet de la prolifération (Wu et al., 2001). Fait intéressant, ces MEFs sont arrêtées dans toutes les phases du cycle cellulaire, ce qui démontre que les E2F activent la transcription de gènes impliqués dans la progression de la phase G1/S, mais aussi de la phase G2/M. Dans le même ordre d'idée, la délétion de DP1, qui neutralise les 3 E2F activateurs, induit une mort embryonnaire précoce chez la souris ainsi que la sénescence prématurée dans certaines lignées cancéreuses humaines (DeGregori, 2002b; Maehara et al., 2005). Malgré cette redondance fonctionnelle, chaque E2F possède une certaine spécificité au niveau des gènes ciblés. Par exemple, E2F2 est l'activateur transcriptionnel principal de DHFR tandis que E2F3 a plus d'affinité pour le promoteur de Chk2. Le gène Cyclin A est principalement activé par E2F1 et E2F2 tandis que le gène de cyclin E est activé par les trois E2F (DeGregori et al., 1997a). Cette spécificité est aussi bien illustrée par les phénotypes observés lors de la délétion des différents E2F chez la souris. La délétion d'E2F1 est viable, mais provoque la formation de plusieurs tumeurs à l'âge adulte ainsi qu'une diminution de l'apoptose au niveau des cellules T, ce qui est fidèle à la fonction pro-apoptotique d'E2F1 (Yamasaki et al., 1996). La délétion d'E2F2 provoque une augmentation de la prolifération des cellules hématopoïétiques. Une augmentation de réponses autoimmunitaires et du nombre de tumeurs a aussi été observé chez ces souris (Murga et al., 2001; Zhu et al., 2001). Pour sa part, une absence d'E2F3 montre une certaine létalité embryonnaire ainsi qu'une diminution de l'entrée dans le cycle cellulaire chez les MEFs (Humbert et al., 2000). Il est aussi important de mentionner qu'il existe un mécanisme de transactivation entre les différents E2F activateurs. Chaque E2F a donc la capacité d'activer la transcription des deux autres. Par ce fait même, les cibles spécifiques d'un des E2F peuvent donc être régulées indirectement par les autres membres (Hsiao et al.,

1994; Johnson et al., 1994b). Un bon exemple de ce phénomène est la capacité d'E2F2 et E2F3 d'induire un certain niveau d'apoptose en passant par l'activation de la transcription de E2F1, puisque cette fonction lui est propre (Lazzerini Denchi and Helin, 2005).

1.3.4 Facteurs influençant le dilemme fonctionnel de E2F1

1.3.4.1 Le modèle des seuils d'activité de E2F1

Par ses deux fonctions contradictoires, E2F1 semble donc être un intégrateur de signaux permettant de décider du sort de la cellule entre la survie ou la mort programmée. Toutefois, une question s'impose : comment se fait le choix entre ces deux fonctions opposées? Trimarchi et al. (2002) ont suggéré un modèle illustré à la Figure 21 qui corrélait bien avec les observations des différentes études à l'époque. Tout dépendrait du niveau

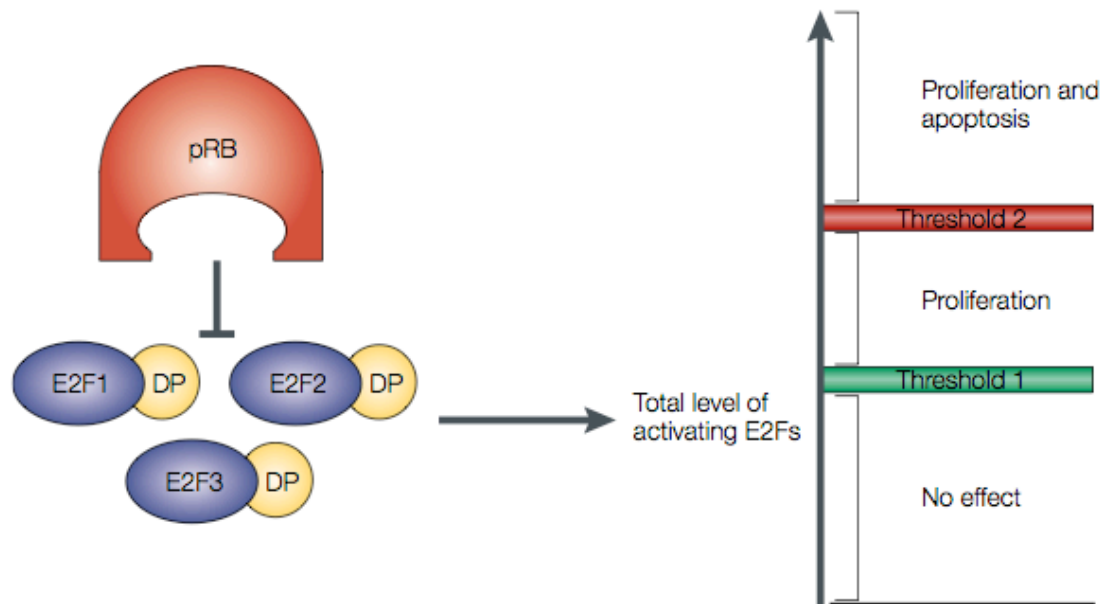


Figure 21. Modèle proposé par Trimarchi et al. afin d'expliquer le choix entre la fonction pro-apoptotique ou pro-proliférative des E2F. Tirée de (Trimarchi and Lees, 2002).

global de l'activité des E2F relatifs à deux seuils. Le premier seuil représente l'induction de

la prolifération et le second l'induction de l'apoptose. Lors de la progression de la phase G1/S, les niveaux d'activité des E2F dépassent le seuil nécessaire à l'activation des cibles impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Toutefois, dans le cas d'une activité trop intense ou anormale, le deuxième seuil est franchi et l'apoptose est induite afin de protéger l'organisme contre des aberrations dangereuses. Évidemment, il est possible d'observer un avantage prolifératif sans induction de l'apoptose dans certaines cellules cancéreuses dans lesquelles les joueurs-clés de mort cellulaire sont inactivés ou absents. Les résultats de Lazzerini Denchi et al. (2005) ont toutefois modifié le modèle tout en conservant le principe des deux seuils. Comme mentionné précédemment, les auteurs ont pu observer que l'apoptose induite par E2F3 était entièrement dépendante de E2F1. Il y avait donc une augmentation marquée des niveaux de E2F1 lors de la surexpression de E2F3 dû au phénomène de transactivation. Seuls les niveaux d'activité de E2F1 devraient donc être pris en considération par rapport aux deux seuils proposés, puisqu'il est le seul membre pouvant activer directement l'apoptose.

1.3.4.2 L'induction de l'apoptose par E2F1 implique plusieurs facteurs

Différents mécanismes ont la capacité de réguler l'activité d'E2F1 permettant un choix entre la prolifération et l'apoptose (Figure 22) (Polager and Ginsberg, 2008). Ces différents mécanismes impliquent des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, l'acétylation, des interactions protéiques ainsi que la régulation de la transcription. Comme mentionné précédemment, Rb est le régulateur principal de la fonction des E2F. Dick et al. (2003) ont identifié un second site de liaison pour Rb qui est toutefois spécifique à E2F1. La liaison de Rb à ce site provoquerait l'inhibition de la fonction apoptotique du facteur de transcription sans influencer le bon fonctionnement du cycle cellulaire. Markham et al. (2006) ont pour leur part démontré que ce site de liaison était régulé par l'acétylation de Rb au niveau des lysines 873/874 dans le cas d'un dommage à l'ADN. Cette modification post-traductionnelle aurait un impact

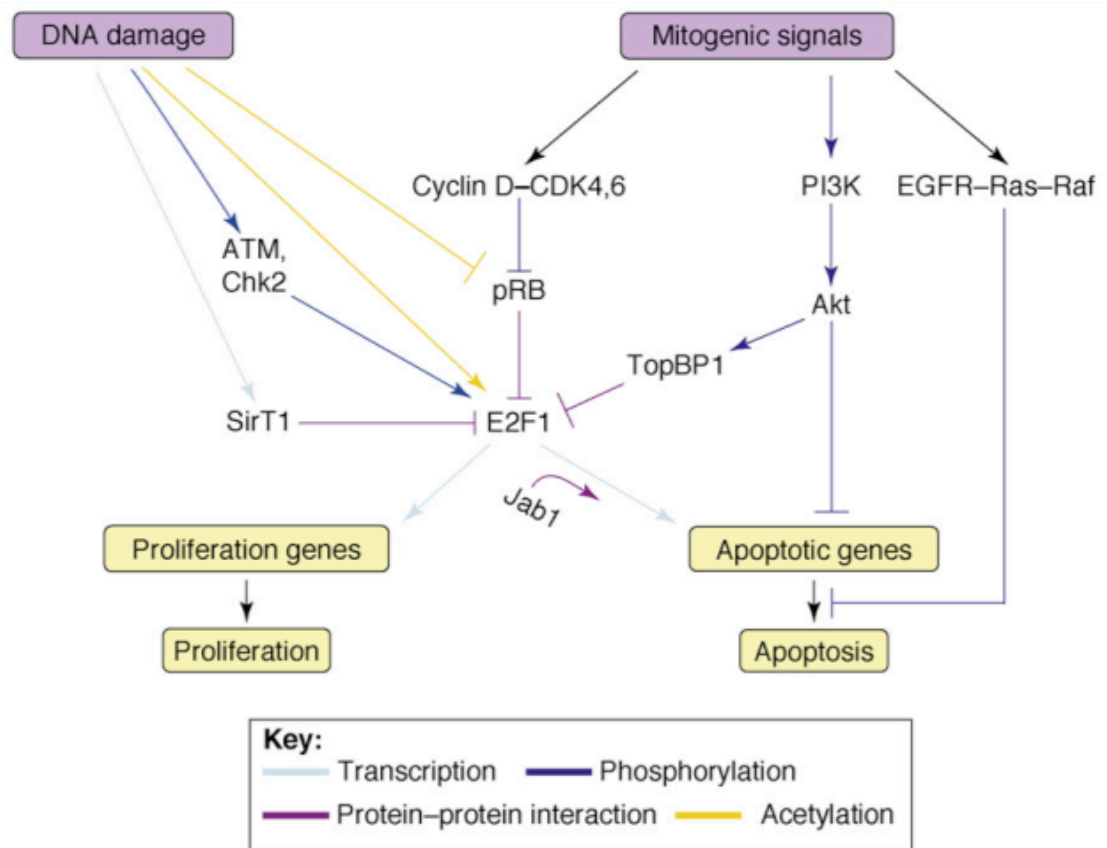


Figure 22. Signalisation en amont de E2F1 permettant l'induction de la prolifération ou de l'apoptose. Tirée de (Polager and Ginsberg, 2008).

sur la cellule à deux niveaux. Premièrement, le site de phosphorylation des cyclines serait bloqué empêchant ainsi l'inactivation de Rb et l'arrêt de la division cellulaire. Deuxièmement, cette acétylation permettrait le relâchement spécifique de E2F1 sans toutefois influencer l'inhibition de E2F2 et E2F3. Cette activation de E2F1 préparerait donc la cellule à une réponse apoptotique si nécessaire. De plus, comme mentionné précédemment, le domaine « marked-box » semble être important au niveau de la fonction pro-apoptotique de E2F1. Hallstrom et al. (2006) ont démontré que ce domaine était responsable de l'interaction de E2F1 avec Jab1, qui serait un facteur indispensable à l'activité anti-apoptotique de E2F1. L'élimination de l'expression de Jab1 est suffisante à

l'inhibition de l'induction de l'apoptose, ce qui suggère un mécanisme puissant dans la détermination de cette fonction d'E2F1. Cette liaison pourrait donc orienter E2F1 au niveau de promoteurs impliqués dans la mort cellulaire plutôt que dans la progression du cycle cellulaire.

1.3.4.3 Importance du contexte cellulaire dans l'induction de l'apoptose dépendante de E2F1

Au fil des années, plusieurs études ont montré l'importance du contexte cellulaire afin d'expliquer la présence ou l'absence de l'induction de l'apoptose par E2F1 sans toutefois identifier ce qui faisait la différence. D'après la Figure 22, en considérant les signaux en amont de E2F1, il serait possible de résumer ce choix comme suit: des signaux de dommages à l'ADN provoqueraient l'apoptose E2F1-dépendante tandis que des signaux mitogéniques, et donc pro-prolifératifs, orienteraient E2F1 vers sa fonction de la progression du cycle cellulaire. Différentes études ont récemment confirmé l'importance du contexte cellulaire et des voies de signalisation dans le choix fonctionnel d'E2F1. Par exemple, Moon et al. (2006) ont montré que, chez la drosophile, la voie EGFR/Ras/Raf avait une vocation pro-survie, entre autre, en inhibant la fonction anti-apoptotique de E2F1 (Moon et al., 2006). Hallstrom et al. (2003) ont pour leur part montré l'existence de ce phénomène dans les cellules humaines et cette inhibition passait par la voie de signalisation PI3K-AKT. Liu et al. (2006) ont ensuite montré que AKT permettait l'oligomérisation et donc l'activation de TopBP1, qui est un inhibiteur de l'activité pro-apoptotique de E2F1, ce qui expliquerait les observations précédentes (Liu et al., 2006).

1.3.5 Implication des E2F dans le cancer

L'inactivation de Rb est observée dans presque tous les types de cancer (Sherr, 1996). Puisque la perte de Rb provoque une augmentation de l'activité des E2F activateurs, il a été suggéré que les E2F étaient impliqués dans le développement du cancer. Toutefois, fidèle aux fonctions contradictoires de E2F1, il semble que ces facteurs de transcription puissent

jouer le rôle d'oncogènes, mais aussi de suppresseurs tumoraux dépendamment du contexte cellulaire (Tsantoulis and Gorgoulis, 2005). Par exemple, la transfection de E2F1 peut induire la formation de colonies dans différents types cellulaires ainsi que la production de tumeurs chez la souris (Johnson et al., 1994a). De plus, chez certains patients, l'expression des E2F a été associée à un mauvais pronostic (Gorgoulis et al., 2002). D'un autre côté, la délétion de E2F1 chez la souris mène aussi au développement de différents types de tumeurs, suggérant aussi une fonction en tant que suppresseur tumoral (Yamasaki et al., 1996). L'exemple le plus flagrant de cette dualité est la délétion de E2F1 ou de E2F3 dans une souris hétérozygote pour Rb. Dans les deux cas, il a été possible d'observer une augmentation de tumeurs dans certains tissus et la diminution dans d'autres, et ce, dans la même souris (Yamasaki et al., 1998; Ziebold et al., 2003). La fonction d'E2F1 en tant que suppresseur tumoral est aussi exploitée par l'utilisation de drogue induisant des dommages à l'ADN. En fait, les points de restriction du cycle cellulaire sont souvent inactivés dans les différents types de cancer (Kastan and Bartek, 2004). Leurs absences permettent aux cellules cancéreuses de maintenir une prolifération excessive en présence d'oncogènes (Paulovich et al., 1997). Cette particularité est toutefois exploitée dans la lutte contre le cancer par l'utilisation de drogue induisant des dommages à l'ADN, comme la doxorubicin. Par exemple, il a été montré dans des cellules du cancer de la prostate que le traitement à cette drogue permettait l'induction de l'apoptose dépendante de E2F1, ce qui permettait l'élimination des cellules cancéreuses (Mukhopadhyay et al., 2005a). Une activité intense des E2F pouvant sembler nuisible pour l'organisme peut être exploitée dans certaines conditions par l'induction de l'apoptose dépendante de E2F1.

2. Résultats

2.1 Article 1

2.1.1 Mise en contexte

Les facteurs de transcription E2F sont des joueurs clés dans la régulation de la prolifération et de la mort cellulaire programmée. De ce fait, un dérèglement de l'activité des E2F pourrait résulter en un avantage prolifératif ou une induction de l'apoptose. Il est donc essentiel pour la cellule de réguler de façon très précise les niveaux d'activité de ces facteurs de transcription. Le mode de régulation de type tampon des miARN semblait correspondre au mode de régulation nécessaire au contrôle de l'activité des E2F. Une analyse à l'aide de l'outil de prédiction TargerScan nous a permis d'observer un enrichissement de sites pour le miARN mir-20a dans le 3'NTR de E2F1, E2F2 et E2F3. L'objectif principal de ce projet était donc de vérifier si miR-20a régulait la traduction des E2F. Les travaux de O'Donnell et al. (2005) avaient aussi démontré que le polycistron possédait son propre promoteur. Puisque les E2F sont des facteurs de transcription, notre deuxième objectif était de vérifier si cette famille de protéine avait la capacité de réguler l'expression du polycistron de miARN miR-17-92. Finalement, à la lumière des résultats de He al. (2005) montrant que l'expression du polycistron inhibait l'apoptose, nous avons voulu vérifier si cette fonction oncogénique pouvait être expliquée par la capacité de miR-20 à inhiber l'activité apoptotique de E2F1.

Note

Contributions des auteurs :

Vincent De Guire : Immunobuvardage de type Northern et Western, clonage du promoteur du polycistron miR-17-92, élaboration des figures

Yannick Sylvestre : Clonage des 3'NTRs des E2F, essais luciférase, mesure de l'apoptose lors de l'inhibition de miR-20

Emmanuelle Querido : Immunoprécipitation de la chromatine

Utpal K. Mukhopadhyay : Étude de la surexpression de miR-20 par mesure de l'apoptose, survie clonogénique et croissance des cellules PC3

Véronique Bourdeault : Expériences de PCR en temps réel

François Major : Collaborateur

Gerardo Ferbeyre: Superviseur principal

Pascal Chartrand : Superviseur principal

¶ Y.S and V.D.G ont contribué également à cet article et doivent être considérés comme co-premiers auteurs

Article publié dans *JBC* 2007, 282(4): 2135-43

An E2F/miR-20a auto-regulatory feed-back loop

**Yannick Sylvestre^{1¶}, Vincent De Guire^{1¶}, Emmanuelle Querido¹,
Utpal K. Mukhopadhyay¹, Véronique Bourdeau^{1,2}, François Major²,
³, Gerardo Ferbeyre^{1,4} and Pascal Chartrand^{1,4}**

¹Département de Biochimie

²Institut de Recherche en Immunologie et Cancer

³Département d'Informatique et Recherche Opérationnelle

Université de Montréal

Montréal, Qc H3C 3J7 Canada

Running title: An E2F/miR-20a auto-regulatory feed-back loop

[¶] Y.S and V.D.G contributed equally to this work

2.1.2 Summary

The E2F family of transcription factors is essential in the regulation of the cell cycle and apoptosis. While the activity of E2F1-3 is tightly controlled by the Retinoblastoma (Rb) family of proteins, the expression of these factors is also regulated at the level of transcription, post-translational modifications and protein stability. Recently, a new level of regulation of E2F has been identified, where microRNAs (miRNAs) from the *mir-17-92* cluster influence the translation of the *E2F1* mRNA. We now report that miR-20a, a member of the *mir-17-92* cluster, modulates the translation of the *E2F2* and *E2F3* mRNAs via binding sites in their 3'UTR. We also found that the endogenous E2F1, E2F2 and E2F3 directly bind the promoter of the *mir-17-92* cluster activating its transcription, suggesting an auto-regulatory feed-back loop between E2F factors and miRNAs from the *mir-17-92* cluster. Our data also point toward an anti-apoptotic role for miR-20a, since overexpression of this miRNA decreased apoptosis in a prostate cancer cell line, while inhibition of miR-20a by an antisense oligonucleotide resulted in increased cell death after doxorubicin treatment. This anti-apoptotic role of miR-20a may explain some of the oncogenic capacities of the *mir-17-92* cluster. Altogether, these results suggest that the auto-regulation between E2F1-3 and miR-20a is important for preventing an abnormal accumulation of E2F1-3 and may play a role in the regulation of cellular proliferation and apoptosis.

2.1.3 Introduction

The proper regulation of cellular proliferation and cell cycle progression is critical for the normal development of organisms and the prevention of cancer. Among the numerous factors involved in these processes, the E2F transcription factors play an essential role (Attwooll, 2004; DeGregori, 2002a; Dyson, 1998b). E2F1, along with E2F2 and E2F3, are activators of cell cycle progression and promote the entry of quiescent cells into S phase (DeGregori et al., 1997b; Johnson et al., 1993b). During G1, E2F1-3 are inhibited by their association with members of the retinoblastoma protein family (pRb, p107 and p130) (Dyson, 1998b). In mid- to late-G1, hyperphosphorylation of pRb by the cyclinD/cdk4-cdk6 complexes leads to the release of E2F1-3, which bind to specific E2F-responsive promoters, stimulating the transcription of genes involved in G1/S progression (Muller et al., 2001a; Stevaux and Dyson, 2002b). Most cancer cells contain mutations that deregulate the pRb/E2F pathway, which highlights its importance in the control of cellular proliferation. Deregulation of Rb/E2F control can also result in the activation of E2F1-induced apoptosis. Indeed, inactivation of pRb or overexpression of E2F1 promote apoptosis in several cell lines. E2F3 has also been shown to stimulate apoptosis, but in a E2F1-dependent pathway (Lazzerini Denchi, 2005). E2F1-responsive sites have been found in the promoters of several caspases as well as in other pro-apoptotic targets of p53 (Furukawa et al., 2002a; Nahle et al., 2002a). E2F1 is also activated by the DNA damage signalling pathway (ATM/ATR) leading to the activation of both p53-dependent and independent, pro-apoptotic pathways (Lin et al., 2001a; Urist et al., 2004). Therefore, E2F1 provides direct coupling of the cell cycle and apoptotic machinery, and it has been suggested that cycling cells are primed for apoptosis by E2F1 should proliferation be perceived as aberrant (Nahle et al., 2002a).

Besides the control of their activity by association with pRb, E2F1-3 are also regulated by phosphorylation (Krek et al., 1994), acetylation (Martinez-Balbas, 2000;

Marzio et al., 2000) and ubiquitin-dependent degradation (Campanero and Flemington, 1997). E2F1-3 also regulate their own transcription through E2F-binding sites within their promoters (Hsiao, 1994; Johnson, 1994). Recently, a novel mechanism of regulation of E2F1 activity has been identified: microRNAs (miRNAs) have been found to be important modulators of *E2F1* mRNA translation (O'Donnell et al., 2005b). miRNAs are small 21-23 nucleotides non-coding RNAs that control the stability and/or translation of specific transcripts through the recruitment of the RISC complex (RNA-inducing silencing complex); reviewed in (Zamore and Haley, 2005). Recent evidence suggests that miRNAs can regulate the expression of numerous genes (Lewis et al., 2005) and several studies point to the role of some miRNAs in the development of cancer; reviewed in (Esquela-Kerscher and Slack, 2006). Among them, miRNAs from the *mir-17-92* cluster have been shown to have an oncogenic activity when overexpressed with *c-myc* in a mouse model of human B-cell lymphoma (He et al., 2005a). Interestingly, this cluster is amplified in large-B cell lymphoma and in other malignant lymphomas (Ota et al., 2004a). Moreover, miRNAs from this cluster are overexpressed in lung cancer cells, and in colon, pancreas and prostate tumours (Hayashita et al., 2005; Volinia et al., 2006a). Another group has also shown that the *mir-17-92* cluster is directly regulated by MYC, and two miRNAs from this cluster, miR-17a and miR-20a, inhibited the translation of the *E2F1* mRNA (O'Donnell et al., 2005b). Altogether, these results suggest that miRNAs from the *mir-17-92* cluster can act as oncogenic miRNAs or “oncomirs” when overexpressed, possibly by acting on key regulators of the cell cycle and apoptosis, like E2F1.

Here, we show that miR-20a, a member of the *mir-17-92* cluster, regulates not only *E2F1* but also *E2F2* and *E2F3* via binding sites in the 3'UTR of their respective mRNAs. We also report that E2F1-3 directly bind the promoter of the *mir-17-92* cluster regulating its transcription. While overexpression of miR-20a decreased apoptosis in a prostate cancer cell line, inhibition of miR-20a by an antisense oligonucleotide resulted in increased cell death after doxorubicin treatment, pointing to a potential anti-apoptotic role for miR-20a. Altogether, these results suggest that

the auto-regulation between E2F1-3 and miR-20a is important for maintaining a balance between E2F activities in cellular proliferation and apoptosis

2.1.4 Experimental procedures

Plasmids constructions. The E2F 3'UTRs were amplified from the genomic DNA of HeLa cells using the following primers: (E2F1) sense 5'-TGCTAGTCTAGAGGATT TCTGACAGGGCTTGGAGG-3'; antisense 5'-CTACTAGCTAGCAGAAGGGAAGTGG AGAATGGGCAT-3'; (E2F2) sense 5'-TGC TAGTCTAGAGGTTCTAGTAAACGGCA GCTGTG-3'; antisense 5'-CTACTAGCTAC GGGACTTTAAGACGGGCGTCTGATA-3; (E2F3) sense 5'-CTACTATCTAGAGATCT AAGGTTTATCAGCCTCTGCA-3';antisense 5'-CTACTAGCTAGCTGTACCAAGTCCA GTGTGTGTGAG-3'. The wild type and mutated 3'UTRs of *E2F1*, *E2F2* and *E2F3* were cloned into the Xba1 site of the pGL3-control vector (Promega). For the mutagenesis, the sequences complementary to the seed of the miR-20a miRNA in each 3'UTR (GCACTTT) were replaced by their complementary sequence (CGTGAAA). For the promoter analysis, a fragment of 1kb from the *miR-17-92* cluster promoter containing five E2F binding sites was amplified from genomic DNA using the following primers: Sense: 5'-CGGCTAGCAGGCTCAGGTA CTGCAGCTG-3'; Antisense: 5'CCCTCGAGGC ACACAGGTTTCCCTC-3'. The PCR product was cloned between the Nhe1 and Xho1 sites of the pGL3-promoter vector (Promega). To overexpress miR-20a, we cloned the miRNA precursor after PCR amplification from human DNA with the following primers: Sense: 5'-CCGCTCGAGGTCTATCTGATGTGACAGCTTCT-3'; Antisense: 5'-CCGGAATTCAGC

TGGAGTTCTACAGCTAGCAG – 3'. The PCR product was subcloned into the retroviral vectors MLP and TMP (S. Lowe, Cold Spring Harbor).

Luciferase assays. Twenty–four hours before transfection, HeLa cells were plated at 300,000 cells per well in a 6-well plate. The pGL3-control plasmids containing the WT or mutated 3'UTRs were transfected (1,0µg) with pRL-globin (0,1µg) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). For the analysis of the *miR-17-92* cluster promoter, the pGL3-promoter plasmid containing a fragment of the promoter was transfected (3.0 µg) into HeLa cells (plated at 350,000 cells in 60X15mm plate 24h before transfection) in combination with different concentrations (0.1 µg, 0.5 µg, 1.0 µg or with 1.0 µg of empty vector) of a pBABE plasmid expressing E2F-ER protein fusion and pRL-globin (0.1µg) using FuGENE 6 (Roche). The total quantity of pBABE plasmid was maintained at 1.0 µg by adding the empty vector to the various concentrations of pBABE-E2F-ER used. The media was change 6hrs after transfection for fresh medium containing 4-OHT (500nM). Luciferase activity was measured 24hrs later. For the analysis of E2F activity, 500 nM of 2'-O-methyl oligoribonucleotide were transfected into HeLa cells (plated 300,000 cells per well 24hrs before transfection) in combination with either the pGVB2 plasmid containing the p73 promoter (2.0 µg), the pGL2 Basic plasmid containing the HsORC-1 promoter (2.0 µg) or the pGL3-control plasmid containing the 3'UTR of E2F1 (1.0 µg), with the pRL-globin plasmid (0.1µg) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 2'-O-methyl antisense oligoribonucleotides (ASO) used in this study were: miR-17-5p antisense: 5'-ACUACCUGCACUGUAAGCA CUUUG-3'; miR-20a antisense: 5'-CUACCU GCACUAUAAGCACUUUA-3'; let-7 antisense: 5'-CUCUGAACUAUACAACCUA CUACCUCAAUUUG-3'; Scramble: 5'-AAAACCUUUUGACCGAGCGUGUU-3'. The 2'-O-Me ASO were synthesized by Integrated DNA Technologies. All the luciferase assays were conducted at least three times in triplicate. For each experiments, luciferase assays were performed 24h after transfection using Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). Firefly luciferase activity was normalized to *Renilla* luciferase activity for each transfected well.

Northern blot analysis. Total RNA was extracted using the miRvana kit total RNA extraction protocol (Ambion). 20ug of total RNA were separated on 15 % denaturing polyacrylamide gels, transferred to a nitrocellulose membrane using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad), and hybridized using the Ambion protocol provided in the miRvana kit. The probe, complementary to miR-20 was labelled using T4 PNK (NEB) and $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Hybridization was performed overnight at room temperature and the film was exposed for 5 days.

Cell viability assay. Twenty-four hours before transfection, PC3 cells were plated at 100,000 cells per well in a 6-well plate. The 2'-O-methyl oligoribonucleotides (200 pmol) were transfected using Oligofectamine. 6hrs after transfection, the media was changed and fresh media containing 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of doxorubicin was added. Cells were harvest 72hrs after transfection and treated with Trypan Blue (Cambrex) to evaluate the cell death ratio. The experiment was conducted three times in triplicate. For miR-20a overexpression, either plasmid MLP-miR-20a or empty MLP plasmid were transfected in PC3 cells and selected with puromycin. About 10^5 cells per well in a 12-well plate from each of the selected populations were plated in media with or without doxorubicin (100ng/ml). After 3 days, all cells (even floating ones) were harvested and stained with 0.4% Trypan blue. Percentage of dead cells (blue⁺) were counted under microscope. Data represent the average of three experiments.

Cell growth assay. Either empty MLP vector or MLP-miR-20a vector were transiently transfected into PC3 cells. 24-36 hrs post-transfection, GFP⁺ cells were FACS sorted (FACS Vantage SE, Becton Dickinson, San Jose CA). 5000 GFP⁺ cells per well were directly sorted into 24-well plate containing media with or without doxorubicin (125 ng/ml). 72 hrs post-transfection, media was changed and surviving cells were allowed to grow further for another 3 days. Cells were washed twice with PBS and fixed with 0.5% glutaraldehyde solution in PBS. Cells were then stained with 0.5% crystal violet, rinsed several times with large amount of cold water and dried. Retained dye, which is proportional to cell mass/number, was extracted with suitable volumes of 10% acetic acid and 100 μl of extracted dye was used for absorbance measurements at O.D₅₉₅ in 96-wells plate with a microplate reader. Data represent the average of three experiments.

Clonogenic survival assay. After transient transfection and FACS sorting (as in the cell growth assay), 500 PC3 GFP+ cells per well were directly sorted into 6-well plate containing media with or without doxorubicin (12,5 ng/ml). 72 hrs post-transfection, media was changed and surviving cells were allowed to form colonies for another 8-10 days. Colonies were fixed with glutaraldehyde, stained with crystal violet and counted manually. Data represent the average of three experiments.

Western blot. HeLa cells were trypsinised, washed with PBS 1X, the pellet was resuspended in 500ul of lysis buffer (20mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2,5mM sodium pyrophosphate, 1mM β -glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4 , 1ug/ml leupeptin and 1mM PMSF), incubated on ice for 5 min and the lysates were sonicated 4X for 5 secondes. The pellet was washed 3X with 500ul of lysis buffer, 1X with PBS, 2X with water and resuspended in 25ul of 4X Laemli buffer and heated 5 min at 95°C. The proteins were loaded on a 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). The following antibodies were used for western blot: anti-E2F1 KH-20 mouse (1ug/ml), anti-E2F2 CC11 mouse (1ug/ml), anti- α -tubulin (B-5-1-2 1 :5000 mouse) (Sigma). Signals were revealed after incubation with anti-mouse secondary antibody (1 :1500) coupled to peroxidase (Amersham, UK) by using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, UK).

2.1.5 Results

2.1.5.1 Regulation of E2F1-3 expression by miR17/miR20 miRNAs.

In order to investigate whether E2F1 expression was regulated by factors binding to its 3'UTR, we fused the intact 3'UTR of *E2F1* to a luciferase reporter. We observed a tenfold reduction in luciferase activity from transfected HeLa cells when compared to a luciferase reporter fused to the 3'UTR of SV40 (Figure 1A). Since O'Donnell and colleagues (O'Donnell et al., 2005b) reported that the *E2F1* mRNA

contained binding sites for miR-17/miR-20 miRNAs that regulated its expression, we mutated the two miR-17-5p/miR-20a binding sites in the *E2F1* mRNA 3'UTR. When both sites were mutated, we observed an increase in luciferase activity near to the control level (Figure 1A). Moreover, co-transfection of the luciferase-*E2F1* 3'UTR reporter with 2'-O-methyl antisense oligonucleotides (ASO) against miR-20a resulted in a 50% increase in luciferase activity compared to a let-7 2'-O-methyl ASO control (Figure 1B). Together, these data support the previous observation that the translation of the *E2F1* mRNA is regulated by miRNAs from the *mir-17-92* cluster, including miR-20a, through miRNA-binding sites in the *E2F1* mRNA 3'UTR (O'Donnell et al., 2005b). Since it is known that other members of the E2F family, especially E2F2 and E2F3, share similar mechanisms of regulation, like Rb-binding, acetylation and co-transcriptional activation (Dyson, 1998b; Johnson, 1994; Marzio et al., 2000), we explored the possibility that miR-20a might also regulate the translation of the *E2F2* and *E2F3* mRNAs via binding sites in their 3'UTR. Indeed, bioinformatics analyses predicted the presence of three miR-20a binding sites in the 3'UTR of the *E2F2* mRNA, and one site in the 3'UTR of the *E2F3* mRNA (John et al., 2004) (Figure 1C). Both 3'UTR were cloned at the 3' end of the luciferase gene in the pGL3 control plasmid and transfected in HeLa cells (due to its large size, the *E2F2* 3'UTR that was cloned contained only the first two miR-20a binding sites). Compared to the control luciferase reporter, near twofold decrease in luciferase activity was observed from the luciferase-*E2F2* 3'UTR and the luciferase-*E2F3* 3'UTR reporters compared to the control (Figure 1A). As we have done for the *E2F1* 3'UTR, we mutated the binding sites of miR-20a in the luciferase-*E2F2* 3'UTR and *E2F3* 3'UTR reporters. As shown in Figure 1A, mutagenesis of the miR-20a target sites increased luciferase activity in both reporter mRNAs near the level of the control, suggesting that binding of miR-20a in these 3'UTR inhibits luciferase expression. We also determined the consequence of inhibiting miR-20a on the expression levels of endogenous E2F. As shown in Figure 2, transfection of HeLa cells with the 2'-O-Me ASO against miR-20a resulted in an increased level of E2F1 and E2F2, as assessed by western blot. Unfortunately, even with different antibodies, we have not been able to obtain clean E2F3 western blots (data not

shown). A 2'-O-Me ASO against miR-17, another member of the miR-20a family, also increased both E2F1 and E2F2 levels compared to the control ASO. Altogether, these results suggest that like *E2F1*, the *E2F2* and *E2F3* mRNAs are also targets of miR-20a.

2.1.5.2 Regulation of miR17/miR-20 gene expression by E2F1-3.

Since E2F1-3 are transcription factors, we explored the possibility that they may regulate the expression of the miR-20a miRNA. We generated stably transfected HeLa cells expressing tamoxifen-inducible oestrogen receptor ligand binding domain (ER) fusion proteins of E2F1, E2F2 and E2F3 (Vigo et al., 1999a). After six hours of tamoxifen induction, total RNA was extracted from these cells and the level of miR-20a was measured by northern blot. As shown in Figure 3A, overexpression of E2F1-3 lead to an increased level of miR-20a compared to the control HeLa cells, suggesting that the E2F1, E2F2 and E2F3 transcription factors can induce the expression of miR-20a. We also transfected HeLa cells with a deletion mutant of a E2F-ER fusion (dmE2F) which lack the transactivation domain but retain the DNA-binding domain. Interestingly, induction of this deletion mutant E2F also lead to increased miR-20a levels. Other studies have reported such effect of the dmE2F in various cellular systems (Attwooll, 2004), which suggest that the displacement of a repressive pRb-E2F complex from a promoter by the dmE2F may be sufficient to induce transcription. The miR-20a miRNA is part of a cluster of seven miRNAs, the *mir-17-92* cluster, which is present on the chromosome 13 (Ota et al., 2004a). This cluster has been shown to be induced by the c-Myc proto-oncogene (O'Donnell et al., 2005b) and amplified in B-cells lymphomas (He et al., 2005a). To determine if the increased expression of miR-20a occurs at the level of the *mir-17-92* cluster precursor, we took advantage of a HeLa cell line stably expressing E2F2-ER. We used Real time PCR to measure the level of pre-miRNA precursor following induction of E2F2. As shown in Figure 3C, induction of the E2F2-ER fusion resulted

in an increased precursor levels, suggesting that the *miR-17-92* cluster is upregulated by E2F.

To determine if this cluster may be directly regulated by the E2F1-3 transcription factors, we looked for putative E2F binding sites within the first 5kb of the promoter of the *mir-17-92* cluster using SiteScan (<http://compel.bionet.nsc.ru/FunSite/SiteScan.html>). E2F are known to bind to a canonical TTTSSCGC sequence (where S= C or G) in the promoters of their target genes (Tao et al., 1997). We identified four putative E2F binding sites in the *mir-17-92* promoter matching to this sequence (Figure 4A and B). In order to confirm the binding of these E2F to the promoter, we performed chromatin-immunoprecipitation (ChIP) experiments to detect the association of the endogenous E2F1, E2F2 and E2F3 transcription factors with the *mir-17-92* promoter in HeLa cells (Figure 4C). In the *mir-17-92* promoter, we generated the amplicon A, which is close to two putative E2F binding sites (sites 3 and 4); the amplicon B, which overlaps two other E2F binding sites (sites 1 and 2). The amplicon D, which overlaps the c-Myc binding sites identified previously (O'Donnell et al., 2005b). The amplicon E was used as a negative control, while amplicon E2F1 in the *E2F1* promoter was used as a positive control. As shown in Figure 4C, amplicons A and B were amplified after chromatin immunoprecipitation with anti-E2F2 and E2F3 antibodies, but not with an anti-GFP antibody. Only the amplicon A was amplified with the anti-E2F1 antibody. Amplicon C and D were negative. Interestingly, a stronger PCR amplification of the amplicon B was observed with E2F3 compared to E2F2 or E2F1. It may either mean that E2F3 binds more strongly to this region of the promoter, or that the E2F3 antibody is more efficient for immunoprecipitation.

To confirm that the *mir-17-92* cluster is regulated by the E2F, we cloned a 1kb fragment of this promoter, containing the four E2F-binding sites overlapping the amplicons A and B (sites 1 to 4), upstream of the luciferase gene in the pGL3-Promoter plasmid. Co-transfection of this reporter luciferase plasmid with increasing amount of the E2F-ER plasmids resulted in an increased activation of the luciferase gene (Figure 4D). E2F1 showed a stronger activation of this promoter (~eightfold), followed by E2F3 (~sixfold), whereas E2F2 activation was smaller (~twofold).

While E2F2 was as efficient as E2F1 and E2F3 to increase miR-20a levels (see Figure 3), it may bind to sites which are outside of the 1kb fragment cloned in the plasmid reporter. Similar levels of induction were observed using an E2F inducible ORC-1 promoter-luciferase reporter (Figure 1, Supplementary data). These results indicated that this fragment of the *mir-17-92* cluster promoter is responsive to the E2F1-3 transcription factors.

Altogether, these data suggest a self-regulatory mechanism, where the translation of the *E2F1-3* mRNAs is controlled by the miR-20a miRNA, which itself is regulated by the E2F at the transcriptional level.

2.1.5.3 Functional consequences of the regulation of E2F1-3 by miR-17/miR-20.

As an inhibitor of E2F1-3 expression, miR-20a should block E2F-dependent gene expression and may act as an anti-proliferative and/or as an anti-apoptotic agent. To explore these questions, we first measured the impact of inhibiting the function of miR-20a on the activity of endogenous E2F1-3. To do so, we transfected HeLa cells with plasmids containing luciferase reporter genes under the control of the ORC-1 or p73 promoter, both being E2F-inducible promoters (Ohtani et al., 1996a; Stiewe and Putzer, 2000b). The same cells were co-transfected with a 2'-O-Me ASO inhibitor against the endogenous miR-20a miRNA. As shown in Figure 5, inhibition of miR-20a resulted in a 50% increase in the activation of the ORC-1 promoter (Figure 5A) and p73 promoter (Figure 5B). A control 2'-O-Me ASO against the let-7 miRNA did not result in the induction of these promoters. Such induction correlates with the increased E2F1-3 expression observed when HeLa cells were transfected with the miR-20a 2'-O-Me ASO (see Figure 2), and suggest an increased E2F1-3 activity in these cells.

To explore the biological impact of an increased or decreased miR-20a activity, we took advantage of a PC3 prostate cancer cell line that was previously used to

study apoptosis after treatment with the DNA damage agent doxorubicin (Mukhopadhyay et al., 2005b). In these cells, an increased E2F activity correlated with apoptosis after treatment with doxorubicin (Mukhopadhyay et al., 2005b). We detected an endogenous miR-20a activity in PC3 cells by measuring a decreased luciferase activity from the luciferase-*E2F1* 3'UTR wild-type compared to the 3'UTR with mutated miR-20a target sites (Figure 6A). To determine if the inhibition of miR-20a function increases the level of apoptosis of PC3 cells, they were transfected with the anti-miR-20a or a scrambled 2'-O-Me ASOs and treated with doxorubicin. Cell death was measured by trypan blue staining after three days in culture. As shown in Figure 6B, transfection of the 2'-O-Me ASO against miR-20a resulted in a 50% increase in cell death after doxorubicin treatment compared to the scramble oligonucleotide, suggesting that inhibition of miR-20a makes these cells more sensitive to drug-induced apoptosis. We also overexpressed the miR-20a miRNA in PC3 cells by transfection of a MLP plasmid expressing a miR-20a shRNA. Northern blot from cells transfected with the MLP-miR-20a plasmid revealed an higher expression of the miR-20a miRNA (Figure 7A). Overexpression of miR-20a resulted in a twofold decrease in the endogenous level of E2F1 and E2F2, as shown by Western blot (Figure 7B). The growth of these cells was affected by the overexpression of miR-20a, suggesting that it may abolish E2F1-3 expression to an extent sufficient to compromise cell cycle transitions (data not shown). However, after treatment with doxorubicin, PC3 cells overexpressing the miR-20a miRNA showed a twofold decrease in cell death compared to the control cells (Figure 7C). By measuring cell survival, after doxorubicin treatment, with a clonogenic survival assay, we observed a twofold increase in cell survival of PC3 cells overexpressing miR-20a compared to control cells with the empty vector (Figure 7D). We also measured cell accumulation in monolayers, after doxorubicin treatment, of PC3 cells overexpressing or not miR-20a. Again, when miR-20a was overexpressed, we observed four times more cells in comparison to the control cells (Figure 7E). Both clonogenic and population growth assays suggest an increased level of cell survival, after treatment with a DNA damage agent, when miR-20a is overexpressed in PC3 cells. Taken together, these experiments support the

hypothesis that miR-20a has an anti-apoptotic function, possibly through its regulation of E2F1 expression.

2.1.6 Discussion

The various programs of gene expression, which explain the myriads of cell phenotypes or their response to environmental stimuli, have been classically viewed as the resultant of the combinatorial action of transcriptional regulators that can activate or repress specific genes. More recently, a family of small RNA molecules has emerged to challenge this accepted paradigm of gene regulation. These miRNAs can regulate gene expression both at transcriptional and post-transcriptional levels (Zamore and Haley, 2005). It has been proposed that they can act as developmental switches or as fail safe regulators of transcriptional programs (Plasterk, 2006). Since miRNAs are themselves transcribed by RNA polymerase II, they can be regulated by transcriptional regulators. This fact predicts that interesting regulatory loops can be established between genes coding for classic transcription factors and genes coding for miRNAs.

We report here that the *mir-17-92* cluster is directly regulated by the E2F family of transcription factors. Since several miRNAs encoded in this cluster can repress E2F1-3 expression, an interesting auto-regulatory feed back loop can be proposed between E2F and the *mir-17-92* cluster (Figure 8A). It is well established that E2F1-3 are involved in a positive auto-regulatory loop because they stimulate their own genes (Hsiao, 1994; Johnson, 1994). We propose that a role of the miR-20a miRNA family is to balance the positive auto-regulatory loop of E2F1-3 by a negative feed-back loop in order to control the level of expression of these transcription factors. We further suggest that other transcription factors involved in positive auto-regulatory loops may also be controlled by negative feed back loops involving miRNAs as transcriptional targets. An example may be the transcription factor MyoD, which is involved in myoblast differentiation, and which is known to activate

the transcription of its own gene (Thayer et al., 1989). Recently, Lodish and colleagues have shown that MyoD activates the transcription of the muscle specific miR-1 and miR-133 miRNAs (Rao et al., 2006). Interestingly, the MyoD mRNA has a potential miR-133 target site in its 3'UTR (Lewis et al., 2005), and it may be involved in a negative feed-back loop that controls MyoD levels and activity. In the negative feed-back loop between E2F1-3 and miR-20a, another layer of complexity must be added due to the activation of the *mir-17-92* cluster by c-Myc (O'Donnell et al., 2005b). Since E2F1-3 are known to activate the transcription of *MYC* (Thalmeier, 1989), and c-Myc can activate the transcription of *E2F1-3* (Adams et al., 2000; Leone, 1997), and both transcription factors activate the *mir-17-92* cluster, it suggest that this system may represent a novel variant of the feed-forward loop (Mangan and Alon, 2003), that can be dubbed as a double feed-forward loop (Figure 8B).

One interesting function of the negative feed-back loop between E2F and the miR-20a family of miRNAs would be to create a fail-safe mechanism to avoid high E2F activity. High E2F activity is potentially dangerous for the cell, because it can lead to cell death or malignant transformation depending on the cellular context. The physiological function of this circuit may be relevant to normal cell cycle regulation, where E2F1-3 levels can potentially reach high levels due to the well known fact that E2F1-3 positively regulate their own promoters. This also raises the possibility that the higher E2F levels observed with miR-20a inhibition may not come entirely from an increased E2F mRNA translation but may be caused in part by a secondary effect of the transcriptional upregulation of the E2F1-3 genes by higher E2F activity. Our observation that miR-20a targets preferentially the 3'UTR of the *E2F1* mRNA compared to the mRNAs of *E2F2* and *E2F3* suggest that E2F1 levels are more critical to cell survival, possibly due to the pro-apoptotic function of E2F1. This regulation may also be relevant to stem cell biology, where the Rb family is functionally inactivated by constitutive hyperphosphorylation and E2F activity is not subjected to Rb repression during the cell cycle (White et al., 2005). Interestingly, the *mir-17-92* cluster is highly expressed in mouse ES cells (Thomson et al., 2004),

which suggest the possibility that in the absence of functional Rb activity, E2F1-3 activity may be controlled instead by this negative feed-back loop.

The E2F/miR20a auto-regulatory feed-back loop may be also operative during the transformation of normal cells into tumor cells. Since E2F1 is known to have both tumor suppressor and oncogenic properties depending on the cellular context, the miRNA fail-safe mechanism that prevents high E2F levels can therefore promote or suppress tumor formation. An oncogenic role for the miR-20a family of miRNAs is consistent with the anti-apoptotic role of this miRNA revealed in this study. Also, enforced expression of the *mir-17-92* cluster in a *E μ -myc* mouse strain accelerated lymphomagenesis (He et al., 2005a). While the anti-apoptotic functions of miR-20a may partly explain this oncogenic activity and the observed decrease in cell death in the *E μ -myc* mouse overexpressing the *mir-17-92* cluster, a previous study has shown that myc-induced apoptosis in the *E μ -myc* mouse is E2F1-independent (Baudino et al., 2003). However, it is possible that other members of the *mir-17-92* cluster may target other pro-apoptotic genes. In addition, the genetic effects of miRNAs are different and subtler than the effects obtained in knockout animals where gene expression is totally abolished. On the other hand, in other cell types, the miR-20a family may act as a tumor suppressor by preventing the proliferative activity of E2F1-3. In agreement, the *mir-17-92* cluster was found deleted in a high percentage of ovarian and breast cancers (Zhang et al., 2006b).

Our results contribute to the understanding of the complex regulatory pathways regulating E2F activity and are therefore relevant for studies on cell cycle regulation, cell death and transformation. In addition, the fail-safe interactions between miRNAs and transcription factors described here, may announce a much more common regulatory pattern.

2.1.7 References

1. DeGregori, J. (2002) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1602**(2), 131-150
2. Attwooll, C., Lazzerini Denchi, E., Helin, K. (2004) *Embo J.* **23**, 4709-4716
3. Dyson, N. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2245-2262
4. DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., and Nevins, J. R. (1997) *PNAS* **94**(14), 7245-7250
5. Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Cress, W. D., and Nevins, J. R. (1993) *Nature* **365**(6444), 349-352
6. Stevaux, O., and Dyson, N. J. (2002) *Current Opinion in Cell Biology* **14**(6), 684-691
7. Muller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D., and Helin, K. (2001) *Genes Dev.* **15**(3), 267-285
8. Lazzerini Denchi, E., Helin, K. (2005) *Embo Reports* **6**, 661-668
9. Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R. V., McCurrach, M. E., Jacobson, M. D., Narita, M., Zhang, M. Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., and Lowe, S. W. (2002) *Nat Cell Biol* **4**(11), 859-864
10. Furukawa, Y., Nishimura, N., Furukawa, Y., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y., and Nakamura, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(42), 39760-39768
11. Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., and Prives, C. (2004) *Genes Dev.* **18**(24), 3041-3054
12. Lin, W.-C., Lin, F.-T., and Nevins, J. R. (2001) *Genes Dev.* **15**(14), 1833-1844
13. Krek, W., Ewen, M. E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, J. W. G., and Livingston, D. M. (1994) *Cell* **78**(1), 161-172
14. Martinez-Balbas, M. A., Bauer, U-M., Nielsen, S.J., Brehm, A., Kouzarides, T (2000) *Embo J.* **19**, 662-671
15. Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M. I., Cartwright, P., Helin, K., and Giacca, M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**(15), 10887-10892

16. Campanero, M. R., and Flemington, E. K. (1997) *PNAS* **94**(6), 2221-2226
17. Johnson, D. G., Ohtani, K., Nevins, J.R. (1994) *Genes Dev.* **8**, 1514-1525
18. Hsiao, K. M., McMahon, S.L., Farnham, P.J. (1994) *Genes Dev.* **8**, 1526-1537
19. O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., and Mendell, J. T. (2005) *Nature* **435**(7043), 839-843
20. Zamore, P. D., and Haley, B. (2005) *Science* **309**(5740), 1519-1524
21. Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005) *Cell* **120**(1), 15-20
22. Esquela-Kerscher, A., and Slack, F. J. (2006) *Nat Rev Cancer* **6**(4), 259-269
23. He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2005) *Nature* **435**(7043), 828-833
24. Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., and Seto, M. (2004) *Cancer Res* **64**(9), 3087-3095
25. Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. (2005) *Cancer Res* **65**(21), 9628-9632
26. Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C., and Croce, C. M. (2006) *PNAS* **103**(7), 2257-2261
27. John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D. S. (2004) *PLoS Biology* **2**(11), e363
28. Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C., and Helin, K. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**(9), 6379-6395
29. Tao, Y., Kassatly, R. F., Cress, W. D., and Horowitz, J. M. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**(12), 6994-7007
30. Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., and Nevins, J. R. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**(12), 6977-6984
31. Stiewe, T., and Putzer, B. M. (2000) *Nat Genet* **26**(4), 464-469
32. Mukhopadhyay, U. K., Senderowicz, A. M., and Ferbeyre, G. (2005) *Cancer Res* **65**(7), 2872-2881

33. Plasterk, R. H. A. (2006) *Cell* **124**(5), 877-881
34. Thayer, M. J., Tapscott, S. J., Davis, R. L., Wright, W. E., Lassar, A. B., and Weintraub, H. (1989) *Cell* **58**(2), 241-248
35. Rao, P. K., Kumar, R. M., Farkhondeh, M., Baskerville, S., and Lodish, H. F. (2006) *PNAS* **103**(23), 8721-8726
36. Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E.L., Lipp, M. (1989) *Genes Dev.* **3**, 527-536
37. Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L., Nevins, J.R. (1997) *Nature* **387**, 422-426
38. Adams, M. R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G., and Nevins, J. R. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**(10), 3633-3639
39. Mangan, S., and Alon, U. (2003) *PNAS* **100**(21), 11980-11985
40. White, J., Stead, E., Faast, R., Conn, S., Cartwright, P., and Dalton, S. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**(4), 2018-2027
41. Thomson, J. M., Parker, J., Perou, C. M., and Hammond, S. M. (2004) *Nat Meth* **1**(1), 47-53
42. Baudino, T. A., Maclean, K. H., Brennan, J., Parganas, E., Yang, C., Aslanian, A., Lees, J. A., Sherr, C. J., Roussel, M. F., and Cleveland, J. L. (2003) *Molecular Cell* **11**(4), 905-914
43. Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M. S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T. L., Barchetti, A., Ward, M. R., Yao, G., Medina, A., O'Brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P. A., Weber, B. L., and Coukos, G. (2006) *PNAS* **103**(24), 9136-9141

2.1.8 Footnotes

We thank Toshiyuki Sakai (Kyoto Prefectural University of Medicine) for the p73 promoter-luciferase reporter plasmid and K. Helin for the E2F1-3 expression vectors. This work was funded by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to F.M, G.F and P.C) and by a grant from the Cancer Research Society of Canada (to P.C). F.M is supported by a CIHR fellowship. G.F is supported by a CIHR

New Investigator fellowship. P.C is supported by a fellowship from the Fond de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (NATEQ).

2.1.9 Figures Legends

Figure 1: miR-20a regulates E2F expression. (A) Luciferase activity from HeLa cells transfected with a reporter luciferase gene fused to the wild-type or mutated *E2F1*, *E2F2* or *E2F3* 3'UTR. Mut. site: miR-20a binding sites are mutated. (B) Luciferase activity from the luciferase-*E2F1* 3'UTR reporter in HeLa cells transfected with 2'-O-Me ASO against miR-20a or the let-7 miRNA as a control. (C) Predicted target sites of miR-20a in the 3'UTRs of *E2F1*, *E2F2* and *E2F3* mRNAs. Paired t-test: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$.

Figure 2: Western blot analysis of endogenous levels of E2F1 and E2F2 in HeLa cells transfected with 2'-O-Me ASO against miR-20a, miR-17, scramble, or without ASO (Control). Numbers correspond to fold increase compared to control.

Figure 3: Induction of miR-20a expression by the E2F1-3 transcription factors. (A) Stable transfection of HeLa cells with pBABE plasmids expressing ER fusions of E2F1, E2F2, E2F3, the defective mutant E2F (dmE2F) or the empty vector were induced with tamoxifen for 6 hrs. Total RNA was extracted and probed by Northern blot for miR-20a expression. The 5S rRNA (ethidium bromide staining) was used as the loading control. Numbers correspond to fold increase compared to control. (B and C) Real-time PCR analysis of the *mir-17-92* pri-precursor. Data is expressed relative to the amount of β -actin mRNA present in each sample. (B) *E2F2* mRNA. (C) *mir-17-92* pri-precursor. Details of the Real-time PCR protocol are in the Supplementary data section.

Figure 4: The E2F1-3 transcription factors activate the *miR-17-92* promoter. (A) Distribution of the putative E2F sites in the promoter of the *miR-17-92* cluster. Boxes indicate the 4 putative E2F sites. Amplicons A to E used in the chromatin-immunoprecipitation experiment are indicated by the horizontal bars. The 1 kb promoter

region cloned is indicated on the Figure. (B) Sequences of the predicted E2F binding sites in the promoter of the *miR-17-92* cluster. (C) Chromatin-immunoprecipitation and PCR amplification of fragments from the *miR-17-92* cluster promoter using antibodies against endogenous E2F1, E2F2 and E2F3. Amplicon A to D are from the *miR-17-92* cluster promoter, amplicon E is from the 3' end of the *miR-17-92* cluster (negative control), amplicon E2F1 is from the promoter of the *E2F1* gene (positive control). Input: PCR amplification from whole chromatin; GFP: control antibody against GFP; No Ab: PCR reaction without chromatin template. Arrows point the PCR products. Stars indicate the primers. (D) Luciferase activity from HeLa cells expressing a luciferase gene under the control of a 1kb fragment of the *miR-17-92* promoter. These HeLa cells were co-transfected with different concentrations (0.1 μ g, 0.5 μ g, 1.0 μ g) of the pBABE plasmid expressing E2F1, E2F2 and E2F3-ER fusions proteins, or the empty vector (1.0 μ g). Paired t-test: * P <0.01, ** P <0.05. Details of the chromatin-immunoprecipitation protocol are in the Supplementary data section.

Figure 5: (A) Effect of the inhibition of endogenous miR-20a by 2'-O-Me ASO on the activity of an E2F-regulated ORC-1 promoter upstream of the luciferase gene. A 2'-O-Me ASO against let-7 was used as a control. (B) Same experiment as in A), but with an E2F1-regulated p73 promoter upstream of the luciferase gene. Paired t-test: ** P <0.05.

Figure 6: Inhibition of miR-20a increased the susceptibility of PC3 cells to cell death after doxorubicin treatment. (A) Luciferase activity from PC3 cells transfected with a reporter luciferase gene fused to the wild-type or mutated *E2F1* 3'UTR. Mut. site: miR-20a binding sites are mutated. (B) PC3 cells were transfected with 2'-O-Me ASO against miR-20a or with a scramble ASO. As another control, PC3 cells were transfected without ASO. Cell death was measured by Trypan blue staining. Paired t-test: * P <0.01, ** P <0.05.

Figure 7: miR-20a protects PC3 cells from doxorubicin-induced E2F-mediated cell death/apoptosis. (A) Northern blot on miR-20a miRNA from PC3 cells transfected with the control vector or the MLP-miR-20a plasmid. (B) Western blot analysis of the levels of E2F1 and E2F2 in PC3 cells transfected with the control vector or the MLP-miR-20a

plasmid. Numbers correspond to fold decrease compared to control. (C) Cell death of PC3 cells transfected with MLP-miR-20a or control vector after treatment with doxorubicin (100 ng/ml). Cell death was assessed using the Trypan blue exclusion assay. (D) Clonogenic survival of PC3 cells transfected with empty vector (control) or MPL-miR-20a vector after treatment with doxorubicin (12.5 ng/ml). Values correspond to the relative clone number compared with respective untreated cells. (E) Growth of PC3 cells transfected with empty vector (control) or MPL-miR-20a vector after treatment with doxorubicin (125 ng/ml). Values correspond to the relative absorbance compared with respective untreated cells. Paired t-test: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$.

Figure 8: Model for an auto-regulatory feed back loop between E2F and the *mir-17-92* cluster. A) E2F1-3 are involved in a positive auto-regulatory loop and stimulate the transcription of their own genes. Activation of the *mir-17-92* cluster by E2F1-3 would balance the positive auto-regulatory loop of E2F1-3 by a negative feed-back loop in order to control the level of expression of these transcription factors. B) Double feed-forward loop between E2F1-3, Myc and the miR-20a miRNA family. Since E2F1-3 activate the transcription of *MYC*, and vice versa (double-headed arrow), the transcriptional activation of the *mir-17-92* cluster by both transcription factors would maintain a level of miR-20a/miR-17 proportional to E2F activity.

Supplementary Figure 1: Figure 1: Luciferase activity from HeLa cells expressing a luciferase gene under the control of the ORC-1 promoter. These HeLa cells were co-transfected with different concentrations (0.1 μ g, 0.5 μ g, 1.0 μ g) of the pBABE plasmid expressing E2F1, E2F2 and E2F3-ER fusions proteins, or the empty vector (1.0 μ g).

2.1.10 Figures

Figure 1

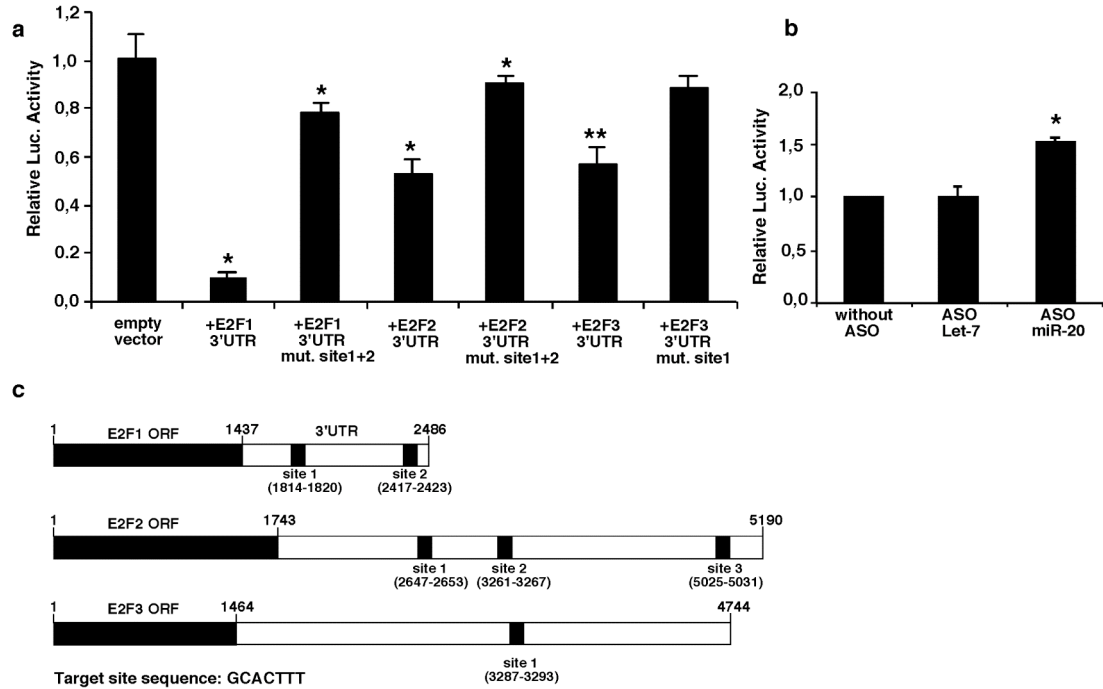


Figure 2

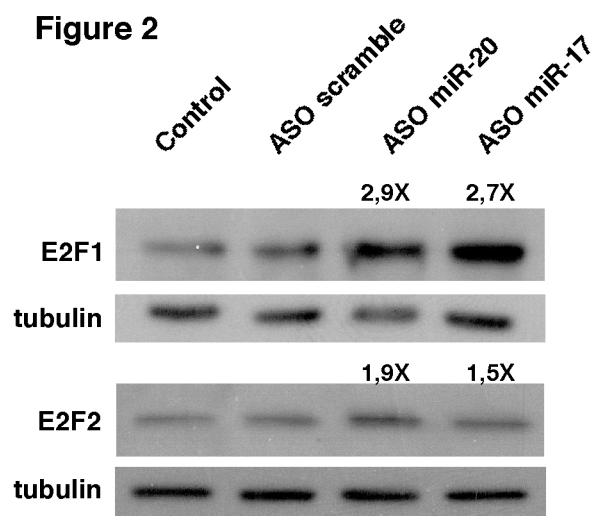


Figure 3

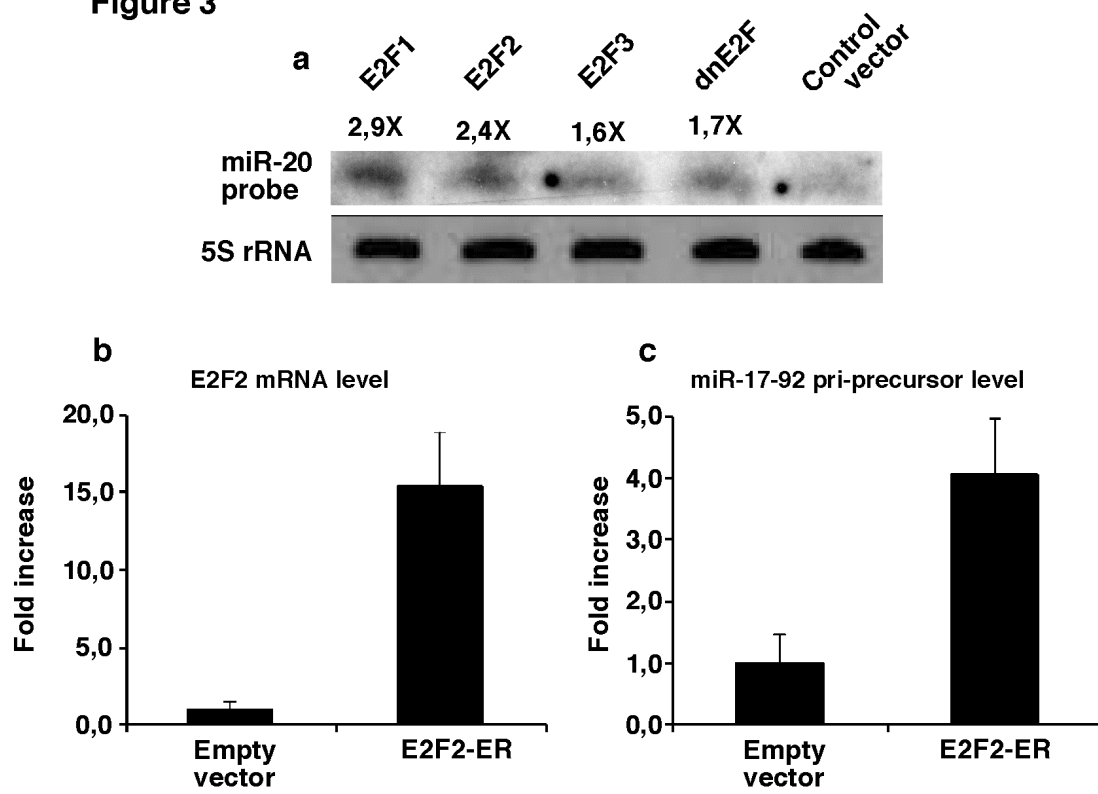


Figure 4

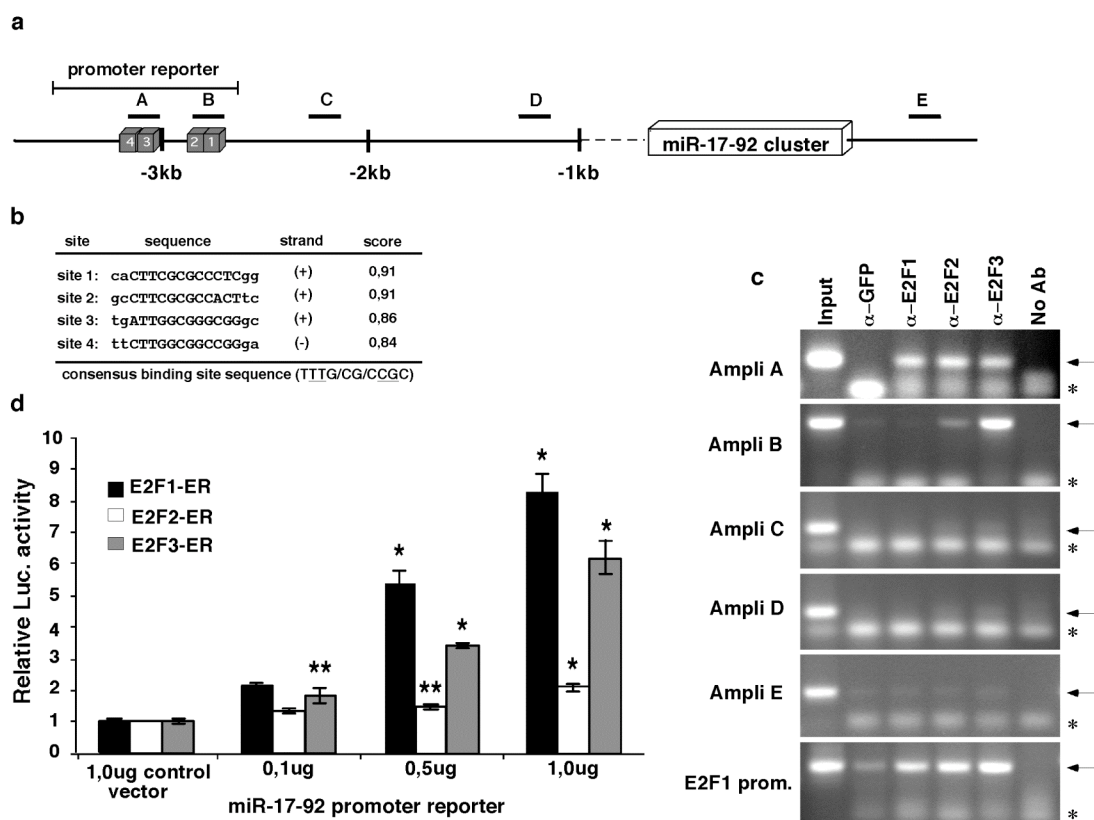


Figure 5

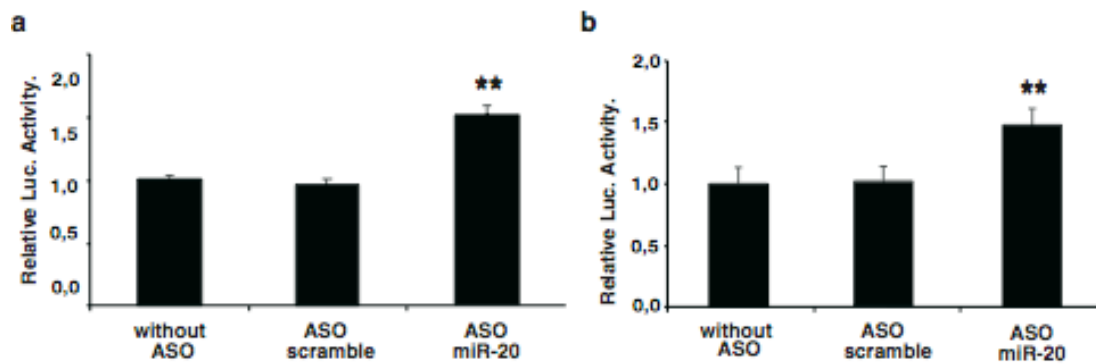


Figure 6

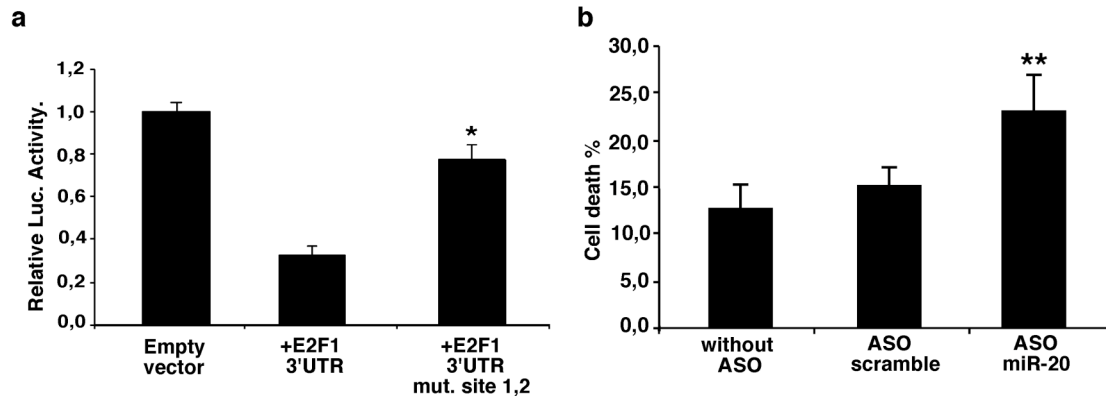
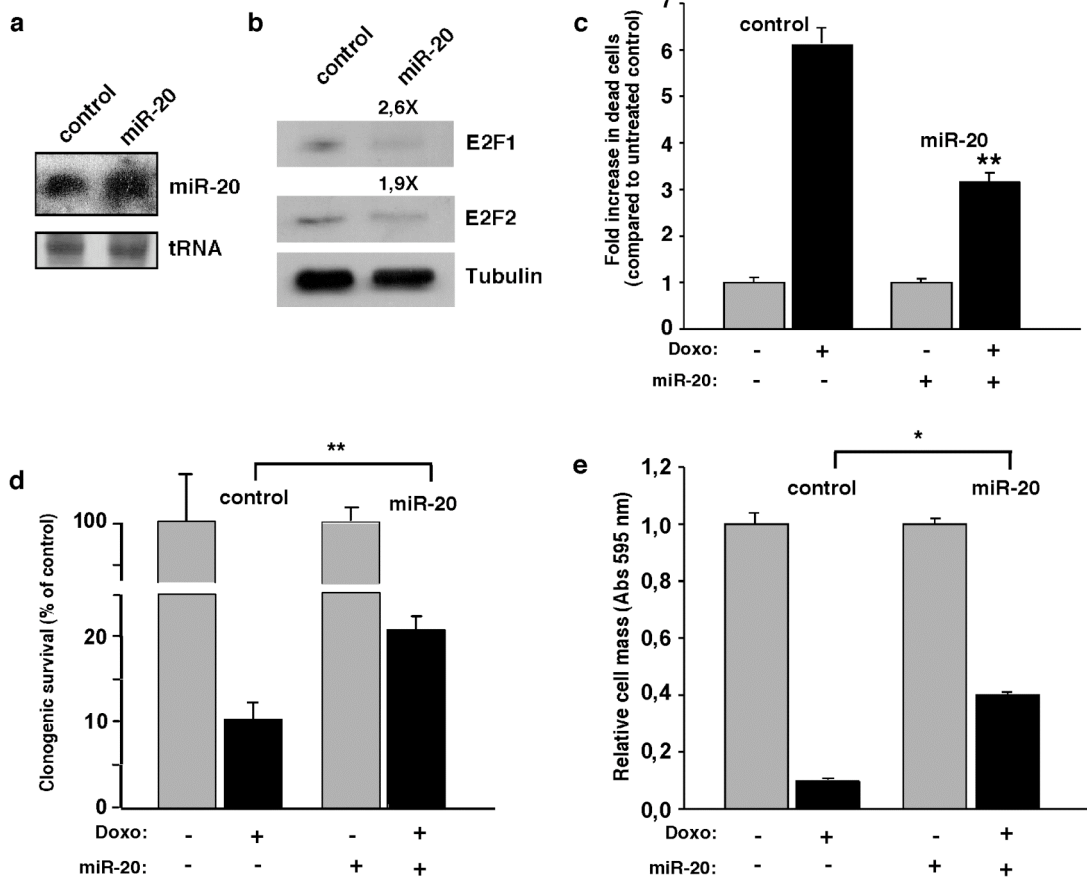
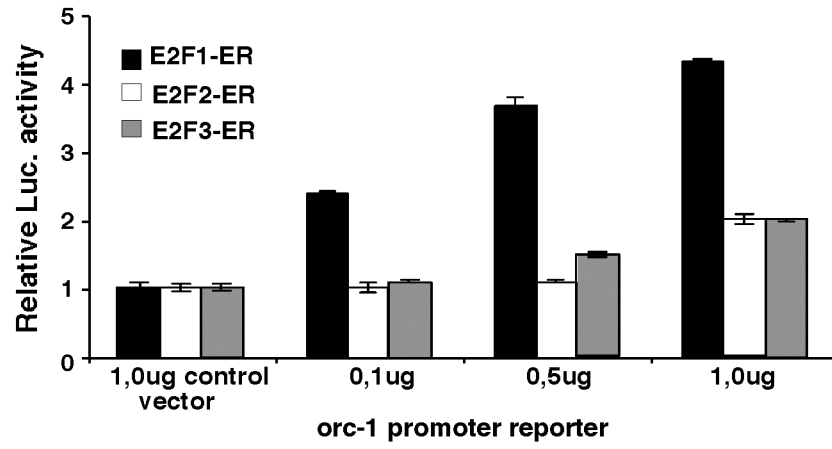


Figure 7



Supplementary figure 1



2.2 Article 2

2.2.1 Mise en contexte

Nos travaux sur la régulation des trois E2F par miR-20 ainsi que la littérature grandissante portant sur le mode de régulation de ces petits ARN nous ont fait réaliser le potentiel incroyable qu'ont les miARN à inhiber simultanément l'expression de plusieurs ARNm. L'utilisation de siRNA pour inhiber l'expression des gènes d'intérêt est très pratique, mais a toutefois ses limites. Le fait que l'inhibition par les siRNA est généralement limité à l'expression d'un gène ne cadre pas bien dans le caractère multigénique de la majorité des maladies. À la fin de nos travaux sur miR-20 et les E2F, les règles de reconnaissance des miARN à leurs cibles étaient de mieux en mieux caractérisées. Afin de répondre au manque de stratégies permettant l'inhibition simultanée de plusieurs cibles, nous avons voulu développer un outil qui met à profit le caractère unique des miARN. L'objectif principal de notre projet était donc de développer un programme bioinformatique permettant de générer la séquence de miARN artificiels ayant la capacité d'inhiber simultanément l'expression de gènes d'intérêt. La famille des E2F était le contexte idéal pour valider notre programme, puisque nous avions déjà tous les outils nécessaires, ainsi qu'un contrôle positif, miR-20. Après avoir créé notre programme, le but était donc de montrer sa fonctionnalité en étudiant l'impact phénotypique de miARN artificiels ciblant les trois E2Fs.

Notes

Contribution des auteurs :

Vincent De Guire : Élaboration du programme, réalisation de toutes les expériences in vivo, élaboration des Figures et participation à l'écriture par l'écriture de la discussion, de la section matériel et méthode, de l'élaboration des Figures et de la correction des autres sections.

Maxime Caron: Élaboration du programme, programmation du programme.

Catherine Ménard : Assistance aux immunobuvarges de type Western des E2F.

Marie-France Gaumont-Leclerc : Participation à initier le programme.

François major : Collaborateur et auteur par correspondance.

Pascal Chartrand : Collaborateur et participation à l'écriture.

Gerardo Ferbeyre : Superviseur Principal, élaboration du programme et participation à l'écriture.

#VDG and MC ont contribué à part égale et doivent être considérés comme co-premiers auteurs.

Article accepté dans Nucleic Acids Research

Designing small multiple-target artificial RNAs

Vincent De Guire^{1#}, Maxime Caron^{2#}, Nicolas Scott², Catherine Ménard¹, Marie-France Gaumont-Leclerc¹, Pascal Chartrand¹, François Major^{2*} and Gerardo Ferbeyre^{1*}

¹Département de Biochimie, and

²Institute for Research in Immunology and Cancer, and Computer Science Department

Equal contribution.

2.2.2 Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are naturally occurring small RNAs that regulate the expression of several genes. MiRNAs' targeting rules are based on sequence complementarity between their mature products and targeted genes' mRNAs. Based on our present understanding of those rules, we developed an algorithm to design artificial miRNAs to target simultaneously a set of predetermined genes. To validate *in silico* our algorithm we tested different sets of genes known to be targeted by a single miRNAs. The algorithm finds the seed of the corresponding miRNAs among the solutions, which also include the seeds of new artificial miRNA sequences potentially capable of targeting these genes as well. We also validated the functionality of some artificially miRNAs designed to target simultaneously members of the E2F family. These artificial miRNAs reproduced the effects of E2Fs inhibition in both normal human fibroblasts and prostate cancer cells where they inhibited cell proliferation and induced cellular senescence. We conclude that the current miRNA targeting rules based on the seed sequence work to design multiple-target artificial miRNAs. This approach may find applications in both research and therapeutics.

2.2.3 Introduction

The lack of good therapeutic strategies to deal with complex diseases is pressuring scientists to rethink the way they approach complex human disorders such as cancer and cardiovascular diseases. Because cancer cell development involves the deregulation of multiple genes (Rhodes et al., 2007), it is reasonable to believe that inhibiting a single gene is not the best solution to address the problem. In addition, the specific gene expression signature of different cancer cell types suggests we may need to simultaneously inhibit the expression of multiple genes. SiRNAs are effective at gene silencing, but they are designed to target single mRNAs (Elbashir et al., 2001). miRNAs have naturally evolved to inhibit the expression of several genes (Baek et al., 2008; Lim et al., 2005; Selbach et al., 2008), suggesting that it could be possible to use them as tools to inhibit multiple genes.

MiRNA-guide sequences are about 22 nucleotides long and repress the expression of specific genes by guiding the RNA silencing complex (RISC) to complementary sequences in messenger RNAs (Bartel, 2004; Wang et al., 2008b). The guide sequences are located on one strand of stem-loop precursor miRNAs from which they are obtained by enzymatic processing. MiRNA-guide sequences tightly bind to the Argonaute protein of RISCs through their backbone. It is believed that a fair fraction (~30%) of miRNAs initiate and stabilize the interaction with their targets by involving their nucleotides in positions 2 to 8 (the seed) in Watson-Crick base pairs with their target mRNAs (Bartel, 2009; Wang et al., 2008b). However, in many cases the seed nucleotides do not have perfect (Watson Crick) matches with their targets (Sethupathy et al., 2006a) and base pairing with the rest of

the miRNAs may compensate to stabilize the interaction. Nevertheless, we implemented in a computer program the current rules of miRNA-target recognition to design artificial miRNAs against gene sets. As a proof of concept, we also tested successfully a few artificial sequences generated by our program.

2.2.4 Materials and methods

Cells and tissue culture

PC3 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in RPM1 (GIBCO) supplemented with 10% FBS (Hyclone). IMR90 cells were obtained from ATCC and cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone) and 1% penicillin G/streptomycin sulfate (GIBCO).

Small-RNA expression

To express our smart RNAs we used a strategy developed by Paddison et al. (Paddison et al., 2004) where the sequence of the small RNA of interest is cloned in the miR-30 endogenous miRNA pri-precursor backbone. The goal is to form a stem-loop structure where the mature miR-30 sequence is replaced by the sequence of interest, in our case a smart RNA. To do so a PCR template is synthesized containing the 5' flanking stem sequence of miR-30, the sequence of the small RNA of interest, the mir-30 loop sequence, the complementary sequence of the small RNA of interest and the 3' flanking stem sequence of miR-30. The miR-30 flanking sequences and loop allow an efficient maturation and expression of the small RNA of interest. This template is amplified by PCR

using universal primers, with restriction sites, annealing to the 5' and 3' flanking miR-30 precursor sequence. The sequence of the templates and universal primers can be found in the supplemental table I. The PCR product is then digested with EcoRI and XhoI and ligated in the MLP retroviral vector that contain the extending miR-30 flanking sequence. The MLP vector is described in (41). The miR-20 precursor sequence was also cloned in MLP vector as described in (16). Retroviral-mediated gene transfer was performed using retroviral particles produced in Phoenix packaging cells as previously described (42). IMR90 and PC3 cell lines were then infected with the viruses and selected 48 hours with puromycin.

miR-20 detection.

miR-20 levels in our different cell lines were measured by qPCR. Total RNA was extract with Trizol reagent (Invitrogen) and 2 µg were reverse transcribed and then amplified with a TaqMan microRNA Assay kit specific for miR-20a (Ambion #000580). The level of miR-20 expression was normalized over the expression of U54.

Luciferase assay

Twenty-four hours before transfection, HeLa cells were plated at 50 000 cells per well in a 24-well plate. The pGL3-control plasmids containing the wild type 3'UTR of E2F1, E2F2 or E2F3 were transfected (50ng) with pRL-globin (50ng), and the smart RNAs, miR-20, or hairpin control (250ng) using Lipofectamine LTX (Invitrogen). The luciferase assay was performed 24 hours post-transfection using the dual luciferase reporter

assay system (Promega) and firefly luciferase activity was normalized to Renilla luciferase activity for each transfected well. The experiment was conducted three times in triplicate.

Western Blot

IMR90 cells were trypsinized and washed one time with PBS. The pellet was resuspended in 100 μ l of Laemmli buffer and heated 5 min at 95 °C. The proteins were quantified with the Bradford reagent and 20 μ g was loaded on a 10% SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore). The following antibodies were used for Western blot: anti-E2F1 KH-20 mouse (1 μ g/ml), anti-E2F2 CC11 mouse (1 μ g/ml), anti- α -tubulin (B-5-1-2 1:5000 mouse) (Abcam ab54945, 1:500), anti-E2F3 (ab54945, 1:500 mouse). Signals were revealed after incubation with anti-mouse secondary antibody (1:1500) coupled to peroxidase (GE Healthcare by using ECL (GE Healthcare).

Growth curves

Twenty-five thousand cells per well were plated into 12-well plates. At the indicated times, cells were washed with PBS, fixed in 4% formaldehyde, and rinsed with distilled water. Cells were stained with 0.1% crystal violet (Sigma) for 30 min, rinsed extensively, and dried. Cell-associated dye was extracted with 2.0 ml 10% acetic acid. Aliquots were diluted 1:4 with H₂O, transferred to 96-well microtiter plates, and the optical density at 590 nm was determined. Values were normalized to the optical density at day 0 for the appropriate cell type. Within an experiment, each point was determined in triplicate.

Senescence-Associated β -Galactosidase

SA- β -gal activity was detected as previously described with slight modifications

(Bandyopadhyay et al., 2005). Cells were washed once with PBS (pH 7.2), fixed with 0.5% glutaraldehyde (PBS [pH 7.2]), and washed in PBS (pH 7.2) supplemented with 1 mM MgCl₂. Cells were stained in X-gal solution (1 mg/ml X-gal, 0.12 mM K₃Fe[CN]₆, 0.12 mM K₄Fe[CN]₆, 1 mM MgCl₂ in PBS at pH 6.0) overnight at 37°C . Blue cells were counted in triplicate.

Colony formation assay

500 PC3 GFP⁺ cells were plated in a 6-well plate and were allowed to form colonies for 8–10 days. Colonies were fixed with glutaraldehyde, stained with crystal violet, and counted manually. Data represent the average of three experiments.

Energy calculations and folding

All ΔG and RNA secondary structure predictions were calculated using the Vienna RNA package (Gruber et al., 2008).

2.2.5 Results and Discussion

Designing small multiple-target artificial (SMART) RNAs to target multiple genes simultaneously is the reverse of finding miRNA targets. Therefore, we implemented known miRNA targeting rules (Lewis et al., 2005) in a computer program (MultiTar) that starts by searching common heptamers in the set of 3'UTRs of the genes we want to target. These heptamers represent common seed binding sites (SBS) for potential Smart RNAs for these genes. We favor SBS that: 1) create low energy duplexes with the seed; and, 2) expose globally and locally the SBS in the mRNA structure. Once a set of SBSs have been

identified and ranked, we use a Taboo search to determine the sequence of the rest of the miRNA (nucleotides 9-22; see supplementary methods).

The Taboo search is a local optimization method. It improves the local search by marking a previously found and potential solution as "taboo" so to avoid visiting that solution again (Cvijovicacut and Klinowski, 1995). We implemented a taboo search procedure to optimize the hybridization of the remaining part of the artificial miRNAs (nucleotides 9-22). We generate a number of sequences by mutating one nucleotide at a time and compute their average hybridization affinities with the mRNAs. We keep the solution that obtains the best average energy at the end of the search. Known examples suggest that the seed alone often suffices to make a miRNA repress the translation of its mRNA targets (Bartel, 2009). However, good complementarity in the 3' region of a miRNA can sometimes compensate for mismatches in the seed (Grimson et al., 2007). Thus, we assign the final scores based on the full miRNA-mRNA duplex complementarity (positions 1 to 22).

Because it has been shown that both strands can be recruited in the RISC complex, we maximize the incorporation of the guide strand to limit the non-specific effect of the sense strand. To do so, we avoid high thermodynamic stability at the 5' end of the guide strand, a condition that favors loading into the RISC complex (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). This is accomplished in the program by an optional rule (asymmetry rule) where the thermodynamic stability of the 5' end of the guide strand can be reduced by

decreasing its GC content. For more details about the MultiTar algorithm, see Fig. S1 and the Supplementary Information. The code of MultiTar is available upon request.

We wanted to test whether our algorithm would find the endogenous miRNAs if we give it the sets of natural genes they target. Given the 3'UTR sequence of the validated targets of miR-20 (Fontana et al., 2008; Hossain et al., 2006; O'Donnell et al., 2005a; Sylvestre et al., 2007; Taguchi et al., 2008; Volinia et al., 2006b; Wang et al., 2008a; Woods et al., 2007; Xu et al., 2008; Yu et al., 2008), miR-206 (Anderson et al., 2006; Rosenberg et al., 2006), and miR-21 (Asangani et al., 2008; Chen et al., 2008; Sayed et al., 2008; Si et al., 2007; Wickramasinghe et al., 2009), our program identified the seed sequences of the corresponding endogenous miRNAs (Table I). The thermodynamic stability of the seed and its match for these functional miRNAs was highly variable (Table I). However, the final thermodynamic seed score that takes into account the accessibility of the seed (see methods) was more homogenous, suggesting that parameters other than the simple thermodynamics of base pairing influence the activity of miRNAs. We compared the efficiency of MultiTar to TargetCombo, which takes the intersection of the predictions made by TargetScanS, Miranda, and Pictar. We took the top predictions (Table I) for miR-10a and miR-22. In both cases, MultiTar identified the correct seed sequence of the corresponding endogenous miRNAs. Interestingly, prediction ranks for miR-20 and miR-22 improved as the number of targets increases (Table I).

Next, we used MultiTar to find Smart RNAs that could target simultaneously E2F1, E2F2 and E2F3. The E2Fs are transcription factors that have redundant function in

activating gene expression (DeGregori et al., 1997a) and on cell cycle progression (Wu et al., 2001). Simultaneous inactivation of E2F1-3 by a conditional gene targeting approach in mice blocks cell cycle progression. However, cells can proliferate normally with only one of the three E2F1-3 genes (Wu et al., 2001). We have recently shown that these three genes are targeted by miR-20 (Sylvestre et al., 2007). MiR-20 is found in the solutions of MultiTar for E2F1-3. Its low scoring rank (66th solution of the program) can be explained by the fact that this miRNA is not optimized for recognition of only these three genes. As seen in Table I, miR-20 is the second best solution when the three E2Fs are combined with RBL2, another target of miR-20.

We experimentally tested the top solutions obtained with different options of the program (Table II). MT-E2Fs(1) and MT-E2Fs(2) were the best seeds found when we looked for only one binding site in each E2Fs with a perfect seed match. MT-E2Fs(3) target two sites with one mismatch allowed in the 3'UTR of each E2F (multiplicity option). In all cases shown in Table II we activated the asymmetry rule to facilitate the loading of the guide strand into the RISC.

To study the ability of these smart RNAs to repress E2Fs' activity, we cloned them as DNA cassettes coding for small hairpin RNAs (shRNAs), which upon expression in cells are expected to be processed into mature smart RNAs. The different MT-E2Fs were co-expressed in HeLa cells with a luciferase reporter containing the 3'UTR of E2F1, E2F2 or E2F3 that we used before to test the ability of miR-20 to regulate these mRNAs (Sylvestre et al., 2007). Base-pairing between these SmartRNA and their target sequences are shown

in Fig 1A. When tested with the reporter having the 3'UTR of E2F1, all three smart RNAs reduced its expression similarly to miR-20 (Fig. 1B). A similar result was found with the E2F2 reporter. However, MT-E2Fs(2) did not reduce expression of the E2F2 reporter because its binding site is not present in this E2F2-3'UTR reporter sequences (14) (Fig. 1C). For the E2F3 3'UTR, the results were identical as for that of E2F1 (Fig. 1D). To show that the inhibition induced by our smart RNAs depends on the sites predicted by MultiTar, we mutated the seed match for MT-E2Fs(1) in the 3'UTR of E2F1 for its complementary sequence. For the mutated seed match, we observed luciferase activity up to the control levels (Fig. 1E).

Next we tested the effect of our smart RNAs on endogenous E2F1-3 in normal fibroblasts IMR90 using immunoblots. All three MT-E2Fs reduced E2F1-3 expression as expected (Fig. 2A). None of these MT-E2Fs changed the levels of miR-20, the endogenous miRNA known to target E2Fs (Fig 2B). Because the main function of the E2Fs depends on their transcriptional activity, we measured expression of Mcm6, a transcriptional target of the E2Fs required for DNA replication (Ohtani et al., 1996b). The three MT-E2Fs decrease Mcm6 levels in comparison to the control hairpin (Fig. 2C). The decrease was comparable to that induced by miR-20, and was more pronounced for MT-E2Fs(1), which is also the smart RNAs that had the highest inhibitory effect on the E2Fs.

Next, we verified the biological impact of the decreased E2Fs' activity by our smart RNAs. Blocking E2F activity is expected to arrest cell proliferation, and in some conditions induce cellular senescence (Maehara et al., 2005). We observed a good correlation between

the extent of E2Fs decrease, Mcm6 decrease (Fig. 2A and C) and that of inhibition of cell proliferation by our MT-E2Fs (Fig. 3A). This result suggests that our smart RNAs can efficiently inhibit their three targets and neutralize the redundant function of the three E2Fs in cell cycle progression. Maehara et al. showed that a siRNA against DP1, an essential cofactor for the transcriptional activity of E2F1-3, induced senescence (Maehara et al., 2005). We thus performed a senescence associated β -galactosidase staining to measure senescence induction in our cells infected with the three smart RNAs, and observed senescence induction for all MT-E2Fs (Fig. 3B).

To measure the impact of the inhibition made by our smart RNAs in cancer cells, we infected PC3 prostate cancer cells with our retroviral vectors expressing MT-E2Fs(1) and MT-E2Fs(2). Then, we evaluated cell growth by clonogenic assays, which are commonly used to evaluate anti cancer drug efficacy in culture. Again, our smart RNAs were effective in inhibiting cell proliferation (Fig. 4A). We also observed a decrease in the number of colonies formed (Fig. 4B).

Our results indicate that we can engineer smart RNAs to inhibit the expression of a predetermined set of genes. This approach is not limited to sets of genes of the same family. For instance, the 3'UTR of the E2Fs are heterogeneous in length and sequence. A multiple sequence alignment between the three sequences using EMBL Clustal W2 gives distances of 0.48651, 0.49250 and 0.48654 for E2F1, E2F2 and E2F3 respectively. A similar calculation for the unrelated genes CCND1, CDKN1 and RBL2 gave numbers in the same range (0.48734, 0.49699, and 0.47777 respectively)

To estimate the upper bound of the number of genes that can be targeted using the targeting rules employed in MultiTar, we searched for heptamers common to a group of n sequences in a collection of randomly generated sequences of different lengths. For sequences of 3000 nts (our estimate of the average length of a mammalian 3'UTR), we found common heptamers for up to five sequences (Fig. S2). The probabilities of finding solutions are even higher when one or two mismatches in the seed region are allowed. In 124 validated miRNA targets in TarBase, 20% include one mismatch and 5% two mismatches. In our sets of randomly generated sequences, one or two mismatches allow to find many common heptamers for up to ten genes (Fig. S2). Since it is now accepted that miRNAs also target the coding region (Chi et al., 2009), this means that our approach can find artificial miRNAs for more than ten genes.

The asymmetry rule can be used to maximize the incorporation of the sequence of interest in the RISC complex but could eliminate some potential solutions. For example, in the in-silico validation of MultiTar, this rule prevented us to find the seed sequence of miR-10a, miR-21 and miR-22 given their respective known targets. In fact, these miRNAs contain more than one G or C in their first four nucleotides. It was reported that endogenous miRNAs precursors can express two different miRNAs that are encoded on each strand of the stem (Ro et al., 2007). Hence, natural miRNAs may sometimes avoid the asymmetry rule. In the case of smart RNAs it is important to limit the expression of the sense sequence to minimize non-specific effects. To maximize the number of solutions suggested by MultiTar, the asymmetry rule in the program is optional.

The MultiTar strategy provides a novel approach to the problem of inhibiting/repressing multiple genes simultaneously. Alternative approaches include the co-expression of one siRNA per gene. For example, Cheng and colleagues showed an induction of cell death in prostate cancer cells using a cassette expressing six shRNAs (Cheng et al., 2009). Interestingly, the inhibition of only one gene by the expression of single-gene targeting shRNAs was not enough to induce cell death, suggesting the requirement of multi-targeting. Liu et al. developed an expression cassette based on the miR-17-92 polycistron to express several shRNAs to target HIV mRNAs (Liu et al., 2008). These strategies achieved good inhibition of the targets, but necessitated the co-expression of several siRNAs that may increase non-specific effects. In addition, the use of several siRNAs can saturate the RISC complex, triggering toxicity by inhibiting endogenous miRNA functions (Grimm et al., 2006). Another difference between Smart RNAs and siRNAs is the degree of target inhibition. SiRNAs inhibit target gene expression with high efficiency while Smart RNAs has a microRNA-like effect inhibiting target gene expression by 1.2-2 fold. Therefore, Smart RNAs are not substitutes of siRNAs and their power of regulation is based on the additivity principal. It as been shown that the deletion of one of the E2Fs is not sufficient to affect cell proliferation (36). Although, the simultaneously moderate inhibition on the three E2Fs induce by our Smart RNAs was enough to decrease cell proliferation.

Smart RNAs, like siRNAs will have off-target effects as first described by Jackson et al (Jackson et al., 2003). The nature and number of off-target effects will depend of each

particular seed sequence. Therefore, as recommended for siRNAs, more than one solution should be tested for each gene set to ensure specificity of any biological effect observed. It is also plausible that some sequences may have more targets than others because they recognize certain repeated patterns in the genome. To minimize as much as possible the non specific effects of our Smart RNAs, additional bioinformatic tools are required to predict whether other genes could fulfill the recognition criteria for every MulTar solution. The use of the asymmetry rule, or modified small RNAs limiting the expression of the passenger strand or pools of smart RNAs could limit the non-specific off target effects of smart RNAs as well. Our results with MT-E2Fs support the concept of custom design miRNAs. These Smart RNAs with the ability to modulate gene expression patterns may find multiple applications in both research and therapeutics.

Funding

Prostate Cancer Canada (GF)

Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) (VDG, PC, GF)

Canadian Institute of Health and Research (FM, GF)

Conflict of interest statement. None declared.

Acknowledgements

We thank members of the Ferbeyre and Major labs for their comments. FM is a member of the Robert-Cedergren Centre of the Université de Montréal.

2.2.6 References

1. Rhodes, D.R., Kalyana-Sundaram, S., Mahavisno, V., Varambally, R., Yu, J., Briggs, B.B., Barrette, T.R., Anstet, M.J., Kincaid-Beal, C., Kulkarni, P. *et al.* (2007) Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia (New York, N.Y)*, **9**, 166-180.
2. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
3. Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. and Johnson, J.M. (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, **433**, 769-773.
4. Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, **455**, 58-63.
5. Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P. and Bartel, D.P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, **455**, 64-71.
6. Bartel, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
7. Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T. and Patel, D.J. (2008) Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*, **456**, 921-926.
8. Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233.
9. Sethupathy, P., Corda, B. and Hatzigeorgiou, A.G. (2006) TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA (New York, N.Y)*, **12**, 192-197.
10. Paddison, P.J., Cleary, M., Silva, J.M., Chang, K., Sheth, N., Sachidanandam, R. and Hannon, G.J. (2004) Cloning of short hairpin

- RNAs for gene knockdown in mammalian cells. *Nat Methods*, **1**, 163-167.
11. Bandyopadhyay, D., Gatza, C., Donehower, L.A. and Medrano, E.E. (2005) Analysis of cellular senescence in culture in vivo: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al]*, **Chapter 18**, Unit 18 19.
 12. Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neubock, R. and Hofacker, I.L. (2008) The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res*, **36**, W70-74.
 13. Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, **120**, 15-20.
 14. Cvijovicacute, D. and Klinowski, J. (1995) Taboo Search: An Approach to the Multiple Minima Problem. *Science*, **267**, 664-666.
 15. Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P. and Bartel, D.P. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, **27**, 91-105.
 16. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199-208.
 17. Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209-216.
 18. Hossain, A., Kuo, M.T. and Saunders, G.F. (2006) Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol*, **26**, 8191-8201.
 19. O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V. and Mendell, J.T. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, **435**, 839-843.
 20. Sylvestre, Y., De Guire, V., Querido, E., Mukhopadhyay, U.K., Bourdeau, V., Major, F., Ferbeyre, G. and Chartrand, P. (2007) An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem*, **282**, 2135-2143.
 21. Woods, K., Thomson, J.M. and Hammond, S.M. (2007) Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem*, **282**, 2130-2134.

22. Fontana, L., Fiori, M.E., Albini, S., Cifaldi, L., Giovinazzi, S., Forloni, M., Boldrini, R., Donfrancesco, A., Federici, V., Giacomini, P. *et al.* (2008) Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PloS one*, **3**, e2236.
23. Yu, Z., Wang, C., Wang, M., Li, Z., Casimiro, M.C., Liu, M., Wu, K., Whittle, J., Ju, X., Hyslop, T. *et al.* (2008) A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol*, **182**, 509-517.
24. Taguchi, A., Yanagisawa, K., Tanaka, M., Cao, K., Matsuyama, Y., Goto, H. and Takahashi, T. (2008) Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res*, **68**, 5540-5545.
25. Xu, X., Hong, Y., Kong, C., Xu, L., Tan, J., Liang, Q., Huang, B. and Lu, J. (2008) Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) is co-regulated by E2F1 and miR-17-92. *FEBS Lett*, **582**, 2850-2856.
26. Wang, Q., Li, Y.C., Wang, J., Kong, J., Qi, Y., Quigg, R.J. and Li, X. (2008) miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 2889-2894.
27. Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M. *et al.* (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2257-2261.
28. Rosenberg, M.I., Georges, S.A., Asawachaicharn, A., Analau, E. and Tapscott, S.J. (2006) MyoD inhibits Fstl1 and Utnr1 expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol*, **175**, 77-85.
29. Anderson, C., Catoe, H. and Werner, R. (2006) MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res*, **34**, 5863-5871.
30. Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S. and Allgayer, H. (2008) MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcdh4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, **27**, 2128-2136.
31. Sayed, D., Rane, S., Lypowy, J., He, M., Chen, I.Y., Vashistha, H., Yan, L., Malhotra, A., Vatner, D. and Abdellatif, M. (2008)

- MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. *Mol Biol Cell*, **19**, 3272-3282.
32. Chen, Y., Liu, W., Chao, T., Zhang, Y., Yan, X., Gong, Y., Qiang, B., Yuan, J., Sun, M. and Peng, X. (2008) MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett*, **272**, 197-205.
 33. Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F. and Mo, Y.Y. (2007) miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, **26**, 2799-2803.
 34. Wickramasinghe, N.S., Manavalan, T.T., Dougherty, S.M., Riggs, K.A., Li, Y. and Klinge, C.M. (2009) Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res*, **37**, 2584-2595.
 35. DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1997) Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7245-7250.
 36. Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J. *et al.* (2001) The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature*, **414**, 457-462.
 37. Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D.R., Kelly, T.J. and Nevins, J.R. (1996) Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol*, **16**, 6977-6984.
 38. Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N. and Hara, E. (2005) Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J Cell Biol*, **168**, 553-560.
 39. Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A. and Darnell, R.B. (2009) Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, **460**, 479-486.
 40. Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M. and Yan, W. (2007) Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5944-5953.
 41. Cheng, T.L., Teng, C.F., Tsai, W.H., Yeh, C.W., Wu, M.P., Hsu, H.C., Hung, C.F. and Chang, W.T. (2009) Multitarget therapy of malignant

- cancers by the head-to-tail tandem array multiple shRNAs expression system. *Cancer Gene Ther.*
42. Liu, Y.P., Haasnoot, J., ter Brake, O., Berkhout, B. and Konstantinova, P. (2008) Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Res*, **36**, 2811-2824.
 43. Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F. and Kay, M.A. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, **441**, 537-541.
 44. Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. and Linsley, P.S. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, **21**, 635-637.

2.2.7 Legend

Figure 1. MT-E2Fs target E2F1-3 luciferase reporter. Luciferase activity from HeLa cells co-transfected with the different Smart RNAs **A) Base-pairing between miR-20, the three MT-E2Fs and the E2Fs binding sites. B) A reporter luciferase gene fused to E2F1 3'UTR. C) A reporter luciferase gene fused to E2F2 3'UTR. D) A reporter luciferase gene fused to E2F3 3'UTR. E) Luciferase activity from HeLa cells co-transfected with MT-E2F(1) and E2F1 3'UTR or a mutant lacking the binding site for MT-E2F1. Paired T test: * indicates $p < 0.05$, and ** $p < 0.02$**

Figure 2. MT-E2Fs target E2F1-3 endogenous protein. A) Immunoblots on endogenous E2F1, E2F2 and E2F3 in IMR90 cells expressing the smart RNAs against E2F1-3, control hairpin and miR-20. A) Measure of the relative miR-20 level by qPCR in the different cell lines expressing the smart RNAs against E2F1-3, control hairpin and miR-20 C) Mcm6 immunoblots of IMR90 cells expressing the smart RNAs against E2F1-3, a control hairpin, and miR-20. D) Quantification of the immunoblots presented in 2A and 2C showing the relative level of E2F1, E2F2, E2F3 and MCM6 normalized on the tubulin expression for the different cell lines.

Figure 3. MT-E2Fs targeting E2F1-3 functions. A) Growth curves of normal human fibroblasts expressing the smart RNAs against E2F1-3, a control hairpin, miR-20, and

RasV12 a positive control for growth arrest and senescence. **B)** Senescence associated β -galactosidase of normal human fibroblasts expressing the smart RNAs against E2F1-3, a control hairpin, miR-20, and RasV12. Cells were stained at day 8 post- selection. Data represents the average and standard deviation of three independent experiments.

Figure 4. Effect of MT-E2Fs(1) and MT-E2Fs(2) on prostate cancer cells. A) Relative cell growth of PC3 cells expressing MT-E2Fs(1), MT-E2Fs(2), and a hairpin control. **B)** Colony formation ability of PC3 cells expressing MT-E2Fs(1), MT-E2Fs(2), and a hairpin control. Paired T test: * indicates $p < 0,05$; ** $p < 0.02$.

2.2.8 Figures

Table I. Finding endogenous miRNAs. The endogenous miRNAs are found given their corresponding target genes. All these targets have perfect seed binding sites. The ranking refers to the scores of the solutions found by the algorithm (ranking/number of solutions). The highest scores are ranked first. The scores are between 0 and 1, where 1 indicates perfect matching (see supplementary methods for their definition).

Input genes	miRNA and rank	Seed ΔG score	Total Average Seed Score
E2F1, E2F2, E2F3, RBL2	miR20 (66/93)	0.44	0.54
E2F1, E2F2, E2F3, CCND1, p21	miR-20 (2/8)	0.44	0.52
E2F1, E2F2, E2F3, CCND1, p21, RBL2	miR-20 (1/2)	0.44	0.56
E2F1, E2F2, E2F3, CCND1, p21, RBL2 PTPPRO	miR-20 (1/3)	0.44	0.55
E2F1, E2F2, E2F3, CCND1, p21, RBL2 NCOA3	miR-20 (1/1)	0.44	0.56
E2F1, E2F2, E2F3, CCND1, p21, RBL2, PTPRO, NCOA3, HIF1 TGFB2	miR-20 (1/1)	0.44	0.55
FSTL1, UTRN, GJA1	miR-206 (8/41)	0.34	0.62
PDCD4, BCL2, SPROUTY2, MTAP, SOX5	miR-21 (1/1)	0.38	0.54
PAFAH1B1, CIDSPL, SDC1, CTDSYL, ID4	miR-10a (3/24)	0.63	0.62
PTEN, NDEL1, IL13RA1	miR-22 (2/33)	0.74	0.65
PTEN, NDEL1, IL13RA1, PLAG2, PTPN9, Cul3	miR-22 (1/1)	0.74	0.66

Table II. Smart RNAs against E2F1-3.

Name	Sequence	M	Target site		
			E2F1	E2F2	E2F3
miR-20	<u>UAAAGUGCU</u> UAUAGUGCAGGUAG	NA	363-395 956-988	881-913 1495-1527 3259-3291	1800-1832
MT-E2Fs(1)	<u>UAUCUGACUU</u> ACGUGACUGCUU	1	740-772	974-1006	1188-1220
MT-E2Fs(2)	<u>UUUCCCAAUUUC</u> GCCCGGCCCU	1	707-739	2019-2051	1838-1870
MT-E2Fs(3)	<u>UAGUGGGG</u> AGGGGGUUUCCGGU	2	93-125 946-978	2262-2294 2734-2766	709-741 1219-1251

M= multiplicity rule

Figure 1

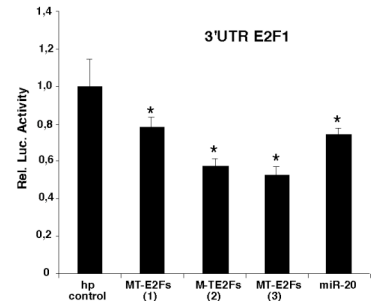
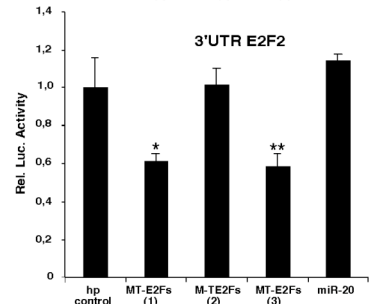
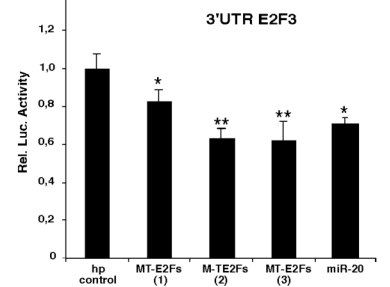
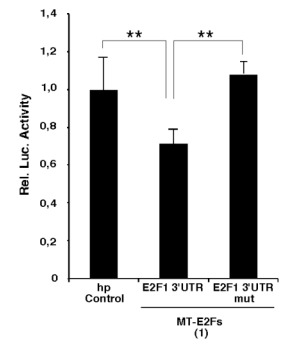
**B****C****D****E**

Figure 2

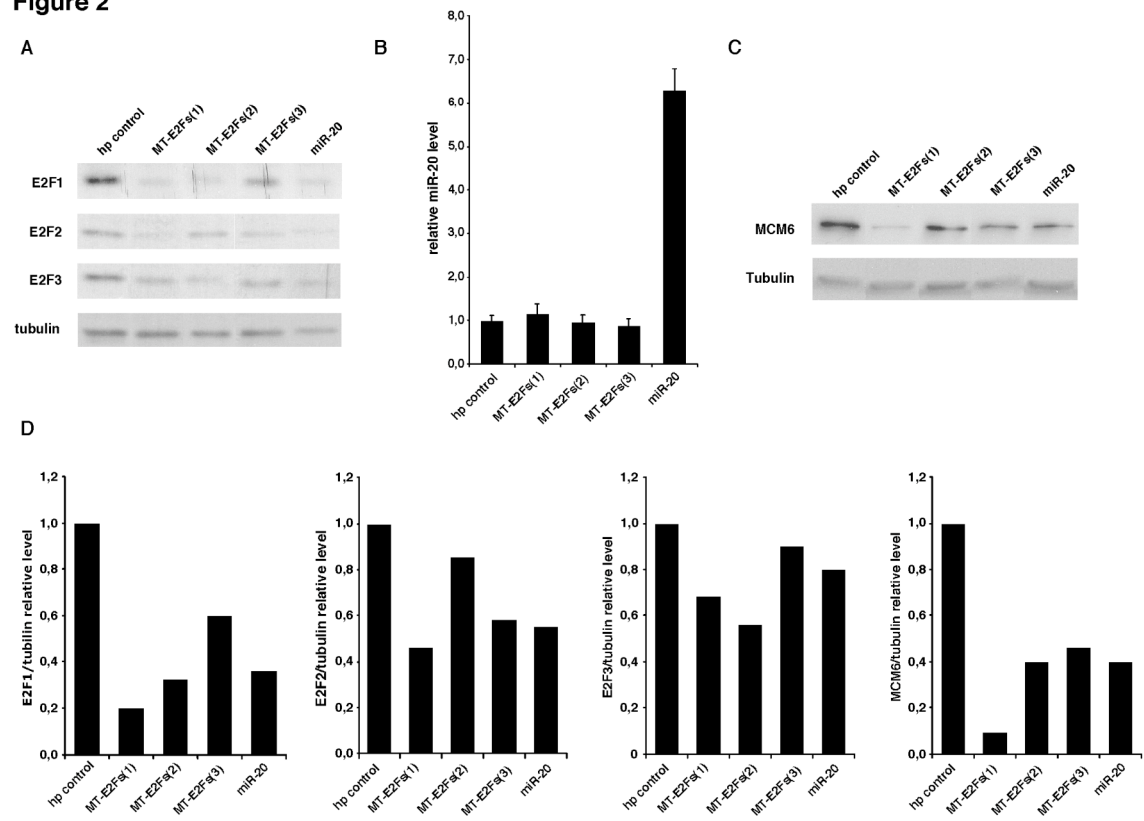
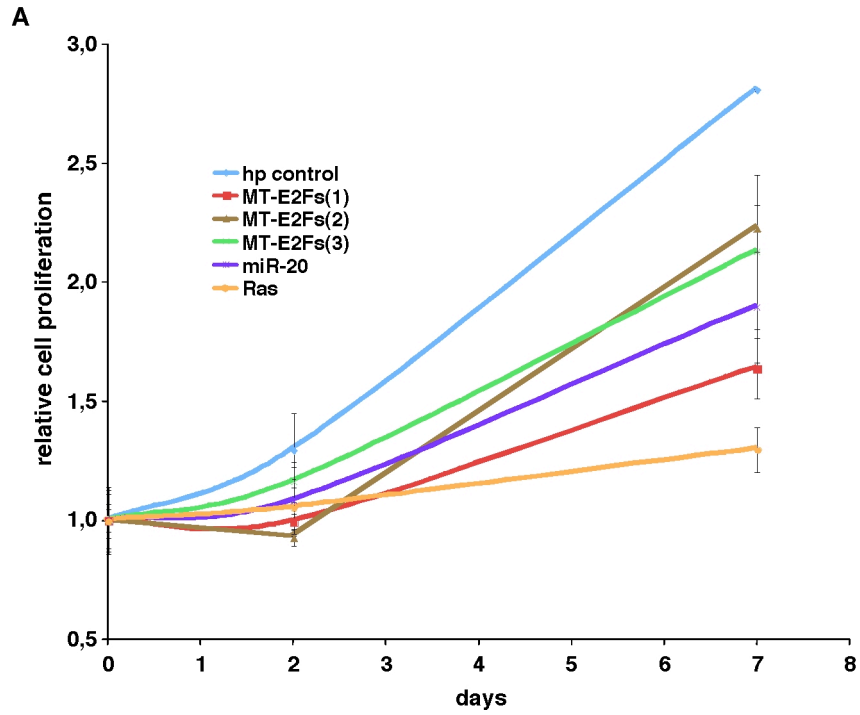


Figure 3



B

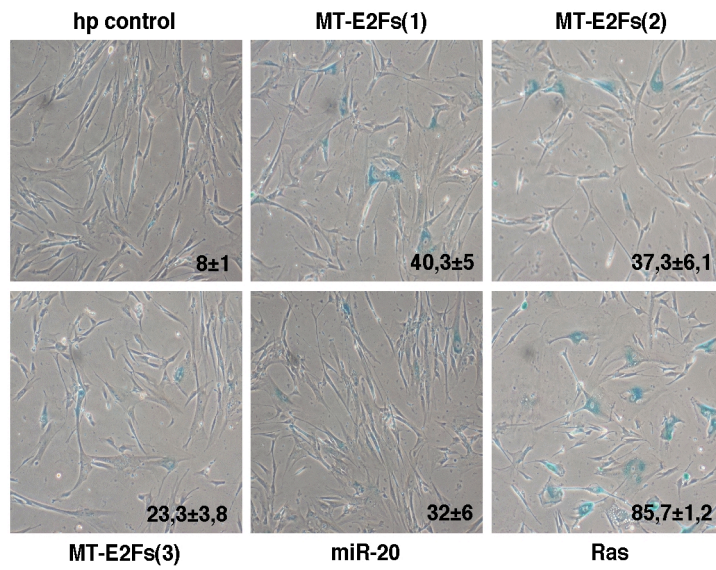
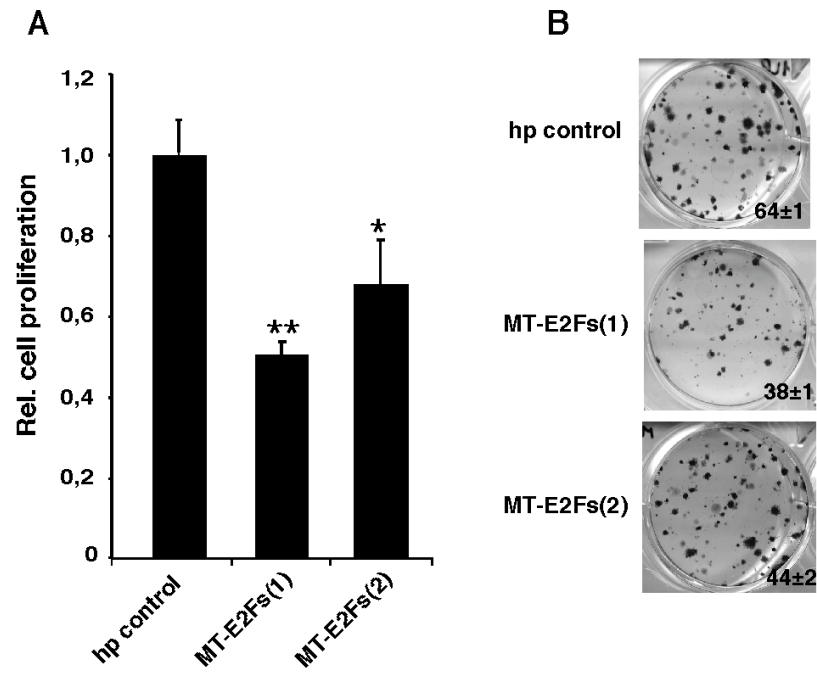
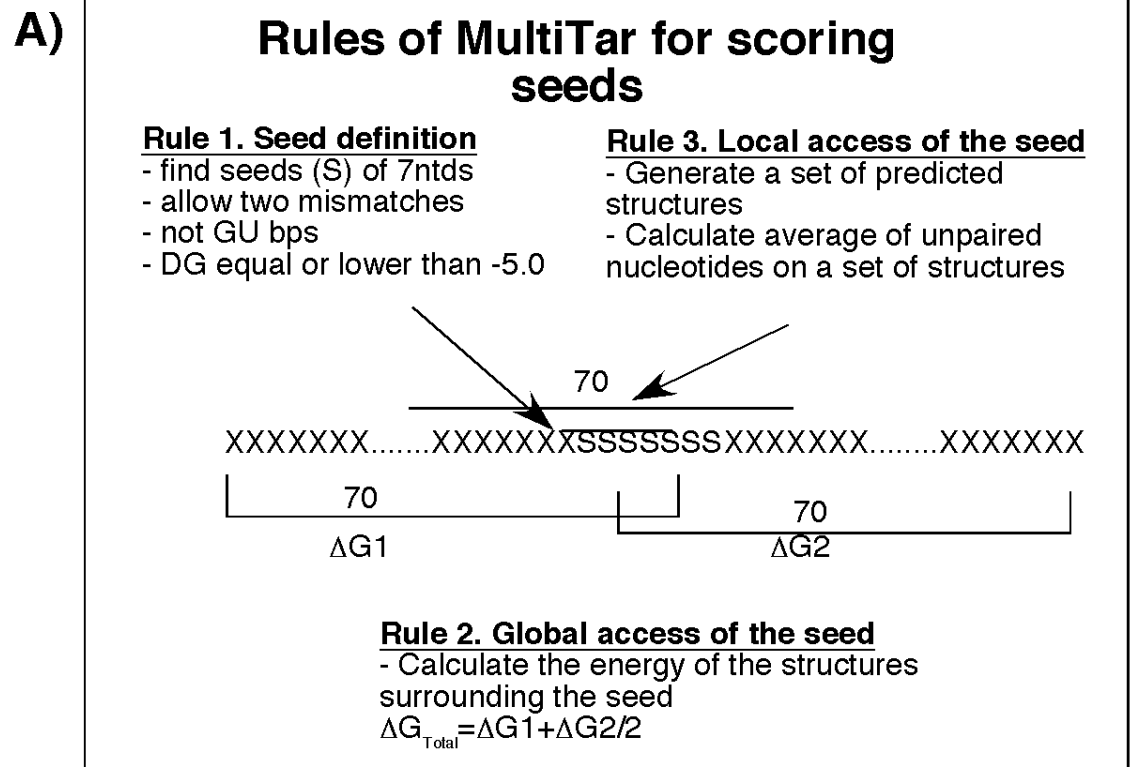


Figure 4

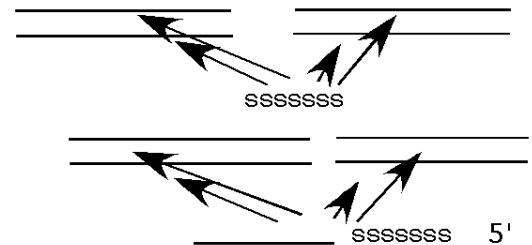
Supplementary Figure 1



B) Steps of MultiTar to find MT-shRNAs

Step 1. Find a common seed binding site for n number of genes (as in A).

Step 2. Tabusearch: search for possible base pairing for nucleotides 9-22 of the miRNA with every target (one loop and mismatches accepted)



Step 3. Assign scores based on energy of interaction (A) and the kind of loop (B), where $A=0.7$ and $B=0.3$

Score = $(A \times \text{Complex Energy Ratio} + B \times \text{Average loop score}) \times (1 - \text{Balance score})$

Step 4. Asymmetry rule: avoid solutions where the 3' end of the antisense strand (last 4 ntds) has a lower ΔG than the 5' end (first four nucleotides).

3. Discussion

3.1 Caractérisation de la boucle de rétroactivation négative entre miR-20/miR-17 et les E2F

Nous avons été le premier groupe à caractériser une boucle de régulation aussi complexe impliquant deux miARN et trois facteurs de transcription. La caractérisation de cette boucle de rétroactivation négative existant entre les miARN miR-20/miR-17, du polycistron miR-17-92 et les facteurs de transcription E2F1, 2 et 3 soulève plusieurs questions qui seront abordées dans cette section. L'analyse sera divisée en différentes sections, basées sur les éléments de la boucle que nous avons identifiés. L'aspect de l'inhibition des trois E2F sera tout d'abord traité, suivi de l'activation transcriptionnelle du polycistron par les E2F. Finalement, l'impact de cette boucle sur les différents processus régulés par les E2F sera mis en contexte.

3.1.1 miR-20 inhibe la traduction des E2F

Nos résultats démontrent clairement la capacité de miR-20/miR-17 à inhiber l'expression des trois E2F activateurs. Toutefois, miR-20 semble inhiber plus efficacement l'expression d'E2F1 que les deux autres membres. Nous avons pu observer que la mutation des sites de liaison pour miR-20 augmente les niveaux d'expression du rapporteur luciférase de 7 fois pour le rapporteur E2F1 comparativement à moins de deux fois pour E2F2 et E2F3. Il est possible d'observer la même tendance au niveau des immunobuvardages de type Western de E2F1 et E2F2, puisque l'inhibition de miR-20 augmente de deux fois plus l'expression de E2F1. Ces différentes observations nous ont porté à conclure que la fonction de miR-20/miR-17 serait de diminuer principalement l'expression de E2F1 tout en contrôlant les niveaux de E2F2 et 3. La Figure 1C de l'article dans JBC présente la cartographie des différents sites de liaison pour ces miARN dans les

différents 3'UTRs des E2F. Fait étonnant, le 3'NTR de E2F2 possède 3 sites de liaison comparativement à deux pour E2F1 et un pour E2F3. Basé sur le nombre de sites, il est étonnant que miR-20 inhibe préférentiellement E2F1 et non E2F2. Bien que le troisième site de E2F2 ne soit pas présent dans le rapporteur luciférase de la Figure 2, il est possible d'observer une diminution de l'expression des E2F endogènes deux fois plus marquée pour E2F1 que pour E2F2. Afin de tenter d'expliquer cette préférence pour E2F1, il serait intéressant d'analyser les caractéristiques des différents sites de liaison de miR-20. Un résumé de l'analyse est illustré dans le tableau II et un schéma des appariements potentiels entre miR-20 et chacun des sites est illustré à la Figure 23. Comme mentionné dans l'introduction, l'élément qui semble le plus important dans la reconnaissance d'une cible par un miARN est son noyau. Les différents sites de liaisons semblent tous posséder une bonne interaction entre leur noyau et la séquence cible avec au minimum un appariement au niveau des nucléotides 2 à 8 de l'extrémité 5' du miARN. Comme illustré à la Figure 6B de l'introduction en B, la présence de deux 7-mers permet une inhibition respectable de la cible, ce qui est observé pour E2F1 qui possède deux 7mer-m8 pour miR-20.

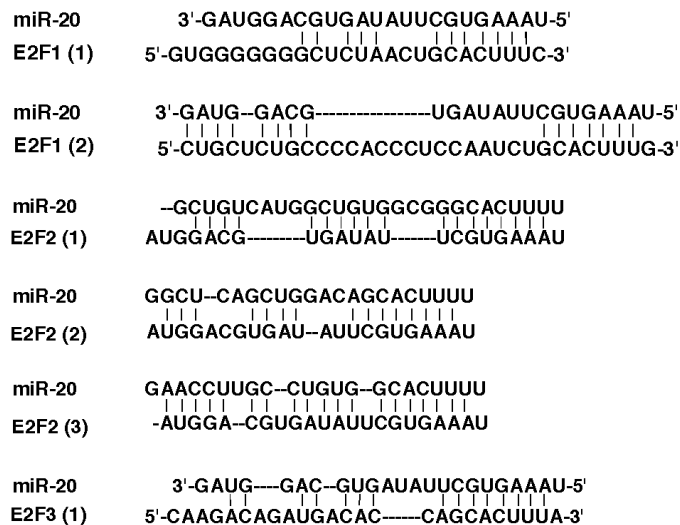


Figure 23. Alignement, estimé par MultiTar, des interactions possibles entre miR-20 et les sites dans les 3'NTR des différents E2F.

Tableau II. Caractéristiques des différentes interactions prédites entre miR-20 et les E2F

sites	Type de seed	appariement 3'	accessibilité local (kcal/mol)	accessibilité globale	%AU	Position
E2F1 (1)	7mer-m8	(5) 12-14,16-17	-21	-53,4	37%	centre
E2F1 (2)	7mer-m8	(8) 16-23	-1,9	-20,30	40%	extrémité
E2F2 (1)	9mer	(10) 13-18	-15	-51	37%	ext/centre
E2F2 (2)	9mer	(7) 13-16	-10,20	-48,9	38%	centre
E2F2 (3)	7mer-m8	(12) 9-15, 17-21	-9.1	-63,3	43%	extrémité
E2F3 (1)	9mer-A1	(7) 14-18	-9.1	-51,6	48%	centre

Toutefois, E2F2 possède un 7mer-m8 ainsi que deux autres sites ayant une interaction au niveau des nucléotides 2 à 9 du noyau de miR-20 (voir la Figure 6 pour la nomenclature des sites). Il est difficile de prédire l'impact d'un appariement au niveau du nucléotide 9. Brennecke et al. (2005) suggèrent qu'un appariement à cette position n'influence pas outre mesure le potentiel d'inhibition du miARN (Brennecke et al., 2005). En fait, le modèle de nucléation du Dr. Bartel, illustré à la Figure 4, montre que les nucléotides 9 à 11 ne sont pas dans une orientation favorable pour lier la cible due à la présence d'une structure en hélice de type A au niveau du noyau (Bartel, 2009). Ces éléments suggèrent donc qu'un appariement au neuvième nucléotide est neutre et sans conséquences. Ce n'est donc pas cette caractéristique qui peut expliquer la diminution d'inhibition dans le cas de E2F2. E2F3 semble posséder une interaction avec le noyau de miR-20 qui est optimale pour un type 8mer, caractérisée par un appariement au 8^e nucléotide et la présence d'un A à la position 1. La Figure 6A de l'introduction démontre bien l'inhibition très efficace induite par ce type de liaison, qui surpasse même la présence de deux 7mers. Cette observation pourrait expliquer l'inhibition satisfaisante de E2F3, comparable à E2F2, malgré la présence d'un seul site dans son 3'NTR. L'analyse des différents types d'interaction au niveau du noyau n'est toutefois pas concluante pour expliquer pourquoi miR-20 inhibe préférentiellement E2F1.

Tous les sites semblent aussi avoir des appariements complémentaires avec l'extrémité 3' du miARN. La Figure 6E montre bien que l'addition d'appariements efficaces dans la portion 3' du miARN augmente le potentiel d'inhibition. En fait, la présence d'appariements supplémentaires permettrait d'inhiber la traduction à une intensité similaire à la présence de deux sites ayant un appariement exclusif au niveau du noyau. Les travaux de Brennecke et al. suggèrent que l'appariement idéal impliquerait au moins 4 nucléotides consécutifs (Brennecke et al., 2005). De plus, les observations de Grimson et al. (2007). suggèrent que l'appariement optimal serait au niveau des nucléotides 12-18 afin de ne pas interférer au niveau de l'interaction du miARN avec RISC. En tenant compte de ces deux règles, les deux premiers sites dans le 3'UTR de E2F2 ainsi que le site dans E2F3 devraient, en théorie, avoir un bon potentiel d'inhibition. Ces observations expliquent l'efficacité du site unique dans le 3'NTR de E2F3 sans toutefois donner d'explications pour E2F2.

L'accessibilité du miARN à la cible a été estimée l'aide de l'outil de repliement de structures secondaires d'ARN MFOLD. Ce programme prédit les différentes structures d'ARN possible et retient celle avec la plus faible énergie libre d'où les unités exprimées en kcal/mol (Zuker, 2003). La présence de structure défavorable à la liaison du miARN a donc été estimée en prenant en considération deux facteurs. Premièrement, l'accessibilité locale a été estimée. Kertesz et al. ont déterminé que tenir compte des 17 nucléotides en amont du site et les 13 nucléotides en aval était optimal pour calculer l'accessibilité local (Kertesz et al., 2007). Cette fenêtre permet de vérifier que la séquence cible soit bien exposée et disposé à liaison par le miARN. L'accessibilité globale des séquences cibles a aussi été calculée afin de prendre en considération l'accessibilité du site au complexe RISC qui est de taille importante. Pour ce faire, une fenêtre plus large est prise en considération soit 70 nucléotides en aval et en amont du site de liaison. Il semble exister une certaine corrélation entre les valeurs de l'accessibilité locale et globale. Fait intéressant, basé sur cette estimation, tous les sites ont une accessibilité similaire, excepté le deuxième site de E2F1

qui serait extrêmement permissif à la liaison du miARN. Cette accessibilité accrue pourrait expliquer l'observation que miR-20 inhibe plus efficacement la traduction de E2F1 que de E2F2 ou E2F3.

La proportion de AU dans les 60 nucléotides entourant le site de liaison a aussi été calculée sur la base des observations de Grimson et al. (2007) Ce critère ne semble toutefois pas significatif, puisque tous les sites possèdent approximativement la même proportion. En fait, le calcul de la proportion de AU ne semble pas très informatif par rapport à l'accessibilité du site si on observe les résultats pour le deuxième site d'E2F1. Bien que la proportion de AU soit identique aux autres sites, le calcul de l'accessibilité par la structure secondaire démontre une accessibilité nettement plus accrue pour ce site. Prendre en considération la proportion de la nature des bases ne semble donc pas nécessairement significative. Finalement, la position des sites dans les 3'NTR ne semble pas donner d'informations additionnelles. Rien dans cette analyse ne permet d'expliquer pourquoi l'inhibition de E2F2 par miR-20 n'est pas efficace malgré la présence de trois sites. La présence de sites de d'autres miARN à proximité pourrait être une hypothèse puisqu'il y aurait interférence de liaison du complexe RISC. Toutefois, une analyse à l'aide du programme de prédiction de cibles TargetScanS ne permet pas de confirmer cette hypothèse. La liaison d'aucun autre miARN connu ne semble chevaucher les sites identifiés pour miR-20 dans le 3'UTR de E2F2.

3.1.2 Les E2F activent la transcription du polycistron miR-17-92

Comme plusieurs autres miARN, le polycistron miR-17-92 possède son propre promoteur lui permettant d'être régulé par différents facteurs de transcription. Les travaux de O'Donnell et al. ont permis d'identifier c-myc comme régulateur transcriptionnel du polycistron (O'Donnell et al., 2005a). Nous avons ensuite montré, simultanément avec le laboratoire du Dr. Hammond, que la famille des E2F pouvait aussi activer la transcription du polycistron (Sylvestre et al., 2007; Woods et al., 2007). Le modèle suggéré par Wood et

al., entre miR-20 et les E2F, est toutefois incomplet. Les auteurs suggèrent une boucle de régulation indirecte dans laquelle miR-20 inhibe la traduction de E2F1 exclusivement et E2F3 est le seul à pouvoir induire la transcription du polycistron. Ce modèle ne représente pas la réalité existant entre les deux familles de régulateur. Premièrement, comme mentionné précédemment, miR-20 a la capacité d'inhiber la traduction des ARNm codant pour les trois E2F *in vivo*. Deuxièmement, nous avons clairement montré que les trois E2F ont la capacité d'induire la transcription du polycistron. Une analyse des résultats de Woods et al. permet de comprendre leurs conclusions. Woods et al. ont identifié seulement deux sites de liaison pour les E2F dans le promoteur de miR-17-92 comparativement à quatre dans notre cas. Une analyse de la séquence de ces deux sites permet de voir qu'il s'agit de nos sites 1 et 2. Nos expériences d'immunoprécipitation démontrent aussi que les sites 1 et 2 sont préférentiellement liés par E2F3. Toutefois, les conclusions de Wood et al sont incomplètes, puisque l'étude des sites 3 et 4, qui sont en amont, montre clairement une liaison très efficace pour les trois E2F. Les auteurs auraient pu arriver à la même conclusion en utilisant leurs gènes rapporteurs luciférase comprenant le fragment pro1353, puisque les sites 3 et 4 y sont présents. Toutefois, ils ont étudié la sensibilité de ce fragment uniquement à E2F1 et non à E2F2 ou 3. Pour notre part, nous avons testé un fragment du promoteur possédant les quatre sites, ce qui nous a permis d'observer une activation transcriptionnelle par l'expression de E2F1, 2 et 3. La preuve que les trois E2F ont la capacité d'activer la transcription du polycistron a aussi été faite en détectant la quantité de miR-20 mature dans des cellules surexprimant E2F1, 2 ou 3. En tenant en considération l'activité transcriptionnelle de chaque construction des E2F, qui a été mesurée à la Figure supplémentaire 1 de l'article, E2F2 est le membre de la famille qui active le plus la transcription du polycistron. Ce résultat est basé sur des observations endogènes où le promoteur complet de miR-17-92 est étudié. Il est toutefois impossible de dissocier l'effet dû à la transactivation existant entre les E2F à l'activation directe du polycistron par chaque membre de la famille. Le phénomène de transactivation est toutefois une réalité du potentiel transcriptionnel de la famille E2F et devrait être tenu en compte dans l'évaluation du

potentiel d'activation de chaque E2F. De plus, bien que nous ayons mis l'emphase sur quatre sites de liaisons potentiels, l'analyse bioinformatique du promoteur suggérait l'existence de dix sites potentiels. Puisque les résultats observés par Northern blot représente la sensibilité du promoteur endogène du polycistron miR-17-92, il est possible de suggérer que le meilleur activateur soit E2F2. Ventura et al. ont démontré l'existence de la même boucle de régulation entre les E2F et le polycistron paralogue miR-106a-363 (Ventura et al., 2008). Puisque les séquences de miR-20 et miR-106a sont pratiquement identiques, les niveaux d'induction mesurés à l'aide d'immunobuvardage de type Northern peuvent être influencés par la détection de miARN paralogues. La mesure par PCR en temps réel du pri-miARN du polycistron miR-17-92 serait donc plus significative. Cette expérience a été faite pour E2F2, mais il manquait E2F1 et E2F3 pour faire des comparaisons. L'utilisation d'un gène rapporteur luciférase comprenant le promoteur complet du polycistron pourrait être une autre alternative. Toutefois, la présence d'une région riche en nucléotides G et C dans le promoteur rend son clonage entier très difficile et des essais pendant plusieurs mois sont demeurés sans résultats. Dans un autre ordre d'idées, nous avons aussi pu observer une augmentation des niveaux de miR-20 mature lorsque les cellules étaient transfectées avec un dominant négatif des E2F. Le dominant négatif est en fait une forme tronquée de E2F1 ne possédant pas de domaine de transactivation. Ce mutant permet donc l'occupation des sites de liaison des E2F ce qui antagonise leur activité. Il est évident, qu'en tenant compte du fait que nous avons montré que E2F1, 2 et 3 activent la transcription, l'utilisation du dominant négatif aurait dû diminuer les niveaux de miR-20 dans la cellule. Or, les E2F inhibiteurs, E2F4 et E2F5 partagent souvent les mêmes sites de liaisons que les E2F activateurs. Bien qu'hypothétique, l'augmentation des niveaux de miR-20 suggère une implication de E2F4 et E2F5 au niveau de la répression de la transcription du polycistron. Des expériences d'immunoprécipitation à la chromatine supplémentaires seraient toutefois nécessaires afin de confirmer le tout.

3.1.3 La fonction anti-apoptotique du polycistron miR-17-92

3.1.3.1 miR-20 et miR-17 inhibent la fonction apoptotique de E2F1

Notre groupe fut le premier à trouver une explication mécanistique à la fonction antiapoptotique du polycistron miR-17-92, qui avait été rapportée par He et al (He et al., 2005b). Notre modèle est illustré à la Figure 24. Afin d'induire l'apoptose, E2F1 doit dépasser un certain seuil d'activité transcriptionnelle (Lazzerini Denchi and Helin, 2005). Dans une cellule cancéreuse, plusieurs facteurs peuvent augmenter les niveaux des E2F. Par exemple, le suppresseur tumoral Rb est muté ou délété dans la majorité des cancers, ce qui augmente de façon drastique l'activité des E2F (Attwooll et al., 2004). Comme illustré à la Figure 24, dans un contexte tumoral, la co-expression de miR-20 permettrait de garder les niveaux d'E2F1 en-dessous du seuil d'induction de l'apoptose, tout en conférant un avantage prolifératif à ces cellules. Le fait d'inhiber aussi E2F2 et E2F3 plus faiblement permettrait à miR-20/miR-17 de neutraliser le phénomène de transactivation entre les E2F tout en permettant la fonction de prolifération. C'est ce que nous avons pu observer dans les cellules du cancer de la prostate. La surexpression de miR-20 nous a permis de mesurer une diminution de l'apoptose lorsque les cellules étaient traitées à la doxorubicine et une augmentation lorsque miR-20 était inhibé par des oligonucléotides antisens. La doxorubicine est une drogue qui induit des dommages à l'ADN et est utilisée dans le traitement de différents cancers (Mukhopadhyay et al., 2005a). Comme mentionné dans l'introduction, les mécanismes de points de restriction et de réparation de l'ADN sont inactifs ou affaiblis dans la majorité des cancers. Une cellule normale peut réparer les dommages induits par l'usage de cette drogue, puisque les mécanismes de réparation de l'ADN sont intacts. Dans une cellule cancéreuse, il y a accumulation des dommages sans qu'il y ait réparation, ce qui mène à l'induction de l'apoptose de façon dépendante à E2F1. La nécessité de traiter les cellules avec cette drogue pour observer l'effet antiapoptotique de miR-20 démontre bien l'influence du contexte cellulaire sur la fonction apoptotique de

E2F1, comme mentionné dans l'introduction (Polager and Ginsberg, 2008). En résumé, en inhibant principalement E2F1 et en neutralisant le potentiel de transactivation de E2F2 et E2F3, l'expression de miR-20 permet aux cellules cancéreuses de neutraliser l'induction de l'apoptose tout en conservant un avantage prolifératif.

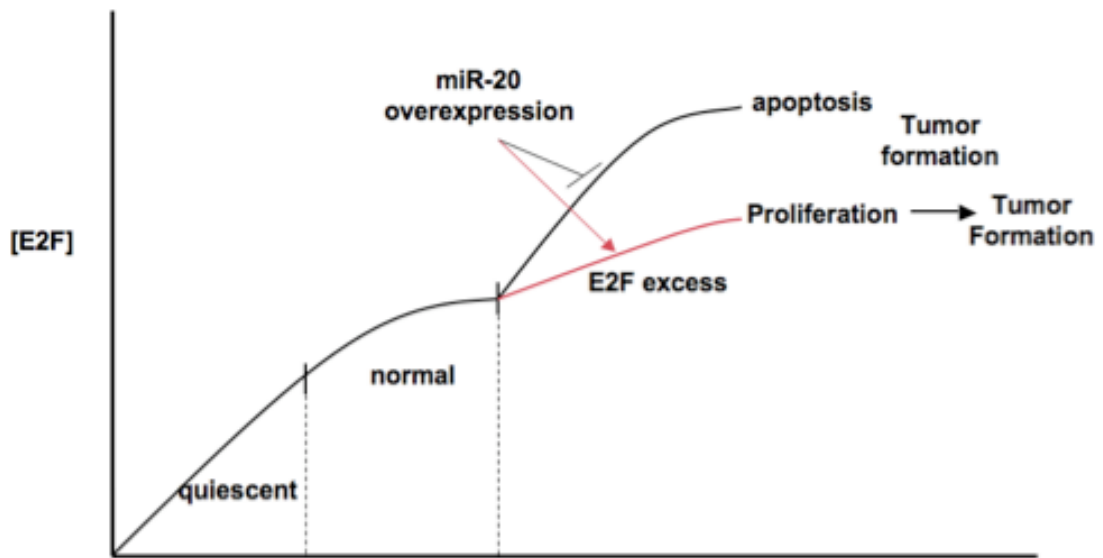


Figure 24. Modèle de la fonction anti-apoptotique de miR-20 par l'inhibition des E2F.

3.1.3.2 Contribution de l'inhibition des E2F par miR-20 dans la fonction anti-apoptotique du polycistron miR-17-92

Expliquer le potentiel oncogénique du polycistron miR-17-92 ou de miR-20 par l'unique inhibition des E2F serait avoir une vue trop réductionniste de la fonction des miARN. Comme mentionné à plusieurs reprises, le pouvoir de régulation des miARN réside dans leur capacité à inhiber plusieurs cibles. Il serait toutefois important d'analyser l'apport de l'inhibition des E2F par miR-20 au niveau de l'activité anti-apoptotique du

polycistron. Pour ce faire, une analyse des effets des autres cibles connues du polycistron miR-17-92 serait intéressante.

Le facteur apoptotique Bim a aussi été identifié par plusieurs groupes comme étant une cible du polycistron miR-17-92. (Bouillet et al., 2002; Ventura et al., 2008; Xiao et al., 2008). L'inhibition de Bim pourrait aussi expliquer la capacité du polycistron à inhiber l'apoptose. Ventura et al. (2008) ont identifié un site pour miR-19 ainsi qu'un site pour miR-92 dans son 3'UTR. En parallèle, Xiao et al. (2008) ont identifié uniquement le site de miR-19. Plusieurs observations semblent toutefois minimiser l'impact de l'inhibition de Bim dans la participation du potentiel oncogénique du polycistron miR-17-92. Premièrement, l'inhibition de l'apoptose par miR-17-92 rapportée par He et al., (2005a) a été observée en utilisant une forme tronquée du polycistron, soit miR-17-19b. Cette forme du polycistron n'exprime pas miR-92, puisque l'expression du transcrit complet ne permet pas une expression aussi efficace des miARN matures. L'inhibition de Bim par miR-92 doit donc être exclue de l'effet d'inhibition de l'apoptose observé par He et al. De plus, l'étude de Ventura et al. a été faite par la délétion du polycistron. Hors, cette délétion permet d'éliminer l'expression de tous les miARN du polycistron à l'exception de miR-92, qui bien qu'amoindri, est exprimé à un faible niveau. L'expression résiduelle de miR-92 limite donc son implication au niveau de l'induction de l'apoptose observée lors de la délétion du polycistron. L'effet de miR-19 pourrait toutefois être un facteur important. Cependant, bien que Ventura et al. aient identifié un site pour miR-19 dans le 3'NTR de Bim, Xiao et al. mentionnent que seule une inhibition efficace par miR-92 a pu être observée. Finalement, l'outil de prédiction de cibles de miARN TargetScan suggère l'existence d'un site potentiel pour miR-17-5p et miR-20 dans le 3'NTR de l'ARNm de Bim. Ventura et al. ne semblent toutefois pas tenir en considération ce site qui est moins conservé à travers les espèces que ceux ciblés par miR-19 ou miR-92. De plus, aucun effet n'a été observé lors de la co-expression d'ARN antisenses contre miR-17 et un gène rapporteur contenant un fragment de Bim possédant le site potentiel de miR-17-et miR-20.

La stratégie expérimentale que nous avons employée limite aussi les effets observés à miR-17-5p et miR-20. Puisque nous avons surexprimé miR-20 uniquement, l'effet des autres miARN du polycistron ne participe pas à l'inhibition de l'apoptose observée dans les cellules du cancer de la prostate. Cette stratégie nous permet donc d'affirmer que nos résultats dépendent uniquement de miR-20 et permet d'éliminer l'apport de Bim, qui serait inhibé uniquement par miR-19 et miR-92. L'inhibition de miR-20 par des antisens devrait aussi être spécifique à miR-20 et miR-17. Matsubara et al. ont étudié l'impact de l'inhibition individuelle des différents miARN sur l'expression des autres miARN du polycistron, en utilisant des oligonucléotides antisens (Matsubara et al., 2007). Il est bien évident qu'un oligonucléotide antisens contre miR-20 permet aussi une inhibition efficace de miR-17 puisque miR-20 et miR-17 sont presque identiques. Les auteurs ont pu observer que l'inhibition de miR-20 n'influence pas l'activité de miR-19 et miR-92. Cette observation nous permet de conclure que la diminution de l'induction de l'apoptose, lors de l'inhibition de miR-20 et miR-17, serait uniquement due à l'inhibition de ces miARN, ce qui écarte aussi l'implication de Bim dans la régulation de l'apoptose observée. De plus, Matsubara et al. n'ont pas pu observer d'induction de l'apoptose lors de l'inhibition de miR-18, miR-19 ou miR-92, mais uniquement lors de l'inhibition de miR-20 et miR-17. L'inhibition de Bim par le polycistron pourrait donc être un événement plus spécifique aux types cellulaires que l'inhibition de l'activité apoptotique de E2F1 par miR-20 qui a été observé dans le cancer de la prostate, le cancer du poumon, les lymphomes des cellules T, les lymphomes des cellules B, au niveau de la spermatogenèse ainsi que dans la maturation des cellules B.

La découverte de Xiao et al. comme quoi PTEN est une cible du polycistron doit aussi être mentionnée. PTEN est l'un des suppresseurs tumoraux le plus muté dans les différents types de cancers (Cantley and Neel, 1999). Le laboratoire du Dr. Pandolfi a démontré que l'impact de la perte de PTEN était dose-dépendante dans le cancer de la prostate (Trotman et al., 2003). Cette observation est extrêmement intéressante, puisqu'elle

fait place à un modèle similaire à celui de E2F1 dans lequel un changement subtil des niveaux de PTEN a une incidence majeure sur la progression du cancer. Il a été observé que la délétion complète de ce suppresseur tumoral survenait plutôt dans des stades avancés de la maladie ou encore lors de la formation de métastase (Cantley and Neel, 1999; Di Cristofano and Pandolfi, 2000). PTEN serait plutôt hétérozygote dans près de 80% des tumeurs primaires. Les auteurs ont donc voulu étudier le phénomène en produisant une souris dans laquelle les niveaux de PTEN seraient à mi-chemin entre ceux d'une souris hétérozygote et ceux d'une souris ayant une délétion totale du gène PTEN. Il ont pu observer la formation de tumeurs beaucoup plus agressives dans ces conditions, en partie à cause d'une résistance des cellules à l'apoptose. Ces résultats suggèrent fortement que l'inhibition potentielle de PTEN par miR-20/miR-17 ait pu participer au phénotype observé dans nos travaux. Toutefois, il est difficile d'estimer l'apport exact de cette inhibition dans les changements des niveaux d'apoptose. Xiao et al. ont montré que la délétion d'une allèle de PTEN permet d'avoir des niveaux d'expression similaires à la souris surexprimant le polycistron. Puisque tous les miARN du polycistron semblent pouvoir inhiber l'expression de PTEN, la contribution de miR-20 doit être relativement modérée. Cette observation suggère donc une faible variation des niveaux de PTEN par miR-20 dans nos expériences, comparativement à l'expression du polycistron complet. Un autre point important à mentionner par rapport aux études de Xiao et al est le phénotype observé chez la souris hétérozygote pour Bim et PTEN. Cette souris a des niveaux d'expression de ces deux protéines qui sont pratiquement identiques à la souris surexprimant le polycistron. Bien que les niveaux d'expression soient similaires, l'intensité de l'inhibition de l'apoptose n'est pas proportionnelle à la surexpression du polycistron. Les auteurs suggèrent donc eux-mêmes l'importance de l'inhibition de la fonction apoptotique de E2F1 par miR-20 dans ce processus. En résumé, il est évident que le caractère antiapoptotique du polycistron miR-17-92 peut-être expliqué par l'inhibition de différentes cibles. L'inhibition des E2F par miR-20/miR-17 semble toutefois avoir une implication majeure dans la régulation de l'apoptose par le polycistron.

3.1.4 Implication de la fonction antiapoptotique de miR-20/miR-17 dans des contextes normaux

Bien que cette caractéristique de miR-20 d'augmenter la résistance des cellules aux signaux de dommages à l'ADN semble être spécifique aux cellules cancéreuses, différentes études ont démontré son importance dans un contexte cellulaire normal. La protection de miR-20 de signaux de dommages à l'ADN trop importants prend aussi tout son sens dans un contexte normal et non tumoral. Il y a des situations où la cellule peut accumuler des dommages à l'ADN plus importants que la normale, ce qui nécessite une pause plus marquée qu'à l'habitude pour réparer les dégâts. Il semble que ce soit le cas pour la spermatogenèse et la différenciation des cellules pré-B en cellules pro-B. Novotny et al ont montré l'importance de l'inhibition de E2F1 par miR-20 dans le processus de maturation des spermatocytes (Novotny et al., 2007). La maturation des cellules germinales est marquée par un type de mitose basé sur un mécanisme de recombinaison. Ce processus provoque donc une accumulation importante de dommages à l'ADN. Il y a donc nécessité d'une désensibilisation à l'induction de l'apoptose afin de permettre à la cellule de réparer les dommages. Les auteurs ont observé une corrélation inverse entre les niveaux de E2F1 et du polycistron, ce qui suggère une implication directe de miR-20 dans ce processus. Ventura et al. (2008), de leur côté, ont aussi observé une diminution du nombre de cellules pré-B lors de la délétion du polycistron. Cette diminution était due à une augmentation de l'apoptose et non à une diminution du cycle cellulaire. Fait intéressant, ils ont pu observer dans les souris normales un haut niveau d'expression de miR-20 dans les cellules pré-B et non dans les cellules pro-B ou matures. Ces résultats suggèrent donc l'importance de l'inhibition de la fonction apoptotique de E2F1 par miR-20 à cette étape précise de la maturation des cellules B.

3.1.5 La fonction suppresseur tumorale de miR-20

Les miARN du polycistron miR-17-92 ont été les premiers à être identifiés comme étant des oncomirs. Bien que cela puisse paraître paradoxal, il semble aussi qu'ils puissent agir en tant que suppresseurs tumoraux. La délétion du polycistron a été observée dans 16,5% des cancers des ovaires, 21,9% du cancer du sein ainsi que 20% des mélanomes (Zhang et al., 2006a). Hossain et al. (2006) ont pu observer une diminution de la prolifération et du potentiel tumoral des cellules du cancer du sein lorsque miR-17 était surexprimé. Ces résultats sont contradictoires à l'activité antiapoptotique de miR-20 dans les cellules du cancer de la prostate et démontrent l'importance du contexte cellulaire dans la définition de la fonction des miARN. Dans le même ordre d'idées, lorsque nous avons validé MultiTar, nous avons pu observer une diminution de la prolifération et l'induction de la sénescence prématurée, lorsque nous avons surexprimé miR-20 dans des fibroblastes normaux. Qu'est-ce qui peut faire en sorte que la surexpression du même miARN induise des phénotypes si opposés? Une première hypothèse peut être faite en prenant en considération les travaux de Cloonan et al. (2008). Comme expliqué dans l'introduction, ils ont montré que l'effet phénotypique observé lors de l'expression d'un miARN dépend de l'addition des effets sur chaque ARN messager ciblé. Puisque chaque type cellulaire possède une signature spécifique d'expression génique, le ratio d'expression entre le miARN et la cible peut varier. Cette variation a un impact direct sur le potentiel d'inhibition du miARN. Dans le même ordre d'idées, la relation fonctionnelle existant entre les différentes cibles a aussi un impact sur le phénotype observé. Par exemple, Inomata et al. (2009) ont montré dans les lymphomes des cellules B que p21 était aussi une cible de miR-20 et miR-17. En tenant uniquement compte de cette cible, il serait possible d'affirmer que la surexpression de miR-20 dans les fibroblastes humains devrait induire une augmentation de la prolifération par la diminution de cet inhibiteur de la progression de la phase G1/S. Toutefois, ce n'est pas le cas puisqu'il faut aussi prendre en considération les autres cibles inhibées par miR-20. Par exemple, nous avons montré que miR-20 inhibait

E2F1-3 et Yu et al. (2008) ont démontré que miR-20 inhibait aussi la traduction de la cycline D1 (Sylvestre et al., 2007; Yu et al., 2008) La Figure 26 montre bien que les E2F et la cycline D1 agissent en aval de p21. En prenant en considération ces cibles, il est possible de prédire que la surexpression de miR-20 n'augmenterait pas la prolifération. Une diminution de p21 pourrait se traduire par une augmentation de la cycline D1 qui, à son tour, activerait les E2F ce qui pourrait augmenter la prolifération. Cependant, bien que p21 soit diminué, le fait que la cycline D1 et les E2F le soient aussi neutralise en quelque sorte l'effet de l'inhibition de p21. Ce n'est évidemment qu'un exemple permettant d'exposer l'importance de l'impact d'une cible sur une autre. L'analyse de toutes les cibles de miR-20/miR-17 dans les fibroblastes humains IMR90 serait nécessaire à l'explication de la diminution de la prolifération observée.

Une autre hypothèse, bien que centrée sur les E2F, tient compte de l'impact des niveaux d'expression de ces facteurs de transcription sur l'effet biologique de miR-20/miR-17. Comme illustré à la Figure 24, la fonction de E2F1 dépend directement de son niveau d'expression. L'impact de la régulation de miR-20 sur la fonction des E2F dépend donc directement du niveau d'activité de ces derniers dans la cellule. Dans la majorité des cellules cancéreuses, Rb est inactivé par différents processus. L'inaptitude de Rb d'agir en tant que suppresseur tumoral a un impact direct sur les E2F, puisque la perte de leur régulateur principal provoque une augmentation significative de leur activité (Tsantoulis and Gorgoulis, 2005). Myc est aussi souvent suractivé dans les différents cancers, ce qui augmente aussi les niveaux des E2F par une activation transcriptionnelle (Coller et al., 2007). Dans un contexte tumoral, la perte de Rb pourrait provoquer l'apoptose due à une activité trop intense des E2F. Par contre, la présence de miR-20 ramène les niveaux d'activité des E2F en dessous du seuil d'induction de l'apoptose tout en donnant un avantage prolifératif aux cellules. Dans ce contexte cellulaire, miR-20 influencerait donc l'activité apoptotique de E2F1. À l'opposé, dans les fibroblastes humains normaux, l'activité des E2F est régulée par Rb et se retrouve donc à un niveau normal permettant le bon fonctionnement du cycle cellulaire. Dans ce contexte, la surexpression de miR-20

diminuerait l'activité des E2F en dessous du seuil requis pour la progression du cycle cellulaire, ce qui provoquerait une diminution de la prolifération ainsi que l'induction de la sénescence prématurée comme nous avons pu l'observer. Fait intéressant, il est bien caractérisé que la surexpression du polycistron agit davantage comme un suppresseur tumoral dans les cellules du cancer du sein. Hors, Yu et al. (2008) ont pu observer une diminution de la prolifération dans des cellules MCF-7 (cellules du cancer du sein) lorsque le polycistron était surexprimé. Comme mentionné plus tôt, les auteurs ont identifié la cycline D1 comme nouvelle cible de miR-20 et explique la diminution de la prolifération par son inhibition. Russel et al. ont montré que la déplétion de p21 dans les MCF-7, à l'aide d'anticorps, induit une augmentation des niveaux de la cycline D1 qui résulte en une augmentation substantielle de la phosphorylation de Rb dans ces cellules (Russell et al., 1999). Cette augmentation de la phosphorylation de Rb suggère fortement que Rb possède toujours une activité considérable dans ces cellules, ce qui devrait contrôler les niveaux d'activité des E2F. Hors, dans cette optique, la diminution de prolifération des MCF-7, lorsque miR-17-92 est surexprimé, concorde bien avec le modèle suggéré. Puisque Rb semble encore actif, les niveaux d'activité des E2F doivent être relativement normaux. Donc l'inhibition des E2F par miR-20 ne produirait pas un avantage prolifératif par inhibition de l'apoptose, mais plutôt une diminution de la prolifération. Plusieurs expériences seraient évidemment nécessaires à la validation de cette hypothèse. Il est à noter que les travaux de Hossain et al. suggèrent une importance majeure de l'inhibition de AIB1 par miR-17 et miR-20 dans la diminution de la prolifération des MCF-7. Bien que l'inhibition des E2F puisse participer au phénotype observé, l'inhibition de AIB1 et de la cycline D1 doivent aussi être tenues en compte.

3.1.6 La boucle de rétroactivation négative entre miR-20/miR-17 et les E2F

Nos travaux ont permis de caractériser une boucle de rétroactivation négative entre les miARN miR-20, miR-17 et les facteurs de transcription E2F. Nous avons été les

premiers à caractériser une boucle de régulation aussi complexe impliquant deux miARN d'une même famille et trois facteurs de transcription d'une autre. Les motifs de régulation sont présents en grands nombres dans les cellules de mammifères et leur utilité dépend des joueurs impliqués et du type de boucle qui les relie. Il avait été rapporté que les boucles de rétroactivation positive étaient surreprésentées comparativement aux boucles de rétroactivation négative (Milo et al., 2002). Toutefois, la découverte que les miARN puissent faire partis de ces réseaux a ramené l'équilibre en augmentant de façon drastique le nombre de ce type de boucle négative. Il existe deux types de boucles de rétroactivations négatives entre un facteur de transcription et un miARN. Le type simple implique une activation de l'expression du miARN tandis que le type double implique une inhibition du miARN (Martinez et al., 2008). La dynamique de l'expression du miARN et du facteur de transcription varie en fonction de la nature de la boucle. Une boucle de rétroactivation négative double permet un système bistable dans lequel l'expression de la protéine et du petit ARN est souvent exclusif (Gardner et al., 2000). De plus, lorsque l'état est établi, le signal initiateur n'est plus requis outre mesure. Le signal initiateur est en fait ce qui active l'expression du facteur de transcription ou du miARN afin d'induire l'expression d'un des deux ou des deux (Figure 13). À l'opposé, une boucle de rétroactivation simple permet la co-expression du facteur de transcription et du miARN. Ce type de boucle permet donc l'oscillation de l'expression des deux composantes et permet une réduction de fluctuations trop marquées de l'expression du facteur de transcription (Tsang et al. 2007). L'activité du facteur de transcription impliqué est donc régulée de façon rigoureuse. Nous avons montré que les E2F avaient la capacité d'activer la transcription du polycistron miR-17-92, ce qui permet une boucle de rétroactivation négative simple. Cette boucle de régulation est illustrée en rouge dans la Figure 25A. La définition d'une boucle de régulation négative simple concorde bien avec notre modèle de la fonction antiapoptotique de miR-20. Dans ce modèle, les miARN et les facteurs de transcription sont co-exprimés et miR-20/miR-17 permettent de contrer une augmentation excessive des niveaux de E2F1. Les niveaux de E2F2 et E2F3 étant aussi contrôlés, miR-20 permet de neutraliser le phénomène de

transactivation existant entre les trois facteurs de transcription. L'existence de cette boucle semble essentielle pour la cellule puisqu'elle permet de contrôler la boucle de rétroactivation positive existant, non seulement entre les trois E2F, mais aussi entre les E2F et Myc (illustré en bleu dans la Figure 25A) (Coller et al., 2007) La présence de signaux de croissance permet à myc d'activer les E2F de façon efficace et d'amplifier ce signal par la transactivation transcriptionnelle. Cette augmentation drastique des niveaux des E2F permet donc une réponse rapide et efficace en présence de signaux pro-prolifératifs. De cette façon, il est possible pour le système de passer d'une absence à une activité significative des E2F en très peu de temps. La présence d'un frein est toutefois essentielle au contrôle de l'activité de cette amplification transcriptionnelle. Rb, le régulateur négatif des E2F est l'un de ces mécanismes, mais son efficacité à inhiber l'activité des E2F dépend intimement du niveau d'expression de ces derniers et son hypophosphorylation est nécessaire. L'activation en parallèle de miR-20/miR-17 à chaque ronde de transactivation permettrait de contenir les niveaux d'activité des E2F afin de ne pas dépasser un seuil critique. Ce mécanisme de protection peut s'appliquer à la fonction apoptotique de E2F1 ou encore à la régulation du cycle cellulaire et au point de restriction en G1/S.

3.1.7 Implication potentielle de la boucle de rétroactivation négative miR-20/E2F au niveau du point de restriction G1/S

La boucle de rétroactivation négative impliquant miR-20, miR-17 et les E2F n'est pas isolée dans la cellule et est sujette à l'influence d'autres facteurs. La boucle de rétroactivation positive entre les E2F et Myc en est un. La boucle de rétroactivation négative simple existant entre miR-20/17 et cycline D1 qui a été caractérisée par Yu et al. en est un autre. La Figure 25B illustre la connexion existant entre les trois différents motifs. Les travaux de Yao et al. (2008) sont extrêmement intéressants puisqu'ils ont étudié l'impact de la présence de la boucle de rétroactivation positive E2F/myc sur l'activité des

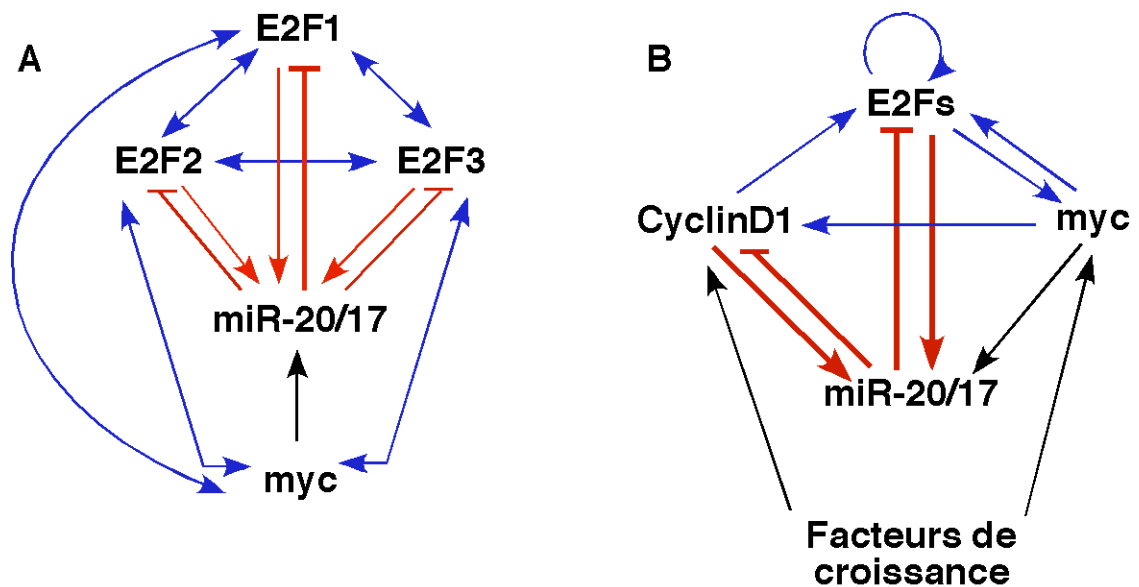


Figure 25. Mise en contexte de la boucle de rétroactivation négative miR-20/E2F avec A) Myc et B) Myc et Cycline D1

E2F. Dans ce contexte, la cycline D1 est considérée comme un contrôle négatif puisque, bien que c-myc puisse activer son expression, le phénomène de transactivation menant à une boucle positive est absent. Les auteurs ont incorporé dans le génome la fusion du promoteur de E2F1 ou de la cycline D1 à un gène fluorescent. Cette stratégie a permis de mesurer l'activation de ces promoteurs, dans une cellule unique, en réponse à la présence de facteurs de croissance. Ils ont pu montrer que la présence de la boucle de rétroactivation positive activant les E2F permet l'existence d'un système bi-stable. L'expression des E2F, en réponse à des facteurs de croissance, est donc de type interrupteur. Les niveaux des facteurs de croissance doivent atteindre un seuil minimal pour que les E2F soient activés transcriptionnellement. Lorsque ce seuil est dépassé, il y a une augmentation drastique des E2F et le niveau nécessaire d'activité des E2F pour la progression du cycle cellulaire est atteint. La présence de la boucle de rétroactivation positive entre les E2F et Myc (illustrée en bleu dans la Figure 25B) fait aussi en sorte que lorsque le seuil d'activation des E2F est

atteint, le signal initial n'est plus nécessaire à leur activité. Cette caractéristique fait aussi en sorte que le niveau atteint d'expression des E2F est indépendant de la concentration des facteurs de croissance. Seul le dépassement du seuil d'activation influence l'expression des E2F. À l'opposé, l'activation des niveaux de la cycline D1 est proportionnelle à l'intensité du signal induit par la présence des facteurs de croissance. Ce mode interrupteur de l'activation des E2F, qui dépend du phénomène de transactivation et de la régulation de Rb, forme en fait le point de restriction de la phase G1/S. La nécessité d'un seuil minimal de la quantité de signaux de prolifération nécessaire à l'activation des E2F est en soit un point de restriction. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que miR-20 et miR-17 puissent agir comme suppresseurs tumoraux en protégeant l'existence du point de restriction en G1/S. Yao et al. ont montré que le point de restriction en G1/S était très sensible au niveau d'activation de Myc et à l'intensité de la boucle de rétroactivation positive E2F/Myc. Une activité excessive de cette boucle positive aurait le potentiel d'éliminer le point de restriction G1/S en réduisant de façon drastique le seuil nécessaire à atteindre par les facteurs de croissance pour activer l'activité des E2F. Par conséquent, la durée du point de restriction est inversement proportionnelle au niveau d'activité de Myc. Ces observations mènent donc à l'hypothèse que miR-20 et miR-17 ont une fonction en tant que suppresseurs tumoraux, limitant l'activité de la boucle de rétroactivation positive E2F/myc. De plus, ce contrôle contribuerait à l'existence du point de restriction G1/S. Comme illustré à la Figure 25B, chaque ronde de transactivation E2F/Myc devrait donc induire l'expression de miR-20 et miR-17. L'expression de ces deux miARN permet de freiner l'augmentation des niveaux des E2F puisque l'activation de la boucle de rétroactivation positive provoque instantanément l'activation de la boucle de rétroactivation négative. Il en est de même pour la boucle de rétroactivation négative miR-20/Cycline D1. Dans ce contexte, ces miARN permettraient de protéger l'intégrité du point de restriction G1/S. Les travaux récents de Pickering et al. (2009) renforcent ce modèle puisqu'ils ont étudié l'effet de l'inhibition de miR-20 et miR-17 sur la progression de la phase G1/S. En synchronisant les cellules et en mesurant les niveaux de E2F1 à chaque quatre heures, ils ont observé

quelque chose de très intéressant. L'inhibition de miR-20/miR-17 n'augmente pas le niveau maximal atteint par E2F1, mais devance l'expression de E2F1 de 4 à 6 heures. Ces observations concordent avec l'hypothèse que la perte du contrôle exercé par ces miARN diminue le seuil minimal d'activation des E2F. Yao et al. ont montré qu'une concentration minimale de facteurs de croissance était requise, mais aussi qu'un temps minimal de traitement des cellules avec cette concentration minimale était aussi nécessaire. La perte du contrôle qu'exerce les deux miARN sur la boucle de rétroactivation positive provoque une accumulation précoce et non-appropriée de l'activité des E2F, ce qui concorde avec le modèle de protection du point de restriction G1/S.

3.1.8 Mise en contexte de la boucle de rétroactivation positive

En terminant, il serait essentiel de tenter de tracer le portrait global de l'implication de la boucle de rétroactivation négative entre miR-20/17 et les E2F, au niveau de la fonction du polycistron miR-17-92. Comme mentionné à maintes reprises, la puissance des miARN est basée sur leur capacité à réguler une multitude de cibles. Le but ici n'est pas d'expliquer tous les phénotypes du polycistron miR-17-92 par l'inhibition des E2F, mais d'essayer de cerner leur implication dans les différents processus régulés par le polycistron. Cette mise en contexte de la boucle de rétroactivation négative est illustrée à la Figure 26. Différents éléments sont pris en considération et le modèle a été élaboré à l'aide de nos observations et des différents travaux cités au cours de ce travail. Afin d'alléger la Figure, E2F1, 2 et 3 sont représentés par le niveau de l'activité globale des E2F. Il est bien évident que l'induction de l'apoptose est entièrement dépendante des niveaux de E2F1 comme discuté précédemment. De plus, les différents signaux influençant la fonction des E2F sont illustrés en vert, pour les signaux favorisant la prolifération et en rouge pour l'induction de l'apoptose. Le but est de montrer que la boucle de régulation impliquant miR-20/17 et les E2F est en fait un intégrateur de signaux cellulaires pouvant s'adapter à son environnement et participant à différents phénotypes.

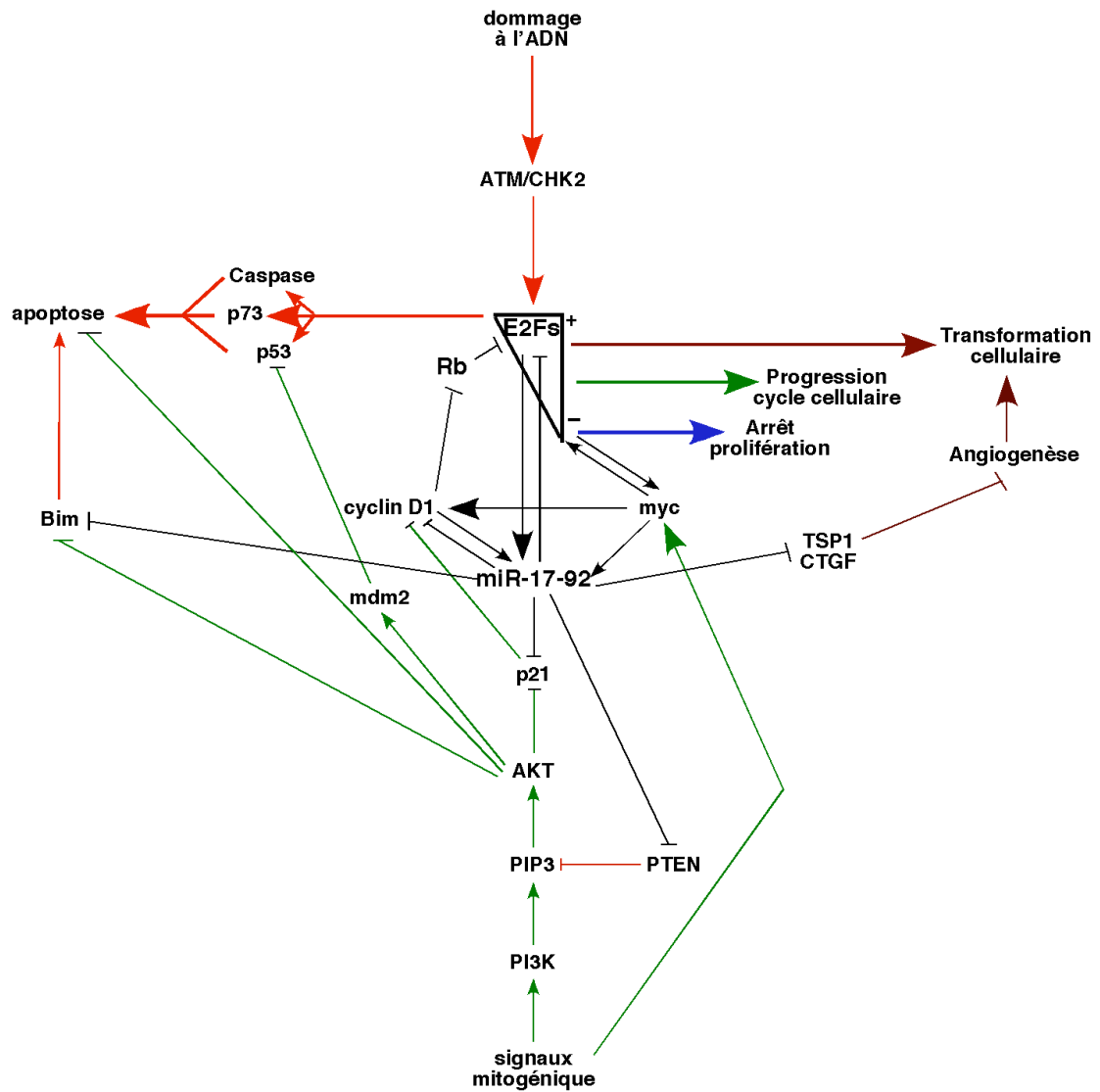


Figure 26. Modèle illustrant la place centrale de la boucle de rétroactivation négative miR-17-92/E2F dans l'intégration des signaux définissant la fonction des E2F.

Les lignes vertes représente les signaux favorisant un contexte prolifératif et les lignes rouges un contexte apoptotique. Les trois E2F sont illustrés de façons à montrer l'importance du niveau de leur activité sur leur impact fonctionnel dans la cellule.

Dans un contexte cellulaire normal, miR-20 et miR-17 joueraient le rôle de gardiens des niveaux des E2F dont le but est le maintien d'une bonne progression du cycle cellulaire et le respect du point de restriction G1/S. Ce point a été expliqué dans la section précédente et implique la régulation de la boucle de rétroactivation positive existant entre les E2F et myc. Ces deux miARN jouent le même rôle de surveillance des niveaux de cycline D1 par la boucle de rétroactivation négative caractérisée par Yu et al. (2008). Dans ce contexte normal, l'augmentation des niveaux du polycistron pourrait provoquer un arrêt de la prolifération cellulaire, si les niveaux de l'activité des E2F descendent en dessous du seuil d'activité requise pour l'induction de la phase G1/S. Cet effet expliquerait la diminution de prolifération observée, ainsi que l'induction d'un certain niveau de sénescence, lorsque nous avons surexprimé miR-20 dans des fibroblastes humain. Encore une fois l'inhibition de la cycline D1 doit participer à ce phénotype ainsi que l'inhibition de LRF, tel que suggéré par Poliseno et al. (2008). Toujours dans un contexte normal, la boucle de rétroactivation négative simple existant entre miR-17/20 et les E2F permettrait une oscillation de l'expression des E2F. Cette expression dynamique fait en sorte que E2F1 puisse agir rapidement lorsqu'un stress cellulaire requiert l'induction de l'apoptose. Comme démontré par Novothy et al. ainsi que Petrocca et al., la régulation de la fonction apoptotique de E2F1 a une implication importante dans un contexte de différenciation cellulaire. Certains processus cellulaires tels que la spermatogenèse ainsi que la maturation des cellules pré-B requièrent la prise en charge d'un niveau important de dommages à l'ADN, qui n'est pas normalement atteint dans la cellule. Dans ce cas, il y aurait induction de E2F1 par la voie de dommage à l'ADN, qui est un contexte cellulaire favorable à l'apoptose. Toutefois, dans ces contextes de différenciation, les niveaux du polycistron sont élevés. L'induction de miR-20/miR-17 permettrait de conserver les niveaux de E2F1 en dessous du seuil d'induction de l'apoptose, ce qui donnerait du temps à la cellule pour réparer les dommages. Puisque les niveaux des E2F ne sont pas excessifs, il n'y aurait pas d'avantage prolifératif. De plus, cette diminution des niveaux des E2F par miR-20/17 pourrait augmenter la durée du point de restriction G1/S permettant à la cellule de réparer

les dommages. L'inhibition de Bim et de PTEN doit aussi contribuer à cette fonction anti-apoptotique. En plus de l'inhibition directe de Bim par le polycistron, l'inhibition de PTEN permettrait d'augmenter les niveaux d'AKT. Cette augmentation permettrait l'établissement d'un contexte de prolifération puisque AKT peut lui aussi inhiber Bim et p53.

Comme expliqué précédemment, la boucle de rétroactivation négative pourrait aussi être tirée à profit par les cellules cancéreuses afin d'inhiber l'apoptose dépendante de E2F1 tout en donnant un avantage prolifératif à la cellule comme illustré en mauve à la Figure 26. Il serait légitime de se demander pourquoi dans un contexte normal, miR-20/17 agissent comme protecteurs cellulaires tandis que dans un contexte tumoral ces miARN jouent le rôle d'oncogènes. Il est tentant d'émettre l'hypothèse que miR-20/17 ne sont pas responsables de leur activité oncogénique. Le responsable serait plutôt la boucle de rétroactivation positive entre les E2F et myc qui influencerait l'effet final de miR-20/17. De plus, l'inactivation de Rb dans la plupart des cancers doit participer à ce phénomène en augmentant aussi le niveau d'activité des E2F. L'activité de la boucle de rétroactivation positive est augmentée par une suractivation de Myc dans les différents cancers. Cette augmentation de la transactivation E2F/Myc ferait en sorte que les niveaux des E2F soient supérieurs à la normale. Sans miR-20 et miR-17, il pourrait y avoir dépassement du seuil de l'induction de l'apoptose. L'inhibition de E2F1 par ces miARN permet de ramener leur activité en dessous de ce seuil. Toutefois, la suractivation de la boucle de rétroactivation positive augmente les niveaux des E2F malgré l'inhibition par les miARN, ce qui donnerait à la cellule un avantage prolifératif. Comme dans un contexte normal, l'activité antiapoptotique du polycistron peut aussi être expliquée par sa capacité à inhiber Bim et PTEN, ce qui favoriserait un environnement pro-survie par l'augmentation des niveaux de AKT. Le polycistron favoriserait aussi l'angiogenèse par l'inhibition de TSP1 et CTGF, comme montré par Dews et al. (2006). En étudiant le modèle présenté, il serait tentant d'affirmer que la boucle de rétroactivation négative entre miR-20/17 et les E2F est en fait un mécanisme de protection et est donc suppresseur tumoral. Ce modèle n'irait pas à

l'encontre de ce que nous avons suggéré dans notre article comme quoi l'activité oncogénique du polycistron miR-17-92 puisse être expliquée par la fonction antiapoptique de miR-20. Il serait toutefois possible de mettre comme nuance que de prime abord, l'inhibition des E2F par miR-20 et miR-17 a plutôt un but protecteur pour la cellule. Bien que ce rôle de maintien des niveaux des E2F favorise la transformation cellulaire, le facteur responsable serait davantage la suractivation de la boucle de rétroactivation positive E2F/Myc. Bien que l'augmentation de l'activité de cette boucle devrait entraîner une augmentation des niveaux de miR-20 et miR-17, l'intensité d'inhibition caractéristique des miARN fait en sorte qu'il soit impossible pour miR-20/17 de ramener les niveaux des E2F à un seuil normal dans n'importe quelle circonstance. Fait intéressant, cette augmentation de l'expression du polycistron qui serait due à une augmentation de l'activité de la boucle de rétroactivation positive E2F/Myc, montre bien qu'il faut se méfier des corrélations faites entre le niveau d'expression et le potentiel oncogénique. Une question s'impose donc, la surexpression du polycistron dans les différents types de cancer est-elle due à son potentiel oncogénique ou est-ce le fait que son expression soit à la merci de l'activité de myc? La relation entre le polycistron miR-17-92 et les E2F est fascinante autant par sa complexité que par sa flexibilité à jouer différentes fonctions dépendamment du contexte cellulaire. Par la mise en évidence de l'implication des miARN dans les réseaux de régulation cellulaires, nos travaux ont permis de mettre en lumière le raffinement existant au niveau de la régulation traductionnelle de ces petits ARN. Par contre, la situation dans laquelle nous nous trouvons maintenant par la découverte de ce nouvel aspect des miARN est bien résumée par un vieux dicton qui dit : « Plus on en apprend, moins on semble en connaître»!

3.2 MultiTar

3.2.1 MultiTar : une alternative au manque d'outils efficaces permettant d'inhiber simultanément l'expression de plusieurs gènes

Nos travaux portant sur miR-20/miR-17 montre clairement la puissance des miARN à réguler les processus cellulaires importants. Le principe de MultiTar repose sur la caractéristique des miARN à interagir et inhiber la traduction de plusieurs ARNm. Nous suggérons donc une alternative aux stratégies déjà existantes, qui sont limitées à l'inhibition de l'expression ou de l'activité d'un seul gène. La communauté scientifique a réalisé dans les dernières années que la stratégie de cibler un seul gène ne répond pas nécessairement à la complexité de la plupart des maladies. Ceci se traduit au niveau thérapeutique par une diminution majeure du nombre de composés pharmacologiques qui se rendent en phases cliniques avancées (Kola and Landis, 2004). La plupart des cancers connus sont causés par quatre à sept mutations indépendantes (Renan, 1993). Le caractère multigénique de ces maladies fait donc en sorte que l'inhibition de l'expression d'un de ces gènes ne permet pas nécessairement de contrôler la maladie de façon efficace. L'existence de voies biologiques compensatrices et le principe de redondance fonctionnelle peut aussi expliquer le manque d'efficacité d'un traitement. Différentes expériences de délétions géniques montrent l'importance de ce point. Par exemple, une étude de délétion chez la souris ayant comme but de trouver des gènes cibles potentiels pour le développement de composés pharmacologiques a permis d'observer un phénotype dans seulement 10% des cas (Zambrowicz et al., 2003). Hillenmeyer et al. (2008) ont pu observer chez la levure un phénotype clair dans seulement 34% des gènes délétés. Par contre, la combinaison d'une délétion à l'action de molécules chimiques a permis de voir un phénotype dans 97% des cas. Ces résultats montrent donc la nécessité de cibler simultanément plus d'un gène afin d'avoir un effet intéressant. La biologie des systèmes (system biology) nous permet de mieux saisir la complexité des maladies multigéniques permettant une vue globale du

problème. Ces nouvelles connaissances impliquant des réseaux de régulation doivent toutefois se traduire par une stratégie thérapeutique semblable. La polypharmacologie est présentement en plein essort afin de répondre à ce problème. Cette approche est toutefois très coûteuse et fastidieuse comparativement à ce que nous proposons. Des programmes bioinformatiques sont développés afin de prédire la structure de composés chimiques pouvant cibler plus d'une protéine. Il semble toutefois beaucoup plus complexe et difficile de prédire la structure tridimensionnelle d'un composé chimique qu'une courte séquence d'ARN. Le développement de la polypharmacologie est aussi basé sur des expériences à grande échelle afin de trouver des composés chimiques pouvant cibler plus d'une protéine. Le côté aléatoire de cette stratégie fait en sorte qu'une quantité astronomique de composés doit être testée et les composés retenus sont souvent les « moins pires » plutôt que les plus performants. L'utilisation de siRNAs est une autre stratégie qui est grandement exploitée en recherche et qui est très prometteuse au niveau thérapeutique. Toutefois un siRNA, bien qu'inhibant la traduction de façon très efficace, est dans la presque totalité des cas limité à inhiber la traduction d'un seul ARNm. Certains groupes ont adopté une stratégie brillante en adaptant certains polycistrons de miARN afin de pouvoir exprimer simultanément plusieurs siRNAs. Liu et al. (2008) ont utilisé le polycistron de miARN miR-17-92 en remplaçant la séquence des miARN endogènes par des siRNAs exogènes ciblant différents gènes du HIV. Leur stratégie a permis d'inhiber la réplication du virus. Toutefois, l'expression simultanée de plusieurs siRNAs peut causer un problème au niveau de la saturation de la voie des miARN endogènes et surtout au niveau de l'intensité des effets non spécifiques. MultiTar semble répondre à ces différentes problématiques en proposant une stratégie multigénique, peu coûteuse, rapide et extrêmement flexible en générant la séquence de miARN artificiels pouvant ciblés plusieurs gènes d'intérêts. Les caractéristiques de MultiTar seront donc traitées dans cette section.

3.2.2 MultiTar : une stratégie basée sur le noyau du miARN

Déterminer la séquence d'un siRNA pouvant inhiber l'expression d'un gène est simple. Puisque le petit ARN doit être parfaitement apparié à sa cible, il suffit de prendre dans la région codante de la cible une séquence de 22 nucléotides parfaitement complémentaires. Le mode de reconnaissance d'un ARNm par un miARN est beaucoup plus complexe et doit suivre plusieurs règles. MultiTar a donc été construit en fonction de ces règles afin de trouver la séquence de miARN artificiels. La séquence du noyau du miARN artificiel est le premier élément défini par le programme. MultiTar analyse donc les séquences des différents 3'UTR soumis par l'utilisateur afin de trouver des heptamères communs à toutes les cibles. Ces sept nucléotides forment la séquence reconnue par le noyau du miARN artificiel et définissent donc les nucléotides 2 à 8. Un A est choisi par défaut pour le premier nucléotide afin d'optimiser l'interaction du miARN avec le complexe RISC (Bartel, 2009). Ces caractéristiques font en sorte que la liaison entre le noyau du miARN et ses cibles sera de type 8mer. La Figure 6 de l'introduction montre bien qu'il s'agit du type de reconnaissance le plus efficace qui devrait permettre une inhibition significative de la traduction des cibles. Ceci suggère que malgré la présence d'un seul site dans chaque cible, le MultiTarget a le potentiel d'inhiber efficacement et simultanément la traduction de toutes ses cibles.

Les chances de trouver un heptamère commun à chaque cible dépend de la longueur des 3'UTRs analysés et du nombre de cibles. Permettre un ou deux mésappariements entre le noyau et la cible augmenterait considérablement le nombre de solutions. Si aucune interaction parfaite n'est trouvée, l'utilisateur a donc l'option de permettre la recherche de la séquence d'un noyau ayant un ou deux mésappariements avec ses cibles. Il est difficile de prédire l'impact d'une liaison imparfaite du noyau avec ses cibles. Toutefois, 20% des interactions validées des miARN endogènes comportent un mésappariement tandis que 5% en contiennent deux (Sethupathy et al., 2006a). Cette avenue semble donc tout à fait

possible. Il existe cependant une faiblesse au niveau du programme actuel lorsque des mésappariements sont permis. MultiTar ne prend pas en considération la position du mésappariement puisqu'il calcul le pointage uniquement en fonction de la nature des nucléotides appariés. Certains noyaux ayant plus de potentiel d'interaction pourraient donc être éliminés par le programme. Par exemple, un mésappariement au niveau du 8^e nucléotide du noyau serait probablement moins nuisible qu'au 5^e nucléotide. Dans le premier cas, il y aurait tout de même une complémentarité au niveau des nucléotides 2 à 7, ce qui produirait un site de type 7merA1. D'après la Figure 6 de l'introduction, ce type de site aurait une bonne efficacité d'inhibition. Toutefois un mésappariement à la position 5 pourrait créer une interférence au niveau de la structure en hélice de type A qui est requise entre le noyau du miARN et sa cible. Une telle interaction pourrait quand même être fonctionnelle, mais elle ne devrait pas être considérée comme meilleure qu'une interaction de type 7merA1. Ce problème influence uniquement la classification des noyaux potentiels et en aucun cas une séquence erronée ne serait suggérée. Ce détail pourra être corrigé dans la prochaine version du programme. Finalement, le fait d'utiliser cette option ne veut pas nécessairement dire qu'il y aura des mésappariements entre le miARN et chacune des cibles. Le but du programme est de trouver la séquence d'un miARN artificiel pouvant inhiber la traduction de toutes les cibles le plus efficacement possible. Par exemple, un MultiTarget pourrait avoir un noyau interagissant parfaitement avec sept des huit cibles, mais avoir un mésappariement pour la dernière. Une diminution de complémentarité avec la huitième cible ne devrait pas trop affecter l'efficacité globale du miARN artificiel.

3.2.3 La règle de sélection du bon brin : un avantage ou une contrainte?

Puisqu'un miARN mature est formé d'un duplex, le complexe RISC doit sélectionner le brin qui doit être incorporé. Le brin recruté est celui avec l'appariement le moins stable thermodynamiquement au niveau de son extrémité 5' (Schwarz et al., 2003). Nous avons mis comme règle qu'un noyau qui a plus de deux G ou C dans ses quatre premiers nucléotides doit être rejeté. Cette règle maximise les chances que la séquence du

MultiTarget et non la séquence complémentaire soit recrutée dans le complexe RISC. Les effets non spécifiques occasionnés par le recrutement du mauvais brin sont donc aussi diminués. Bien que cette règle soit nécessaire, elle élimine un certain nombre de noyaux potentiels. Nous avons réalisé cette contrainte lors de la validation *in silico* de MulTitar. Le but était de tester la capacité du programme à prédire la séquence du noyau d'un miARN endogène, lorsque la séquence de ses cibles validées étaient suggérées. La séquence du noyau de certains miARN endogènes était seulement suggérée lorsque la règle de thermodynamique était inactivée. Il est important de mentionner que dans certains cas, les deux brins du duplex sont recrutés et agissent en tant que miARN endogènes fonctionnels. Toutefois, cet événement est planifié par la cellule et l'action du brin antisens n'est pas un problème. Dans notre cas, le but est de maintenir la possibilité des effets non spécifiques à son minimum. En prenant en compte ces observations, nous avons décidé de rendre cette règle optionnelle. L'utilisateur pourra donc choisir d'activer ou non la règle de sélection des brins en fonction de ses besoins. Il existe deux stratégies afin d'exprimer un miARN artificiel ou un siRNA dans une cellule. La première, celle que nous avons choisie, utilise le contexte d'un miARN endogène afin d'exprimer la séquence d'intérêt. Le contexte que nous avons utilisé est celui du miARN miR-30 et cette stratégie a été élaborée par Paddison et al. (2004). La séquence de miR-30 est remplacée par le miARN ou siRNA d'intérêt ainsi que sa séquence complémentaire. La boucle de miR-30 est toutefois conservée ainsi que les séquences flaquantes de la tige. Le tout est dans un vecteur rétroviral, ce qui permet la transfection ou l'infection de la construction. Il y aura donc expression d'un pri-précurseur qui possède la séquence de choix, mais aussi les caractéristiques d'un miARN endogène. Ces caractéristiques permettront la maturation du miARN artificiel par la voie de procession des miARN endogènes. Dans ce cas, la règle de thermodynamique permettant la sélection du bon brin est importante puisque les deux brins ont le potentiel d'être actifs. La deuxième stratégie consiste en la synthèse chimique d'un double brin d'ARN qui a les caractéristiques d'un miARN mature. L'ajout de modifications sur le brin antisens peut toutefois empêcher son recrutement dans le complexe RISC. Ces modifications réduisent

les effets non spécifiques pouvant être provoqués par le brin complémentaire. Dans ce cas, la règle de thermodynamique n'est pas essentielle et le fait de ne pas l'utiliser devrait permettre à l'utilisateur d'avoir plus de solutions possibles. Chaque méthode a ses avantages et désavantages. C'est à l'utilisateur de choisir celle qui correspond le mieux à ses besoins. Le clonage dans un précurseur de miARN permet d'avoir tous les avantages d'un vecteur d'expression. Il est donc possible d'exprimer de façon stable le miARN, de sélectionner la population de cellules l'exprimant et d'amplifier le plasmide par maxipréparation. De plus, la maturation par la voie endogène augmenterait l'efficacité de recrutement au complexe RISC. De l'autre côté, la synthèse évite l'étape du clonage et des modifications permettent une plus grande spécificité de la sélection du bon brin. Cette stratégie est toutefois très dispendieuse et la transfection limite l'expression à une durée d'environ 3 jours.

3.2.4 L'option de multiplicité

Le principe de la multiplicité est de trouver une séquence consensus de sept nucléotides se répétant deux ou trois fois dans chaque 3'UTR. Cette option se fait aussi au niveau de la recherche de la séquence du noyau. Il est bien connu que la présence de plus d'un site dans un ARNm augmente de façon significative l'efficacité d'inhibition des miARN. Cependant, la Figure 6 de l'introduction suggère qu'en général la présence de deux sites de type 7mer n'est pas aussi efficace que la présence d'un site de type 8mer. Ce modèle suggère une grande importance à l'ajout d'un seul appariement au niveau de la stabilisation du duplexe formé entre le miARN et la cible. Nos résultats lors de la validation expérimentale de MultiTar semblent concorder avec ce modèle. Le MultiTarget le plus efficace est clairement MT-E2F(1) qui a un type d'interaction 8mer pour tous les E2F avec uniquement un site dans chaque cible, comme MT-E2F(2). De son côté MT-E2F(3) a 2 sites par cible et 1 mésappariement et il est aussi fonctionnels, mais moins efficaces. Il n'est toutefois pas possible de faire de conclusions générales puisque l'étude de plus de multitargets serait nécessaire. Cette option demeure tout de même intéressante,

spécialement s'il est possible de trouver un MultiTarget avec plusieurs sites par cible et des interactions de type 8mer. Bien que plus avantageux, le phénomène de coopération demeure difficile à appliquer. Les chances sont faibles de trouver des séquences consensus répétées plus d'une fois dans les différents 3'UTRs, tout en étant espacées de 20 à 40 nucléotides. Puisque le fait d'avoir deux sites à proximité augmente de beaucoup le niveau d'inhibition, cet aspect pourrait être exploité dans la prochaine version de MultiTar. L'utilisation de méthodes à grande échelle, comme les micropuces à ADN, a augmenté le rythme d'identification de sites de miARN endogènes. Il serait donc intéressant d'exploiter la présence de ces sites. Pour ce faire, il serait possible de favoriser les sites de miARN artificiels étant suffisamment à proximité de sites endogènes pour profiter du phénomène de coopération. Bien que ce ne soit pas deux miARN de même nature, c'est la proximité des complexes RISC qui provoque la synergie dans l'intensité d'inhibition de la traduction. La combinaison d'un site de miARN endogène à celui d'un multitarget pourrait donc induire une inhibition intéressante.

3.2.5 Importance de l'évaluation de l'accessibilité d'un miARN à sa cible

Notre programme tient aussi en considération l'accessibilité du MultiTarget aux sites de liaisons potentiels. Ce point est primordial puisque comme l'ADN, l'ARN peut-être structuré, ce qui affecte l'accessibilité du complexe RISC et du miARN à la cible. Notre méthode de calcul est complète puisqu'elle prend en considération 3 facteurs différents. Le calcul de l'accessibilité locale implique deux paramètres qui sont basés sur les travaux de Kertesz et al. (Kertesz et al., 2007). Le premier est le calcul de l'interaction du noyau du miARN à la séquence cible afin de calculer l'énergie d'interaction entre les deux ARN. Le deuxième critère prend en considération le contexte dans lequel le site de liaison se retrouve. L'énergie nécessaire afin de libérer le site potentiel des interactions possibles avec les nucléotides environnants est donc calculé. L'accessibilité locale du miARN à la cible est donc estimée en soustrayant l'énergie nécessaire pour rendre le site accessible au miARN à l'énergie d'interaction entre le miARN et site de liaison. Puisque ce critère permet de

classifier les différentes séquences pouvant être retenues comme noyau, la séquence de l'extrémité 3' du miARN n'est pas prise en considération. Un appariement efficace en 3' du miARN pourrait augmenter la force d'interaction et changer le pointage attribué à chaque site. Il serait toutefois trop lourd pour le programme d'attribuer une séquence pour chaque noyau candidat et cette étape est faite uniquement pour les dix meilleurs noyaux retenus. Finalement, nous prenons aussi en considération l'accessibilité globale. Ce paramètre estime la capacité du complexe RISC à avoir accès au site potentiel en prenant en considération la présence possible de structures environnantes. L'outil bioinformatique utilisé pour estimer ces paramètres d'accessibilité est MFOLD, qui est un outil de prédiction de structure secondaire de l'ARN (Zuker, 2003). MFOLD forme les différentes structures secondaires possibles et retient celle qui a l'énergie libre minimale. Bien que pratique, cet outil de prédictions a évidemment ses limites. Par exemple, il ne tient pas en considération la présence de pseudo-noeuds. Cette structure est formée lorsque la boucle d'une tige boucle s'apparie avec une séquence complémentaire qui se trouve à l'extérieur de la tige boucle. Certaines structures considérées comme étant permissives pourraient donc être structurées. Nous sommes toutefois limités à utiliser les outils disponibles. De plus, la majorité des outils de prédiction de sites de miARN endogènes utilisent ce genre de programmes afin d'estimer l'accessibilité. Bien que MFOLD ait ses limites, il demeure primordial de prendre en considération l'accessibilité des sites potentiels sélectionnés par le programme est bien accessible aux miARN. Différentes études démontrent l'importance de ce paramètre. Par exemple, comme mentionné dans l'introduction, le déplacement d'un site fonctionnel dans une région plus structurée provoque la perte du potentiel d'inhibition d'un miARN (Farh et al., 2005).

3.2.6 Localisation des sites des multitargets dans les ARNm ciblés

Jusqu'à maintenant, nous avons limité nos recherches de sites de MultiTargets aux 3'UTR des ARNm. Le but de notre article étant de valider notre programme, il était à notre avantage d'utiliser des paramètres qui sont bien caractérisés afin de maximiser nos chances

de réussite. La liaison des miARN dans le 3'UTR des ARNm est indéniable et des centaines d'exemples sont disponibles dans la littérature. Toutefois, comme mentionné dans l'introduction, différentes études suggèrent la possibilité qu'un miARN puisse inhiber l'expression de sa cible en se liant au niveau de la région codante ou encore du 5'UTR. Cette avenue serait extrêmement avantageuse puisque nous pourrions augmenter de façon considérable la longueur des séquences analysées par MultiTar. De plus, certains ARNm possèdent un 3'UTR très court qui diminue le nombre de solutions possibles. Satrk et al. (2005) ont montré que certains gènes, impliqués dans les processus cellulaires de base (house-keeping gene), ont généralement des 3'UTRs plus courts. Ce raccourcissement au cours de l'évolution permettrait à ces gènes d'éviter le contrôle traductionnel des miARN. Un autre bon exemple est le gène ATR qui est impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN. Le 3'UTR de ce gène contient seulement 201 nucléotides. Cette courte séquence limite de beaucoup le nombre de solutions potentielles. Nous avons essayé de trouver la séquence d'un MultiTarget pouvant cibler simultanément ATM et ATR. Malheureusement la longueur du 3'UTR de ce dernier est très contraignante et aucun noyau parfaitement complémentaire aux deux gènes n'a pu être trouvé malgré le fait qu'ATM ait un 3'UTR d'environ 3500 nucléotides. Dans le cas d'ATR, l'utilisation de la région codante serait extrêmement intéressante puisqu'elle est de 8057 nucléotides. Le nombre de solutions potentielles serait donc très élevé. Des études supplémentaires seraient toutefois nécessaires afin de s'assurer que cette région puisse être régulée efficacement par les miARN. Un des problèmes majeurs au niveau de la région codante est le passage de ribosomes qui pourrait déplacer les complexes RISC qui y sont liés. Fidèle à ses idées originales avec beaucoup de potentiel, le Dr. Ferbeyre a pensé à une stratégie qui vaut la peine d'être mentionnée. Afin d'augmenter l'intensité d'inhibition d'un multitarget, la combinaison d'un site au niveau du 3'UTR et d'un autre dans la région codante pourrait être efficace. En premier lieu, le site conventionnel dans le 3'UTR permettrait une diminution de la traduction. La traduction étant diminuée, le passage des ribosomes devrait être moins fréquent. Le site dans la région codante pourrait ensuite être lié, ce qui devrait augmenter l'intensité d'inhibition. Bien que

rien n'est certain présentement, l'utilisation des autres régions d'un ARNm pourrait augmenter de beaucoup la puissance de notre programme.

3.2.7 Validation in vivo et in silico de MultiTar

La meilleure façon de prouver que notre programme est fonctionnel était de le démontrer expérimentalement. Pour ce faire, nous avons généré des MultiTargets contre les trois E2F activateurs. Il s'agissait d'un modèle de choix pour nous. Premièrement, nous avons tous les outils nécessaires pour étudier l'effet de nos miARN artificiels. De plus, les E2F nous permettaient aussi d'étudier le potentiel de nos MultiTargets contre le phénomène de redondance fonctionnel. Comme mentionné à plusieurs reprises, E2F1, E2F2 et E2F3 ont une fonction redondante au niveau de la progression de la phase G1/S du cycle cellulaire. Par exemple, Molina Privado et al. (2009) ont montré que l'inhibition de E2F1 n'est pas suffisante pour diminuer la prolifération cellulaire puisque E2F2 et E2F3 sont toujours fonctionnels. À l'opposé, la délétion combinée des 3 E2F chez la souris ou encore la délétion de DP1, un cofacteur essentiel à E2F1-3 dans les fibroblastes humains, montre un arrêt de la prolifération (Maehara et al., 2005; Wu et al., 2001). Puisque nous voulions montrer que nos miARN artificiels pouvaient inhiber efficacement l'expression de plusieurs cibles, ce modèle était idéal. Il est toutefois important de mentionner que bien que les E2F aient de grandes similarités au niveau de leurs régions codantes, une analyse de la séquence de leur 3'UTR n'a pas montré de ressemblance. Ce point est important puisque MultiTar n'est pas limité aux membres d'une même famille. Notre programme est bien fonctionnel, puisque nos quatre MultiTargets ont tous diminué l'expression des trois E2F. Ce point est bien démontré par les expériences d'immunobuvardage et d'essais luciférase. Les expériences les plus significatives demeurent toutefois la courbe de croissance ainsi que la mesure de l'induction de la sénescence prématurée. Ces expériences nous démontrent clairement que l'inhibition des E2F par les différents multitargets est suffisamment efficace pour neutraliser leur fonction redondante. De plus, à ce niveau MT-E2F(1) est même plus efficace que miR-20 et ce avec uniquement un site par cible. Nous avons montré que miR-

20 inhibait préférentiellement E2F1 et plus faiblement E2F2 et E2F3. À l'opposé, MT-E2F(1) est conçu pour inhiber efficacement les trois E2F, ce qui explique une diminution plus marquée de la prolifération. Le fait que miR-20 ait la capacité d'inhiber d'autres gènes favorisant la progression du cycle cellulaire comme la cycline D1 démontre à quel point MT-E2F(1) est efficace. Puisqu'un lien clair existe entre miR-20 et le contrôle de la prolifération, d'autres cibles que les E2F doivent participer au phénotype observé.

Il est évident que l'idéal aurait été de valider MultiTAr avec au moins un autre contexte biologique que les E2F afin de démontrer son universalité. Il n'est toutefois pas évident au niveau expérimental de trouver des contextes biologiques permettant de voir l'effet escompté tout en ayant de bons contrôles positifs. Nous avons produit des multitargets ayant le potentiel d'inhiber l'expression de différents facteurs antiapoptotiques dans les cellules du cancer de la prostate. Nos tentatives n'ont malheureusement pas porté fruit, mais le contexte expérimental semble être en cause. Nous avons utilisé en parallèle le miARN miR-15 comme contrôle positif puisqu'il a été démontré qu'il inhibe l'expression de BCL2 et BCLxL ce qui induit de l'apoptose (Cimmino et al., 2005). Bien que nos multitargets n'aient montré aucun d'effet, aucune induction de l'apoptose n'a pu être détectée par l'expression de miR-15. Dans la recherche d'un phénotype clair, nous avons aussi généré des multitargets contre les 3 membres de la famille Rb, soit Rb, p107 et p130. Il a été montré dans les MEFs, que la triple délétion de ces gènes permet de contourner l'induction de la sénescence répllicative et que l'inactivation des trois gènes était nécessaire à ce phénotype (Sage et al., 2000). Il est important de mentionner que les multitargets ne sont pas conçus pour reproduire des délétions et malgré une inhibition efficace de l'expression d'une sélection de gènes, une expression résiduelle de ces protéines devrait être présente. Nous n'avons pas pu observer un contournement de la sénescence répllicative, mais rien ne laisse suggérer que les multitargets n'inhibent pas de façon efficace les 3 membres de la famille Rb. Des expériences d'immunobuvardage auraient été nécessaires pour vérifier l'existence d'une diminution de leur expression, mais les anticorps n'étaient pas disponibles.

La validation bioinformatique nous démontre toutefois que le programme peut-être fonctionnel avec d'autres gènes que les E2F et ce, avec plus de trois cibles. Le but de cette validation est de voir si le programme a la capacité de donner la séquence du noyau de miARN endogènes, lorsque la séquence du 3'UTR complet de leurs cibles validées expérimentalement est analysées. Nous avons pris dans la littérature des cibles validées de miR-20, miR-206 et miR-21. Comme le montre le tableau I de l'article, la séquence de leur noyau a été suggérée lorsque les séquences de leurs cibles ont été analysées. L'exercice a même été poussé à 10 cibles pour miR-20 et l'unique séquence suggérée par le programme était celle de ce miARN, ce qui montre la grande efficacité de MultiTar. Trouver la séquence de MultiTargets est l'inverse de la démarche des programmes de prédiction de cibles endogènes. Afin de comparer l'efficacité de MultiTar aux outils de prédiction utilisés par la communauté scientifique, nous avons utilisé les meilleures prédictions faites par TargetCombo. Ce programme permet d'obtenir les prédictions bioinformatiques communes à TargetScanS, miRanda et PicTar. De cette façon, la quantité de faux positifs diminue considérablement. Pour ce faire, nous avons choisi les cibles de miR-10a et miR-22. Il est intéressant d'observer que le fait d'augmenter le nombre de cibles de miR-22 analysées par le programme améliore le classement de ce miARN jusqu'à ce qu'il soit le seul suggéré. D'après cette analyse il est possible d'affirmer que MultiTar est équivalent ou meilleur que ces programmes de prédiction. Il est toutefois important de rappeler que bien que les règles utilisées soient similaires, la fonction de MultiTar n'est pas la même que les programmes déjà existant. Notre programme est le seul à pouvoir générer la séquence de miARN artificiels pouvant inhiber l'expression de gènes d'intérêts. La raison pour laquelle nous nous sommes limités à chercher le noyau de ces miARN et non la séquence complète est dû au fonctionnement du programme pour générer la séquence du 3' du miARN. Puisque le noyau forme les huit premiers nucléotides, le programme doit ensuite définir la nature des nucléotides 9 à 22 d'après la séquence environnante du site identifié dans chaque cible. Pour ce faire, nous avons opté pour une analyse de type Tabu Search. Afin de définir la nature des 14 nucléotides qui forment l'extrémité 3', le programme génère d'abord une

séquence consensus. Cette séquence est déterminée en retenant, pour chaque position, les nucléotides revenant le plus souvent dans les différentes cibles. Par la suite, chaque nucléotide est substitué par un autre nucléotide ce qui génère les autres solutions possibles. Un pointage est attribué pour chaque solution en prenant en considération la stabilité thermodynamique d'appariement et la présence de motifs structuraux d'ARN. La séquence formant le 3' du miARN artificiel est donc la solution qui a obtenu le meilleur pointage. Le nombre de possibilités de solutions est donc de 4 exposant 14. Il serait trop lourd pour le programme de calculer l'efficacité de liaison pour 268 millions de solutions. Par cette approche, il y a peu de chance de trouver la séquence exacte du 3' d'un miARN endogène. De plus, cette région des miARN endogènes est sujette à plus de mutations que le noyau lors de l'évolution comme montré par Chen et al (Chen et al., 2009). La séquence de cette région ne représente donc pas nécessairement la solution avec l'appariement le plus optimal, contrairement à ce que le programme recherche. Le fait que MultiTar nous suggère la séquence du noyau de miARN endogènes démontre toutefois de façon convaincante qu'il est fonctionnel et qu'il a la capacité d'analyser simultanément un grand nombre de séquences.

3.2.8 Les MultiTargets peuvent-ils causer des effets non-spécifiques?

Le principe des MultiTarget est basé sur la propriété des miARN de pouvoir inhiber simultanément un grand nombre de cibles. Dû au caractère multi-cible des miARN, certains ont une mauvaise perception du degré des effets non-spécifiques pouvant être induits par un MultiTarget. L'existence d'effets non-spécifiques est évidemment une réalité, mais elle est loin d'être problématique. Afin de faire la part des choses, je propose ici une comparaison aux siRNAs ainsi que quelques suggestions afin de contrôler l'éventualité d'effets non spécifiques. Bien que les compagnies travaillent fort pour limiter les effets non souhaités des siRNAs, personne ne peut mettre en doute leur efficacité et leur spécificité lorsque utilisés *in vitro* ou *in vivo*. Il est important de comparer l'action des siRNAs ou des MultiTargets à ce qui existe déjà au niveau thérapeutique. Nul ne peut affirmer que les

composés pharmacologiques utilisées présentement sur le marché sont très spécifiques et sans effets secondaires. Lire l'arrière d'une bouteille d'aspirine est suffisant pour s'en convaincre. En fait, la force des siRNAs semble reposer sur la facilité de construire un petit ARN pouvant inhiber efficacement l'expression d'un gène sans qu'il y est trop d'effets non voulus. Il est essentiel de comprendre qu'un MultiTarget et un siRNA ont exactement le même potentiel d'avoir des effets non spécifiques et penser le contraire serait avoir une mauvaise compréhension du mécanisme de l'ARN interférence. La nature d'un miARN et d'un siRNA est identique puisqu'il s'agit dans les deux cas d'un double brin d'ARN d'une vingtaine de nucléotides. Mis à part la voie de procession, ce n'est pas le petit ARN qui définit sa nature, mais plutôt la relation qu'il a avec ces cibles. C'est donc le degré de complémentarité avec un ARNm ciblé qui définira s'il y aura coupure ou inhibition de la traduction. La notion d'effet non spécifique a été caractérisée en 2003 par Jackson et al. (2003). Ils ont remarqué que lorsqu'un siRNA était introduit dans une cellule, l'expression de dizaines de cibles était diminuée de 1,5 à 3 fois. Par la suite, d'autres travaux ont découvert qu'il s'agissait en fait d'un effet miARN par le siRNA. Un siRNA a donc obligatoirement un effet miARN et l'inverse est aussi vrai si un miARN reconnaît un ARNm avec une complémentarité parfaite. Dans les deux cas c'est le degré de complémentarité qui dicte au complexe RISC l'action finale. Différentes stratégies pourraient toutefois être utilisées afin de limiter le phénomène d'inhibition non-souhaité par nos multitarget. Premièrement, comme expliqué précédemment la règle de sélection du bon brin par le programme diminue l'incorporation du brin guide ce qui élimine ou diminue ces effets possibles. Des modifications chimiques peuvent aussi limiter ce phénomène. Une recherche rapide à l'aide d'un programme bioinformatique serait aussi possible afin de vérifier si d'autres ARN messenger contiennent des séquences complémentaires au noyau du multitarget. Cette analyse permettrait en quelque sorte de prédire la nature des effets non-spécifiques s'il y a lieu. Deuxièmement, au moins deux séquences différentes ciblant les mêmes gènes devraient être utilisées afin de conclure à un effet spécifique. Puisque chaque séquence devrait avoir des effets non spécifiques différents, cette stratégie démontre que le

phénotype observé est dû à l'inhibition des cibles souhaitées. Par exemple, les quatre MultiTargets que nous avons testé contre les E2F ont tous eu un effet correspondant à l'inhibition des E2F. L'utilisation de deux solutions différentes serait toutefois suffisante. Finalement, comme illustré à la Figure 27 il a été démontré que les effets d'un siRNA, incluant les effets non spécifiques, sont dépendants de la quantité transfectée. Il est donc

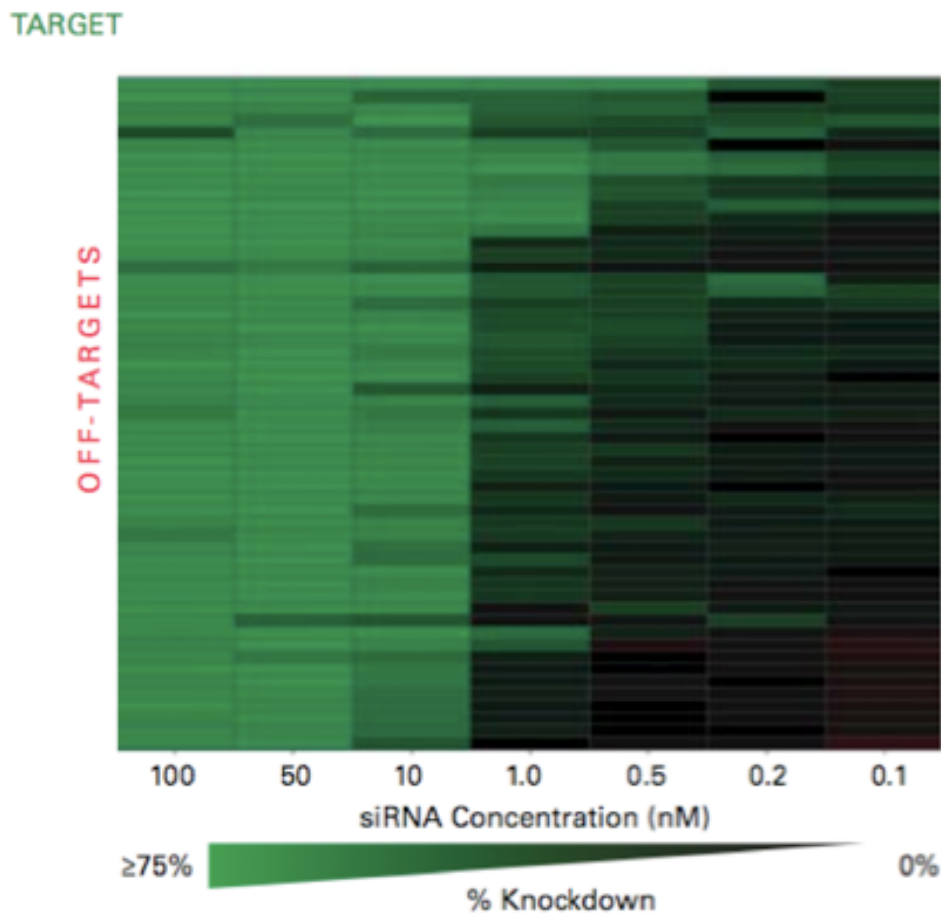


Figure 27. Impacte de la concentration d'un siRNA sur ses effets spécifiques et non-spécifiques (<http://www.Dharmacon.co>

possible de faire un mélange de quatre siRNA de séquences différentes ciblant le même gène. Au lieu de transfecter 100 nM d'un siRNA, il est possible de transfecter 25 nM de chaque pour obtenir le même effet. L'effet spécifique est donc efficace dû au phénomène

d'additivité, mais les effets non spécifiques sont dilués. Cette stratégie est extrêmement intéressante et serait facile à appliquer puisque le programme peut suggérer jusqu'à dix solutions différentes. En conclusion, il est évident que la possibilité d'effets non spécifiques est présente, mais il en est de même pour un siRNA ou une molécule chimique. L'important est que MultiTar suggère une stratégie unique par l'inhibition simultanée de plusieurs cibles. De plus, comparativement à la conception et à la synthèse de molécules chimiques, notre proposition est beaucoup plus simple et rapide. Il est évident que des expériences à grande échelle seraient nécessaires afin de mieux caractériser l'effet global de nos multitargets, mais pour l'instant l'avenir des MultiTarget semble être très prometteur.

3.2.9 MultiTar et le principe d'additivité

La force de MultiTar réside dans sa stratégie à inhiber simultanément la traduction de plusieurs ARNm. Son but n'est donc pas d'inhiber de façon efficace l'expression d'une cible comme peut le faire un siRNA. Il est évident que l'intensité d'inhibition d'un miARN sur des cibles individuelles est limitée comparativement à un siRNA. La force d'un MultiTarget repose plutôt sur le principe d'additivité. Le principe d'additivité fait en sorte que l'inhibition faible de plusieurs cibles impliquées dans le même processus cellulaire est plus efficace que l'inhibition complète d'une seule cible. Le potentiel de cette stratégie est reflété dans les efforts et l'argent investis dans le développement de la polypharmacologie. Les travaux de Kung et al. portant sur les inhibiteurs de kinase, est un bon exemple de la puissance de l'approche multicibles (Kung et al., 2005). Les auteurs montrent clairement que l'effet observé lorsqu'un composé cible simultanément plusieurs kinases est plus grand que l'addition des effets individuels sur chaque kinase. Le fait d'inhiber simultanément plusieurs cibles peut augmenter le potentiel de l'effet de façon synergique. Donc même si un miARN inhibe seulement 50% de la traduction de ces cibles, l'addition des effets pourrait permettre un phénotype drastique. Cette stratégie pourrait être très avantageuse au niveau thérapeutique. Prenons comme exemple le cancer. La plupart des gènes qui sont

dérégulés dans les différents cancers sont aussi exprimés et nécessaires à la survie des cellules normales de l'organisme. Inhiber de façon parfaite l'expression d'un gène afin d'influencer la prolifération des cellules cancéreuses risque aussi de causer un effet dramatique au niveau des cellules normales. Toutefois, sans tenir compte du principe de synergie, la diminution de l'expression de 25% de quatre gènes impliqués dans la prolifération pourrait avoir le même effet au niveau de la diminution de la croissance d'une tumeur. Le fait qu'il y ait une expression résiduelle des cibles devrait moins affecter les cellules normales qui auraient pu être ciblées. De plus, le caractère multi-génique du cancer nécessite la diminution de l'expression de plusieurs gènes, défi qui peut-être réalisé par les multitargets. Imaginez un multitarget ciblant simultanément des gènes antiapoptotiques, pro-prolifératifs, pro-angiogénèses, favorisant une croissance sans inhibition de contact etc. L'effet au niveau de la cellule cancéreuse pourrait être remarquable. De plus, la flexibilité de MultiTar permettant à l'utilisateur de choisir ses cibles pourrait adresser le caractère unique de chaque cancer. Puisqu'il est permis de rêver, imaginer un patient atteint d'un cancer allant voir son médecin dans 15 ans. Le médecin pourrait faire une analyse génétique afin de déterminer quels sont les gènes surexprimés qui participent au développement du cancer du patient. Ensuite, une analyse avec MultiTar de quelques heures permettrait de générer un MultiTarget pouvant cibler spécifiquement ces différents gènes, ce qui permettrait un traitement personnalisé. De la fiction, vous pensez? Comment auriez-vous réagi si le Dr. Mellow vous avait annoncé, il y a 10 ans, qu'il y aurait des dizaines d'études cliniques en cours dans le but d'utiliser les siRNAs comme thérapie potentiel et que les compagnies pharmaceutiques dépenseraient des millions de dollars sur leur développement? Faites une recherche sur Pubmed avec les mots clé clinical trial siRNA juste pour le plaisir.

3.2.10 La technologie au service des MultiTargets

Puisqu'il est permis de rêver et de voir à long terme, il serait intéressant de discuter d'avancements technologiques permettant une application in vivo aux MultiTargets. Bien

que l'administration et la livraison in vivo puissent être des défis de taille, nous n'avons pas besoin de nous soucier de cet aspect. Les miARN étant identiques aux siRNAs, nous pouvons utiliser les avancés dans ce domaine. Bien que l'utilisation des siRNAs soit relativement nouvelle, il y a eu dans les dernières années des avancements majeurs au niveau des techniques de livraison in vivo. Il est évident que l'administration de duplex d'ARN ne ferait pas long feu dans un organisme. Premièrement, le risque de dégradation est très élevé et l'élimination par le rein est rapide. Des modifications peuvent donc être ajoutées afin de palier à ces problèmes. Une administration intraveineuse implique que les petits ARN évitent l'élimination, traversent la barrière endothéliale et diffusent dans la matrice extracellulaire pour enfin être introduits dans la cellule et rencontrer leurs cibles. L'ajout de modifications 2'O-méthyl réduit significativement la dégradation par les endonucléases et des modifications sur l'extrémité 3' des ARN bloquent aussi les exonucléases. Un duplex d'ARN modifié est aussi plus gros, ce qui diminue la filtration glomérulaire et l'élimination. Ces modifications diminuent aussi les chances de réponse immunitaire qui pourrait être induite par la détection de double brin d'ARN (Judge et al., 2005). L'utilisation de liposomes est aussi très répandue et l'ajout de molécules à ces membranes englobant les petits ARN permet une livraison très spécifique par l'interaction des récepteurs cellulaires (Whitehead et al., 2009). Par exemple, l'ajout de groupements cholestérols a permis la livraison spécifique de siRNAs dans le foie et le jejunum de la souris. Les auteurs ont pu mesurer une diminution des niveaux de cholestérol par l'inhibition de l'apoprotéine A (Soutschek et al., 2004). L'administration de duplex d'ARN peut aussi se faire par inhalation. Une étude portant sur l'inhibition du virus RSV par l'inhalation de siRNAs est maintenant en phase II et semble prometteuse (DeVincenzo et al., 2008). Tous ces exemples démontrent bien la possibilité d'utiliser des MultiTargets en clinique. Ces études sont donc très stimulantes puisqu'elles suggèrent la possibilité d'utiliser MultiTar à son plein potentiel. Puisque les outils semblent exister afin d'utiliser des MultiTargets au niveau thérapeutique, la balle est dans notre camp pour prouver que ces petits ARN ont le potentiel d'être au service des patients.

4. Conclusion

Nos travaux ont permis de caractériser l'existence de motifs de régulation impliquant les miARN et les facteurs de transcription. Nous avons donc suggéré un modèle complet incluant l'identification de cibles de miARN, l'identification de facteurs régulant les miARN ainsi qu'une application biologique à la boucle de rétroactivation négative caractérisée. Il est intéressant et gratifiant de voir que plusieurs groupes se sont inspirés ou ont reproduit les différents éléments de la boucle de rétroactivation négative que nous avons caractérisée. Après la publication de l'article, la fonction antiapoptotique de miR-20 a été rapportée dans différents types cellulaires, ce qui a permis de valider nos observations. Moins de trois ans après l'identification de la boucle miR-20/E2F, des dizaines de groupes ont rapporté l'existence d'un tel mode de régulation chez différents organismes. Bien que nous ayons initialement suggéré que cette boucle de régulation soit impliquée au niveau de l'apoptose dépendante de E2F1, nous avons par la suite observé son utilité au niveau de la prolifération cellulaire. Ces différentes fonctions suggèrent donc un rôle d'intégration de signaux cellulaire par cette boucle permettant d'influencer la fonction des E2F. Nous avons aussi vu, dans les miARN, un outil idéal permettant d'inhiber la traduction de différents gènes d'intérêts. La complexité de la reconnaissance d'un miARN à sa cible nous a poussé à concevoir MultiTar. Notre programme bioinformatique a été validé *in vivo* et *in silico* avec succès à l'aide du contexte des E2F, ce qui était le modèle idéal pour nous dû à nos travaux précédents. L'avenir de MultiTar semble être prometteur, puisqu'il suggère une alternative permettant d'adresser le caractère multigénique de différents processus biologiques et pathologiques. Lorsque ce doctorat a débuté, les miARN commençaient à peine à être caractérisés et peu de cibles endogènes étaient validées expérimentalement. Il est incroyable de voir comment le domaine a évolué en six ans et nous avons la chance de pouvoir affirmer que nous y avons contribué. Travailler dans un domaine en pleine ébullition comme celui de ces petits ARN a été très motivant. Heureusement, cette passion que j'ai

développée pour les miARN aura une suite et leur utilité dans le diagnostique de différentes pathologies saura occuper mon temps dans les prochaines années.

5. Bibliographie

Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538.

Adams, M. R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G., and Nevins, J. R. (2000). Complex Transcriptional Regulatory Mechanisms Control Expression of the E2F3 Locus. *Mol Cell Biol* 20, 3633-3639.

Anderson, C., Catoe, H., and Werner, R. (2006). MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res* 34, 5863-5871.

Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 5, 337-350.

Asangani, I. A., Rasheed, S. A., Nikolova, D. A., Leupold, J. H., Colburn, N. H., Post, S., and Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128-2136.

Attwooll, C., Lazzarini Denchi, E., and Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J* 23, 4709-4716.

Attwooll, C., Lazzarini Denchi, E., Helin, K. (2004). The E2F family: specific functions and overlapping interests. *Embo J* 23, 4709-4716.

Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., and Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64-71.

Bandara, L. R., Buck, V. M., Zamanian, M., Johnston, L. H., and La Thangue, N. B. (1993). Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J* 12, 4317-4324.

- Bandyopadhyay, D., Gatza, C., Donehower, L. A., and Medrano, E. E. (2005). Analysis of cellular senescence in culture in vivo: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al Chapter 18, Unit 18 19.*
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell 116*, 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell 136*, 215-233.
- Bartel, D. P., and Chen, C. Z. (2004). Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet 5*, 396-400.
- Bartkova, J., Bakkenist, C. J., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N. E., Sehested, M., Lukas, J., Kastan, M. B., and Bartek, J. (2005). ATM activation in normal human tissues and testicular cancer. *Cell Cycle 4*, 838-845.
- Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L., and Vousden, K. H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature 395*, 124-125.
- Baudino, T. A., Maclean, K. H., Brennan, J., Parganas, E., Yang, C., Aslanian, A., Lees, J. A., Sherr, C. J., Roussel, M. F., and Cleveland, J. L. (2003). Myc-Mediated Proliferation and Lymphomagenesis, but Not Apoptosis, Are Compromised by E2f1 Loss. *Molecular Cell 11*, 905-914.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev 20*, 1885-1898.
- Ben-Ami, O., Pencovich, N., Lotem, J., Levanon, D., and Groner, Y. (2009). A regulatory interplay between miR-27a and Runx1 during megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A 106*, 238-243.
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., *et al.* (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet 37*, 766-770.

- Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E. C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28, 328-336.
- Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R. H., and Cuppen, E. (2005). Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell* 120, 21-24.
- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111-1124.
- Borchert, G. M., Lanier, W., and Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1097-1101.
- Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-926.
- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3, e85.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., and Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966.
- Campanero, M. R., and Flemington, E. K. (1997). Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: Stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *PNAS* 94, 2221-2226.
- Cantley, L. C., and Neel, B. G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240-4245.
- Chen, K., Maaskola, J., Siegal, M. L., and Rajewsky, N. (2009). Reexamining microRNA site accessibility in *Drosophila*: a population genomics study. *PLoS ONE* 4, e5681.

- Chen, Y., Liu, W., Chao, T., Zhang, Y., Yan, X., Gong, Y., Qiang, B., Yuan, J., Sun, M., and Peng, X. (2008). MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett* 272, 197-205.
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
- Cheng, T. L., Teng, C. F., Tsai, W. H., Yeh, C. W., Wu, M. P., Hsu, H. C., Hung, C. F., and Chang, W. T. (2009). Multitarget therapy of malignant cancers by the head-to-tail tandem array multiple shRNAs expression system. *Cancer Gene Ther.*
- Chi, S. W., Zang, J. B., Mele, A., and Darnell, R. B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 460, 479-486.
- Cimmino, A., Calin, G. A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Aqeilan, R. I., Zupo, S., Dono, M., *et al.* (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
- Classon, M., and Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 910-917.
- Cloonan, N., Brown, M. K., Steptoe, A. L., Wani, S., Chan, W. L., Forrest, A. R., Kolle, G., Gabrielli, B., and Grimmond, S. M. (2008). The miR-17-5p microRNA is a key regulator of the G1/S phase cell cycle transition. *Genome Biol* 9, R127.
- Cobrinik, D., Whyte, P., Peeper, D. S., Jacks, T., and Weinberg, R. A. (1993). Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev* 7, 2392-2404.
- Coller, H. A., Forman, J. J., and Legesse-Miller, A. (2007). "Myc'ed messages": myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron. *PLoS Genet* 3, e146.
- Cvijovicacute, D., and Klinowski, J. (1995). Taboo Search: An Approach to the Multiple Minima Problem. *Science* 267, 664-666.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R., and Leone, G. (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 278, 42041-42049.

DeGregori, J. (2002a). The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1602, 131-150.

DeGregori, J. (2002b). The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta* 1602, 131-150.

DeGregori, J., and Johnson, D. G. (2006). Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr Mol Med* 6, 739-748.

DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., and Nevins, J. R. (1997a). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7245-7250.

DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., and Nevins, J. R. (1997b). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *PNAS* 94, 7245-7250.

Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., and Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.

DeVincenzo, J., Cehelsky, J. E., Alvarez, R., Elbashir, S., Harborth, J., Toudjarska, I., Nechev, L., Murugaiah, V., Van Vliet, A., Vaishnav, A. K., and Meyers, R. (2008). Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res* 77, 225-231.

Di Cristofano, A., and Pandolfi, P. P. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100, 387-390.

Dirks, P. B., Rutka, J. T., Hubbard, S. L., Mondal, S., and Hamel, P. A. (1998). The E2F-family proteins induce distinct cell cycle regulatory factors in p16-arrested, U343 astrocytoma cells. *Oncogene* 17, 867-876.

Dyson, N. (1998a). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.

Dyson, N. (1998b). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.

- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494-498.
- Enright, A. J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D. S. (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* *5*, R1.
- Esquela-Kerscher, A., and Slack, F. J. (2006). Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* *6*, 259-269.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* *27*, 3970-3981.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* *132*, 9-14.
- Farh, K. K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* *310*, 1817-1821.
- Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* *17*, 1115-1129.
- Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A., and Trouche, D. (1998). The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 10493-10498.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* *9*, 102-114.
- Flynt, A. S., and Lai, E. C. (2008). Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nat Rev Genet* *9*, 831-842.
- Fontana, L., Fiori, M. E., Albini, S., Cifaldi, L., Giovinnazzi, S., Forloni, M., Boldrini, R., Donfrancesco, A., Federici, V., Giacomini, P., *et al.* (2008). Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PloS one* *3*, e2236.

Furukawa, Y., Nishimura, N., Furukawa, Y., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y., and Nakamura, M. (2002a). Apaf-1 Is a Mediator of E2F-1-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 277, 39760-39768.

Furukawa, Y., Nishimura, N., Satoh, M., Endo, H., Iwase, S., Yamada, H., Matsuda, M., Kano, Y., and Nakamura, M. (2002b). Apaf-1 is a mediator of E2F-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 39760-39768.

Gardner, T. S., Cantor, C. R., and Collins, J. J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 403, 339-342.

Gaubatz, S., Lindeman, G. J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J. R., Livingston, D. M., and Rempel, R. E. (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell* 6, 729-735.

Giraldez, A. J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R. J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A. J., and Schier, A. F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75-79.

Gorgoulis, V. G., Zacharatos, P., Mariatos, G., Kotsinas, A., Bouda, M., Kletsas, D., Asimacopoulos, P. J., Agnantis, N., Kittas, C., and Papavassiliou, A. G. (2002). Transcription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol* 198, 142-156.

Grad, Y., Aach, J., Hayes, G. D., Reinhart, B. J., Church, G. M., Ruvkun, G., and Kim, J. (2003). Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Mol Cell* 11, 1253-1263.

Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235-240.

Grimm, D., Streetz, K. L., Jopling, C. L., Storm, T. A., Pandey, K., Davis, C. R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M. A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537-541.

Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engle, P., Lim, L. P., and Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27, 91-105.

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neubock, R., and Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* *36*, W70-74.

Hallstrom, T. C., and Nevins, J. R. (2003). Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 10848-10853.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., and Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* *18*, 3016-3027.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B. T., and Kim, V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* *125*, 887-901.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. (2005). A Polycistronic MicroRNA Cluster, miR-17-92, Is Overexpressed in Human Lung Cancers and Enhances Cell Proliferation. *Cancer Res* *65*, 9628-9632.

He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2005a). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* *435*, 828-833.

He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2005b). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* *435*, 828-833.

Hershko, T., Chaussepied, M., Oren, M., and Ginsberg, D. (2005). Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F. *Cell Death Differ* *12*, 377-383.

Hershko, T., and Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* *279*, 8627-8634.

Hirose, S. (1998). Chromatin remodeling and transcription. *J Biochem* *124*, 1060-1064.

Hobert, O. (2004). Common logic of transcription factor and microRNA action. *Trends Biochem Sci* *29*, 462-468.

- Hobert, O. (2008). Gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Science* 319, 1785-1786.
- Hossain, A., Kuo, M. T., and Saunders, G. F. (2006). Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* 26, 8191-8201.
- Hsiao, K. M., McMahon, S. L., and Farnham, P. J. (1994). Multiple DNA elements are required for the growth regulation of the mouse E2F1 promoter. *Genes Dev* 8, 1526-1537.
- Hsiao, K. M., McMahon, S.L., Farnham, P.J. (1994). Multiple DNA elements are required for the growth regulation of the mouse E2F1 promoter. *Genes Dev* 8, 1526-1537.
- Hsieh, J. K., Yap, D., O'Connor, D. J., Fogal, V., Fallis, L., Chan, F., Zhong, S., and Lu, X. (2002). Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 22, 78-93.
- Hu, H. Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y. H., Chen, W., and Khaitovich, P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 10, 413.
- Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kato, T., and Yuan, Z. M. (1997). Role for E2F in DNA damage-induced entry of cells into S phase. *Cancer Res* 57, 3640-3643.
- Humbert, P. O., Verona, R., Trimarchi, J. M., Rogers, C., Dandapani, S., and Lees, J. A. (2000). E2f3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev* 14, 690-703.
- Iaquinta, P. J., and Lees, J. A. (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 19, 649-657.
- Inomata, M., Tagawa, H., Guo, Y. M., Kameoka, Y., Takahashi, N., and Sawada, K. (2009). MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 113, 396-402.
- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J. R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* 21, 4684-4699.

Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P. S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* *21*, 635-637.

John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D. S. (2004). Human MicroRNA Targets. *PLoS Biology* *2*, e363.

Johnson, D. G., Cress, W. D., Jakoi, L., and Nevins, J. R. (1994a). Oncogenic capacity of the E2F1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 12823-12827.

Johnson, D. G., Ohtani, K., and Nevins, J. R. (1994b). Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev* *8*, 1514-1525.

Johnson, D. G., Ohtani, K., Nevins, J.R. (1994). Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev* *8*, 1514-1525.

Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Cress, W. D., and Nevins, J. R. (1993a). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* *365*, 349-352.

Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Cress, W. D., and Nevins, J. R. (1993b). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* *365*, 349-352.

Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* *23*, 457-462.

Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316-323.

Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E., and Sherr, C. J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* *7*, 331-342.

Kedde, M., Strasser, M. J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J. A., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P. M., van Duijse, J., Orom, U. A., *et al.* (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* *131*, 1273-1286.

- Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., and Segal, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 39, 1278-1284.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.
- Kiriakidou, M., Nelson, P. T., Kouranov, A., Fitziev, P., Bouyioukos, C., Mourelatos, Z., and Hatzigeorgiou, A. (2004). A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev* 18, 1165-1178.
- Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141-1151.
- Kola, I., and Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 3, 711-715.
- Kovesdi, I., Reichel, R., and Nevins, J. R. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* 45, 219-228.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., and Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500.
- Krek, W., Ewen, M. E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, J. W. G., and Livingston, D. M. (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78, 161-172.
- Kung, C., Kenski, D. M., Dickerson, S. H., Howson, R. W., Kuyper, L. F., Madhani, H. D., and Shokat, K. M. (2005). Chemical genomic profiling to identify intracellular targets of a multiplex kinase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3587-3592.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
- Lai, E. C., Tomancak, P., Williams, R. W., and Rubin, G. M. (2003). Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol* 4, R42.

Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.

Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2005). E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. *EMBO Rep* 6, 661-668.

Lazzerini Denchi, E., Helin, K. (2005). E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. *Embo Reports* 6, 661-668.

Lee, R. C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060.

Lee, Y. S., and Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 21, 1025-1030.

Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L., and Nevins, J. R. (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387, 422-426.

Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L., Nevins, J.R. (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387, 422-426.

Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* 120, 15-20.

Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., and Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.

- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003a). Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., and Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Weinstein, E. G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M. W., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2003b). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17, 991-1008.
- Lin, W.-C., Lin, F.-T., and Nevins, J. R. (2001a). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 15, 1833-1844.
- Lin, W. C., Lin, F. T., and Nevins, J. R. (2001b). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 15, 1833-1844.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719-723.
- Liu, K., Paik, J. C., Wang, B., Lin, F. T., and Lin, W. C. (2006). Regulation of TopBP1 oligomerization by Akt/PKB for cell survival. *EMBO J* 25, 4795-4807.
- Liu, Y. P., Haasnoot, J., ter Brake, O., Berkhout, B., and Konstantinova, P. (2008). Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Res* 36, 2811-2824.
- Louie, M. C., Zou, J. X., Rabinovich, A., and Chen, H. W. (2004). ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* 24, 5157-5171.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 375, 503-506.

- Lukas, J., Petersen, B. O., Holm, K., Bartek, J., and Helin, K. (1996). Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* *16*, 1047-1057.
- Lund, E., and Dahlberg, J. E. (2006). Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *71*, 59-66.
- Lundberg, A. S., and Weinberg, R. A. (1998). Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* *18*, 753-761.
- Ma, J. B., Yuan, Y. R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* *434*, 666-670.
- Macrae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., and Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* *311*, 195-198.
- Maeda, T., Hobbs, R. M., and Pandolfi, P. P. (2005). The transcription factor Pokemon: a new key player in cancer pathogenesis. *Cancer Res* *65*, 8575-8578.
- Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N., and Hara, E. (2005). Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J Cell Biol* *168*, 553-560.
- Magae, J., Wu, C. L., Illenye, S., Harlow, E., and Heintz, N. H. (1996). Nuclear localization of DP and E2F transcription factors by heterodimeric partners and retinoblastoma protein family members. *J Cell Sci* *109 (Pt 7)*, 1717-1726.
- Maiti, B., Li, J., de Bruin, A., Gordon, F., Timmers, C., Opavsky, R., Patil, K., Tuttle, J., Cleghorn, W., and Leone, G. (2005). Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* *280*, 18211-18220.
- Mangan, S., and Alon, U. (2003). Structure and function of the feed-forward loop network motif. *PNAS* *100*, 11980-11985.

- Mann, D. J., and Jones, N. C. (1996). E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest. *Curr Biol* 6, 474-483.
- Maroney, P. A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T. W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1102-1107.
- Martinez, N. J., Ow, M. C., Barrasa, M. I., Hammell, M., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Roth, F. P., Ambros, V. R., and Walhout, A. J. (2008). A *C. elegans* genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes Dev* 22, 2535-2549.
- Martinez-Balbas, M. A., Bauer, U-M., Nielsen, S.J., Brehm, A., Kouzarides, T (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J* 19, 662-671.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M. I., Cartwright, P., Helin, K., and Giacca, M. (2000). E2F Family Members Are Differentially Regulated by Reversible Acetylation. *J Biol Chem* 275, 10887-10892.
- Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., *et al.* (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764-1767.
- Matsubara, H., Takeuchi, T., Nishikawa, E., Yanagisawa, K., Hayashita, Y., Ebi, H., Yamada, H., Suzuki, M., Nagino, M., Nimura, Y., *et al.* (2007). Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene* 26, 6099-6105.
- Mendell, J. T. (2008). miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 133, 217-222.
- Milo, R., Shen-Orr, S., Itzkovitz, S., Kashtan, N., Chklovskii, D., and Alon, U. (2002). Network motifs: simple building blocks of complex networks. *Science* 298, 824-827.
- Moon, N. S., Di Stefano, L., and Dyson, N. (2006). A gradient of epidermal growth factor receptor signaling determines the sensitivity of rbf1 mutant cells to E2F-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 26, 7601-7615.

Moroni, M. C., Hickman, E. S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H., and Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3, 552-558.

Mukhopadhyay, U. K., Senderowicz, A. M., and Ferbeyre, G. (2005a). RNA silencing of checkpoint regulators sensitizes p53-defective prostate cancer cells to chemotherapy while sparing normal cells. *Cancer Res* 65, 2872-2881.

Mukhopadhyay, U. K., Senderowicz, A. M., and Ferbeyre, G. (2005b). RNA Silencing of Checkpoint Regulators Sensitizes p53-Defective Prostate Cancer Cells to Chemotherapy while Sparing Normal Cells. *Cancer Res* 65, 2872-2881.

Muller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D., and Helin, K. (2001a). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285.

Muller, H., Bracken, A. P., Vernell, R., Moroni, M. C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J. D., and Helin, K. (2001b). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15, 267-285.

Murga, M., Fernandez-Capetillo, O., Field, S. J., Moreno, B., Borlado, L. R., Fujiwara, Y., Balomenos, D., Vicario, A., Carrera, A. C., Orkin, S. H., *et al.* (2001). Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* 15, 959-970.

Nagel, S., Venturini, L., Przybylski, G. K., Grabarczyk, P., Schmidt, C. A., Meyer, C., Drexler, H. G., Macleod, R. A., and Scherr, M. (2009). Activation of miR-17-92 by NK-like homeodomain proteins suppresses apoptosis via reduction of E2F1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 50, 101-108.

Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R. V., McCurrach, M. E., Jacobson, M. D., Narita, M., Zhang, M. Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., and Lowe, S. W. (2002a). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 4, 859-864.

Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R. V., McCurrach, M. E., Jacobson, M. D., Narita, M., Zhang, M. Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D., and Lowe, S. W. (2002b). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* 4, 859-864.

- Nip, J., Strom, D. K., Eischen, C. M., Cleveland, J. L., Zambetti, G. P., and Hiebert, S. W. (2001). E2F-1 induces the stabilization of p53 but blocks p53-mediated transactivation. *Oncogene* *20*, 910-920.
- Nolde, M. J., Saka, N., Reinert, K. L., and Slack, F. J. (2007). The *Caenorhabditis elegans* pumilio homolog, puf-9, is required for the 3'UTR-mediated repression of the let-7 microRNA target gene, hbl-1. *Dev Biol* *305*, 551-563.
- Nottrott, S., Simard, M. J., and Richter, J. D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 1108-1114.
- Novotny, G. W., Sonne, S. B., Nielsen, J. E., Jonstrup, S. P., Hansen, M. A., Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Kjems, J., and Leffers, H. (2007). Translational repression of E2F1 mRNA in carcinoma in situ and normal testis correlates with expression of the miR-17-92 cluster. *Cell Death Differ* *14*, 879-882.
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., and Mendell, J. T. (2005a). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* *435*, 839-843.
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., and Mendell, J. T. (2005b). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* *435*, 839-843.
- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., and Nevins, J. R. (1996a). Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol* *16*, 6977-6984.
- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., and Nevins, J. R. (1996b). Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol* *16*, 6977-6984.
- Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., and Seto, M. (2004a). Identification and Characterization of a Novel Gene, C13orf25, as a Target for 13q31-q32 Amplification in Malignant Lymphoma. *Cancer Res* *64*, 3087-3095.
- Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., and Seto, M. (2004b). Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* *64*, 3087-3095.

- Paddison, P. J., Cleary, M., Silva, J. M., Chang, K., Sheth, N., Sachidanandam, R., and Hannon, G. J. (2004). Cloning of short hairpin RNAs for gene knockdown in mammalian cells. *Nat Methods* *1*, 163-167.
- Parker, J. S., Roe, S. M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* *434*, 663-666.
- Parker, R., and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* *25*, 635-646.
- Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 121-127.
- Pasquinelli, A. E., McCoy, A., Jimenez, E., Salo, E., Ruvkun, G., Martindale, M. Q., and Baguna, J. (2003). Expression of the 22 nucleotide let-7 heterochronic RNA throughout the Metazoa: a role in life history evolution? *Evol Dev* *5*, 372-378.
- Paulovich, A. G., Toczyski, D. P., and Hartwell, L. H. (1997). When checkpoints fail. *Cell* *88*, 315-321.
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., and Sharp, P. A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* *21*, 533-542.
- Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M. R., Shah, M. H., Nicoloso, M. S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Piloizzi, E., Liu, C. G., Negrini, M., *et al.* (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* *13*, 272-286.
- Phillips, A. C., Ernst, M. K., Bates, S., Rice, N. R., and Vousden, K. H. (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. *Mol Cell* *4*, 771-781.
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* *309*, 1573-1576.
- Planas-Silva, M. D., Shang, Y., Donaher, J. L., Brown, M., and Weinberg, R. A. (2001). AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res* *61*, 3858-3862.

Plasterk, R. H. A. (2006). Micro RNAs in Animal Development. *Cell* 124, 877-881.

Polager, S., and Ginsberg, D. (2008). E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* 18, 528-535.

Powers, J. T., Hong, S., Mayhew, C. N., Rogers, P. M., Knudsen, E. S., and Johnson, D. G. (2004). E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. *Mol Cancer Res* 2, 203-214.

Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., and Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226-230.

Qin, X. Q., Chittenden, T., Livingston, D. M., and Kaelin, W. G., Jr. (1992). Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev* 6, 953-964.

Rao, P. K., Kumar, R. M., Farkhondeh, M., Baskerville, S., and Lodish, H. F. (2006). Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *PNAS* 103, 8721-8726.

Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M., and Giegerich, R. (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 10, 1507-1517.

Rehwinkel, J., Natalin, P., Stark, A., Brennecke, J., Cohen, S. M., and Izaurralde, E. (2006). Genome-wide analysis of mRNAs regulated by Drosha and Argonaute proteins in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 26, 2965-2975.

Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-906.

Renan, M. J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* 7, 139-146.

Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110, 513-520.

- Rhodes, D. R., Kalyana-Sundaram, S., Mahavisno, V., Varambally, R., Yu, J., Briggs, B. B., Barrette, T. R., Anstet, M. J., Kincaid-Beal, C., Kulkarni, P., *et al.* (2007). Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia* (New York, NY 9, 166-180.
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K. M., and Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 35, 5944-5953.
- Rogoff, H. A., Pickering, M. T., Frame, F. M., Debatis, M. E., Sanchez, Y., Jones, S., and Kowalik, T. F. (2004). Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2. *Mol Cell Biol* 24, 2968-2977.
- Rosenberg, M. I., Georges, S. A., Asawachaicharn, A., Analau, E., and Tapscott, S. J. (2006). MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol* 175, 77-85.
- Russell, A., Hendley, J., and Germain, D. (1999). Inhibitory effect of p21 in MCF-7 cells is overcome by its coordinated stabilization with D-type cyclins. *Oncogene* 18, 6454-6459.
- Saetrom, P., Heale, B. S., Snove, O., Jr., Aagaard, L., Alluin, J., and Rossi, J. J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res* 35, 2333-2342.
- Sage, J., Mulligan, G. J., Attardi, L. D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E., and Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev* 14, 3037-3050.
- Saini, H. K., Griffiths-Jones, S., and Enright, A. J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17719-17724.
- Sayed, D., Rane, S., Lypowy, J., He, M., Chen, I. Y., Vashistha, H., Yan, L., Malhotra, A., Vatner, D., and Abdellatif, M. (2008). MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths. *Mol Biol Cell* 19, 3272-3282.
- Schmidt, T., Mewes, H. W., and Stumpflen, V. (2009). A novel putative miRNA target enhancer signal. *PLoS One* 4, e6473.

- Schmitter, D., Filkowski, J., Sewer, A., Pillai, R. S., Oakeley, E. J., Zavolan, M., Svoboda, P., and Filipowicz, W. (2006). Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res* 34, 4801-4815.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58-63.
- Sethupathy, P., Corda, B., and Hatzigeorgiou, A. G. (2006a). TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA (New York, NY)* 12, 192-197.
- Sethupathy, P., Megraw, M., and Hatzigeorgiou, A. G. (2006b). A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat Methods* 3, 881-886.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Si, M. L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., and Mo, Y. Y. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 26, 2799-2803.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., *et al.* (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432, 173-178.
- Stanelle, J., and Putzer, B. M. (2006). E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol Med* 12, 177-185.
- Stevaux, O., and Dyson, N. J. (2002a). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* 14, 684-691.
- Stevaux, O., and Dyson, N. J. (2002b). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 684-691.

- Stevens, C., and La Thangue, N. B. (2003). A new role for E2F-1 in checkpoint control. *Cell Cycle* 2, 435-437.
- Stevens, C., and La Thangue, N. B. (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 3, 1071-1079.
- Stiewe, T., and Putzer, B. M. (2000a). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* 26, 464-469.
- Stiewe, T., and Putzer, B. M. (2000b). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* 26, 464-469.
- Sylvestre, Y., De Guire, V., Querido, E., Mukhopadhyay, U. K., Bourdeau, V., Major, F., Ferbeyre, G., and Chartrand, P. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem* 282, 2135-2143.
- Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., and Seto, M. (2005). Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 24, 1348-1358.
- Tagawa, H., and Seto, M. (2005). A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia* 19, 2013-2016.
- Taguchi, A., Yanagisawa, K., Tanaka, M., Cao, K., Matsuyama, Y., Goto, H., and Takahashi, T. (2008). Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res* 68, 5540-5545.
- Tao, Y., Kassatly, R. F., Cress, W. D., and Horowitz, J. M. (1997). Subunit composition determines E2F DNA-binding site specificity. *Mol Cell Biol* 17, 6994-7007.
- Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E.L., Lipp, M. (1989). Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev* 3, 527-536.
- Thayer, M. J., Tapscott, S. J., Davis, R. L., Wright, W. E., Lassar, A. B., and Weintraub, H. (1989). Positive autoregulation of the myogenic determination gene MyoD1. *Cell* 58, 241-248.

- Thomson, J. M., Parker, J., Perou, C. M., and Hammond, S. M. (2004). A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. *Nat Meth* *1*, 47-53.
- Trimarchi, J. M., and Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 11-20.
- Trotman, L. C., Niki, M., Dotan, Z. A., Koutcher, J. A., Di Cristofano, A., Xiao, A., Khoo, A. S., Roy-Burman, P., Greenberg, N. M., Van Dyke, T., *et al.* (2003). Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol* *1*, E59.
- Tsantoulis, P. K., and Gorgoulis, V. G. (2005). Involvement of E2F transcription factor family in cancer. *Eur J Cancer* *41*, 2403-2414.
- Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., and Prives, C. (2004). p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev* *18*, 3041-3054.
- Vasudevan, S., and Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* *128*, 1105-1118.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* *318*, 1931-1934.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J. A. (2008). Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* *7*, 1545-1549.
- Vella, M. C., Choi, E. Y., Lin, S. Y., Reinert, K., and Slack, F. J. (2004). The *C. elegans* microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev* *18*, 132-137.
- Ventura, A., Young, A. G., Winslow, M. M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S. J., Newman, J., Bronson, R. T., Crowley, D., Stone, J. R., *et al.* (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* *132*, 875-886.
- Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C., and Helin, K. (1999a). CDC25A Phosphatase Is a Target of E2F and Is Required for Efficient E2F-Induced S Phase. *Mol Cell Biol* *19*, 6379-6395.

Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M. C., and Helin, K. (1999b). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol* *19*, 6379-6395.

Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., *et al.* (2006a). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *PNAS* *103*, 2257-2261.

Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., *et al.* (2006b). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2257-2261.

Wang, Q., Li, Y. C., Wang, J., Kong, J., Qi, Y., Quigg, R. J., and Li, X. (2008a). miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 2889-2894.

Wang, X. J., Reyes, J. L., Chua, N. H., and Gaasterland, T. (2004). Prediction and identification of Arabidopsis thaliana microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol* *5*, R65.

Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2008b). Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* *456*, 921-926.

White, J., Stead, E., Faast, R., Conn, S., Cartwright, P., and Dalton, S. (2005). Developmental Activation of the Rb-E2F Pathway and Establishment of Cell Cycle-regulated Cyclin-dependent Kinase Activity during Embryonic Stem Cell Differentiation. *Mol Biol Cell* *16*, 2018-2027.

Whitehead, K. A., Langer, R., and Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* *8*, 129-138.

Wickramasinghe, N. S., Manavalan, T. T., Dougherty, S. M., Riggs, K. A., Li, Y., and Klinge, C. M. (2009). Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* *37*, 2584-2595.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* *11*, 228-234.

- Woods, K., Thomson, J. M., and Hammond, S. M. (2007). Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem* 282, 2130-2134.
- Wu, C. L., Zukerberg, L. R., Ngwu, C., Harlow, E., and Lees, J. A. (1995). In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* 15, 2536-2546.
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4034-4039.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H. I., Sang, L., Chong, G. T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F. A., Field, S. J., *et al.* (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 414, 457-462.
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D. P., Patterson, H. C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J. M., Kutok, J. L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9, 405-414.
- Xu, X., Hong, Y., Kong, C., Xu, L., Tan, J., Liang, Q., Huang, B., and Lu, J. (2008). Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) is co-regulated by E2F1 and miR-17-92. *FEBS Lett* 582, 2850-2856.
- Yamasaki, L., Bronson, R., Williams, B. O., Dyson, N. J., Harlow, E., and Jacks, T. (1998). Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1(+/-)mice. *Nat Genet* 18, 360-364.
- Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N. J. (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* 85, 537-548.
- Yekta, S., Shih, I. H., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594-596.
- Yu, Z., Wang, C., Wang, M., Li, Z., Casimiro, M. C., Liu, M., Wu, K., Whittle, J., Ju, X., Hyslop, T., *et al.* (2008). A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation. *J Cell Biol* 182, 509-517.
- Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* 106, 233-241.

- Zambrowicz, B. P., Turner, C. A., and Sands, A. T. (2003). Predicting drug efficacy: knockouts model pipeline drugs of the pharmaceutical industry. *Curr Opin Pharmacol* 3, 563-570.
- Zamore, P. D., and Haley, B. (2005). Ribo-gnome: The Big World of Small RNAs. *Science* 309, 1519-1524.
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M. S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T. L., Barchetti, A., Ward, M. R., *et al.* (2006a). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9136-9141.
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M. S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T. L., Barchetti, A., Ward, M. R., *et al.* (2006b). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *PNAS* 103, 9136-9141.
- Zhao, C., Sun, G., Li, S., and Shi, Y. (2009). A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat Struct Mol Biol* 16, 365-371.
- Zhu, J. W., Field, S. J., Gore, L., Thompson, M., Yang, H., Fujiwara, Y., Cardiff, R. D., Greenberg, M., Orkin, S. H., and DeGregori, J. (2001). E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 21, 8547-8564.
- Zhu, L., van den Heuvel, S., Helin, K., Fattaey, A., Ewen, M., Livingston, D., Dyson, N., and Harlow, E. (1993). Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev* 7, 1111-1125.
- Ziebold, U., Lee, E. Y., Bronson, R. T., and Lees, J. A. (2003). E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Biol* 23, 6542-6552.
- Ziebold, U., Reza, T., Caron, A., and Lees, J. A. (2001). E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev* 15, 386-391.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.

