

2m11-3537-9

Université de Montréal

**Étude du mécanisme d'autorégulation entre les facteurs de transcription
E2F et le microARN miR-20a.**

11807000

Par
Yannick Sylvestre

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Science en Biochimie

Avril 2007



W

4

US4

2007

v.123

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude du mécanisme d'autorégulation entre les facteurs de transcription
E2F et le microARN miR-20a.**

Présenté par :
Yannick Sylvestre

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Normand Brisson
Président-rapporteur

Dr. Pascal Chartrand
Directeur de recherche

Dr. Sylvie Mader
Membre du jury

Résumé

La famille de facteur de transcription E2F chez les mammifères est essentielle à la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. L'activité de E2F1, E2F2, et E2F3 est contrôlée par la protéine pRb et l'expression de ces facteurs est également régulée au niveau transcriptionnel. Récemment, un nouveau mode de régulation des E2Fs a été identifié, qui implique les miARNs du cluster *miR-17-92*, qui influence la traduction de l'ARNm de E2F1. Nous avons montré que miR-20a, un miARN du cluster *miR-17-92*, influence également la traduction des ARNm de E2F2 et E2F3 en se liant à leur 3'UTR. Nous avons également montré que E2F1, E2F2 et E2F3 peuvent se lier directement au promoteur du cluster *miR-17-92* et active sa transcription, ce qui suggère l'existence d'un mécanisme d'autorégulation entre les facteurs de transcription E2F et les miARNs du cluster *miR-17-92*. Le miARN miR-20a semble avoir également un rôle anti-apoptotique puisque la surexpression de ce miARN diminue l'apoptose chez des cellules cancéreuses de la prostate. De plus, une inhibition de l'activité de ce miARN par un oligonucléotide antisens contre miR-20a entraîne une augmentation de la mort cellulaire après un traitement à la doxorubicine. Le rôle anti-apoptotique de miR-20a peut expliquer le pouvoir oncogénique du cluster *miR-17-92*. Ces résultats montrent que le mécanisme d'autorégulation entre E2F1-3 et miR-20a est important pour maintenir un équilibre de l'activité des E2Fs entre la prolifération cellulaire et l'apoptose.

Mots clés : Facteurs de transcription E2F, autorégulation, miARN, cluster *miR-17-92*, prolifération cellulaire, apoptose.

Abstract

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 E2Fs 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 antiapoptotic 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 maintaining a balance between E2F activities in cellular proliferation and apoptosis.

Key words : E2F transcription factors, auto-regulatory feed-back loop, miRNA, cluster *miR-17-92*, cellular proliferation, apoptosis.

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Liste des figures.....	VIII
Liste des tableaux.....	X
Liste des abréviations.....	XI
Liste des symboles.....	XII
Remerciements.....	XIII
1. Introduction	
1.1 Cycle cellulaire.....	1
1.2 La famille des facteurs de transcription E2F.....	4
1.2.1 Les protéines associées aux E2F.....	6
1.2.2 Les E2F et la prolifération cellulaire.....	8
1.2.3 Les E2F et l'apoptose.....	9
1.2.3.1 L'induction de l'apoptose par la voie p53 dépendente.....	10
1.2.3.2 L'induction de l'apoptose par la voie p53 indépendante.....	10
1.2.4 Mode de régulation de l'activité des E2F.....	13
1.2.4.1 Phosphorylation.....	13
1.2.4.2 L'actylation.....	13
1.2.4.3 L'ubiquitination.....	13
1.3 Les miARNs.....	14
1.3.1 La biogénèse des miARNs.....	15
1.3.2 Transcription des gènes de miARN par l'ARN pol II.....	15
1.3.3 Maturation du pri-miARN par Drosha.....	16
1.3.4 Export du pre-miARN dans le cytoplasme par l'exportine-5.....	17

1.3.5	Maturation du pre-miARN par Dicer.....	18
1.3.6	Formation du complexe RISC.....	19
1.3.7	Modes de régulation de la traduction par les miARNs.....	21
1.3.7.1	Dégradation de l'ARNm via les miARNs.....	21
1.3.7.2	Inhibition de la traduction par les miARNs.....	21
1.4	Implication des miARNs dans le développement.....	23
1.4.1	miR10 et miR196 sont impliqués dans le développement embryonnaire....	24
1.4.2	miR-1 et miR-133 participe à la formation des tissus musculaires.....	24
1.4.3	miARNs impliqués dans le développement du cerveau.....	25
1.5	Implication des miARNs dans le cancer.....	26
1.5.1	Les miARNs anti-tumoraux.....	27
1.5.2	Les miARNs oncogéniques.....	28
1.5.2.1	Implication du cluster miR-17-92 dans le cancer.....	28
1.6	Régulation de l'expression de E2F1 par le miARNs miR-17-5p.....	30
1.7	Questions et hypothèses de travail.....	33
2.	Contributions	
2.1	Sylvestre et al.	36
3.	An E2F/miR-20a auto-regulatory feed-back loop.....	37
4.	Discussion	
4.1	Le miARN miR-20a régule l'expression de E2F1, E2F2 et E2F3.....	69
4.2	Régulation de l'expression du cluster miR-17-92 par les E2F1-3.....	70
4.3	L'inhibition de miR-20a peut induire l'apoptose dans les cellules PC3...	71

4.4 Modèle de l'autorégulation entre les facteurs de transcription E2F et miR20a.....	73
4.5 Implication du cluster miR-17-92 dans le cancer.....	76
4.6 Autres mécanismes de régulation entre facteurs de transcription et miARNs.....	77
4.7 Parallèle d'action entre les facteurs de transcription et les miARNs.....	81
5. Conclusion.....	84
6. Références.....	85

Listes des figures

Figures du mémoire

Figure 1 : Le cycle cellulaire et les complexes cyclin/CDKs spécifiques aux différentes phases du cycle.....	3
Figure 2 : Les membres de la famille des facteurs de transcription E2F.....	5
Figure 3 : Voie de signalisation ATM et ATR.....	12
Figure 4 : Étapes nécessaires lors de la biogénèse des miARNs.....	20
Figure 5 : Le cluster <i>miR-17-92</i>.....	29
Figure 6 : Modèle de la régulation de l'expression du facteur de transcription E2F1 par <i>miR-17-5p</i> et <i>miR20a</i>.....	32
Figure 7 : Mécanisme d'autorégulation entre les facteurs de transcription E2F et le miARN <i>miR-20a</i>.....	74
Figure 8 : Les fonctions des E2F dépendent de leur niveau d'expression.....	75
Figure 9 : Cascade de régulation établissant l'asymétrie du système gustatif chez <i>C. elegans</i>.....	79
Figure 10 : Les miARNs <i>lxy-6</i> et <i>miR-273</i> sont impliqués dans une double boucle d'autorégulation négative.....	80

Figures du Chapitre 3

Figure 1: miR-20a regulates E2Fs expression.....	56
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).....	57
Figure 3: Induction of miR-20a expression by the E2F1-3 transcription factors....	58
Figure 4: The E2F1-3 transcription factors activate the <i>miR-17-92</i> promoter.....	59
Figure 5: Effect of the inhibition of endogenous miR-20a by 2'-O-Me ASO on the activity of an E2F-regulated ORC-1 and p73 promoter upstream of the luciferase gene.....	60
Figure 6: Inhibition of miR-20a increased the susceptibility of PC3 cells to cell death after doxorubicin treatment.....	61
Figure 7: miR-20a protects PC3 cells from doxorubicin-induced E2F-mediated cell death/apoptosis.....	62
Figure 8: Model for an auto-regulatory feed back loop between E2Fs and the <i>mir-17-92</i> cluster.....	63

Figure supplémentaire

Figure 1: Luciferase activity from HeLa cells expressing a luciferase gene under the control of the ORC-1 promoter.....	67
--	-----------

Liste des tableaux

Tableaux du chapitre 3

Tableau 1 : Primers used for Chromatin immunoprecipitation analyses.....66

Tableau 2: Primers used for Real time PCR analyses.....66

Liste des abréviations

ADN	Acide déoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
Cdk	Cycline dependent kinase
HDAC	Histone déacétylase
kDa	kiloDalton
miARN	microARN
pre-miARN	microARN précurseur
pri-miARN	microARN primaire
NES	Signal d'export nucléaire
NLS	Signal de localisation nucléaire
3'UTR	Région 3' non-codante

Liste des symboles

α	Alpha
κ	Kappa
%	Pourcentage

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr. Pascal Chartrand pour m'avoir offert la possibilité d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire sur un sujet très intéressant.

Je tiens à remercier Vincent De Guire avec qui j'ai collaboré sur le projet miARN, dont le travail a contribué à la publication de l'article sur miR-20a.

Je tiens aussi remercier encore une fois Vincent De Guire mais aussi Franck Gallardo et Nicolas Paquin pour le support moral et les discussions en relation avec la science et autres.

Finalement, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire du Dr. Pascal Chartrand.

1. Introduction

1.1 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire pourrait se définir comme une suite de transformations que doit subir une cellule entre l'instant où elle est formée et le moment où elle se reproduit. Le cycle cellulaire comporte deux étapes principales, l'interphase, où la cellule croît et poursuit la majeure partie de ses activités et la phase mitotique, où la cellule se divise.

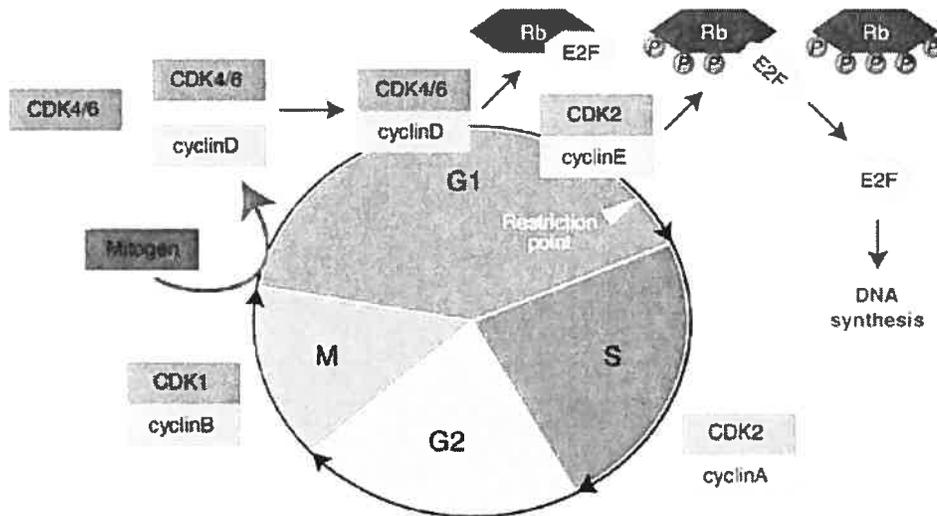
Durant l'interphase, qui comprend les phases G1, S et G2, la cellule réplique son ADN et double son nombre d'organelles et de protéines pour permettre la ségrégation chromosomique et la formation d'une cellule fille suite à la division cellulaire durant la phase mitotique. L'importance de ces processus durant le cycle cellulaire implique l'existence d'un système de contrôle permettant à la cellule de synchroniser les différentes phases, de s'assurer que les phases se produisent dans le bon ordre et une seule fois par cycle.

Le cycle cellulaire est contrôlé à différents niveaux par plusieurs mécanismes pour protéger la cellule contre une dérégulation du cycle. Chez la plupart des cellules, il existe plusieurs moments durant le cycle cellulaire, les points de contrôles ou «les checkpoints» où la cellule peut freiner la progression du cycle si des étapes n'ont pas été complétées de façon adéquate [1]. Notamment, l'entrée en mitose est retardée lorsque la réplication de l'ADN est incomplète. La progression des phases G1 et G2 est également ralentie si l'ADN des chromosomes a subi des dommages. Les délais durant ces deux phases sont nécessaires pour que l'ADN puisse être réparé et ainsi permettre au cycle de reprendre sa progression. Les points de contrôles permettent également au cycle d'être régulé par des signaux extracellulaires provenant d'autres cellules. Ces signaux peuvent soit favoriser ou inhiber la progression du cycle cellulaire en permettant à la cellule de reconnaître si elle est dans un contexte favorable ou peu favorable à la prolifération.

Le mécanisme au cœur de la régulation du cycle cellulaire demeure cependant l'action des Cdks (cyclin-dependent kinases). L'activité de ces kinases varie au fur et à mesure que la cellule progresse dans le cycle [1]. Cette variation de l'activité des Cdks amène des changements cycliques de la phosphorylation de facteurs qui sont responsables de l'induction ou de la régulation des événements majeurs du cycle comme la réplication de l'ADN ou la mitose. Par exemple, une augmentation de l'activité des Cdks au début de la mitose entraîne une phosphorylation de facteurs qui sont nécessaires pour la condensation chromosomique et la rupture de la membrane nucléaire [1]. L'activité cyclique des Cdks est régulée en grande partie

par les cyclines. Pour que les Cdks puissent être actives, elles doivent être associées aux cyclines. Le niveau des cyclines varie tout au long du cycle cellulaire, contrairement aux Cdks, qui sont pour la plupart exprimées de façon constante durant le cycle cellulaire, permettant une association et une activation cyclique des complexes cyclin/Cdk ce qui assure une progression normale du cycle cellulaire. Les différentes phases du cycle cellulaire ont des complexes cyclin/Cdk spécifiques. Durant la phase G1, le complexe cyclinD-Cdk4/6 est activé et prédominant. Durant la transition de la phase G1/S, c'est plutôt le complexe cyclinE-Cdk2 qui est impliqué dans la progression du cycle. Par la suite, le complexe cyclinA-Cdk2 se forme pendant la phase S et participe à l'initiation de la réplication de l'ADN et le complexe cyclinB-Cdk1 se forme pour promouvoir la mitose (Fig 1) [1].

Figure 1 : Le cycle cellulaire et les complexes cyclin/CDKs spécifiques aux différentes phases du cycle (Tiré de www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/fig003wkg.gif)



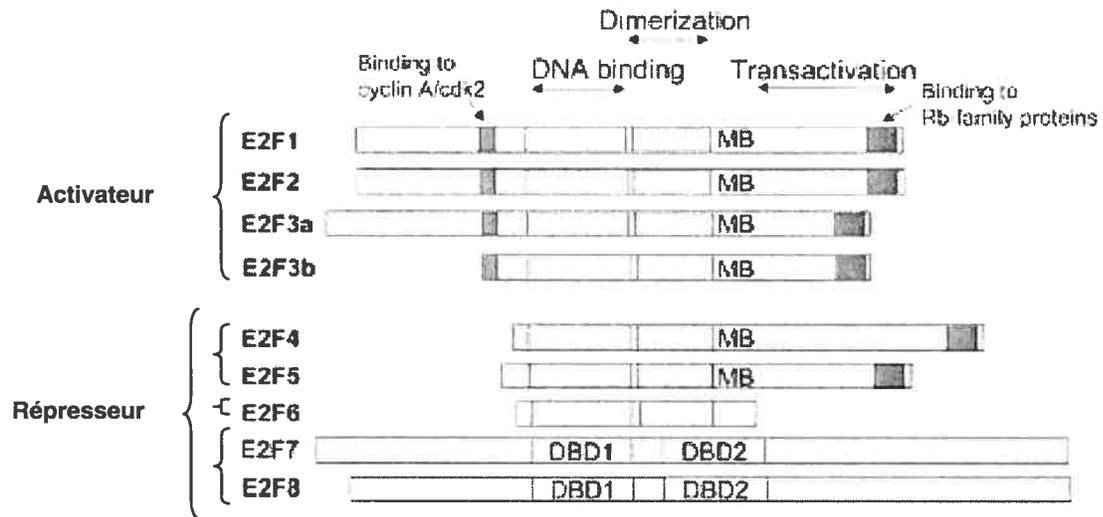
La régulation de l'expression des cyclines est particulièrement importante en phase G1 et en phase S, puisque ces cyclines sont responsables de promouvoir la réplication de l'ADN. De plus, c'est durant ces phases que la cellule reçoit des signaux qui vont influencer la division cellulaire et la mise en place d'un programme de différenciation. Une erreur dans l'interprétation de ces signaux peut donc mener au développement d'un cancer. La régulation de l'expression des cyclines durant ces phases est donc importante. La variation du niveau des différentes cyclines au cours du cycle cellulaire, dépend entre autre du niveau d'expression de leur ARNm. Certains facteurs de transcription sont exprimés à des moments précis du cycle cellulaire et sont responsables de l'expression de certaines cyclines. Les facteurs de transcription de la famille E2F jouent un rôle important dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, puisqu'ils induisent l'expression des cyclines nécessaires durant la transition de phase G1/S et durant la phase S [2].

1.2 La famille des facteurs de transcription E2F

Les facteurs de transcription E2F constituent une famille de protéine comprenant neuf membres. La famille des E2Fs peut être divisée en quatre sous-groupes d'après leurs fonctions et le mode d'activation utilisé (Fig. 2). Les E2F1-3 sont considérés comme des activateurs car ils sont responsables de l'induction de gènes impliqués dans la transition de la phase G1 à la phase S [3]. Lorsque l'expression de ces trois E2Fs activateurs est inhibée, le cycle cellulaire s'arrête et les cellules entrent en quiescence [3]. De plus, une surexpression de E2F1-3 dans des fibroblastes maintenus en quiescence est suffisante pour faire entrer les cellules en phase S [4]. Pour ce qui est des facteurs E2F4 et E2F5, ils sont plutôt considérés comme des répresseurs puisqu'ils sont nucléaires chez des cellules en phase G0 et qu'ils sont associés à des membres de la famille des protéines Rb inhibant l'expression de gènes et maintenant ainsi les cellules en quiescence [5]. Le rôle majeur de E2F4 et E2F5 semble être la promotion de l'arrêt du cycle cellulaire et de la différenciation [6].

Figure 2 : Les membres de la famille des facteurs de transcription E2F.

(Modifié de Current Molecular Medicine, Volume 6, Number 7, November 2006, pp. 739-748(10).)



Les trois autres membres E2F6-8 ont des rôles moins bien connus, bien qu'ils soient considérés comme des répresseurs de la transcription. E2F6 serait impliqué dans la quiescence, tandis que E2F7 pourrait réguler un groupe de gènes ciblés par les E2Fs durant le cycle cellulaire [7]. Le rôle de E2F8 demeure nébuleux puisqu'il a été tout récemment identifié comme membre de la famille des E2Fs [8]. On peut regrouper ensemble les différents membres des E2Fs pour en faire une famille de protéines, malgré la différence de leurs fonctions, en se base sur l'homologie des différents domaines qui composent ces protéines. La diversité de fonction qu'on retrouve parmi la famille des E2Fs s'explique par l'absence ou la présence de domaines particuliers conférant une particularité à chaque E2F [4]. Les E2F1-6 possèdent en N-terminal un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine de dimérisation. À l'exception d'E2F6-8, les E2Fs possèdent en C-terminal un domaine de transactivation qui contient une région de liaison à la famille des protéines Rb. D'autres membres (E2F1-3) possèdent une séquence de localisation nucléaire (NLS) et un domaine de liaison à la cyclin A dans la région N-terminal [4]. E2F4 et E2F5 possèdent un signal d'export nucléaire (NES) et dépendent d'une hétérodimérisation avec les polypeptides DP-1/2 pour leur import au noyau [9]. La présence de signal de localisation chez les E2Fs permet un mouvement entre le noyau et le cytoplasme qui est important pour moduler leur activité durant le cycle cellulaire [9].

1.2.1 Les protéines associées aux E2Fs

Les membres de la famille des E2Fs sont généralement associés de façon constante à d'autres protéines qui permettent de moduler leur activité, leur donnant ainsi une plus grande variété de fonction et établissant un contrôle très précis de leur action.

Les protéines E2Fs forment un hétérodimère, lorsqu'elles sont fonctionnelles, avec les protéines DP-1/2. Chaque membre des E2Fs est capable de s'associer à l'une ou l'autre des protéines DP [10]. La coopération entre les E2Fs et DP-1/2 optimiserait leur liaison à l'ADN [11, 12]. De plus, la présence d'un signal de localisation nucléaire chez DP-2 et son absence chez DP-1 pourrait influencer l'accumulation des E2Fs au noyau et ainsi contribuer à la régulation des E2Fs [13].

Le complexe E2F-DP peut également s'associer avec les protéines de la famille RB c'est-à-dire pRB, p107 et p130. Lorsqu'elles sont liées au complexe E2F-DP, les protéines RB inhibent l'activation de la transcription par les E2Fs [14]. Contrairement aux protéines DP qui ne

montrent pas de spécificité dans leur association avec les membres des E2Fs, les protéines RB sont beaucoup plus spécifiques. La protéine pRB se lie presque exclusivement avec E2F1-3 et E2F4 dans certains types cellulaires, p107 se lie avec E2F4, et p130 se lie avec E2F4 et E2F5 [15]. La liaison des protéines RB aux E2Fs s'effectue grâce à une région située à l'extrémité C-terminale des E2Fs [14]. Ce domaine de liaison aux protéines RB se trouve à l'intérieur du domaine de transactivation des E2Fs, qui est responsable de l'activation de la transcription, expliquant en partie le rôle de répresseur des protéines RB [16].

Les protéines RB peuvent réguler la transcription par les E2Fs de deux façons. Un premier mode de régulation s'effectue par une interaction physique entre les protéines RB et les E2Fs. Le domaine de liaison des protéines RB étant situé dans le domaine de transactivation des E2Fs, la formation d'un complexe pRB-E2F bloquerait l'activation de la transcription. L'existence de ce mode de régulation est supportée par des essais *in vitro*, où l'inhibition de la transcription par E2F1 est assurée par pRB, en l'absence d'autres co-répresseurs [17]. Les protéines RB peuvent également réguler la transcription par les E2Fs en recrutant des enzymes pouvant modifier la structure de la chromatine comme les histones déacétylases (HDAC). Les histones déacétylases sont des enzymes qui déplacent les groupes acétyl des histones et ainsi permettent la condensation de la chromatine [18]. Cette modification de la chromatine inhibe l'expression de gènes en bloquant l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs [18]. De plus, E2F1 peut s'associer avec des histone acétyl-transférases comme p300/CBP et p/CAF qui peuvent acétyler E2F1 et ainsi favoriser la liaison à l'ADN du complexe E2F/DP [19]. Le recrutement des HDAC aux E2Fs par pRB pourrait donc entraîner également une déacétylation des E2Fs et ainsi réduire leur niveau de liaison à l'ADN, affectant du même coup leur capacité d'activation de la transcription.

L'activité transcriptionnelle des E2F1-3 est essentielle pour la transition de la phase G1/S du cycle cellulaire [20]. Ainsi l'association pRB-E2F/DP maintiendrait les cellules en phase G1 en inhibant l'activité transcriptionnelle des E2Fs. La protéine pRB serait donc associée aux E2Fs en G0 et au début de la phase G1 [21], puis la phosphorylation de pRB vers la fin de la phase G1 par les Cdks mènerait à la dissociation de pRB du complexe E2F/DP et ainsi permettrait l'expression des gènes qui sont sous le contrôle des E2Fs et qui sont nécessaires pour la progression de la phase S du cycle cellulaire. La progression du cycle cellulaire peut donc s'effectuer lorsque pRB est inactivé par phosphorylation. La protéine pRB possède 16 sites

potentiels de phosphorylation et son état varie entre hypo et hyperphosphorylé durant le cycle cellulaire [22]. Au moins trois complexes cyclin-cdks sont susceptibles de pouvoir phosphoryler pRB durant le cycle cellulaire. Le complexe cyclinD-cdk4/6 phosphoryle pRB au début de la phase G1, le complexe cyclinE-cdk2 phosphoryle pRB à la fin de la phase G1 et le complexe cyclinA-cdk2 pourrait maintenir pRB phosphorylé durant la phase S [22]. La phosphorylation de pRB par le complexe cyclinD-cdk4/6 entraîne un changement dans la structure de la protéine RB qui fait en sorte que les HDACs se dissocient de pRB [23]. Cette dissociation mènerait à la levée de l'inhibition de l'expression de la cyclinE qui est sous contrôle de pRB [23]. Ainsi, la cyclinD-cdk4/6 permettrait l'expression de la cyclinE en causant la dissociation des HDACs de pRB et l'activité de la cyclinE-cdk2 serait suffisante pour mettre fin au maintien des cellules en phase G1 par pRB et permettre l'activation des E2F1-3 [24]. La phosphorylation de pRB par les différentes cyclin-cdk entraîne une dissociation de pRB des autres protéines régulatrices, ce qui permet à pRB d'avoir différentes fonctions dépendamment de son état de phosphorylation et permet un contrôle accru de la progression du cycle cellulaire.

1.2.2 Les E2Fs et la prolifération cellulaire

Une fois dissociés de pRB, les facteurs de transcription E2F sont actifs et peuvent induire l'expression de gènes cibles. Le moment où les E2Fs sont activés n'est pas un hasard. La phosphorylation de pRB a lieu durant la phase G1, ce qui permet aux E2Fs d'être actifs à la fin de cette phase. Cette activation des E2Fs permet ainsi l'induction de certains gènes qui sont nécessaires à la réplication de l'ADN et à la progression du cycle cellulaire. Parmi les gènes activés par les E2F durant cette phase, on retrouve notamment la cycline E et la cycline A, Cdk2 et Cdk1 [25]. De plus, les E2Fs peuvent induire l'expression de certains membres de la famille des protéines INK4, qui sont des inhibiteurs des Cdks, comme p18^{INK4C} et p19^{INK4D} [2]. Ces protéines peuvent se lier et inhiber les Cdks associées à la cyclinD [26], ce qui favorise la progression du cycle vers la phase S puisque le complexe cyclinD-Cdk4/6 est responsable de l'activation de protéines régulant la phase G1. Ces gènes sont particulièrement important lors de la transition de la phase G1/S et durant la phase S. Ce mécanisme d'activation à plusieurs niveaux favorise une régulation serrée de la progression du cycle cellulaire et implique les E2F1-3 dans la prolifération cellulaire.

Des études de délétion, notamment chez la drosophile, montrent que la perte des E2Fs activateurs atténue l'entrée en phase S et entraîne un retard de la croissance des mouches [27]. De plus, une diminution du niveau de E2F1 par l'utilisation d'ARN interférence chez la drosophile provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et diminue la réplication de l'ADN [28]. Cependant, dans certains cas, une délétion d'un des facteurs de transcription E2F n'influence pas de façon importante la progression du cycle cellulaire. La compensation entre les E2Fs activateurs peut probablement expliquer pourquoi une délétion d'un E2F activateur n'entraîne pas un arrêt de la prolifération cellulaire. Wu et al. ont donc inactivé les trois E2Fs activateurs (E2F1-3) pour constater que cette situation bloque complètement la prolifération cellulaire [3]. De la même façon, une surexpression des E2Fs activateurs peut forcer les cellules quiescentes à s'engager dans le cycle cellulaire en phase S [20]. Cependant, il faut noter que dans certains cas, une surexpression des E2Fs peut provoquer la sénescence ou l'apoptose chez quelques types cellulaires [29]. Ainsi, la variation des effets de délétion ou de surexpression des E2Fs activateurs sur la progression du cycle cellulaire en phase S démontre que l'activité des E2Fs peut dépendre du contexte cellulaire et suggère que la cellule possède d'autres mécanismes que l'activation de gènes par les E2Fs pour promouvoir la prolifération cellulaire.

1.2.3 Les E2F et l'apoptose

Bien qu'il soit impliqué dans la prolifération cellulaire, le facteur de transcription E2F1 joue également un rôle dans l'induction de l'apoptose. Cette dualité dans les fonctions biologiques de E2F1 pourrait s'expliquer par le fait que la cellule, durant la progression du cycle cellulaire, devrait être capable d'entrer en apoptose en cas d'irrégularité et cette tâche est probablement mieux accomplie si elle est coordonnée par un même facteur. Une dérégulation de l'expression de E2F1 peut causer l'apoptose via une voie p53-dépendante ou p53-indépendante [30], et est donc liée à une série d'évènements qui pourraient servir de mécanisme de protection pour l'organisme contre le développement de tumeurs.

L'implication de E2F1 dans l'induction de l'apoptose a été notamment montrée chez des souris *E2F1^{-/-}* qui montraient une résistance face aux stimuli apoptotiques et où on constatait une forte incidence de développement de tumeurs, démontrant ainsi un rôle anti-tumoral pour E2F1 [31]. De plus, une surexpression de E2F1 dans différents types cellulaires entraîne une sensibilisation des cellules à l'apoptose suite à un traitement avec radiation ou en présence de drogues

chimiothérapeutiques [32, 33]. E2F1 est également surexprimé lorsque l'ADN est endommagé, suggérant une implication directe du facteur de transcription dans une réponse suite à de tels dommages [34]. Ces dommages à l'ADN sont suivis d'une stabilisation de la protéine E2F1 via une phosphorylation par les kinases ATM, ATR et Chk2 [35-37] ou par une acétylation par P/CAF [38].

1.2.3.1 L'induction de l'apoptose par la voie p53 dépendante

E2F1 est capable d'induire l'apoptose via différents mécanismes. Des essais de surexpression ou de délétion ont montré que E2F1 pouvait induire l'apoptose de façon p53-dépendante ou p53-indépendante. Le mécanisme d'induction de l'apoptose où p53 est nécessaire implique l'activation transcriptionnelle, par E2F1, du gène ARF (p14^{ARF}), qui contient des sites de liaison E2F dans son promoteur [39, 40]. La régulation de p53 se fait en grande partie au niveau de sa stabilité puisque dans des cellules normales, le niveau de la protéine p53 est maintenu à un niveau basal grâce à une auto-régulation négative qui implique une induction par p53 de la transcription du facteur Hdm2 (Mdm2 chez la souris) qui à son tour se lie à p53 et entraîne sa dégradation par ubiquitination [41, 42]. E2F1 peut stabiliser p53 en activant la protéine p14^{ARF} qui se lie directement à Hdm2 et l'empêche de se lier à p53 pour ainsi prévenir sa dégradation [43]. La stabilisation de p53 suite à une activation de certains facteurs par E2F1 amènerait une augmentation du niveau de p53 et favoriserait ainsi la cellule à se compromettre vers l'apoptose.

1.2.3.2 L'induction de l'apoptose par la voie p53 indépendante

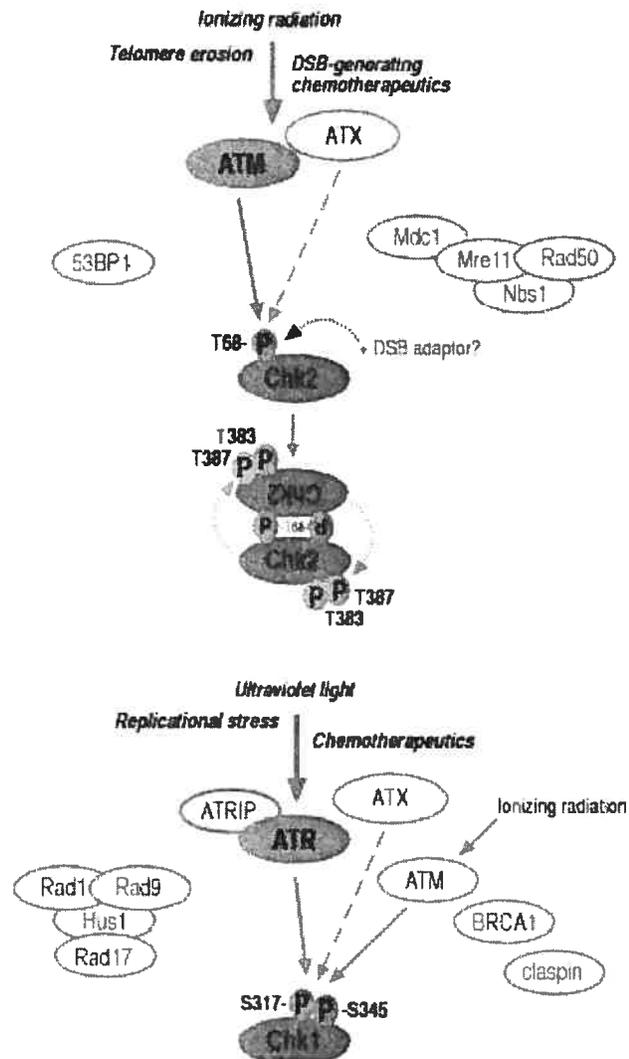
Dans certains types cellulaires qui ne possèdent pas p53, notamment les cellules Saos-2, E2F1 a toujours la capacité d'induire la mort cellulaire. Dans ce cas, p73, un membre de la famille de protéine à laquelle appartient p53, est impliqué dans l'induction p53-indépendante de l'apoptose [44]. E2F1 peut se lier directement au promoteur de p73 et activer sa transcription et ainsi induire l'expression des gènes ciblés par p73 dont certains sont aussi activés par p53 [45]. La protéine p73 peut également se lier à Hdm2 mais n'est pas dégradée suite à cette association, donc elle n'est pas stabilisée par une activation des protéines ARF [46]. E2F1 peut également induire l'apoptose en inhibant l'action de facteurs anti-apoptotiques. En effet, E2F1 peut inhiber l'action de NF-κB, qui active l'expression de plusieurs gènes anti-apoptotiques, en régulant de

façon négative le facteur TRAF-2 qui contrôle l'activation de NF- κ B [47]. L'induction de l'apoptose par E2F1 peut aussi se faire par l'activation de facteurs intrinsèques du processus apoptotique comme Apaf-1 [48]. Lorsqu'il est activé, le facteur Apaf-1 régule la libération du cytochrome c par la mitochondrie, suite à un signal apoptotique, menant à l'activation de la procaspase-9 ce qui déclenche une cascade d'évènements qui résultent en l'activation des caspases effectrices comme les caspases 3-6-7, qui mènent les cellules vers l'apoptose [49].

L'implication de E2F1 dans la réponse cellulaire suite à des dommages à l'ADN a été démontrée grâce à des essais effectués avec des agents génotoxiques qui ont pour effet d'entraîner une augmentation du niveau de E2F1 et non des autres membres de la famille des E2Fs, chez les cellules traitées avec ces agents [34, 50, 51]. Une augmentation du niveau de E2F1 est accompagnée par une phosphorylation de la protéine par des facteurs impliqués dans la voie de signalisation lors de dommage à l'ADN comme ATM, ATR et Chk2. Dans la voie de signalisation du dommage à l'ADN, ATM et ATR agissent comme senseurs en amont de la voie de signalisation et phosphorylent, en réponse à l'ADN endommagé, les kinases Chk1 et Chk2 (Fig.3) [52]. Une fois activés, suite à leur phosphorylation, Chk1 et Chk2 phosphorylent une variété de protéines incluant p53, Cdc25a et E2F1 pour faciliter l'arrêt du cycle cellulaire ou l'entrée en apoptose dûe aux dommages subis par l'ADN [52]. La phosphorylation par ATM et ATR de E2F1 affecte la stabilité de la protéine. En effet, la phosphorylation de E2F1 inhibe son association avec le facteur Skp2 réduisant le taux de dégradation de E2F1 [35]. La phosphorylation de E2F1 par Chk2 prévient également sa dégradation en bloquant son association avec Hdm2 [53]. L'augmentation du niveau de la protéine E2F1 et sa stabilisation par phosphorylation amène un accroissement du niveau d'activation du facteur de transcription E2F1. En plus de réguler l'expression du gène ATM, E2F1 régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie de réponse au dommage à l'ADN comme BRCA-1, Msh2 et PCNA [54].

Le rôle essentiel que jouent les E2Fs dans la régulation de processus biologiques importants comme la prolifération cellulaire et l'apoptose implique que leur activité soit sous contrôle de plus d'un mécanisme de régulation, pour éviter une suractivation de ces facteurs de transcription, ce qui entraînerait des conséquences néfastes pour la cellule.

Figure 3 : Voie de signalisation ATM et ATR (Tiré de Bartek et al. 2003) [52].



1.2.4 Mode de régulation de l'activité des E2Fs

1.2.4.1 Phosphorylation

En plus d'être régulé par pRB, d'autres mécanismes de régulation ont pour fonction de permettre une activité normale des E2Fs. Les E2F1-3 possèdent des motifs permettant une association avec les cyclinA/cdk2 et cyclinE/cdk2 [55]. Les kinases liées à ce domaine phosphorylent les E2Fs ainsi que la sous-unité DP-1/2 et inhibent ainsi la capacité du complexe E2F/DP de se lier à l'ADN [56, 57]. Lorsque le site de liaison des kinases est muté chez E2F1, ou lorsque le site de phosphorylation de DP-1 est muté, un complexe stable est généré et les cellules demeurent en phase S [58]. La phosphorylation par la cyclinE/cdk2 a cependant moins d'effet sur l'activité de liaison à l'ADN du complexe E2F/DP que la phosphorylation par la cyclinA/cdk2 [56]. Puisque la cyclinE/cdk2 est activée avant la cyclinA/cdk2 durant le cycle cellulaire, ceci permettrait au complexe E2F/DP d'être actif à un moment précis durant la progression du cycle.

1.2.4.2 L'acétylation

L'acétylation des E2F1, E2F2, et E2F3 peut également modifier leur activité. La régulation des E2Fs par pRB nécessite l'activité de déacétylation de l'histone déacétylase HDAC-1 [59-61]. Pour être activé, le complexe E2F/DP a besoin d'être acétylé, c'est pourquoi il est associé aux co-activateurs transcriptionnels CBP et p300 [62], qui possèdent une activité acétyltransférase [63]. Cette acétylation du complexe E2F/DP favoriserait sa liaison à l'ADN et le stabiliserait, augmentant ainsi son activité transcriptionnelle [63]. Le fait que les E2Fs soient ciblés par les acétylases CBP et p300, et par une déacétylase, HDAC-1, suggère que l'activation et la répression de ces facteurs de transcription par l'acétylation constitue un mécanisme de régulation pour ces facteurs.

1.2.4.3 L'ubiquitination

La dégradation des E2Fs constitue également un mode de régulation de ces facteurs de transcription. En effet, les E2Fs sont ciblés par la voie de dégradation des protéasomes. Les protéines qui sont dégradées via cette voie doivent d'abord être conjuguées à l'ubiquitine pour

être reconnues par le protéasome. La conjugaison de l'ubiquitine aux E2Fs se fait par l'entremise de la région carboxy-terminale contenant les domaines d'activation et de liaison à la protéine RB [64]. Lorsque les E2Fs sont associés à pRB, ils seraient protégés de l'ubiquitination et donc de la dégradation. Comme discuté précédemment, la liaison de pRB inhibe l'activité transcriptionnelle des E2Fs durant les phases G0 et G1. Lors de la transition des phases G1/S, pRB se dissocie des E2Fs permettant l'expression des gènes nécessaires pour la progression de la phase S. La libération du site de conjugaison à l'ubiquitine permet son ubiquitination avec les E2Fs et entraîne une protéolyse des facteurs de transcription. Cette dégradation suite à l'activation des gènes de la phase S serait un mécanisme de régulation qui assure la progression des cellules vers la phase G2 du cycle cellulaire [64].

Aux différents mécanismes de régulation de l'expression des E2Fs, et plus particulièrement de E2F1, s'est ajouté récemment la régulation par les miARNs [65]. Les miARNs sont de petits ARNs non-codants (21-23 nucléotides) qui contrôlent la stabilité ou la traduction de transcrits spécifiques. Les miARNs pourraient réguler l'expression de nombreux gènes et ils pourraient donc jouer un rôle important dans de nombreux processus biologiques [66].

1.3 Les miARNs

L'origine de l'intérêt pour l'étude des miRNAs provient d'études effectuées sur le pétunia, qui consistaient à accentuer la pigmentation des fleurs pour leur donner une pigmentation plus intense. À l'aide d'un transgène, les chercheurs s'attendaient à une augmentation de l'expression de la protéine responsable de cette pigmentation et à obtenir des fleurs plus colorées. Cependant, les résultats obtenus ont été tout autres. Le transgène donnait des fleurs blanches et une réduction de la synthèse du pigment voulu. L'étrange phénomène a été nommé cosuppression [67, 68].

Quelques années plus tard, Lee et al. ont identifié chez *C. elegans* deux transcrits de *lin-4* (abnormal cell *LINeage*) dont le plus petit (21 nucléotides) possédait une complémentarité avec 7 séquences répétées dans le 3'UTR de l'ARNm *lin-14*. Cette découverte supposait que *lin-4* pouvait réguler la traduction de *lin-14* via l'interaction antisens :ARNm, et que *lin-4* jouait un rôle primordial dans le développement du nématode. Cette découverte était des plus intrigante étant donné que la régulation des gènes eucaryotiques se fait par des protéines et non par des molécules d'ARN. Par la suite, la découverte du miRNA *let-7* (*LEThal*), un autre gène impliqué dans le développement de *C. elegans* [69] et de sa cible, *lin-41*, ainsi que leur conservation

phylogénétique [70] a provoqué une véritable chasse pour l'identification de miARNs dans d'autres espèces animales. Ces découvertes ont ainsi mené à la création d'un nouveau champ de recherche en biologie : la régulation génique par de petits ARNs non-codants. Les nombreuses études effectuées sur les miARNs ont permis de mieux connaître leur biogénèse, leurs modes d'action et leurs fonctions chez différents organismes.

1.3.1 La biogénèse des miARNs

L'identification de l'emplacement des miARNs à l'intérieur du génome indique que la plupart des miRNAs sont localisés dans des régions intergéniques (à >1Kb d'un gène annoté ou prédit) et qu'un nombre moins importants de miRNAs se retrouve dans la région intronique de gènes dans une orientation sense ou antisense [71, 72]. Cet emplacement dans le génome signifie que la plupart des gènes de miARNs sont transcrits en tant qu'unités de transcription autonomes. De plus, environ 50% des miARNs se trouvent à proximité d'autres miARNs dans le génome, rendant possible la transcription d'un groupe de gènes de miARNs à partir d'une seule unité transcriptionnelle [72, 73]. Des analyses détaillées de l'expression de gènes de miARNs ont montré qu'ils peuvent être transcrits à partir de leur propre promoteur et que les miARNs qui sont regroupés, sont produits sous forme de transcrits polycistroniques [74].

1.3.2 Transcription des gènes de miARN par l'ARN pol II

La transcription de la plupart des gènes de miARNs est effectuée par l'ARN polymérase II (pol II) [75, 76], même si la possibilité qu'un petit nombre de gènes de miRNAs soient transcrits par d'autres ARN polymérases ne peut être exclue. Au départ, il était convenu de croire que l'ARN polymérase III puisse être responsable de la transcription de certains gènes des miARNs, étant donné qu'elle est responsable de la transcription de la majorité des petits ARNs comme les ARNt. Cependant, la longueur du transcrit produit suite à la transcription d'un gène de miARN, qui peut parfois dépasser plusieurs kilobases, met en doute l'hypothèse selon laquelle l'ARN pol III est impliquée dans la transcription des miARNs.

Il existe trois évidences qui montrent que l'ARN pol II est responsable de la transcription des miARNs. Premièrement, les transcrits primaires des miARNs (pri-miARN) contiennent une coiffe en 5' et une queue polyA en 3' [75, 76]. Deuxièmement, la transcription des miARNs est

réduite en présence de concentrations d' α -amanitine qui inhibe spécifiquement l'ARN pol II, et non l'ARN pol I ou pol III [75]. Finalement, il a été démontré que l'ARN pol II interagit spécifiquement avec le promoteur de miARNs comme miR-23a, miR-27 et miR-24-2 par des analyses d'immunoprécipitation de chromatine [75].

La transcription des gènes de miRNAs par l'ARN pol II représente certains avantages. La transcription des miARNs peut être régulée par plusieurs facteurs associés à la pol II pour faire en sorte que des miARNs puissent être impliqués, par exemple, dans le développement et être exprimés dans certaines conditions et dans des types cellulaires spécifiques. Suite à la production du pri-miARN, différentes étapes de maturation devront être nécessaires pour donner naissance au miARN mature.

Le modèle de la maturation des miARNs qui est présentement accepté découle de deux observations simples. La première est que le long transcrit primaire est mûré en un intermédiaire (pré-miARN) en forme de tige boucle et cet intermédiaire est clivé une seconde fois pour donner le miARN mature [77]. La deuxième est que les activités catalytiques responsables de générer le pré-miARN et le miARN mature, se retrouve dans le noyau et le cytoplasme, respectivement [77]. Ainsi, l'export du pré-miARN hors du noyau est nécessaire pour que la maturation cytoplasmique puisse se faire.

1.3.3 Maturation du pri-miARN par Drosha

La transcription des gènes de miARNs produit de long transcrits de plusieurs kilobases qui contiennent une structure en forme de tige boucle. Cette tige-boucle est coupée par une ribonucléase nucléaire de type III, Drosha, qui produit ainsi le pré-miARN [78]. Les fragments de chaque côté de la tige-boucle sont probablement dégradés suite à l'action de Drosha, mais il se pourrait que ces fragments aient leur propre fonction.

Drosha est une protéine de ~160 kDa qui est conservée chez les métazoaires [79]. Elle contient deux domaines RNase III en tandem et un domaine de liaison à l'ARN double brin. Le domaine de liaison à l'ARN et la région centrale de la protéine sont essentiels à l'activité catalytique de Drosha [80]. Drosha fait partie d'un gros complexe de 650 kDa chez l'homme, qui est mieux connu comme étant le complexe Microprocesseur [81]. Dans ce complexe, Drosha interagit avec son cofacteur, la protéine DGCR8 (chez *D. melanogaster* et *C. elegans*, il s'agit de Pasha) [80]. DGCR8 est une protéine de ~120 kDa, qui contient deux domaines de liaison à l'ARN double

brin. Elle contient également un domaine qui peut interagir avec des séquences riches en proline et ce domaine pourrait être responsable de l'interaction entre DGCR8 et Drosha, puisque cette dernière possède une région riche en prolines. DGCR8 est présentement considéré comme participant à la reconnaissance du substrat pour le complexe Microprocesseur [80-83].

Drosha semble reconnaître les pri-miARNs d'après leur structure particulière étant donné qu'ils n'ont pas de séquence précise en commun. Ainsi, des analyses effectuées par mutagenèse montrent que la structure tertiaire est le facteur de reconnaissance primaire pour Drosha. En effet, la longue tige ainsi que la boucle terminale sont essentielles pour une reconnaissance du substrat par le complexe microprocesseur [84, 85]. Le complexe détermine également la longueur du pré-miARN, puisque le site de coupure se situe toujours à environ deux tours d'hélices (environ 22 nucléotides) à partir de la base de la boucle terminale [85]. La participation de Drosha dans la maturation d'autres types d'ARN est mal connue, malgré le fait qu'elle pourrait être impliquée de façon indirecte dans la maturation de l'ARN ribosomique [86].

1.3.4 Export du pré-miARN dans le cytoplasme par l'exportine-5

Suite à l'étape nucléaire de maturation, le pré-miARN devra être exporté hors du noyau pour subir la seconde étape de maturation dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme le pré-miRNA sera coupé par une autre RNase III, Dicer.

Le transport nucléaire s'effectue par l'entremise des pores nucléaires qui sont de gros canaux protéiques ancrés dans la membrane nucléaire. Les récepteurs protéiques responsables de l'export nucléaire peuvent se lier à un élément prêt à être exporté hors du noyau ainsi qu'au cofacteur Ran-GTP. Suite à l'export, l'hydrolyse du GTP en GDP induit le relâchement de l'élément à exporter du complexe d'export. L'export du pré-miARN est effectué par un des récepteurs du transport nucléaire, l'exportine-5. Lorsqu'on inhibe l'action de l'exportine-5 chez les cellules, on constate une diminution du niveau des pré-miARNs ainsi que des miARNs dans le cytoplasme [87, 88]. Cependant, il est intéressant de noter qu'une inhibition de l'exportine-5 n'entraîne pas une accumulation de pré-miARN dans le noyau. Ceci suggère que le pré-miARN pourrait être instable dans le noyau et qu'il pourrait être stabilisé via son interaction avec l'exportine-5 [88]. L'exportine-5 peut également exporter l'ARN adénoviral VA1, qui est un ARN non-codant de 160 nucléotides. La structure de ce petit ARN possède un motif de mini-hélice formé d'une tige d'au moins 14 paires de bases ainsi qu'une protrusion de 3 à 8

nucléotides à l'extrémité 3'. Cette structure est très similaire à la structure en tige boucle des pré-miARNs. La tige des pré-miARNs fait environ 22 paires de bases et possède également une protrusion de deux nucléotides à l'extrémité 3'. En introduisant des mutations dans la structure du pré-miR-30, la présence d'une tige de plus de 16 paires de bases ainsi qu'une protrusion de quelques nucléotides à l'extrémité 3', ont été confirmées comme étant des caractéristiques essentielles pour l'export des pré-miARNs [89].

1.3.5 Maturation du pré-miARN par Dicer

Suite à leur export dans le cytoplasme, les pré-miARNs subissent une seconde maturation grâce à une autre RNaseIII, Dicer, pour produire un duplexe de 22 nucléotides [90, 91]. Dicer a été identifié à l'origine comme étant impliqué dans la maturation des siARNs qui sont de taille similaire aux miARNs (21-25 nucléotides). Lorsque Dicer est délété, les pré-miARNs s'accumulent dans le cytoplasme et une diminution marquée du niveau des miARNs s'en suit [91, 92]. Dicer est une protéine qui est hautement conservée chez plusieurs organismes comme la levure *S. pombe*, les plantes et les métazoaires. C'est une protéine de 200 kDa qui possède plusieurs domaines, notamment un domaine DEAD-BOX RNA HELICASE ainsi qu'un domaine PAZ. Le domaine PAZ peut se lier à l'extrémité 3' du pré-miARN forçant les domaines catalytiques RNaseIII de Dicer à se retrouver à la base de la boucle du pré-miARN. Le domaine PAZ servirait donc de guide et déterminerait le site de clivage sur la tige boucle pour les domaines RNaseIII [93, 94]. Dicer s'associe avec plusieurs protéines dont notamment les protéines Argonautes [95]. Parmi ces protéines, Ago2 est la protéine avec un rôle majeur, puisque c'est elle qui possède l'activité catalytique capable de cliver l'ARNm [96]. Les autres protéines associées à Dicer ont des rôles variés dans la stabilité des miARNs ainsi que dans la formation du complexe de maturation des pré-miARNs [97, 98].

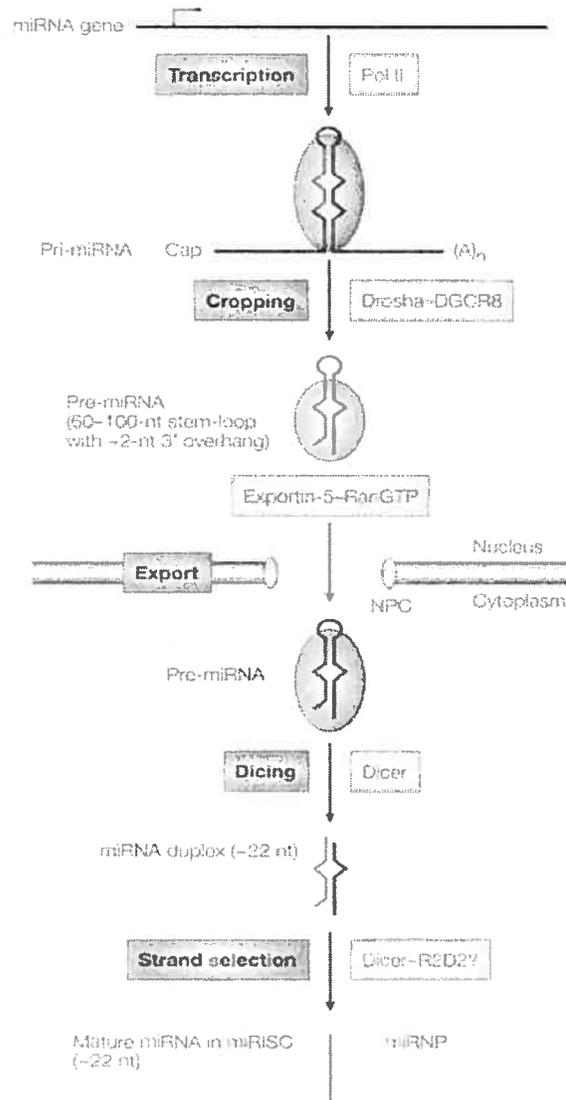
Les multiples étapes nécessaires à la maturation d'un miARN fonctionnel sont très bien coordonnées (Fig. 4). La protéine Drosha initie la maturation des miARNs en produisant un précurseur ayant une structure en forme de tige boucle dans le noyau. Comme les autres endonucléases de type III, Drosha coupe en laissant une protrusion de 2 nucléotides en 3'. La structure particulière du pré-miARN semble être primordiale puisqu'elle permet à l'exportine-5 de s'associer à celui-ci et de l'exporter dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé par Dicer qui reconnaît plus spécifiquement l'ARN double brin possédant une

protrusion de deux nucléotides en 3'. Ainsi, la maturation par Drosha donne une spécificité et facilite la maturation des miARNs en générant une structure particulière qui est reconnue par les autres facteurs impliqués dans les étapes de maturation subséquentes.

1.3.6 Formation du complexe RISC

Les miARNs matures sont incorporés dans le complexe RISC (RNA-induced-silencing complex). L'identité du brin du duplexe qui sera incorporé dans le complexe est déterminée en fonction de la stabilité des deux extrémités du duplexe. Le brin possédant une extrémité 5' relativement instable est généralement incorporé dans le complexe RISC. L'autre brin est normalement dégradé par la suite [99, 100]. La composante majeure du complexe RISC est une protéine de la famille des Argonautes. Les protéines Argonautes sont associées au complexe RISC chez plusieurs organismes [101]. Les membres de la famille des Argonautes possèdent un domaine PAZ qui est impliqué dans la liaison avec le miARN et un domaine PIWI qui possède l'activité endonucléasique [102]. La plupart des eucaryotes possèdent plusieurs protéines Argonautes qui ont une fonction spécifique. Par exemple, chez la drosophile, Ago1 est impliqué dans la répression de la traduction tandis que Ago2 est impliqué dans la dégradation de l'ARNm par les siARNs [103]. De la même façon, chez l'homme, Ago2 semble être le seul membre de la famille des protéines Ago à posséder une activité endonucléasique [98]. D'autres protéines font également partie intégrante du complexe RISC notamment VIG, Tudor-SN et Gemin3, mais leurs rôles précis n'ont pas été déterminés [104].

Figure 4 : Étapes nécessaires lors de la biogénèse des miARNs.
(Tiré de Kim et al.) [77]



1.3.7 Modes de régulation de la traduction par les miARNs

Le contrôle de l'expression de gènes par les miARNs dépend de l'interaction de la région en 5' du miARN et une séquence dans le 3'UTR d'un ARNm et de la complémentarité qui existe entre les deux ARNs. C'est le niveau de complémentarité entre les deux ARNs qui déterminera quelle voie de régulation sera utilisée par le miARN. L'interaction miARN:ARNm dépend principalement d'une complémentarité entre la région 5' du miARN (2^e -8^e nucléotide) et une région dans le 3'UTR de l'ARNm ciblé. La région 3' du miARN est tout de même importante et pourrait moduler l'effet de répression du miARN [105]. En effet, une forte complémentarité entre le miARN et l'ARNm entraîne généralement une dégradation de l'ARNm. Ceci est particulièrement vrai chez les plantes où le principal mode d'action des miARNs est la dégradation, puisque la majorité des miARNs possède une complémentarité parfaite ou presque parfaite avec leur cible [106]. Dans le cas où la complémentarité n'est pas parfaite, le mode d'action des miARNs est plutôt la répression de la traduction.

1.3.7.1 Dégradation de l'ARNm via les miARNs

Chez les métazoaires, contrairement à ce qu'on voit chez les plantes, la dégradation de l'ARNm par les miARNs est plutôt rare comme mode de régulation de l'expression génique chez les métazoaires [107, 108]. Comme mentionné plus haut, il est nécessaire d'avoir une complémentarité presque parfaite pour qu'un miARN puisse induire la dégradation de sa cible. Cependant, une complémentarité parfaite ne signifie pas nécessairement qu'il y aura clivage de l'ARNm [109]. En plus de la complémentarité entre le miARN et sa cible, la présence d'Ago2 dans le complexe RISC est essentielle, étant donné qu'il est le seul membre de la famille des Argonautes à posséder une activité endonucléasique [97].

1.3.7.2 Inhibition de la traduction par les miARNs

Le second mode d'action des miARNs consiste à inhiber la traduction de l'ARNm ciblé. Ce mode de régulation a d'abord été montré chez *C. elegans* où le miARN lin-4 réduit le niveau de la protéine lin-14 sans affecter le niveau de l'ARNm lin-14 [110]. Ce mode de régulation se distingue de la régulation par dégradation de plusieurs façons. D'abord, les niveaux d'ARNm ne sont généralement pas modifiés par l'action des miARNs, seulement le niveau des protéines est

affecté. Deuxièmement, il semble que tous les membres de la famille AGO (AGO1-4) puissent participer à ce mode de régulation [111]. Finalement, il est généralement convenu qu'une inhibition efficace de la traduction par les miARNs nécessite plusieurs sites de liaison pour les miARNs dans le 3'UTR de l'ARNm. Cependant, il est important de noter que certains miARNs sont capables d'inhiber la traduction d'ARNm seulement avec un site de liaison. Cette situation amène probablement une régulation très fine de l'ARNm [112].

Lors de l'inhibition de la traduction, deux modèles semblent expliquer comment l'inhibition s'effectue. Des observations récentes montrent que les miARNs diminuent le taux d'initiation de la traduction. Les protéines argonautes, les miARNs et les ARNm ciblés par des miARNs peuvent s'accumuler dans les P-bodies [111, 113]. Il semble que les P-bodies contiennent des ARNm qui ne sont pas en train d'être traduits puisqu'ils ne contiennent pas la machinerie de traduction [114]. De plus, des gradients de polysomes montrent que des ARNm ciblés par des miARNs se retrouvent dans des fractions où les polysomes sont moins présents comparativement à des ARNm qui ne sont pas ciblés par des miARNs, indiquant que les miARNs pourraient bloquer l'association des ribosomes avec l'ARNm lors de l'initiation de la traduction [111]. Deux possibilités peuvent expliquer la diminution du taux d'initiation de la traduction par les miARNs. Premièrement, les miARNs par l'entremise du complexe RISC pourraient recruter un ou des facteurs pouvant inhiber la fonction de certains facteurs d'initiation de la traduction et ainsi freiner la traduction et mener à une accumulation des ARNm ciblés dans les P-bodies. L'autre alternative serait le recrutement d'un facteur initiant la formation d'un complexe ribonucléoprotéique capable de s'accumuler dans les P-bodies et ainsi de se soustraire à la machinerie de traduction [115].

Outre le modèle d'inhibition de l'initiation de la traduction, d'autres groupes ont proposé que la répression de la traduction par les miARNs pourrait se faire lors d'une étape de la synthèse des protéines suivant l'initiation de la traduction [116]. Cette hypothèse est basée sur des observations concernant le contrôle de l'expression des ARNms *lin-14* et *lin-28*, qui sont régulés durant le développement chez *C. elegans* par le miARN *lin-4* [110]. La répression de la traduction de ces ARNm n'entraîne pas de changement dans la distribution polysomale, suggérant que l'inhibition de la traduction ne se fait pas à l'étape de l'initiation. La présence de miARNs au 3'UTR d'un ARNm pourrait ainsi retarder la synthèse de la protéine en bloquant la progression des ribosomes sur l'ARNm ou en empêchant la terminaison de synthèse de

s'effectuer correctement [116, 117]. Bien que ces deux modèles puissent sembler contradictoires, il se pourrait que la répression de la traduction s'effectue de façon complémentaire lors de l'initiation, de l'élongation et de la terminaison. Dans ce cas, toutes les étapes devraient être soumises au contrôle des miARNs puisqu'un délai lors de l'élongation ou de la terminaison provoquerait une augmentation du nombre de ribosomes par ARNm, tandis que l'inhibition de l'initiation provoquerait une diminution du nombre de ribosomes par ARNm [115].

Le contrôle de la traduction par les miARNs débute donc par l'interaction du complexe RISC avec un ARNm spécifique, grâce à une complémentarité de séquence entre le miARN et l'ARNm. Si cette interaction est stable, le complexe RISC demeure lié au 3'UTR de l'ARNm et induit une diminution du niveau de traduction et une éventuelle accumulation de l'ARNm dans les P-bodies. Si la complémentarité est suffisante entre le miARN et l'ARNm et que le complexe RISC contient la protéine Ago2, l'ARNm peut être clivé. La différence entre la dégradation d'un ARNm ou la répression de sa traduction peut aussi dépendre de ses fonctions et de ses caractéristiques. Un ARNm ayant un taux de dégradation rapide, serait régulé par une répression de sa traduction, puisque sa demi-vie est courte. Par contre, un ARNm ayant une longue demi-vie pourrait être plus susceptible à la dégradation. Finalement, puisque la traduction et la dégradation d'un ARNm peuvent être régulées en fonction de l'environnement dans lequel se trouve la cellule, le mode de régulation employé par un miARN pourrait bien être influencé par le contexte cellulaire.

1.4 Implication des miARNs dans le développement

Le nombre croissant de miARNs et leurs nombreuses cibles potentielles font en sorte que les miARNs sont considérés comme une classe de régulateurs importants qui seraient impliqués dans différents processus biologiques.

Le développement animal requiert l'établissement d'une régulation spatio-temporelle spécifique de l'expression de gènes impliqués dans la transformation d'un zygote en organisme doté de tissus spécialisés fonctionnant de manière concertée. Un mécanisme de régulation précis est requis pour un contrôle efficace de l'expression de gènes durant le développement de tissus embryonnaires. Un aspect important de ce contrôle implique une expression spécifique de facteurs durant chaque étape du développement. Il est également important que des facteurs puissent être inhibés lorsqu'ils ne sont pas requis durant certaines phases du développement.

Plusieurs évidences démontrent que les miARNs jouent un rôle important dans la régulation de plusieurs processus du développement puisque leur expression peut varier dans le temps et qu'ils peuvent être exprimés dans des régions spécifiques de l'organisme en développement. Cette régulation par les miARNs est notamment importante dans le développement des tissus musculaires squelettiques et cardiaques et dans le développement neuronal du cerveau.

Le rôle des miARNs dans le développement a d'abord été démontré chez *C. elegans*, avec la découverte du miARN lin-4 et de sa cible, lin-14 [110]. La régulation de lin-14 par lin-4 permet l'établissement d'un gradient de la protéine lin-14 durant le développement, permettant une transition adéquate entre les différents stades larvaires chez *C. elegans*.

1.4.1 miR-10 et miR-196 sont impliqués dans le développement embryonnaire

Les miARNs miR-196 et miR-10 sont les deux premiers miARNs à avoir été identifiés comme étant impliqués dans la régulation du développement embryonnaire chez les mammifères, en ciblant le cluster des gènes HOX. Plus particulièrement, miR-196 régule l'expression du gène Hox8b [118]. Hox8b est un facteur de transcription qui régule l'action de Sonic Hedgehog durant le développement des membres antérieurs de la souris [118]. Par contre, Hox8b n'est pas exprimé dans les tissus à l'origine des membres postérieurs et le contrôle de son expression s'explique par l'action de miR-196, qui lui est exprimé dans ces tissus mais pas dans les tissus à l'origine des membres antérieurs [118]. miR-196 permet de réprimer l'expression du gène Hox8b dans une région où il n'est pas requis, permettant ainsi un développement adéquat des membres chez la souris.

1.4.2 miR-1 et miR-133 participent à la formation des tissus musculaires

Les miARNs sont impliqués dans le développement et la différenciation des muscles squelettiques et cardiaques chez différents organismes. Une étude portant sur l'expression des miARNs dans différents tissus a montré une expression du miARN miR-1 dans les tissus musculaires de la drosophile et dans les muscles squelettiques et cardiaques chez la souris [119]. La séquence de miR-1 est conservée des nématodes aux mammifères [119]. Durant le développement des tissus cardiaques de l'embryon de souris, miR-1 est fortement exprimé et cible le facteur de transcription Hand2 qui est responsable de la différenciation des

cardiomyocytes entre les jours 8,5 et 11,5 du développement de l'embryon [120]. Par contre, durant les jours 13,5 et 16,5 du développement, la présence de miR-1 est pratiquement indétectable et une surexpression de miR-1 à ce stade provoque un défaut de différenciation des cardiomyocytes causant un amincissement des parois ventriculaires [121]. Ceci suggère qu'une régulation très précise de l'expression de miR-1 est essentielle durant le développement et que ce miARN a une fonction spécifique à un stade donné chez l'embryon de souris. Quelques facteurs de transcription impliqués dans la différenciation musculaire comme MyoD, Mef-2 et SRF (serum response factor) sont capables d'induire l'expression de miR-1 et de moduler le niveau du miARN durant le développement des tissus musculaires [118]. De plus, miR-1 peut contribuer à la différenciation des myoblastes en ciblant le facteur HDAC4 qui a pour fonction d'inhiber la différenciation musculaire [120]. miR-1 est situé à l'intérieur d'un cluster qui comprend également miR-133, un miARN qui ne possède pas la même séquence cible et qui a une fonction distincte. Contrairement à miR-1, miR-133 inhibe la différenciation et induit la prolifération en ciblant le facteur SRF [122]. miR-181 est un autre miARN impliqué dans le développement des tissus musculaires [123]. Même si ce miARN est peu présent dans les muscles squelettiques, il est fortement exprimé durant la différenciation des myoblastes et inhibe l'expression du gène HoxA11, qui est un répresseur de la différenciation [123]. Plusieurs miARNs jouent un rôle important dans la différenciation musculaire en inhibant l'expression de certains gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation des myoblastes. De plus, l'expression de miARNs à des stades précis du développement ou dans des tissus spécifiques favorise une coordination des différentes phases de la myogénèse et de la cardiogénèse.

1.4.3 miARNs impliqués dans le développement du cerveau

Le cerveau représente un tissu très complexe et est constitué de plusieurs types cellulaires différents. De nombreux miARNs sont exprimés dans des régions spécifiques du cerveau ou des neurones chez les vertébrés, ce qui suggère un rôle important pour ces miARNs dans le développement et le fonctionnement du cerveau [124]. Chez la souris, les neurones embryonnaires ont un niveau élevé des miARNs miR-124 et miR-128 tandis que les miARNs miR-23, miR-26 et miR-29 sont fortement exprimés chez les astrocytes. Cette expression spécifique de certains miARNs peut contribuer à une composition distincte de protéines nécessaires à l'établissement d'une spécialisation des différents compartiments neuronaux [125].

miR-124 est impliqué dans la maturation des neurones en dégradant les transcrits qui ne sont pas nécessaires au fonctionnement des neurones [126]. Dans les autres cellules, l'expression de miR-124 est inhibée par le facteur de répression transcriptionnel REST, qui réprime la transcription par l'entremise des HDACs [127]. Un autre miARN spécifique au cerveau, miR-134, qui est principalement localisé dans les dendrites, est impliqué dans la formation des épines dendritiques. miR-134 inhibe l'expression de la kinase *Limk1* qui contrôle le développement des épines dendritiques. Un signal extracellulaire ou un stimuli synaptique inhibe la répression de miR-134 et favorise la croissance des épines dendritiques [128].

1.5 Implication des miARNs dans le cancer

L'implication des miARNs dans la prolifération cellulaire et la différenciation, notamment pour les muscles et le cerveau, permet le développement adéquat d'un organisme. L'expression des miARNs doit donc être régulée de façon précise étant donné leur implication dans une multitude de processus biologiques qui sont essentiels à la viabilité des cellules. Cependant, lorsque l'expression de certains miARNs se fait de manière désordonnée ou lorsqu'une mutation dans la séquence d'un miARN diminue sa capacité à réguler un ARNm en particulier, cela peut modifier le fonctionnement normal des cellules et avoir des conséquences majeures. Une des conséquences résultant d'une dérégulation de l'expression des miARNs pourrait être le développement de cancers. En effet, de plus en plus d'évidences semblent impliquer certains miARNs dans le développement de tumeurs cancéreuses.

Le cancer est causé par une prolifération incontrôlée et par une incapacité des cellules endommagées à entrer en apoptose. Les cellules ont développé des mécanismes de protection qui assurent un contrôle de la division cellulaire, de la prolifération et de l'apoptose. Plusieurs facteurs de régulation, comme pRB et p53, qui sont considérés comme des suppresseurs de tumeurs, ou *MYC* et *Ras*, qui sont plutôt considérés comme des oncogènes, sont impliqués dans les différents mécanismes qui régulent ces processus biologiques.

La sur- ou sous-expression de certains miARNs montre une corrélation avec l'apparition de cancers et ces miARNs sont considérés comme oncogènes ou comme répresseurs de tumeur. Environ 50% des miARNs identifiés chez l'homme sont situés dans des régions du génome qui sont associées au cancer, ce qui suggère que les miARNs auraient un rôle crucial dans la progression du cancer [129].

1.5.1 Les miARNs anti-tumoraux

Une des premières indications que les miARNs jouent un rôle dans la progression du cancer fût la découverte, chez des patients atteints d'une forme de leucémie adulte (CLL), d'une délétion dans le génome d'une région comprenant un cluster de miARNs comprenant miR-15 et miR-16 [130]. Une délétion dans le locus 13q14, où sont situés miR-15 et miR-16, survient dans 60% des cas de CLL, dans 50% de certains lymphomes et dans 60% des cancers de la prostate. Ces deux miARNs ont pour cible l'ARNm de *BCL2* qui est un gène anti-apoptotique qui est souvent surexprimé dans certains types de cancer incluant les leucémies et les lymphomes [131]. Ainsi, une délétion de miR-15 et miR-16 pourrait mener à une augmentation de l'expression du gène *BCL2* et entraîner une prolifération cellulaire menant au développement d'un cancer.

La famille des miARNs let-7 pourrait également agir comme répresseur de tumeur. Il existe 12 homologues de let-7 dans le génome humain, répartis dans huit polycistrons distincts [129]. Au moins quatre de ces polycistrons sont situés dans des régions du génome qui sont fréquemment délétées dans différents cancers, dont le cancer du poumon [129]. Des essais *in vitro* effectués avec des cellules cancéreuses de poumon ont montré que let-7 pouvait avoir un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules [132]. Une diminution du niveau de let-7 et de certains de ses homologues semble donc être un élément important dans le déclenchement et la progression de certains cancers et plus particulièrement le cancer du poumon. Une des hypothèses qui pourrait expliquer l'importance de la famille de let-7 dans la régulation de la prolifération et la protection contre développement du cancer est que let-7 et quelques homologues de la famille régulent l'expression de l'oncogène *Ras*. Dans 15-30% des tumeurs humaines, le gène *Ras* est muté. Une mutation qui entraîne une activation de l'expression du gène *Ras* cause une transformation cellulaire qui peut mener au développement de tumeurs [129].

Let-7 et certains homologues de la famille interagissent avec l'ARNm de *Ras* par l'entremise de sites complémentaires dans le 3'UTR de l'ARNm. La régulation négative de *Ras* par let-7 s'effectue dans les cellules humaines et a pour but de maintenir un taux de prolifération normal. Dans les lignées cellulaires humaines cancéreuses, une surexpression de let-7 entraîne une diminution du niveau de la protéine *Ras* comparativement aux cellules où il n'y a pas de surexpression de let-7. Inversement, dans des lignées cellulaires où le niveau de let-7 est diminué, on constate une augmentation marquée du niveau de la protéine *Ras* [133].

Dans le cas de miR-15, miR-16 et de let-7, il semble que ces miARNs puissent jouer un rôle de répresseur de tumeur en régulant l'expression de gènes qui ont pour fonction de stimuler la prolifération cellulaire, ou des gènes qui sont anti-apoptotiques. Cependant, pour d'autres miARNs, leur surexpression favorise la formation de tumeurs et la progression d'un cancer. Dans le cas de certains miARNs, leur rôle dans le développement d'un cancer semble être relié à une augmentation de l'expression du gène *MYC*.

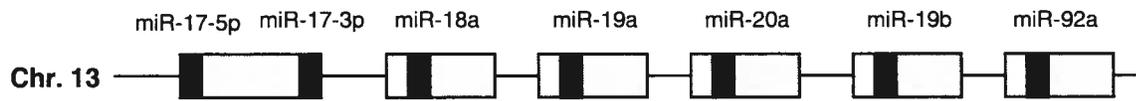
1.5.2 Les miARNs oncogéniques

L'oncogène *MYC* est souvent muté ou surexprimé dans les cancers humains et est un facteur de régulation important de la croissance cellulaire en induisant la prolifération cellulaire et l'apoptose [134]. La transformation tumorale des lymphocytes B semble être causée, dans certains cas, par une surexpression de *MYC* et une augmentation du niveau d'expression de miR-155 [133]. Ce miARN est situé dans le dernier exon du gène *BIC*, qui ne code pour aucune protéine, mais qui est surexprimé dans les lymphomes de cellules B [133]. Des études ont montré que ce miARN voit son expression augmenter dans le lymphome de Burkitt et dans le lymphome de Hodgkin [135-137]. Il semble donc que miR-155 agirait comme un oncogène en coopération avec *MYC*.

1.5.2.1 Implication du cluster miR-17-92 dans le cancer

MYC est également impliqué dans la régulation d'un cluster de miARN ayant des propriétés oncogéniques. Le gène *C13orf25*, duquel est transcrit le cluster *miR-17-92*, se retrouve au locus 13q31 qui est amplifié dans certains cancers comme le lymphome des cellules B et les lymphomes folliculaires [65]. Le cluster *miR-17-92* comprend 7 miARNs : miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR20a, miR-19b et miR-92 (Fig.5). Une analyse de l'expression de 191 miARNs dans des lignées cellulaires amplifiant le locus 13q31, a montré une augmentation du niveau d'expression de 6 miARNs, dont 5 font partie du cluster 17-92, proportionnellement à une augmentation du niveau d'expression du gène *C13orf25* [138]. Le même groupe a également montré que le pri-miARN du cluster *miR-17-92* est surexprimé dans 65% des lymphomes de cellules B, suggérant ainsi que ce cluster contribue à la formation de tumeurs cancéreuses.

Figure 5 : Le cluster *miR-17-92*



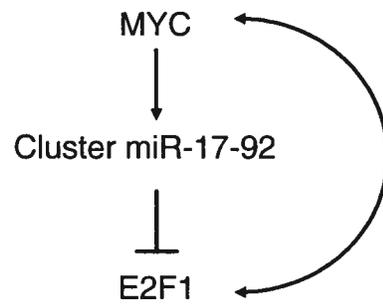
La démonstration de l'implication de ce cluster dans le développement du cancer a été effectuée en surexprimant le cluster tronqué *miR17-19b* (excluant miR-92a), grâce à une infection avec un rétrovirus, dans des cellules souches hématopoïétiques (HSC) isolées de souris, exprimant un transgène de *MYC* [136]. Ces cellules infectées ont ensuite été transplantées dans des souris ayant préalablement reçu une dose de radiation pour éliminer les cellules de la moelle osseuse. Les animaux irradiés ayant reçu les cellules exprimant *MYC* et le cluster *miR-17-19b* ont développé des lymphomes seulement 51 jours après la transplantation, comparativement aux animaux ayant reçus les cellules exprimant *MYC* seulement, qui eux ont développé des lymphomes 3-6 mois après la transplantation. Des expériences similaires effectuées avec des HSC exprimant *MYC*, en combinaison avec 96 miARNs différents ou avec chaque miARN du cluster *miR-17-19b*, n'ont pas montré une accélération du développement de la maladie chez les souris. Dans les lymphomes causés par l'augmentation de l'expression de *MYC* et de chaque miARN du cluster *miR-17-19b*, l'augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'une diminution de la mort cellulaire contraste avec les tumeurs résultant de l'augmentation de l'expression de *MYC* uniquement, qui elles montraient un taux élevé d'apoptose. La coopération entre *MYC* et le cluster *miR-17-19b* produit donc des lymphomes se développant très rapidement et capables d'échapper à l'apoptose en induisant une prolifération cellulaire incontrôlée. Les miARNs du cluster *miR-17-19b*, en ciblant des facteurs apoptiques qui sont induits par une surexpression de *MYC*, peuvent agir en tant qu'oncogènes. Lorsque l'expression de ces facteurs apoptotiques est diminuée, *MYC* induit la prolifération cellulaire pour mener à la formation de cancers. La fonction oncogénique du cluster *miR-17-92* peut être confirmée par le fait que des miARNs du cluster sont surexprimés dans les cancers du poumon et que l'expression des miARNs miR-19 et miR-92 est augmentée dans les leucémies lymphocytiques chroniques de cellules B [139, 140].

1.6 Régulation de l'expression de E2F1 par les miARNs miR-17-5p et miR-20a

Un autre groupe, O'Donnell et al., a également trouvé de façon indépendante que le cluster *miR-17-92* pourrait être un oncogène potentiel en analysant l'expression de 235 miARNs humains, de souris et de rat pour identifier les miARNs dont l'expression varie dans une lignée cellulaire de cellule B, P493-6, qui surexprime c-Myc [65]. Cette analyse a montré que c-Myc peut induire l'expression du cluster *miR-17-92*. De plus une immunoprécipitation de la chromatine a montré

que c-Myc peut se lier dans le premier intron du gène *C13orf25*, indiquant que c-Myc régule directement la transcription du pri-miARN du cluster *miR-17-92*. Des analyses bioinformatiques ont identifié le facteur de transcription E2F1 comme cible potentielle de deux miARNs du cluster, miR-17-5p et miR-20a [65]. Il est intéressant de noter que *MYC* et *E2F1* s'autorégulent positivement de façon réciproque [141, 142]. O'Donnell et *al.* ont montré qu'une inhibition de miR-17-5p et miR-20a dans les cellules HeLa augmente significativement le niveau d'expression de la protéine E2F1 sans affecter le niveau de l'ARNm. De plus, en mutant les sites complémentaires à miR-17-5p et de miR-20a dans le 3'UTR de E2F1 cloné dans un plasmide rapporteur exprimant la luciférase, les auteurs ont observés une augmentation de l'expression du gène rapporteur comparativement au niveau d'expression de la construction avec le 3'UTR sauvage de E2F1. c-Myc induirait l'expression de *E2F1* et du cluster *miR-17-92* alors que les miARNs miR-17-5p et miR-20a réguleraient à leur tour l'expression de *E2F1* (Fig 6). L'induction de la prolifération par *MYC* serait donc contrôlée par le cluster *miR-17-92*. Dans un tel contexte, le cluster *miR-17-92* agirait plutôt comme un répresseur de tumeur ce qui irait à l'encontre du modèle proposé par He et *al.* [138]. Cependant, la dualité des fonctions de *E2F1*, c'est-à-dire sa capacité à induire la prolifération cellulaire et à induire l'apoptose, ne met pas en contradiction les modèles proposés par les deux groupes. L'expression normale de *E2F1* induit la prolifération cellulaire en permettant la progression du cycle cellulaire. Par contre, lorsque l'expression de *E2F1* dépasse un certain niveau, l'induction de l'apoptose est favorisée par rapport à la prolifération cellulaire [143]. Dans ce contexte, la régulation de l'expression de *E2F1* par des miARNs du cluster *miR-17-92* inhiberait l'activité pro-apoptotique de *E2F1* et stimulerait la prolifération cellulaire par *MYC*.

Figure 6 : Modèle de la régulation de l'expression du facteur de transcription E2F1 par miR-17-5p et miR-20a (Inspiré de O'Donnell et al. 2005) [64].



1.7 Questions et hypothèses de travail

Bien que la régulation de l'expression de *E2F1* par miR-17-5p et miR-20a semble bien établie, il demeure néanmoins quelques aspects de cette régulation à élucider. Le fait que *E2F1* puisse être régulé par miR-17-5p et miR-20a suggère que cette régulation pourrait également s'appliquer aux autres E2F activateurs, *E2F2* et *E2F3*. Puisque ces facteurs de transcription ont sensiblement les mêmes fonctions et ont plusieurs gènes cibles en commun, il est plausible que ces miARNs puissent cibler ces facteurs de transcription. Une diminution du niveau de la protéine E2F1 qui serait compensée par les autres E2F activateurs, qui ne seraient pas ciblés par miR-17-5p et miR-20a, rendrait inutile la régulation de *E2F1* par ces miARNs. Pour que miR-17-5p et miR-20a puissent cibler les ARNm des facteurs de transcription E2F2 et E2F3, leur 3'UTR doit contenir des éléments reconnus par ces miARNs. En effet, une analyse de la séquence du 3'UTR de E2F2 et de E2F3 révèle la présence respectivement de 3 sites et 1 site potentiellement reconnus par miR-17-5p et miR-20a, ce qui indique que les ARNm de *E2F2* et *E2F3* sont possiblement des cibles de ces miARNs.

L'induction de l'expression du cluster *miR-17-92* par *MYC* est intéressante car elle permet d'énoncer d'autres hypothèses. Puisque l'activité des E2Fs et plus particulièrement de E2F1 est régulée à plusieurs niveaux et implique de nombreux facteurs, il est possible que c-Myc ne soit pas le seul facteur de transcription qui puisse induire l'expression du cluster. Malgré le fait que les E2Fs soient sous le contrôle de nombreux facteurs, ils ont la capacité d'autoréguler leur transcription grâce à des sites E2F dans leurs promoteurs [144]. De plus, *MYC*, qui induit l'expression de miARNs capables de réguler l'expression de *E2F1*, induit également l'expression de *E2F1* et inversement, *E2F1* peut induire l'expression de *MYC* [141, 142]. Ainsi, en régulant l'expression de *MYC*, *E2F1* régule également son expression mais de façon indirecte. Il est donc possible que les E2Fs puissent contrôler leur expression en régulant directement l'expression du cluster *miR-17-92*. Cette régulation est d'autant plus plausible, puisqu'une analyse effectuée à l'aide de l'algorithme bioinformatique SiteScan, a démontré la présence de sites E2F au promoteur de ce cluster. Cette régulation croisée permet de suggérer l'existence d'un mécanisme complexe de contrôle du niveau de la protéine E2F1 et même des autres E2F activateurs par miR-17-5p et miR-20a.

Une surexpression du cluster *miR-17-92* provoque une accélération du développement de tumeurs chez la souris [138], possiblement en bloquant l'activité apoptotique de *E2F1* et en favorisant la prolifération cellulaire par l'entremise de la protéine c-Myc. Le niveau de la protéine E2F1 semble influencer son rôle, c'est-à-dire une induction de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose. En effet, lorsque le niveau d'expression de *E2F1* dépasse une certaine limite, son activité favorise l'induction de l'apoptose [143]. Ainsi, contrairement à la surexpression du cluster *miR-17-92* qui provoque le développement de tumeurs, l'inhibition de miR-20a pourrait probablement déclencher l'apoptose par l'entremise d'une augmentation du niveau de la protéine E2F1.

Ainsi, dans l'article qui suit, nous apportons des réponses à certaines questions auxquelles aucun des articles portant sur le mécanisme de régulation de *E2F1* par les miARNs du cluster *miR-17-92* n'avait répondues. Entre autre, nous montrons que miR-20a peut non seulement cibler le 3'UTR de l'ARNm de E2F1, mais il peut également cibler le 3'UTR des ARNm E2F2 et de E2F3. De plus, nous montrons l'existence d'une boucle de régulation entre les facteurs de transcription E2F1-3 et miR-20a, puisque ces facteurs peuvent induire l'expression du cluster *miR-17-92*, duquel fait partie miR-20a, par l'entremise de sites E2F dans le promoteur du cluster. L'existence de cette boucle de régulation permettrait de maintenir un niveau des E2Fs dans un ratio favorable pour la cellule. Cependant, lorsqu'on inhibe miR-20a et traite les cellules avec l'agent génotoxique doxorubicine, on constate que les cellules sont beaucoup plus susceptibles d'entrer en apoptose. De même, la surexpression de miR-20a rend les cellules plus résistantes à l'apoptose, suggérant que ce miARN a probablement une activité anti-apoptotique. Ainsi, ces résultats démontrent que la boucle de régulation entre miR-20a et E2F1-3 contribue à maintenir un équilibre entre l'induction de la prolifération cellulaire et de l'apoptose par les E2Fs.

2. Contributions

2.1 Sylvestre et al.

Pour l'article *An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop* publié dans le «Journal of Biological Chemistry» en novembre 2006, quelques auteurs ont contribué à l'obtention des différents résultats qui se retrouvent dans cet article :

- J'ai contribué à la Figure 1 en effectuant le clonage des 3'UTR des E2F sauvages et mutants dans le vecteur pGL3-Control. J'ai également effectué tous les essais luciférase de cette figure.
- Vincent De Guire a contribué à la Figure 2 en effectuant les transfections avec les antisenses et les Western blots.
- J'ai contribué à la Figure 3 en effectuant le Northern blot.
- Véronique Bourdeau a contribué à la Figure 3 en effectuant les analyses de «Real-Time PCR».
- Vincent De Guire a contribué à la Figure 4 en effectuant le clonage d'une partie du promoteur dans le vecteur pGL3-promoteur.
- Emmanuelle Quérido a contribué à la Figure 4 en effectuant les immunoprécipitations de chromatine et les amplifications PCR.
- J'ai contribué à la Figure 4 en effectuant les essais luciférase.
- J'ai contribué à la Figure 5 en effectuant les essais luciférase.
- J'ai contribué à la Figure 6 en effectuant les essais luciférase et les tests apoptotiques.
- Vincent De Guire a contribué à la Figure 7 en effectuant les Western blots et le Northern blot.
- Utpal K. Mukhopadhyay a contribué à la Figure 7 en effectuant les tests apoptotique, les essais de survie cellulaire ainsi que les expériences de croissance cellulaire.
 - J'ai contribué à la Figure 1 supplémentaire en effectuant les essais luciférase.

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

Yannick Sylvestre[¶], Vincent De Guire[¶], Emmanuelle Querido¹, Utpal K. Mukhopadhyay¹, Véronique Bourdeau^{1,2}, François Major^{2,3}, 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

⁴To whom correspondence should be addressed:

Pascal Chartrand, Département de Biochimie, Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit, Montréal, Qc, H3C 3J7, Canada Tel: 514-343-5684; Fax: 514-343-2210; Email: [REDACTED]

Gerardo Ferbeyre, Département de Biochimie, Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit, Montréal, Qc, H3C 3J7, Canada, Tel: 514-343-7571; Fax: 514-343-2210; Email: [REDACTED]

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

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 E2Fs 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.

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 (1-3). E2F1, along with E2F2 and E2F3, are activators of cell cycle progression and promote the entry of quiescent cells into S phase (4,5). During G1, E2F1-3 are inhibited by their association with members of the retinoblastoma protein family (pRb, p107 and p130) (3). 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 (6,7). 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 (8). E2F1-responsive sites have been found in the promoters of several caspases as well as in other pro-apoptotic targets of p53 (9,10). 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 (11,12). 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 (9).

Besides the control of their activity by association with pRb, E2F1-3 are also regulated by phosphorylation (13), acetylation (14,15) and ubiquitin-dependent degradation (16). E2F1-3 also regulate their own transcription through E2F-binding sites within their promoters (17,18). 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 (19). 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 (20). Recent evidence suggests that miRNAs can regulate the expression of numerous genes (21) and several studies point to the role of some miRNAs in the development of cancer; reviewed in (22). 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 (23). Interestingly, this cluster is amplified in large-B cell lymphoma and in other malignant lymphomas (24). Moreover, miRNAs from this cluster are overexpressed in lung cancer cells, and in colon, pancreas and prostate tumours (25,26). 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 (19). 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

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids constructions. The E2Fs 3'UTRs were amplified from the genomic DNA of HeLa cells using the following primers: (E2F1) sense 5'-TGCTAGTCTAGAGGATT TCTGACAGGGCTTGGAGG-3'; antisense 5'-CTACTAGCTAGCAGAAGGGGAAGTGG 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'-CGGCTAGCAGGCTCAGGTACTGCAGCTG-3'; Antisense: 5'CCCTCGAGGCACACAGGTTTCCCTC-3'. The PCR product was cloned between the *Nhe*I and *Xho*I 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'-CCGGAATTCAGCTGGAGTTCTACAGCTAGCAG - 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 E2Fs 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 $\mu\text{g/mL}$ 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 Na₃VO₄, 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).

RESULTS

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 (19) 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 (19). 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 (3,15,17), 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 (27) (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 E2Fs. 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.

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 (28). 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 (2), 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 (24). This cluster has been shown to be induced by the c-Myc proto-oncogene (19) and amplified in B-cells lymphomas (23). 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 E2Fs.

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>). E2Fs are known to bind to a canonical TTTSSCGC sequence (where S= C or G) in the promoters of their target genes (29). 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 E2Fs 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 (19). 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 E2Fs, 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 E2Fs at the transcriptional level.

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 (30,31). 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 (32). In these cells, an increased E2F activity correlated with apoptosis after treatment with doxorubicin (32). 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.

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 (20). It has been proposed that they can act as developmental switches or as fail safe regulators of transcriptional programs (33). 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 E2Fs 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 (17,18). 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 (34). Recently, Lodish and colleagues have shown that MyoD activates the transcription of the muscle specific miR-1 and miR-133 miRNAs (35). Interestingly, the MyoD mRNA has a potential miR-133 target site in its 3'UTR (21), 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 (19). Since E2F1-3 are known to activate the transcription of *MYC* (36), and c-Myc can activate the

transcription of *E2F1-3* (37,38), 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 (39), that can be dubbed as a double feed-forward loop (Figure 8B).

One interesting function of the negative feed-back loop between E2Fs 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 E2Fs levels observed with miR-20a inhibition may not come entirely from an increased E2Fs 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 (40). Interestingly, the *mir-17-92* cluster is highly expressed in mouse ES cells (41), 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 E2Fs 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 (23). 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 (42). 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 (43).

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.

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

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).

FIGURES LEGENDS

Figure 1: miR-20a regulates E2Fs 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 E2Fs 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 E2Fs activity.

Figure 1

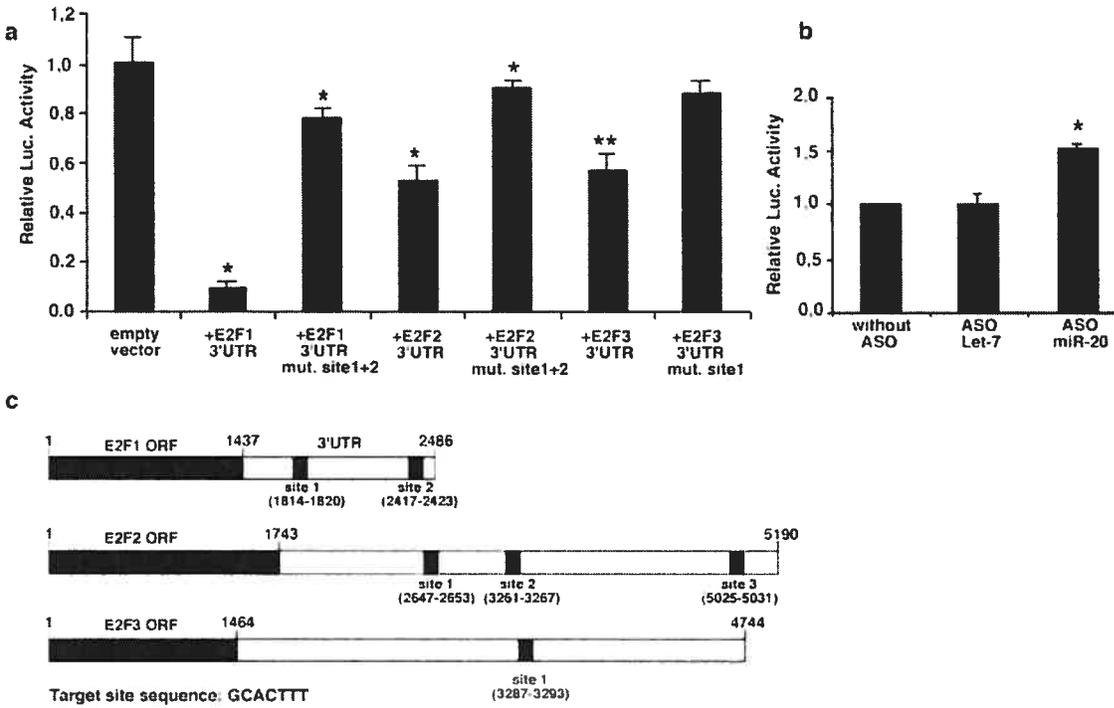


Figure 2

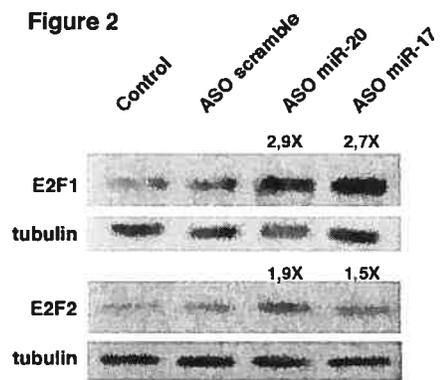


Figure 3

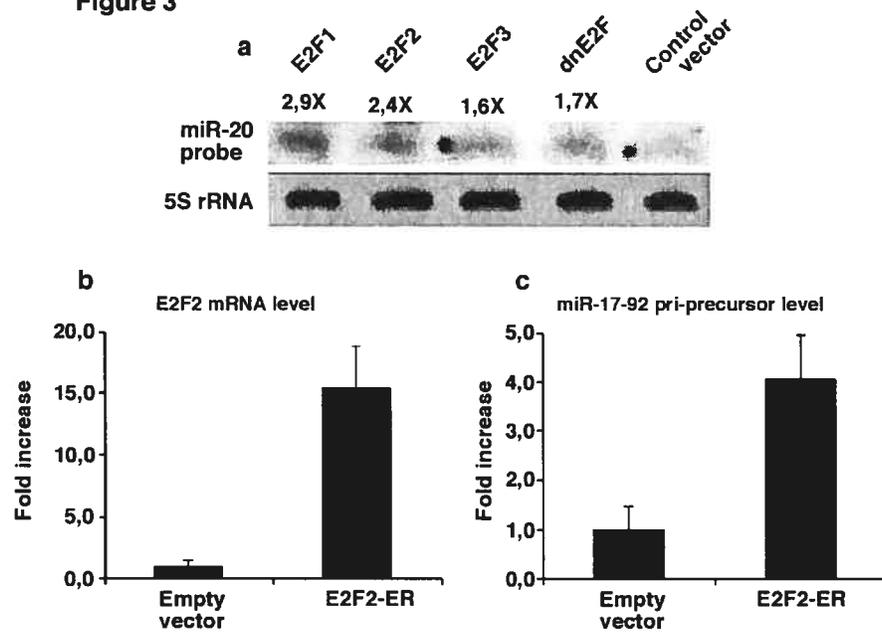


Figure 4

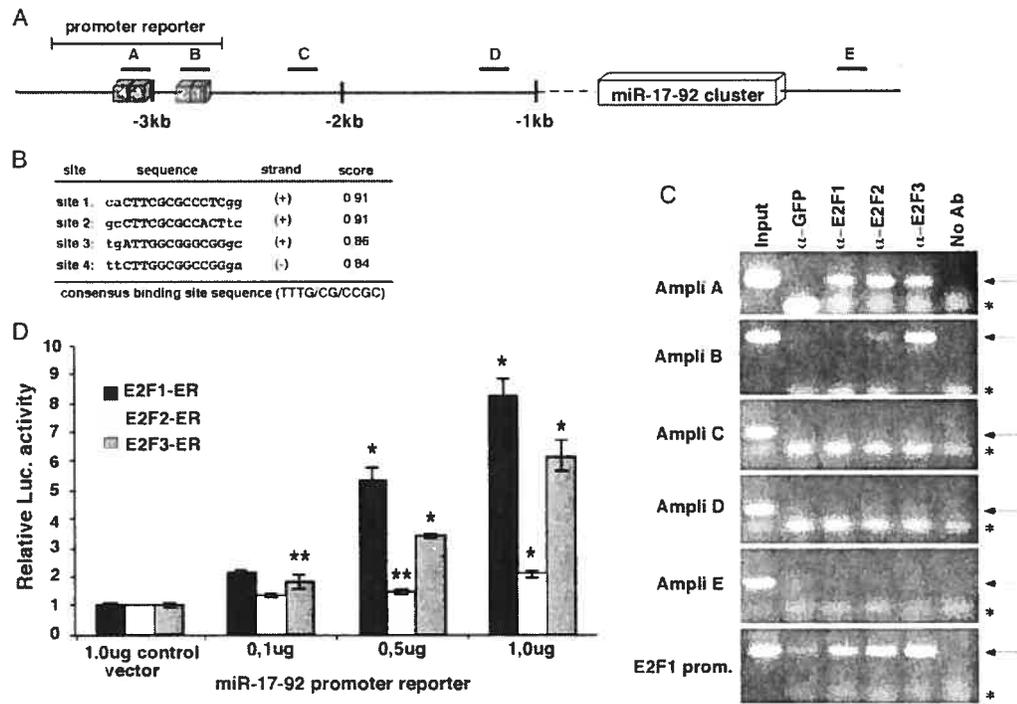


Figure 5

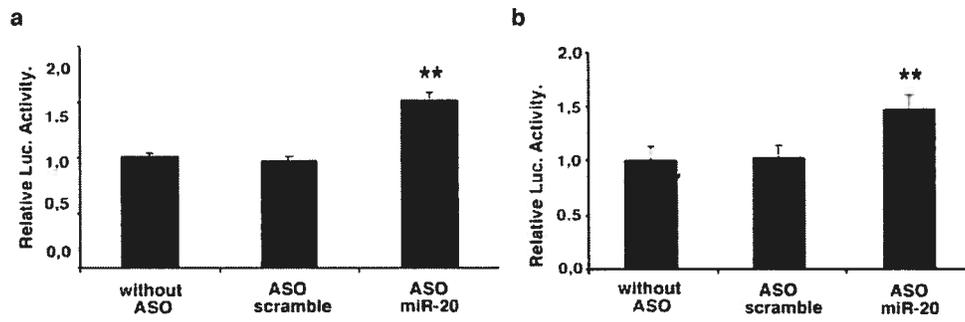


Figure 6

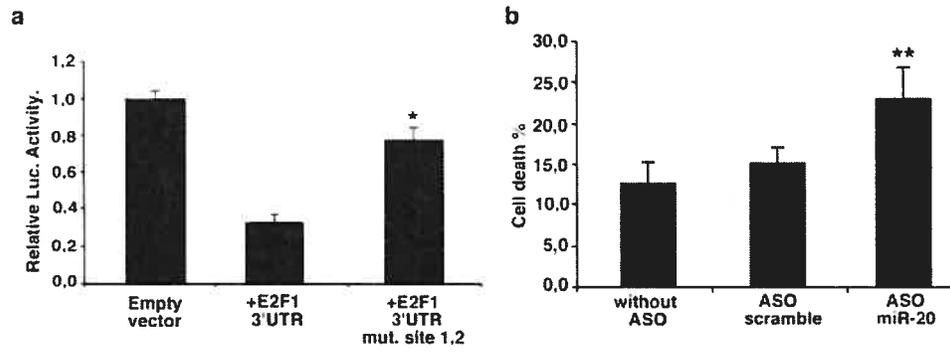


Figure 7

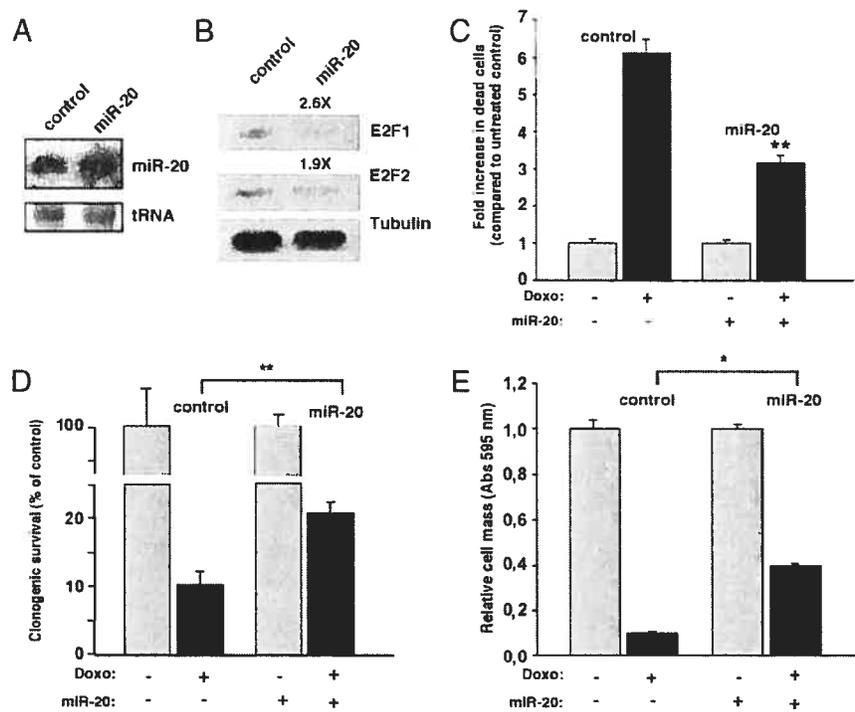
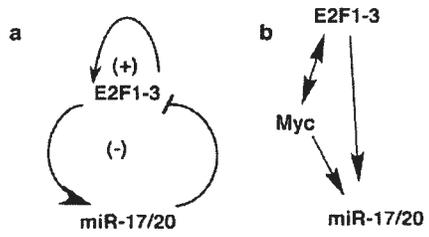


Figure 8



Supplementary Data (Sylvestre et al.)

Chromatin Immunoprecipitations

Each 100% confluent 100 mm plate of HeLa cells served for 2 chromatin immunoprecipitations (3×10^6 cells per antibody). The HeLa cells were crosslinked on the plate in 1% formaldehyde for 10 min at room temperature, and after addition of 0.125 M glycine, cells were collected in cold PBS. All buffers described for chromatin preparation were supplemented with effective concentrations of Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, PMSF, Sodium Vanadate and Sodium Fluorure as well as 0.5 mM DTT. Cell pellets were resuspended in 1 ml Nucleus/Chromatin Preparation buffer NCP I (10 mM HEPES pH 6.5, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.25% Triton X-100) followed by 5 min centrifugation at $2000 \times g$ at 4°C. The pellets were then resuspended in 1 ml NCP II buffer (10 mM HEPES pH 6.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA) followed by the same centrifugation. The pellets were then resuspended in 300 μ l of Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS, 0.5% NP-40) and the suspensions were lysed by sonication with a microtip 4 times for 10 s at minimum setting (Sonic Dismembrator Model 100, Fisher Scientific). Foaming of the lysates was not allowed to occur during sonication and this protocol reliably fragmented chromatin to a size between 200 and 700 bp. After 10 min centrifugation at $10,000 \times g$ at 4°C, 25 μ l of the supernatants were kept as Inputs, and the remainder diluted 2.5-fold in IP buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100). This diluted fraction was subjected to 3hr pre-clearing at 4°C with 4 μ g pre-immune rabbit IgG (Sigma) and 50 μ l of a mix of protein A/G-Sepharose beads (Sigma) pre-blocked with tRNA. The pre-cleared chromatin was incubated overnight at 4°C with 2 μ g of antibody to GFP (mix of mAb 7.1 and 13.1, Roche Applied Science), E2F1 (pAb sc-193x, Santa Cruz Biotechnology), E2F2 (pAb sc-633), E2F3 (pAb sc-878). Complexes were recovered by 1 hr of incubation at 4°C with 30 μ l of protein A/G-Sepharose beads. Precipitates were washed 6 times with 500 μ l Washing Buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% NP-40). Precipitated chromatin complexes were removed from the beads through a 10 min incubation with 50 μ l of 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃, with vortexing each 5 min. This step was repeated twice. To the 150 μ l of extract, 10 μ g of RNase A and 6 μ l of 5M NaCl

were added and the samples were incubated at 65°C overnight. Proteinase K buffer 5X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM EDTA, 1.25% SDS) was added and the samples incubated with Proteinase K at 45°C for 2 hours. Sample volume was then increased to 300 µl with TE and extraction with phenol/chloroform and chloroform was performed. Chromatin fragments were precipitated with 20 µg of tRNA and 2.5 volumes of EtOH overnight at -20°C, then washed with 70% EtOH and resuspend in 50 µl TE (100 µl TE for Input). PCR was performed on 5 µl of sample in a 50 µl total volume using Taq DNA polymerase (New England Biolabs), ThermoPol buffer and 2% DMSO. The PCR protocol consisted of 6 cycles of touch down from 62°C to 56°C annealing temperature, followed by 35 cycles at 58°C annealing temperature. The PCR products were analysed on a 2.5% agarose gel. The primers used for PCR amplification are described in the Table 1 of Supplementary Data.

Real-time PCR

Total RNA (2 µg) was reverse transcribed using the RevertAid H first minus strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas) as recommended by the manufacturer. The reverse transcription (RT) product was diluted 10 times prior to quantitative real-time PCR (Q-PCR). Each Q-PCR reaction mixture had a final volume of 20 µl and contained 2 µl of the diluted RT, 200 to 250 nM forward and reverse primers, 2,5 to 3,5 nM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0,33X SYBR Green (Invitrogen), 1X buffer for Jump Start Taq and 0.5 U. of Jump Start Taq (Sigma). In a RotorGene 3000 (Corbett, Australia), triplicate samples were heated at 95 °C for 7 min before 7 cycles of touch down PCR (95°C 15 sec, 60°C-53°C 15 sec, 72°C 20 sec) followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 15 sec at 58°C and 20 sec at 72°C. For each gene, non-template control reactions were added as negative control. Primers are described in Table 2 of Supplementary Data.

Table 1: Primers used for Chromatin immunoprecipitation analyses

Amplicon	Forward Primer	Reverse Primer	Band	Corresponds to
A	TCTCCCGGCCGCAAGAACGA	AAAACAAAGTACTTCGACCTCCC	85 nuc	miR-17-92 prom. A primers
B	CACATGGTCCTTCGAGGTGC	AGGAGAGCTTCGCGGAGGAG	137 nuc	miR-17-92 prom. B primers
C	CACGAGGTACCTGCGCGCCAG	CCTCGCGCTACAAAGTTTGG	76 nuc	miR-17-92 prom. C primers
D	AAAGGCAGGCTCGTCGTTG	CGGGATAAAGAGTTGTTTCTCAA	93 nuc	amplicon3 <i>O'Donnell et al.</i>
E	CCAAGCTGAAGTACAGGCAAACCT	TGGGTGGTCTAACCTAGTGTATGG	129 nuc	amplicon6 <i>O'Donnell et al.</i>
E2F1	ACCGCCGCGTGTGCCGTCACG	GCCGCTGCCTGCAAAGTCCCGGCC	124 nuc	E2F1 prom. primers

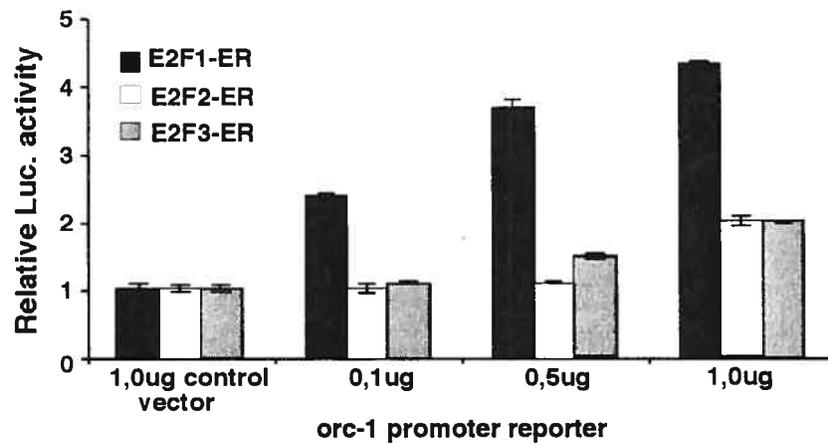
Table 2: Primers used for Real time PCR analyses

mRNA	forward	reverse	Primers (nM)	MgCl ₂ (mM)
β-Actin	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AAAGCCATGCCAATCTCATC	200	3,5
E2F2	TGGGTAGGCAGGGGAATGTTTG	AGTCACATAGCCAGCCTCTTG	300	2,5
mir-17-pre	ACATGGACTAAATTGCCTTTAAATG	AATCTTCAGTTTTACAAGGTGATG	250	3,5

Figure legend

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 µg, 0.5 µg, 1.0 µg) of the pBABE plasmid expressing E2F1, E2F2 and E2F3-ER fusions proteins, or the empty vector (1.0 µg).

Supplementary figure 1



4. Discussion

4.1 Le miARN miR-20a régule l'expression de E2F1, E2F2 et E2F3

Depuis la découverte des miARNs chez *C. elegans* [110], le monde de la biologie moléculaire a dû réviser sa conception de la régulation de l'expression des gènes. Les facteurs de transcription étaient considérés comme étant les principaux responsables du contrôle de l'expression des gènes suite à différents stimuli en induisant ou en réprimant l'expression de gènes spécifiques. Cependant, la découverte des miARNs et le potentiel extraordinaire que ces petits ARNs semblaient avoir, a forcé de nombreux groupes à les étudier, ce qui a permis de démontrer que les miARNs avaient la capacité d'une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de l'expression de gènes [115]. Les miARNs constituent donc un mécanisme supplémentaire de la régulation de l'expression des gènes. L'implication des miARNs a ainsi été démontré dans différents processus biologiques importants comme le développement et la prolifération cellulaire [66]. L'implication des miARNs dans des processus biologiques aussi importants suggère que leur propre expression est également régulée de façon stricte. Puisque les miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II [75], leur expression peut être régulée en partie par des facteurs de transcription. Ceci laisse entrevoir la possibilité de l'existence de boucles de régulation entre certains facteurs de transcription et les miARNs.

Pour notre part, nous démontrons l'existence d'une boucle de régulation entre les facteurs de transcription E2F1-3 et des miARNs du cluster *miR-17-92*. En effet, ces trois facteurs de transcription sont ciblés par le miARN miR-20a et ces mêmes facteurs de transcription peuvent induire l'expression du cluster.

La régulation de l'expression du facteur de transcription E2F1 par les miARNs miR-17-5p et miR-20a du cluster *miR-17-92* a récemment été démontrée [65]. Cependant, ces miARNs peuvent également cibler les facteurs de transcription E2F2 et E2F3, puisqu'on retrouve des sites de liaison pour ces miARNs dans le 3'UTR des ARNm de ces facteurs. Dans le 3'UTR de l'ARNm de *E2F2*, on retrouve 3 sites de liaison pour miR-17-5p et miR-20a et dans le 3'UTR de l'ARNm de *E2F3* on retrouve un site de liaison. Les 3'UTR de ces trois facteurs de transcription ont donc été clonés dans un plasmide rapporteur exprimant la luciférase et ces constructions ont ensuite été transfectées dans des cellules HeLa, qui expriment les miARNs du cluster, dont miR-20a. Une diminution de l'expression de la luciférase a été notée avec les trois constructions, signifiant ainsi que miR-20a peut

cibler le 3'UTR des trois facteurs de transcription E2F. Cette diminution de l'expression de la luciférase est causée par l'interaction de miR-20a avec le 3'UTR des trois facteurs de transcription, puisque lorsqu'on mute les sites de liaisons pour miR-20a, ce qui empêche l'interaction miARN:ARNm, l'expression de la luciférase est rétablie. De plus, l'inhibition de miR-20a amène une augmentation du niveau des protéines E2F1 et E2F2, démontrant que miR-20a régule l'expression de *E2F1* mais également de *E2F2* et *E2F3*. Cependant, la régulation de miR-20a semble être moins importante pour *E2F2* et *E2F3* que pour *E2F1*, ce qui peut s'expliquer de deux façons. Premièrement, la présence de sites de liaison pour un miARN dans le 3'UTR d'un ARNm ne signifie pas forcément que ce dernier sera régulé par le miARN en question. L'accès au site de liaison dans le 3'UTR constitue probablement un des facteurs limitants de la régulation par les miARNs. Il faut prendre en considération que la structure secondaire de l'ARNm ne permet pas nécessairement au complexe RISC un accès direct aux sites de liaison du miARN. Ainsi, des sites de liaison de miARN se retrouvant à l'intérieur d'une tige stable ne seront pas facilement accessibles pour le complexe RISC, ce qui diminuera la capacité du miARN à réguler l'expression de cet ARNm. Deuxièmement, la variation de l'importance de la régulation des E2Fs par miR-20a suggère que le niveau de la protéine E2F1 est plus critique et doit donc être soumis à un contrôle plus efficace. Bien que les facteurs de transcription E2F1-3 aient sensiblement les mêmes fonctions, E2F1 est le seul à avoir la capacité d'induire directement l'apoptose [30]. Puisque des niveaux élevés de E2F1 semblent être un élément déclencheur pour l'apoptose dans certains contextes, il est possible que le niveau de E2F1 soit critique pour la survie cellulaire et que la régulation par miR-20a soit plus efficace pour *E2F1* que pour *E2F2* et *E2F3* afin d'éviter qu'un niveau anormalement élevé de E2F1 puisse induire l'apoptose de manière incontrôlée.

4.2 Régulation de l'expression du cluster *miR-17-92* par les E2F1-3

Dans le contexte d'une boucle d'autorégulation entre un miARN et un facteur de transcription, l'expression du miARN doit dépendre entièrement ou en partie du facteur régulé. Dans ce cas, des séquences reconnues par ce facteur de transcription doivent être présentes dans le promoteur du miARN. Dans le promoteur du cluster *miR-17-92* on retrouve quatre sites potentiels de liaison pour les facteurs de transcription E2F. Les quatre

séquences consensus (TTTG/CG/CCGC) sont situées à environ 3kb en amont du site d'initiation de la transcription et permet ainsi aux E2Fs de se lier au promoteur du cluster *miR-17-92*. La démonstration de la régulation de l'expression du cluster par les E2Fs s'est faite en produisant des lignées stables de cellules HeLa exprimant une protéine de fusion inductible au tamoxifène, comprenant un récepteur aux estrogènes (ER) et les protéines E2F1, E2F2 ou E2F3. Les cellules provenant de ces lignées stables ont ensuite été traitées au tamoxifène pendant 6h, pour induire l'expression des protéines de fusion, et suite à cette induction l'ARN total a été isolé. Le niveau d'expression de miR-20a a été mesuré par Northern blot pour chaque lignée stable, ce qui a permis de constater que chez les trois lignées E2F, il y a une augmentation du niveau de miR-20a comparativement à la lignée contrôle, suggérant que les E2F ont la capacité d'induire l'expression de miR-20a. Des essais d'immunoprécipitations de la chromatine ont confirmé que les facteurs de transcription E2F1-3 peuvent se lier au promoteur du cluster, et que l'induction de l'expression du cluster *miR-17-92* par ces facteurs est directe. Présentement, le cluster *miR-17-92* serait sous le contrôle transcriptionnel de c-Myc et des E2F1-3. Il est intéressant de noter que *MYC* peut être activé par les E2F1-3 [141] et qu'inversement, c-Myc peut activer la transcription des *E2F1-3* [142]. Cette situation suggère la présence d'un mécanisme d'autorégulation double où ces facteurs de transcription activent l'expression du cluster *miR-17-92* et en retour, miR-20a, un miARN de ce cluster régule l'expression des facteurs de transcription E2F1-3.

4.3 L'inhibition de miR-20a peut induire l'apoptose dans les cellules PC3

En considérant la possibilité que miR-20a soit impliqué dans un mécanisme de protection de la cellule contre une activité élevée des E2Fs, qui peut induire une prolifération cellulaire menant à la formation de tumeurs ou à la mort cellulaire, une inhibition ou une augmentation de l'activité de miR-20a devrait donc empêcher la cellule de maintenir un niveau adéquat des E2Fs. Les conséquences biologiques de cette dérégulation de l'expression de miR-20a ont été étudiées dans une lignée cellulaire cancéreuse de la prostate (PC3) qui a été utilisée précédemment pour étudier l'apoptose suite à des traitements avec la doxorubicine, un agent pouvant induire des dommages à l'ADN. Un traitement à la doxorubicine chez ces cellules amène une augmentation de l'activité des

E2Fs et entraîne la mort cellulaire par apoptose [145]. L'inhibition de miR-20a chez des cellules PC3 traitées avec la doxorubicine a bel et bien causé une augmentation de l'apoptose. Ce résultat suggère que le contrôle de l'accroissement du niveau de E2F1 par miR-20a, suite à un traitement à la doxorubicine, est nécessaire afin d'éviter une mort cellulaire importante. De plus, les cellules traitées à la doxorubicine où miR-20a a été surexprimé sont moins aptes à entrer en apoptose. Ces résultats montrent que miR-20a peut protéger les cellules contre une entrée hâtive en apoptose et que cette protection passe probablement par un contrôle du niveau de l'expression des E2Fs et plus particulièrement du niveau d'expression de E2F1 en raison de sa capacité à induire l'apoptose.

4.4 Modèle de l'autorégulation entre les facteurs de transcription E2F et miR-20a

Le mécanisme de régulation entre les facteurs de transcription E2F et le miARN miR-20a consiste en un contrôle direct de l'expression des différents protagonistes impliqués dans cette boucle d'autorégulation. En effet, E2F1-3 induisent l'expression du cluster *miR-17-92* grâce à des sites E2Fs dans le promoteur du cluster. De plus, miR-20a régule l'expression des E2Fs en ciblant le 3'UTR de ces facteurs de transcription. Ainsi, les E2Fs peuvent moduler leur expression en régulant l'expression de miARNs pouvant à leur tour réguler l'expression des E2Fs permettant ainsi l'établissement d'une boucle d'autorégulation entre miR-17-5p, miR-20a et les facteurs de transcription E2F (Fig. 7). Cette boucle d'autorégulation aurait pour but de maintenir le niveau des E2Fs en deçà d'un seuil critique permettant à la cellule de croître normalement. Lorsque le niveau des E2Fs se situe à un certain seuil, leur activité contribue à la prolifération cellulaire en favorisant la progression du cycle cellulaire en permettant la transition de la phase G1 à la phase S. Cependant, lorsque le niveau des E2Fs dépasse ce seuil critique, les conséquences biologiques sont sérieuses, car il entraînerait soit une prolifération cellulaire désordonnée, pouvant mener à la formation de tumeur, soit à l'entrée en apoptose (Fig. 8). Dépendamment des conditions dans laquelle se trouve la cellule, la prolifération cellulaire ou l'apoptose sera favorisée. Ainsi, le maintien d'une activité normale des E2Fs serait en partie la responsabilité de miR-20a. Le fait que miR-20a puisse cibler E2F1, E2F2 et E2F3 n'est pas futile car, durant la progression du cycle cellulaire, l'expression des E2Fs peut être importante à certains moments. De plus, ces facteurs ont la capacité de réguler positivement leur propre expression, il y a donc une possibilité que le seuil critique d'expression des E2Fs soit dépassé durant la transition de la phase G1/S, moment où leur activité est la plus forte.

Figure 7 : Mécanisme d'autorégulation entre les facteurs de transcription E2F, MYC et le miARN miR-20a.

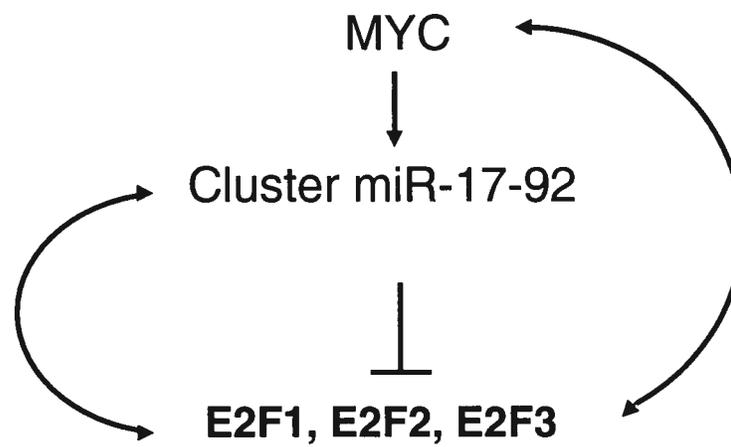
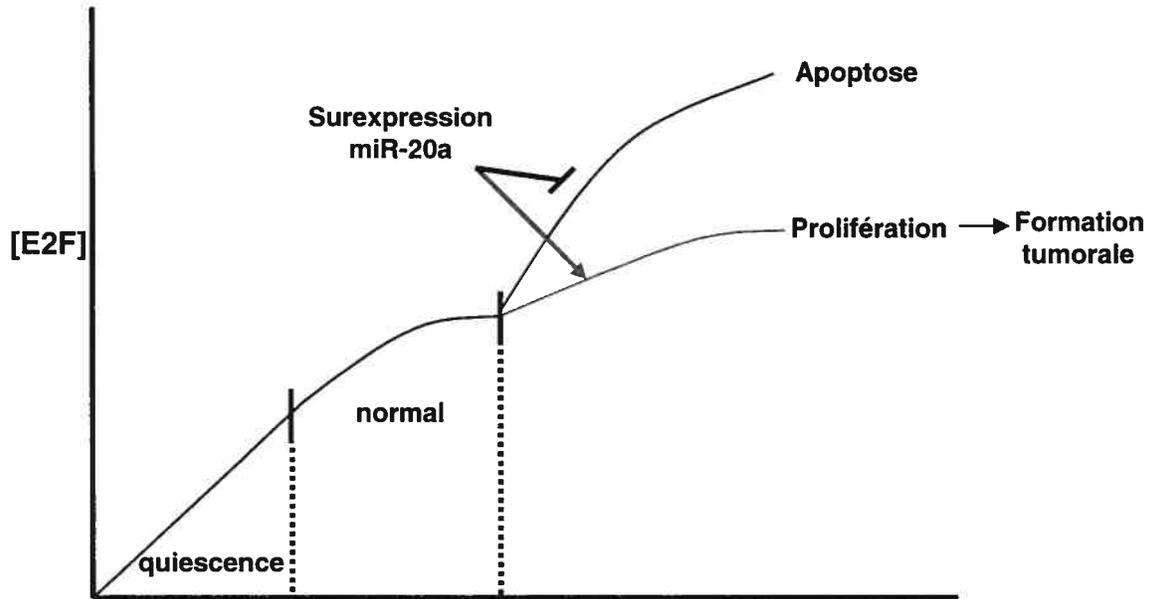


Figure 8 : Les fonctions des E2Fs dépendent de leur niveau d'expression.



4.5 Implication du cluster *miR-17-92* dans le cancer

L'implication des miARNs dans le développement du cancer a été démontrée dans de nombreuses études. Certains de ces miARNs ont un pouvoir anti-tumoral tandis que d'autres ont un pouvoir oncogénique. Le miARN let-7 est considéré comme un répresseur de tumeurs puisqu'une surexpression de ce miARN réduit la prolifération cellulaire dans le cancer du poumon et son expression est souvent réduite dans ce type de cancer [132]. La confirmation de let-7 comme facteur anti-tumoral a ensuite été renforcée avec l'identification de *RAS* comme cible de let-7 [133]. Par contre, d'autres miARNs ont un rôle oncogénique comme dans le cas des miARNs du cluster *miR-17-92*. L'amplification et la surexpression des miARNs du cluster au locus 13q31.3 ont récemment été montrées dans les lymphomes de cellules B [138] et dans les cancers du poumon [140]. De plus, une surexpression du cluster accélère le développement du lymphome des cellules B chez la souris en réduisant l'apoptose [138]. Cependant, comme nous l'avons montré, l'utilisation d'oligonucléotides antisens contre miR-20a induit l'apoptose dans les cellules HeLa tout comme l'utilisation d'oligonucléotides antisens contre miR-17-5p et miR-20a induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses de poumon [146]. L'expression du cluster *miR-17-92* pourrait donc éviter à la cellule d'entrer en apoptose et induirait plutôt la prolifération cellulaire. Cette capacité à induire la prolifération cellulaire en diminuant l'apoptose pourrait s'expliquer en identifiant les cibles des miARNs du cluster. Certains miARNs du cluster, et plus particulièrement miR-17-5p et miR-20a, ont probablement pour cibles outre les facteurs de transcription E2F, des facteurs pro-apoptotiques [146], ce qui expliquerait qu'une surexpression du cluster *miR-17-92* puisse induire de façon aussi marquée la prolifération cellulaire et le développement de tumeurs. Ce sont possiblement les microARNs miR-17-5p et miR-20a qui ont la plus grande capacité d'induire la croissance cellulaire puisque leur inhibition entraîne la plus forte induction d'apoptose comparativement aux autres miARNs du cluster [146]. La fonction oncogénique du cluster *miR-17-92* explique probablement en grande partie sa participation à un mécanisme d'autorégulation qui assure une régulation stricte de l'expression de ce cluster.

4.6 Autres mécanismes de régulation entre facteurs de transcription et miARNs

Il existe d'autres mécanismes d'autorégulation impliquant des facteurs de transcription et des miARNs, qui sont notamment impliqués dans le développement ou la différenciation cellulaire. Ces mécanismes sont cependant beaucoup plus complexes que le mécanisme d'autorégulation entre les facteurs E2F et le miARN miR-20a, probablement à cause de leurs fonctions régulatrices durant le développement. Un mécanisme d'autorégulation impliquant des miARNs et des facteurs de transcription est également présent chez *C. elegans*. Ce mécanisme d'autorégulation est à l'origine de l'établissement d'une asymétrie gauche-droite notamment pour le système gustatif des nématodes (Fig. 9). Les deux principaux neurones du système gustatif de *C. elegans*, ASEL et ASER, situés respectivement à gauche et à droite du vers, expriment de façon distincte plusieurs chemorécepteurs qui sont nécessaires pour l'orientation du vers lors de ses déplacements [147]. Cette asymétrie est obtenue grâce à l'expression exclusive du côté droit de l'animal d'un miARN, miR-273 qui régule l'expression d'une série de gènes impliqués dans la régulation de l'expression des chemorécepteurs spécifiques aux ASER [148]. L'absence de miR-273 du côté gauche de l'animal permettra ainsi l'expression de gènes impliqués dans l'expression des chemorécepteurs propres aux ASEL. miR-273 régule négativement l'expression de *die-1* qui code pour un facteur de transcription qui est responsable d'induire l'expression du miARN *lxy-6* [148]. *die-1* et *lxy-6* font tous deux partie de la cascade de régulation qui est responsable de l'établissement de l'asymétrie du système gustatif. En effet, *lxy-6* régule l'expression de *cog-1*, un facteur de transcription qui inhibe entre autre l'expression de *gcy-7* et *lim-6* qui sont spécifiques aux ASEL [149]. Finalement, le facteur de transcription *cog-1* induit l'expression de miR-273, ce qui fait en sorte que *lxy-6* et miR-273 sont impliqués dans une double boucle d'autorégulation négative déterminant le sort des neurones ASE chez *C. elegans* [149] (Fig. 10).

Les mécanismes d'autorégulation impliquant miR-223 et miR-273 démontrent que les miARNs peuvent réguler indirectement leur propre expression en ciblant des facteurs de transcription. Cette situation suggère que le niveau des miARNs influence grandement leur activité et que leur expression est régulée de façon complexe. Le mécanisme d'autorégulation impliquant miR-273 démontre aussi que certains miARNs ont la possibilité d'avoir un effet de type «tout ou rien» en inhibant presque totalement

l'expression d'un gène. En effet, il faut prendre en considération que certains miARNs peuvent agir différemment par rapport à la plupart des miARNs chez les métazoaires, qui eux agissent comme des régulateurs subtils de l'expression des gènes.

Figure 9 : Cascade de régulation établissant l'asymétrie du système gustatif chez *C. elegans* (Tiré de Johnston et al. 2005) [149].

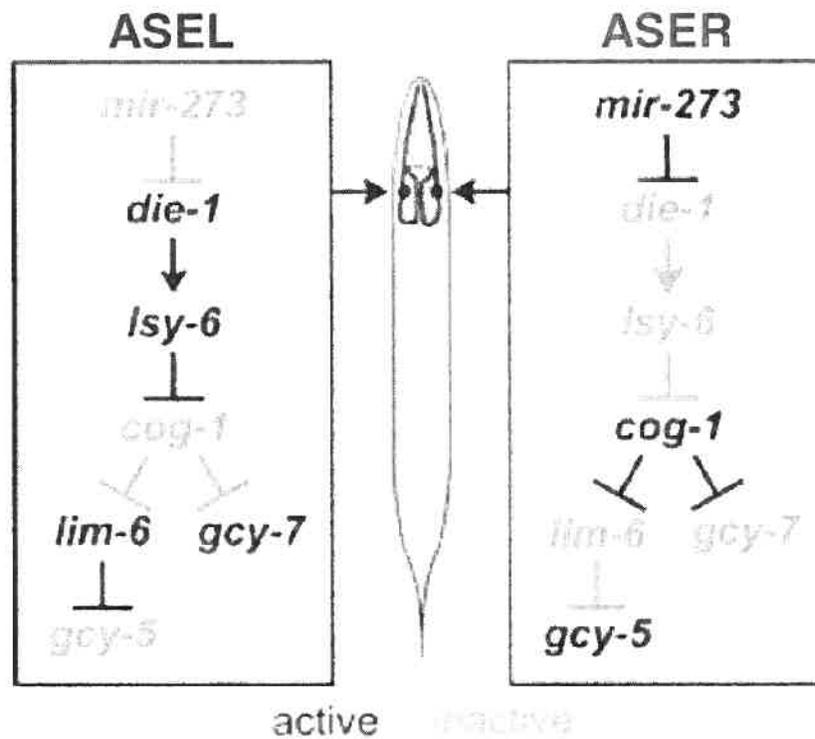
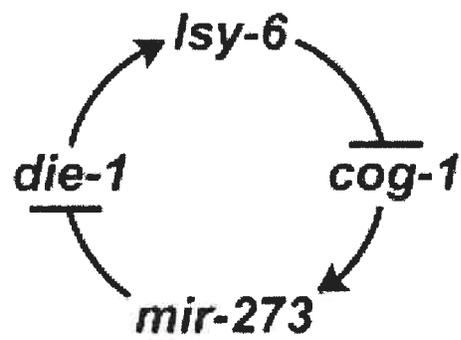


Figure 10 : Les miARNs *lsy-6* et *mir-273* sont impliqués dans une double boucle d'autorégulation négative (Tiré de Johnston et al. 2005) [149].



4.7 Parallèle d'action entre les facteurs de transcription et les miARNs

Les gènes sont activés ou inhibés par des facteurs *trans*-régulateurs qui se lient à des éléments *cis*-régulateurs situés dans leur promoteur permettant une régulation spécifique des gènes dans un type cellulaire particulier. La diversité des éléments *cis*-régulateurs et la disponibilité des éléments *trans*-régulateurs sont responsables en grande partie de la diversité et la complexité des tissus d'un organisme [150].

Les miARNs qui se lient dans le 3'UTR des ARNm agissent comme les facteurs de transcription se liant aux éléments régulateurs des promoteurs. Une similarité d'action entre les facteurs de transcription et les miARNs peut donc être établie. Cependant, cette similitude va au-delà du mode de régulation de ces deux types de *trans*-régulateurs [150]. Bien que l'action des facteurs de transcription sur l'expression des gènes ait rarement un effet de «tout ou rien», ils agissent comme des adaptateurs on/off qui déterminent l'ensemble des gènes qui seront exprimés durant les différentes étapes du développement.

Les miARNs peuvent également agir comme des adaptateurs on/off déterminant l'expression de gènes dans des types cellulaires spécifiques. En effet, chez *C. elegans*, la présence du miARN miR-273 dans certaines cellules est suffisante pour induire la différenciation de ces cellules. miR-273 agit comme un régulateur en amont d'une cascade de régulation [149].

Les programmes de développement nécessitent souvent plusieurs niveaux de régulation où les facteurs de transcription sont impliqués dans des cascades et des boucles d'autorégulation. Les miARNs et les facteurs de transcription fonctionnent en relation étroite dans ces mécanismes de régulation car d'une part les miARNs sont régulés par les facteurs de transcription de façon stricte, et d'autre part les miARNs ont la propension à réguler l'expression de facteurs de transcription [150].

L'exemple le plus marquant de cette interaction entre les facteurs de transcription et les miARNs, et l'importance de ces interactions, se retrouve chez *C. elegans*. Comme mentionné plus haut, les miARNs *lxy-6* et miR-273 régulent les facteurs de transcription *cog-1* et *die-1* respectivement, et participent à une double boucle d'autorégulation [149].

L'action combinatoire est un autre aspect que les miARNs et les facteurs de transcription ont en commun. En effet, tout comme les promoteurs qui contiennent plusieurs éléments

cis-régulateurs qui peuvent être liés par plusieurs facteurs de transcription, les 3'UTR de plusieurs ARNm contiennent des sites qui peuvent être liés par différents miARNs [66].

La présence de plusieurs éléments *cis*-régulateurs peut être une indication que différents *trans*-régulateurs peuvent occuper ces éléments dans différents types cellulaires, ce qui est le cas lors de la régulation transcriptionnelle. De plus, la présence de plusieurs éléments *cis*-régulateurs peut être une indication du niveau de complexité du mécanisme de régulation, puisqu'un nombre important d'éléments régulateurs dans le promoteur d'un gène suggère que la présence de nombreux facteurs est nécessaire pour la régulation de l'expression de ce gène.

Finalement, la coopération entre miARNs pour réguler l'expression d'un gène est un autre aspect qui permet un rapprochement avec les facteurs de transcription. Dans certains promoteurs, on retrouve parfois plusieurs sites de liaison pour un même facteur de transcription. La présence de plusieurs sites pouvant être lié par un même facteur augmenterait la réponse d'induction par ce facteur [150]. On retrouve également dans plusieurs 3'UTR plusieurs sites de liaison pour un même miARN, comme par exemple *lin-14* qui contient plusieurs sites de liaison pour *let-7* [69]. La présence de plusieurs sites de liaison dans un 3'UTR pour un même miARN augmenterait le pouvoir régulateur de l'expression d'un gène par ce même miARN [66].

Cependant, la similitude d'action entre les facteurs de transcription et les miARNs ne signifie pas qu'ils sont semblables à tout point de vue, car certaines caractéristiques sont propres à chacun. Contrairement aux miARNs, dont la fonction est essentiellement de supprimer ou d'atténuer l'expression de gènes, les facteurs de transcription peuvent être des activateurs ou des répresseur de l'expression de gènes [1]. L'interaction des facteurs de transcription avec certains co-facteurs permet de moduler leurs fonctions et de leur donner une spécificité d'action dépendamment des protéines qui interagissent avec eux. L'emplacement des sites de fixation pour les facteurs de transcription et les miARNs est une autre caractéristique qui les différencie. Les facteurs de transcription peuvent se lier à des sites qui se retrouvent à proximité du site d'initiation ou à plusieurs kilobases de ce site notamment dans le cas des «enhancers» [1]. On peut donc retrouver des sites de fixation pour des facteurs de transcription dans des régions de l'ADN qui varient grandement et qui ne font pas partie du promoteur d'un gène. Par contre, les sites reconnus par des miARNs

sont présents seulement dans le 3'UTR des ARNm. L'exclusivité de la présence de ces sites dans le 3'UTR des ARNm pourrait s'expliquer par le fait que la reconnaissance de la cible d'un miARN ce fait principalement grâce à une séquence comprenant 7 nucléotides. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'interaction miARN:ARNm dépend principalement d'une complémentarité entre la région 5' du miARN (2^e -8^e nucléotide) et une région dans le 3'UTR de l'ARNm ciblé [105]. Puisqu'une séquence de 7 nucléotides ne confère pas une grande spécificité aux miARNs envers leur cible, la réduction des régions potentiellement ciblées par les miARNs résulterait donc en une augmentation de la spécificité des miARNs pour leur cible. De plus, le 3'UTR de certains ARNm contient des séquences pouvant être liées par des répresseurs de la traduction qui empêche l'interaction entre la coiffe en 5' et la queue de poly-A en 3', réduisant ainsi l'efficacité de la traduction [1]. Puisque le 3'UTR est une région qui en quelque sorte, régule l'efficacité de la traduction, il n'est donc pas étonnant que ce soit cette région de l'ARNm qui possède des sites pouvant être liés par des miARNs.

La présence d'éléments *cis*-régulateurs au promoteur et la présence de facteurs *trans*-régulateurs (facteurs de transcription et miARNs), qui peuvent être spécifiques à un type cellulaire donné, contribue à une régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes. Les facteurs de transcription et les miARNs déterminent donc en partie les gènes qui seront exprimés dans un type cellulaire particuliers. La fonction similaire que partagent les facteurs de transcription et les miARNs fait en sorte que la cellule dispose d'un second niveau de régulation de l'expression génique. Les mécanismes de régulation de l'expression de gènes dans lesquels sont impliqués les facteurs de transcription et les miARNs permettent donc la diversité cellulaire dans un organisme.

5. Conclusion

Nous avons montré que le miARN miR-20a du cluster *miR-17-92* cible l'ARNm des facteurs de transcription E2F1-3 et régule ainsi leur activité. Nous montrons également que les facteurs de transcription E2F1-3 activent la transcription du cluster *miR-17-92* en liant directement au promoteur du cluster ce qui suggère l'existence d'un mécanisme d'autorégulation entre les facteurs de transcription E2F et les miARNs du cluster *miR-17-92*. Ce mécanisme d'autorégulation semble être destiné à maintenir le niveau des E2Fs, et plus particulièrement le niveau de E2F1, sous une certaine limite critique. En effet, E2F1 semble être ciblé beaucoup plus efficacement par miR-20a, par rapport à E2F2 et E2F3, ce qui suggère qu'il est important pour la cellule de garder le niveau de E2F1 en deçà d'une certaine limite. En effet, il semble que dans certains cas, lorsque l'expression de E2F1 dépasse une certaine limite, le niveau excessif de la protéine, puisse induire l'apoptose. L'action de miR-20a servirait donc de tampon pour maintenir l'activité de E2F1 en équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose.

6. Références

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of the cell*, ed. G. Science. 2002.
2. DeGregori, J., et al., *Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7245-50.
3. Wu, L., et al., *The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation*. Nature, 2001. **414**(6862): p. 457-62.
4. Lukas, J., et al., *Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1047-57.
5. Muller, H., et al., *Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(9): p. 5508-20.
6. Lindeman, G.J., et al., *A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting*. Genes Dev, 1998. **12**(8): p. 1092-8.
7. Ogawa, H., et al., *A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells*. Science, 2002. **296**(5570): p. 1132-6.
8. Christensen, J., et al., *Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(17): p. 5458-70.
9. Verona, R., et al., *E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(12): p. 7268-82.
10. Wu, C.L., et al., *In vivo association of E2F and DP family proteins*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2536-46.
11. Bandara, L.R., et al., *Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F*. Embo J, 1993. **12**(11): p. 4317-24.
12. Krek, W., D.M. Livingston, and S. Shirodkar, *Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members*. Science, 1993. **262**(5139): p. 1557-60.
13. de la Luna, S., et al., *Nuclear accumulation of the E2F heterodimer regulated by subunit composition and alternative splicing of a nuclear localization signal*. J Cell Sci, 1996. **109** (Pt 10): p. 2443-52.
14. Helin, K., E. Harlow, and A. Fattaey, *Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6501-8.
15. Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2245-62.
16. Morkel, M., et al., *An E2F-like repressor of transcription*. Nature, 1997. **390**(6660): p. 567-8.
17. Ross, J.F., X. Liu, and B.D. Dynlacht, *Mechanism of transcriptional repression of E2F by the retinoblastoma tumor suppressor protein*. Mol Cell, 1999. **3**(2): p. 195-205.
18. Kingston, R.E. and G.J. Narlikar, *ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity*. Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2339-52.
19. Martinez-Balbas, M.A., et al., *Regulation of E2F1 activity by acetylation*. Embo J, 2000. **19**(4): p. 662-71.

20. Johnson, D.G., et al., *Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase*. Nature, 1993. **365**(6444): p. 349-52.
21. Qin, X.Q., et al., *The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(2): p. 742-55.
22. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.
23. Harbour, J.W., et al., *Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1*. Cell, 1999. **98**(6): p. 859-69.
24. Zhang, H.S., et al., *Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF*. Cell, 2000. **101**(1): p. 79-89.
25. Dimova, D.K. and N.J. Dyson, *The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2810-26.
26. Hannon, G.J., D. Casso, and D. Beach, *KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1731-5.
27. Duronio, R.J., et al., *The transcription factor E2F is required for S phase during Drosophila embryogenesis*. Genes Dev, 1995. **9**(12): p. 1445-55.
28. Dimova, D.K., et al., *Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the Drosophila E2F/RB pathway*. Genes Dev, 2003. **17**(18): p. 2308-20.
29. DeGregori, J., *The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1602**(2): p. 131-50.
30. Ginsberg, D., *E2F1 pathways to apoptosis*. FEBS Lett, 2002. **529**(1): p. 122-5.
31. Yamasaki, L., et al., *Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1*. Cell, 1996. **85**(4): p. 537-48.
32. Pruschy, M., et al., *E2F-1 has properties of a radiosensitizer and its regulation by cyclin A kinase is required for cell survival of fibrosarcoma cells lacking p53*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(3): p. 141-6.
33. Meng, R.D., P. Phillips, and W.S. El-Deiry, *p53-independent increase in E2F-1 expression enhances the cytotoxic effects of etoposide and of adriamycin*. Int J Oncol, 1999. **14**(1): p. 5-14.
34. Blattner, C., A. Sparks, and D. Lane, *Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3704-13.
35. Lin, W.C., F.T. Lin, and J.R. Nevins, *Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation*. Genes Dev, 2001. **15**(14): p. 1833-44.
36. Stevens, C., L. Smith, and N.B. La Thangue, *Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 401-9.
37. Powers, J.T., et al., *E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(4): p. 203-14.
38. Ianari, A., et al., *Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30830-5.
39. de Stanchina, E., et al., *E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2434-42.

40. Bates, S., et al., *p14ARF links the tumour suppressors RB and p53*. Nature, 1998. **395**(6698): p. 124-5.
41. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
42. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 296-9.
43. Pomerantz, J., et al., *The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53*. Cell, 1998. **92**(6): p. 713-23.
44. Irwin, M., et al., *Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis*. Nature, 2000. **407**(6804): p. 645-8.
45. Yang, A. and F. McKeon, *P63 and P73: P53 mimics, menaces and more*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 199-207.
46. Balint, E., S. Bates, and K.H. Vousden, *Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation*. Oncogene, 1999. **18**(27): p. 3923-9.
47. Chen, G. and D.V. Goeddel, *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1634-5.
48. Moroni, M.C., et al., *Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(6): p. 552-8.
49. Cain, K., S.B. Bratton, and G.M. Cohen, *The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex*. Biochimie, 2002. **84**(2-3): p. 203-14.
50. Hofferer, M., et al., *Increased levels of E2F-1-dependent DNA binding activity after UV- or gamma-irradiation*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(2): p. 491-5.
51. O'Connor, D.J. and X. Lu, *Stress signals induce transcriptionally inactive E2F-1 independently of p53 and Rb*. Oncogene, 2000. **19**(20): p. 2369-76.
52. Bartek, J. and J. Lukas, *Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer*. Cancer Cell, 2003. **3**(5): p. 421-9.
53. Loughran, O. and N.B. La Thangue, *Apoptotic and growth-promoting activity of E2F modulated by MDM2*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(6): p. 2186-97.
54. Polager, S., et al., *E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis*. Oncogene, 2002. **21**(3): p. 437-46.
55. Krek, W., et al., *Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase*. Cell, 1994. **78**(1): p. 161-72.
56. Dynlacht, B.D., et al., *Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes*. Genes Dev, 1994. **8**(15): p. 1772-86.
57. Kitagawa, M., et al., *Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2*. Oncogene, 1995. **10**(2): p. 229-36.
58. Krek, W., G. Xu, and D.M. Livingston, *Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1149-58.
59. Magnaghi-Jaulin, L., et al., *Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 601-5.
60. Luo, R.X., A.A. Postigo, and D.C. Dean, *Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription*. Cell, 1998. **92**(4): p. 463-73.
61. Brehm, A., et al., *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 597-601.

62. Trouche, D., A. Cook, and T. Kouzarides, *The CBP co-activator stimulates E2F1/DPI activity*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(21): p. 4139-45.
63. Ogryzko, V.V., et al., *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases*. Cell, 1996. **87**(5): p. 953-9.
64. Campanero, M.R. and E.K. Flemington, *Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2221-6.
65. O'Donnell, K.A., et al., *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 839-43.
66. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
67. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. Plant Cell, 1990. **2**(4): p. 279-289.
68. Jorgensen, R., *Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes*. Trends Biotechnol, 1990. **8**(12): p. 340-4.
69. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
70. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
71. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
72. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
73. Mourelatos, Z., et al., *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. Genes Dev, 2002. **16**(6): p. 720-8.
74. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. Embo J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
75. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. Embo J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
76. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. Rna, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
77. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 376-85.
78. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
79. Filippov, V., et al., *A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes*. Gene, 2000. **245**(1): p. 213-21.
80. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
81. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
82. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.

83. Landthaler, M., A. Yalcin, and T. Tuschl, *The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis*. *Curr Biol*, 2004. **14**(23): p. 2162-7.
84. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells*. *Rna*, 2003. **9**(1): p. 112-23.
85. Zeng, Y., R. Yi, and B.R. Cullen, *Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha*. *Embo J*, 2005. **24**(1): p. 138-48.
86. Wu, H., et al., *Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(47): p. 36957-65.
87. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
88. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. *Genes Dev*, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
89. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(16): p. 4776-85.
90. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
91. Grishok, A., et al., *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing*. *Cell*, 2001. **106**(1): p. 23-34.
92. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. *Science*, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
93. Ma, J.B., K. Ye, and D.J. Patel, *Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain*. *Nature*, 2004. **429**(6989): p. 318-22.
94. Lingel, A., et al., *Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(6): p. 576-7.
95. Hammond, S.M., et al., *Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1146-50.
96. Song, J.J., et al., *Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity*. *Science*, 2004. **305**(5689): p. 1434-7.
97. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. *Science*, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
98. Meister, G., et al., *Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs*. *Mol Cell*, 2004. **15**(2): p. 185-97.
99. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. *Cell*, 2003. **115**(2): p. 199-208.
100. Khvorovova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. *Cell*, 2003. **115**(2): p. 209-16.
101. Carmell, M.A., et al., *The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis*. *Genes Dev*, 2002. **16**(21): p. 2733-42.
102. Lingel, A. and M. Sattler, *Novel modes of protein-RNA recognition in the RNAi pathway*. *Curr Opin Struct Biol*, 2005. **15**(1): p. 107-15.
103. Okamura, K., et al., *Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways*. *Genes Dev*, 2004. **18**(14): p. 1655-66.

104. Caudy, A.A., et al., *Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery*. Genes Dev, 2002. **16**(19): p. 2491-6.
105. Doench, J.G. and P.A. Sharp, *Specificity of microRNA target selection in translational repression*. Genes Dev, 2004. **18**(5): p. 504-11.
106. Rhoades, M.W., et al., *Prediction of plant microRNA targets*. Cell, 2002. **110**(4): p. 513-20.
107. Llave, C., et al., *Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2053-6.
108. Yekta, S., I.H. Shih, and D.P. Bartel, *MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA*. Science, 2004. **304**(5670): p. 594-6.
109. Chen, X., *A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2022-5.
110. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
111. Pillai, R.S., et al., *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1573-6.
112. Bartel, D.P. and C.Z. Chen, *Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(5): p. 396-400.
113. Sen, G.L. and H.M. Blau, *Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(6): p. 633-6.
114. Teixeira, D., et al., *Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs*. Rna, 2005. **11**(4): p. 371-82.
115. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.
116. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol, 1999. **216**(2): p. 671-80.
117. Seggerson, K., L. Tang, and E.G. Moss, *Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation*. Dev Biol, 2002. **243**(2): p. 215-25.
118. Hornstein, E., et al., *The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 671-4.
119. Aboobaker, A.A., et al., *Drosophila microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18017-22.
120. Sokol, N.S. and V. Ambros, *Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth*. Genes Dev, 2005. **19**(19): p. 2343-54.
121. Zhao, Y., E. Samal, and D. Srivastava, *Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis*. Nature, 2005. **436**(7048): p. 214-20.
122. Chen, J.F., et al., *The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation*. Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 228-33.

123. Naguibneva, I., et al., *The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(3): p. 278-84.
124. Wienholds, E., et al., *MicroRNA expression in zebrafish embryonic development*. Science, 2005. **309**(5732): p. 310-1.
125. Kim, J., et al., *Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 360-5.
126. Smirnova, L., et al., *Regulation of miRNA expression during neural cell specification*. Eur J Neurosci, 2005. **21**(6): p. 1469-77.
127. Conaco, C., et al., *Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2422-7.
128. Schrott, G.M., et al., *A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development*. Nature, 2006. **439**(7074): p. 283-9.
129. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
130. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
131. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
132. Takamizawa, J., et al., *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3753-6.
133. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
134. Pelengaris, S., M. Khan, and G.I. Evan, *Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression*. Cell, 2002. **109**(3): p. 321-34.
135. Eis, P.S., et al., *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3627-32.
136. Kluiver, J., et al., *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas*. J Pathol, 2005. **207**(2): p. 243-9.
137. van den Berg, A., et al., *High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **37**(1): p. 20-8.
138. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
139. Calin, G.A., et al., *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11755-60.
140. Hayashita, Y., et al., *A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation*. Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 9628-32.
141. Thalmeier, K., et al., *Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter*. Genes Dev, 1989. **3**(4): p. 527-36.
142. Leone, G., et al., *Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 422-6.

143. Trimarchi, J.M. and J.A. Lees, *Sibling rivalry in the E2F family*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(1): p. 11-20.
144. Johnson, D.G., K. Ohtani, and J.R. Nevins, *Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression*. Genes Dev, 1994. **8**(13): p. 1514-25.
145. Mukhopadhyay, U.K., A.M. Senderowicz, and G. Ferbeyre, *RNA silencing of checkpoint regulators sensitizes p53-defective prostate cancer cells to chemotherapy while sparing normal cells*. Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2872-81.
146. Matsubara, H., et al., *Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92*. Oncogene, 2007.
147. Yu, S., et al., *Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3384-7.
148. Chang, S., et al., *MicroRNAs act sequentially and asymmetrically to control chemosensory laterality in the nematode*. Nature, 2004. **430**(7001): p. 785-9.
149. Johnston, R.J., Jr., et al., *MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12449-54.
150. Hobert, O., *Common logic of transcription factor and microRNA action*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(9): p. 462-8.

