Etude fonctionnelle de la voie micro-ARN dans la biologie des cellules tumorales

Delphine Peric

▶ **To cite this version:**

Delphine Peric. Etude fonctionnelle de la voie micro-ARN dans la biologie des cellules tumorales. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112328 . tel-00656609

HAL Id: tel-00656609
https://theses.hal.science/tel-00656609

Submitted on 4 Jan 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE : Gènes, Génomes, Cellules
Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, CEA, Fontenay-aux-Roses

DISCIPLINE : Biologie cellulaire et moléculaire

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue publiquement le 15 Décembre 2011

par

Delphine PERIC

Etude fonctionnelle de la voie micro-ARN dans la biologie des cellules tumorales

Composition du jury :

Président du jury :	Dr Pierre LEGRAIN
Rapporteurs :	Dr Stephan VAGNER
	Dr Christophe ANTONIEWSKI
Examinateurs :	Dr Christine BALDESCHI
	Pr Jean FEUNTEUN
Directeur de thèse :	Dr Germain ROUSSELET

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour l'interêt qu'ils ont porté à ce travail. Je souhaite remercier le Dr Pierre Legrain de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je remercie tout particulièrement le Dr Stephan Vagner et le Dr Christophe Antoniewski d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le Dr Christine Baldeschi et le Pr Jean Feunteun d'avoir accepté d'être examinateurs de mon travail.

Je souhaite adresser mes remerciements au CEA et au programme Irtelis pour avoir financé cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Jaime Angulo-Mora pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité. Je le remercie pour sa bonne humeur, sa générosité, et ses conseils avisés. Je lui souhaite une très bonne continuation vers de nouveaux horizons.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Germain Rousselet. Je tiens à le remercier pour les discussions scientifiques (et non scientifiques) enrichissantes échangées, pour le temps qu'il m'a consacré, pour m'avoir transmis ses connaissances techniques, son esprit d'analyse critique et sa rigueur scientifique. Je le remercie surtout pour sa grande disponibilité, sa patience à toute épreuve, pour m'avoir fait confiance et encouragée dans les moments de doute, pour son ouverture d'esprit en général. J'ai beaucoup appris à ses côtés.

Je remercie bien sûr tous les autres membres du LGR pour l'esprit de bonne humeur et la convivialité qui a régné dans ce labo, nous ne sommes pas très nombreux donc le tour sera rapide, mais ce qui compte ce n'est pas la quantité c'est la qualité. Je remercie Emilie pour le petit mois passé en sa compagnie et pour m'avoir passé le flambeau. Je souhaite remercier Katerina, qui m'a beaucoup appris la première année et qui est restée une amie (ça a été dur de rester la seule fille du labo après son départ !). Pour ces trois bonnes années passées avec eux, un grand merci à Philippe, à Oscar, et bien sûr merci à Laurent, mon colocataire de bureau, merci pour toutes les discussions et bons moments partagés. Je leur souhaite à tous bonne chance pour la suite.

Heureusement que les bons et les mauvais moments d'une thèse peuvent être partagés avec ceux qui nous comprennent, à savoir ceux qui font (ou ont fait) eux-mêmes une thèse. J'adresse donc un grand merci au petit groupe qui s'est formé pour partager des déjeuners de « thésards », de bonnes

petites soirées, et la pause désormais institutionnalisée de 16h30 qui m'aura permis de survivre ces derniers mois. Merci donc à Laure, Benoît, Thierry, Julie, Laurent, Sandrine, Mathieu…
Merci à Eléa. Merci à Emilie et Zhou pour leur amitié au-delà des murs du CEA.

Durant ces trois années de thèse, j'ai croisé de nombreuses autres personnes au sein de l'institut avec qui j'ai eu des échanges amicaux. Je pense à Pierre, Virginie, Bruno, Luis, Sylvie, Jérôme, Luc, Marion, Muriel, Aurélie, Anieschka… et j'en oublie surement beaucoup, qu'elles m'en excusent. Je les remercie toutes pour leur sympathie et leur gentillesse.

Je remercie tous mes amis pour les moments partagés en dehors de la thèse, pour leur amitié depuis de nombreuses années et leur soutien. Une pensée particulière pour Myriam avec qui j'aurais beaucoup échangé sur cette épreuve qu'est la thèse.

Enfin, un grand merci à ma famille pour leur soutien au quotidien. Merci à ma petite soeur. Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes choix.

A mes grand-parents

SOMMAIRE

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX 8

LISTE DES ABBREVIATIONS 10

INTRODUCTION 13

I. LA VOIE MICRO-ARN 13

I.1 L'interférence ARN 13

I.1.1 Origines et découverte de l'interférence ARN 13

I.1.2 Identification des siRNAs, intermédiaires de l'interférence ARN 14

I.1.3 La voie siRNA 15

I.1.4 Découverte des micro-ARNs 17

I.1.5 Origine et évolution des micro-ARNs 19

I.2 Biogenèse des micro-ARNs 20

I.2.1 Organisation génomique et transcription 20

I.2.1.1 Organisation génomique 20

I.2.1.2 Transcription 21

I.2.2 Maturation dans le noyau et export dans le cytosplasme 22

I.2.2.1 Voie canonique : clivage du pri-miRNA par le microprocesseur 22

I.2.2.2 Régulation de l'activité du microprocesseur 25

I.2.2.3 Auto-régulation croisée entre Drosha et DGCR8 26

I.2.2.4 Un processus co-transcriptionnel 27

I.2.2.5 Mirtrons 27

I.2.2.6 Export dans le cytoplasme 28

I.2.3 Maturation du pre-miRNA et formation du complexe RISC 28

I.2.3.1 Maturation du pre-miRNA 28

I.2.3.2 Le(s) complexe(s) RISC 29

I.3 Modes d'actions 34

I.3.1 Appariement à l'ARNm cible 34

I.3.1.1 Règles classiques d'appariement 34

I.3.1.2 Discussion des règles d'appariement 37

I.3.1.3 Conséquences 39

I.3.2 Modes de régulation de l'expression de la cible 40

I.3.2.1 GW182 et les « corps-P » 40

I.3.2.2 Inhibition de la traduction 41

I.3.2.3 Déadénylation et dégradation de l'ARNm 44
I.3.2.4 Plusieurs mécanismes ? 47
I.3.2.5 Cas particulier : l'activation de la traduction 49
I.4 Rôles biologiques 50
I.4.1 Expression mutuellement exclusive : induction de transitions, sauvegarde et états bistables 50
I.4.2 Co-expression : affinage du niveau d'expression de la cible 53
I.4.3 Maintien des états cellulaires spatio-temporels 54
II. MICRO-ARNS ET CANCER 56
II.1 Profils d'expression des micro-ARNs dans les cancers 56
II.1.1 Profils et signatures d'expression 56
II.1.2 Applications en clinique 64
II.2 Perturbation globale de la voie micro-ARN dans les cancers 66
II.2.1 Diminution de la majorité des micro-ARNs 66
II.2.2 Anomalies d'expression d'acteurs de la voie de biogenèse des micro-ARNs 69
II.2.3 Conséquences fonctionnelles sur la tumorigenèse et la progression tumorale 72
II.3 Micro-ARNs suppresseurs de tumeurs et oncogènes 78
II.3.1 Suppresseurs de tumeurs 78
II.3.1.1 miR-15a~16-1 78
II.3.1.2 let-7 79
II.3.2 Oncogènes (oncomiRs) 81
II.3.2.1 miR-17-92 81
II.3.2.2 miR-155 87
II.3.2.3 miR-21 89
II.3.2.4 miR-372~373 94
OBJECTIFS ET STRATEGIE EXPERIMENTALE 98
I. OBJECTIFS DU PROJET 98
II. STRATEGIE EXPERIMENTALE 98
II.1 Présentation globale de la stratégie utilisée 98
II.2 Utilisation de vecteurs épisomaux dérivés du plasmide EBV 100
II.2.1 Présentation 100
II.2.2 Validation du système expérimental pour l'inhibition de Drosha 102
II.2.2.1 Obtention de populations cellulaires homogènes avec le vecteur épisomal .. 102
II.2.2.2 L'inhibition de Drosha n'affecte pas la maturation des ARN ribosomaux 104

RESULTATS **105**

I. IDENTIFICATION DE CELLULES CANCEREUSES DEPENDANTES DU MICROPROCESSEUR ET CRIBLAGE DE MICRO-ARNS CAPABLES DE SOUTENIR LA PROLIFERATION TUMORALE **105**

I.1 Article I 105

I.2 Résultats additionnels 129

I.2.1 L'inhibition du microprocesseur n'est pas améliorée par l'inhibition concomitante de Drosha et DGCR8 129

I.2.2 PTEN est une cible de la famille miR-20 130

II. MISE EN PLACE D'UN SYSTEME INDUCTIBLE POUR L'INHIBITION DE DROSHA **131**

II.1 Intérêt 131

II.2 Matériel et méthodes 132

II.2.1 Plasmides et production des particules lentivirales 132

II.2.2 Transduction cellulaire et établissement de lignées stables 132

II.3 Résultats préliminaires 133

II.3.1 Validation de la fonctionnalité du système inductible 133

II.3.2 Effets de l'inhibition de Drosha sur la capacité des cellules dépendantes du microprocesseur à former des colonies 135

III. MODIFICATIONS PROTEOMIQUES INDUITES PAR L'INHIBITION DU MICROPROCESSEUR (ARTICLE II) **137**

DISCUSSION **169**

I. APPROCHE DE GENETIQUE MOLECULAIRE DE LA VOIE MICRO-ARN **169**

II. REPONSE A L'INHIBITION DU MICROPROCESSEUR DEPENDANTE DU CONTEXTE CELLULAIRE ET PHENOTYPE COGAM **171**

II.1 La réponse à l'inhibition du microprocesseur dépend du contexte cellulaire 171

II.2 Potentielle implication d'une composante quantitative dans la réponse à l'inhibition du microprocesseur 174

II.3 Autres composantes pouvant intervenir dans le phénotype CoGAM 177

III. IDENTIFICATION DE MICRO-ARNS SOUTENANT INDIVIDUELLEMENT LA PROLIFERATION TUMORALE **179**

IV. CONCLUSION **183**

BIBLIOGRAPHIE **185**

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : La voie siRNA.....16
Figure 2 : Exemples de miRNAs et leurs structures secondaires chez *C. elegans*.....18
Figure 3 : Organisation génomique des pri-miRNAs.....21
Figure 4 : La famille des RNases III.....23
Figure 5 : Clivage du pri-miRNA par le microprocesseur.....25
Figure 6 : Structure de la protéine AGO2 humaine.....30
Figure 7 : La voie miRNA.....33
Figure 8 : Appariements entre miRNAs et ARNm cibles.....36
Figure 9 : Mécanismes possibles de la répression des ARNm cibles induite par les miRNAS.....46
Figure 10 : Exemples de boucles de régulation mutuellement répressives impliquant des miRNAs.....52
Figure 11 : Diminution de la majorité des miRNAs dans les tissus tumoraux.....59
Figure 12 : Organisation du cluster miR-17-92 et de ses paralogues.....82
Figure 13 : Augmentation de l'expression de miR-17-92 dans les lymphomes.....83
Figure 14 : Réseau de cibles régulées par la famille de miRNAs let-7 (suppresseur de tumeur) et le cluster miR-17-92 (oncogène) dans le contexte tumoral.....86
Figure 15: Boucle de régulation entre Ras et miR-21.....92

OBJECTIFS ET STRATEGIE EXPERIMENTALE

Figure 16 : Approche de génétique moléculaire de la voie miRNA.....100
Figure 17 : Utilisation des vecteurs épisomaux dérivés d'EBV pour l'expression de shRNAs et pre-miRNAs.....102
Figure 18 : Inhibition homogène de Drosha avec le vecteur épisomal shDro dans des cellules HeLa.....103
Figure 19 : L'inhibition de Drosha n'affecte pas la maturation des ARNr dans les cellules HeLa.....104

RESULTATS

Figure 20 : Comparaison des efficacités de différents types d'inhibition du microprocesseur .. 129
Figure 21 : Effet du 3'UTR de PTEN sauvage et muté au niveau de sites prédits pour miR-20 sur l'expression d'un gène rapporteur..... 130
Figure 22 : Le traitement à la doxycycline des lignées i-shDro entraine une inhibtion de l'expression de Drosha..... 133
Figure 23 : Le traitement à la doxycycline des lignées inductibles i-shDro entraine une inhibtion de l'expression des miRNAs..... 134
Figure 24 : Effet de l'inhibition de Drosha sur la capacité à former des colonies. 135

DISCUSSION

Figure 25 : Comparaison de nos résultats de complémentation dans les cellules MCF-7 shDro avec ceux dans les cellules ES DGCR8$^{-/-}$ 180

TABLEAUX

Tableau 1 : Etudes de profils d'expression des miRNAs dans les cancers du sein 63
Tableau 2 : Dérégulations de l'expression de Drosha ou Dicer associées aux cancers..... 71

LISTE DES ABBREVIATIONS

Par ordre alphabétique :

AGO : Argonaute

AIN : ALG-1 interacting protein

AP-1 : Activator protein 1

ARE : AU-rich element

ARN : Acide ribonucléique

ARNdb : ARN double brin

ARNm : ARN messager

ARNr : ARN ribosomique

BCL2 : B-cell CLL/lymphoma 2

BIC : B-cell integration cluster

CDK : Cycline-dependent kinase

CDKN1A: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)

cellules ES : cellules souches embryonnaires

ceRNAs : competitive endogenous RNAs

ChiP : immunoprécipitation de la chromatine

C-IT : cellules initiatrices de tumeurs

CoGAM : Colony growth arrest induced by microprocessor inhibition

CREB : CRE-binding protein

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

DGCR8 : DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8

DLEU2 : Deleted in lymphocytic leukemia 2

dsRBD : double-stranded RNA binding domain

EBV : Epstein-Barr virus

EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse

ER : Récepteur aux œstrogènes

ErbB2 : Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (HER2)

FXR1 : Fragile X mental retardation-related protein 1

GRP94 : 94 kDa glucose-regulated protein

GTP : Guanosine triphosphate

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

HBS : Hepes Buffer saline

HCV : Virus de l'hépatite C

HDAC : Histones déacétylases
HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2)
HMGA2 : High mobility group AT-hook 2
hnRNP : Heterogenous nuclear ribonucleoprotein particle
hTERT : Human telomerase reverse transcriptase
HULC : Highly up-regulated in liver cancer
IMS : Instabilité des microsatellites
ING1: Inhibitor of growth family, member 1
iPSC = induced Pluripotent Stem Cells
IRES : Internal ribosome entry site
JAK : Janus Kinase
LATS2 : Large Tumor suppressor homolog 2
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
m7G : 7-methylguanosine
MCM7 : mini-chromosome maintenance 7
MEFs : Mouse embryonic fibroblasts
MET : Transition mésenchyme-épithéliale
miRNA : micro-ARN
miRNP : miRNA-associated ribonucleoprotein complex
MRE : miRNA response element
NRF2 : Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
nt : nucléotide
OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4
ORF : Open reading frame
PAPBC : Poly(A) binding protein, cytoplasmic
PAZ : PIWI-Argonaute-Zwille
pb : paires de base
PDCD4 : Programmed cell death 4
PI3K : Phosphoinositide-3-kinase
PI3KCA : Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PKA : Protein kinase, cAMP-dependent
PKR : Protéine kinase dépendante de l'ARNdb
PR : Récepteur à la progestérone
Pre-miRNA : Précurseur du miRNA
Pri-miRNA : Transcrit primaire du miRNA
PTEN : Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

qRT-PCR : quantitative Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction

RISC : RNA-induced silencing complex

RNAi : interférence ARN

RNU48 : SNORD48 small nucleolar RNA

rpm : tours par minute

RT-PCR : Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction

S.D. : Standard deviation

S.E.M : Standard error of the mean

shCT : shRNA contrôle

shDG : shRNA dirigé contre DGCR8

shDro : shRNA dirigé contre Drosha

shDro^{sp} : shRNA dirigé contre un variant d'épissage rare de Drosha

shRNA : short hairpin RNA

siRNA : short interfering RNA

STAT : Signal transducer and activator of transcription

SV40 : Simian virus 40

TNRC6 : Trinucleotide repeat containing 6

TPM1 : Tropomyosin 1

TRBP : TAR RNA-binding protein

UTR : Untranslated Region

XPO5 : Exportine-5

XRN1 : 5'-3' exoribonuclease 1

INTRODUCTION

Ce travail de thèse a porté sur l'étude du rôle de la voie micro-ARN dans la biologie des cellules tumorales. Les micro-ARNs (miRNAs) sont des ARNs de 20-22 nucléotides, transcrits à partir du génome, qui régulent l'expression de protéines cibles en s'appariant de manière spécifique aux ARN messagers, inhibant ainsi leur traduction ou entrainant leur dégradation. Pour aborder l'hypothèse de départ de cette thèse, à savoir que certaines cellules cancéreuses dépendent de miRNAs pour survivre ou proliférer, nous avons choisi une approche d'inhibition globale de la biogenèse des miRNAs et la complémentation du ou des phénotype(s) observés par l'expression de miRNAs individuels. Pour comprendre les enjeux de cette problématique et le choix de cette démarche expérimentale, il est nécessaire de connaître la voie miRNA en général et les liens qui existent entre miRNAs et tumorigenèse. C'est pourquoi cette introduction exposera dans une première partie les connaissances actuelles sur la voie miRNA : ce qu'est l'interférence ARN, les étapes de la biogenèse des miRNAs, les modes de répression des ARNm cibles et les fonctions biologiques des miRNAs. Une deuxième partie abordera les liens qui existent entre miRNAs et cancer, nous amenant à la problématique de cette thèse.

I. La voie micro-ARN

I.1 L'interférence ARN

I.1.1 Origines et découverte de l'interférence ARN

En 1990, le premier phénomène de type Interférence ARN est découvert par hasard chez le pétunia par l'équipe de Richard Jorgensen. En introduisant des copies supplémentaires du gène de la chalcone synthase (CHS), celui-ci pensait renforcer la couleur violette des pétunias. Or, les fleurs obtenues se sont avérées au contraire blanches ou partiellement blanches et le niveau d'ARNm de la CHS cinquante fois inférieur aux fleurs sauvages. Ce mécanisme, encore incompris, est alors appelé « co-suppression » puisque les deux copies du gène (endogène et transgène) semblent interagir de manière négative en se « co-supprimant » (Napoli et al., 1990). En 1995, Guo et Kemphues injectent un ARN antisens à l'ARNm de par-1 dans les gonades du ver *C. elegans*, l'ARN antisens étant supposé s'hybrider à l'ARNm et inhiber ainsi l'expression du gène dans la descendance. De manière surprenante, le contrôle effectué avec l'ARN sens de par-1 donne des résultats similaires, mimant le phénotype d'un mutant par-1 (Guo and Kemphues, 1995).

C'est en 1998 qu'une explication à ces résultats étranges est apportée par la publication des travaux d'Andrew Fire et Craig Mello qui décrivent pour la première fois le mécanisme d'interférence ARN (RNAi) chez le nématode *C. elegans*. Leurs résultats montrent que l'expression de gènes endogènes est inhibée de manière spécifique et très efficace par l'injection d'ARN double brin (ARNdb) homologue au gène visé, tandis que l'ARN sens ou l'ARN antisens seuls sont relativement inefficaces (Fire et al., 1998). Peu de temps après, il est montré que le mécanisme de RNAi est également fonctionnel chez la drosophile où de l'ARNdb est utilisé de manière efficace sur des embryons pour inactiver des gènes et mimer des phénotypes mutants (Kennerdell and Carthew, 1998). Les résultats obtenus par Guo et Kemphues étaient en fait dus à une faible contamination des préparations d'ARNs par de l'ARNdb, liée à l'activité non spécifique des ARN polymérases utilisées produisant une petite quantité d'ARN antisens. De même, les résultats de Jorgensen sur le pétunia étaient dus à une faible transcription de l'ARN antisens pouvant former un ARNdb avec l'ARN sens. Andrew Fire et Craig Mello furent récompensés en 2006 par le Prix Nobel de physiologie et de médecine pour leurs travaux ayant permis la découverte de la RNAi.

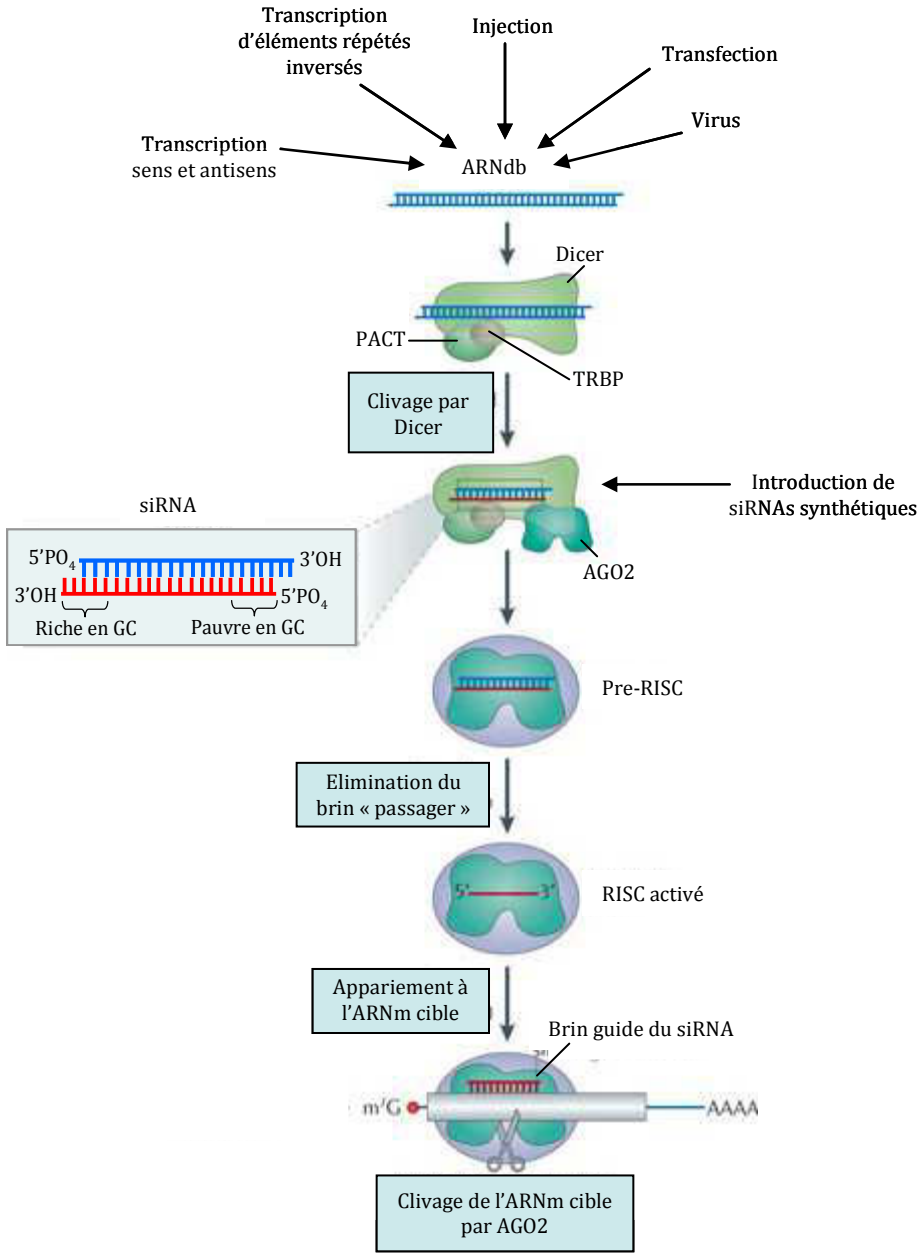
I.1.2 Identification des siRNAs, intermédiaires de l'interférence ARN

L'utilisation d'un système *in vitro* basé sur des extraits cellulaires de cellules de drosophile permet à deux laboratoires de mettre en évidence des intermédiaires ARN de petite taille (21-25 nt) responsables du mécanisme de RNAi. Hammond et al. mettent ainsi en évidence, dans les extraits cellulaires préalablement transfectés avec un ARNdb, une activité nucléase, responsable de la dégradation de l'ARNm homologue ciblé. Cette activité nucléase est nommée RISC pour « RNA-induced silencing complex », et le fractionnement des extraits cellulaires permet de montrer que cette activité RISC co-purifie avec des petits ARNs de 25 nt correspondant à des fragments sens et antisens de l'ARNm ciblé (Hammond et al., 2000). Egalement à l'aide de ce système *in vitro*, Zamore et al. montrent quant à eux que l'ARNdb est clivé en petits fragments de 21-23 nt même en absence de l'ARNm ciblé. Ils montrent aussi que l'ARNm cible est clivé dans la région correspondant à l'ARNdb, et tous les 21-23 nt environ, suggérant que les ARNs de 21-23 nt sont les intermédiaires guidant ce clivage (Zamore et al., 2000). Une étape supplémentaire est franchie lorsque Elbashir et al. montrent que des fragments synthétiques d'ARNdb de 21-22 nt, avec des extrémités 3' sortantes de 2 nt, sont suffisants pour éteindre de manière spécifique de la séquence l'expression d'un gène rapporteur de la luciférase dans ce modèle *in vitro*. Ils confirment ainsi que ces petits ARNdb sont les intermédiaires de la RNAi et les nomment siRNAs pour « short interfering RNAs ». Leurs résultats montrent aussi que l'ARNm cible est clivé à peu près au centre de la région complémentaire au siRNA (Elbashir et al., 2001b).

A cette période, seules de rares études ont montré la possibilité d'éteindre des gènes par RNAi chez les mammifères, et uniquement dans l'oocyte et l'embryon précoce de souris, les cellules ES de souris indifférenciées et la lignée de carcinome embryonnaire P19 (Svoboda et al., 2000; Wianny and Zernicka-Goetz, 2000; Yang et al., 2001; Paddison et al., 2002). Par ailleurs, des difficultés sont rencontrées par d'autres équipes tentant d'appliquer la RNAi aux cellules de mammifères (Caplen et al., 2000; Ui-Tei et al., 2000). Ceci est lié au fait qu'à des stades plus avancés de développement, les cellules de mammifères déclenchent normalement une réponse de défense antivirale non spécifique appelée « réponse interféron » lorsque des ARNdb de plus de 30 nt entrent dans la cellule (Minks et al., 1979; Manche et al., 1992). L'ARNdb active la protéine kinase dépendante de l'ARNdb (PKR) et la 2'-5'-oligoadenylate synthétase. La PKR phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2α, déclenchant ainsi une inhibition globale de la traduction, tandis que la 2'-5'-oligoadenylate synthétase active indirectement la RNase L responsable de la dégradation non spécifique des ARNm (Baglioni et al., 1978; Clemens and Williams, 1978; Clemens, 1997). Lorsque cette réponse a lieu, si elle ne conduit pas à l'apoptose, elle masque le phénomène spécifique de RNAi par une inhibition globale et non spécifique de l'expression des protéines (Caplen et al., 2000). La découverte des siRNAs permet alors de montrer que, de par leur petite taille, ils sont capables d'éteindre spécifiquement l'expression de gènes exo- et endo-gènes dans des cellules de mammifères sans déclencher de « réponse interféron » (Elbashir et al., 2001a). Notons cependant que quelques études montrent par la suite que dans certains cas, les siRNAs sont capables de déclencher une « réponse interféron » entrainant des effets non spécifiques (Bridge et al., 2003; Reynolds et al., 2006).

I.1.3 La voie siRNA

L'enzyme responsable du clivage de l'ARN double brin en petits duplexs de 21-23 nt avec des extremités 3' sortantes de 2 nt est une RNase de type III appelée Dicer (Bernstein et al., 2001) (Figures 1 et 4). La purification des complexes RISC dans des cellules HeLa a permis de montrer que le brin antisens du siRNA réside dans le complexe RISC avec AGO1 et AGO2, des protéines de la famille Argonaute (Martinez et al., 2002). Il existe huit protéines de la famille Argonaute dans le génome humain, quatre de la sous-catégorie AGO (AGO1-4) et quatre de la sous-catégorie Piwi (Sasaki et al., 2003). Chez les mammifères, toutes les protéines de la sous-catégorie AGO sont capables de fixer les siRNAs, mais seule AGO2 possède l'activité catalytique de clivage de l'ARNm cible (Liu et al., 2004b; Meister et al., 2004) (Figure 1). AGO2 sert également à activer le complexe RISC en clivant le brin sens ou brin « passager » pendant l'assemblage du complexe (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005) (Figure 1). Les fonctions de Dicer, des protéines AGO et du complexe RISC seront abordées plus en détails dans la partie *I.2 Biogenèse des micro-ARNs*.



<u>Figure 1 : La voie siRNA.</u> *Les longs ARNdb sont clivés en siRNAs par la Rnase III Dicer au sein d'un complexe protéique contenant également TRBP et/ou PACT (détaillé dans la partie I.2 Biogenèse des micro-ARNs). Les siRNAs sont des petits ARNdb de 20-24 nt avec des groupements 3'-OH et 5-phosphate (PO_4) et des extrémités 3' sortantes de 2 nt. Le recrutement d'AGO2 ou sa présence préalable au sein du complexe Dicer-TRBP et/ou PACT, permet de former le complexe pre-RISC qui est activé par le clivage du brin « passager » par AGO2, initiant son élimination du complexe. Le complexe RISC activé s'associe à l'ARNm cible grâce à l'appariement du brin guide du siRNA au niveau de la séquence complémentaire de l'ARNm. AGO2 clive l'ARNm cible au centre de la région appariée entre le siRNA et l'ARNm. (Adapté de Davidson et McCray, 2011).*

I.1.4 Découverte des micro-ARNs

Parallèlement à la découverte du mécanisme de RNAi, des recherches menées dans différents laboratoires sur des mutants du ver *C. elegans* ont permis de mettre en évidence l'existence de petits ARNs interférents endogènes, transcrits à partir du génome cellulaire : les micro-ARNs (miRNAs). Le premier miRNA, lin-4, a été décrit de manière concomitante par les équipes de Victor Ambros et Gary Ruvkun en 1993. Des cribles génétiques sur des mutants de *C. elegans* avaient déjà permis d'identifier les gènes lin-4 et lin-14 comme essentiels pour le contrôle temporel du développement post-embryonnaire de ce nématode (Chalfie et al., 1981; Ambros and Horvitz, 1984). Il existe en effet chez *C. elegans* quatre stades larvaires (L1 à L4) qui peuvent être caractérisés par l'état de division et de différentiation des cellules. Il a ainsi été montré que des mutations de lin-4 entrainaient des divisions cellulaires caractéristiques du stade L1 à des stades plus avancés de développement. Au contraire, des mutations de lin-14 entrainaient de manière prématurée des caractéristiques de stades larvaires plus avancés. Ruvkun et al. ont montré que lin-14 codait pour une protéine nucléaire dont la diminution graduelle d'expression à la fin du stade larvaire L1 initiait le passage au stade L2 (Ruvkun and Giusto, 1989). Les phénotypes opposés des mutants de lin-4 et lin-14 avaient déjà permis à Victor Ambros de proposer que lin-4 soit responsable de l'inhibition de lin-14 (Ambros, 1989). En 1993, son équipe montre que le gène lin-4 ne code pas pour une protéine mais pour deux transcrits de petites tailles (environ 61 et 22 nt), dont une partie de la séquence est partiellement complémentaire à des séquences contenues dans le 3'UTR (« Untranslated region » ou région on traduite) de l'ARNm de la protéine lin-14 (Lee et al., 1993). Au même moment, Whigtman et al. montrent que la région 3'UTR de lin-14 est suffisante à sa régulation par lin-4 au niveau post-transcriptionnel (Wightman et al., 1993). Il est ensuite montré que c'est une interaction directe par un appariement partiel antisens du petit ARN lin-4 avec les séquences contenues dans le 3'UTR de l'ARNm de lin-14 qui est responsable de l'inhibition de lin-14 au moment de la traduction , initiant ainsi le passage des stades larvaires L1 à L2 (Ha et al., 1996; Olsen and Ambros, 1999). Entre temps, il est montré que lin-4 inhibe de la même manière, via un élément de réponse contenu dans le 3'UTR, la protéine lin-28, responsable du passage des stades larvaires L2 à L3 (Moss et al., 1997).

En 2000, l'équipe de Gary Ruvkun découvre un nouveau miRNA chez *C. elegans*. Il s'agit de let-7, responsable de l'inhibition de l'expression de la protéine lin-41, permettant cette fois la transition du stade larvaire L4 à l'âge adulte (Reinhart et al., 2000). Contrairement à lin-4, des homologues de let-7 sont rapidement découverts dans d'autres organismes, y compris les mammifères, et une structure conservée de type tige-boucle est prédite pour le transcrit

précurseur (Pasquinelli et al., 2000). Une structure similaire de type tige-boucle est prédite pour le précurseur de lin-4 et correspond à la forme plus grande de 61 nt que Lee et al. avaient détecté (Lee et al., 1993). En 2001, les groupes de Victor Ambros, David Bartel et Thomas Tuschl publient simultanément des études montrant l'existence de nombreux autres gènes, conservés du ver à l'humain, codant pour des petits ARNs comme lin-4 et let-7, qui sont alors appelés micro-ARNs (miRNAs) (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001) (Figure 2). On compte aujourd'hui plus de 1000 miRNAs humains identifiés, séquencés et annotés dans le génome (www.mirbase.org).

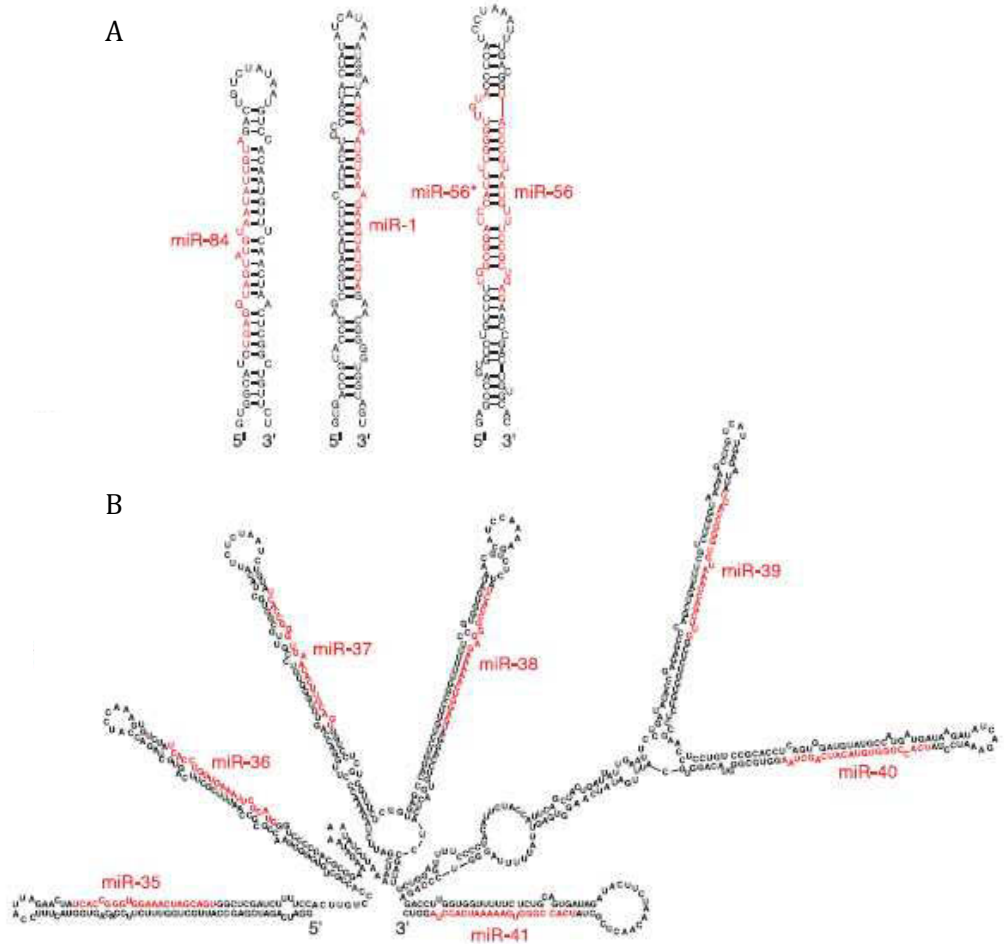


Figure 2 : Exemples de miRNAs et leurs structures secondaires chez *C. elegans*. *Structures secondaires de type tige-boucle prédites par « RNAfold » pour les précurseurs de miRNAs matures (en rouge) clonés chez C. elegans en 2001. (A) miRNAs individuels : miR-84 (un miRNA de la même famille que let-7), miR-1, miR-56 et miR-56* (deux miRNAs clonés provenant des deux bras de la même structure tige-boucle) (B) Exemple d'un cluster de sept miRNAs, le cluster miR-35-41. (D'après Lau et al., 2001).*

I.1.5 Origine et évolution des micro-ARNs

Les miRNAs existent chez des organismes aussi éloignés que les plantes et les animaux mais leurs voies de biogenèse et les mécanismes par lesquels ils régulent leurs cibles sont très différents. De plus, aucune famille de miRNAs n'a été trouvée conservée entre les deux règnes, conduisant à l'hypothèse que les miRNAs des plantes et des animaux ont des origines indépendantes au cours de l'évolution (Jones-Rhoades et al., 2006). Ainsi, même si des avancées majeures sur la compréhension de la RNAi ont été obtenues par l'étude des miRNAs chez les plantes (Jones-Rhoades et al., 2006), ce manuscrit détaillera uniquement la voie miRNA chez les animaux, et plus particulièrement chez les mammifères. Comme let-7, de nombreux miRNAs sont conservés chez les animaux bilatériens (Prochnik et al., 2007). Par exemple, 55% des miRNAs de *C. elegans* ont des miRNAs homologues dans le génome humain, indiquant leur rôle important au cours de l'évolution animale (Ibanez-Ventoso et al., 2008). En revanche, il n'y a pas de miRNAs chez les organismes unicellulaires, qu'il s'agisse des bactéries ou des levures. Quelques miRNAs ont été trouvés chez des organismes métazoaires ancêtres des bilatériens : environ 40 chez l'anémone de mer *Nematistella vectensis* et 8 chez la démosponge *Amphimedon queenslandica* (Grimson et al., 2008). Leur nombre est beaucoup moins important que chez les organismes métazoaires plus complexes. Or, la complexité des organismes corrèle avec la portion d'ADN génomique dit « non-codant », c'est-à-dire ne codant pas pour des protéines (introns et régions dites intergeniques), qui atteint presque 98,5% dans le génome humain (Mattick, 2004). Pourtant, une grande partie du génome dit « non-codant » est conservée d'une part (Shabalina et al., 2001; Thomas et al., 2003), et transcrite d'autre part (Okazaki et al., 2002; Carninci et al., 2005; Cheng et al., 2005), suggérant un rôle fonctionnel de ces ARNs « non-codant ». La découverte des miRNAs et de leur rôle comme régulateurs de l'expression du génome a ainsi remis en question le dogme central de gènes fonctionnels codant nécessairement pour des protéines. Elle a ouvert la voie à l'étude plus étendue des ARNs « non-codant » ayant une fonction de régulation (endo-siARNs, piwi-ARNs, long ARNs non codant…), qui semblent avoir été nécessaires au cours de l'évolution à l'apparition d'organismes de plus en plus complexes (Mattick, 2004).

I.2 Biogenèse des micro-ARNs

I.2.1 Organisation génomique et transcription

I.2.1.1 Organisation génomique

Les miRNAs sont codés dans le génome au sein d'unités transcriptionnelles codant ou non pour des protéines (Figure 3). Dans la mesure où un gène ne codant pas pour une protéine peut en fait « coder » pour un miRNA, nous appelerons P-codant les gènes codant pour une protéine, et R-codant les gènes codant pour des miRNAs. Environ 50% des miRNAs humains appartiennent à des unités transcriptionnelles déjà connues et annotées du génome, et sont principalement trouvés dans les introns de ces gènes (Rodriguez et al., 2004; Saini et al., 2007; Griffiths-Jones et al., 2008). L'étude de Rodriguez et al. , ne portant que sur les 232 miRNAs de mammifères connus en 2004 , indiquait que 40% des miRNAs étaient contenus dans les introns de gènes P-codant et 10% dans les introns de longs ARNs « non-codants » déjà connus (Rodriguez et al., 2004). Bien qu'il n'y ait pas de statistique claire sur la répartition des miRNAs entre gènes P-codant et R-codant, on peut considérer que les 50 % de miRNAs dits « intergeniques » (parce qu'ils n'étaient pas codés dans des unités transcriptionnelles déjà connues) sont également codés dans de longs transcrits R-codant (voir paragraphe suivant), ce qui amène grossièrement à environ 60% des miRNAs dans des gènes R-codant et environ 40% dans des gènes P-codant. Quelques miRNAs sont présents dans des exons mais il s'agit alors principalement de gènes R-codant. Il est intéressant de noter par exemple qu'une structure de type tige-boucle avait été identifiée comme seul élément conservé dans l'ARN « non-codant » BIC et ainsi supposée constituer l'élément fonctionnel de ce gène (Tam, 2001). On sait aujourd'hui qu'il s'agit du miRNA miR-155 (Figure 3). Enfin il existe de très rares cas (deux dans l'étude de Rodriguez et al. de 2004) de miRNAs codés dans un exon de gène P-codant, comme miR-198 dans le 3'UTR de l'ARNm de FSTL1 (Figure 3). Par ailleurs, environ un tiers des miRNAs chez les mammifères sont regroupés en « clusters » et transcrits en un seul pri-miRNA (transcrit primaire du/des miRNA(s)) polycistronique (Figure 3) (Lee et al., 2002; Lee et al., 2004a). Les pri-miRNAs présentent localement des structures secondaires de type tige-boucle qui constituent les futurs précurseurs des miRNAs (Figure 3).

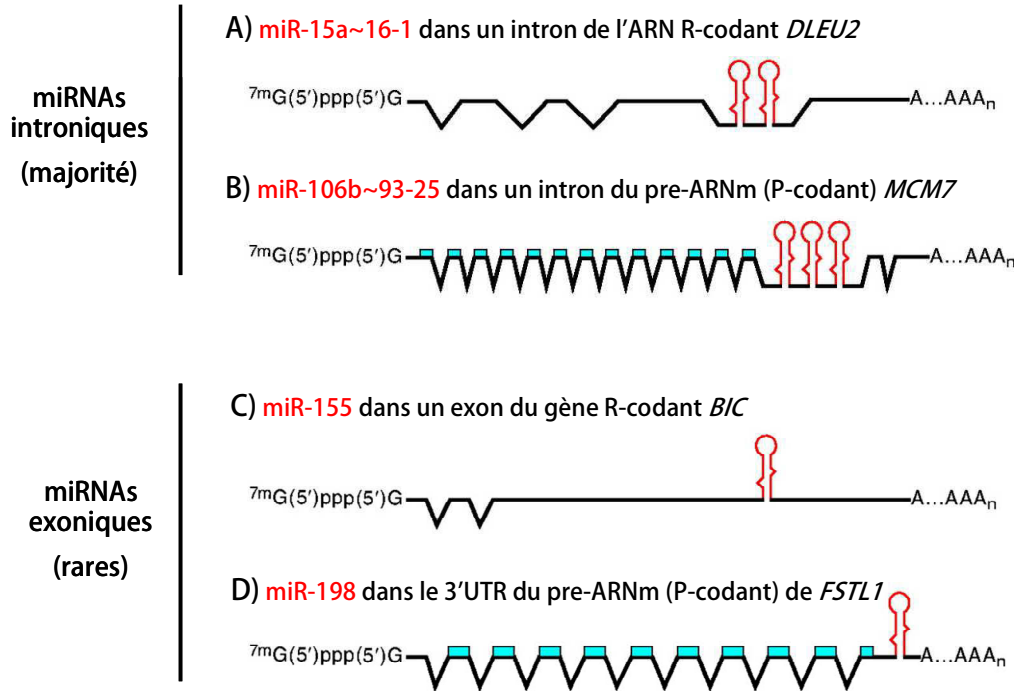


Figure 3 : Organisation génomique des pri-miRNAs. *Les miARNs sont codés dans des introns (majorité) ou des exons (minorité) d'unités transcriptionnelles codant (P-codant) ou ne codant pas pour des protéines (R-codant). (A) Le cluster miR-15a~16-1 est codé dans un intron du long ARN R-codant appelé DLEU2 (« deleted in lymphocytic leukemia 2 »). (B) Le cluster miR-106b~93~25 est intégré dans un intron du gène P-codant MCM7 (« minichromosome maintenance deficient 7 »). (C) Le précurseur de miR-155 se trouve dans un exon d'un ARN R-codant, préalablement connu sous le nom de BIC (« B-cell integration cluster»). (D) Le précurseur de miR-198 est codé dans un exon, plus précisément le 3'UTR du gène P-codant FSTL1 (« follistatin-like 1 »). Les précurseurs des miRNAs de structure secondaire tige-boucle sont représentés en rouge au sein des unités transcriptionnelles. Les régions codant pour des protéines apparaissent en bleu. (D'après Du et Zamore, 2005 ; Kim et al., 2009).*

I.2.1.2 Transcription

Les miRNAs appartenant à des gènes P-codant sont généralement présents dans les introns du gène. La majorité de ces miRNAs introniques seraient co-transcrits avec leur gène hôte. Cette hypothèse est confirmée par la fréquente corrélation entre l'expression des miRNAs introniques et celle de leur gène hôte (Rodriguez et al., 2004; Baskerville and Bartel, 2005), ainsi que par des évidences expérimentales montrant la possibilité de produire des miRNAs matures introniques à partir de l'expression du gène hôte (Kim and Kim, 2007; Morlando et al., 2008). Cependant, plusieurs études comprenant des analyses de la position des nucléosomes, des analyses bioinformatiques de marqueurs des promoteurs, des immunoprécipitations de chromatine associée à l'ARN polymérase II (et/ou ARN polymérase III), ainsi que des validations fonctionnelles de certains promoteurs identifiés, montrent qu'environ 30% des miRNAs introniques peuvent être transcrits à partir d'un promoteur indépendant du gène hôte (Ozsolak et al., 2008; Corcoran et al., 2009; Monteys et al., 2010). Certains miRNAs pourraient d'ailleurs

être transcrits à la fois à partir de leur promoteur indépendant et à partir du promoteur du gène hôte.

Les miRNAs contenus dans des unités transcriptionnelles R-codantes sont transcrits comme les ARNm par l'ARN polymérase II en un long transcrit primaire mesurant plusieurs kilobases, possédant une coiffe m^7G en 5', polyadénylé et appelé pri-miRNA (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004a; Gu et al., 2006; Saini et al., 2007). Il a été proposé que certains miRNAs associés à des répétitions Alu, tels que ceux du mégacluster C19MC sur le chromosome 19, puissent être transcrits par l'ARN polymérase III (Borchert et al., 2006). De plus, les études récentes ayant identifié de nouveaux promoteurs de miRNAs introniques indiquent que 5% d'entre eux portent des marques de promoteurs dépendants de l'ARN polymérase III et que certains de ces promoteurs sont effectivement occupés par celle-ci (Monteys et al., 2010; Ozsolak et al., 2008). Cependant, les résultats de Bortolin-Cavaillé et al. en 2009 remettent en question la transcription du mégacluster de miRNAs C19MC par l'ARN polymérase III et indiquent qu'ils sont bien transcrits par l'ARN polymérase II sous la forme d'un long transcrit non codant (Bortolin-Cavaille et al., 2009). La grande majorité des pri-miRNAs semble donc être transcrite par l'ARN polymérase II et porte les marques associées à ce mode de transcription (coiffe en 5', polyadénylation) mais la possibilité que certains miRNAs soient transcrits par l'ARN polymérase III ne peut être exclue. Si la grande majorité des miRNAs matures sont aujourd'hui identifiés et annotés dans le génome, la compréhension de leur organisation génomique (comme la localisation exacte de leurs promoteurs) et de leurs mécanismes de transcription reste encore incomplète.

I.2.2 Maturation dans le noyau et export dans le cytosplasme

I.2.2.1 Voie canonique : clivage du pri-miRNA par le microprocesseur

Le pri-miRNA généré dans le noyau est clivé localement pour libérer des structures tige-boucle d'environ 70 nt qui constituent les pre-miRNAs (Lee et al., 2002). Ce clivage est réalisé par Drosha, une RNase de type III (Lee et al., 2003) (Figure 4), au sein d'un complexe nucléaire appelé microprocesseur. Drosha interagit au sein de ce complexe avec une protéine partenaire de liaison à l'ARNdb appelée DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) (Pasha chez les invertébrés) (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004). Les protéines Drosha ou DGCR8 recombinantes ne sont pas capables de cliver seules un pri-miRNA tandis que les deux protéines ensemble présentent l'activité catalytique de maturation du pri-miRNA (Gregory et al., 2004; Han et al., 2004).

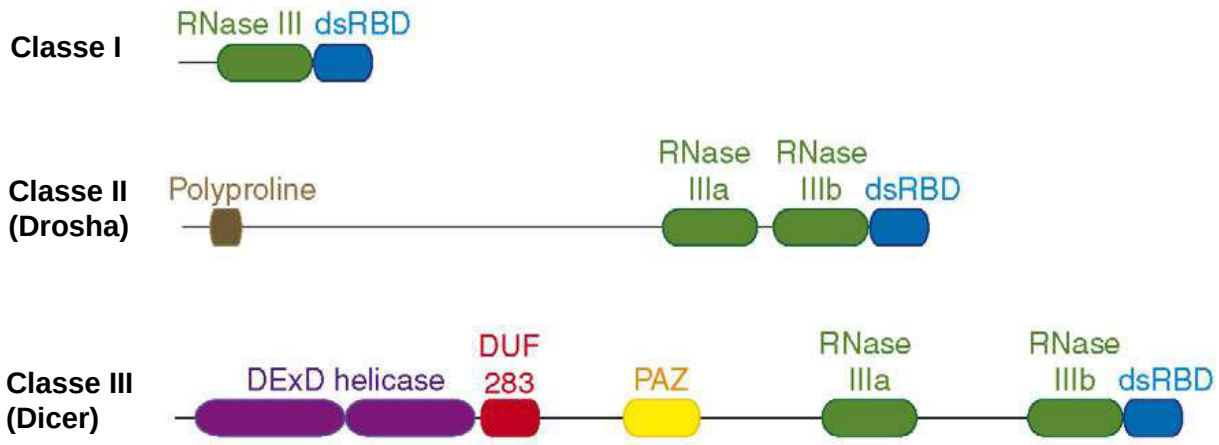


Figure 4 : La famille des RNases III. *Les RNases III sont des enzymes qui reconnaissent et clivent spécifiquement l'ARNdb. Le clivage par une RNase III produit une structure terminale caractéristique au niveau de l'ARNdb, à savoir un groupement 5'-phosphate et 2 nucléotides qui dépassent en 3'. Elles sont classées en trois familles en fonction de leurs domaines. Les RNases III de classe I sont trouvées chez la bactérie et la levure et contiennent uniquement un domaine RNase III et un domaine de liaison à l'ARNdb (dsRBD). Drosha fait partie des RNases de classe II qui possèdent deux domaines RNase III (a et b) et un dsRBD. Des homologues de Drosha sont retrouvés uniquement chez les animaux. Les RNases III de classe III comprennent Dicer et ses homologues conservés chez S. pombe, les plantes et les animaux. Elles contiennent deux domaines RNase III (a et b), un dsRBD, un domaine hélicase en N-terminal, un petit domaine DUF283 de fonction inconnue et un domaine PAZ qui est retrouvé également chez les protéines Argonautes et qui est responsable de la fixation à l'extrémité de l'ARNdb. (D'après MacRae et Doudna, 2007).*

Le clivage du pri-miRNA par le microprocesseur est une étape critique dans la biogenèse des miRNAs puisqu'elle détermine une des extrémités finales du duplex miRNA. Puisqu'il n'existe pas de séquences conservées communes aux pri-miRNAs, ce sont des éléments structuraux qui permettent leur reconnaissance par le microprocesseur. Le pri-miRNA est caractérisé par une tige d'ARNdb d'environ 30 nt présentant des mésappariements, une boucle, et des fragments d'ARN simple brin de part et d'autre de cette structure tige-boucle (Figure 5). DGCR8, mais pas Drosha, interagit directement et spécifiquement avec les pri-miRNAs (Han et al., 2006; Yeom et al., 2006). Les travaux réalisés par Han et al. montrent que DGCR8 reconnaît la jonction entre les fragments d'ARN simple brin en 5' et 3' et l'ARNdb de la tige, et que cette jonction est indispensable à la reconnaissance de la structure tige-boucle et à son clivage (Figure 5). Ce modèle est cohérent avec des résultats préalables obtenus à partir de tentatives d'expression ectopique de miRNAs à partir d'un promoteur de l'ARN polymérase III dans des cellules transfectées, montrant que des séquences additionnelles de 40 nt minimum de part et d'autre de la structure tige-boucle du pre-miRNA sont nécessaires à sa maturation (Chen et al., 2004). Le modèle de Han et al. conforte également les résultats obtenus à partir d'expériences de maturation *in vitro* de substrats de type pri-miRNAs radiomarqués, de différentes tailles et

structures, montrant que le clivage du pri-miRNA par Drosha nécessite la présence de fragments d'ARN simple brin non structurés de part et d'autre de la structure tige-boucle (Zeng and Cullen, 2005). La fixation de DGCR8 au niveau de la jonction simple brin-double brin permettrait au domaine de liaison à l'ARNdb (dsRBD, pour « double-stranded RNA binding domain ») de Drosha d'interagir transitoirement avec la tige, et positionnerait le centre catalytique de l'enzyme (constitué des deux domaines RNase IIIa et IIIb) de manière à ce qu'elle clive le duplex d'ARN 11 pb après la jonction (Han et al., 2006) (Figure 5). La jonction tige-boucle peut éventuellement être reconnue par DGCR8 comme jonction simple brin-double brin. En effet, lorsque la boucle et les fragments simple brin d'un pri-miRNA donné sont changés de côté, le pre-miRNA généré provient toujours du site de clivage original (Han et al., 2006). Toutefois, deux éléments structuraux sont supposés défavoriser la maturation provenant de la fixation de DGCR8 à la jonction tige-boucle à la faveur de la maturation correcte provenant de la fixation à la jonction fragments simple brin-tige (Figure 5). Premièrement, DGCR8 reconnaitrait de manière préférentielle la jonction entre la tige double brin et les fragments simple brin flexibles en 5' et 3', plutôt que la jonction entre la tige double brin et la boucle plus rigide. Deuxièmement, en cas de fixation à la jonction tige-boucle, des mésappariements ou des paires de base faiblement appariées dans la tige limiteraient la possibilité de clivage par Drosha à cet endroit inapproprié.

DGCR8 est une protéine qui possède un domaine WW central et deux dsRBD en C-terminal. Les deux dsRBD sont nécessaires à la fixation aux pri-miRNAs et le domaine de liaison à Drosha se situe également en C-terminal. Une région minimale C-terminale contenant le domaine de liaison à Drosha et les deux dsRBDs est suffisante pour maturer des pri-miRNAs en pre-miRNAs *in vitro*. En revanche, la région N-terminale de DGCR8 est nécessaire à sa localisation nucléaire (Yeom et al., 2006). Afin de mieux comprendre la spécificité de DGCR8 pour les pri-miRNAs, différentes études structurales et biochimiques portant sur des régions de la protéine contenant les dsRBD ou simplement dépourvue de la région N-terminale ont proposé des modèles coopératifs de liaison de DGCR8 au pri-miRNA, tels que : une molécule de DGCR8 qui se lierait via ses deux dsRBD à un seul pri-miRNA, ou la liaison coopérative de deux DGCR8 à deux pri-miRNAs (Sohn et al., 2007), ou encore la formation coopérative d'un trimère de dimères de DGCR8 sur un pri-miRNA (Faller et al., 2010).

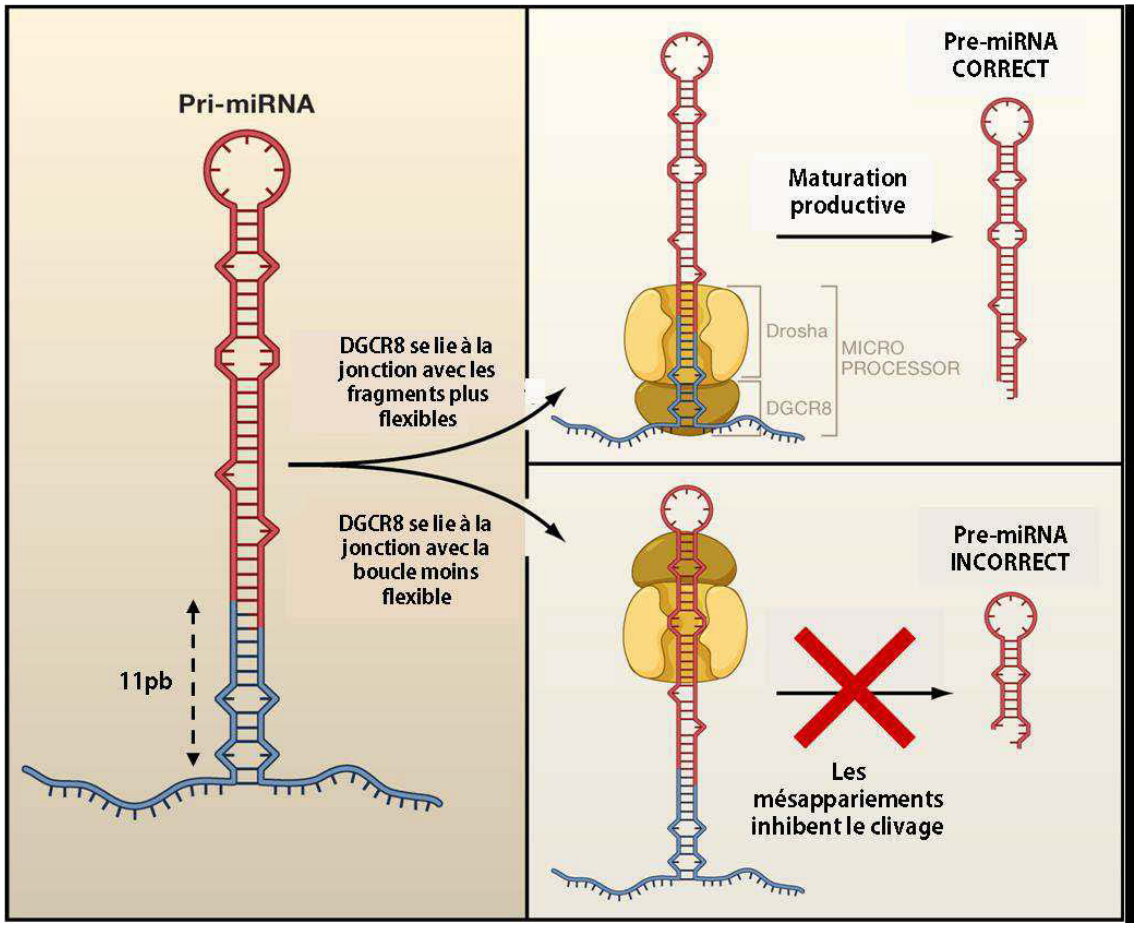


Figure 5 : Clivage du pri-miRNA par le microprocesseur. *Les caractéristiques structurales des pri-miRNAs favorisent leur maturation correcte en pre-miRNAs par le complexe Drosha-DGCR8 (microprocesseur). DGCR8 se lierait de manière préférentielle à la jonction entre la tige double brin et les fragments flexibles simple brin en 5' et 3', plutôt qu'à la jonction entre la tige double brin et la boucle plus rigide. La fixation de DGCR8 positionne le centre catalytique de Drosha 11 pb après la jonction simple brin-double brin, où celle-ci réalise le clivage asymétrique de l'ARNdb de la tige pour libérer un pre-miRNA d'environ 60-70 nt avec une extrémité 3' sortante de 2 nt. La liaison de DGCR8 à la jonction tige-boucle positionne Drosha de manière inappropriée. Des mésappariements ou des paires de base faiblement appariées localisées à cet endroit limiteraient le clivage par Drosha, réduisant ainsi la production de pre-miRNAs incorrects. (D'après Seitz et Zamore, 2006; Han et al., 2006).*

I.2.2.2 Régulation de l'activité du microprocesseur

S'il a été montré que Drosha et DGCR8 constituent les éléments nécessaires et suffisants à la maturation des pri-miRNAs, plusieurs complexes de différentes tailles contenant Drosha ont été purifiés et différents facteurs auxiliaires associés à Drosha et DGCR8 pourraient permettre de réguler l'activité du complexe ou de l'orienter vers certains pri-miRNAs spécifiques (Gregory et al., 2004; Shiohama et al., 2007). Par exemple, les ARN hélicases p68 (DDX5) et p72 (DDX17) joueraient un rôle de facteurs auxiliaires en favorisant la sélection et la maturation de certains pri-miRNAs spécifiques (Fukuda et al., 2007).

Par ailleurs, d'autres facteurs capables de moduler la maturation de certains pri-miRNAs par le microprocesseur ont été identifiés. Davis et al. ont mis en évidence un mécanisme favorisant la maturation de certains pri-miRNAs, dont pri-miR-21 et pri-miR-199a, lors du traitement de cellules du muscle lisse pulmonaire avec du TGFβ (« transforming growth factor β ») ou des protéines BMP (« Bone morphogenic protein »). Les protéines SMAD, responsables de la transduction du signal de la voie TGFβ, reconnaissent un motif (5'-CAGAC-3') présent dans la tige de certains pri-miRNAs et recrutent ainsi le microprocesseur, y compris p68, pour maturer spécifiquement ces pri-miRNAs (Davis et al., 2008; Davis et al., 2010). Une autre étude montre que la protéine suppresseur de tumeur p53, induite en réponse à un dommage à l'ADN, est capable de s'associer au microprocesseur d'une manière dépendante de p68 et p72, et favorise ainsi la maturation de certains pri-miRNAs spécifiques (Suzuki et al., 2009). La protéine de liaison à l'ARN hnRNPA1 (« heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 ») reconnaît spécifiquement une région de la boucle de pri-mir-18a et facilite ainsi le clivage par Drosha, en induisant un relâchement au niveau de la structure de la tige (Michlewski et al., 2008). La protéine de régulation de l'épissage KSRP (« KH-type splicing regulatory protein ») facilite aussi spécifiquement la maturation par Drosha de quelques pri-miRNAs en reconnaissant des triplets « GGG » dans la région de la boucle (Trabucchi et al., 2009).

D'autres facteurs sont capables au contraire de réguler négativement la maturation de certains pri-miRNAs par le microprocesseur. C'est le cas du complexe de facteurs nucléaires NF90-NF45 qui est capable de se lier spécifiquement à certains pri-miRNAs, empêchant ainsi l'accès du microprocesseur (Sakamoto et al., 2009). Différents niveaux de régulation croisée existent entre let-7 et lin-28 (détaillé dans le paragraphe I.4.1), parmi lesquels lin-28 inhibe spécifiquement la maturation de pri-let-7 par le microprocesseur en se fixant au niveau de la boucle (Piskounova et al., 2008; Viswanathan et al., 2008; Newman and Hammond, 2010). Les enzymes ADARs (« Adenosine deaminase acting on RNA ») catalysent la conversion d'adénosines en inosines au sein de segments d'ARNdb. Des résidus adénosines de certains pri-miRNAs sont ainsi édités en inosines par des protéines ADARs (Blow et al., 2006). Ceci peut avoir pour conséquence une inhibition du clivage par Drosha (Yang et al., 2006; Kawahara et al., 2008), qui s'accompagne dans le cas de pri-miR-142 de sa dégradation par la ribonucléase Tudor-SN (Yang et al., 2006). Dans d'autres cas, cela peut au contraire favoriser la maturation par Drosha (Kawahara et al., 2008).

I.2.2.3 Auto-régulation croisée entre Drosha et DGCR8

Un important mécanisme de régulation croisée entre Drosha et DGCR8 a été mis en évidence. Tout d'abord, DGCR8 stabilise Drosha grâce à leur interaction protéine-protéine (Han et al.,

2009). En revanche, Drosha, au sein du complexe microprocesseur, régule négativement l'expression de DGCR8 en clivant une structure tige-boucle similaire à un pre-miRNA présente dans la région 5'UTR de l'ARNm de DGCR8 (Han et al., 2009; Kadener et al., 2009; Triboulet et al., 2009). Cette auto-régulation croisée entre le microprocesseur et DGCR8 peut servir à maintenir un niveau d'activité constant du microprocesseur en évitant de fortes fluctuations d'expression.

I.2.2.4 Un processus co-transcriptionnel

Plusieurs études fournissent des évidences indiquant que le clivage des pri-miRNAs serait un processus co-transcriptionnel. En effet, des pri-miRNAs retenus artificiellement au niveau du site de transcription sont maturés en pre-miRNAs plus efficacement que des pri-miRNAs libérés dans le nucléoplasme, et réciproquement, les pri-miRNAs endogènes efficacement maturés sont associés majoritairement à la fraction chromatinienne du noyau (Pawlicki and Steitz, 2008). De plus, Drosha est retrouvée localisée spécifiquement au niveau des sites de transcription des pri-miRNAs (« indépendants » et introniques) qui s'expriment, et ce d'une manière dépendante de la présence de transcrit comme le montre la diminution de Drosha au site de transcription après traitement à la RNase (Morlando et al., 2008). Enfin, les pri-miRNAs introniques seraient excisés par Drosha co-transcriptionnellement avant l'épissage du pre-ARNm hôte, et cette excision n'empêcherait pas la production de l'ARNm épissé à un taux normal (Kim and Kim, 2007; Morlando et al., 2008). S'il peut sembler contre-intuitif qu'un intron soit clivé par le microprocesseur avant l'épissage du gène hôte, il faut noter qu'il a déjà été mis en évidence qu'un intron continu n'était pas nécessaire à l'épissage d'un pre-ARNm *in vivo* (Dye et al., 2006). Cependant, ces études ne démontrent pas formellement qu'un pri-miRNA intronique et un ARNm hôte épissé puissent provenir de la même molécule de pre-ARNm, et n'excluent pas que les deux processus sur un pre-ARNm donné soient en fait mutuellement exclusifs.

I.2.2.5 Mirtrons

Certains miRNAs codés dans de courts introns sont générés directement par épissage et ne nécessitent pas de clivage par le microprocesseur. Dans ce cas particulier, après épissage et débranchement de la forme lasso de l'intron, celui-ci forme directement une structure tige-boucle de type pre-miRNA (Figure 7). Ces miRNAs particuliers découverts en premier lieu chez les invertébrés sont appelés « mirtrons » (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Ils existent également chez les mammifères mais constituent un groupe relativement minoritaire : trois mirtrons conservés chez les mammifères et 16 mirtrons spécifiques des primates ont été identifiés, ainsi qu'une cinquantaine d'autres mirtrons candidats chez différentes espèces de mammifères (Berezikov et al., 2007).

I.2.2.6 Export dans le cytoplasme

Les pre-miRNAs générés dans le noyau par clivage du microprocesseur ou par la voie « mirtrons » sont exportés activement dans le cytoplasme par l'exportine-5 (XPO5), une protéine de la famille des karyophérines β, responsables du transport de protéines ou d'autres cargos du noyau vers le cytoplasme au travers du complexe de pore nucléaire (Yi et al., 2003; Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004) (Figure 7). La fixation de XPO5 au pre-miRNA est dépendante d'un co-facteur, la GTPase Ran sous sa forme GTP. L'hydrolyse de RanGTP en RanGDP dans le cytoplasme permet la dissociation du complexe et la libération du pre-miRNA. XPO5 reconnaît la partie double-brin du pre-miRNA ainsi que les 2 nt sortants en 3' (Zeng and Cullen, 2004). De plus, la formation du complexe pre-miRNA/XPO5/RanGTP protège le pre-miRNA de la dégradation par des nucléases (Yi et al., 2003; Zeng and Cullen, 2004; Okada et al., 2009).

I.2.3 Maturation du pre-miRNA et formation du complexe RISC

I.2.3.1 Maturation du pre-miRNA

Une fois exporté dans le cytoplasme, le pre-miRNA est clivé par une deuxième RNase III, Dicer (Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001) (Figures 4 et 7). Ce clivage génère un duplex miRNA-miRNA* d'environ 20 pb avec des extrémités 3' sortantes de 2 nt de chaque côté, caractéristiques des clivages successifs par les RNases III Drosha et Dicer. Le duplex miRNA-miRNA* correspond à la partie inférieure de la « tige » du pre-miRNA débarrassé de la boucle. Alors que chez *D. melanogaster*, il existe deux protéines Dicer, l'une responsable de la génération des siRNAs à partir d'ARNdb (Dicer-2) et l'autre responsable de la maturation des pre-miRNAs (Dicer-1) (Lee et al., 2004b), il n'existe qu'une seule protéine Dicer chez les mammifères. Le domaine PAZ (PIWI-Argonaute-Zwille) de Dicer (Figure 4) est retrouvé également dans les protéines Argonautes. D'après une étude structurale du domaine PAZ de AGO1 humaine complexé avec un petit duplex de type siRNA, ce domaine servirait à la reconnaissance des extrémités 3' sortantes des duplexs d'ARNdb (Ma et al., 2004). Un modèle basé sur la structure d'une protéine Dicer « minimale » trouvée chez *Giarda intestinalis* a été proposé pour le clivage du pre-miRNA par Dicer à une distance précise. Le domaine PAZ associé à l'extrémité de l'ARNdb est séparé des 2 domaines RNAses III formant un dimère intramoléculaire par une hélice α (Zhang et al., 2004; Macrae et al., 2006). La distance qui sépare le domaine PAZ du site catalytique formé par les 2 domaines RNases III correspond à la longueur de ≈ 22 nt (25 nt pour Dicer de *Giarda intestinalis*) des duplexs de siRNA ou miRNA-miRNA* générés par Dicer (MacRae, 2006). Les brins 5' et 3' de la tige du pre-miRNA sont clivés respectivement par les domaines RNase IIIa et RNase IIIb au sein du site catalytique qu'ils constituent (Zhang et al., 2004).

In vivo, Dicer interagit avec les protéines TRBP (TAR RNA-binding protein, également appelée TARBP2) et/ou PACT (Chendrimada et al., 2005; Lee et al., 2006). Ces deux protéines ont des structures similaires avec la présence de trois dsRBD. Ni TRBP ni PACT ne sont indispensables à l'activité catalytique de Dicer en soi, mais elles semblent stabiliser Dicer *in vivo*, et contribuer à la formation du complexe effecteur RISC (Chendrimada et al., 2005; Lee et al., 2006). Curieusement, TRBP était initialement connue comme une protéine régulant de manière négative la protéine kinase dépendante de l'ARNdb (PKR), intervenant dans la réponse interféron décrite précédemment, tandis que PACT est au contraire une protéine activatrice de PKR (Park et al., 1994; Patel and Sen, 1998; Gupta et al., 2003). Il semble donc exister un lien entre la voie RNAi/miRNA et la signalisation de PKR mais il n'est pas encore clairement établi.

Dicer constitue donc le premier point commun entre la voie siRNA et la voie miRNA. L'un des deux brins du duplex miRNA-miRNA*, communément appelé le brin « guide » ou miRNA mature, est ensuite incorporé au sein d'un complexe RISC, rejoignant ainsi la voie RNAi (Hutvagner and Zamore, 2002). L'autre brin, miRNA* ou brin « passager » est exclu du complexe RISC et éliminé. C'est la stabilité thermodynamique relative des deux extrémités des duplexs de siRNAs et miRNAs qui semble déterminer la sélection de l'un des deux brins. Ainsi, le brin le plus faiblement apparié à son extrémité 5' est majoritairement incorporé (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Cependant, certains pre-miRNAs donnent des miRNAs matures provenant des deux brins à une fréquence comparable (parfois distingués dans ce cas par la notation miR-x-3p (brin en 3') et miR-x-5p (brin en 5')), ou parfois non négligeable pour le brin miRNA* (Ro et al., 2007; Okamura et al., 2008; Kuchenbauer et al., 2011). La notation miRNA et miRNA* est établie à partir du ratio entre les nombres de séquençages obtenus pour les deux espèces respectives, le miRNA mature étant celui trouvé le plus abondamment (www.mirbase.org). Pourtant ce ratio varie fortement (entre 1 et plus de 100) en fonction du pre-miRNA, et varie également en fonction du tissu considéré pour certains pre-miRNAs, indiquant que le brin « passager » miRNA* est dans certains cas exprimé de manière significative (Ro et al., 2007; Biasiolo et al., 2011; Kuchenbauer et al., 2011). De plus, les miRNA* exprimés sont fonctionnels et peuvent aussi induire la répression de cibles *in vivo* (Ro et al., 2007; Okamura et al., 2008; Yang et al., 2011).

I.2.3.2 Le(s) complexe(s) RISC

RISC est en fait un terme générique pour une famille hétérogène de complexes moléculaires programmés pour éteindre l'expression de gènes cibles par divers mécanismes comme la dégradation de l'ARNm ou la répression de la traduction. Un complexe RISC est caractérisé par la

présence d'une protéine effectrice de la famille Argonaute (Figure 6) et d'un petit ARN (siRNA, miRNA entre autres) servant de guide en s'appariant à un ARN cible. De même que pour Dicer, il existe deux protéines Argonaute de la sous-famille AGO chez la drosophile, chacune dédiée préférentiellement à la voie siRNA (AGO2) ou miRNA (AGO1) (Okamura et al., 2004); et les termes siRISC et miRISC ont été employés pour distinguer les complexes RISC associés à un siRNA de ceux associés à un miRNA (Lee et al., 2004b). En revanche, il existe quatre protéines AGO chez les mammifères (AGO1-4). Alors que seule AGO2 possède une activité catalytique de clivage d'un ARNm cible lorsqu'associée à un siRNA/miRNA parfaitement complémentaire à la cible, toutes les protéines AGO sont capables de se lier avec la même affinité aux petits duplexs d'ARNs (siRNA ou miRNA) (Liu et al., 2004b; Meister et al., 2004), et les protéines AGO1-4 sont redondantes pour l'utilisation des miRNAs (Su et al., 2009). Le nom de miRNP (« miRNA-associated ribonucleoprotein complex ») est aussi utilisé pour désigner les complexes RISC associés à des miRNAs (Mourelatos et al., 2002). Les protéines Argonautes (AGO) possèdent trois domaines conservés (Figure 6). Le domaine PAZ (« Piwi-Argonaute-Zwille »), que possède aussi Dicer, reconnaît et se fixe à l'extrémité 3' sortante du duplex siRNA ou miRNA (Song et al., 2003; Yan et al., 2003; Lingel et al., 2004; Ma et al., 2004); le domaine MID constitue une poche de fixation du 5'-phosphate du duplex (Ma et al., 2005; Parker et al., 2005), et le domaine PIWI, qui adopte une conformation secondaire ressemblant à une RNase H , constitue le domaine catalytique de certaines AGO (comme AGO2 chez les mammifères) (Liu et al., 2004b; Parker et al., 2004; Song et al., 2004; Ma et al., 2005; Yuan et al., 2005).

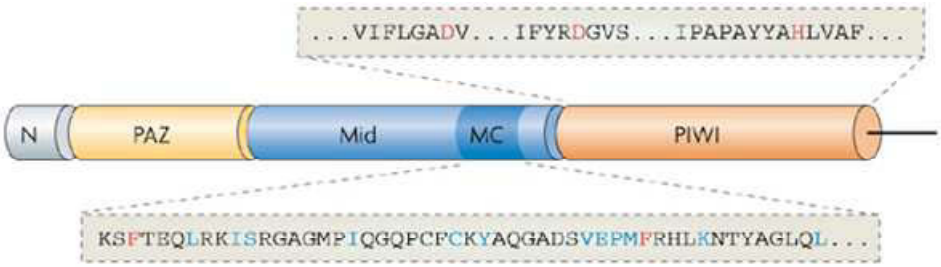


Figure 6 : Structure de la protéine AGO2 humaine. *Le domaine PAZ (en jaune), situé près du côté N-terminal de la protéine (en gris) est nécessaire àa la reconnaissance et à la fixation de l'extremité 3' sortante du duplex d'ARN. Le domaine MID (en bleu) permet de fixer l'extrémité 5'-phosphate du duplex d'ARN. Une partie du domaine MID, le domaine MC (en bleu foncé), présente une homologie de séquence avec le motif de reconnaissance de la coiffe présent dans le facteur eIF4E, particulièrement deux résidus aromatiques (en rouge). Ce domaine entrerait donc en compétition avec eIF4E pour la reconnaissance de la coiffe de l'ARNm cible, bloquant ainsi l'initiation de la traduction, mais il a été également montré que c'est ce domaine qui permettrait l'interaction avec la protéine GW182 (voir I.3.2.2 Inhibition de la Traduction). Le domaine PIWI (en orange) est le domaine contenant les résidus catalytiques (en rouge) des protéines AGO compétentes pour le clivage endonucléolytique. (D'après Hutvagner et Simard, 2008).*

AGO2 purifiée seule est capable d'utiliser un siRNA simple brin pour cliver un ARNm cible mais n'est pas suffisante pour utiliser directement un siRNA double brin, suggérant la nécessité de co-facteurs (Liu et al., 2004b). Des complexes RISC de tailles et de compositions moléculaires très variables, allant de 150 kDa à 80S, ont été purifiés dans différents organismes et parfois caractérisés moléculairement (Nykanen et al., 2001; Martinez et al., 2002; Pham et al., 2004; Gregory et al., 2005; Hock et al., 2007). Un complexe « minimal » RISC composé de AGO2, TRBP et Dicer, a été purifié à partir de cellules humaines et caractérisé *in vitro* (Chendrimada et al., 2005; Gregory et al., 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005). Ce complexe « minimal » immunopurifié ou reconstitué *in vitro* à l'aide des trois protéines recombinantes est capable de cliver un pre-miRNA pour générer un miRNA mature, présente l'activité catalytique de RISC puisqu'il est capable de cliver un ARN cible, et sélectionne préférentiellement le brin guide du pre-miRNA fourni (Gregory et al., 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005; MacRae et al., 2008). Après clivage du pre-miRNA par Dicer, le complexe RISC activé, c'est-à-dire chargé avec le miRNA mature et possédant l'activité catalytique sur l'ARN cible, est dissocié de Dicer (Maniataki and Mourelatos, 2005; MacRae et al., 2008). Ces études suggèrent donc un couplage entre l'activité de maturation du pre-miRNA par Dicer et l'assemblage du complexe RISC grâce à l'interaction de Dicer/TRBP avec AGO2. Une autre étude suggère que l'activité de Dicer et l'assemblage/activation du complexe RISC sont dissociés du fait que le complexe RISC immunopurifié peut utiliser directement un duplex d'ARN ne nécessitant pas de clivage par Dicer (Yoda et al., 2010). Il est vrai que par ailleurs, l'immuno-déplétion de Dicer n'empêche pas l'activité de RISC *in vitro* (clivage d'un ARN cible via un siRNA) (Martinez et al., 2002), et que des cellules ES déficientes pour Dicer supportent une activité RNAi via l'utilisation de siRNAs (Kanellopoulou et al., 2005; Murchison et al., 2005). Ces résultats suggèrent que Dicer n'est pas indispensable à la constitution d'un complexe RISC fonctionnel mais ne sont pas incompatibles pour autant avec l'existence *in vivo* de complexes RISC associés à Dicer, pouvant faciliter le couplage entre la maturation du pre-miRNA et le chargement du miRNA mature sur la protéine AGO (Chendrimada et al., 2005; Gregory et al., 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005; Hock et al., 2007; Landthaler et al., 2008).

Contrairement aux siRNAs, les duplexs miRNA-miRNA* présentent des mésappariements empêchant le clivage du brin passager lorsqu'incorporé dans un complexe RISC-AGO2. Les résultats de l'étude de Yoda et al. sur des complexes RISC immunopurifiés montrent qu'un mésappariement central facilite le chargement d'un petit duplex d'ARN dans les complexes pre-RISC (AGO1-4), et qu'un mésappariement supplémentaire dans la région (2-7) ou (12-15) facilite la séparation des 2 brins et donc l'activation de RISC. En revanche, un duplex de type siRNA complètement apparié ne peut être utilisé que par le complexe RISC-AGO2 grâce à l'activité

catalytique d'AGO2 capable de cliver le brin passager pour activer RISC (Yoda et al., 2010). Pour les duplexs présentant des mésappariements comme les miRNA-miRNA*, il n'y a donc pas clivage du brin « passager » et la façon dont le complexe RISC l'élimine n'est pas encore claire. Cependant, de nombreuses ARN hélicases dont Gemin3 (Mourelatos et al., 2002), DDX5 (ou ARN hélicase p68) (Salzman et al., 2007), MOV10 (ARN hélicase putative) (Meister et al., 2005), ou encore RHA (ARN hélicase A) (Robb and Rana, 2007), ont été trouvées associées aux complexes RISC et pourraient jouer un rôle dans la séparation des deux brins et l'élimination du brin « passager ». Trois complexes RISC différents ont été purifiés à partir de cellules humaines et correspondent probablement à différentes formes de pre-RISC et RISC activés. Des approches protéomiques ont permis d'identifier des dizaines d'autres protéines associées aux protéines AGO au sein de ces trois complexes RISC, dont des hélicases, des hnRNPs (heterogenous nuclear ribonucleoprotein particles) et d'autres protéines de liaison aux ARNm (Hock et al., 2007; Landthaler et al., 2008). Le rôle exact de la plupart de ces protéines dans la fonction de RISC reste à déterminer.

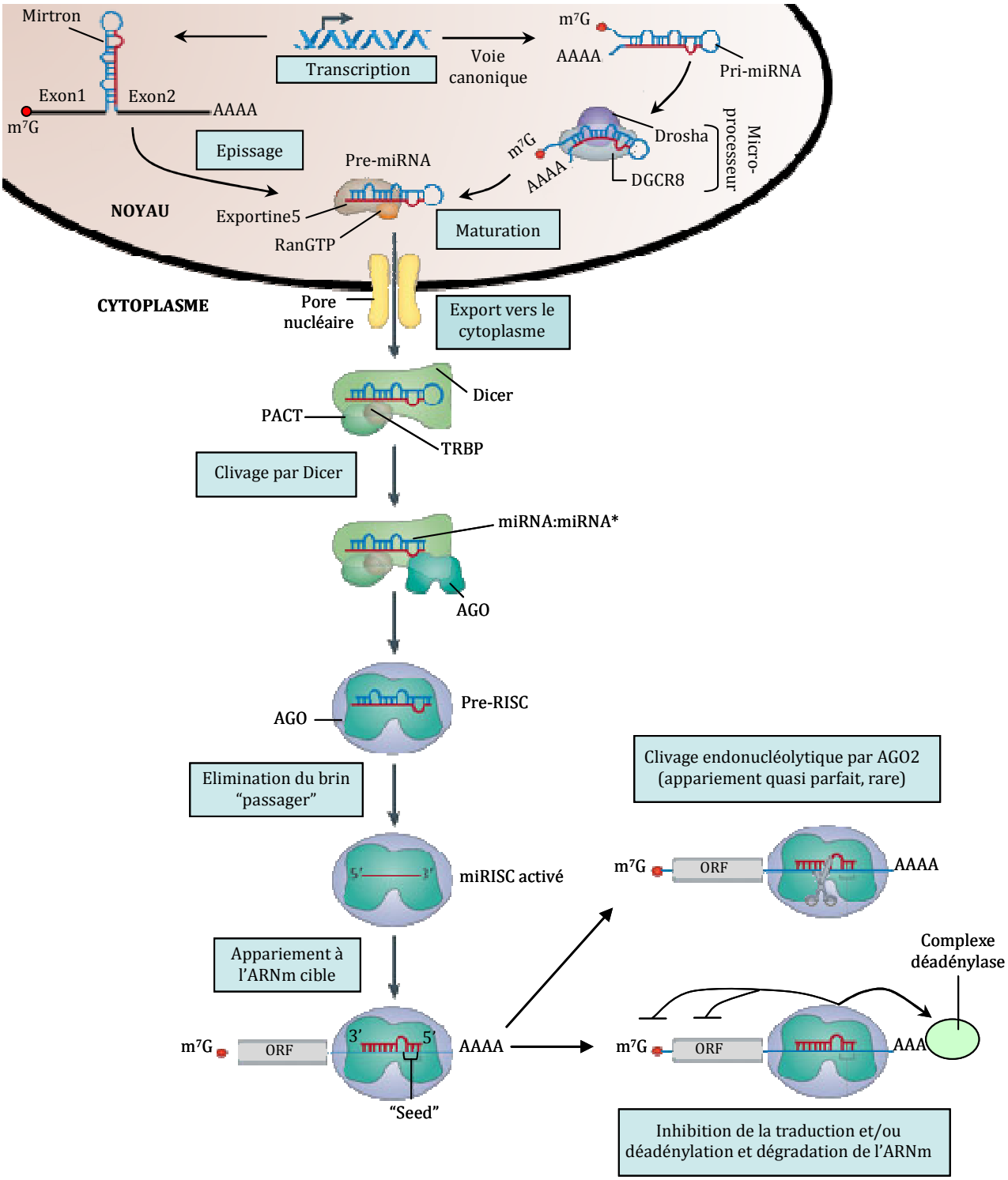


Figure 7 : **La voie miRNA**. *Les gènes codant pour des miRNAs sont transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II (ou III) en un transcrit primaire appelé pri-miRNA. La structure tige-boucle du pri-miRNA est reconnue et excisée par le microprocesseur, un complexe nucléaire composé de la RNAse III Drosha et de la protéine de liaison à l'ARNdb DGCR8, générant ainsi le pre-miRNA (voie canonique). Alternativement, quelques pre-miRNAs constituant de courts introns sont générés directement par épissage (mirtrons). Le pre-miRNA est exporté dans le cytoplasme par le complexe Exportine 5-RanGTP, où il est reconnu par un complexe composé de la RNase III Dicer, et la ou les protéine(s) de liaison à l'ARNdb TRBP et/ou PACT. Dicer clive le pre-miRNA de manière à éliminer la boucle et générer un duplex miRNA :miRNA*.La présence préalable ou le recrutement d'une protéine AGO permet de former le complexe pre-RISC, activé par l'élimination du brin « passager ». Le complexe miRISC activé s'associe à l'ARNm cible grâce à l'appariement partiel du miRNA à une séquence cible située généralement dans le 3'UTR. Dans quelques cas rares d'appariement quasi parfait, AGO2 peut cliver l'ARNm cible. Généralement, la fixation de miRISC sur l'ARNm cible a pour conséquence(s) une inhibtion de la traduction et/ou une déadénylation suivie d'une dégradation de l'ARNm. (Adapté de Davidson et McCray, 2011).*

I.3 Modes d'actions

I.3.1 Appariement à l'ARNm cible

I.3.1.1 Règles classiques d'appariement

La régulation exercée par les miRNAs est spécifique grâce à l'appariement du miRNA mature contenu dans le complexe miRISC avec une séquence partiellement complémentaire située généralement dans le 3'UTR de l'ARNm cible et appelée MRE pour «miRNA Response Element» (Elément de réponse au miRNA). Dans la majorité des cas, l'appariement est imparfait et suit les règles suivantes qui ont été établies par des analyses expérimentales et informatiques (Figure 8) :

- Le critère le plus important est un appariement parfait entre l'ARNm cible et les nucléotides 2-7 en 5' du miRNA, qui constituent la séquence noyau (« seed ») du miRNA ou région de nucléation de l'interaction entre le miRNA et l'ARNm cible. Ce critère a été établi d'après les évidences suivantes : (i) la séquence la plus conservée des miRNAs chez les métazoaires est la région 5' contenant la séquence noyau (Lim et al., 2003); (ii) chez les mammifères, la majorité des gènes codant pour des protéines ont évolué pour maintenir spécifiquement des séquences complémentaires aux séquences noyau d'un ou plusieurs miRNAs (Lewis et al., 2005; Friedman et al., 2009), et de nombreux gènes ont également évolué pour éviter spécifiquement de contenir des séquences complémentaires à des séquences noyau de miRNAs fortement co-exprimés (Farh et al., 2005; Stark et al., 2005) ; (iii) des mutations dans la séquence noyau, donnant lieu à des mésappariements ou des appariements bancals G-U (« wobble ») diminuent considérablement la répression de la cible (Doench and Sharp, 2004; Kloosterman et al., 2004; Brennecke et al., 2005); (iv) des analyses transcriptomiques et protéomiques après inhibition ou sur-expression d'un miRNA montrent un enrichissement en MRE avec la séquence noyau correspondante dans les gènes affectés par le traitement (Lim et al., 2005; Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008) ; et (v) beaucoup des sites prédits par la conservation de la séquence noyau ont été validés fonctionnellement *in vivo.*

- Des mésappariements sont généralement trouvés dans la région centrale (nucléotides 9-12), empêchant le clivage endonucléolytique de l'ARNm cible dans le cas d'un complexe RISC contenant AGO2. Très rarement chez les animaux, des sites cibles fortement complémentaires au miRNA avec un appariement parfait dans la région centrale peuvent entrainer un clivage de l'ARNm cible (Yekta et al., 2004; Davis et al., 2005; Shin et al., 2010).

- Un appariement de 7 pb au niveau de la séquence noyau en 5' sans appariement en 3' peut être suffisant pour réprimer un gène rapporteur cible (Brennecke et al., 2005). Toutefois, la région 3' contient souvent un niveau minimal d'appariements, pour stabiliser l'interaction du miRNA avec sa cible. En particulier, un appariement supplémentaire au niveau des nucléotides 13-16 améliore la spécificité de l'interaction, et un appariement étendu en 3' compense dans certains cas un mésappariement dans la région noyau (Brennecke et al., 2005; Grimson et al., 2007) (Figure 8). Cependant, un appariement étendu en 3' n'est pas suffisant à lui seul pour que la répression soit fonctionnelle sans un degré minimal de complémentarité en 5' (Brennecke et al., 2005).

Il a été estimé à plus de 60% les gènes humains codant pour des protéines qui seraient régulés par des miRNAs (Friedman et al., 2009). Des logiciels de prédiction des cibles des miRNAs (miRanda, PicTar, TargetScan…) ont été développés sur la base des règles décrites ci-dessus, principalement celle de l'appariement parfait au niveau de la séquence noyau, ainsi que sur la conservation des MRE pour favoriser l'identification de sites fonctionnels sélectionnés au cours de l'évolution (Lewis et al., 2003; John et al., 2004; Krek et al., 2005). Ils prédisent plusieurs dizaines à centaines de cibles pour un miRNA donné mais elles n'ont pas toujours une réalité biologique. Des validations expérimentales sont nécessaires dans chaque cas pour montrer qu'une cible prédite est bien une cible du miRNA *in vivo*. Elles reposent généralement sur une approche de surexpression et/ou inhibition du miRNA considéré et la mesure de l'effet sur l'expression de la cible endogène d'une part et sur l'utilisation de gènes rapporteurs comme la luciférase, fusionnée au 3'UTR du gène cible étudié d'autre part. Les logiciels de prédiction de cibles utilisent des paramètres et algorithmes quelque peu différents (Witkos et al., 2011), d'où l'intérêt de croiser les prédictions obtenues par plusieurs d'entre eux. Toutefois, à la lumière des avancées des connaissances sur les intéractions miRNA-ARNm cibles, nous verrons dans le paragraphe suivant que les logiciels utilisés actuellement présentent des limites.

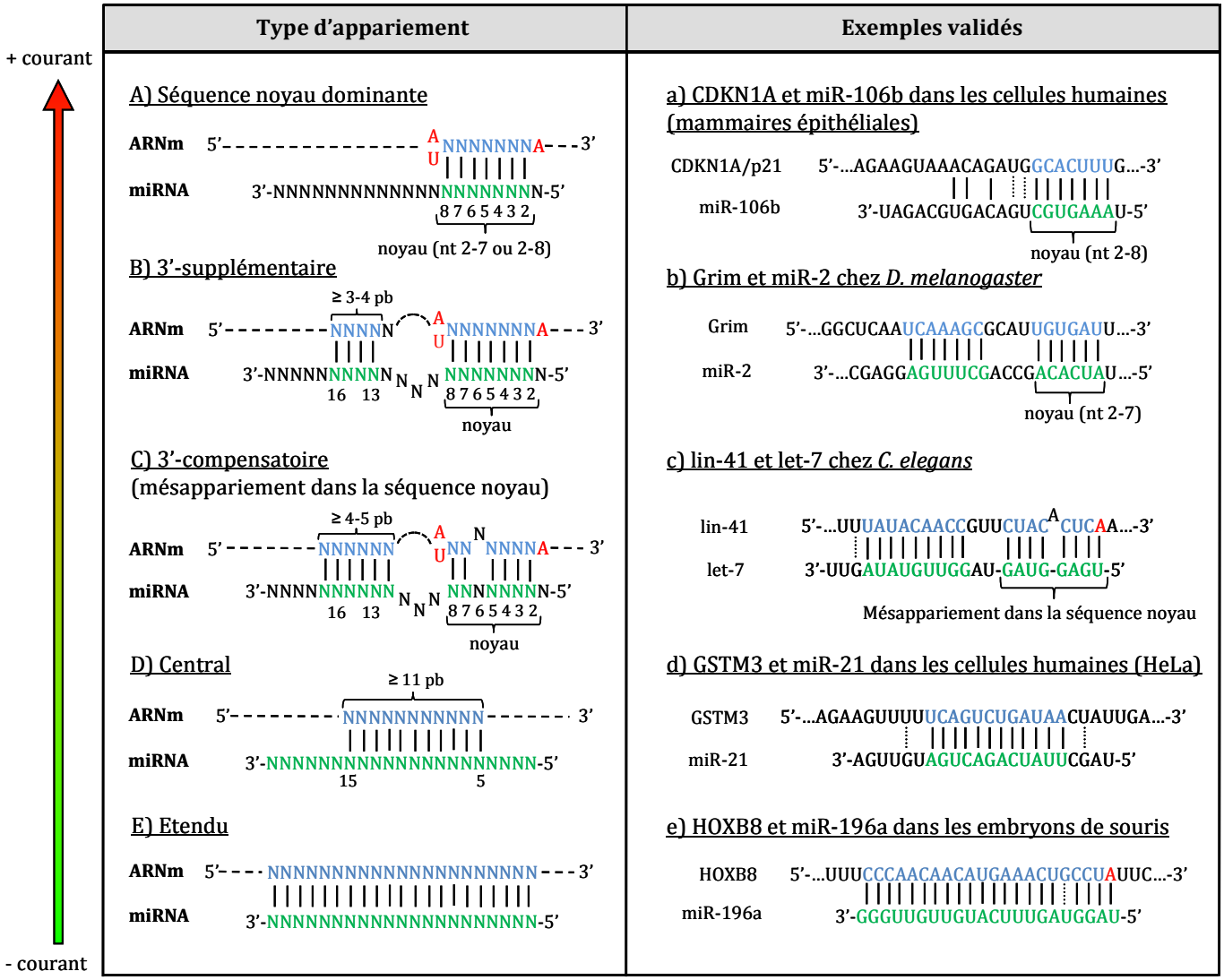


Figure 8 : Appariements entre miRNAs et ARNm cibles. *Types d'appariements possibles entre un miRNA et un ARNm cible du plus courant (A) au moins courant (E) (colonne de gauche) et exemples validés expérimentalement avec la lettre correspondante en minuscule (colonne de droite). (A) Appariement principal au niveau de la séquence noyau (nt 2-7 ou 2-8), (a) (Ivanovska et al., 2008; Davidson and McCray, 2011) ; (B) Un appariement supplémentaire de minimum 3-4 pb généralement centré sur les nt 13-16 améliore l'appariement au niveau de la séquence noyau, (b) (Brennecke et al., 2005) ; (C) Un appariement de minimum 4-5 pb généralement centré sur les nt 13-16 complémente un mésappariement dans la séquence noyau, (c)(Reinhart et al., 2000) ; (D) Appariement central de 11 nt minimum d'affilée qui peut permettre le clivage endonucléolytique par AGO2, (d) (Filipowicz et al., 2008; Hutvagner and Simard, 2008; Bartel, 2009; Shin et al., 2010) ; (E) Appariement étendu qui peut permettre le clivage endonucléolytique par AGO2, (e) (Yekta et al., 2004). (A, B et C) Un résidu adénosine est souvent retrouvé sur l'ARNm en face de la position 1 du miRNA, et un résidu adénosine ou uracile est souvent retrouvé en face de la position 9 (en rouge). La pertinence de la distinction entre (A) et (B) reste à vérifier, des appariements en 3' étant très courants mais la validation expérimentale d'une cible se faisant toujours par des mutations dans la séquence noyau. (Schéma réalisé d'après Filipowicz et al., 2008 ; Bartel, 2009).*

I.3.1.2 Discussion des règles d'appariement

Certains MRE ne respectent pas strictement les règles énoncées ci-dessus, notamment la règle de la séquence noyau. Or, rappellons que les logiciels actuels de prédiction des cibles des miRNAs sont basés principalement sur une complémentarité au niveau de la séquence noyau, introduisant un biais vers la recherche et la validation de ces sites. Par exemple, les deux sites de réponse à let-7 contenus dans le 3'UTR de lin-41 présentent des mésappariements dans la séquence noyau et sont pourtant fonctionnels (Ha et al., 1996; Reinhart et al., 2000; Vella et al., 2004). Cependant, dans les 2 cas, un appariement étendu de 9 nt d'affilée en 3' compense les mésappariements dans la séquence noyau (Figure 8). Même si ces sites avec des appariements « compensatoires » en 3' sont rares, ils semblent avoir été sélectionnés pour des situations particulières. En effet, let-7 est exprimé à un moment précis du développement chez *C. elegans* pour permettre le passage du stade larvaire L4 à l'âge adulte. D'autres miRNAs, miR-48, miR-84 et miR-241, possèdent la même séquence noyau que let-7 mais diffèrent dans le reste de leur séquence (Lau et al., 2001; Lim et al., 2003). Ces miRNAs sont exprimés plus tôt que let-7 et causeraient probablement une transition précoce vers l'âge adulte s'ils régulaient lin-41 (Abbott et al., 2005). let-7 et ces miRNAs possèdent probablement d'autres cibles en commun plus tard au cours du développement, mais les MRE de lin-41 ont évolué de manière à présenter des mésappariements dans la séquence noyau et un appariement étendu avec la séquence 3' de let-7 seul, pour que sa répression soit spécifiquement exercée par let-7 et non par les autres miRNAs ayant la même séquence noyau.

D'autres MRE identifiés et caractérisés depuis présentent des mésappariements dans la séquence noyau. C'est le cas d'un site de réponse à miR-296 contenu dans la séquence codante du facteur de pluripotence Nanog, qui présente un appariement bancal G-U dans la séquence noyau (Tay et al., 2008); d'un MRE contenu dans MCIB (major histocompatibility complex class I-related chain B), un gène intervenant dans la réponse immunitaire, ciblé par un miRNA viral (Stern-Ginossar et al., 2007); ou encore de trois sites de réponses à miR-214 trouvés dans le 3'UTR de disp2, un gène essentiel au développement chez le poisson zèbre (Li et al., 2008). De plus, chez *C. elegans*, l'insertion de un à deux appariements bancals G-U dans la séquence noyau d'un site de réponse cible au miRNA lys-6, est tolérée et la répression du gène rapporteur utilisé est maintenue (Didiano and Hobert, 2006). Enfin, notons que de nouveaux MRE fonctionnels avec des appariements centraux parfaits de 11 nt minimum d'affilée (nucléotides 4-14 ou 5-15) et des appariements imparfaits au niveau de la séquence noyau et en 3' ont été récemment mis en évidence (Shin et al., 2010) (Figure 8). Certains de ces nouveaux MRE étendent la liste des sites permettant un clivage endonucléolytique de l'ARNm cible, même si, *in vivo*, la répression par clivage des ARNm cibles semble demeurer un mécanisme minoritaire.

Chez les métazoaires, les MRE connus sont localisés généralement dans le 3'UTR, et plusieurs copies dans un même ARNm assurent une répression plus efficace (Brennecke et al., 2005). De plus, des MRE proches (10-40 nt d'écart) semblent agir de manière coopérative, avec des effets de répression de la cible plus importants que ceux attendus de la contribution de deux MRE indépendants (Doench and Sharp, 2004; Grimson et al., 2007; Saetrom et al., 2007; Broderick et al., 2011). Cependant, la localisation des MRE dans les 3'UTR est potentiellement biaisée par le fait que les logiciels de prédiction ont précisément focalisé la recherche de ces sites dans les 3'UTR. Ceci est dû premièrement au fait que les MRE des deux premiers miRNAs découverts chez *C. elegans*, lin-4 et let-7, étaient situés dans les 3'UTR des gènes cibles, et deuxièmement au fait que ces logiciels se basent sur la conservation au cours de l'évolution des MRE, plus visibles dans les 3'UTR que dans la séquence codante où ils seraient masqués par la conservation des codons. Or, des études basées sur des constructions de gènes rapporteurs montrent que des MRE localisés artificiellement dans le 5'UTR ou la région codante sont capables de guider la répression du transcrit cible (Kloosterman et al., 2004; Lytle et al., 2007). De plus, différentes études ont mis en évidence l'existence de MRE fonctionnels dans la séquence codante de plusieurs ARNm, dont Dicer et certains variants de DNMT3b chez l'humain, ou encore les facteurs de pluripotence Nanog, Oct4 et Sox2 chez la souris (Duursma et al., 2008; Forman et al., 2008; Tay et al., 2008). L'utilisation d'un algorithme optimisé pour identifier des MRE conservés dans les séquences codantes montre que chez la drosophile, les MRE seraient aussi répandus dans les ORFs que dans les 3'UTR, et quelques MRE identifiés par cette méthode ont été validés fonctionnellement (Schnall-Levin et al., 2010). Toutefois, ces exemples restent rares, et des évidences expérimentales suggèrent que la traduction active par les ribosomes limite l'association de complexes miRISC au niveau de la séquence codante, apportant une explication mécanistique à la localisation préférentielle des MRE dans les régions non codantes (Gu, 2009). D'autres exemples montrent que certains miRNAs sont capables de réguler l'expression de gènes cibles via des MRE situés dans le 5'UTR. Curieusement, dans la plupart des cas, la fixation d'un miRNA sur un MRE localisé dans le 5'UTR s'accompagne d'une activation de la traduction, contrairement à la répression normalement induite par les miRNAs (Henke et al., 2008; Orom et al., 2008; Tsai et al., 2009).

Enfin, d'autres facteurs que l'appariement lui-même interviennent dans la reconnaissance d'une séquence cible par un miRNA et dans sa fonctionnalité. Un de ces facteurs est l'accessibilité du MRE *in vivo*, qui peut être influencée par la structure secondaire de l'ARNm ou encore par l'association de protéines de liaison à l'ARNm, qui peuvent agir comme des modulateurs de l'effet des miRNAs (Bhattacharyya et al., 2006; Ameres et al., 2007; Kedde et al., 2007; Kertesz et al., 2007; Glorian et al., 2011). De plus, le contexte dans lequel se situe le MRE influence l'effet du

miRNA sur la cible. Des éléments de séquence non complémentaires au miRNA mais présents à proximité dans le 3'UTR, comme une région riche en A/U à proximité, sont nécessaires ou améliorent dans certains cas la répression de la cible par le miRNA (Vella et al., 2004; Didiano and Hobert, 2006; Grimson et al., 2007; Nielsen et al., 2007; Sun et al., 2010). La simple prédiction des MRE basée sur les règles décrites au début de ce chapitre est donc insuffisante pour présumer de sa fonctionnalité. La validation expérimentale est indispensable et devrait se faire idéalement dans des conditions se rapprochant le plus possible du contexte cellulaire où s'exprime le miRNA endogène.

I.3.1.3 Conséquences

Les conséquences du mode d'appariement des miRNAs à leurs cibles sont les suivantes :

- **Un système redondant :** Des miRNAs homologues (qui diffèrent de un à deux nucléotides) et identiques existent souvent en plusieurs copies dans le génome. Il existe également de nombreux miRNAs possédant la même séquence noyau. Ces miRNAs ont donc beaucoup de cibles en commun et constituent ainsi des « familles » de miRNAs. Il existe donc une grande redondance structurale et fonctionnelle à la voie miRNA, mise en évidence notamment par les travaux de Miska et al. qui montrent que la délétion de miRNAs individuels dans le génome de *C. elegans* a rarement des conséquences phénotypiques marquées (Miska et al., 2007). L'exemple décrit précédemment avec let-7 et les miRNAs miR-48, miR-84 et miR-241 ayant la même séquence noyau, montre comment cette redondance a pu être contournée dans certains cas grâce à des mutations dans la séquence noyau compensée par des appariements étendus en 3'.

- **Un réseau complexe :** Un miRNA peut réguler de nombreuses cibles. Une famille de miRNAs de mammifères conservée chez les vertébrés au niveau de la séquence noyau a ainsi une moyenne de 300 cibles conservées prédites (Friedman et al., 2009). Expérimentalement, la surexpression d'un miRNA particulier dans des cellules en culture affecte l'expression de centaines de transcrits, dont la plupart sont des cibles prédites du miRNA (Lim et al., 2005; Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008). Inversement, un transcrit est généralement régulé par plusieurs miRNAs. Les interactions miRNAs-cibles constituent donc un réseau complexe qui dépend du contexte cellulaire, et en particulier de la quantité respective de miRNAs et de transcrits cibles. De plus, la fixation d'un miRNA sur un ARNm diminue la quantité disponible de ce miRNA, ajoutant à la complexité du système (Salmena et al., 2011). Par exemple, l'expression d'un pseudogène peut interagir avec l'expression du gène original, en entrant en compétition avec la fixation des mêmes miRNAs (Poliseno et al., 2010b).

I.3.2 Modes de régulation de l'expression de la cible

L'interaction d'un miRNA, associé au complexe RISC activé (miRISC), avec un ARNm cible a pour conséquence une inhibition de l'expression de la cible, grâce à (i) un clivage de l'ARNm cible dans quelques cas très rares d'appariement presque parfait du miRNA à sa cible et par AGO2 exclusivement (Yekta et al., 2004; Davis et al., 2005; Shin et al., 2010), (ii) une inhibition de la traduction ou (iii) une dégradation de l'ARNm. Dans certains cas particuliers, les miRNAs peuvent au contraire activer la traduction d'ARNm cibles. En dehors du cas rare (i) de clivage de l'ARNm, les mécanismes de régulation de l'expression de la cible par les miRNAs sont détaillés dans les paragraphes suivants (Figure 9).

I.3.2.1 GW182 et les « corps-P »

Les protéines de la famille GW182 (GW182 chez la drosophile ; TNRC6A, B et C chez les mammifères ; AIN-1 et AIN-2 chez *C. elegans*) sont des composants de foci cytoplasmiques appelés « corps-P » ou « corps-GW », qui contiennent des enzymes de dégradation des ARNm et sont impliqués dans le catabolisme et/ou le stockage des ARNm non traduits (Eystathioy et al., 2002; Ingelfinger et al., 2002; van Dijk et al., 2002; Eystathioy et al., 2003; Sheth and Parker, 2003). Or, les protéines GW182 sont trouvées également au sein des complexes miRISC où elles jouent un rôle clé dans la répression induite par les miRNAs (Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005a; Rehwinkel et al., 2005; Eulalio et al., 2008). Des protéines AGO et GW182, des miRNAs ainsi que des ARNm réprimés sont d'ailleurs trouvés enrichis dans les « corps-P » (Ding et al., 2005; Jakymiw et al., 2005; Liu et al., 2005a; Liu et al., 2005b; Pillai et al., 2005; Sen and Blau, 2005).

GW182 interagit avec les protéines AGO au niveau de répétitions GW (glycine-tryptophane) en N-terminal et la disruption de cette interaction empêche la répression induite par les miRNAs (Behm-Ansmant et al., 2006; Till et al., 2007; Eulalio et al., 2008; Lian et al., 2009; Takimoto et al., 2009). La fixation artificielle, sans miRNA, de GW182 à un ARNm dans des cellules de drosophile conduit à une répression de l'expression du transcrit, même en absence de AGO1, indiquant que GW182 agit en aval de AGO1 (Behm-Ansmant et al., 2006). De même, dans des cellules humaines, le domaine C-terminal des protéines TNRC6A-C suffit à la répression de la cible, alors que ce domaine n'est pas responsable de l'interaction avec AGO (Lazzaretti et al., 2009; Zipprich et al., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la protéine AGO recrute GW182 au niveau du transcrit cible, puis la région C-terminale de GW182 agit en aval pour induire la répression traductionnelle et/ou la dégradation de l'ARNm.

I.3.2.2 Inhibition de la traduction

La traduction débute par la reconnaissance de la coiffe m^7G en 5' de l'ARNm par eIF4E, une sous-unité du complexe d'initiation eIF4F qui contient également les sous-unités eIF4A et eIF4G. L'interaction d'eIF4G avec eIF3 facilite le recrutement de la petite sous-unité ribosomique 40S, qui commence alors le balayage de la région 5' à la recherche du codon d'initiation AUG, où son association avec la grande sous-unité 60S permet de former le complexe ribosomique 80S et de commencer l'élongation. eIF4G interagit également avec PABPC (poly(A)-binding protein, cytoplasmic), une protéine associée à la queue poly(A) en 3', ce qui permet de donner une conformation circulaire à l'ARNm, et améliore ainsi l'efficacité de la traduction tout en protégeant l'ARNm de la dégradation (Jackson et al., 2010). Le mécanisme par lequel miRISC inhibe la traduction est controversé. Plusieurs études présentent des résultats indiquant un blocage de l'initiation de la traduction, tandis que d'autres études présentent des évidences concernant une répression à des stades post-initiation.

a) Inhibition de l'initiation

Plusieurs résultats indiquent une inhibition de la traduction induite par les miRNAs au stade de l'initiation :

- L'utilisation de gènes rapporteurs montre que les ARNm réprimés par des miRNAs se situent vers le haut du gradient de sédimentation lors de l'analyse des polysomes, ce qui signifie qu'ils sont associés à moins de ribosomes en cours d'élongation que les ARNm contrôles (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Bhattacharyya et al., 2006; Huang et al., 2007). De plus, l'ARNm de CAT1 (« cationic amino acid transporter 1 »), libéré de la répression par miR-122 lors d'une privation en acides aminés dans des cellules hépatiques humaines, est alors recruté plus efficacement au niveau des polysomes (Bhattacharyya et al., 2006). Enfin, alors que les premières expériences réalisées sur lin-14 et lin-28, les cibles endogènes de lin-4 chez *C. elegans*, montraient que leurs ARNm restaient associés aux polysomes, une étude plus récente montre que l'inhibition de plusieurs cibles endogènes de let-7 et lin-4, dont lin-14 et lin-28, s'accompagne d'une diminution de l'association aux polysomes (Ding and Grosshans, 2009).
- Des ARNm rapporteurs produits à partir d'un IRES («Internal Ribosome Entry Site »), ne possèdant pas de coiffe m^7G, ou ayant une coiffe non fonctionnelle (ApppN) ne sont pas efficacement réprimés par les miRNAs (Humphreys et al., 2005; Pillai et al., 2005; Zdanowicz et al., 2009).

- Plusieurs études réalisées *in vitro* sur des extraits cellulaires de cellules humaines, de drosophile, de souris et de lapin, montrent que la coiffe m^7G ainsi que la queue poly(A) sont nécessaires à la répression de la traduction induite par les miRNAs (Wang et al., 2006; Mathonnet et al., 2007; Thermann and Hentze, 2007; Wakiyama et al., 2007).

Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer l'inhibition de l'initiation de la traduction par les miRNAs (Figure 9):

- **Inhibition de la reconnaissance de la coiffe** : A l'aide d'un système *in vitro* basé sur des extraits cellulaires de cellules tumorales d'ascite de souris (Krebs-2) et de gènes rapporteurs cibles de let-7, Mathonnet et al. montrent que l'inhibition induite par let-7 s'accompagne d'une diminution de l'association de l'ARNm cible avec le complexe ribosomique 80S. L'ajout en excès du complexe eIF4F lève l'inhibition induite par let-7, indiquant que la phase de reconnaissance de la coiffe est importante dans le processus d'inhibition de la traduction de l'ARNm cible (Mathonnet et al., 2007). Ces résultats sont confortés par ceux de Thermann et al. qui montrent sur des extraits d'embryons de drosophile que miRISC empêche l'association de la sous-unité 40S à l'ARNm (Thermann and Hentze, 2007). De plus, les travaux de Kiriakidou et al. apportent une hypothèse mécanistique en montrant qu'AGO2 humaine est capable de se fixer spécifiquement à la coiffe via un motif, principalement 2 résidus aromatiques présents dans le domaine MID (Figure 6), ressemblant à celui d'eIF4E. La mutation de ces 2 résidus lève l'inhibition de la traduction induite par la fixation directe d'AGO2 sur l'ARNm, suggérant donc que la fixation d'AGO2 à la coiffe lui permet d'entrer en compétition avec la fixation du complexe d'initiation eIF4E (Kiriakidou et al., 2007). Cependant, des résultats obtenus chez la drosophile sur AGO1 et les cellules de mammifères sur AGO2 viennent contredire cette hypothèse en proposant que ces résidus soient en fait nécessaires à la liaison avec les protéines GW182 (Eulalio et al., 2008; Chen et al., 2009).

- **Inhibition du recrutement de la sous-unité 60S :** Des expériences d'immunoprécipitation couplée à de la spectrométrie de masse ont permis d'identifier eIF6 et la sous-unité ribosomique 60S parmi les facteurs associés au complexe miRISC (Chendrimada et al., 2007). eIF6 est une protéine impliquée dans la biogenèse et la maturation des sous-unités ribosomiques 60S et empêche l'association prématurée des sous-unités 60S et 40S. Son association au complexe miRISC au niveau de l'ARNm cible permettrait donc d'empêcher le recrutement de la sous-unité 60S et donc l'initiation de la traduction. De plus, les auteurs montrent que la déplétion d'eIF6 dans les cellules humaines et chez *C. elegans* lève l'inhibition induite par les miRNAs. Leur hypothèse est corroborée par des expériences de reconstitution acellulaire montrant que les ARNm réprimés par des miRNAs sont enrichis en

ribosomes 40S mais pas 60S (Wang et al., 2008a). Toutefois, ces résultats ne sont pas reproduits par la déplétion d'eIF6 dans les cellules de drosophile (Eulalio et al., 2008). De plus, le rôle d'eIF6 dans la biogenèse de la sous-unité ribosomale 60S complique l'interprétation des résultats obtenus par Chendrimada et al. et suggère que l'effet de la déplétion d'eIF6 puisse être indirect.

b) Inhibition après l'initiation

Différents résultats, parfois très contradictoires avec ceux décrits précédemment, indiquent que l'inhibition de la traduction induite par les miRNAs se fait après l'initiation :

- Les ARNm de gènes rapporteurs réprimés par des miRNAs sont associés aux polysomes. De plus, le traitement à la puromycine, permettant la terminaison prématurée de l'élongation et la dissociation des polysomes, permet de montrer que les ARNm réprimés se décalent vers le haut du gradient de sédimentation, indiquant que la puromycine entraine leur dissociation de polysomes qui étaient engagés dans l'élongation de la traduction (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002; Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006).
- La traduction initiée au niveau d'un IRES peut être réprimée par un mécanisme dépendant des miRNAs (Petersen et al., 2006; Lytle et al., 2007).

Plusieurs mécanismes décrivant l'inhibition de la traduction induite par les miRNAs à des stades post-initiation ont également été proposés (Figure 9) :

- **Détachement des ribosomes pendant l'élongation** : A l'aide d'une construction bicystronique de 2 gènes rapporteurs, dont celui en aval est contrôlé artificiellement par l'introduction de sites de réponse à un miRNA, Petersen et al. montrent que la répression induite par le miRNA diminue le pourcentage naturel de « read through » du codon stop du premier gène rapporteur, indiquant que la fixation des miRNAs dans le 3'UTR interfère avec l'élongation à distance, et suggérant l'induction d'une terminaison prématurée ou l'élimination des ribosomes en cours d'élongation (Petersen et al., 2006). De plus, lorsqu'ils bloquent l'initiation de la traduction avec du hippuristanol, un inhibiteur de eIF4A, les ribosomes se dissocient plus rapidement des ARNm réprimés par les miRNAs que des ARNm contrôles, confirmant que miRISC favorise le détachement des ribosomes.
- **Dégradation des polypeptides naissants** : Des immunoprécipitations de polypeptides naissants tagués en N-terminal montrent qu'aucun polypeptide naissant ne peut être immunoprécipité lorsque l'ARNm correspondant contient des sites de réponse à un miRNA,

alors que les auteurs démontrent que le processus d'élongation a bien lieu (Nottrott et al., 2006). Curieusement, Petersen et al. montrent également par marquage métabolique des polypeptides naissants suivi de pulse-chasse qu'aucun peptide naissant ni complet n'est détecté lorsque l'ARNm est réprimé par un miRNA (Petersen et al., 2006). Nottrott et al. suggèrent donc que miRISC recrute ou est associé à des protéases spécifiques permettant de dégrader les polypeptides naissants (Nottrott et al., 2006). Cependant, aucune protéase pouvant jouer ce rôle n'a été identifiée à ce jour et des résultats démontrant que la répression induite par des miRNAs est maintenue lorsque les polypeptides rapporteurs sont adressés au réticulum endoplasmique (où ils sont protégés de la protéolyse) remettent en question la possibilité d'un mécanisme par lequel les protéines naissantes seraient dégradées dans le cytosol (Pillai et al., 2005).

I.3.2.3 Déadénylation et dégradation de l'ARNm

Alors que les études initiales sur le rôle des miRNAs montraient que le niveau des ARNm réprimés restait inchangé et suggéraient que la répression dépendante des miRNAs n'affecte pas la stabilité des ARNm (Wightman et al., 1993; Olsen and Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002), différentes études réalisées sur l'animal, des cellules en culture ou encore des extraits cellulaires, ont montré depuis que la répression de nombreuses cibles de miRNAs s'accompagne de leur déadénylation et de leur dégradation (Lim et al., 2005; Giraldez et al., 2006; Wu et al., 2006; Wakiyama et al., 2007; Eulalio et al., 2009). De plus, une étude plus récente des cibles des miRNAs initialement identifiés chez *C. elegans* montre que la quantité des transcrits ciblés par ces miRNAs diminue (Bagga et al., 2005). Récemment, des analyses comparatives des modifications protéomiques et transcriptomiques à grande échelle, suite à la surexpression ou à l'inhibition d'un miRNA dans des cellules de mammifères, montrent que la grande majorité des cibles réprimées par un miRNA présentent une diminution de leur niveau d'ARNm qui reflète la diminution en protéine (Baek et al., 2008; Selbach et al., 2008; Hendrickson et al., 2009; Guo et al., 2010). Ces études montrent donc que la répression induite par les miRNAs se traduit majoritairement par une dégradation des transcrits. Notons également que certaines de ces études montrent, grâce à une approche de « profiling » des ribosomes, permettant de les localiser précisément sur l'ARNm, que si un blocage de la traduction intervient, alors il a lieu au stade de l'initiation. En effet, elles montrent que, si le nombre de ribosomes sur des ARNm cibles non dégradés diminue, il diminue de manière équivalente tout au long de l'ARNm, un résultat incompatible avec l'hypothèse du détachement des ribosomes en cours d'élongation (Hendrickson et al., 2009; Guo et al., 2010).

Différentes expériences montrent que GW182 entraine une déadénylation de l'ARNm cible en recrutant le complexe déadénylase CAF1 :CCR4 :NOT1 (plus PAN2 :PAN3 chez les mammifères), puis le décoiffage par le complexe DCP1 :DCP2 et enfin la digestion exonucléolytique 5'-3' vraisemblablement par XRN1 (Rehwinkel et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006; Eulalio et al., 2007b; Chen et al., 2009; Eulalio et al., 2009; Fabian et al., 2009). Si beaucoup des composants des « corps-P », comme DCP1, DCP2, GW182 ou encore des activateurs du décoiffage comme RCK/p54, jouent un rôle dans la répression induite par les miRNAs (Eystathioy et al., 2003; Liu et al., 2005a; Rehwinkel et al., 2005; Behm-Ansmant et al., 2006; Chu and Rana, 2006; Eulalio et al., 2007b), l'intégrité des « corps-P » n'est pas indispensable en soi à la fonction des miRNAs, ce qui suggère que l'enrichissement dans les « corps-P » des ARNm ciblés par les miRNAs est plutôt une conséquence de leur répression qu'une nécessité fonctionnelle (Chu and Rana, 2006; Eulalio et al., 2007a). Ceci est conforté par le fait que la formation des « corps-P » est en revanche dépendante d'une voie miRNA ou RNAi fonctionnelle (Pauley et al., 2006).

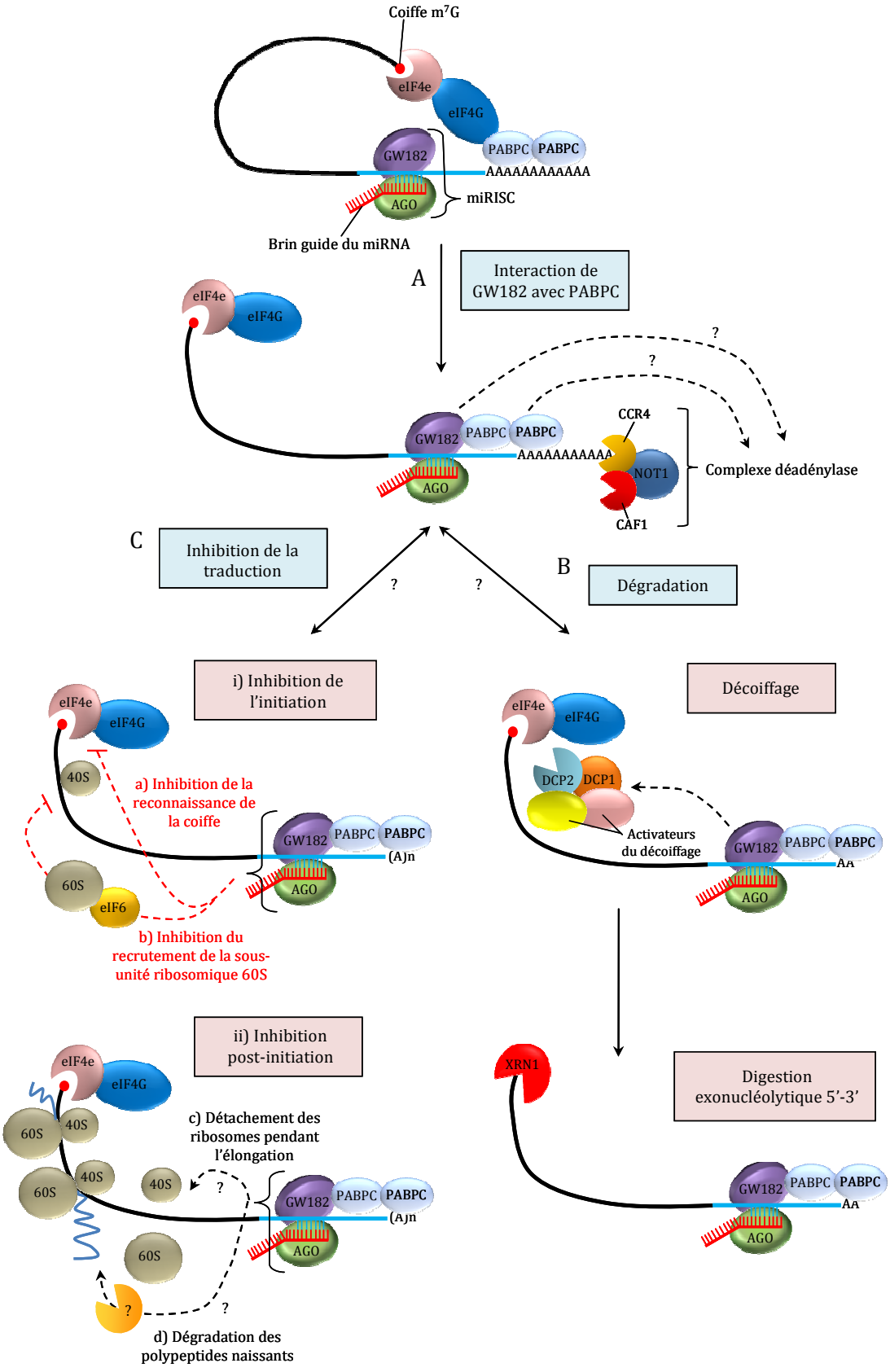


Figure 9 : Mécanismes possibles de la répression des ARNm cibles induite par les miRNAS.
L'ARNm cible est représenté dans sa conformation circulaire, obtenue par l'interaction de PABPC liée à la queue poly(A) avec le facteur eIF4G, lié au facteur de reconnaissance de la coiffe eIF4E. Le miRNA guide le complexe miRISC au niveau de l'ARNm cible en s'appariant de manière partielle (séquence noyau) au niveau d'un site de réponse dans le 3'UTR. La protéine GW182 est recrutée au sein du complexe effecteur miRISC par une interaction directe avec la protéine Argonaute (AGO). (A) L'interaction de GW182 du complexe miRISC avec PABPC a potentiellement plusieurs conséquences : la compétition avec l'interaction

PABPC/eIF4G entraine la perte de la conformation circulaire, ce qui peut participer à (C) l'inhibition de la traduction, tout en exposant la queue poly(A) au complexe déadénylase. GW182 et/ou PABPC interviennent dans le recrutement du complexe déadénylase CCR4 :NOT1 :CAF1. La déadénylation est supposée précéder (B) la dégradation de l'ARNm grâce au décoiffage par le complexe DCP1 :DCP2 (accompagné d'activateurs du décoiffage), et enfin grâce à la digestion 5'-3' de l'ARNm cible par XRN1. Mais la déadénylation peut aussi contribuer à (C) l'inhibition de la traduction. Les incertitudes concernant l'ordre et le lien éventuel entre des évènements, ainsi que sur les acteurs moléculaires de certaines étapes sont représentées par les « ? ». (C) Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer l'inhibition de la traduction induite les miRNAs. (i) L'inhibition de l'initiation de la traduction peut se faire par (a) une inhibition de la reconnaissance de la coiffe, un mécanisme d'interaction de AGO avec la coiffe ayant été proposé, entrant ainsi en compétition avec eIF4E ; ou par (b) l'inhibition de recrutement de la sous-unité ribosomique 60S via le recrutement du facteur eIF6. (ii) L'inhibition des étapes post-initiation peut se faire par deux mécanismes possibles (c) le détachement prématuré des ribosomes en cours d'élongation, ou (d) la dégradation co-traductionnelle des polypeptides naissants par une protéase inconnue. (Schéma réalisé d'après Filipowicz et al., 2008 ; Huntzinger et Izaurralde, 2011).

I.3.2.4 Plusieurs mécanismes ?

Si les mécanismes exacts permettant la répression traductionnelle sont encore sujets à controverse, il paraît clair que les miRNAs peuvent inhiber l'expression de leurs cibles aussi bien par des mécanismes d'inhibition de la traduction que par la dégradation des ARNm, cette deuxième étant beaucoup plus répandue que ce qui était cru initialement (Hendrickson et al., 2009; Guo et al., 2010). On peut alors légitimement se demander si les deux types de mécanismes ne sont pas en fait couplés. La dégradation des ARNm pourrait finalement être une conséquence du blocage de la traduction, et inversement, la déadénylation pourrait conduire indirectement à une inhibition de la traduction, en empêchant l'interaction de PABPC1 avec eIF4G et donc la conformation circulaire de l'ARNm, comme cela a été proposé par Wakiyama et al. Leurs travaux sur des extraits de cellules humaines soulignent l'importance de la queue poly(A) dans la répression induite par let-7 et montre une forte corrélation entre déadénylation et arrêt de la traduction (Wakiyama et al., 2007). Cette hypothèse est confortée par plusieurs études récentes qui apportent un éclairage sur le lien entre déadénylation et inhibition de la traduction en montrant que GW182 interagit avec PAPBC (Fabian et al., 2009; Zekri et al., 2009; Huntzinger et al., 2010). Des mutants de GW182 (*D. melanogaster*) et de TNRC6A (humain) ne pouvant plus interagir avec PABPC ont une activité de répression de la cible fortement inhibée (Huntzinger et al., 2010). Cette interaction pourrait intervenir de différentes manières dans la répression dépendante des miRNAs. Tout d'abord, des études indiquent qu'elle est en compétition avec l'interaction entre PABPC et eIF4G (Fabian et al., 2009; Zekri et al., 2009), empêchant alors vraisemblablement la conformation circulaire de l'ARNm et inhibant ainsi la traduction, tout en exposant l'ARNm à la déadénylation. Par ailleurs, la déplétion de PABPC dans des extraits cellulaires inhibe la déadénylation induite par un miRNA (Fabian et al., 2009), indiquant que PABPC pourrait aussi jouer un rôle dans le recrutement de déadénylases (Zekri et al., 2009). Enfin, PABPC pourrait au contraire jouer un rôle de protection de la queue poly(A)

(Walters et al., 2010), et son interaction avec GW182 pourrait diminuer son affinité pour la queue poly(A) et l'exposer à la déadénylation. Cette hypothèse expliquerait que dans les cellules de drosophile et les cellules humaines, la surexpression de PABPC inhibe la répression dépendante du miRNA (Zekri et al., 2009; Walters et al., 2010), PABPC venant saturer et protéger la queue poly(A).

Plusieurs éléments indiquent cependant que les deux mécanismes (inhibition de la traduction et déadénylation/dégradation) sont indépendants :

- Des ARNm rapporteurs dont la traduction est inhibée grâce à des oligonucléotides hybridés au niveau du site d'initiation, à des structures en épingle à cheveux dans le 5'UTR, ou à une coiffe ApppG qui ne peut pas fixer eIF4E, sont encore déadénylés d'une manière dépendante du miRNA qui les cible, indiquant que la déadénylation n'est pas une simple conséquence de l'inhibition de la traduction (Giraldez et al., 2006; Wu et al., 2006; Eulalio et al., 2009; Fabian et al., 2009). De même, la déadénylation induite par les miRNAs a lieu en présence de cycloheximide ou hippuristanol, des inhibiteurs de la traduction (Eulalio et al., 2007b; Wakiyama et al., 2007; Fabian et al., 2009).

- A l'inverse, l'inhibition de la traduction peut avoir lieu sans déadénylation puisque des ARNm sans queue poly(A) (remplacée par une structure tige-boucle dérivée d'un ARNm d'histone ou par un ribozyme auto-catalytique) sont réprimés de manière dépendante d'un miRNA (même si parfois moins efficacement que leur équivalent polyadénylé) (Wu et al., 2006; Eulalio et al., 2008; Eulalio et al., 2009). De plus, la fixation artificielle de GW182 sur un ARNm réprime la traduction même en absence de NOT1 dans des cellules de drosophile (Eulalio et al., 2008). Ces résultats suggèrent que si la déadénylation renforce et contribue à la répression induite par les miRNAs, elle n'est pas absolument requise.

Il n'est donc pas encore clairement établi si les différents mécanismes d'inhibition proposés sont le fruit d'artefacts liés à différentes approches expérimentales, s'ils correspondent à des évènements secondaires à un mécanisme initial commun, ou encore si les miRNAs sont capables de réprimer leurs cibles par différents mécanismes indépendants. Il est en effet possible que le mécanisme de répression utilisé dans chaque cas dépende du contexte cellulaire, de la cible, du type d'interaction miRNA-cible, ou encore de la présence d'autres protéines de liaison à l'ARNm.

I.3.2.5 Cas particulier : l'activation de la traduction

Comme mentionné précédemment, certains MRE localisés dans le 5'UTR d'ARNm cibles entrainent une activation de la traduction dépendante de la fixation du miRNA, plutôt qu'une répression. Orom et al. montrent ainsi, en utilisant une approche d'expression d'une version de miR-10a biotinylée dans des cellules ES de souris, suivie d'une purification des ARNm cibles associés grâce à des billes de streptavidine et une analyse sur puce, que miR-10a s'associe à des sites de réponse dans le 5'UTR d'ARNm de protéines ribosomales. La fixation de miR-10a à proximité du motif 5'TOP, permettant de réguler la traduction des protéines de la machinerie de traduction en réponse à des agents mitogènes ou à la privation en nutriment, active la traduction des protéines ribosomales cibles (Orom et al., 2008). De même, miR-122, un miRNA spécifique du foie, stimule la réplication de l'ARN du virus de l'hépatite C (HCV) en se fixant à des sites de réponses présents dans le 5'UTR (Jopling et al., 2005; Chang et al., 2008a). En utilisant des constructions de gènes rapporteurs et un mutant de HCV déficient pour la réplication, Henke et al. montrent que la fixation de miR-122 sur 2 sites de réponses présents dans le 5'UTR à proximité de l'IRES, stimule aussi la traduction de l'ARN de HCV (Henke et al., 2008). Cette activation de la traduction se fait au stade de l'initiation, en stimulant l'association de la petite sous-unité ribosomique avec l'ARN de HCV (Henke et al., 2008). Toutefois, Henke et al. ne montrent pas si cette fonction d'activation de la traduction par miR-122 est dépendante des protéines AGO ou du complexe miRISC.

Mais des cas d'activation de l'expression de la cible par des MRE présents dans les 3'UTR existent également. Vasudevan et al. sont les premiers à avoir décrit l'activation de la traduction induite par des miRNAs. Ils découvrent d'abord qu'une région riche en AU (ARE = « AU-rich element ») dans le 3'UTR de l'ARNm de TNFα (Tumor necrosis factor α) devient un signal d'activation de la traduction lors de l'arrêt du cycle cellulaire induit par la privation en sérum, en recrutant AGO et FXR1 (Fragile X mental retardation-related protein 1) (Vasudevan and Steitz, 2007). Ils montrent alors à l'aide de gènes rapporteurs que la fixation de miR-369-3p au niveau de deux sites cibles contenus dans l'ARE de TNFα, est nécessaire à l'activation de la traduction induite par la privation en sérum, en recrutant le complexe miRISC contenant AGO2 et FXR1 (Vasudevan et al., 2007). De la même manière, la traduction d'ARNm rapporteurs avec des sites cibles de let-7 ou d'un miRNA synthétique, est inhibée par le miRNA dans les cellules qui prolifèrent mais est activée lorsque les cellules sont arrêtées par la privation en sérum. Les résultats de Vasudevan et al. indiquent donc que les miRNAs pourraient passer de la répression à l'activation de la traduction en fonction du cycle cellulaire, notamment grâce à l'interaction avec FXR1, qui est trouvé dans le complexe miRISC activateur mais pas dans le répresseur classique. Récemment, l'équipe de Vasudevan a confirmé ces résultats par la mise en évidence de

ce type de régulation positive sur une cible endogène dans des oocytes de xénope (Mortensen et al., 2011). Les oocytes immatures induisent l'expression de gènes, dont la kinase Myt1, permettant de maintenir un état quiescent G0. Les auteurs montrent que Myt1 est une cible endogène de xl-miR-16 dans l'oocyte immature. Sa traduction est activée par miR-16 et requise pour le maintien de l'état immature de l'oocyte, indiquant un rôle physiologique de la régulation positive par un miRNA associée à un état quiescent. Toutefois, il serait prématuré à ce stade de généraliser le fait que les miRNAs activent la traduction dans les cellules quiescentes. En effet, ces résultats n'ont pas été obtenus dans d'autres laboratoires à ce jour, et au contraire, il existe des exemples de répression exercée par les miRNAs dans des cellules arrêtées, comme miR-7 réprimant le facteur de transcription Yan dans les photorécepteurs de l'œil de la drosophile (Li and Carthew, 2005).

I.4 Rôles biologiques

Depuis leur découverte, les miRNAs ont été impliqués dans la régulation de quasiment tous les processus biologiques. Ils jouent un rôle particulièrement clé dans le développement et le maintien des états souches et de différentiation, mais également dans des processus cellulaires comme l'apopotose, la prolifération et la régulation du cycle cellulaire, le métabolisme etc. Des exemples de régulation de processus biologiques par les miRNAs seront donnés en distinguant le type de régulation exercée.

I.4.1 Expression mutuellement exclusive : induction de transitions, sauvegarde et états bistables

De la même manière que lin-4 et let-7 dans le développement hétérochronique de *C. elegans*, l'expression d'un miRNA à un moment précis peut permettre d'amorcer une transition au cours du développement ou de la différentiation en réprimant une ou des cible(s) à un niveau d'expression virtuellement zéro, où elles ne sont plus fonctionnelles. Par exemple, miR-124 participe à la différentiation neuronale en ciblant notamment PTBP1 (« polypyrimidine tract binding protein 1 »), ce qui a pour conséquence un épissage alternatif permettant l'expression d'une protéine spécifique au développement du système nerveux, et SCP1 (« small C-terminal domain phosphatase 1 »), une phosphatase anti-neurale dont la répression est nécessaire à l'induction de la neurogenèse (Makeyev et al., 2007; Visvanathan et al., 2007). De même, miR-181 joue un rôle dans la différentiation des myoblastes en cellules musculaires chez les mammifères, entre autres en ciblant la protéine Hox-A11 (Naguibneva et al., 2006). Il est intéressant de noter que miR-181 s'exprime transitoirement au moment de la différentiation et pas dans le muscle adulte, sauf au niveau de fibres musculaires en cours de régénération,

indiquant qu'il joue un rôle dans l'induction de la transition myoblastes-cellules musculaires différenciées, et pas dans le maintien du phénotype différencié. On peut également citer l'exemple de miR-203, nécessaire à la différentiation précoce de l'ectoderme en épiderme, mis en évidence grâce à un modèle de différentiation de cellules ES humaines en kératinocytes *in vitro* (Nissan et al., 2011). Enfin, des cellules ES de souris déficientes pour le gène DGCR8, donc déficientes en miRNAs matures, sont incapables de se différencier correctement et maintiennent l'expression de facteurs de pluripotence après induction de la différentiation par différents protocoles, confirmant le rôle essentiel des miRNAs dans le processus de différentiation (Wang et al., 2007).

Ce type d'expression mutuellement exclusive (spatiale ou temporelle) entre un miRNA et sa cible permet aussi de maintenir la répression de gènes qui ne doivent pas s'exprimer dans un type cellulaire donné (Stark et al., 2005): expression mutuellement exclusive entre un état souche et un état différencié, entre deux types cellulaires voisins, ou entre un état quiescent et un état prolifératif par exemple. Le miRNA peut alors constituer une sauvegarde supplémentaire à l'encontre de fuites de transcription de gènes dont l'expression, déjà réprimée transcriptionnellement, doit être nulle dans le type cellulaire concerné (Stark et al., 2005; Li et al., 2009a). Dans ce cas, le même facteur de transcription peut être responsable de la répression de la cible au niveau transcriptionnel, et de l'induction du miRNA qui assure une sauvegarde supplémentaire au niveau post-transcritionnel. Rosa et al. montrent par exemple que, dans les cellules ES humaines, le facteur de pluripotence OCT4 réprime transcriptionnellement NR2F2, tandis qu'il active l'expression du cluster miR-302, codant pour 4 variants de miR-302 (a-d), qui assurent un niveau supplémentaire de répression en ciblant NR2F2 au niveau post-transcriptionnel (Rosa and Brivanlou, 2011). Ce facteur de transcription est induit au début de la différentiation neurale et responsable de l'activation transcriptionnelle de gènes neuraux (Figure 10).

Lorsqu'un miRNA fonctionne en s'exprimant de manière mutuellement exclusive avec la cible, son effet est souvent renforcé par une boucle de régulation mutuellement répressive (directe ou indirecte) avec la cible (Fazi et al., 2005; Johnston et al., 2005; Li and Carthew, 2005; Bracken et al., 2008; Rybak et al., 2008; Hassan et al., 2010; Dey et al., 2011; Rosa and Brivanlou, 2011). Ces boucles de répression mutuelles permettent de renforcer la bistabilité, c'est-à-dire l'expression du miRNA ou de la cible exclusivement dans l'un ou l'autre des deux états possibles de la cellule (Figure 10). Par exemple, dans le cas de la régulation OCT4/miR-302/NR2F2, NR2F2 réprime aussi transcriptionnellement OCT4 (Rosa and Brivanlou, 2011), incluant indirectement miR-302 dans une boucle de régulation négative, assurant que lorsque l'expression de NR2F2 est induite

lors de la différentiation, l'expression de OCT4, et par conséquent de miR-302, est inhibée (Figure 10). Un exemple simple de boucle bistable directe a été mis en évidence dans le développement de l'œil chez *D. melanogaster* où le facteur de transcription Yan réprime la transcription de miR-7 dans les progéniteurs, et miR-7 réprime l'expression de Yan dans les photorécepteurs différentiés (Li and Carthew, 2005). Le « switch » d'expression est amorcé par la voie EGFR qui entraine transitoirement la dégradation de Yan au moment de la différentiation des progéniteurs. Chez les mammifères, lin-28, un marqueur de pluripotence exprimé dans les cellules ES, est une cible du miRNA let-7 (Rybak et al., 2008; Zhong et al., 2010), lui-même exprimé au contraire dans les cellules différenciées, et notamment au moment de la différentiation des cellules ES en cellules souches neurales (Rybak et al., 2008). Or, lin-28 inhibe la production de let-7 mature dans les cellules ES en bloquant sa maturation à deux niveaux : dans le noyau, sa fixation au niveau de la boucle de pri-let-7 bloque la maturation en pre-let-7 par le microprocesseur (Piskounova et al., 2008; Viswanathan et al., 2008; Newman and Hammond, 2010), et dans le cytoplasme, lin-28 recrute une TUTase qui uridyle spécifiquement pre-let-7 et quelques autres miRNAs, bloquant ainsi leur clivage par Dicer (Hagan et al., 2009; Heo et al., 2009). Cette boucle de régulation négative entre lin-28 et let-7 joue un rôle dans la différentiation neurale des cellules ES, avec lin-28 assurant le maintien de l'état de pluripotence en réprimant let-7, et let-7 agissant comme une sauvegarde en réprimant lin-28 une fois la différentiation neurale amorcée (Rybak et al., 2008).

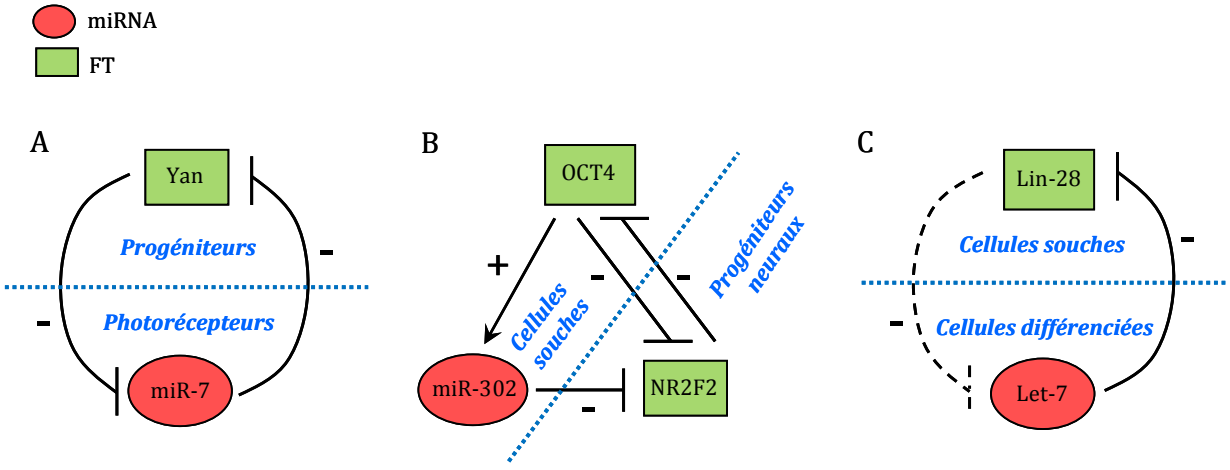


Figure 10 : Exemples de boucles de régulation mutuellement répressives impliquant des miRNAs. *(A) Boucle de régulation mutuellement répressive lors du développement de l'œil chez D. melanogaster entre le facteur de transcription (FT) Yan, exprimé dans les progéniteurs, et miR-7, exprimé dans les photorécepteurs différenciés. Le « switch » d'expression est amorcé par la voie EGFR qui entraine transitoirement la dégradation de Yan au moment de la différentiation des progéniteurs. (B) Boucle de régulation dans les cellules ES humaines où le FT OCT4 réprime transcriptionnellement l'expression de NR2F2, exprimé lors de la différentiation neurale, et induit l'expression de miR-302, qui assure un niveau supplémentaire de répression en ciblant NR2F2 au niveau post-transcriptionnel. A l'inverse, NR2F2 réprime transcriptionnellement OCT4 lors de la différentiation neurale. (C) Boucle de régulation mutuellement répressive entre lin-28 et let-7 chez les mammifères. Lin-28, exprimé dans les cellules ES, inhibe à plusieurs niveaux la maturation de let-7. Les pointillés indiquent qu'il ne s'agit pas ici d'une répression directe au niveau transcriptionnel, mais une inhibition de la maturation du pri-miRNA par Drosha dans le noyau, et du pre-miRNA par Dicer dans le cytoplasme. let-7 s'exprime au contraire dans les cellules différenciées, et réprime l'expression de lin-28.*

I.4.2 Co-expression : affinage du niveau d'expression de la cible

Contrairement aux cas précédents, un miRNA et sa cible sont parfois co-exprimés (Farh et al., 2005; Sood et al., 2006). Les miRNAs agissent dans ce cas comme des sortes de rhéostats permettant d'ajuster finement le niveau d'expression de la cible à un niveau optimal pour sa fonctionnalité. Karres et al. montrent par exemple que chez la drosophile, la régulation de l'atrophine par miR-8 (interaction conservée chez les mammifères) réduit l'expression de cette protéine à un niveau prévenant la neurodégénérescence, mais pas trop bas pour ne pas compromettre la viabilité (Karres et al., 2007). De même, une étude sur des cellules murines des îlots pancréatiques montre que miR-375, un miRNA spécifique du pancréas, réprime l'expression de la myotrophine (Mtpn) nécessaire à l'exocytose de l'insuline, à un niveau permettant toutefois que la sécrétion de l'insuline soit fonctionnelle (Poy et al., 2004).

Dans le cas de co-expression, un miRNA et sa cible peuvent être induits par le même facteur de transcription. Par exemple, les facteurs de transcription E2F1-3 sont activés lors de l'entrée dans le cycle cellulaire et induisent l'expression des gènes nécessaires à la réplication et à la mitose. Bueno et al. montrent en stimulant l'entrée dans le cycle cellulaire de MEFs (« mouse embryonic fibroblasts »), que les facteurs E2F1 et E2F3 induisent l'expression de miRNAs (let-7a-7d, let-7i, mir-15b-16-2, et mir-106b-25) lors de la transition G1/S, et que ces miRNAs régulent négativement des activateurs de l'entrée en phase S induits par les facteurs E2F (Bueno et al., 2010). Ces miRNAs agissent comme une sécurité en empêchant la trop forte expression de gènes activateurs du cycle pouvant entrainer un stress réplicatif en réponse aux signaux mitogènes. De même, une boucle de régulation entre E2F et le cluster mir-17-92 a été établie, avec les facteurs E2F activant l'expression de ce cluster de miRNAs (Sylvestre et al., 2007; Woods et al., 2007), et certains membres du cluster (miR-17-5p, miR-20a) régulant négativement les facteurs E2F (O'Donnell et al., 2005; Sylvestre et al., 2007). Contrairement aux boucles mutuellement répressives décrites précédemment et favorisant la bistabilité, ce type de régulation favorise l'homéostasie, c'est-à-dire le retour à un état d'équilibre unique. Bien que miR-17-92 favorise par ailleurs la prolifération en réprimant des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p21/CDKN1A (Fontana et al., 2008; Ivanovska et al., 2008; Inomata et al., 2009; Wong et al., 2010), la boucle d'auto-régulation avec E2F pourrait être un moyen d'empêcher une accumulation anormale des facteurs E2F en réponse à des stimuli mitogènes (Pickering et al., 2009), conduisant à un stress réplicatif, à l'apoptose ou à une prolifération incontrôlée. Sur un même schéma, E2F1 active l'expression de mir-106b-25 tandis que des membres de ce cluster, miR-106b (appartenant à la même famille que miR-17-5p et miR-20a) et miR-93, régulent négativement l'expression d'E2F1 (Petrocca et al., 2008; Li et al., 2009b).

La délétion de miRNAs individuels chez *C. elegans* a généralement, contrairement aux mutants lin-4 et let-7, des conséquences phénotypiques limitées (Miska et al., 2007). Cette étude montre que la majorité des miRNAs individuels n'intervient pas dans des régulations essentielles au développement ou à la survie. Ce résultat est lié d'une part à la grande redondance des miRNAs déjà évoquée, mais est cohérent d'autre part avec le fait que les miRNAs agissent plutôt comme des rhéostats pour une régulation plus fine de l'expression des protéines cibles, ou comme une sauvegarde supplémentaire à l'encontre de cibles déjà réprimées transcriptionnellement, assurant ainsi une robustesse des systèmes biologiques complexes.

I.4.3 Maintien des états cellulaires spatio-temporels

Différentes études basées sur des clonages des petits ARNs et leur séquençage, des hybridations *in situ* ou la quantification de l'expression des miRNAs sur puce, montrent que certains miRNAs sont hautement spécifiques d'un tissu, d'un type cellulaire ou d'un stade de différentiation, constituant ainsi des profils d'expression spécifiques (Lagos-Quintana et al., 2002; Babak et al., 2004; Sempere et al., 2004; Deo et al., 2006; Strauss et al., 2006; Beuvink et al., 2007; Landgraf et al., 2007). Le séquençage et le clonage de 250 bibliothèques de petits ARNs provenant de 26 organes ou types cellulaires différents de rat et humain montre que seulement 70 miRNAs matures s'expriment en moyenne par type d'échantillon (Landgraf et al., 2007). De plus, dans la plupart des cas, peu de miRNAs constituent la majorité des miRNAs exprimés. En effet, une étude comparative de l'expression des miRNAs dans des lymphocytes B normaux et issus de leucémies lymphoïdes chroniques montre que dans les deux cas, 20 espèces différentes de miRNAs représentent plus de 90% des miRNAs clonés (Fulci et al., 2007). De même, l'étude du profil d'expression des miRNAs dans les lymphocytes T montre que seulement 7 miRNAs représentent 60% des miRNAs exprimés (Wu et al., 2007). Le clonage des miRNAs dans l'épiderme et le follicule pileux de souris montre que 10 et 3 espèces respectivement représentent environ 50% des miRNAs clonés (Yi et al., 2006). Notons également que le nombre de miRNAs exprimés est plus important dans les cellules différenciées par rapport aux cellules souches (Strauss et al., 2006), ce qui est cohérent avec le rôle important que jouent les miRNAs dans l'induction de la différentiation puis le maintien des états différenciés, comme décrit précédemment.

Quelques miRNAs, possédant pour la plupart la même séquence noyau, sont exprimés spécifiquement dans les cellules ES humaines et de souris, et réprimés lors de la différentiation (Houbaviy et al., 2003; Suh et al., 2004; Strauss et al., 2006; Chen et al., 2007; Bar et al., 2008; Laurent, 2008; Morin et al., 2008). Les principaux miRNAs spécifiques des cellules ES incluent

des miRNAs du cluster mir-302 chez l'homme et la souris (miR-302a-d), le cluster miR-290 (miR-290-295) chez la souris et son équivalent miR-371-373 chez l'homme. Or, l'expression de miR-302b (ou miR-372) en plus des facteurs de pluripotence utilisés habituellement (Takahashi and Yamanaka, 2006), permet d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation de fibroblastes humains en cellules souches pluripotentes induites (iPSC = « induced Pluripotent Stem Cells ») (Subramanyam et al., 2011). Lin et al. montrent même, grâce à l'utilisation d'un modèle d'expression inductible du cluster mir-302a-d, que l'expression de miR-302 suffit, à partir d'un certain seuil, pour reprogrammer des cellules humaines du follicule pileux en iPSC (Lin et al., 2011). Tandis que Lin et al. montrent que le mécanisme passe par la répression par miR-302 de régulateurs épigénétiques permettant une déméthylation globale du génome, Subramanyam et al. montrent que miR-302 et miR-372 augmentent la reprogrammation en régulant plusieurs cibles intervenant également dans la régulation épigénétique mais aussi le cycle cellulaire ou encore la transition « MET » (mésenchyme-épithéliale). Ces résultats indiquent que quelques miRNAs jouent un rôle clé dans le maintien des caractéristiques des cellules souches pluripotentes en ciblant plusieurs voies de signalisation cellulaires.

De même, la transfection d'un miRNA spécifique d'un tissu, comme miR-1 (spécifique du muscle et du cœur) ou miR-124 (spécifique du cerveau) dans des cellules HeLa, modifie le profil d'expression des ARNm vers celui du tissu en question, avec une centaine de transcrits réprimés enrichis en cibles prédites du miRNA transfecté (Lim et al., 2005). Certains miRNAs spécifiques d'un tissu sont donc capables de modifier l'expression de nombreux gènes, jouant ainsi un rôle dans la définition de l'identité tissulaire.

Les miRNAs étant capables de cibler plusieurs dizaines de cibles, et les ARNm pouvant eux-mêmes être ciblés par plusieurs miRNAs, ces exemples montrent que les interactions entre miRNAs et cibles peuvent être vues comme un réseau où quelques miRNAs spécifiques assurent le maintien d'états spatio-temporels cellulaires tels que l'identité tissulaire ou les états souches et différenciés.

II. Micro-ARNs et cancer

La tumorigenèse, de la transformation cellulaire à la formation de tumeurs cancéreuses, est un processus complexe nécessitant que des cellules somatiques normales acquièrent un certain nombre de caractéristiques. Celles-ci ont été répertoriées et complétées récemment par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011). La caractéristique principale des cellules cancéreuses est leur capacité à proliférer de manière incontrôlée et infinie. Cette capacité est le résultat de : un signal de prolifération soutenu, l'échappement aux signaux inhibiteurs de prolifération, une résistance à la mort cellulaire et une immortalisation réplicative. L'acquisition de ces caractéristiques a longtemps été associée à des gains et/ou pertes d'expression de gènes codant pour des protéines (activation d'oncogènes et/ou inactivation de suppresseurs de tumeurs), au travers de modifications génétiques (mutations, délétions ou amplifications chromosomiques…) ou épigénétiques (méthylation des promoteurs). La découverte du rôle important des miRNAs dans des processus biologiques comme la prolifération, la différentiation ou l'apoptose, ainsi que le fait qu'environ 50% des gènes humains codant pour des miRNAs sont localisés au niveau de sites chromosomiques fragiles ou dans des régions chromosomiques fréquemment altérées (déletées ou amplifiées) dans les cancers (Calin et al., 2004b), implique que la dérégulation de leur expression puisse intervenir dans les pathologies néoplasiques. Ce chapitre décrira donc le lien entre miRNAs et cancer, l'expression des miRNAs ainsi que celle d'acteurs de la voie miRNA étant effectivement dérégulées dans les cancers, et certains miRNAs se comportant individuellement comme des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs *in vivo.*

II.1 Profils d'expression des micro-ARNs dans les cancers

II.1.1 Profils et signatures d'expression

De nombreuses études d'analyse globale de l'expression des miRNAs dans les cancers ont été réalisées grâce au développement et à l'utilisation de puces, au clonage et séquençage des petits ARNs, à de la RT-PCR quantitative en temps réel ou au développement de méthodes à façon. Concernant les techniques expérimentales pour l'étude des miRNAs, il faut garder à l'esprit qu'elles se sont développées en parallèle de l'avancement des connaissances sur les miRNAs au cours des dix dernières années. Beaucoup des études ayant établi des profils d'expression des miRNAs ont utilisé des puces avec hybridation sur des sondes oligonucléotidiques. Plusieurs différences avec les puces mesurant l'expression des ARNm font que l'utilisation de cette méthode pour les miRNAs a présenté des limites. Tout d'abord, la normalisation de l'expression se fait généralement par rapport à l'expression médiane de toute la puce, ce qui, compte-tenu du faible nombre de miRNAs testés (quelques centaines) et du faible nombre parmi ceux-ci qui

s'expriment significativement, n'est pas approprié. De plus la petite taille des miRNAs (20-22 nt) pose plusieurs problèmes, dont celui de la spécificité de l'appariement, avec beaucoup de miRNAs qui diffèrent de un ou deux nucléotides seulement. Cette petite taille pose également un problème de Tm (« melting temperature » ou température d'hybridation) qui varie beaucoup en fonction de la composition en bases. Dans le cas des ARNm, leur longueur permet de choisir pour les sondes de la puce des régions spécifiques et dont la composition en base va être homogène pour avoir le même Tm pour toute la puce. La taille des miRNAs ne laisse pas cette liberté et peut avoir pour conséquence que certains s'hybrident mieux que d'autres. L'utilisation des puces a tout de même permis d'obtenir des résultats intéressants mettant en évidence des miRNAs sur- et sous-exprimés dans certains types tumoraux mais ont peut-être laissé passer des différences d'expression plus subtiles à cause des limites décrites.

Quelques études ont réalisé des analyses comparatives des profils d'expression des miRNAs dans les tissus tumoraux en général par rapport aux tissus normaux (Lu et al., 2005; Volinia et al., 2006; Navon et al., 2009; Wang et al., 2010b). Lu et al. ont pour cela développé une technique de cytométrie de flux basée sur des micro-billes imprégnées de mélanges variables de deux marqueurs fluorescents et couplées à des sondes oligonucléotidiques complémentaires aux miRNAs, de sorte que chaque couleur de bille corresponde à un miRNA (Lu et al., 2005). Les miRNAs exprimés dans les échantillons sont amplifiés par RT-PCR avec un primer biotinylé, hybridés aux billes, puis marqués en fluorescence par la fixation de streptavidine-phycoérythrine, l'intensité de la phycoérythrine correspondant donc à la quantité du miRNA. L'analyse de l'expression de 217 miRNAs dans 334 leucémies et tumeurs solides montre que l'expression des miRNAs permet de classer les types de cancers en fonction du tissu d'origine et du stade de différentiation. L'expression des miRNAs permet aussi de distinguer les tissus tumoraux des tissus normaux avec une majorité de miRNAs diminuée dans les cancers par rapport aux tissus normaux (Figure 11). L'étude menée par Volinia et al. analyse, par hybridation sur puce, l'expression de 228 miRNAs dans 363 échantillons correspondant à 6 types de tumeurs solides et 177 échantillons de tissus normaux. Une analyse de classification hiérarchique montre, comme Lu et al., que l'expression des miRNAs permet de classer les échantillons tumoraux en fonction de leur tissu d'origine, ce qui est cohérent avec l'existence de miRNAs hautement tissu-spécifiques comme cela a été décrit dans la première partie de ce manuscrit. Les résultats montrent aussi que les cellules cancéreuses ont un profil d'expression différent des cellules normales, avec 26 miRNAs significativement surexprimés et 17 sous-exprimés. Ils identifient une signature d'expression permettant de distinguer les échantillons tumoraux des tissus normaux, et n'y conservent que les miRNAs communs à au moins 3 types tumoraux de manière à éliminer les miRNAs exprimés différentiellement car spécifiques d'un

tissu. Parmi les miRNAs les plus surexprimés dans les cancers par rapport aux tissus normaux, ils identifient plusieurs miRNAs oncogènes (voir *II.2. micro-ARNs suppresseurs de tumeurs et oncogènes*), comme miR-21, miR-17-5p, miR-20a, miR-92 et miR-155. Les résultats de Volinia et al. diffèrent donc en partie de ceux de Lu et al. qui montrent une diminution de la majorité des miRNAs dans les cancers par rapport aux tissus normaux. Notons cependant que les méthodes utilisées sont très différentes puisque Volinia et al. utilisent des puces pour l'analyse des miRNAs, avec les limites déjà décrites que présente cette technique. Lu et al. utilisent quant à eux un contrôle interne (miRNA synthétique ajouté dans l'échantillon) avec leur méthode de micro-billes analysées en cytométrie de flux. Ils comparent exclusivement l'ensemble des tissus tumoraux par rapport à l'ensemble des tissus normaux, ce qui leur permet de pointer la diminution globale des miRNAs, mais ne font pas une analyse tissu par tissu, qui leur aurait peut-être permis de mettre en évidence la surexpression de certains miRNAs spécifiques à certains types tumoraux. Une étude menée par Ozen et al. utilise des puces pour établir les profils d'expression des miRNAs dans 16 échantillons tumoraux et 10 échantillons normaux de prostate (Ozen et al., 2008). Cette étude montre que seulement 85 miRNAs sur 480 testés sont détectables et que l'expression de 76/85 miRNAs sont diminués dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux. Dans leur étude, les auteurs comparent leurs résultats avec les données de Lu et al. (2005) et celles de Volinia et al. (2006) concernant les échantillons de prostate (Figure 11). S'ils retrouvent la diminution globale montrée par Lu et al., cette comparaison permet de visualiser que les résultats obtenus par Volinia et al. sont en revanche différents. Les auteurs proposent plusieurs différences dans le protocole expérimental pouvant expliquer les différences de résultats, notamment la méthode de purification de l'ARN, Volinia et al. purifiant l'ARN total y compris les pre-miRNAs qui peuvent s'apparier sur les sondes de la puce utilisée (Liu et al., 2004a), tandis que les deux autres études purifient les petits ARNs. De plus, l'origine des tissus contrôles non tumoraux n'est pas la même puisque dans le cas de Ozen et al. ils proviennent de zones périphériques chez les mêmes patients qui ont subi une prostatectomie, tandis que ceux de Volinia et al. proviennent d'autres personnes n'ayant pas de cancer de la prostate. Cet exemple illustre bien les différences de résultats obtenus parmi toutes les études de profils d'expression, dépendamment de la méthode utilisée et de beaucoup d'autres facteurs comme le choix des contrôles non tumoraux.

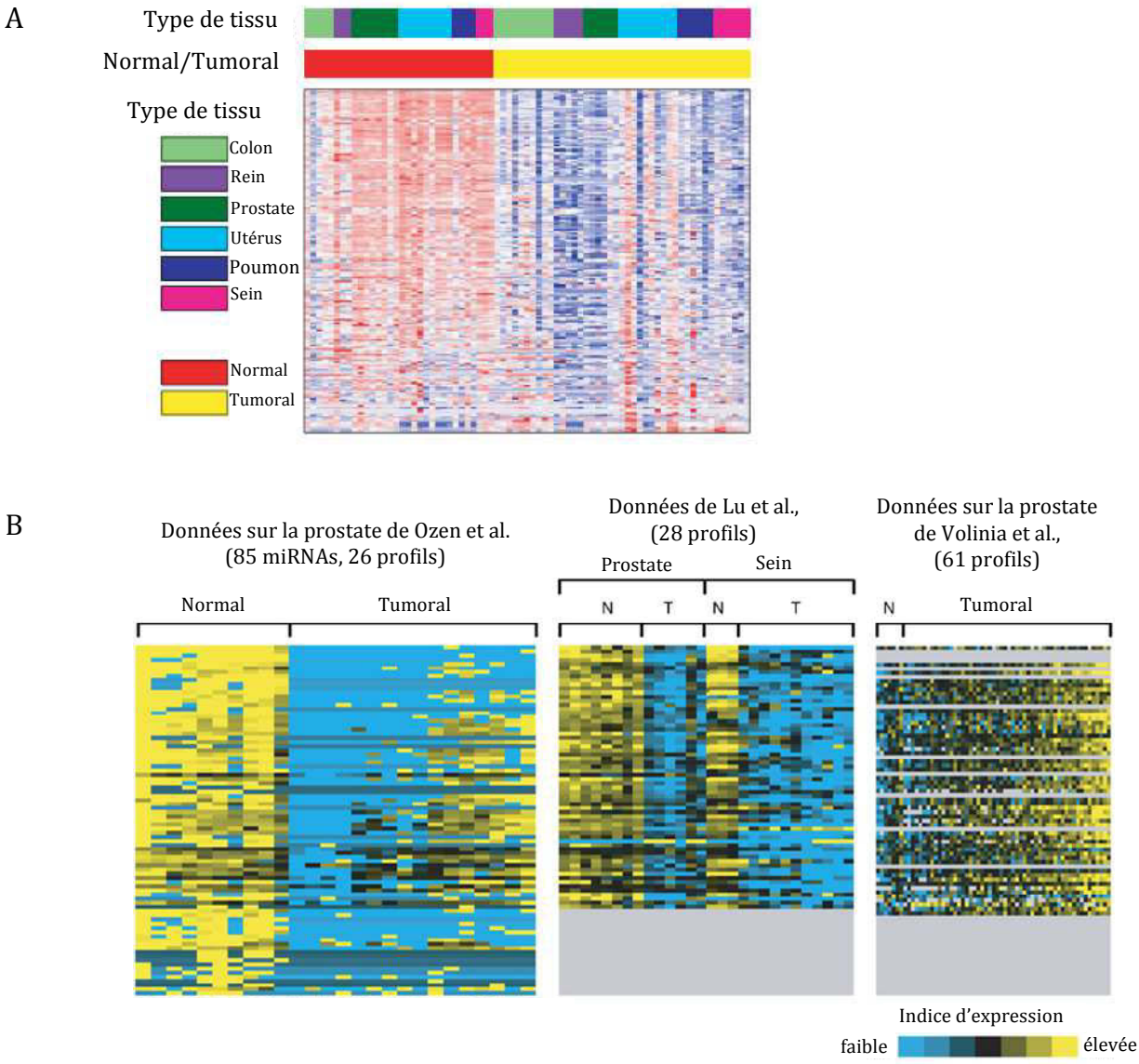


Figure 11 : Diminution de la majorité des miRNAs dans les tissus tumoraux. *A) Profils d'expression obtenus par Lu et al. avec la technique des micro-billes analysées en cytométrie de flux pour les miRNAs exprimés différentiellement dans les tissus normaux (gauche) par rapport aux tissus tumoraux (droite), en rouge les miRNAs fortement exprimés, en bleu les miRNAs faiblement exprimés (D'après Lu et al., 2005). B) Profils d'expression obtenus par analyse sur puce pour 85 miRNAs exprimés dans 10 échantillons normaux et 16 échantillons tumoraux de prostate (à gauche) par Ozen et al. et comparaison avec les résultats obtenus par Lu et al. (2005) (milieu) et Volinia et al. (2006) (à droite) sur des échantillons de prostate (D'après Ozen et al., 2007). N=normal, T=tumoral.*

D'autres études ont réalisé des comparaisons de l'expression des miRNAs dans les cancers en général par rapport aux tissus normaux, cherchant à identifier des miRNAs potentiellement oncogènes ou suppresseurs de tumeurs. Wang et al. ont mis en commun et ré-analysé les résultats de puces de 28 études comparant l'expression des miRNAs dans un type tumoral donné par rapport au tissu normal correspondant (Wang et al., 2011). La mise en commun de ces 28 études inclut 16 types tumoraux différents. Wang et al. montrent que 52 miRNAs sont exprimés différentiellement dans les tumeurs en général par rapport aux tissus normaux, dont 29 diminués et 23 induits. Parmi ceux-ci, on retrouve plusieurs miRNAs appartenant aux mêmes familles comme 125a/b qui sont diminués, ou miR-103/107 et des membres des clusters de la famille miR-17-92 (18a/b, 25/92a, et 17-5p/20/93/106) (Figure 12) qui sont induits et dont il sera question plus tard dans le manuscrit pour leurs rôles dans la tumorigenèse. Wang et al. montrent également que certains miRNAs sont spécifiquement dérégulés par type de cancer. Une autre étude compare 28 paires de tissus normaux et tumoraux correspondant à 8 types de cancers différents pour identifier des miRNAs sur- ou sous-exprimés dans les cancers en général (Navon et al., 2009). L'analyse sur puce de plus de 700 miRNAs met en évidence 41 miRNAs surexprimés et 17 sous-exprimés dans les cancers. Parmi les miRNAs surexprimés, ils retrouvent encore tous les membres du cluster oncogénique mir-17-92. Une autre étude a mesuré par qRT-PCR en temps réel l'expression de 241 miRNAs dans les 59 lignées cellulaires cancéreuses humaines du panel NCI-60 et les a comparées aux expressions dans 13 tissus normaux (Gaur et al., 2007). La classification des échantillons basée sur l'expression des miRNAs donne six groupes dont deux rassemblent tous les tissus normaux. Les lignées cancéreuses sont majoritairement regroupées en fonction du tissu d'origine notamment les lignées d'origine hématopoïétique, du système nerveux, du côlon, et les mélanomes. En revanche, des disparités au sein d'un même type tumoral sont mises en évidences par le fait que les lignées tumorales de sein, de poumon, des ovaires et de la prostate ne sont pas toutes regroupées par type de tissu. L'étude montre que 81 miRNAs suffisent à distinguer significativement les différents groupes et à refaire la classification. Parmi ces 81 miRNAs, certains sont exprimés spécifiquement à un type tumoral et constituent des signatures d'expression permettant de distinguer ce type tumoral des autres lignées. De plus, l'étude montre encore une fois que l'expression des miRNAs est majoritairement diminuée dans les lignées cancéreuses par rapport aux tissus normaux même si, dans ce cas, la diminution globale dans les lignées pourrait être une conséquence de la culture *in vitro*.

Les très nombreuses études ayant comparé l'expression des miRNAs dans un type tumoral particulier par rapport au tissu normal correspondant montrent toutes que le profil des miRNAs dans les tumeurs est significativement différent de celui des cellules normales provenant du

même tissu, et permettent généralement de dégager une signature d'expression de quelques miRNAs différentiellement exprimés caractérisant le type tumoral. Compte-tenu du très grand nombre d'études ayant réalisé des profils d'expression dans les cancers, les exemples de profils de miRNAs réalisés dans les cancers du sein sont répertoriés dans le Tableau 1 ci-dessous. Cet exemple illustre bien l'évolution des techniques utilisées, allant des puces au séquençage haut débit. De plus, le cancer du sein est très hétérogène avec, entre autres, une distinction des tumeurs basée sur les profils moléculaires en 5 sous-types tumoraux : normal, luminal A, luminal B, ErbB2+ (ou HER2+ = « Human Epidermal growth factor Receptor 2 »), et basal (Sorlie et al., 2001). Les types luminaux sont associés à l'expression des récepteurs hormonaux (hormonaux-dépendants), notamment le récepteur aux œstrogènes (ER+), à des grades bas et à une évolution plutôt favorable. Par opposition, les types basaux, assimilés aux « triples-négatifs », c'est-à-dire ER-/PR-/ErbB2- ou hormonaux-indépendants, sont plus agressifs et invasifs, de haut grade et de pronostic défavorable. Plusieurs études présentées dans le Tableau 1 montrent que non seulement les profils d'expression des miRNAs permettent de distinguer les tumeurs des tissus normaux, mais aussi que certaines signatures de miRNAs sont associées à certains sous-types tumoraux, aux statuts des récepteurs hormonaux, à l'apparition de métastases et parfois même à un pronostic. Malgré des différences dans les résultats obtenus, liées aux différentes techniques utilisées, aux différents échantillons, ou aux différences de comparaisons faites, certains résultats sont communs à plusieurs études. Tout d'abord, miR-21 ressort comme le plus surexprimé dans les tumeurs par rapport aux tissu normaux (Iorio et al., 2005; Yan et al., 2008; Farazi et al., 2011), et son expression est associée à des stades avancés et à un pronostic défavorable de survie (Yan et al., 2008). L'expression de miR-155 est également augmentée dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux (Iorio et al., 2005; Yan et al., 2008). Ces deux miRNAs seront décrits dans le chapitre suivant comme des miRNAs oncogènes. Les expressions de miR-210 et miR-128a sont significativement associées dans plusieurs études à l'apparition de métastases (Foekens et al., 2008), ou à un pronostic défavorable de survie (Buffa et al., 2011; Rothe et al., 2011). Les expressions de miR-125 et miR-145 sont diminuées dans les tumeurs du sein par rapport au tissu normal (Iorio et al., 2005; Farazi et al., 2011). Enfin, notons que l'étude de Farazi et al., basée sur le séquençage à haut débit, indique ne pas trouver de diminution globale de l'expression des miRNAs dans les tumeurs du sein étudiées par rapport aux tissus normaux.

Référence	Technique	Echantillons tumoraux	Echantillons contrôles	Résultats
Iorio et al., 2005	Puce (Liu et al., 2004)	76 dont 58 avec les informations clinicopathologiques	6 pools de 5 tissus normaux mammaires et 4 individuels	- **29 miRNAs** exprimés différentiellement dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux. Une classification basée sur ces 29 miRNAs sépare clairement tissus normaux des tissus tumoraux, parmi lesquels les plus dérégulés sont **miR-155** et **miR-21** induits, et **miR-125b**, **miR-145** et **miR-10b** diminués - Une signature d'expression de **15 miRNAs** suffit pour prédire si le tissu est tumoral ou normal - Identification de **signatures d'expression** significativement associées à: expression des récepteurs hormonaux ER (+ ou -) et PR (+ ou -) (ER = récepteur aux oestrogènes et PR= récepteur à la progéstérone), stade tumoral, invasion des ganglions lymphatiques, insavion vasculaire, index de prolifération, statut p53 (+ ou -)
Mattie et al., 2006	Puce avec amplification préalable des miRNAs	20 échantillons dont 9 ErbB2+/ER-; 4 ErbB2+/ER+; et 74 ErbB2-/ER+ (dont on dispose aussi du statut PR)	1 échantillon de tissu normal mammaire	- La classification non supervisée distingue 3 groupes correspondant aux différents statuts ErbB2, ER mais aussi PR. - **43 miRNAs** significativement surexprimés dans les cancers ErbB2+ par rapport à ErbB2-; **43 miRNAs** significativement surexprimés dans les cancers ER+ par rapport à ER- et **46 surexprimés** dans les cancers PR+ par rapport à PR-. - La comparaison des 3 signatures révèle un sous-groupe de miRNAs spécifiques au statut ErbB2 (**let-7f, let-7g, miR-107, miR-10b, miR-126, miR-154, et miR-195**), et un sous-groupe spécifique au statut ER/PR (**miR-142-5p, miR-200a, miR-205 et miR-25**)
Blenkiron et al., 2007	micro-billes analysées par cytométrie de flux (Lu et al., 2005)	93 échantillons de tumeurs primaires de cancers du sein, dont 51 ont pu être classés en sous-types basés sur les profils d'expression des ARNm (Sorlie et al., 2001): 16 de type basal, 15 de type luminal A, 9 de type luminal B, 5 HER2+ et 6 de type normal	5 échantillons de tissu normal mammaire	- La classification hiérarchique non supervisée montre des profils d'expression différents entre les échantillons ER+ et les échantillons ER- - Les profils d'expression des miRNAs utilisés pour établir une discrimination entre les cancers de type basal et de type luminal A, les deux sous-types les plus représentés dans les échantillons. Les profils d'expression des ARNm et des miRNAs de 5 tumeurs du sein d'une étude indépendante (Lu et al., 2005) sont utilisés pour établir à partir des ARNm que 3 tumeurs sont de type basal et deux de type luminal A. La discrimination basée sur l'expression des miRNAs permet de classer correctement les 5 tumeurs en type basal ou luminal A. - expression de **31 miRNAs** significativement associée à un sous-type tumoral, au statut ER ou au grade. Une majorité est exprimée dans les tumeurs moins agressives, de grade 1, et ER+. D'autres sont plutôt associés au tumeurs plus agressives, de grade 3 et ER-.
Yan et al., 2008	a/ Puce b/ qRT-PCR en temps réel sur miR-21 (le plus surexprimé)	a/ 8 échantillons de cancer du sein b/113 échantillons de cancers du sein	a/ tissu normal adjacent correspondant b/-	a/ **9 miRNAs** surexprimés dans les échantillons tumoraux par rapport au tissu normal correspondant (**miR-21, miR-365, miR-181b, let-7f, miR-155, miR-29b, miR-181d, miR-98, miR-29c**) et **6** sous-exprimés (**miR-497, miR-31, miR-355, miR-320, miR-127 et miR-30a-3p**). La classification hiérarchique non supervisée basée sur ces miRNAs distingue clairement les tissus tumoraux des tissus normaux. b/ La formation de 2 groupes basés sur la faible ou forte expression de **miR-21** montre une association significative entre l'expression élevée de miR-21 et les stades avancés, l'invasion des ganglions lymphatiques ainsi qu'un mauvais pronostic de survie
Foekens et al., 2008	qRT-PCR en temps réel (Taqman Human MicroRna assay Set de Applied Biosystems)	185 échantillons ER+ et 114 ER-, sans invasion des ganglions lymphatiques. 34% des patients ont développé une métastase distante après la chirurgie	-	**4 miRNA**s significativement associés à une durée plus courte d'apparition d'une métastase distante dans les échantillons ER+: **miR-7, miR-128a, miR-210 et miR-516-3**p; et **un seul, miR-210**, est significativement associé à durée plus courte d'apparition d'une métastase distante dans les échantillons ER-
Rothé et al., 2011	Puce (miRvana microarray V2 de Ambion) et vérification par qRT-PCR pour miR-210	56 échantillons de cancers du sein avec un profil des ARNm disponible	-	-Les miRNAs ne permettent pas de retrouver la classification obtenue par les profils d'expression des ARNm (triple négatifs ou type basal, Her2+, luminal A et luminal B) - **19 miRNAs** exprimés différentiellement en fonction du statut ER, et **20 miRNAs** en fonction du grade histologique -2 miRNAs sont significativement associés à la survie sans récidive: **miR-148a et miR-210**. Une expression élevée de **miR-210** est associée à un mauvais pronostic.

Référence	Technique	Echantillons tumoraux	Echantillons contrôles	Résultats
Farazi et al., 2011	Séquençage haut débit (Solexa)	151 échantillons de tumeurs invasives et 17 non invasives, et 6 lignées cellulaires de cancers du sein	11 tissus normaux	- Mesure de la quantité absolue de miRNAs dans un sous-groupe de 31 échantillons: pas de diminution globale des miRNAs dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux. - Les profils d'expression sont réalisés pour 179 échantillons avec suffisamment de séquences lues et les 6 lignées cellulaires. La classification hiérarchique non supervisée sépare les tissus normaux des tissus tumoraux. Parmi les tissus tumoraux, certains sont regroupés en petits sous-groupes correspondant à un récepteur hormonal positif, ainsi qu'aux tumeurs triples négatives. - miRNAs individuels ou clusters exprimés différentiellement entre les tumeurs Her2+ invasives, non invasives et les tissus normaux: ==> **miR-21** est le plus surexprimé dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux, puis **miR-142-3p et -5p**, qui sont aussi surexprimés dans les tumeurs invasives par rapport aux non invasives (miR-142 étant spécifique du lignage hémétopoiëtique, ceci reflète probablement un changement de la composition cellulaire). ==> **miR-22**, des membres des clusters miR-98/let-7 (familles **miR-125, miR-99, let-7**), le cluster **miR-143/145** (peut-être lié à la présence de tissu adipeux dans les biopsies), **miR-378, miR-497, miR-320** et des membres du cluster miR-144 (**miR-144, miR-451**) sont diminués dans les tumeurs. - les tumeurs triples négatives se caractérisent par une augmentation de l'expression de membres de la famille **miR-19** (familles clusters **miR-17-92**), **miR-205** et **miR-146**, et une diminution de **miR-451**, par rapport aux autres tumeurs - Une augmentation de **miR-423-5p et -3p** et **miR-375** ainsi qu'une diminution de **miR-184** sont significativement associées au développement d'une métastase
Buffa et al., 2011	puce miRNAv1 de Illumina (miRNAs) et puce Human RefSeq-8 de Illumina (ARNm)	207 tumeurs primaires invasives	-	- Identification de signatures d'expression miRNA associées à un pronostic: ==> Une expression élevée de **miR-767-3p, miR-128a et/ou miR-769-3p** est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs ER+, tandis qu'une expression élevée de **miR-135a** est associée à un bon pronostic ==> Une expression élevée de **miR-27b, miR-144 et/ou miR-210** est associée à un mauvais pronostic dans les tumeurs ER-, tandis qu'une expression élevée de **miR-342, miR-150 et/ou miR-30c** est associée à un bon pronostic. **miR-27b, -210, -144 et -342** sont confirmés par qRT-PCR. ==> **miR-342, miR-27b et miR-150** sont aussi associés à un pronostic dans les tumeurs triples négatives - Comparaison avec les facteurs clinicopathologiques et les signatures d'expression obtenues à partir des ARNm: **miR-210** est associé à la signature d'hypoxie, de prolifération, de l'invasion nodale, au statut ER+, et au grade.**miR-128a** est associé au statut ER+. **miR-135a** est inversement corrélé avec la signature de prolifération, et **miR-27b** est associé à la signature d'invasion - L'expression de miRNAs avec une valeur pronostique ou associés à un facteur clinicopathologique corrèle avec une diminution des cibles prédites correspondantes, principalement pour **miR-128a, miR-144 et miR-210**.

Tableau 1 : Etudes de profils d'expression des miRNAs dans les cancers du sein. *Résumés des résultats obtenus par des études ayant réalisé des analyses d'expression des miRNAs à grande échelle dans les cancers du sein. (ER= récepteur aux œstrogènes, PR = récepteur à la progestérone, ErbB2 = HER2 = « Human Epidermal growth factor Receptor 2 »).*

Par ailleurs, l'analyse de l'expression des miRNAs avec la technique des micro-billes en cytométrie de flux de Lu et al. (2005) permet de distinguer les différentes étapes de la tumorigenèse dans un modèle murin où l'expression de l'antigène T de SV40 dans les cellules pancréatiques β entraine le développement de tumeurs pancréatiques neuroendocrines (Olson et al., 2009). Ce modèle reconstitue différentes étapes du développement tumoral avec d'abord une hyperplasie, puis un « switch » angiogénique (production par les cellules tumorales de facteurs permettant la néovascularisation de la tumeur), puis la formation d'une tumeur solide, tumeur qui devient ensuite invasive et parfois aboutit à la formation de métastases. L'étude montre que des signatures de miRNAs sur- et sous-exprimés permettent de distinguer chaque étape de la tumorigenèse de l'étape qui la précède. La plupart des miRNAs différentiellement exprimés à chaque nouvelle étape sont induits. Par exemple, le stade hyperprolifératif de l'hyperplasie est caractérisé par 9 miRNAs induits dont miR-155 et 6 qui appartiennent à la famille des clusters miR-17-92. On retrouve aussi miR-21 qui fait partie de la signature du stade angiogénique. 34 miRNAs au total distinguent le stade de tumeur solide des cellules normales, mais beaucoup de ces modifications d'expression ont lieu aux stades plus précoces. En séparant différents types cellulaires en FACS (« Fluorescence Activated Cell Sorting ») en fonction des marqueurs exprimés, les auteurs montrent que certains miRNAs, dont miR-155, sont exprimés spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques qui infiltrent généralement les tumeurs aux stades angiogénique et de tumeur solide. Ainsi, certains miRNAs des signatures d'expression pourraient refléter une inflammation, une infiltration de cellules du système immunitaire, ou plus généralement une modification dans la composition cellulaire de la tumeur. Enfin, les métastases dans le foie ont une signature différente marquée, et 4 tumeurs pancréatiques sur les 39 testées ont un profil plus proche de celui des métastases que des autres tumeurs. Deux de ces tumeurs sur 4 proviennent de souris qui ont effectivement développé des métastases, ce qui suggère que certaines tumeurs primaires posséderaient des marqueurs d'une tendance à métastaser. La signature métastatique se caractérise notamment par une diminution des membres de la famille miR-200 (a, b, c, miR-141 et miR-429). Or, les miRNAs de la famille miR-200 inhibent la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Gregory et al., 2008; Park et al., 2008). Ce type de transition a lieu physiologiquement au cours du développement et lors de la réparation des tissus. Dans les tumeurs, la transition vers un phénotype mésenchymateux favorise la migration et l'invasion, donc un phénotype tumoral plus agressif.

II.1.2 Applications en clinique

La plupart des études ayant réalisé des profils d'expression dans les cancers cherchent à conclure sur la signification biologique de la sur- ou sous-expression de tel ou tel miRNA qui pourrait agir comme un oncogène ou un suppresseur de tumeur. Bien qu'il y ait une signification

biologique dans certains cas comme nous le verrons un peu plus loin, l'intérêt de l'existence de signatures d'expression des miRNAs caractéristiques d'un tissu, d'un type tumoral, de différents sous-types de tumeurs au sein d'un même cancer, d'un stade de différentiation, d'un stade de la tumorigenèse, de l'agressivité des tumeurs, réside surtout dans des applications diagnostiques et pronostiques prometteuses.

Comme nous l'avons décrit dans les cancers du sein (Tableau 1), certaines études ayant réalisé des profils d'expression montrent que des signatures d'expression de miRNAs sont significativement associées à un pronostic ou à l'apparition de métastases et pourraient donc servir de marqueurs pronostiques (Calin et al., 2005; Yanaihara et al., 2006; Bloomston et al., 2007; Foekens et al., 2008; Yan et al., 2008; Buffa et al., 2011; Farazi et al., 2011; Rothe et al., 2011). D'autres études ont étudié la valeur pronostique de miRNAs particuliers, comme le cas de let-7 dans les cancers du poumon (Takamizawa et al., 2004). L'étude de Takamizawa et al. montre, grâce à une classification hiérarchique non supervisée de 143 échantillons provenant de résections potentiellement curatives, qu'une expression réduite de let-7 est significativement associée à une durée de survie plus courte après la résection, et constitue donc un indicateur de pronostic défavorable.

Par ailleurs, plusieurs études montrent que les signatures de miRNAs spécifiques du tissu d'origine peuvent être exploitées pour déterminer l'origine tissulaire de tumeurs peu différenciées d'origine inconnue. Ces tumeurs sont souvent des métastases dont la tumeur primaire n'a pas été identifiée et dont l'origine ne peut pas être déterminée histologiquement (3-5% des cas de cancers) (Pavlidis and Fizazi, 2005). Le manque de diagnostic pose problème pour établir un traitement adapté. Ainsi, l'analyse de l'expression globale des miRNAs dans les tissus tumoraux réalisée par Lu et al. montre que le profil d'expression des miRNAs peut être utilisé pour classer des tumeurs peu différenciées dont l'origine tissulaire n'a pas pu être déterminée histologiquement mais dont le contexte anatomique a permis un diagnostique clinique (soit une tumeur primaire dans un organe donné soit une métastase d'une tumeur primaire préalablement identifiée) (Lu et al., 2005). Ainsi, en utilisant des tumeurs plus différenciées pour établir des classificateurs basés sur les profils d'expression des miRNAs d'une part et des ARNm d'autre part, Lu et al. montrent que l'expression des miRNAs permet de classer correctement 12 tumeurs d'origine incertaine sur 17, contre seulement une avec le classificateur basé sur les ARNm. Cette approche est confirmée par une étude plus récente de Rosenfeld et al. cherchant une méthode plus fiable que la classification basée sur l'expression des ARNm afin d'identifier l'origine tissulaire de cancers métastatiques d'origine primaire inconnue (Rosenfeld et al., 2008). Les auteurs utilisent les profils d'expression sur puce des miRNAs de 336

échantillons tumoraux (333 fixés au formol et inclus en paraffine et 3 échantillons récemment congelés), correspondant en tout à 22 types tumoraux différents, pour établir un algorithme de classification des échantillons se basant sur 48 miRNAs. Dans un test en aveugle effectué sur 83 des échantillons, cet algorithme permet de classer correctement 89% des échantillons et 85% des échantillons métastatiques dont le classement est prédit par l'algorithme des auteurs et par un autre algorithme (haute confiance de la prédiction). A l'aide d'une approche similaire, Ferracin et al. analysent l'expression sur puce des miRNAs dans 40 tumeurs primaires représentant 10 types tumoraux différents et établissent un classificateur basé sur l'expression de 47 miRNAs permettant de discriminer chaque type tumoral (Ferracin et al., 2011). L'utilisation de ce classificateur permet de classer correctement 100% des tumeurs primaires et 78% des tumeurs métastatiques testées. Ferracin et al. utilisent ensuite les données d'expression de l'étude de Rosenfled et al. citée ci-dessus afin de montrer que le classificateur établi permet de classer correctement les tumeurs d'une étude indépendante. Enfin, le classificateur est utilisé pour établir une hypothèse d'origine tissulaire pour 16 cancers d'origine primaire inconnue. Dans 12 cas sur 16, une prédiction est établie avec une forte probabilité et dans plusieurs cas, la prédiction établie est cohérente avec les hypothèses émises mais non vérifiées des cliniciens.

Ainsi, les démonstrations qui ont été faites de l'utilisation possible des miRNAs comme marqueurs pronostiques ou diagnotiques dans les tumeurs suggèrent qu'une fois les techniques normalisées et financièrement accessibles, les miRNAs pourront être utilisés couramment et constituer un apport majeur en clinique.

II.2 Perturbation globale de la voie micro-ARN dans les cancers

II.2.1 Diminution de la majorité des micro-ARNs

Plusieurs études montrent donc une diminution de la majorité des miRNAs matures dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux (Lu et al., 2005; Gaur et al., 2007; Ozen et al., 2008). L'étude de Lu et al. propose que ce phénomène puisse refléter un état de dé-différentiation des tumeurs. En effet, comme cela a déjà été mentionné dans la première partie de cette introduction (Strauss et al., 2006), Lu et al. confirment, en induisant la différentiation de la lignée de leucémie myéloïde HL-60 avec de l'acide rétinoïque, que de nombreux miRNAs sont induits lors de la différentiation (Lu et al., 2005). Par ailleurs, les travaux de Thomson et al. montrent qu'au cours du développement chez la souris, un certain nombre de miRNAs sont effectivement induits (Thomson et al., 2006). Pour certains, il existe une corrélation entre le niveau du pri-miRNA et celui du miRNA mature, suggérant une induction au niveau

transcriptionnel, mais pour beaucoup, dont les miRNAs de la famille let-7, le niveau de pri-miRNA reste relativement constant tandis que le niveau de pre-miRNA et de miRNA mature ne sont induits que tardivement au cours du développement, suggérant une régulation de la maturation par le microprocesseur. L'étude de Thomson et al. reprend ensuite les résultats de Lu et al. concernant l'expression des miRNAs dans les cancers et les compare aux données d'une puce mesurant les ARNm des mêmes échantillons, dans 22 cas où le transcrit primaire du miRNA est mesuré sur la puce à ARNm. La classification hiérarchisée basée sur ces 22 miRNAs permet de séparer les tissus tumoraux des tissus normaux avec, comme dans l'étude de Lu et al., une diminution des miRNAs matures dans les cancers. En revanche, tandis qu'il existe une corrélation entre l'expression des pri-miRNAs et celle des miRNAs matures dans les tissus normaux, l'expression des pri-miRNAs dans les tissus tumoraux ne reflète pas celle des miRNAs matures et ne montre pas de diminution globale. Les auteurs proposent que ce phénomène reflète, comme dans les cellules non différenciées, un blocage de la maturation d'une majorité de miRNAs par le microprocesseur dans les cancers. Comme décrit dans la première partie de l'introduction, on sait aujourd'hui que le facteur de pluripotence lin-28 est capable d'inhiber la maturation des miRNAs de la famille let-7 par le microprocesseur (Piskounova et al., 2008; Viswanathan et al., 2008; Newman and Hammond, 2010). Ce mécanisme fournit un exemple de régulation de la maturation par le microprocesseur au cours du développement et dans les cancers, lin-28 agissant comme un oncogène (Viswanathan et al., 2009).

Un autre mécanisme de régulation de la maturation par le microprocesseur en lien avec le cancer a été décrit par Suzuki et al. qui montrent que la protéine p53 est capable de s'associer au microprocesseur pour favoriser la maturation de certains pri-miRNAs (Suzuki et al., 2009). p53 est la protéine suppresseur de tumeur la plus couramment mutée ou délétée dans les cancers humains et responsable en cas de stress de l'induction de gènes permettant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN en cas de dommages, l'apoptose ou encore la sénescence en fonction du contexte, évitant ainsi la transmission de mutations ou d'anomalies chromosomiques (Soussi and Beroud, 2001). Lorsque Suzuki et al. mènent cette étude, il a déjà été montré que p68 (DDX5), une protéine associée au microprocesseur, peut interagir directement avec p53 (Bates et al., 2005). Suzuki et al. montrent que, après induction de dommages à l'ADN par traitement à la doxorubicine, et donc induction de p53, l'expression de certains miRNAs est induite. Certains miRNAs, comme miR-34a, sont induits directement au niveau transcriptionnel. En effet, la famille miR-34 est connue pour être une cible transcriptionnelle de p53 (He et al., 2007). D'autres miRNAs (miR-15a, miR-16-1, miR-23a, miR-26a, miR-103, miR-143, miR-145, miR-203 et miR-206) sont induits au niveau du pre-miRNA et du miRNA mature mais pas au niveau du pri-miRNA, et ce d'une manière dépendante

de la présence de p53, p68 et p72. Certains de ces miRNAs sont diminués dans les cancers (Calin et al., 2002; Michael et al., 2003; Iorio et al., 2005; Bueno et al., 2008; Kondo et al., 2008; Ozen et al., 2008; Farazi et al., 2011) et certains (miR-15a et -16-1) ont une activité démontrée de suppresseur de tumeur (Klein et al., 2010). Les auteurs montrent qu'après induction de dommages à l'ADN, p53 est induite, interagit directement avec le microprocesseur via p68 et p72, favorise l'association du microprocesseur avec pri-miR-16-1 et pri-miR-143 et leur maturation. Enfin, alors que l'introduction d'une version sauvage de p53 dans des cellules HCT116 (carcinome de colon) $p53^{-/-}$ augmente les niveaux d'expression des pre-miRNAs et miRNAs matures correspondant à miR-16-1, miR-143 et miR-206, l'introduction de versions mutées de p53 couramment retrouvées dans les cancers diminue au contraire significativement les niveaux de ces pre-miRNAs et miRNAs matures. De plus, ces versions mutées de p53 diminuent l'association de p68 avec le microprocesseur, ce qui explique probablement leur effet négatif sur la maturation des pri-miRNAs en question. Cette étude fournit donc une autre hypothèse concernant la diminution de certains miRNAs dans les cancers ayant une version mutée de p53.

En plus de la régulation de l'étape de maturation par le microprocesseur, la diminution de l'expression de certains miRNAs dans les cancers se fait directement par une répression transcriptionnelle. C'est ce que montre une étude s'intéressant aux miRNAs ciblés transcriptionnellement par l'oncogène c-myc (Chang et al., 2008b). Deux modèles de lymphomes induits par c-myc sont utilisés : des cellules B humaines immortalisées possédant une version inductible de c-myc (réprimé en présence de tétracycline) et un modèle murin de lymphome induit par le traitement au 4-hydroxytamoxifène entrainant l'expression d'une version de c-myc fusionnée au récepteur aux oestrogènes (ER) dans la moelle épinière. A l'aide d'une analyse sur puce confirmée par des northern-blots, les auteurs identifient des miRNAs induits ou réprimés par l'expression de c-myc. Hormis le cluster miR-17-92, déjà identifié par les auteurs comme étant induit par c-myc (O'Donnell et al., 2005) (voir *II.3.2.1. miR-17-92*), la majorité des miRNAs identifiés sont réprimés par l'expression de c-myc. Parmi ces miRNAs, on retrouve miR-15a et miR-16 ; miR-22 ; miR-26a et b ; miR-29a, b et c ; miR-34a ; miR-195 et la famille let-7, des miRNAs qui ont été trouvés mutés ou délétés dans les cancers (Calin et al., 2004a), et qui ont un rôle suppresseur de tumeur *in vivo* pour certains (miR-15a et -16, let-7) (voir *II.3. micro-ARNs suppresseurs de tumeurs et oncogènes*). Les auteurs confirment par ChiP que c-myc s'associe aux promoteurs des pri-miRNAs identifiés pour réprimer leur transcription.

Malgré la diminution d'une majorité des miRNAs généralement observée dans les cancers, certains miRNAs sont surexprimés spécifiquement dans certains types tumoraux, comme le

cluster miR-17-92 mentionné ci-dessus. Contrairement à la régulation négative de la maturation par le microprocesseur décrite précédemment, une étude menée par le laboratoire de Carlo Croce montre que la maturation de certains miRNAs est favorisée dans des leucémies aigues associées au réarrangement du gène MLL («mixed-lineage leukemia ») (ou ALL-1) (Nakamura et al., 2007). Ce gène, situé dans une région fréquemment réarrangée dans les leucémies, est retrouvé fusionné avec d'autres protéines, formant ainsi des protéines chimères oncogènes, la fusion MLL-AF4 étant la plus couramment retrouvée (Bueno et al., 2011). Une analyse de l'expression des miRNAs sur puce montre que 18 miRNAs sont surexprimés dans les lignées cellulaires présentant un réarrangement du gène MLL, miR-191 en tête (Nakamura et al., 2007). Des expériences d'immunoprécipitation montrent que MLL-AF4 co-précipite avec Drosha, et que ce complexe immuno-purifié clive plus efficacement pri-miR-191 *in vitro* par rapport au complexe sans MLL-AF4. Des expériences de ChiP montrent que MLL-AF4 et Drosha sont associées au loci génomiques de pri-miRNAs dont l'expression est augmentée dans les leucémies avec le réarrangement MLL. Rappelons que le clivage par le microprocesseur est un processus co-transcriptionnel (Kim and Kim, 2007; Morlando et al., 2008). Les résultats de cette étude suggèrent donc, sans le démontrer formellement, que l'interaction de la protéine de fusion MLL-AF4 avec le microprocesseur dans certaines leucémies aigues favorise le recrutement du microprocesseur au site de transcription de certains pri-miRNAs et par conséquent leur maturation.

II.2.2 Anomalies d'expression d'acteurs de la voie de biogenèse des micro-ARNs

En plus de la dérégulation des miRNAs, de nombreuses études (Tableau 2) montrent une dérégulation de l'expression de certains acteurs de la voie de biogenèse des miRNAs dans les cancers, parfois associées à un pronostic défavorable de survie. Cependant, les dérégulations diffèrent en fonction du type tumoral considéré. En effet, une faible expression de Dicer est associée à des stades avancés et/ou à un pronostic défavorable de survie dans les cancers du poumon, les neuroblastomes, les cancers de l'ovaire et les cancers du sein (Tableau 2). Au contraire, une surexpression de Dicer est associée à un pronostic défavorable dans les cancers colorectaux et à des stades plus avancés et métastatiques dans les cancers de la prostate ; et une surexpression de Drosha est associée au gain du chromosome 5p retrouvée dans 50% des cancers du col de l'utérus (Tableau 2). Dans certains types tumoraux, une diminution de l'expression d'acteurs directement impliqués dans la voie de biogenèse des miRNAs peut donc aussi participer à un effet de diminution globale de l'expression des miRNAs, comme cela a été montré dans le cas des neuroblastomes et dans les cancers de l'ovaire (Faggad et al., 2010; Lin et al., 2010) (Tableau 2).

Type de cancer	échantillons	Protéine de la voie miRNA affectée	Technique utilisée	Informations concernant le niveau d'expression	Référence
Poumon	67 cas de cancers du poumons non-à-petites cellules provenant de résection potentiellement	**Dicer**	qRT-PCR en temps réel	Une faible expression de Dicer est associée à un pronostic défavorable de survie	Karube et al., 2005
Neuroblastome	65 échantillons de neuroblastomes	**Dicer** **Drosha**	qRT-PCR en temps réel	Une faible expression de Drosha ou Dicer est associée aux phénotypes de haut risque et à un pronostic défavorable de survie, ainsi qu'à une diminution globale des miRNAs	Lin et al., 2010
Endomètre	26 échantillons de carcinomes de l'endomètre et 18 échantillons contrôles	**Dicer** **Drosha**	qRT-PCR en temps réel	L'expression de Dicer est significativement diminuée dans les tissus tumoraux pas rapport aux tissus normaux	Torres et al., 2011
Foie	36 cas de cancers hépatocellulaires avec les tissus du foie adjacents non cancéreux	**Dicer**	qRT-PCR en temps réel	L'expression de Dicer est diminuée dans le tissu tumoral par rapport au tissu normal aadjacent dans 34/36 cas mais n'est pas associé à des caractéristiques cliniques	Wu et al., 2011
Ovaire	111 cas de cancers de l'ovaire épithéliaux invasifs	**Dicer** **Drosha**	qRT-PCR en temps réel	Les expressions de Dicer et Drosha sont diminuées significativement dans 60% et 51% respectivement des échantillons tumoraux. L'expression faible de Dicer est associée avec un stade tumoral avancé. L'expression élevée à la fois de Drosha et Dicer est associée à une durée de survie plus élevée.	Merritt et al., 2008
	34 échantillons ovariens (10 tissus normaux, 8 tumeurs bénignes, et 16 cancers ovariens)	**Dicer**	RT-PCR semi-quantitative	L'expression de Dicer est diminuée dans les tumeurs bénignes et malignes par rapport aux tissus normaux, avec une diminution plus étendue dans les tumeurs de haut grade et stade elevé	Pampalakis et al., 2009
	140 cas de carcinomes ovariens primaires	**Dicer**	Immunohistochimie	23,6% des cas de cancers ont un score négatif pour l'expression de Dicer. Une faible expression de Dicer est associée à une diminution globale des miRNAs et à un pronostic défavorable de survie	Faggad et al., 2010
Sein	a/ modèle cellulaire de progression du cancer du sein et lignées cellulaires b/ 104 cas de cancers du sein et 4 échantillons de tissu normal c/86 échantillons de cancers du sein invasifs fixés au formol et inclus en paraffine, et 8 échantillons de tissu normal mammaire	**Dicer**	a/ western-blot et qRT-PCR en temps réel b/qRT-PCR en temps réel et western-blot c/ immunohistochimie	a/ L'expression de Dicer est diminuée dans les cancers du sein avec un phénotype mésenchymateux, et les stades avancés et métastatiques b et c/ Une faible expression de Dicer est associée aux métastases, au statut des récepteurs hormonaux (ER- et PR-) et à un pronostic défavorable de survie	Grelier et al., 2009
	245 échantillons de cancers du sein invasifs provenant de patients recevant une chimiothérapie et 10 échantillons de tissu normal mammaire	**Dicer** **Drosha**	qRT-PCR en temps réel	18% des échantillons tumoraux (36/200) et 46% (92/200) ont un niveau d'ARNm significativement diminué de Drosha et Dicer respectivement. Une expression faible de Dicer est associée au cancers triple-négatifs, ER-, PR- et de phénotype de type basal.	Dedes et al., 2011
	49 paires de tissus mammaires tumoraux et normaux correspondants provenant de patients ayant subi une chirurgie d'une tumeur primaire, la majorité sont positifs aux récepteurs hormonaux ER et PR, 70% de sont type luminal.	**Dicer** **Drosha**	qRT-PCR en temps réel	Une diminution de l'expression est observée dans 53,1% des cas pour Dicer, 51,9% des cas pour Drosha. 75,5% des échantillons ont une expression diminuée de Drosha ou Dicer.	Yan et al., 2011

Type de cancer	échantillons	Protéine de la voie miRNA affectée	Technique utilisée	Informations concernant le niveau d'expression	Référence
Colorectal	237 cas d'adénocarcinomes du colon	**Dicer**	Immunohistochimie sur les tissus tumoraux fixés au formol et inclus en paraffine	Une surexpression de Dicer est associée à un pronostic défavorable de survie	Faber et al., 2011
Col de l'utérus	36 échantillons cliniques, 10 lignées cellulaires et un modèle cellulaire W12 infecté avec un papillomavirus, reproduisant la progression néoplasique du col de l'utérus, dont le gain du chromosome 5p (observé dans 50% des cas)	**Drosha**	CGH (hybridation génomique comparative), puce, qRT-PCR en temps réel	Le transcrit le plus significativement induit après le gain du chromosome 5p dans le modèle W12 est celui de Drosha. Gains du nombre de copies génomiques de Drosha dans 21/36 échantillons (58%) et 8/10 lignées cellulaires (Drosha se situe sur le chromosome 5p), et association avec une augmentation de l'ARNm de Drosha	Muralidhar et al., 2007
Prostate	a/ 64 adénocarcinomes de la prostate, 24 métastases de la prostate provenant de 4 patients et 16 échantillons normaux de prostate b/ puce avec 232 échantillons de prostate provenant de 166 patients c/lignées cellulaires DU145 (métastase de la prostate) et RWPE-1 (prostate non tumorigénique)	**Dicer**	a/ puce affimetrix b/ immunohistochimie c/ immunocytochimie et western-blots	a/ L'expression de Dicer est augmentée de 2,5x dans les échantillons métastatiques par rapport aux tumeurs non métastatiques b/ 89/107 (81%) des adénocarcinomes de la prostate montrent une surexpression de Dicer par rapport au tissu prostatique normal et l'expression de Dicer augmente avec le stade clinique de la tumeur c/Expression de Dicer beaucoup plus élevée dans la lignée DU145 par raport à la lignée RWPE-1	Chiosea et al., 2006
Œsophage	a/ 73 échantillons de cancers de l'œsophage b/27 lignées cellulaires	**Drosha**	qRT-PCR en temps réel	a/ La surexpression de Drosha est associée à un pronostic défavorable de survie b/ Drosha est surexprimée dans la majorité des lignées de cancer de l'œsophage par rapport à une lignée d'œsophage normal et d'autres lignées tumorales	Sugito, 2006
Mélanome	404 échantillons cliniques de tumeurs et contrôles de la peau dont: 12 tissus normaux, 71 nevi mélanocytiques 223 mélanomes, 73 carcinomes et 12 sarcomes.	**Dicer**	immunohistochimie et western-blots	L'expression de Dicer est spécifiquement augmentée dans les mélanomes, avec une augmentation significative dans 81% des mélanomes cutanés, 80% des mélanomes acrolentigineux et 96% des mélanomes métastatiques par rapport aux carcinomes et aux sarcomes. La surexpression de Dicer est significativement associée à un index mitotique élevé, à la métastase nodale et à un stade clinque avancé	Ma et al., 2011

Tableau 2 : Dérégulations de l'expression de Drosha ou Dicer associées aux cancers. *Etudes ayant montré une diminution (en bleu) ou une augmentation (en rouge) de l'expression de Dicer ou Drosha associées à certains types tumoraux et parfois à un grade, un pronostic ou des métastases.*

Quelques cas rares de mutations affectant l'expression d'acteurs de la voie miRNA ont également été rapportés. Hill et al. ont identifié des mutations hétérozygotes du gène de Dicer, entrainant la production de versions tronquées de la protéine, chez des familles de patients atteints de blastome pleuro-pulmonaire, une tumeur pédiatrique rare, souvent héréditaire, qui apparaît pendant le développement du poumon (Hill et al., 2009). La majorité des porteurs de la mutation dans la famille des patients ont cependant un phénotype normal, indiquant que la mutation de Dicer est insuffisante pour former des tumeurs. Par ailleurs, deux études effectuées par Melo et al. ont rapporté des mutations des gènes de TRBP (partenaire de Dicer) ou de XPO-5 (exportine-5) dans certains cancers caractérisés par une instabilité des microsatellites (IMS) (Melo et al., 2009; Melo et al., 2010). Ces cancers ont des mutations dans des gènes de la voie de réparation des mésappariements et présentent des taux élevés de mutations insertionnelles ou de délétions de nucléotides individuels, pouvant conduire à l'apparition de codons stops prématurés. Sur 12 lignées cellulaires avec IMS testées, Melo et al. en identifient 2 avec des mutations hétérozygotes de TRBP et 2 autres avec des mutations hétérozygotes de XPO-5, aboutissant dans les deux cas à une forme tronquée de la protéine. Dans le cas de TRBP, la mutation a pour conséquence une diminution de l'expression de la protéine, une diminution de l'expression de Dicer qui est normalement stabilisée par TRBP, et une diminution de la maturation des pre-miRNAs conduisant donc à une diminution des miRNAs matures (Melo et al., 2009). Les auteurs montrent que ce type de mutation hétérozygote de TRBP est trouvé dans 26% (72/282) des échantillons de tumeurs primaires avec IMS. Dans le cas de XPO-5, la protéine tronquée est exprimée exclusivement dans le noyau, n'est pas capable de former le complexe ternaire XPO-5/RanGTP/pre-miRNA permettant d'exporter les pre-miRNAs qui s'accumulent donc dans le noyau, entrainant une diminution de l'expression des miRNAs matures (Melo et al., 2010). Les auteurs montrent que ce type de mutation de XPO-5 est trouvé dans 22,8% (77/373) des échantillons de tumeurs primaires avec IMS.

II.2.3 Conséquences fonctionnelles sur la tumorigenèse et la progression tumorale

L'expression de la majorité des miRNAs est donc diminuée dans les cancers par rapport aux tissus normaux et des signatures d'expression de miRNAs permettent d'identifier différents types tumoraux. Par ailleurs, une dérégulation de l'expression d'acteurs de la voie miRNA est aussi retrouvée dans certains cancers, parfois associée à des facteurs pronostiques, et joue dans certains cas un rôle dans la diminution globale des miRNAs observée. Mais ces dérégulations sont-elles uniquement une conséquence du processus tumorigénique, comme par exemple une conséquence de la dé-différentiation des tumeurs ? Ou sont-elles sélectionnées car elles jouent un rôle fonctionnel dans le processus tumorigénique et dans la progression des tumeurs ? Ces

deux possibilités ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives et plusieurs évidences montrent un lien de cause à effet entre la dérégulation de la voie miRNA et la tumorigenèse. Tout d'abord, l'étude de Melo et al. ayant identifié des mutations de TRBP dans certaines lignées cancéreuses avec IMS montre que la réintroduction de TRBP ou Dicer permet de restaurer la maturation des pre-miRNAs et inhibe la tumorigenèse *in vitro* (viabilité et formation de colonies) et *in vivo* (diminution de la taille des tumeurs formées à partir des cellules xénogreffées chez la souris) (Melo et al., 2009). La réintroduction de XPO-5 dans les lignées possédant la version mutée a le même effet d'inhibition de la tumorigenèse *in vitro* et *in vivo* (Melo et al., 2010). De plus, l'inhibition stable de XPO-5 dans une des lignées cancéreuses avec IMS possédant les deux allèles normaux entraine au contraire une augmentation de la viabilité cellulaire et de la formation des colonies *in vitro*, ainsi qu'une augmentation de la tumorigenèse *in vivo*.

Par ailleurs, Kumar et al. montrent que l'inhibition stable de Drosha, DGCR8 ou Dicer à l'aide de shRNAs dirigés contre ces protéines augmente la tumorigenèse dans des cellules déjà transformées, particulièrement dans les cellules LKR13, une lignée murine d'adénocarcinome du poumon exprimant une version mutée de l'oncogène K-Ras (Kumar et al., 2007). Les auteurs montrent que l'inhibition globale de la voie miRNA augmente la vitesse de prolifération de ces cellules, la formation des colonies après ensemencement à faible densité, et la formation de colonies indépendante de l'ancrage à un support (dans de l'agar mou), caractéristique des cellules transformées. La xénogreffe à des souris immunodéficientes des cellules LKR13 dont l'expression de Drosha, DGCR8 ou Dicer est inhibée montre un développement accéléré du développement des tumeurs *in vivo* et une invasion des tissus environnants qui n'a pas lieu avec les cellules LKR13 contrôle. Enfin, la délétion conditionnelle homozygote ou hétérozygote de Dicer dans un modèle murin de développement spontané de cancers du poumon, basé sur la surexpression de la version mutée K-Ras^{G12D}, augmente le nombre et la taille des tumeurs obtenues. Toutefois, l'inhibition de Drosha, DGCR8 ou Dicer ne suffit pas à transformer *de novo* des cellules MEFs ni même à transformer complètement des MEFs exprimant la version mutée de K-Ras. Les auteurs montrent que l'augmentation de tumorigenèse dans les modèles de cancers du poumon utilisés pourrait être liée en partie à la diminution de l'expression de miRNAs de la famille let-7, inhibiteurs des oncogènes K-Ras et c-myc (voir *II.3.1.2 let-7*). Dans une autre étude, les mêmes auteurs reprennent le modèle murin de tumeurs du poumon basé sur l'expression de K-Ras^{G12D} avec la délétion conditionnelle d'un ou deux allèles de Dicer (Kumar et al., 2009). Curieusement, la délétion homozygote de Dicer a un effet moins important par rapport à la délétion hétérozygote sur la durée de survie des animaux. Les auteurs établissent une lignée cellulaire de cancer du poumon à partir d'un modèle similaire ayant en

plus une délétion homozygote du suppresseur de tumeur p53 ($p53^{-/-}$). Ils montrent que dans le cas de la délétion homozygote de Dicer, un allèle est en fait maintenu, indiquant qu'une sélection a lieu contre la perte totale du gène de Dicer dans les tumeurs. Enfin, la délétion forcée des deux allèles entraine une diminution de la taille et de l'étendue des tumeurs par rapport à la délétion hétérozygote. Dans ce cas encore, un allèle est en fait maintenu dans les tumeurs qui apparaissent. Ces résultats ont été obtenus dans un modèle tumoral bien particulier et les résultats de la deuxième étude de Kumar et al. ne sont pas tout à fait cohérents avec ceux de la première. Toutefois, ils sont corroborés par ceux obtenus par Lambertz et al. avec une approche similaire de délétion conditionnelle hétérozygote de Dicer dans un modèle murin de rétinoblastome (Lambertz et al., 2010). L'expression de la recombinase Cre dans la rétine d'animaux $rb^{lox/lox}$, $p107^{-/-}$ entraine l'apparition de lésions hyperprolifératives qui deviennent rarement agressives et invasives. La délétion hétérozygote de Dicer dans ce modèle accélère énormément la formation des tumeurs dans la rétine. Les tumeurs avec un allèle supprimé de Dicer sont plus invasives, présentent un phénotype plus sévère, une prolifération augmentée et moins d'apoptose. Les auteurs montrent que la délétion hétérozygote de Dicer entraine bien une diminution globale de l'expression des miRNAs par rapport à la rétine $Dicer^{+/+}$. En revanche, l'inactivation des deux allèles de Dicer inhibe l'apparition de tumeurs car elle entraine une dégénération de la rétine. Comme Kumar et al., les auteurs proposent donc que Dicer soit un suppresseur de tumeur haploinsuffisant, c'est-à-dire que la perte d'un des deux allèles suffit pour avoir un effet tumorigénique. Normalement, la perte des 2 allèles conduit à un phénotype plus sévère mais la particularité réside ici dans le fait que la perte totale de l'expression de Dicer est délétère pour la formation des tumeurs.

Cependant, une autre étude, menée par Arrate et al., montre que Dicer n'agit pas comme un suppresseur de tumeur haploinsuffisant dans tous les modèles tumoraux (Arrate et al., 2010). Ils utilisent un modèle murin de lymphome induit par l'expression de Eμ-myc, une version de l'oncogène c-myc avec la séquence « enhancer » Eμ de la chaine lourde des immunoglobulines, permettant l'expression de c-myc spécifiquement dans les cellules B. Les auteurs modifient génétiquement ces souris de façon à ce qu'elles expriment la recombinase Cre sous la dépendance du promoteur de CD19, un marqueur des cellules B, et une version de Dicer avec un ou deux allèles « floxés », permettant la délétion hétérozygote ou homozygote de Dicer par la recombinase Cre. Comme dans les modèles précédents, Arrate et al. montrent que la délétion homozygote de Dicer inhibe la formation des lymphomes et augmente la survie des animaux par rapport à la surexpression de c-myc seule. De même, ils montrent que parmi les lymphomes qui apparaissent, aucun n'a de délétion homozygote de Dicer, que pour la plupart ils n'expriment pas de Cre fonctionnelle, et qu'une protéine Dicer fonctionnelle s'exprime ainsi que des miRNAs

matures. Les auteurs vont encore plus loin en montrant que la délétion forcée des 2 allèles de Dicer dans des clones cellulaires issus de lymphomes Eμ-myc entraine de l'apoptose, avec seulement 43/192 clones (22%) qui survivent. Sur ces 43 clones, aucun n'a en fait la délétion homozygote de Dicer. Ces résultats indiquent encore une fois une pression de sélection contre la perte totale de Dicer dans ce modèle tumoral et que l'expression de Dicer est indispensable à la survie des lymphomes déjà établis. De plus, contrairement aux études précédentes basées sur l'expression de Ras muté dans le poumon ou de la délétion de Rb dans la rétine, Arrate et al. montrent que la délétion d'un seul allèle de Dicer n'augmente pas la lymphomagenèse induite par c-myc. Ceci suggère que l'effet pro-tumorigénique de la délétion hétérozygote de Dicer dépend du type de tumeur considéré et de la voie oncogénique dont la tumeur dépend. En effet, nous avons déjà évoqué le fait que c-myc inhibe l'expression de certains miRNAs mais induit celle du cluster oncogène miR-17-92 (O'Donnell et al., 2005). Nous verrons dans le paragraphe décrivant ce cluster que son expression augmente la lymphomagenèse dans le modèle Eμ-myc (He et al., 2005). On peut donc supposer que l'expression de certains miRNAs oncogènes dans certains types tumoraux est nécessaire à la tumorigenèse.

Le Tableau 2 montre qu'une expression réduite de Dicer est associée à des stades avancés dans certains cancers, en particulier dans les cancers du sein où elle est associée à des phénotypes mésenchymateux (par opposition aux épithéliaux moins agressifs et invasifs) et aux cancers métastatiques (Grelier et al., 2009; Dedes et al., 2011). Une étude montre un lien entre l'inhibition de l'expression de Dicer par des miRNAs de la famille miR-103/107 et la métastase dans les cancers du sein (Martello et al., 2010). Les auteurs montrent que Dicer est une cible endogène des miRNAs de la famille miR-103/107. Dans un modèle cellulaire de lignées dérivées d'une même tumeur primaire mais reflétant différents stades de progression tumorale, l'expression de Dicer est diminuée dans les 2 lignées métastatiques, alors que l'expression de miR-103/107 y est augmentée. Dans des échantillons cliniques de cancers du sein provenant de patients, l'expression élevée de miR-103/107 est associée à une forte probabilité de développer des métastases et à une faible expression de Dicer. La surexpression de miR-103 ou miR-107 dans des cellules de cancer du sein exprimant faiblement ces miRNAs augmente la capacité de migration des cellules *in vitro*, le même effet étant obtenu par l'inhibition de Dicer, et permet de former des foci micrométastatiques *in vivo* dans le poumon lorsqu'injectées dans la glande mammaire de souris. L'effet inverse est obtenu *in vitro* et *in vivo* par l'inhibition de miR-103/107 dans des cellules d'une lignée à fort pouvoir métastatique. La surexpression de Dicer dans cette lignée inhibe aussi la formation des métastases *in vivo*. Les auteurs montrent que l'inhibition de Dicer par miR-103/107 favorise la transition EMT, en diminuant l'expression de miRNAs inhibiteurs de cette transition, comme la famille miR-200 (Gregory et al., 2008; Park et al., 2008).

Les miRNAs miR-103/107 maintiennent donc vraisemblablement Dicer en dessous d'un niveau favorable au processus métastatique, mais comme miR-103/107 ont besoin de Dicer pour être produits, là encore ce processus est incompatible avec une perte totale de Dicer. Une autre étude, qui démontre le potentiel de suppresseur de tumeur haploinsuffisant de p63, confirme le lien entre Dicer et le processus métastatique (Su et al., 2010). Cette étude montre que des souris $p63^{+/-}$ et $p63^{-/-}$ développent spontanément différents types de tumeurs sur le long terme, ainsi que des métastases, notamment 10% dans le cerveau, fait rare dans les modèles de tumeurs spontanées. Les cellules MEFs $p63^{-/-}$ ont un potentiel invasif *in vitro* plus élevé que des MEFs $p53^{-/-}$. Or, l'expression de Dicer est diminuée dans les MEFS et les tumeurs des souris $p63^{-/-}$ comparées aux $p53^{-/-}$, et il existe une corrélation entre la faible expression de p63 dans des lignées humaines de cancers de la tête et du cou métastatiques et une diminution de l'expression de Dicer. Les auteurs montrent par ChiP et transactivation d'un gène rapporteur en aval du promoteur de Dicer que p63 se fixe au promoteur de Dicer et active ainsi son expression. La réexpression de p63 ou Dicer dans les MEFs $p63^{-/-}$ diminue leur potentiel invasif *in vitro*, tandis que l'inhibition de Dicer par un shRNA l'augmente, confirmant un lien fonctionnel entre diminution de l'expression de Dicer et potentiel invasif.

Dans certains cancers (Tableau 2), l'expression de Drosha ou Dicer est au contraire augmentée, comme dans les cancers du col de l'utérus où le gain fréquent du chromosome 5p est associé à un gain du nombre de copies de Drosha et une augmentation de son expression dans des échantillons de patients (Muralidhar et al., 2007). Muralidhar et al. utilisent aussi un modèle cellulaire (W12) de culture primaire de kératinocytes normaux cervicaux infectés avec HPV16 (papillomavirus humain), qui, cultivés sur le long terme reconstituent les étapes de progression du cancer du col de l'utérus dont le gain du chromosome 5p. Ils identifient dans ce modèle l'ARNm de Drosha comme étant le transcrit le plus significativement induit après le gain du chromosome 5p. Dans une deuxième étude, les auteurs utilisent une approche d'inhibition fonctionnelle de Drosha et de 3 autres gènes avec des pools de siRNAs dirigés contre ces protéines dans des lignées cellulaires de cancer du col utérin surexprimant les 4 gènes (Muralidhar et al., 2011). Ils montrent que l'inhibition de Drosha n'a pas d'effet sur la prolifération mais diminue la capacité de migration des cellules contrairement aux 3 autres gènes testés. L'analyse de l'expression des miRNAs sur puce montre que les lignées de cancer du col de l'utérus sont classées en deux groupes en fonction du niveau d'expression de Drosha, et que les lignées déplétées pour Drosha avec les siRNAs se classent dans le groupe des lignées qui ne surexpriment pas Drosha, indiquant un impact de cette inhibition sur l'expression des miRNAs. Toutefois, il faut noter que l'utilisation de siRNAs pour inhiber Drosha et ainsi impacter la voie miRNA est une approche qui présente des limites puisqu'elle est transitoire (les auteurs

font les expériences 24 à 72h après), et ne permet pas à priori de voir des conséquences marquées sur l'inhibition des miRNAs. L'approche utilisée explique donc peut-être que les résultats obtenus soient limités même s'ils vont dans le sens d'un avantage conféré par le gain d'expression de Drosha dans la capacité de migration des cellules tumorales du col de l'utérus.

Enfin, il faut noter que ni des mutations ni des altérations de l'expression de DGCR8 n'ont été décrites dans les cancers. DGCR8 est pourtant, jusqu'à preuve du contraire, spécifique de la voie miRNA, ce qui n'est pas le cas de Dicer (Fukagawa et al., 2004; Kanellopoulou et al., 2005; Tam et al., 2008; Ting et al., 2008; Watanabe et al., 2008). Les travaux de Gomez-Cabello et al. montrent cependant un lien entre DGCR8 et un suppresseur de tumeur appelé ING1 (Gomez-Cabello et al., 2010). Leurs résultats montrent que l'expression de DGCR8 est induite dans des MEFs provenant de souris déficientes pour le gène ING1, qu'à l'inverse la surexpression d'ING1 entraine une répression de l'expression de DGCR8, et qu'ING1 réprime directement DGCR8 en se fixant à son promoteur. L'acétylation des histones H3 et H4 du promoteur de DGCR8 est augmentée dans les cellules déficientes pour ING1 et le traitement des cellules sauvages avec un inhibiteur des histones déacétylases (HDAC) augmente l'expression de DGCR8, ce qui suggère qu'ING1 réprime l'expression de DGCR8 en recrutant des HDAC au niveau de son promoteur. Les auteurs construisent ensuite une lignée dérivée de cellules U2OS (ostéosarcome) permettant de surexprimer de manière inductible ING1. L'inhibition de DGCR8 à l'aide d'un shRNA dans ces cellules a un effet comparable à la surexpression d'ING1, à savoir une diminution de la prolifération et de la formation de colonies *in vitro*. L'induction d'ING1 et la répression concomitante de DGCR8 avec le shRNA conduit à une diminution plus marquée de DGCR8 et un effet inhibiteur de la prolifération encore plus important. Cet article montre donc qu'un acteur de la voie de biogenèse des miRNAs, DGCR8, est réprimé par un suppresseur de tumeur, et que, contrairement aux résultats de Kumar et al. dans les tumeurs du poumon dépendantes de K-Ras muté, l'inhibition de DGCR8 entraine ici une diminution de la prolifération et de la capacité à former des colonies dans des cellules d'une lignée cellulaire d'ostéosarcome. Cependant, les auteurs ne montrent pas les conséquences de l'expression d'ING1 ni de l'inhibition de DGCR8 sur l'expression des miRNAs matures, ce qui, malgré la spécificité de DGCR8 à la voie miRNA, limite les conclusions permettant de lier l'inhibition de la prolifération observée à une inhibition globale significative des miRNAs.

L'ensemble des études décrites montrent qu'il existe un lien entre la voie miRNA et le processus de tumorigenèse. Cependant, certains résultats peuvent sembler contradictoires. En effet, dans certains cas, la diminution globale des miRNAs semble favoriser la tumorigenèse tandis que dans d'autres cas, l'inhibition de la voie miRNA semble être délétère à la formation des tumeurs et

une surexpression de certains acteurs de la voie est même sélectionnée. Il n'est donc pas possible de faire une conclusion générale sur un effet dans un sens ou dans l'autre de la dérégulation globale des miRNAs. Toutefois, il ressort que ces effets sont très dépendants du type tumoral considéré, ce qui est logique avec la grande hétérogénéité des types tumoraux et des voies altérées/mutées aboutissant à la formation des tumeurs. On peut donc penser que dans certains types tumoraux, comme dans les modèles d'adénocarcinomes de poumon induits par K-Ras muté, l'inhibition de miRNAs suppresseurs de tumeurs, comme let-7 (qui inhibe K-Ras), va favoriser la tumorigenèse. En revanche, dans un modèle de lymphome induit par c-myc, qui active l'expression d'un cluster oncogène (miR-17-92), l'inhibition de la voie miRNA n'augmente pas la tumorignèse et induit au contraire de l'apoptose.

II.3 Micro-ARNs suppresseurs de tumeurs et oncogènes

Parmi la majorité de miRNAs diminués dans les cancers, certains clusters de miRNAs ou miRNAs individuels jouent un rôle de suppresseurs de tumeurs. D'autres miRNAs sont en revanche surexprimés dans certains types tumoraux et une activité d'oncogène a été démontrée pour certains d'entre eux. Si un nombre croissant de miRNAs individuels sont régulièrement associés aux cancers et aux phénotypes transformés, ce chapitre décrira quelques cas bien caractérisés et démontrés de miRNAs suppresseurs de tumeurs et oncogènes.

II.3.1 Suppresseurs de tumeurs

II.3.1.1 miR-15a~16-1

Le cluster miR-15a~16-1 contient les deux premiers miRNAs à avoir été identifiés en lien avec un type de cancer, la leucémie lymphoïde chronique (LLC). La recherche infructueuse d'un gène suppresseur de tumeur codant pour une protéine dans la région chromosomique 13q14, déletée dans plus de 50% des LLC, a conduit l'équipe de Carlo Croce à identifier deux miRNAs, miR-15a et miR-16-1, codés dans cette région, et dont l'expression est effectivement diminuée significativement chez 68% des patients (Calin et al., 2002). La délétion conditionnelle ciblée du cluster miR-15a~16-1 dans un modèle murin conduit à l'apparition d'une LLC chez 21% des animaux, confirmant le rôle suppresseur de tumeur de ces miRNAs (Klein et al., 2010). La région chromosomique 13q14 est aussi fréquemment délétée dans les cancers de la prostate, avec une incidence corrélant avec le stade de progression de la tumeur (Dong et al., 2001). Or, l'inhibition de miR-15a et miR-16 *in vivo* conduit à une hyperplasie de la prostate chez la souris, tandis que leur inhibition dans des cellules non transformées de prostate permet la formation de tumeurs lorsque ces cellules sont injectées en sous-cutané dans des souris immunodéficientes (Bonci et al., 2008). Inversement, les auteurs montrent que la restitution de l'expression de miR-15a et

miR-16-1 dans les tumeurs xénogreffées entraine un arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la régression des tumeurs. miR-15a et miR-16-1 possèdent la même séquence noyau, et différentes cibles impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Cycline D1, cycline D3, cycline E1, CDK6…) et l'inhibition de l'apoptose (BCL2 = « B-cell CLL/lymphoma 2 ») ont été identifiées et validées (Cimmino et al., 2005; Linsley et al., 2007; Liu et al., 2008; Klein et al., 2010), apportant des indices sur les voies régulées par ces miRNAs pouvant expliquer leur rôle de suppresseurs de tumeur.

II.3.1.2 let-7

Plusieurs gènes de la famille de miRNAs let-7 sont situés dans des régions chromosomiques fréquemment délétées dans les cancers (Calin et al., 2004b). L'expression de let-7 est diminuée dans différents types de cancers, principalement dans les cancers du poumon (Takamizawa et al., 2004; Johnson et al., 2005), tandis que let-7 est normalement fortement exprimé dans ce tissu (Johnson et al., 2007). Une étude menée sur des échantillons de cancers du poumon humains montre que 7 échantillons sur 16 présentent une réduction de plus de 80% de l'expression de let-7 par rapport au tissu normal du poumon chez le même patient (Takamizawa et al., 2004). Comme nous l'avons déjà mentionné, cette étude montre aussi qu'une expression réduite de let-7 constitue un indicateur de pronostic défavorable. Une autre étude montre une diminution moyenne de plus de 50% de l'expression de let-7 dans 12 échantillons de cancers du poumon humains par rapport au niveau d'expression dans le tissus normal correspondant (Johnson et al., 2005). Les résultats des équipes de Tyler Jacks et Franck Slack montrent que la transfection ou l'induction de l'expression de let-7 dans des lignées cellulaires de cancer du poumon ralentit la prolifération cellulaire *in vitro* et le développement de tumeurs lorsque ces cellules sont xénogreffées dans des souris immunodéficientes ; et que l'expression de let-7 diminue aussi significativement le nombre et la taille des tumeurs dans un modèle murin de cancer du poumon induit par l'expression du mutant oncogène K-Ras^{G12D} (Esquela-Kerscher et al., 2008; Kumar et al., 2008). La démonstration formelle que let-7 est un suppresseur de tumeur nécessite son inactivation, supposée entrainer la formation de tumeurs. Cette inactivation est compliquée par la redondance de la famille let-7 : il existe 11 homologues connus de let-7, exprimés à partir de 8 gènes différents dans les génomes humain et murin. Une première approche a tout de même permis à l'équipe de Franck Slack de montrer que l'administration d'une molécule anti-let-7g dans le modèle murin de cancer du poumon K-Ras^{G12D} augmentait significativement le développement des tumeurs *in vivo* (Trang et al., 2010). Cependant, même s'il n'est pas exclu que cet anti-miR croise avec d'autres membres de la famille let-7, sa spécificité à let-7g et son expression seulement transitoire limitent le résultat obtenu.

L'expression de let-7 est aussi diminuée dans les cancers du sein par rapport au tissu mammaire normal (Iorio et al., 2005; Yu et al., 2007). L'étude de Yu et al. explore surtout l'hypothèse des cellules « initiatrices de tumeurs » (C-IT) ou cellules souches cancéreuses, qui propose que quelques cellules, à l'origine de la tumeur, maintiennent au sein de celle-ci un potentiel d'auto-renouvellement et une multipotence. Ces C-IT sont hautement tumorigènes lorsque transplantées chez la souris et pourraient jouer un rôle dans la formation de métastases et dans la réapparition de tumeurs des années plus tard après traitement (Dalerba et al., 2007). Les auteurs montrent, par différentes méthodes permettant l'enrichissement en C-IT à partir de lignées cellulaires ou d'échantillons de cancers du sein, que l'expression de let-7 est nulle dans ces cellules, et qu'elle augmente au fur et à mesure de leur différentiation (Yu et al., 2007), ce qui est cohérent avec le rôle déjà décrit de let-7 dans la différentiation cellulaire normale. Cette étude montre que l'expression fortement réduite de let-7 est nécessaire au maintien de l'état indifférencié des C-IT, et que l'expression forcée de let-7 dans ces cellules transplantées ensuite chez la souris diminue le nombre et la vitesse de prolifération des tumeurs. Une autre étude, cohérente avec ces résultats, montre que le niveau d'expression de let-7 est faible dans des lignées cellulaires tumorales humaines ayant une signature d'expression mésenchymale (tumeurs moins différenciées, plus agressives), et élevée dans celles ayant une signature épithéliale (tumeurs plus différenciées, moins agressives), let-7 étant donc un marqueur des cancers plus différenciés (Shell et al., 2007).

Let-7 joue un rôle de suppresseur de tumeur en réprimant plusieurs cibles oncogènes, dont N-Ras et K-ras (Johnson et al., 2005), HMGA2 (« high mobility group AT-hook 2 ») (Lee and Dutta, 2007; Mayr et al., 2007), et c-Myc (Sampson et al., 2007); ainsi que des régulateurs du cycle cellulaire comme CDC25A, CDK6 et la cycline D2 (Johnson et al., 2007). Or, des mutations activatrices de membres de la famille Ras sont trouvées dans beaucoup de tumeurs humaines, dont environ 30% dans les adénocarcinomes du poumon (Bos, 1989). De même, HMGA2, normalement exprimée pendant l'embryogenèse mais pas dans les tissus adultes (Rogalla et al., 1996), est surexprimée dans un certain nombre de tumeurs bénignes (Fedele et al., 2001), et dans 90% des cancers du poumon (Sarhadi et al., 2006). Dans beaucoup de ces tumeurs, une translocation chromosomique au niveau de la région 12q15 tronque l'ORF de HMGA2 qui perd une partie C-terminale et le 3'UTR ou parfois uniquement le 3'UTR (Geurts et al., 1997; Fedele et al., 2001; Inoue et al., 2006). Or, HMGA2 possède 7 sites de réponse à let-7 conservés dans son 3'UTR, et l'inhibition de l'interaction let-7/HMGA2 par la mutation de ces sites a un effet tumorigènique *in vitro* et *in vivo* dans la lignée fibroblastique immortalisée mais pas transformée NIH/3T3 (Mayr et al., 2007). Ces résultats suggèrent que le potentiel oncogène de la version sans 3'UTR de HMGA2 provient de la perte de la répression exercée par le miRNA let-7.

Comme décrit précédemment dans le contexte de la différentiation, la protéine lin-28 inhibe l'expression de let-7 à différents niveaux. Or, environ 15% des échantillons tumoraux (tumeurs primaires et lignées cellulaires) présentent une surexpression de lin-28 ; et la surexpression de lin-28 permet de transformer différentes lignées cellulaires, en diminuant fortement l'expression des membres de la famille let-7, ce qui a pour conséquence la surexpression des protéines oncogéniques cibles de let-7, K-Ras et c-myc (Viswanathan et al., 2009). De plus, une forte expression de lin-28 corrèle avec une faible expression de let-7 et avec un enrichissement en gènes cibles de let-7 et en gènes induits par c-myc dans des échantillons de carcinomes hépatiques, et corrèle avec des stades avancés de plusieurs types de cancers (Viswanathan et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc un mécanisme par lequel lin-28 a un effet tumorigènique grâce à l'inhibition du miRNA let-7, et par conséquent l'induction de plusieurs oncogènes cibles (Figure 14).

II.3.2 Oncogènes (oncomiRs)

II.3.2.1 miR-17-92

Le cluster miR-17-92 est un exemple de pri-miRNA polycistronique codant pour 6 miRNAs (Figure 12). Il est situé dans le 3e intron d'un transcrit primaire R-codant préalablement noté C13orf25. D'anciennes duplications génomiques ont donné lieu à deux clusters paralogues de miR-17-92 situés sur d'autres chromosomes, les clusters miR-106a-363 et miR-106b-25 (Figure 12). Contrairement aux clusters miR-17-92 et miR-106b-25 exprimés dans la plupart des tissus murins, le cluster miR-106a-363 est indétectable dans tous les tissus testés (Ventura et al., 2008).

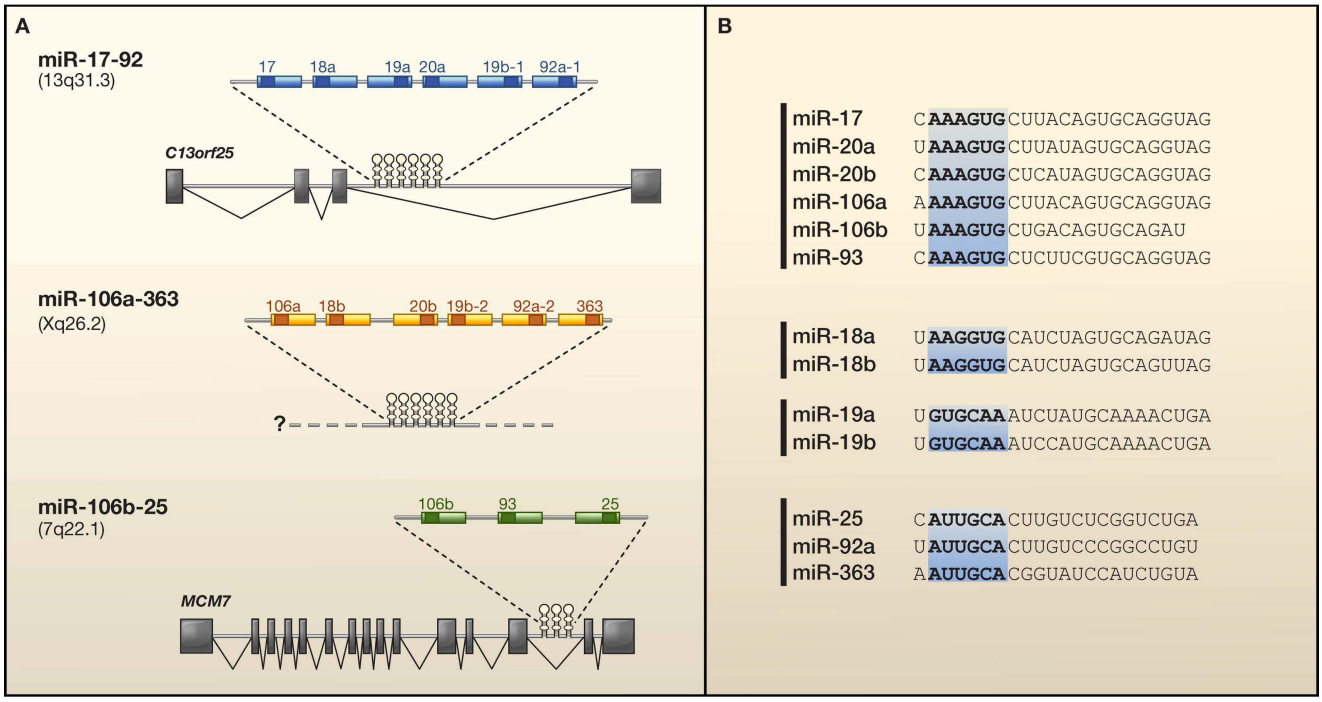


Figure 12 : Organisation du cluster miR-17-92 et de ses paralogues. *A) Organisation génomique et structures des transcrits primaires des clusters miR-17-92, miR-106a-363 et miR-106b-25 humains. miR-17-92 est codé dans le 3e intron d'un transcrit R-codant noté C13orf25. Le transcrit primaire de miR-106a-363 n'a pas été caractérisé. Le cluster miR-106b-25 est situé dans le 13e intron du gène P-codant MCM7. B) Les miRNAs de ces 3 clusters peuvent être regroupés en 4 familles en fonction de leur séquence noyau (en bleu). (D'après Mendell, 2008).*

En recherchant des gènes candidats dans la région 13q31-q32 fréquemment amplifiée dans différents types de lymphomes et de tumeurs solides, Ota et al. identifient C13orf25 (le transcrit primaire de miR-17-92), comme étant surexprimé dans des lignées cellulaires de lymphomes et des échantillons de lymphomes diffus à grandes cellules B présentant cette amplification (Ota et al., 2004). Par la suite, une étude menée par les laboratoires de Gregory Hannon et Scott Hammond confirment la surexpression des miRNAs du cluster dans 65% des échantillons de lymphomes testés (Figure 13) (He et al., 2005). Des surexpressions de miRNAs de miR-17-92 sont ensuite mises en évidence dans de nombreux autres types tumoraux (Hayashita et al., 2005; Volinia et al., 2006; Petrocca et al., 2008; Northcott et al., 2009; Mi et al., 2010). De plus, l'étude menée par les équipes d'Hannon et Hammond apporte l'évidence expérimentale d'une activité oncogénique du cluster. La transplantation dans des souris préalablement irradiées de cellules souches hématopoïétiques (CSH) provenant de souris Eμ-myc entraine spontanément l'apparition de lymphomes à cellules B. Or, la transduction rétrovirale des CSH Eμ-myc avec une version partielle du cluster miR-17-92 (miR-17-19b) accélère fortement l'apparition des tumeurs (51 jours contre 3-6 mois), leur développement et la mort des animaux (He et al.,

2005). De plus, ces tumeurs présentent un index mitotique plus fort et peu d'apoptose par rapport aux tumeurs induites par Eμ-myc seule, indiquant que miR-17-92 active la prolifération et joue un rôle anti-apoptotique. Par ailleurs, une autre étude montre que des souris modifiées génétiquement afin de surexprimer miR-17-92 dans les lymphocytes B et T meurent prématurément d'une maladie lympho-prolifératives associée à de l'auto-immunité (Xiao et al., 2008). *In vitro*, les lymphocytes activés de ces souris présentent une augmentation de la prolifération et de la survie par rapport aux cellules contrôles, confirmant le rôle activateur de la prolifération et inhibiteur de l'apoptose de miR-17-92. Par ailleurs, la délétion du cluster miR-17-92 chez la souris entraine une mort cellulaire prématurée lors de la transition des cellules pro-B à pre-B au cours du développement (Ventura et al., 2008), indiquant que miR-17-92 joue un rôle dans la survie cellulaire et le développement normal du compartiment des cellules B. De plus, une augmentation de la tumorigenèse induite par la surexpression de miR-17-92 a été décrite dans d'autres modèles tumoraux, dont des lignées de neuroblastome (Fontana et al., 2008) et un modèle murin de leucémie associée au réarrangement du gène MLL (Wong et al., 2010).

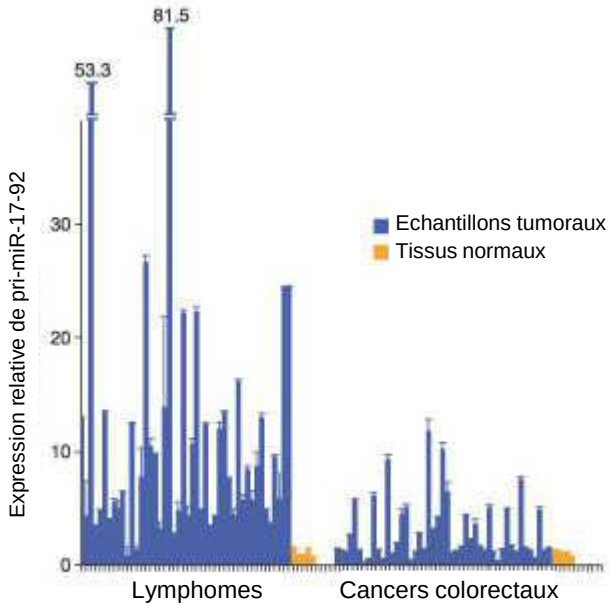


Figure 13 : Augmentation de l'expression de miR-17-92 dans les lymphomes. *Expression de pri-miR-17-92 mesurée par qRT-PCR en temps réel dans 46 échantillons de lymphomes et 47 carcinomes colorectaux, et comparée aux niveaux d'expression dans les tissus normaux de 5 individus. (D'après He et al., 2005).*

L'étude de Xiao et al. identifie deux gènes suppresseurs de tumeurs, PTEN («phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10») et Bim (ou BCL2L11), comme étant des cibles de plusieurs miRNAs du cluster miR-17-92 (Xiao et al., 2008), celles-ci étant confirmées par

plusieurs autres études (Lewis et al., 2003; Fontana et al., 2008; Ventura et al., 2008; Olive et al., 2009; Poliseno et al., 2010a; Poliseno et al., 2010b). PTEN est un suppresseur de tumeur, muté ou délété dans de nombreux types tumoraux, qui régule négativement la voie activatrice de prolifération et de survie PI3K/Akt (Cantley and Neel, 1999). A l'aide du modèle de lymphome B obtenu par transplantation de CSH Eμ-myc décrit ci-dessus, Olive et al. montrent que miR-19 est le miRNA du cluster nécessaire et suffisant pour l'accélération du développement des lymphomes, principalement via une inhibition de l'apoptose, et valident PTEN comme cible directe de miR-19 potentiellement impliquée dans le phénotype (Olive et al., 2009). Bim est un facteur activateur de l'apoptose qui agit comme antagoniste de protéines anti-apoptotiques telles que BCL2 (O'Connor et al., 1998). Or, une haploinsuffisance du gène Bim accélère la lymphomagenèse dans le modèle murin Eμ-myc (Egle et al., 2004), indiquant que la répression de ce gène par miR-17-92 peut aussi être impliquée dans la capacité du cluster à accélérer la progression de la maladie. Une autre cible de miR-17-92, plus précisément des miRNAs de la famille miR-17/20/106 (Figure 12), est p21 (Waf1/Cip1/CDKN1A) (Fontana et al., 2008; Ivanovska et al., 2008; Inomata et al., 2009; Wong et al., 2010), un inhibiteur de complexes cycline-CDK qui bloque la transition G1-S du cycle cellulaire (Harper et al., 1993) et agit comme un suppresseur de tumeur *in vivo* (Martin-Caballero et al., 2001). p21 est activée par et agit en aval de p53 (el-Deiry et al., 1993). La voie p53 est aussi impliquée dans un autre mécanisme protecteur contre la tumorigenèse : la sénescence induite par un oncogène. En particulier, la surexpression d'une version oncogène mutée de Ras (Ras^{G12V}) dans des cellules primaires entraine un arrêt cellulaire irréversible de type sénescence (Serrano et al., 1997). La transformation par Ras^{G12V} nécessite donc un autre évènement permettant d'inhiber cette sénescence, par exemple l'inactivation de p53. Or, deux études montrent que les miRNAs de la famille miR-17/20 sont capables d'inhiber la sénescence induite par Ras^{G12V} dans des cellules primaires humaines (fibroblastes et cellules épithéliales mammaires), vraisemblablement grâce à la répression de leur cible p21 (Borgdorff et al., 2010; Hong et al., 2010), mettant ainsi en évidence un autre mécanisme par lequel miR-17-92 est impliqué dans le processus de tumorigenèse.

Une boucle de régulation relie le proto-oncogène c-myc, le cluster miR-17-92 et les facteurs E2F1-3, activateurs de la transition G1-S (Wu et al., 2001) (Figure 14). Le proto-oncogène c-myc induit l'expression des facteurs E2Fs (Sears et al., 1997; Adams et al., 2000; Fernandez et al., 2003) et du cluster miR-17-92 (O'Donnell et al., 2005), tandis que certains miRNAs du cluster (famille miR-17/20) régulent négativement E2F1-3 (O'Donnell et al., 2005; Sylvestre et al., 2007). Par ailleurs, les facteurs E2Fs stimulent l'expression de leurs propres gènes (Hsiao et al., 1994; Johnson et al., 1994), l'expression de c-myc (Thalmeier et al., 1989), et celle du cluster

miR-17-92 (Sylvestre et al., 2007; Woods et al., 2007). Notons que les données les plus complètes et convaincantes concernant la répression des facteurs E2Fs par miR-17/20 concernent E2F1 (O'Donnell et al., 2005; Sylvestre et al., 2007). Or, dans certains contextes cellulaires, E2F1 peut induire l'apoptose (Field et al., 1996; Nahle et al., 2002), et l'inactivation du gène chez la souris entraine même l'apparition de tumeurs (Yamasaki et al., 1996). L'inhibition préférentielle d'E2F1 par rapport à E2F3 par miR-17/20 pourrait donc inhiber l'apoptose induite par E2F1 et favoriser la prolifération induite par E2F3 (Woods et al., 2007). Alternativement, l'induction de miR-17-92 par c-myc et E2F1-3 et la répression qu'il exerce sur E2F1-3 semble jouer un rôle protecteur contre l'activation réciproque démesurée de ces gènes (boucle d'auto-amplification du signal) pouvant conduire à un signal prolifératif incontrôlé (Figure 14). Dans ce contexte, miR-17-92 jouerait donc curieusement un rôle inhibiteur de la progression du cycle cellulaire, peu cohérent avec son rôle oncogénique. Toutefois, il faut noter qu'une étude mesurant les altérations du nombre de copies de gènes de miRNAs par hybridation génomique comparative montre que la région contenant miR-17-92 est délétée dans 16,5% des cancers ovariens, 21,9% des cancers du sein et 20% des mélanomes (Zhang et al., 2006). De plus, un rôle inhibiteur de la prolifération par le cluster, en particulier par miR-17-5p, a été montré dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Hossain et al., 2006; Yu et al., 2010) et une lignée endothéliale non transformée (Shan et al., 2009). Il a été montré que la surexpression de miR-17 *in vivo* dans des souris transgéniques entrainait un retard de croissance de différents organes (Shan et al., 2009). Dans les lignées de cancers du sein, cet effet anti-prolifératif pourrait être lié à l'inhibition par miR-17-5p de AIB1 (« Amplified in breast cancer 1 ») (Hossain et al., 2006), un oncogène fréquemment surexprimé dans les cancers du sein et co-activateur du récepteur aux œstrogènes ERα et d'E2F1 (Anzick et al., 1997; Torres-Arzayus et al., 2004) (Louie et al., 2004), apportant donc un niveau supplémentaire de répression de l'activité d'E2F1 par miR-17-92. De plus, suite à une activation œstrogènique, ERα induit indirectement l'expression du cluster miR-17-92 grâce à l'induction de c-myc, et miR-17-92 cible en retour ERα (Castellano et al., 2009), ajoutant de nouvelles interactions au réseau c-myc/miR-17-92 dans les cancers du sein (Figure 14). Ces résultats suggèrent donc que miR-17-92 pourrait agir comme un suppresseur de tumeur ou un oncogène en fonction du contexte cellulaire, mais la preuve expérimentale que miR-17-92 peut agir comme un suppresseur de tumeur *in vivo* n'a pas été établie. D'autre part, l'étude du rôle individuel des miRNAs du cluster est nécessaire, comme cela a été fait dans le modèle de lymphome Eμ-myc pointant miR-19 comme l'élément oncogénique du cluster dans ce contexte-ci.

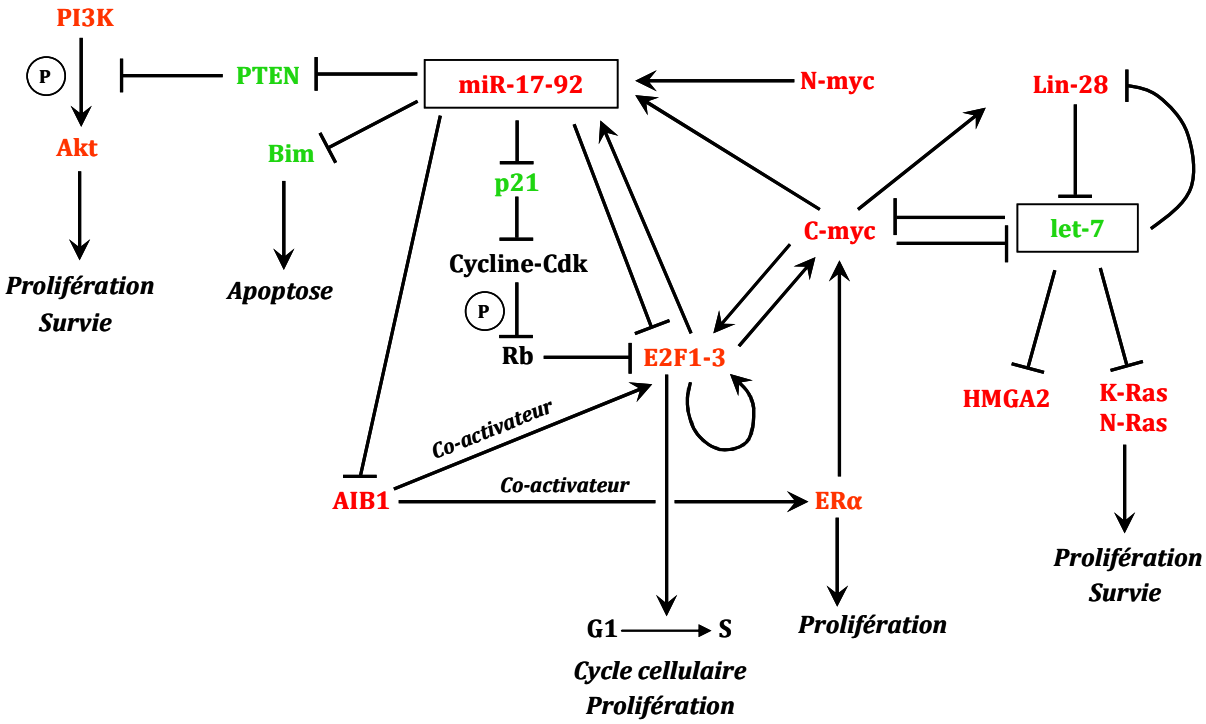


Figure 14 : Réseau de cibles régulées par la famille de miRNAs let-7 (suppresseur de tumeur) et le cluster miR-17-92 (oncogène) dans le contexte tumoral. *Schéma non exhaustif intégrant les miRNAs suppresseurs de tumeur let-7 et les miRNAs du cluster oncogène miR-17-92 dans un réseau complexe de régulation de cibles elles mêmes oncogènes (en rouge) ou suppresseurs de tumeurs (en vert).*

Enfin, il est intéressant de noter que les miRNAs du cluster miR-106b-25, paralogue de miR-17-92, ciblent également PTEN (Poliseno et al., 2010a), Bim et p21 (Ivanovska et al., 2008; Petrocca et al., 2008). L'étude de Poliseno et al. montre que les miRNAs de miR-106b-25 sont surexprimés dans les cancers de la prostate (Poliseno et al., 2010a). Il avait déjà été montré que le gène hôte du cluster, MCM7 (« mini-chromosome maintenance 7 ») (Figure 12), est fréquemment amplifié dans les cancers de la prostate (Ren et al., 2006), et que MCM7 et miR-106b-25 sont sur-exprimés dans les tumeurs de la prostate par rapport aux tissu normaux (Ambs et al., 2008). Poliseno et al. montrent que l'expression de miR-106b-25 avec celle de la protéine codée par MCM7 permet de transformer des cellules MEFs (« mouse embryonic fibroblasts ») et d'initier la formation de tumeurs de la prostate *in vivo*, tandis que les expressions du cluster de miRNAs seul ou de la protéine MCM7 seule ne sont pas transformantes. Ces résultats démontrent le pouvoir transformant d'un cluster de miRNAs en coopération avec le gène hôte. Une autre étude indique que les miRNAs du cluster mir-106b-25 sont aussi parmi les plus fortement surexprimés dans les cancers gastriques, et identifie Bim comme cible de miR-25, un miRNA appartenant à la même famille que miR-92, et p21 comme cible de miR-106b et miR-93 (Petrocca et al., 2008). Ce travail met aussi en évidence une boucle de régulation entre E2F1 et le cluster miR-106b-25, similaire à celle déjà décrite pour miR-17-92.

II.3.2.2 miR-155

Le précurseur de miR-155 est codé dans un transcrit préalablement connu sous le nom de BIC. Le gène BIC avait déjà été identifié avec c-myc comme un locus d'insertion rétrovirale dans les lymphomes induits par le virus de la leucose aviaire chez le poulet (Clurman and Hayward, 1989; Tam et al., 1997). Tam et al. ont montré une activité oncogénique de BIC, qui coopère avec c-myc dans la lymphomagenèse chez le poulet (Tam et al., 2002). Cependant, l'absence d'une ORF dans le transcrit BIC avait déjà conduit Tam et al. à penser que l'ARN lui-même pouvait être fonctionnel et à identifier une structure tige-boucle conservée que l'on sait aujourd'hui être pre-miR-155 (Tam et al., 1997; Tam, 2001; Tam et al., 2002). Il avait également été montré que l'expression de BIC était augmentée dans les lymphomes de Hodgkin humains (van den Berg et al., 2003). En 2004, Metzler et al. montrent que BIC et pre-miR-155 sont fortement surexprimés dans les formes pédiatriques des lymphomes de Burkitt et proposent que miR-155 coopère avec l'oncogène c-myc qui est activé dans ce type de lymphome (Metzler et al., 2004). Depuis, de nombreuses études ont montré que miR-155 est surexprimé dans un grand nombre de tumeurs, dont de nombreuses tumeurs d'origine hématopoiétiques (Calin et al., 2005; Eis et al., 2005; Kluiver et al., 2005; Fulci et al., 2007; Marton et al., 2008; O'Connell et al., 2008), des cancers du sein (Iorio et al., 2005; Yan et al., 2008), du col de l'utérus (Wang et al., 2008c), du pancréas (Lee et al., 2007; Szafranska et al., 2007) ou encore du poumon (Yanaihara et al., 2006). miR-155 fait partie des miRNAs surexprimés dans la signature caractérisant les tumeurs solides (Volinia et al., 2006) et son expression élevée a été associée à un pronostic défavorable dans les cancers du poumon et du pancréas (Yanaihara et al., 2006; Greither et al., 2010).

miR-155 est fortement exprimé dans les cellules hématopoïétiques (Landgraf et al., 2007) et joue un rôle dans des processus physiologiques tels que l'hématopoïèse, l'inflammation et l'immunité (Faraoni et al., 2009). Deux études ont utilisé des modèles murins avec une surexpression d'une version ectopique de miR-155 dans les cellules B et les cellules souches hématopoïétiques respectivement (Costinean et al., 2006; O'Connell et al., 2008). Costinean et al. ont généré des souris transgéniques avec miR-155 sous contrôle d'un promoteur spécifique des cellules B et avec la séquence « enhancer » Eμ permettant l'expression de miR-155 spécifiquement à partir de la fin du stade pro-B (Costinean et al., 2006). Les auteurs montrent que les souris surexprimant miR-155 dans les cellules B présentent d'abord une expansion polyclonale des cellules pre-B dans la rate et la moelle osseuse, suivie du développement d'un lymphome de haut grade. Ces résultats montrent que la surexpression de miR-155 suffit à transformer des cellules B *in vivo*. Dans une étude ultérieure basée sur le même modèle, les auteurs identifient deux cibles de miR-155 dont l'expression est diminuée dans le compartiment des cellules B (pre-B et B matures) des souris leucémiques où Eμ-miR-155 est surexprimé

(Costinean et al., 2009). Il s'agit de SHIP (« Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphate ») et Cebpβ (« CCAAT enhancer-binding protein β »), deux médiateurs de la signalisation interleukine-6 qui interviennent dans la différentiation des cellules hématopoïétiques et notamment la maturation des cellules B (Screpanti et al., 1995; Helgason et al., 2000). Costinean et al. proposent que la répression de ces cibles par miR-155 bloque la différentiation des cellules au stade pre-B et favorise leur expansion polyclonale à l'origine de la leucémie et du lymphome de haut grade dans les souris Eμ-miR-155. Une autre étude a introduit un transgène exprimant miR-155 dans des cellules souches hématopoïétiques transplantées dans des souris irradiées afin de reconstituer leur moelle osseuse (O'Connell et al., 2008). Cette étude montre que la surexpression de miR-155 dans la moelle osseuse entraine un syndrome myéloprolifératif avec une expansion anormale du compartiment myéloïde au détriment d'autres cellules hématopoïétiques comme les lymphocytes et les érythrocytes, sans toutefois développer une véritable leucémie, nécessitant probablement d'autres mutations. De plus, les auteurs identifient et valident plusieurs cibles prédites de miR-155, réprimées par la surexpression de miR-155 et pouvant jouer un rôle dans le syndrome myéloprolifératif observé. Parmi ces cibles, ils retrouvent notamment Cebpβ déjà mentionné, qui intervient aussi dans la granulopoièse (Hirai et al., 2006).

Nous avons mentionné que miR-155 est aussi surexprimé dans les cancers du sein. Kong et al. montrent que la surexpression de miR-155 dans une lignée cellulaire de cancer du sein l'exprimant peu favorise la prolifération et la survie de ces cellules, tandis que son inhibition dans une lignée l'exprimant fortement entraine un arrêt cellulaire et de l'apopotose (Kong et al., 2010). De plus, l'inhibition de miR-155 sensibilise ces cellules à l'effet d'agents chimiothérapeutiques comme la doxorubicine. Les auteurs de cette étude montrent que FoxoA3, un facteur de transcription activateur de protéines apoptotiques comme Bim et p27, est une cible de miR-155. L'expression ectopique d'une version sans le 3'UTR de FoxoA3 (donc résistante à la répression par miR-155) annule l'effet de la surexpression de miR-155 en restaurant l'effet apoptotique d'un traitement à la doxorubicine, ainsi que l'expression des protéines Bim et p27 agissant en aval de FoxoA3. FoxoA3 constitue donc une cible de miR-155 intervenant dans son rôle anti-apoptotique dans les cancers du sein. Une autre étude montre que la surexpression de miR-155 favorise la prolifération cellulaire de la lignée cellulaire MDA-MB-231 *in vitro*, et le développement de tumeurs à partir de ces cellules xenogreffées à des souris immunodéficientes, tandis que l'utilisation d'un anti-miR-155 (oligonucléotide modifié antisens de miR-155) inhibe la formation de colonies indépendante de l'ancrage à un support et réduit le développement des tumeurs xénogreffées (Jiang et al., 2010). Les auteurs de cette étude identifient une autre cible de miR-155 impliquée dans son rôle oncogénique : SOCS1

(« suppressor of cytokine signaling 1 »), un suppresseur de tumeur qui régule négativement la voie de signalisation JAK/STAT (Yoshikawa et al., 2001). L'étude montre que l'inhibition de SOCS1 par un siRNA a des effets similaires à la surexpression de miR-155. De plus, par une approche similaire à celle utilisée pour FoxoA3, les auteurs montrent que la surexpression d'une version de SOCS1 sans 3'UTR annule les effets de la surexpression de miR-155 *in vitro* et *in vivo*, confirmant que cette cible joue un rôle dans l'augmentation de la tumorigenèse induite par miR-155 dans les lignées de cancers du sein.

Une autre étude montre que TP53INP1 (« tumor protein p53 inducible nuclear protein 1 »), une protéine pro-apoptotique induite par p53, est surexprimée dans les adénocarcinomes pancréatiques, agit comme un suppresseur de tumeur *in vivo* et est une cible prédite de miR-155 (Gironella et al., 2007). Si les auteurs valident par des tests *in vitro* TP53INP1 comme cible de miR-155 et montrent que l'inhibition de miR-155 par un anti-miRNA induit de l'apoptose dans une lignée d'adénocarcinome pancréatique, ils ne font pas la démonstration formelle comme dans les études précédentes que l'inhibition de TP53INP1 par miR-155 joue un rôle dans la tumorigenèse.

Rappelons enfin que l'étude d'Olson et al., déjà citée (*II.1.1 Profils et signatures d'expression*), a montré que la surexpression de miR-155 dans les tumeurs pancréatiques d'un modèle murin était liée principalement à une surexpression dans les cellules hématopoïétiques qui infiltrent généralement les tumeurs (Olson et al., 2009). La surexpression de miR-155, spécifique des cellules hématopoïétiques, pourrait donc être une conséquence indirecte d'une inflammation et d'une infiltration de cellules du système immunitaire dans certaines tumeurs.

II.3.2.3 miR-21

miR-21 est le miRNA le plus fréquemment trouvé surexprimé dans les cancers. L'étude menée par Volinia et al., qui analyse l'expression des miRNAs dans des échantillons correspondant à 6 types de tumeurs solides, montre que miR-21 est le seul miRNA surexprimé dans les 6 types tumoraux analysés (Volinia et al., 2006). D'autres analyses des profils d'expression des miRNAs dans des échantillons tumoraux montrent que miR-21 est surexprimé dans les glioblastomes (Chan et al., 2005), les carcinomes de la tête et du cou (Tran et al., 2007), les cancers ovariens (Iorio et al., 2007), les lymphomes B (lawrie 2007), les leucémies (Fulci et al., 2007), les carcinomes hépatocellulaires (Meng et al., 2007), les cancers du col de l'utérus (Lui et al., 2007), du sein (Iorio et al., 2005; Yan et al., 2008; Farazi et al., 2011), du colon (Schetter et al., 2008) ou encore du poumon (Yanaihara et al., 2006). Dans certains types tumoraux, la surexpression de

miR-21 est associée à un pronostic défavorable (Yanaihara et al., 2006; Markou et al., 2008; Schetter et al., 2008; Yan et al., 2008).

Afin de déterminer si la surexpression de miR-21 constitue uniquement un marqueur tumoral ou si miR-21 intervient dans le processus de tumorigenèse, des études fonctionnelles ont tout d'abord été réalisées dans des lignées cellulaires tumorales. L'étude de Chan et al. montre ainsi que l'inhibition de miR-21 entraine l'activation de caspases conduisant à de la mort cellulaire par apoptose dans des cellules de glioblastomes en culture (Chan et al., 2005). Si et al. montrent que l'inhibition de miR-21 dans la lignée de cancer du sein MCF-7 inhibe la prolifération et active l'apoptose dans les cellules en culture, et réduit le développement des tumeurs après implantation de ces cellules dans les glandes mammaires de souris immunodéficientes (Si et al., 2007). Ces études supportent un rôle activateur de la prolifération et anti-apoptotique de miR-21. Dans la lignée de cancer du sein métastatique MDA-MB-231, l'inhibition de miR-21 n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules (Zhu et al., 2008). En revanche, elle diminue l'invasion et la migration des cellules MDA-MB-231 *in vitro* ainsi que la formation de métastases dans les poumons de souris injectées avec ces cellules. Une autre étude montre que l'inhibition de miR-21 diminue la capacité invasive, d'intravasation et de métastase d'une lignée de carcinome du colon (Asangani et al., 2008). Dans des lignées de cancers hépatocellulaires, l'inhibition de miR-21 diminue la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion (Meng et al., 2006).

Plusieurs cibles de miR-21 pouvant jouer un rôle dans les phénotypes observés ont été validées dans différentes études. D'abord, la protéine suppresseur de tumeur TPM1 (tropomyosin 1) a été identifiée comme étant surexprimée dans les MCF-7 inhibées pour miR-21 et validée comme cible de miR-21 par des tests *in vitro* (Zhu et al., 2007). La surexpression de TPM1 dans les MCF-7 inhibe la prolifération et la formation des colonies sans ancrage à un support. Le suppresseur de tumeur PTEN a également été identifié comme cible de miR-21 dans des lignées de cancers hépatocellulaires (Meng et al., 2006). Dans ces lignées, PTEN a été validé comme cible de miR-21 en mesurant des effets significatifs de l'inhibition de miR-21 sur : l'expression du gène rapporteur de la luciférase portant le 3'UTR de PTEN, l'expression de PTEN endogène, et la phosphorylation, normalement inhibée par PTEN, de certaines protéines. De plus, des effets inverses sont obtenus par les auteurs en surexprimant miR-21 dans des hépatocytes normaux. L'inhibition de PTEN par un siRNA annule l'effet anti-prolifératif et anti-invasif de l'inhibition de miR-21 dans les lignées de cancers hépatocellulaires, indiquant que la dé-répression de PTEN lors de l'inhibition de miR-21 joue un rôle dans les phénotypes observés. PTEN est aussi réprimé par miR-21 dans un modèle de cellules de thyroïde de rat dans lesquelles l'expression d'un transgène H-Ras^{V12} peut être induite et entraine la surexpression de miR-21 (Talotta et al.,

2009). Dans ce modèle, PTEN et PDCD4 (détaillé ci-après) sont réprimés par l'induction de H-Ras^{V12} d'une manière dépendante de miR-21. En revanche, dans ce modèle, les auteurs ne trouvent pas de répression de TPM1. Notons que PTEN ne fait cependant pas partie des cibles prédites de miR-21. Frankel et al. montrent quant à eux que la surexpression ou l'inhibition de miR-21 dans les cellules de cancer du sein MCF-7 n'a des effets que très subtils sur l'expression de PTEN (Frankel et al., 2008). De plus, une autre étude, qui sera détaillée ci-après, montre qu'un gène rapporteur de la luciférase avec le 3'UTR de PTEN n'est pas inhibé par miR-21, et que PTEN ne fait pas partie des cibles réprimées *in vivo* dans un modèle de tumeurs du poumon surexprimant miR-21 (Hatley et al., 2010). L'effet de miR-21 sur les cibles dépend donc probablement beaucoup du contexte cellulaire et PTEN en particulier ne semble pas être une cible ubiquitaire de miR-21.

Plusieurs études montrent que le suppresseur de tumeur PDCD4 (« programmed cell death 4 ») est une autre cible de miR-21, validée dans plusieurs contextes cellulaires différents (Asangani et al., 2008; Frankel et al., 2008; Lu et al., 2008; Zhu et al., 2008). Frankel et al. montrent que la déplétion de PDCD4 par siRNA dans les cellules MCF-7 réduit significativement l'effet antiprolifératif de l'inhibition de miR-21 (Frankel et al., 2008), confirmant que PDCD4 joue, au moins en partie, un rôle dans le phénotype observé. Asangani et al. montrent que PDCD4 est aussi une cible de miR-21 dans des lignées de carcinomes du colon et qu'il existe une corrélation inverse entre l'expression de miR-21 et celle de PDCD4 dans les lignées cellulaires de cancers du colon et des échantillons provenant de résection de tumeurs du colon (Asangani et al., 2008). Une autre étude montre également que l'expression de PDCD4 corrèle inversement avec celle de miR-21 dans des échantillons de tumeurs du sein et que la surexpression de PCDC4 réduit la capacité invasive de la lignée cellulaire MDA-MB-231 (Zhu et al., 2008). De plus, une boucle de régulation impliquant miR-21 et PDCD4 a été mise en évidence dans la transformation induite par Ras (Figure 15) (Talotta et al., 2009). Ras est un activateur de AP-1, un facteur de transcription formé par la dimérisation de protéines des familles JUN et FOS. AP-1 a un effet tumorigénique en régulant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, ou encore l'invasion. Or, Talotta et al. utilisent une lignée de cellules de thyroïde de rat inductible pour l'expression de H-Ras^{V12} pour montrer que miR-21 est induit par l'expression de cet oncogène d'une manière dépendante de AP-1. Les auteurs montrent, par des expériences de ChiP et par clonage de la région promoteur de pri-miR-21 en amont d'un gène rapporteur, que miR-21 est une cible transcriptionnelle directe de AP-1. Ils montrent que PDCD4 est fortement réprimé par l'induction de H-Ras^{V12} d'une manière dépendante d'AP-1 et de miR-21. Or, il a déjà été montré que PDCD4 inhibe l'activité d'AP-1 (Yang et al., 2003; Wang et al., 2008b), ce qui inclut donc AP-1, miR-21 et PDCD4 dans une boucle de régulation mutuellement

repressive (voir paragraphe I.4.1 et Figure 10) permettant de renforcer l'activité d'AP-1 induite par Ras en levant l'inhibition exercée par PDCD4 (Figure 15).

Enfin, 3 études ont étudié le potentiel oncogène de miR-21 dans des modèles murins *in vivo*. L'étude de Hatley et al. est basée sur un modèle murin portant un allèle K-Ras^{G12D} qui est activé spontanément par des évènements de recombinaison *in vivo*, entrainant principalement la formation de tumeurs du poumon (Hatley et al., 2010). Les auteurs modifient ce modèle de manière à ce que ces souris surexpriment miR-21 ou n'expriment pas miR-21 (miR-21$^{-/-}$). Ils montrent que la surexpression de miR-21 augmente le nombre de tumeurs, l'hyperplasie et la vitesse de prolifération mais n'a pas d'effet sur la métastase ni sur la conversion d'adénome (bénin) à adénocarcinome, suggérant que miR-21 intervient plutôt dans l'initiation tumorale plutôt que dans sa progression. En revanche, la surexpression de miR-21 seul sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire n'est pas suffisante pour induire la formation de tumeurs. La délétion de mir-21 dans ce même modèle réduit significativement le nombre de tumeurs et les lésions hyperplasiques. Les auteurs valident une dizaine de cibles *in vitro* par des tests luciférase et confirment la diminution de leur expression *in vivo* dans les tumeurs surexprimant miR-21. Parmi ces cibles, 4 sont des régulateurs négatifs de la voie Ras/MEK/ERK : il s'agit de sprouty1, sprouty2, Btg2 (« B cell translocation gene 2 ») et PDCD4, ce qui renforce la boucle d'amplification du signal entre la voie Ras/AP-1 et miR-21 (Figure 15). Des cibles pro-apoptotiques comme Apaf1 (« apoptotic peptidase activating factor 1 »), Fas ligand, ou encore RhoB (« ras homolog gene family, member B »), sont également validées dans cette étude.

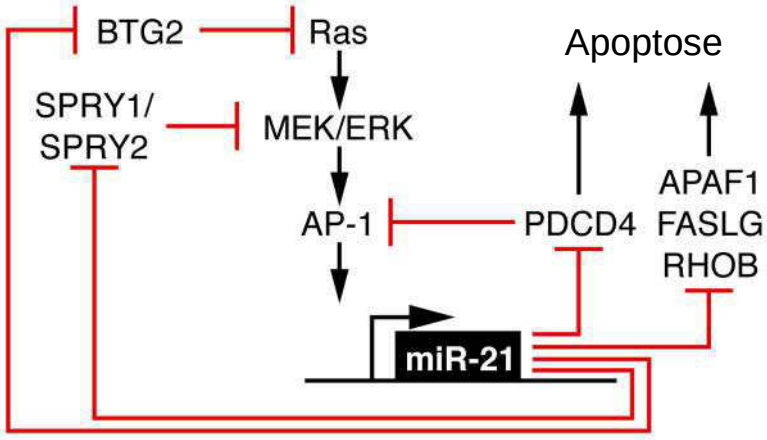


Figure 15: Boucle de régulation entre Ras et miR-21. *Schéma de cibles régulées par miR-21 montrant comment miR-21 favorise la tumorigenèse dans un modèle dépendant de Ras, en potentialisant le signal de la voie Ras par la répression de plusieurs régulateurs négatifs de cette voie, et en atténuant l'apoptose par la répression de plusieurs cibles pro-apoptotiques.*

L'équipe de Franck Slack a quant à elle développé un modèle murin de surexpression de miR-21 sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire « Tet-off » de manière à ce que le traitement des souris à la doxycyline arrête la surexpression de miR-21 (Medina et al., 2010). Dans ce modèle, la surexpression de miR-21 entraine au bout de 2 mois des signes cliniques de tumeurs hématopoïétiques avec des cellules tumorales envahissant le sang et certains organes comme le foie. Des souris contrôles recevant le traitement doxycycline ne présentent aucun signe de lymphomagenèse, même jusqu'à 3 mois. L'analyse en cytométrie de flux des cellules de la rate, du thymus et des ganglions lymphatiques montre que, dans les souris malades, ces organes sont envahis par une population néoplasique avec des marqueurs caractéristiques de cellules pre-B, qui ont donc arrêté de se différencier et se sont multipliées de manière clonale. Les auteurs confirment la nature maligne de ces tumeurs en montrant que l'injection de cellules provenant de ces tumeurs en sous-cutané dans des souris immunodéficientes entraine la formation de tumeurs solides. Les résultats obtenus par Medina et al. sont donc différents de ceux de Hatley et al. dont le modèle de surexpression de miR-21 seul ne suffit pas à induire la formation de tumeurs. Cette différence vient peut-être du dosage de la surexpression qui est supérieure à 10 dans le modèle de Medina et al. contre environ 5 fois la normale dans le modèle de Hatley et al., ce qui suffit peut-être à renforcer la tumorigenèse induite par Ras muté mais pas à induire de la tumorigenèse *de novo*. Medina et al. montrent surtout pour la première fois la dépendance des tumeurs à un miRNA oncogène. En effet, après apparition des premiers signes de lymphome, des souris sont traitées à la doxycycline pour inhiber la surexpression de miR-21. En quelques jours, les signes cliniques disparaissent et les tumeurs régressent. De plus, les souris traitées à la doxycycline sont toutes vivantes à 3 mois tandis que les souris qui continuent de surexprimer mir-21 meurent toutes avant. De même, après xénogreffe, le traitement des souris à la doxycycline une fois les tumeurs solides établies entraine une régression totale des tumeurs en quelques jours. Les auteurs montrent que la régression des tumeurs après inhibition de la surexpression de miR-21 est due, au moins en partie, à la mort des cellules tumorales par apoptose. La surexpression de miR-21 dans ce modèle entraine donc non seulement la formation de tumeurs mais surtout la dépendance de ces tumeurs à miR-21. Même si ce modèle de dépendance à un oncomiR présente comme limite le fait que la tumorigenèse soit induite par la surexpression d'une version exogène du miRNA lui-même, ces résultats suggèrent que, dans certaines tumeurs dépendantes de miRNAs oncogènes, ces derniers pourraient constituer de potentielles cibles thérapeutiques.

Enfin, une autre équipe a étudié l'effet de la délétion de miR-21 dans un modèle murin de carcinogenèse de la peau induite par le traitement avec des agents chimiques (Ma et al., 2011). Les résultats de cette étude montre que les souris miR-21$^{-/-}$ développent significativement moins

de papillomes (tumeurs bénignes apparaissant dans les premiers temps du traitement) que les souris sauvages dans ce modèle. Les auteurs montrent également que les kératinocytes des souris miR-21$^{-/-}$ présentent un taux de base d'apoptose plus élevé. Enfin, cette étude confirme que les protéines sprouty1, PTEN et PDCD4, mais pas sprouty2, sont induites dans les cellules miR-21$^{-/-}$, confirmant que l'effet de miR-21 sur différentes cibles est dépendant du contexte cellulaire.

II.3.2.4 miR-372~373

Les miRNAs miR-372 et miR-373 sont codés au sein du même cluster génomique (avec miR-371) et font partie des miRNAs identifiés comme fortement exprimés et spécifiques des cellules souches (voir *I.4.3 Maintien des états cellulaires spatio-temporels*). Leur rôle a donc logiquement été étudié entre autres dans les cellules souches. L'équipe de Robert Blelloch a réalisé un crible cherchant à identifier des miRNAs individuels capables de complémenter le défaut de prolifération que présentent les cellules ES de souris délétées pour le gène DGCR8, donc déficientes pour la production des miRNAs (Wang et al., 2008d). Parmi les miRNAs capables de complémenter, l'équipe de Blelloch identifie des miRNAs de la famille mmu-miR-290, homologues à la famille miR-372/373 chez l'homme. Ils valident plusieurs cibles pouvant intervenir dans cet effet accélérateur de la prolifération dans les cellules ES, parmi lesquelles p21/CDKN1A et LATS2 (« Large Tumor suppressor homolog 2 »), qui agissent comme des inhibiteurs de la transition G1-S.

L'équipe de Reuven Agami a publié 2 articles dans lesquels une approche de criblage fonctionnel à l'aide d'une banque de vecteurs de miRNAs leur permet d'identifier miR-372 et miR-373 comme de potentiels oncogènes dans les cancers des cellules germinales testiculaires, et miR-373 comme un activateur de la métastase (Voorhoeve et al., 2007; Huang et al., 2008). Dans le 1er article, l'équipe d'Agami recherche des miRNAs favorisant la transformation en permettant d'inhiber la sénescence induite par l'expression de l'oncogène H-Ras^{V12}, comme cela peut être fait en inhibant l'expression de p53 (Voorhoeve et al., 2007). Pour cela, ils transduisent une banque de vecteurs rétroviraux exprimant des régions génomiques codant pour des miRNAs avec un vecteur exprimant l'oncogène H-Ras^{V12} dans des fibroblastes immortalisés BJ/hTERT. Après 2 à 3 semaines en culture, ils analysent l'insertion des vecteurs de miRNAs dans les cellules ayant proliféré et identifient les vecteurs exprimant miR-372 et miR-373 comme ayant favorisé la prolifération des cellules. Les auteurs montrent que cet effet est du à l'inhibition par miR-372 et miR-373 de la senescence induite H-Ras^{V12}. L'expression du cluster miR-371-373 dans des cellules BJ/hTERT exprimant également l'antigène t de SV40 permet la transformation des cellules au même titre que l'inhibition de p53, comme le montrent la formation de colonies

sans ancrage à un support et la formation de tumeurs *in vivo* dans des souris athymiques. Les résultats de cette étude montrent également que la voie p53/p21 est active dans les cellules surexprimant miR-372 et miR-373, indiquant que les miRNAs agissent en aval de p53 pour inhiber la sénescence. En combinant une approche de puce comparant l'expression des ARNm dans les cellules H-Ras^{V12}/shRNA-p53 et H-Ras^{V12}/miR-371-373, avec les résultats des logiciels de prédiction de cibles, les auteurs identifient LATS2 (identifiée ultérieurement dans l'étude sur les cellules ES de Wang et al. citée ci-dessus), une kinase suppresseur de tumeur, dont la surexpression inhibe le complexe cycline E/Cdk2 et la transformation induite par Ras^{V12} (Li et al., 2003). Les auteurs valident LATS2 comme étant une cible de miR-372 et miR-373 en montrant que la surexpression de ces miRNAs inhibe l'expression de LATS2 endogène et un gène rapporteur de la luciférase avec le 3'UTR de LATS2. L'inhibition de LATS2 par miR-372/373 peut donc expliquer le maintien d'une activité CDK en présence d'un signal p53/p21 actif. Enfin les auteurs montrent que miR-372 et miR-373 sont surexprimés dans des échantillons de tumeurs des cellules germinales testiculaires, ayant souvent une version sauvage de p53, indiquant que ces miRNAs pourraient jouer un rôle oncogène dans ces tumeurs via le mécanisme décrit.

Dans un 2e article, l'équipe d'Agami transduit la lignée de cancer du sein non métastatique MCF-7 avec leur banque de vecteurs de miRNAs (Huang et al., 2008). Ils utilisent un test de migration cellulaire *in vitro* afin d'identifier des miRNAs favorisant la migration. Dans la population de cellules MCF-7 ayant migré, ils trouvent un enrichissement en cellules transduites avec miR-373 (ainsi que miR-520). Les auteurs confirment que la surexpression de miR-373 favorise la migration et l'invasion des MCF-7 *in vitro*. Par ailleurs, l'inhibition de miR-373 dans deux lignées cellulaires métastatiques (l'une de sein et l'autre de prostate) exprimant miR-373 diminue leur capacité de migration *in vitro*. Les cellules MCF-7 surexprimant miR-373 injectées à des souris immunodéficientes forment des nodules métastasiques *in vivo* dans le crâne, la colonne vertébrale et les poumons, alors que les MCF-7 contrôles ne forment aucune métastase. Par la même approche de recherche et de validation de cibles que l'article précédent, l'équipe d'Agami identifie et valide CD44, un récepteur membranaire de l'acide hyaluronique (composant de la matrice extracellulaire) comme cible de miR-373. Or, CD44 a été identifié comme inhibiteur de la métastase dans les cancers du colon et dans un modèle de cancer du sein (Choi et al., 2000; Lopez et al., 2005). La ré-expression d'une version de CD44 sans 3'UTR dans les MCF-7 surexprimant miR-373 réduit significativement l'invasion et la migration, confirmant que l'inhibition de CD44 joue un rôle dans l'effet pro-invasif et migratoire de miR-373. Enfin, les auteurs montrent que miR-373 est surexprimé dans les métastases d'échantillons cliniques de cancers du sein, en comparaison avec les tumeurs primaires, confirmant que ce miRNA joue

vraisemblablement un rôle dans le développement des métastases, et indiquant que miR-373 peut jouer un rôle dans les tumeurs d'origine somatique.

Il existe peu d'autres évidences d'une implication de miR-372 ou miR-373 comme oncogéniques dans des cancers somatiques hormis une étude sur les cancers de l'œsophage (Lee et al., 2009). Cette étude montre qu'il existe une corrélation inverse entre l'expression de miR-373 et LATS2 dans des lignées cellulaires de cancers de l'œsophage ainsi que des échantillons cliniques de tumeurs de l'œsophage. De plus, dans ces tumeurs, miR-373 fait partie des 4 miRNAs les plus surexprimés par rapport aux tissus normaux. L'inhibition de miR-373 dans les lignées cellulaires de cancers de l'œsophage qui l'expriment fortement augmente l'expression de LATS2 et diminue la vitesse de prolifération, tandis que la surexpression de miR-373 dans des lignées qui l'expriment peu a les effets inverses.

Cependant, d'autres études concernant miR-372 indiquent que ce miRNA serait plutôt diminué dans certains types tumoraux. Tian et al. montrent par exemple que miR-372 est diminué par rapport au tissu normal correspondant dans 18 sur 19 échantillons de tumeurs du col de l'utérus (Tian et al., 2011). Les auteurs montrent que la surexpression de miR-372 dans la lignée cellulaire tumorale de col de l'utérus HeLa diminue la vitesse de prolifération cellulaire et la transition S-G2 du cycle cellulaire. Ils valident les régulateurs du cycle cellulaire CDK2 et cycline A1 comme cibles de miR-372 dont l'inhibition serait impliquée dans le ralentissement de la prolifération induite par miR-372.

Par ailleurs, une diminution de miR-372 dans des échantillons de carcinomes hépatocellulaires est également mise en évidence dans une autre étude s'intéressant à la régulation d'un long ARN ne codant pas pour une protéine et appelé HULC (« highly up-regulated in liver cancer » = hautement induit dans les cancers du foie) (Wang et al., 2010a). Comme son nom l'indique, l'expression de cet ARN est fortement augmentée dans les cancers du foie. Les auteurs montrent que son expression est induite au niveau transcriptionnel par la fixation de la protéine CREB phosphorylée sur un site de réponse contenu dans le promoteur de HULC. Or, HULC possède un site de fixation de miR-372 qui permet de séquestrer ce miRNA et de diminuer son activité et, peut-être indirectement, son expression. De plus, cette étude montre que miR-372 a pour cible une sous-unité catalytique de PKA, responsable de la phosphorylation de CREB. Si les auteurs n'étudient pas l'effet de la diminution de miR-372 sur la tumorigenèse des lignées de cancer hépatique, ils mettent en évidence une boucle de régulation mutuellement répressive intéressante (voir paragraphe I.4.1 et Figure 10), impliquant un long ARN dit « non-codant ». Ainsi, l'inhibition de miR-372 par HULC, entraine une dé-répression de la sous-unité de PKA,

donc une augmentation de la phosphorylation de CREB, et donc une augmentation de la transcription de HULC. Au contraire, l'expression élevée de miR-372 a un effet inhibiteur sur HULC. Les fonctions des longs ARNs « non-codants » sont encore peu connues. Cette étude, ainsi que celle de Poliseno et al. montrant que l'ARN d'un pseudogène est capable de fixer les mêmes miRNAs que le gène original (Poliseno et al., 2010b), montre que l'une de ces fonctions pourrait être d'inhiber certains miRNAs en agissant comme des « éponges » endogènes les séquestrant, influençant ainsi l'expression de nombreux autres gènes.

OBJECTIFS ET STRATEGIE EXPERIMENTALE

I. Objectifs du projet

L'objectif général du projet était d'étudier le rôle de la voie miRNA dans la biologie cellulaire des tumeurs solides. Plus précisément, nous avons posé l'hypothèse que certaines cellules cancéreuses dépendent de miRNAs oncogènes pour survivre ou proliférer. Nous avons donc cherché à identifier de telles cellules, ainsi que les miRNAs impliqués dans la survie ou la prolifération tumorale.

L'inhibition de miRNAs individuels présente des limites. En effet, les outils d'inhibition de miRNAs individuels (anti-miRs ou antagomiRs) sont des molécules d'ARN antisens au miRNA mature ciblé, modifiées pour s'hybrider de manière irréversible au miRNA. Cependant, ces outils s'utilisent uniquement en transitoire. De plus, les miRNAs sont fortement redondants en séquence (il existe souvent plusieurs miRNAs homologues dans le génome qui diffèrent de un ou deux nt) et en fonction (des miRNAs ayant la même séquence « noyau » constituent des familles de miRNAs avec de nombreuses cibles en commun, des miRNAs d'un même cluster peuvent coopérer en inhibant plusieurs cibles d'une même voie…). Par conséquent, l'inhibition d'un seul miRNA a souvent des conséquences phénotypiques limitées (Krutzfeldt et al., 2005; Miska et al., 2007; Si et al., 2007; Wang et al., 2008d) (observations personnelles). Une alternative consiste à inhiber de manière globale l'expression des miRNAs. Nous avons vu que cette approche augmente le phénotype tumoral dans certains modèles (Kumar et al., 2007; Melo et al., 2010). Cependant, notre hypothèse implique que certaines cellules cancéreuses, dépendant majoritairement de miRNAs oncogènes pour survivre ou proliférer, présentent une perturbation de croissance ou de survie cellulaire après inhibition globale des miRNAs.

II. Stratégie expérimentale

II.1 Présentation globale de la stratégie utilisée

Afin d'identifier des cellules cancéreuses dépendantes des miRNAs, nous avons donc choisi d'utiliser une approche de génétique moléculaire de la voie miRNA basée sur l'inhibition globale de l'expression des miRNAs matures, suivie de la complémentation du/de(s) phénotypes observés par des miRNAs individuels (Figure 16). L'inhibition globale des miRNAs se fait en réprimant de manière stable l'expression de Drosha ou DGCR8, les deux protéines du microprocesseur, le complexe nucléaire de maturation des pri-miRNAs en pre-miRNAs (Figure

16). Cette inhibition se fait par RNAi grâce à l'expression de séquences shRNA (« short hairpin RNA ») ciblant spécifiquement Drosha ou DGCR8 (voir paragraphe suivant). Afin d'identifier des miRNAs d'intérêt dans la prolifération ou la survie des cellules cancéreuses identifiées, le principe de notre démarche expérimentale est ensuite d'identifier des miRNAs individuels capables de complémenter le(s) phénotype(s) observé(s). Pour cela, les miRNAs sont exprimés de manière stable sous leur forme précurseur de type « tige-boucle » (Figures 16 et 17). Une fois que des miRNAs capables de complémenter le(s) phénotype(s) induits par l'inhibition globale sont identifiés, nous avons cherché à identifier les voies contrôlées par ces miRNAs qui permettent aux cellules cancéreuses identifiées de survivre ou proliférer. En effet, l'hypothèse est que, suite à l'inhibition globale, la dé-répression d'une ou de plusieurs cible(s) de ces miRNAs est impliquée dans le phénotype. L'implication de ces cibles est testée en regardant si leur inhibition directe par RNAi permet de complémenter le phénotype induit par l'inhibition du microprocesseur (Figure 16).

Pour bloquer la maturation des miRNAs, nous avons donc choisi d'inhiber Drosha ou DGCR8 mais pas Dicer car (i) Drosha et DGCR8 sont deux protéines jusqu'à présent plus spécifiques à la voie miRNA que ne l'est Dicer, (ii) elles font partie du même complexe, le microprocesseur, et devraient donc conduire au même phénotype à moins d'effets non spécifiques, (iii) contrairement à Dicer, elles ne sont pas nécessaires au clivage et à la fonctionnalité des shRNA utilisés dans notre modèle expérimental, ni à la maturation des pre-miRNAs utilisés pour la complémentation.

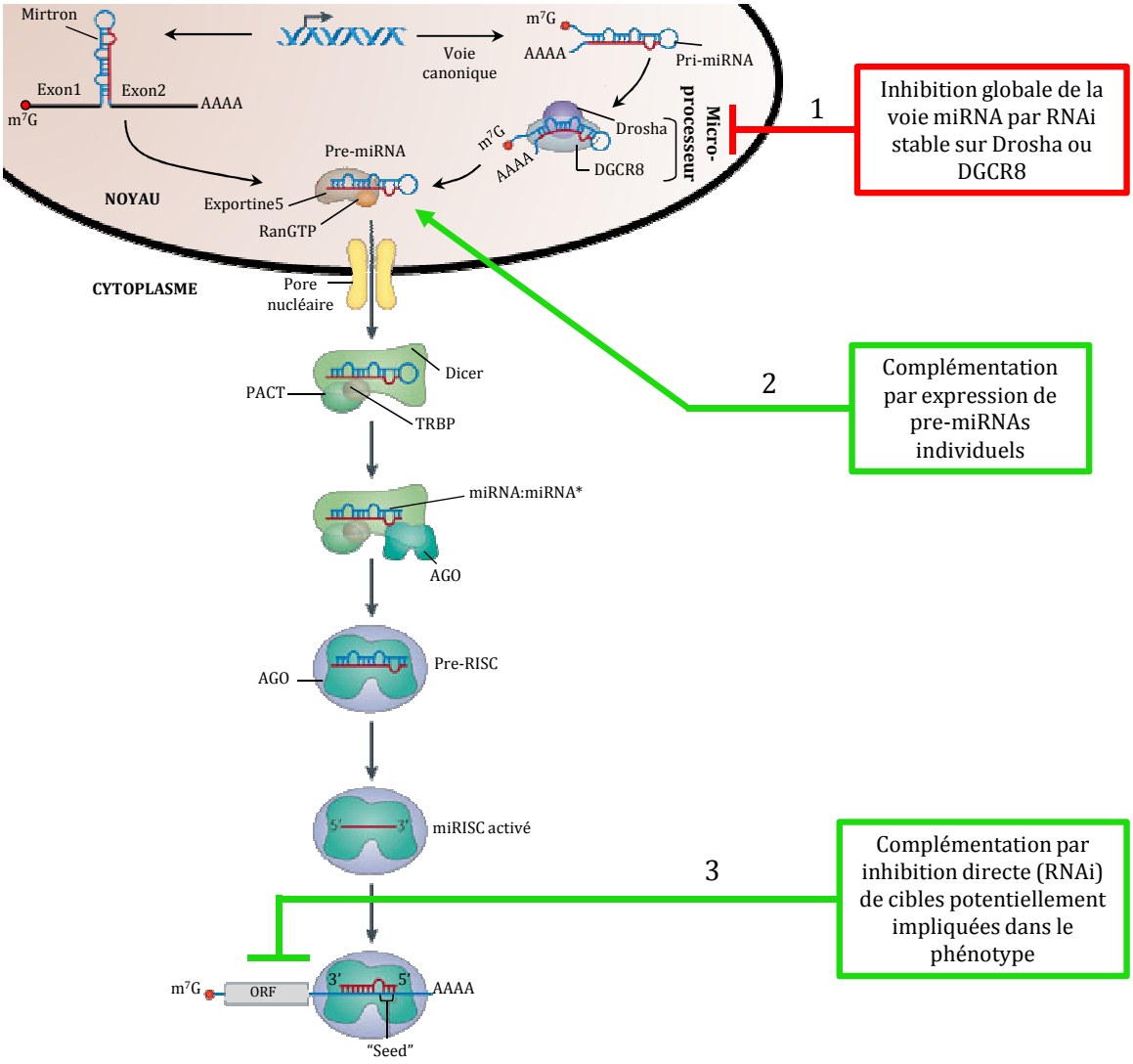


Figure 16 : Approche de génétique moléculaire de la voie miRNA. *Schéma de la voie de biogenèse des miRNAs indiquant la stratégie expérimentale adoptée. 1) L'expression de Drosha ou celle de DGCR8 est inhibée de manière stable par utilisation de shRNAs spécifiques de ces protéines. 2) La complémentation du/de(s) phénotype(s) induit(s) par l'inhibition du microprocesseur est testée par l'expression de pre-miRNAs individuels. 3) Après avoir identifié des miRNAs capables de complémenter le(s) phénotype(s) induit(s), l'implication de cibles de ces miRNAs dans le(s) phénotype(s) est évaluée. Pour cela, des cibles dont l'inhibition directe par shRNA complémente le phénotype induit par l'inhibition du microprocesseur sont recherchées.*

II.2 Utilisation de vecteurs épisomaux dérivés du plasmide EBV

II.2.1 Présentation

La possibilité d'éteindre spécifiquement l'expression de gènes par RNAi dans les cellules de mammifères sans déclencher de réponse interféron a été décrite avec l'utilisation des siRNAs dans l'introduction (Elbashir et al., 2001a). Les siRNAs sont couramment utilisés pour étudier les phénotypes associés aux pertes de fonction, mais l'inconvénient est qu'ils ne peuvent

s'utiliser que de manière transitoire. En 2002, Brummelkamp et al. développent le premier vecteur permettant de produire de manière stable des siRNAs (Brummelkamp et al., 2002). Le plasmide pSUPER permet de produire, sous contrôle du promoteur H1 dépendant de l'ARN polymérase III, un shRNA (« short hairpin RNA ») ou structure en épingle à cheveux, qui après clivage par Dicer, donne un duplexe de type siRNA. Ce vecteur s'est avéré très efficace pour éteindre à court terme l'expression de plusieurs gènes endogènes et pour éteindre à long terme l'expression de p53 dans plus de 50% des clones cellulaires sélectionnés et cultivés après co-transfection de pSUPER-p53 avec un vecteur codant pour un marqueur de sélection. Cependant, ce plasmide nécessite d'être intégré au génome cellulaire pour exprimer le shRNA de manière stable. Or, l'intégration présente plusieurs inconvénients. La cassette shRNA peut être perdue lors de l'intégration ou éliminée par la suite alors que la résistance à la sélection est maintenue. De plus, l'intégration ne permet pas de travailler directement sur les populations cellulaires transfectées car elles ne sont pas homogènes. Elle nécessite de sélectionner puis travailler sur des clones cellulaires ayant intégré le plasmide et correspondant chacun à un évènement rare. En effet, on ne contrôle ni l'efficacité ni le lieu de l'intégration dans le génome et il est donc nécessaire de vérifier clone par clone l'expression du shRNA.

Pour remédier à ces limitations, un vecteur non intégratif (épisomal), dérivé du virus Epstein-Barr (EBV) et permettant comme pSUPER d'exprimer des séquences shRNA sous contrôle du promoteur H1, a été développé il y a quelques années au laboratoire (Biard et al., 2005). Ce vecteur contient l'origine de réplication oriP (séquences FR (family of repeats) et DS (« dyad symmetry ») ainsi que le gène codant pour la protéine EBNA-1 (antigène nucléaire 1 d'Epstein-Barr) du virus EBV. EBNA-1 permet au vecteur de se maintenir à l'état d'épisome dans le noyau en permettant sa réplication au même rythme que celle du génome cellulaire (Ritzi et al., 2003), ainsi que sa répartition dans les cellules filles lors de la mitose en le fixant aux chromosomes (Marechal et al., 1999; Sears et al., 2003; Nanbo et al., 2007). Un marqueur de sélection (dans notre cas le gène de résistance à la puromycine ou à l'hygromycine) est nécessaire avec ce type de vecteurs car en absence de pression de sélection, ils sont perdus de façon passive par la population cellulaire. Ce vecteur permet d'obtenir un nombre beaucoup plus important de cellules résistantes à la sélection par rapport à un vecteur intégratif (Biard et al., 2005). De plus, la totalité des clones testés au hasard sont inhibés pour le gène cible contre seulement 40% avec le vecteur intégratif (Biard et al., 2005). Le vecteur épisomal EBV peut donc être utilisé de manière efficace pour établir des populations stables et homogènes de cellules inhibées pour des gènes cibles. Nous avons utilisé ces vecteurs pour exprimer les séquences shRNA ciblant Drosha et DGCR8 d'une part, et pour exprimer les pre-miRNAs testés en complémentation (Figure 17). Pour les pre-miRNAs, nous avons inséré dans les vecteurs les séquences naturelles des pre-

miRNAs indiquées sur www.mirbase.org (séquence rose en 5' suivie de la boucle suivie de la séquence rose en 3'). Notons que le promoteur du gène H1 dépendant de l'ARN polymérase III présente l'intérêt d'être très compact et de se situer entièrement en amont du gène (Myslinski et al., 2001), d'avoir un site de début de transcription bien défini et un signal de terminaison très simple, à savoir une suite de 5 thymidines (Baer et al., 1989), caractéristique de la terminaison par l'ARN polymérase III (Bogenhagen and Brown, 1981; Carbon et al., 1987). De plus, le clivage du transcrit au niveau du site de terminaison se fait après la 2e uridine (Baer et al., 1989), laissant donc 2 nucléotides dépassant en 3' comme les duplexes de siRNAs ou comme les pre-miRNAs naturels ayant été clivés par le microprocesseur.

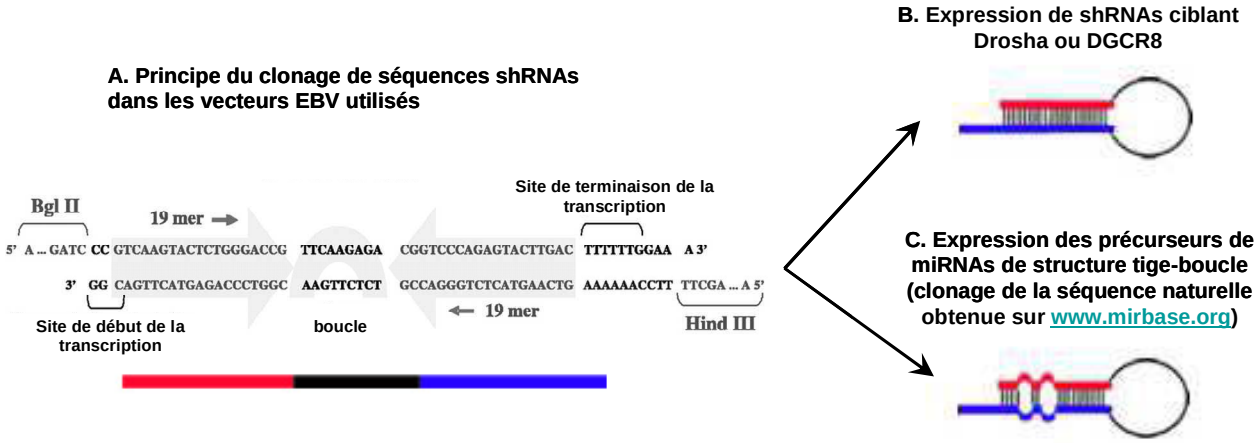


Figure 17 : Utilisation des vecteurs épisomaux dérivés d'EBV pour l'expression de shRNAs et pre-miRNAs. *A) Principe du clonage de séquences shRNAs dans les vecteurs EBV : la séquence du siRNA suivie d'une séquence 9 nt constituant la boucle puis de la séquence en orientation inverse du siRNA puis de 6 thymidines, est clonée en aval du promoteur H1 entre les sites de restriction BglII et HindIII. In vivo, la transcription par l'ARN polymérase III génère une structure shRNA tige-boucle (B), qui donne un duplex de siRNA après clivage par Dicer. Pour générer des pre-miRNAs avec les vecteurs EBV, la séquence naturelle du pre-miRNA trouvée sur la base de données « miRbase » est directement clonée entre les sites BglII et HindIII.*

II.2.2 Validation du système expérimental pour l'inhibition de Drosha

II.2.2.1 Obtention de populations cellulaires homogènes avec le vecteur épisomal

Nous avons dans un premier temps développé un vecteur épisomal dérivé d'EBV permettant l'expression stable d'un shRNA ciblant Drosha (shDro). Nous avons testé l'inhibition de Drosha par le vecteur épisomal shDro dans des cellules HeLa et nous avons mesuré une inhibition efficace à long terme de la protéine cible dans une population cellulaire exprimant de manière stable shDro (Figure 18A). Nous avons également réalisé un marquage de Drosha par

immunofluorescence dans cette population de cellules HeLa shDro. Ce marquage a permis de mettre en évidence une absence quasi totale et homogène de signal dans le noyau de toutes les cellules de la population shDro (Figure 18B). Notons que le marquage cytoplasmique est dû à une réaction croisée de l'anticorps avec une protéine inconnue de 50 kDa. De plus, nous avons isolés et propagés des clones de cellules HeLa transfectées avec le vecteur shDro. La mesure de l'expression de Drosha dans ces clones individuels a permis de montrer qu'ils présentaient tous une inhibition relativement homogène de Drosha, confirmée d'un point de vue fonctionnel par l'induction de l'expression de DGCR8 (Han et al., 2009; Kadener et al., 2009; Triboulet et al., 2009) (Figure 18C). Ces résultats confirment l'intérêt de l'utilisation des vecteurs épisomaux qui permettent d'obtenir et de travailler sur des populations cellulaires inhibées pour le gène cible de manière homogène.

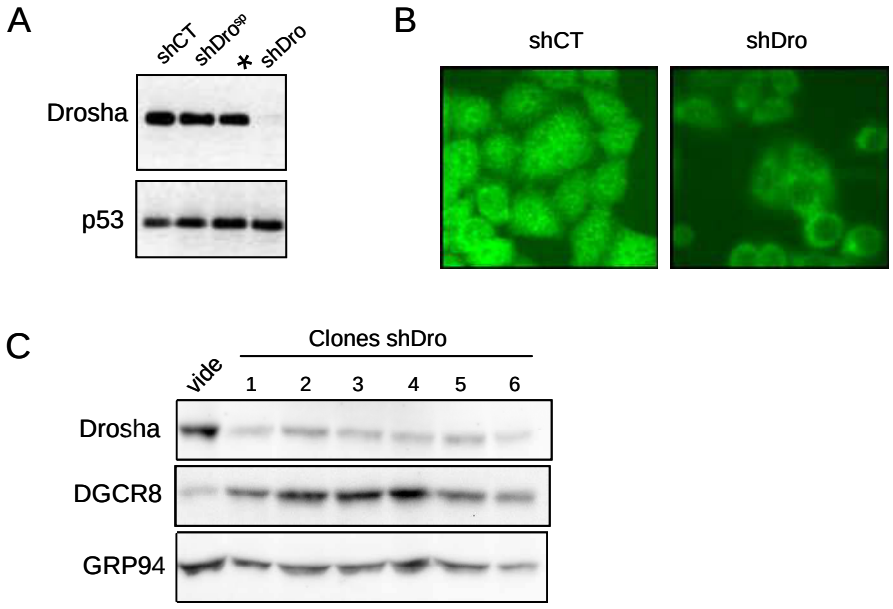


Figure 18 : Inhibition homogène de Drosha avec le vecteur épisomal shDro dans des cellules HeLa. *A) Des cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs épisomaux codant pour les shRNAs indiqués, sélectionnées et cultivées comme populations pendant 66 jours (CT = contrôle), 80 jours (Dro^{sp}= variant rare d'épissage de Drosha) ou 82 jours (Dro =Drosha). Les protéines totales ont été extraites et 30 µg ont été analysées par western-blot pour l'expression de Drosha et celle de p53 comme contrôle de chargement. *piste non pertinente. B) Les populations shCT et shDro ont été marquées en immunofluorescence pour l'expression de Drosha. On note une absence de signal dans le noyau de toutes les cellules shDro. C) Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur shDro et sélectionnées. 6 clones individuels choisis au hasard ont été isolés et propagés jusqu'à avoir suffisamment de cellules pour préparer des extraits de protéines totales. 20 µg de protéines totales ont été analysées par western-blot pour l'expression de Drosha, DGCR8 et GRP94. Une population de cellules HeLa avec le plasmide vide sert de contrôle.*

II.2.2.2 L'inhibition de Drosha n'affecte pas la maturation des ARN ribosomaux

Une équipe a proposé que Drosha joue un rôle dans la maturation des ARN ribosomaux (ARNr). En 2000, avant la découverte des miRNAs, la première étude consacrée à Drosha a montré que son inhibition par une stratégie d'oligonucléotide antisens entrainait une accumulation des pre-ARNr 12S et 32S (Wu et al., 2000). Plus récemment, la même équipe a montré que l'inhibition de Drosha (ainsi que celle de Dicer) entrainait l'accumulation de différentes formes de pre-ARNr de 5.8S, sans toutefois que cela n'affecte la quantité de 5.8S mature, indiquant que si Drosha joue un rôle dans la maturation des ARNr, ce rôle n'est pas essentiel à la production normale des ARNr matures (Liang and Crooke, 2011). Nous avons voulu vérifié que l'inhibition de Drosha dans les cellules HeLa n'affectait pas la production des ARNr (Figure 19). Nous n'avons observé aucune accumulation de précurseurs d'ARNr ni de défaut dans la production des ARNr matures dans les profils des ARNr des cellules HeLa inhibées pour Drosha (shDro) par rapport aux cellules contrôles (shCT et shDro^{sp}).

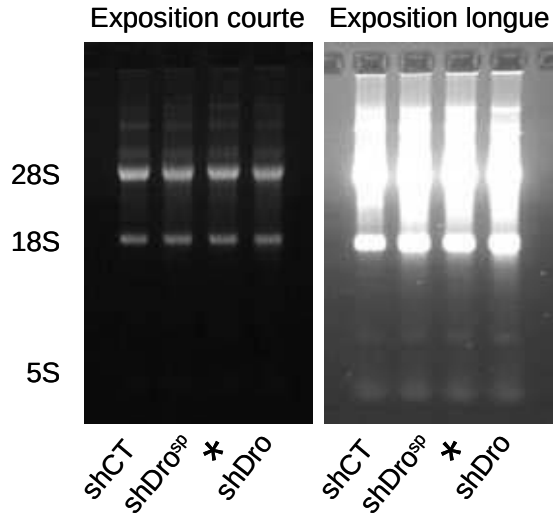


Figure 19 : L'inhibition de Drosha n'affecte pas la maturation des ARNr dans les cellules HeLa.
*L'ARN total a été extrait des populations de cellules HeLa indiquées et 2,5 µg ont été séparés dans un gel à 1,6% d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Les ARN ribosomiques ont été visualisés par fluorescence sous lampe UV et sont indiqués à gauche. *piste non pertinente.*

L'ensemble de ces résultats confirme que le système de vecteurs épisomaux peut être utilisé pour obtenir des populations cellulaires inhibées de manière stable et homogène pour le microprocesseur. De plus, nous nous sommes assuré que, dans notre modèle expérimental, l'inhibition de Drosha n'avait pas d'effet sur la maturation des ARNr, ce qui aurait pu conduire à des effets phénotypiques non spécifiques de la voie miRNA.

RESULTATS

I. Identification de cellules cancéreuses dépendantes du microprocesseur et criblage de micro-ARNs capables de soutenir la prolifération tumorale

I.1 Article I

Dans cette partie, il sera fait référence aux Figures de l'article I.

En plus du vecteur épisomal ciblant Drosha (shDro) décrit dans la partie précédente, nous avons développé un vecteur épisomal codant pour un shRNA ciblant DGCR8 (shDG). La capacité des séquences shDro et shDG à inhiber l'expression de Drosha et DGCR8 a été évaluée dans la lignée de carcinome de colon HCT116, car il a déjà été montré que ces cellules supportent une inhibition de Dicer (Cummins et al., 2006). Dans ces cellules, nous avons montré que l'expression des protéines cibles était réprimée de manière efficace par shDro et shDG, entrainant une diminution significative de l'expression des miRNAs matures (Figures 1a et 1b). De plus, la xénogreffe de ces cellules dans des souris immunodéficientes nous a permis de montrer que l'inhibition du microprocesseur dans les cellules HCT116 entrainait une augmentation de la tumorigenèse *in vivo* (Figure 1c), conformément au modèle publié (Kumar et al., 2007).

Pour répondre à notre hypothèse de départ, nous avons ensuite cherché à identifier des lignées de tumeurs solides dont la vitesse de prolifération ou la survie serait altérée par l'inhibition du microprocesseur, à savoir aussi bien par shDro que par shDG. Cependant, pour certaines lignées cellulaires, il n'a pas été possible d'obtenir de populations cellulaires stables exprimant shDro ou shDG. En effet, dans 3 lignées de cancer du sein de type luminal (MCF-7, ZR-75-1, T-47D), l'inhibition de Drosha et celle de DGCR8 a entrainé un arrêt de prolifération durable après quelques divisions des cellules transfectées et sélectionnées à faible densité, cet arrêt se caractérisant par des petits clones d'une dizaine de cellules incapables de former des colonies macroscopiques (Figures 2a, 2b et S2). La spécificité du phénotype observé a été démontrée en restaurant la formation des colonies dans des cellules MCF-7 exprimant une version de DGCR8 exogène résistante à shDG (Figure 2d). Les colonies arrêtées ont pu être maintenues en culture pendant un mois sans reprise de la prolifération. Nous avons montré que ces cellules n'étaient pas sénescentes mais que l'arrêt de prolifération observé s'accompagnait d'une augmentation de la fraction cellulaire en G0/G1 du cycle cellulaire (Figures S1 et 2c). Nous avons appelé ce

phénotype inédit CoGAM (Colony Growth Arrest induced by Microprocessor inhibition) pour « Arrêt de la croissance des colonies induit par l'inhibition du microprocesseur ». De plus, cette réponse phénotypique s'est avérée corréler avec le type tumoral puisque l'inhibition du microprocesseur dans les autres lignées cancéreuses testées, dont 2 lignées de cancer du sein de type basal (MDA-MB-157 et MDA-MB-231), n'a pas empêché les cellules de proliférer ni de former des colonies macroscopiques (Figures 2a et S2).

Afin d'évaluer la capacité de certains miRNAs à complémenter le phénotype CoGAM, nous avons développé un crible positif reposant sur la co-transfection du plasmide codant pour shDro avec des plasmides codant pour des pre-miRNAs individuels dans la lignée MCF-7, dépendante du microprocesseur. Cette approche nous a permis d'identifier plusieurs miRNAs capables de restaurer individuellement la formation et la prolifération des colonies, principalement miR-19a, miR-19b et miR-20a, trois membres du cluster oncogène miR-17-92 (Figures 3a et 3b). Des cinétiques de complémentation nous ont permis de montrer que miR-20a et miR-27b étaient capables de soutenir durablement la prolifération des colonies (jusqu'à 18 jours), tandis que miR-19b, miR-302 et miR-372 conduisaient à la formation de colonies dans un premier temps (à 8 jours), mais qui régressaient au cours du temps (Figures 3c et S6). Ces cinétiques ont mis en évidence une différence fonctionnelle entre miRNAs d'une même famille puisque miR-302 et miR-372, deux miRNAs spécifiques des cellules ES appartenant à la même famille que miR-20, n'ont pas été capables de soutenir durablement la prolifération des colonies comme l'a permis miR-20a. De même, miR-27b, mais pas miR-27a, a été identifié parmi les miRNAs capables de restaurer la formation de colonies (Figures 3a, 3b et S6).

Enfin, ces résultats nous ont permis de formuler des hypothèses quant aux cibles moléculaires de miRNAs potentiellement impliquées dans le phénotype observé. Nous avons montré que le phénotype CoGAM était indépendant de la voie p53 en montrant que l'inhibition de p53 ou p21 ne permettait pas de restaurer la formation des colonies dans les cellules MCF-7 inhibées pour Drosha (Figure 4). PTEN, un suppresseur de tumeur et inhibiteur de la voie de prolifération PI3K/Akt, est une cible commune à miR-19 et miR-20 (Lewis et al., 2003; Olive et al., 2009; Poliseno et al., 2010a; Poliseno et al., 2010b). Dans les cellules MDA-MB-231, résistantes au phénotype CoGAM, nous avons montré que l'expression de PTEN était significativement induite par l'inhibition du microprocesseur (Figure 5a). La co-transfection de shDro avec un shRNA ciblant PTEN dans les cellules MCF-7 a permis de restaurer partiellement la formation de colonies, indiquant que PTEN est impliqué dans le phénotype d'arrêt de prolifération CoGAM (Figures 5b et 5c).

Oncogene (2011) 1–10
© 2011 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/11
www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE

Identification of microprocessor-dependent cancer cells allows screening for growth-sustaining micro-RNAs

D Peric, K Chvalova and G Rousselet

CEA, DSV, iRCM, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité (LGR), Fontenay aux Roses, France

Micro-RNAs are deregulated in cancer cells, and some are either tumor suppressive or oncogenic. In addition, a link has been established between decreased expression of micro-RNAs and transformation, and several proteins of the RNA interference pathway have been shown to be haploinsufficient tumor suppressors. Oncogenic micro-RNAs (oncomiRs) could represent new therapeutic targets, and their identification is therefore crucial. However, structural and functional redundancy between micro-RNAs hampers approaches relying on individual micro-RNA inhibition. We reasoned that in cancer cells that depend on oncomiRs, impairing the micro-RNA pathway could lead to growth perturbation rather than increased tumorigenesis. Identifying such cells could allow functional analyses of individual micro-RNAs by complementation of the phenotypes observed upon global micro-RNA inhibition. Therefore, we developed episomal vectors coding for small hairpin RNAs targeting either Drosha or DGCR8, the two components of the microprocessor, the nuclear micro-RNA maturation complex. We identified cancer cell lines in which both vectors induced colony growth arrest. We then screened for individual micro-RNAs complementing this growth arrest, and identified miR-19a, miR-19b, miR-20a and miR-27b as major growth-sustaining micro-RNAs. However, the effect of miR-19a and miR-19b was only transient. In addition, embryonic stem cell-derived micro-RNAs with miR-20a seeds were much less efficient than miR-20a in sustaining cancer cell growth, a finding that contrasted with results obtained in stem cells. Finally, we showed that the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, a shared target of miR-19 and miR-20, was functionally involved in the growth arrest induced by microprocessor inhibition. We conclude that our approach allowed to identify microprocessor-dependent cancer cells, which could be used to screen for growth-sustaining micro-RNAs. This complementation screen unveiled functional differences between homologous micro-RNAs. Phenotypic characterization of the complemented cells will allow precise functional studies of these micro-RNAs.
Oncogene advance online publication, 12 September 2011; doi:10.1038/onc.2011.391

Correspondence: Dr G Rousselet, CEA, DSV, IRCM/LGR, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, CEA, Bat. 5 p. 219, 18 route du Panorama, Fontenay aux Roses, 92265, France.
E-mail: germain.rousselet@cea.fr
Received 28 March 2011; revised 30 June 2011; accepted 2 August 2011

Keywords: microprocessor; growth arrest; drosha; DGCR8; PTEN; micro-RNA

Introduction

Micro-RNAs are small non-coding RNAs that control genome expression by inhibiting translation and/or inducing degradation of specific target mRNAs (reviewed in Bartel, 2009). They are encoded in the genome as dedicated polymerase II transcription units or in the introns of protein-coding genes. Small hairpin RNAs (pre-miRNAs) are excised from primary transcripts by the microprocessor, a complex composed of the RNase III Drosha (Lee *et al*., 2003) and the RNA-binding protein DGCR8 (Denli *et al*., 2004; Gregory *et al*., 2004; Han *et al*., 2004; Landthaler *et al*., 2004). These 60–70 nt stem-loop RNAs are exported to the cytoplasm by exportin 5 (XPO5), where the loop is removed by the RNase III Dicer, producing a double-stranded RNA composed of the mature micro-RNA and a so-called miRNA*. The mature micro-RNA is then preferentially loaded on an RNA-induced silencing complex (RISC), and engages in the RNA interference pathway (Hutvagner *et al*., 2001). These biogenesis steps are crucial because micro-RNA function has been found so far to be essentially controlled at the level of mature micro-RNA expression (Krol *et al*., 2010).

Micro-RNAs are key players in the establishment and maintenance of cellular differentiation states, including stemness (Ivey and Srivastava, 2010). Consistently, the expression profile of mature micro-RNAs is tissue specific. In transformed cells, this profile is sufficiently conserved to indicate the developmental origin of the tumor tissue (Lu *et al*., 2005). However, a majority of micro-RNAs are downregulated in tumor tissues, probably reflecting the cellular dedifferentiation generally associated with transformation (Lu *et al*., 2005). This downregulation is due at least in part to impairment of the microprocessor function (Thomson *et al*., 2006). Among these downregulated micro-RNAs, several have been shown to be *bona fide* tumor suppressors (Calin *et al*., 2002; Mayr *et al*., 2007; Welch *et al*., 2007; Bonci *et al*., 2008; Cole *et al*., 2008; Esquela-Kerscher *et al*., 2008; Chen *et al*., 2009; Trang *et al*., 2010). On the other hand, certain micro-RNAs are overexpressed in cancer. An oncogenic activity has been demonstrated for some of them, such as the miR-17-92

cluster (He *et al*., 2005) or miR-21 (Si *et al*., 2007; Asangani *et al*., 2008; Lu *et al*., 2008), for which the term oncomiR was coined. Interestingly, miR-21-induced tumors are addicted to miR-21, that is, inhibition of miR-21 expression in established tumors resulted in tumor regression (Medina *et al*., 2010).

Prompted by the observed downregulation of a majority of micro-RNAs in tumors, Kumar *et al*. (2007) went on to show that impairing the micro-RNA pathway in transformed cells increased tumorigenesis, and that Dicer was an haploinsufficient tumor suppressor (Kumar *et al*., 2009). Furthermore, certain cancer cell lines were shown to harbor inactivating mutations in TARBP2 (Melo *et al*., 2009), an integral component of the Dicer complex, or XPO5 (Melo *et al*., 2010). Both mutations diminished mature micro-RNA expression, and in both cases, re-expression of the wild-type protein was tumor suppressive. Altogether, these results built a picture in which decreased micro-RNA expression, a feature of undifferentiated cells, has protumorigenic properties. In contrast, blocking the micro-RNA pathway of embryonic stem (ES) cells impaired their growth (Murchison *et al*., 2005; Wang *et al*., 2007; Qi *et al*., 2009). This global approach allowed to circumvent the often silent phenotype observed after inhibition of individual micro-RNAs (Miska *et al*., 2007; Wang *et al*., 2008), a probable consequence of the structural and functional redundancy of these regulatory RNAs. In an elegant approach, Wang *et al*., (2008) went on by complementing this growth defect with individual micro-RNAs. This genetic screen identified ES cell growth-sustaining micro-RNAs, and through identification of their targets, revealed essential pathways controling the progression of ES cells in the cell cycle. Interestingly, several of these micro-RNAs share a common seed sequence with certain oncomiRs.

We hypothesized that cancer cells whose growth is dependent upon expression of oncomiRs should also respond to inhibition of the micro-RNA pathway by cell death or growth perturbation. Identifying such cells would support the concept of oncomiR addiction in cancer models not directly induced by exogenous oncomiR overexpression. Furthermore, it would provide with a genetic screen of growth-sustaining micro-RNAs in differentiated transformed cells. Herein, we report the identification of microprocessor-dependent cancer cell lines, and use thereof to screen for such micro-RNAs.

Results

An episomal shRNA system targeting the microprocessor

It has been described previously that expressing gene-targeting shRNAs from episomal vectors under the control of the H1 promoter is an efficient method of obtaining stable populations of homogenously knocked-down cells (see for instance Biard *et al*., 2005; Biard, 2007; Le May *et al*., 2010; Boehler *et al*., 2011). We constructed a series of such vectors expressing shRNAs targeting either Drosha or DGCR8. These targets were chosen because, as required components of the same complex, their inhibition should induce similar phenotypes. Furthermore, in contrast with Dicer, the microprocessor is required for neither shRNA nor pre-miRNA maturation, allowing high efficiency of the knockdown, and subsequent complementation with individual pre-miRNAs. We first screened these vectors in HCT116 cells, as these cells have been described to withstand an impaired RNA interference pathway (Cummins *et al*., 2006). We selected the most efficient shRNAs (shDro and shDG), as revealed by western blotting of Drosha and DGCR8 (Figure 1a), and quantitative reverse transcription PCR (qRT–PCR) of a series of micro-RNAs (Figure 1b). Of note, inhibiting Drosha induced overexpression of DGCR8, whereas inhibiting DGCR8 led to a decrease of Drosha expression (Figure 1a). This result confirmed the already identified cross-regulation between these two proteins (Han *et al*., 2009). In addition, Drosha^{kd} HCT116 cells displayed an increased tumorigenesis capacity upon injection in immuno-compromised mice (Figure 1c), again in agreement with published results (Kumar *et al*., 2007). We also selected two control shRNAs, one targeting a rare splice variant of Drosha (shDro^{sp}) and the other being a point mutant of shDG (shDGm; Figure 1a). We concluded that the episomal vector strategy led to functional and stable knockdown of the microprocessor in non-clonal populations of transfected cells.

Identification of microprocessor-dependent cancer cells

To eliminate potential microprocessor-independent functions of the targeted proteins, as well as off-target effects of the selected shRNAs, we aimed at identifying cell lines in which both Drosha and DGCR8 knockdowns would diminish growth rates. Therefore, in a series of cancer cell lines, we attempted to obtain populations of cells expressing either shDro or shDG. However, we observed that certain cell lines, such as MCF-7, were unable to give rise to macroscopically visible clones after microprocessor knockdown (Figure 2a). Microscopic examination of the plates revealed multiple clones of 5–10 adherent cells in both Drosha^{kd} and DGCR8^{kd} MCF-7 plates (Figure 2b). These clones could be maintained in culture for over 1 month without resuming growth. Flow cytometry DNA content analyses objectified a small but significant increase of the proportion of cells in the G0/G1 phase of the cell cycle (Figure 2c). However, staining for senescence-associated β-galactosidase activity was negative (Supplementary Figure 1). This colony growth arrest was observed in other breast cancer cell lines (T47D and ZR75-1; Supplementary Figure 2), but not all (MDA-MB-231 and MDA-MB-157; Figure 2a and Supplementary Figure 2), despite inhibition of both target protein and mature micro-RNA expression (Supplementary Figure 3).

To ascertain that this colony growth arrest was due to the knockdown of the microprocessor, we first controlled that it could be reproduced with different shRNAs targeting Drosha or DGCR8 (Supplementary Figure 4). In addition, we attempted to complement inhibition of the endogenous DGCR8 with an exogenous RNA interference-resistant flagged version

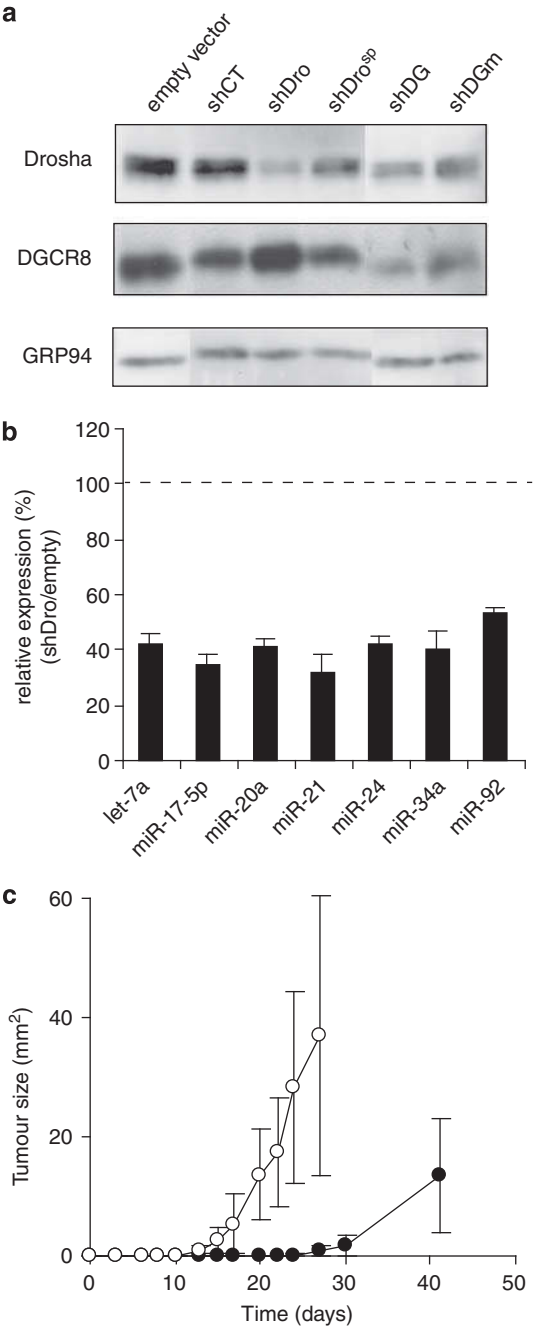


Figure 1 An episomal system of microprocessor knockdown. (**a**) HCT116 cells were transfected with plasmids coding for the indicated shRNAs (CT, control; Dro, Drosha; Dro^{sp}, a rare splice variant of Drosha; DG, DGCR8; DGm, a point mutant of shDG), and grown under selection for 2 weeks. Whole-cell extracts were analyzed by western blotting for Drosha and DGCR8 expression. GRP94 was used as a loading control. Although some irrelevant lanes have been deleted, all the presented lanes were from the same blot. (**b**) Total RNA was extracted from HCT116 cells transfected with a plasmid coding for shDro (pEBP-shDro) or an empty vector (pEBP). Expression of a series of mature micro-RNAs was quantified by qRT–PCR using RNU48 as a normalization target. Results are expressed as mean ± s.e.m. ($n=3$) of the relative expression in pEBP-shDro- *vs* pEBP-transfected cells. (**c**) Populations of HCT116 cells transfected with a control vector (closed circles) or a vector coding for shDro (open circles) were injected in the flanks of athymic mice (5×10^5 cells per injection), and tumor volume was plotted against time as mean ± s.e.m. ($n=5$).

of DGCR8 (flag-DGCR8m; see Materials and methods). A population of MCF-7 cells expressing flag-DGCR8m was established, then transfected with shDG or shDro, and selected for 15 days. These cells were able to grow to macroscopically visible clones after transfection of shDG, but not shDro (Figure 2d). Alternatively, we reasoned that in microprocessor-dependent cells, DGCR8 inhibition should be sufficient to select for high flag-DGCR8m expression. We therefore co-transfected shDG and flag-DGCR8m, selected cells for shDG expression for 15 days, and analyzed flag-DGCR8m expression by western blotting. This led indeed to flag-DGCR8m overexpression in MCF-7 cells, but not in MDA-MB-231 (Figure 2e). Therefore, we concluded that the observed colony growth arrest was actually due to microprocessor inhibition. Of note, the latter experiment also revealed that DGCR8 knockdowns were of similar efficiencies in the two cell lines, whereas quantification of Drosha and DGCR8 in growth-arrested cells was not reliable (personal results).

Altogether, our data demonstrated that in certain cancer cells, inhibiting the microprocessor induced a long-term colony growth arrest, to which we will refer as CoGAM (Colony Growth Arrest induced by Microprocessor inhibition).

miR-19 and miR-20 are major CoGAM-complementing micro-RNAs in MCF-7 cells

We then attempted to rescue CoGAM with single micro-RNAs, as assayed by the capacity for microprocessor-depleted cells to grow to macroscopically visible clones in the presence of a single micro-RNA. For microprocessor-independent micro-RNA expression, we constructed a series of episomal vectors with a different selection marker (hygromycin instead of puromycin), each coding for a unique pre-miRNA under the control of the H1 promoter (see Materials and methods). Each vector was tested for its capacity to induce mature micro-RNA expression by transient transfection in HeLa cells, followed by qRT–PCR (Supplementary Table 1). We then co-transfected MCF-7 cells with the shDro coding vector (pEBP-shDro) and an equal amount of a single pre-miRNA coding vector (pEBH-miRx), and assayed for outgrowth of visible clones under puromycin and hygromycin selection. Under these settings, shDro expression also led to colony growth arrest when co-transfected with pEBH, or with the majority of the pre-miRNA coding vectors (Figures 3a and b). We also noted that two pre-miRNAs, pre-let-7g and pre-miR-92, inhibited colony formation even without Drosha knockdown (Figure 3a). Strikingly, we identified pre-miRNAs that were capable of rescuing CoGAM on their own (Figures 3a and 3b). In particular, pre-miR-19a ($P<10^{-4}$ vs pEBH), pre-miR-19b ($P<10^{-4}$) and pre-miR-20a ($P<10^{-7}$), three members of the oncogenic miR-17-92 cluster, allowed growth of multiple clones of Drosha^{kd} cells. This was also the case for pre-miR-27b ($P<10^{-4}$), pre-miR-33a ($P<10^{-2}$), pre-miR-302b ($P<10^{-2}$) and pre-miR-372 ($P<5\times10^{-2}$). The results of these rescue experiments

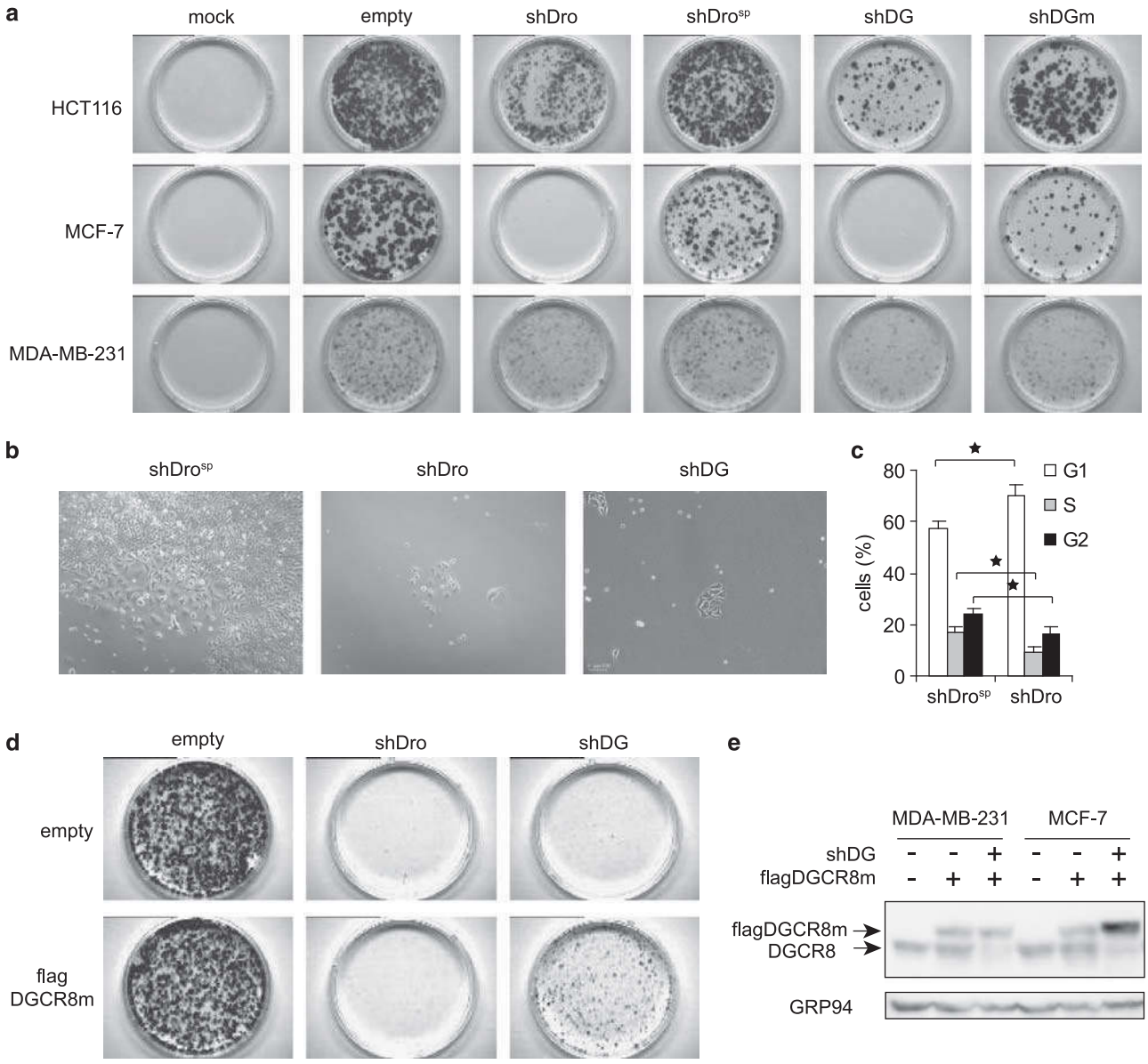
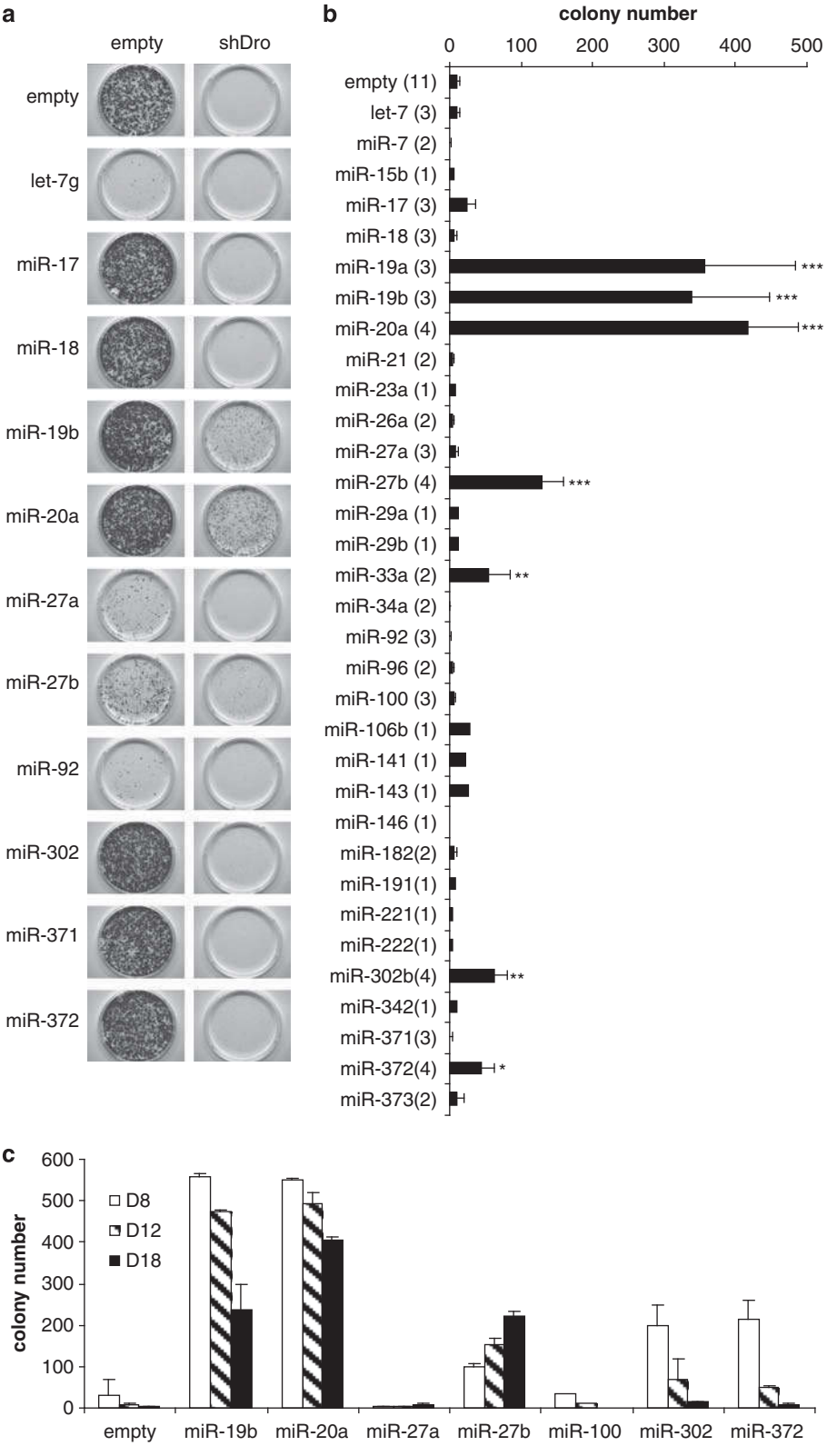


Figure 2 Microprocessor inhibition induces growth arrest in MCF-7 cells. (**a**) Cells (as indicated) were transfected with vectors coding for the indicated shRNAs, or with the empty vector (empty), or without DNA (mock). The next day, cells were diluted, and grown under selection for 2 weeks. They were then fixed in paraformaldehyde 4%, and stained with methylene blue. The experiment was repeated at least five times with similar results. (**b**) Phase contrast pictures of the clones obtained with MCF-7 cells transfected with plasmids coding for the indicated shRNAs. (**c**) MCF-7 cells were transfected with plasmids coding for the indicated shRNAs, grown under selection for 2 weeks, and analyzed for their DNA content by flow cytometry. Results are presented as the percentage of cells in the different phases of the cell cycle (mean ± s.e.m., $n=3$). (**d**) Populations of MCF-7 cells expressing or not a shDG-resistant version of DGCR8 (flagDGCR8m) were transfected with vectors coding for the indicated shRNAs, and treated as in (**a**). (**e**) MDA-MB-231 or MCF-7 cells were co-transfected with 0.2 μg of pEBP-shDG and 1.8 μg pCMV-flagDGCR8m, and grown for 2 weeks with puromycin selection (targeting only pEBP-shDG). Whole-cell extracts were analyzed for DGCR8 expression by western blotting. GRP94 was used as a loading control. Identification of the top band as flagDGCR8m was confirmed by hybridization with an anti-flag antibody (not shown). The experiment was performed three times with similar results.

Figure 3 Complementation of microprocessor knockdown by individual micro-RNAs. (**a**) MCF-7 cells were co-transfected with pEBP (empty) or pEBP-shDro (shDro), and pEBH (empty) or pEBH-miRx (as indicated). They were then grown under selection for 14 days, fixed and stained with methylene blue. Plates from one representative experiment are shown. (**b**) Quantification of complementation experiments (pEBP-shDro + pEBH-miRx) performed as described in (**a**). The results are presented as mean ± s.e.m. of the number of independent experiments indicated in brackets after the name of the complementing pre-miRNA. Statistical significance was calculated with a one-tailed Student's *t*-test vs complementation with the empty vector; $***P<10^{-4}$, $**P<10^{-2}$ and $*P<5\times10^{-2}$ (**c**) MCF-7 cells were transfected with pEBP-shDro and the indicated pEBH-miRx, grown under selection for 8, 12 and 18 days (D8, D12 and D18, respectively) and then fixed and stained with methylene blue. Colony numbers were quantified and are presented as mean ± s.d. of two independent experiments, except for empty ($n=3$) and miR-100 ($n=1$). Note that the small decrease in colony number upon complementation with miR-20a at day 18 is because of counting saturation (Supplementary Figure 5).

could be interpreted as *bona fide* complementation phenotypes, as Drosha was effectively knocked-down in cells that had overcome CoGAM in response to pre-miRx expression (Supplementary Figure 5). Among complementing pre-miRNAs, two were able to sustain clone growth up to 20 days after transfection (pre-miR-20a and pre-miR-27b; Figure 3c and Supplementary Figure 6). In contrast, pre-miR-19, pre-miR-302 and pre-miR-372 led to growth of clones that regressed with time (Figure 3c and Supplementary Figure 6). These



time-course experiments also confirmed that, contrary to pre-miR-27b, pre-miR-27a was not able to complement CoGAM (Figure 3c and Supplementary Figure 6), although both pre-miRNAs similarly inhibit growth of control cells (Figure 3a).

CoGAM is independent of the p53/p21 pathway

The two major CoGAM-complementing micro-RNAs, miR-19 and miR-20, have also been reported to rescue the slow growth of DGCR8^{ko} ES cells, in part through inhibition of the p21 G1 checkpoint protein (Wang *et al*., 2008). As CoGAM was accompanied by an increase in the proportion of cells in G0/G1 (Figure 2c), we hypothesized that it involved p21 activation. We therefore constructed a hygromycin-selectable vector coding for a p21 targeting shRNA (pEBH-shp21), which we co-transfected with pEBP-shDro. After double selection, no visible clones could be observed (Supplementary Figure 7). To ascertain the efficiency of p21 knockdown, we established a population of MCF-7 cells stably expressing shp21. These cells were deficient in p21 expression, even after ultraviolet treatment (Figure 4a), but were still unable to grow after Drosha knockdown (Figure 4b). As p53 is a major transcriptional regulator of p21, we also tested the effect of Drosha knockdown in p53^{kd} cells (Desaint *et al*., 2004). Western blotting confirmed the absence of p53 in one clone of pSUPER-shp53-transfected MCF-7 cells, even after ultraviolet treatment (Figure 4c). Although p53 knockdown slightly increased cloning frequency, Drosha inhibition was still able to induce growth arrest (Figure 4d). In addition, we noted that CoGAM could be observed in T47-D cells (Supplementary Figure 2), where p53 is known to be mutated (Runnebaum *et al*., 1991). We concluded that CoGAM was resistant to inhibition of the p53/p21 axis.

The tumor suppressor phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) is involved in CoGAM

The tumor suppressor PTEN, a major inhibitory regulator of the PI3K/AKT proliferation signaling pathway (Carracedo and Pandolfi, 2008), is also a shared target of miR-19 (Lewis *et al*., 2003) and miR-20 (Poliseno *et al*., 2010). In addition, in MDA-MB-231 cells, the PTEN protein was actually significantly increased by Drosha knockdown (Figure 5a), a result that was confirmed at the mRNA level (Supplementary Figure 8). To test for the involvement of PTEN in CoGAM, we constructed a hygromycin-selectable episomal vector coding for a PTEN targeting shRNA (pEBH-shPTEN). Upon transfection in MCF-7 cells, pEBH-shPTEN induced a decrease in PTEN expression and an increase in the phosphorylated form of AKT (Figure 5b). Strikingly, pEBH-shPTEN was able to rescue the colony growth arrest induced by pEBP-shDro (Figure 5c). Although Drosha^{kd}–PTEN^{kd} cells did not grow to clones of similar size as controls, this result showed that PTEN is involved in the colony growth arrest induced by Drosha knockdown in MCF-7 cells.

Discussion

The results presented herein demonstrate that inhibiting the microprocessor results in growth arrest in certain cancer cell lines (Figure 2). Beyond the novelty of this observation, the experimental system that we designed,

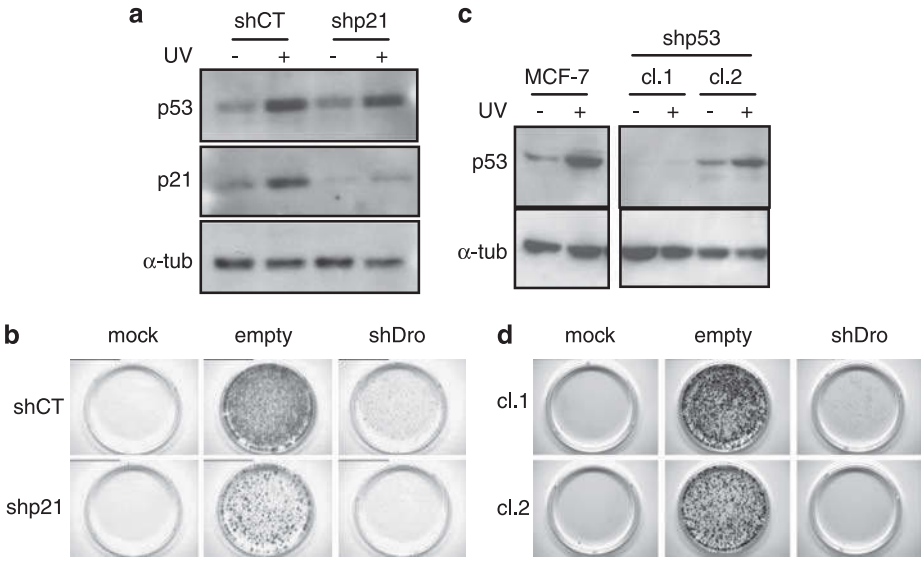


Figure 4 CoGAM is independent of the p53/p21 axis. (**a**) Populations of MCF-7 cells expressing a control shRNA (shCT) or a p21 targeting shRNA (shp21) were treated or not with ultraviolet (UV) and analyzed for p53 and p21 expression by western blotting. α-Tubulin was used as a loading control. (**b**) The same cells as in (**a**) were transfected as indicated, grown for 2 weeks under selection, fixed and stained. Mock: transfection without DNA. (**c**) Two clones of MCF-7 cells transfected with pSUPER-shp53 were analyzed for p53 expression with or without UV treatment. Whereas p53 is not detected in clone 1 (cl. 1), its level of expression is normal in clone 2 (cl. 2), which was used as a control. Parental MCF-7 cells are presented for comparison. α-Tubulin was used as a loading control. (**d**) The two clones analyzed in (**c**) were tested for growth after Drosha knockdown (shDro), as presented in (**b**).

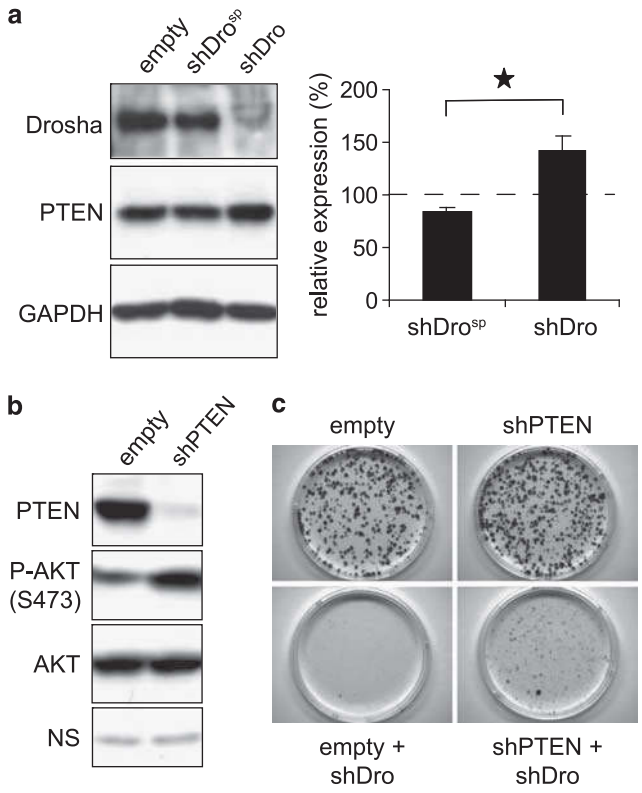


Figure 5 PTEN is a target of the micro-RNA pathway, involved in CoGAM. (**a**) Left: MDA-MB-231 cells were transfected with vectors coding for the indicated shRNAs and grown for 2 weeks under selection. Whole-cell extracts were analyzed for Drosha and PTEN expression by western blotting, with glyceraldehyde phosphate deshydrogenase (GAPDH) as a loading control. Right: PTEN expression was quantified from three independent experiments. Results are presented as the relative expression in shDro^{sp}- or shDro-transfected cells vs cells transfected with an empty vector, after normalization with GAPDH (mean ± s.e.m.). $\star P < 2 \times 10^{-2}$. (**b**) MCF-7 cells were transfected with an empty vector, or a vector coding for a PTEN targeting shRNA (shPTEN). After growth for 2 weeks under selection, total proteins were extracted in the presence of phosphatase inhibitors (PhosSTOP, Roche) and analyzed for the expression of PTEN, phophorylated AKT (P-AKT) and total AKT. A non-specific band is shown under AKT as a non-saturated loading control. (**c**) MCF-7 cells were transfected with vectors coding for the indicated shRNAs, grown for 2 weeks under selection, and analyzed as in Figure 2.

based on shRNA and pre-miRNA expression from episomal vectors, allowed to set up a positive screen for identification of growth-sustaining micro-RNAs in microprocessor-dependent cells (Figure 3). In its turn, this identification could be used as a starting point for hypothesis-driven strategies aimed at characterizing major growth-regulatory genes in CoGAM-sensitive cancer cells (Figures 4 and 5).

The fact that microprocessor inhibition can result in growth arrest had not been reported so far. On the contrary, impairing the micro-RNA pathway has been reported to increase tumorigenesis of transformed cells (Kumar *et al*., 2007 and Figure 1), and mutations in at least three proteins involved in micro-RNA function (XPO5, TARBP2 and DICER) have been found to be functionally involved in tumorigenesis and/or tumor biology (Kumar *et al*., 2009; Melo *et al*., 2009, 2010). A major question is whether these different phenotypes resulted from quantitative or qualitative differences. Precise quantification of knockdown efficiencies in arrested cells was not possible, at the level of either targeted protein inhibition or mature micro-RNA expression. Although flag-DGCR8m-complemented DGCR8^{kd} cells revealed comparable levels of DGCR8 knockdown in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, we cannot exclude that the rescue in itself modifies DGCR8 expression. As a matter of fact, less efficient Drosha targeting shRNAs did not induce growth arrest in MCF-7 cells (personal observations), showing that microprocessor inhibition must reach a threshold to induce growth arrest, even in CoGAM-sensitive cells. On the other hand, cell-specific phenotypes of approaches targeting the micro-RNA pathway are consistent with the cell specificity of growth-sustaining pathways and micro-RNA expression profiles. In this regard, the fact that the three CoGAM-sensitive cell lines were from breast carcinoma of the luminal type, whereas two basal-like breast carcinomas were CoGAM resistant, although correlative at this point, supports the concept of a cell specificity of CoGAM sensitivity. In addition, the fact that Drosha^{kd}–PTEN^{kd} MCF-7 cells are able to grow, even at slow rate, confirms that induction of colony growth arrest by micro-RNA depletion depends upon the cellular background. We also note that complete inhibition of the micro-RNA pathway in ES cells (Murchison *et al*., 2005; Wang *et al*., 2007; Qi *et al*., 2009), or adult tissues (Giraldez *et al*., 2005; Chong *et al*., 2008; Hand *et al*., 2009), did not induce growth arrest. We conclude that CoGAM requires efficient microprocessor knockdown in a specific cellular background.

It should also be noted that the microprocessor is able to target and cleave the DGCR8 mRNA (Han *et al*., 2009; Kadener *et al*., 2009; Triboulet *et al*., 2009). Although targeting of other mRNAs by the microprocessor (Kadener *et al*., 2009) is still controversial (Shenoy and Blelloch, 2009), we cannot exclude that inhibiting Drosha or DGCR8 could modify the expression of non-pri-miRNA RNAs.

Complementation experiments revealed similarities between the experimental model we present and the DGCR8^{ko} murine ES cell system (Wang *et al*., 2008). In both cases, miR-19 and miR-20, as well as certain micro-RNAs sharing the miR-20 seed (from the miR-302 family, the murine miR-290 family and the human miR-372 family), or the miR-19 seed (miR-33), were found to rescue the phenotype induced by microprocessor inhibition. This is consistent with both phenotypes involving control of cell growth, and these micro-RNAs targeting multiple cell growth inhibitory genes. Interestingly, in both cases, miR-17 did not efficiently rescue the growth defect, although miR-17-5p and miR-20a share the same seed. This observation points to functional differences between homologous micro-RNAs, as also observed for miR-19a and miR-19b in DGCR8^{ko} ES cell rescuing (Wang *et al*., 2008), or

for pre-miR-27a and pre-miR-27b in CoGAM rescuing (this manuscript). In the latter case, it appeared puzzling to attribute the marked functional difference to the single outside-the-seed nucleotide difference between miR-27a and miR-27b. We therefore note that, although this hypothesis has still to be tested, our data could also be explained by functional expression of miR-27b*. Indeed, (i) the miR expression system that we used is designed to lead to expression of the natural pre-miRNA, including the miR* part; (ii) miR-27b* and miR-27a* differ by several nucleotides, including one point mutation in the seed and (iii) miR-27b* is actually expressed *in vivo*, as shown by miR-27b/miR-27b* ratios of around 10 (Kuchenbauer *et al*., 2011). On the other hand, we also detected a series of specificities that differentiated the ES cell-based screen from our data: (i) ES cell-expressed micro-RNAs (miR-302, miR-372/3) were found to rescue CoGAM less efficiently than miR-19 and miR-20, a difference that was not detected by complementation of DGCR8 knockout in ES cells; (ii) the rescuing effects of miR-19b and miR-27b appeared specific for CoGAM and (iii) p21, which participates in the growth inhibition observed in DGCR8^{ko} ES cells, is not involved in CoGAM. Altogether, these comparisons extend the major growth control function of micro-RNAs bearing the miR-19 or miR-20 seeds from stem cells to cancer cells. They also point to differences in the growth-regulatory pathways of ES cells and CoGAM-sensitive cancer cells, which deserve further investigation.

The identification of PTEN as a growth-regulatory protein involved in CoGAM is presented as an example of a hypothesis-driven approach based on the results of the micro-RNA functional screen that we describe. PTEN was chosen as a candidate because (i) it is a shared target of miR-19 and miR-20a; (ii) small modifications of PTEN expression have important functional consequences (Alimonti *et al*., 2010), suggesting that deregulation of the micro-RNA level of regulation could be sufficient for a role in CoGAM induction and (iii) PTEN overexpression is known to inhibit growth of MCF-7 cells through induction of a G1 arrest (Weng *et al*., 1999). Clearly, complementation of Drosha knockdown by PTEN knockdown is only partial, and less efficient than miR-19 or miR-20 complementation. Differences in the complementation phenotype were also observed between miR-19 and miR-20 (transient vs sustained colony outgrowth; Figure 3b). These results are consistent with miR-19 and miR-20-complementing CoGAM through multiple targets, some shared, including PTEN, and some specific. They do, however, demonstrate that PTEN is involved in the regulation of growth-sustaining pathways in MCF-7 cells. In addition, they are consistent with a functional importance of oncomiRs in MCF-7, and consequently of the tumor suppressive consequences of microprocessor inhibition.

In summary, we have shown that certain cancer cells are dependent upon the microprocessor for their growth, and we have provided a simple positive screen to identify growth-sustaining micro-RNAs. This approach circumvented the problems linked to structural and functional redundancy of micro-RNAs, and was able to unveil functional specificities of homologous micro-RNAs. Obviously, characterization of other phenotypes in microprocessor-inhibited cancer cells could open new possibilities to functionally characterize micro-RNAs by direct phenotypic complementation.

Materials and methods

Cell culture

Cell lines used were as follows: A549 (lung carcinoma), HCT116 (colon carcinoma) and its p53$^{-/-}$ derivative, HeLa (cervix carcinoma), MCF-7 (breast carcinoma), MDA-MB-157 (breast carcinoma), MDA-MB-231 (breast carcinoma), T-47D (breast carcinoma) and ZR75-1 (breast carcinoma). They were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium-Glutamax-I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biological Industries, ATGC, Marne-la-Vallée, France) at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Transfections were performed in 3.5 cm petri dishes at 80% confluency with 2 μg plasmid and 2 μl lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were then seeded at 1/50 in 6 cm petri dishes and grown under selection for 14 days, unless otherwise indicated. Double transfections were performed the same way with 1.5 μg of each plasmid and 3 μl lipofectamine 2000, and cells were diluted 1/20th in 6 cm petri dishes for selection. Populations of transfected cells were established by pooling at least 100 clones after transfection and selection.

Complementation screen

Double transfections were performed as described above. After 14 day selection, plates were fixed for 2 h in 4% formaldehyde and stained overnight with methylene blue in 30% methanol. They were then washed in water and air dried. Dried plates were pictured with a Bio-Print system (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Colonies were quantified with a ColCount system (Oxford Optronics, Oxford, UK) with a manufacturer-provided sensitivity setting ('disperse-colonies').

Plasmids

The H1 promoter-containing Epstein-Barr virus plasmids (pEBP for puromycin selection and pEBH for hygromycin selection) have been described previously (Biard *et al*., 2005). Individual shRNA or pre-miRNA coding plasmids were constructed by inserting hybridized oligonucleotides (Sigma, Lyon, France) into *Bgl*II–*Hin*dIII digested vectors. Oligonucleotide sequences were established by using the Dharmacon web site for shRNAs (http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx) and the miRBase web site for pre-miRNAs (http://www.mirbase.org/), and are available upon request. To ensure correct processing of the vector-encoded pre-miRNAs, we inserted the exact pre-miRNA sequences as shown in miRBase (that is, the 5′ stem indicated in purple followed by the loop and the 3′ stem indicated in purple) immediately after the well-defined transcription start site of the H1 promoter (as described in Brummelkamp *et al*., 2002). *Polymerase* III will then lead to transcription of this sequence into a stem-loop RNA, which will require only cleavage by Dicer to remove the loop and produce the natural miR/miR* duplex. Plasmids were systematically sequenced (Millegen Biotechnologies, Labège, France).

The pCMV-3 × flagDGCR8m vector was constructed by ligating the PCR-amplified mmDGCR8 cDNA into pCMV-3 × flag-10 (Sigma). Three mutations (T1642C, G1649C and T1651C) were introduced using the Quickchange Lightning site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Massy, France), leading to one conservative change (V435L). The insert was fully sequenced (Millegen Biotechnologies).

Western blotting
Total proteins were extracted in Tris 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, Triton X-100 1%, sodium dodecyl sulfate 0.1%, ethylenediaminetetraacetic acid 1 mM, Complete protease inhibitor cocktail (Roche, Meylan, France) and phenylmethanesulphonyl-fluoride 1 mM, supplemented with PhosSTOP (Roche) where indicated. Lysates were cleared by centrifugation at 15 000 r.p.m. for 10 min at 4 °C, and protein content assayed using the Pierce micro-BCA kit (Thermo Fisher Scientific, Brebières, France). Proteins were separated on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred on nitrocellulose or polyvinylidene difluoride membranes. Specific proteins were detected by incubation with the following antibodies: anti-PTEN (Cell Signaling Technology no. 9559, Beverly, MA, USA), anti-Phospho-Akt (S473; Cell Signaling Technology no. 4060), anti-Akt (Cell Signaling Technology no. 9272), anti-α-tubulin (Sigma no. T5168), anti-Drosha (Millipore nos. 07-717, Molsheim, France), anti-DGCR8 (Protein Tech Group no. 60084-1-Ig, Chicago, IL, USA), anti-GRP94 (Santa Cruz Biotechnology no. sc-11402, Le Perray en Yvelines, France), anti-glyceraldehyde phosphate deshydrogenase (Santa Cruz Biotechnology no. sc-20357), anti-p21 (Santa Cruz Biotechnology no. sc-6246) and the DO-7 anti-p53 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology no. 47698). Blots were revealed with either enhanced chemiluminescence + (GE Healthcare, Orsay, France) and film exposure, or enhanced chemiluminescence Advance (GE Healthcare) and camera capture (G:Box, Syngene, Cambridge, UK). Quantification was performed with ImageQuant (GE Healthcare).

RNA extraction and micro-RNA qRT–PCR
Total RNA was extracted using the miRNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and its quality was checked by calculating the optical density $(OD)_{260}/OD_{230}$ (> 2) and OD_{260}/OD_{280} (> 1.8) ratios, and by agarose electrophoresis. Micro-RNAs were quantified by triplicate qRT–PCR using the Taqman micro-RNA assay (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). Relative quantification was performed using the ΔΔCt method, using RNU48 as a reference.

Growth in athymic mice
Exponentially growing cells were trypsinized, washed once in phosphate-buffered saline supplemented with 10% fetal bovine serum and twice in phosphate-buffered saline, before subcutaneous injection into the flanks of athymic mice (NMRI nude mice, Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Tumor volumes were calculated by multiplying two perpendicular measures, taken three times a week for the following 41 days, or until tumor size precluded it.

Cell cycle analysis (Colmont *et al*., 2001) and senescence-associated β-galactosidase staining (Dimri *et al*., 1995) were performed as described elsewhere.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank V Neuville for assistance with the *in vivo* experiments, B Vogelstein and B Bugler for the HCT116 cell lines, J Lebeau for the A549, T-47D, ZR751, MDA-MB-157 and MDA-MB-231 cell lines, and DSF Biard for the pEBP and pEBH vectors and advice for their use. We also thank M Mangeney, C Pique and all members of the Angulo laboratory for helpful discussions and support. This work was supported by the Electricité De France grant no. V3-104 to G.R.

References

Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, Trotman LC, Nardella C, Egia A *et al*. (2010). Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet* **42**: 454–458.

Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S *et al*. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* **27**: 2128–2136.

Bartel DP. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**: 215–233.

Biard DS, Despras E, Sarasin A, Angulo JF. (2005). Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* **3**: 519–529.

Biard DS. (2007). Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* **35**: 3535–3550.

Boehler C, Gauthier LR, Mortusewicz O, Biard DS, Saliou JM, Bresson A *et al*. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 2783–2788.

Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L *et al*. (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* **14**: 1271–1277.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550–553.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E *et al*. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15524–15529.

Carracedo A, Pandolfi PP. (2008). The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* **27**: 5527–5541.

Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y *et al*. (2009). Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* **28**: 1385–1392.

Chong MM, Rasmussen JP, Rundensky AY, Littman DR. (2008). The RNAseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J Exp Med* **205**: 2005–2017.

Cole KA, Attiyeh EF, Mosse YP, Laquaglia MJ, Diskin SJ, Brodeur GM *et al*. (2008). A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol Cancer Res* **6**: 735–742.

Colmont C, Michelet S, Guivarc'h D, Rousselet G. (2001). Urea sensitizes mIMCD3 cells to heat shock-induced apoptosis: protection by NaCl. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: C614–C620.

Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz Jr LA, Sjoblom T *et al*. (2006). The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3687–3692.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**: 231–235.

Desaint S, Luriau S, Aude JC, Rousselet G, Toledano MB. (2004). Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H2O2. *J Biol Chem* **279**: 31157–31163.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C *et al*. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9363–9367.

Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L *et al*. (2008). The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* **7**: 759–764.

Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S *et al*. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* **308**: 833–838.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N *et al*. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**: 235–240.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* **18**: 3016–3027.

Han J, Pedersen JS, Kwon SC, Belair CD, Kim YK, Yeom KH *et al*. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* **136**: 75–84.

Hand NJ, Master ZR, Le Lay J, Friedman JR. (2009). Hepatic function is preserved in the absence of mature microRNAs. *Hepatology* **49**: 618–626.

He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S *et al*. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* **435**: 828–833.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**: 834–838.

Ivey KN, Srivastava D. (2010). MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell* **7**: 36–41.

Kadener S, Rodriguez J, Abruzzi KC, Khodor YL, Sugino K, Marr II MT *et al*. (2009). Genome-wide identification of targets of the drosha-pasha/DGCR8 complex. *RNA* **15**: 537–545.

Krol J, Loedige I, Filipowicz W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* **11**: 597–610.

Kuchenbauer F, Mah SM, Heuser M, McPherson A, Ruschmann J, Rouhi A *et al*. (2011). Comprehensive analysis of mammalian miRNA* species and their role in myeloid cells. *Blood* (e-pub ahead of print 31 May 2011; doi:10.1182).

Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* **39**: 673–677.

Kumar MS, Pester RE, Chen CY, Lane K, Chin C, Lu J *et al*. (2009). Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev* **23**: 2700–2704.

Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. Melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* **14**: 2162–2167.

Le May N, Mota-Fernandes D, Velez-Cruz R, Iltis I, Biard D, Egly JM. (2010). NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol Cell* **38**: 54–66.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J *et al*. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**: 415–419.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**: 787–798.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D *et al*. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**: 834–838.

Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH *et al*. (2008). MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* **27**: 4373–4379.

Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* **315**: 1576–1579.

Medina PP, Nolde M, Slack FJ. (2010). OncomiR addiction in an *in vivo* model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* **467**: 86–90.

Melo SA, Moutinho C, Ropero S, Calin GA, Rossi S, Spizzo R *et al*. (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* **18**: 303–315.

Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA *et al*. (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet* **41**: 365–370.

Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Abbott AL, Lau NC, Hellman AB, McGonagle SM *et al*. (2007). Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genet* **3**: e215.

Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12135–12140.

Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* **465**: 1033–1038.

Qi J, Yu JY, Shcherbata HR, Mathieu J, Wang AJ, Seal S *et al*. (2009). microRNAs regulate human embryonic stem cell division. *Cell Cycle* **8**: 3729–3741.

Runnebaum IB, Nagarajan M, Bowman M, Soto D, Sukumar S. (1991). Mutations in p53 as potential molecular markers for human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10657–10661.

Shenoy A, Blelloch R. (2009). Genomic analysis suggests that mRNA destabilization by the microprocessor is specialized for the autoregulation of Dgcr8. *PLoS One* **4**: e6971.

Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* **26**: 2799–2803.

Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* **20**: 2202–2207.

Trang P, Medina PP, Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M *et al*. (2010). Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* **29**: 1580–1587.

Triboulet R, Chang HM, Lapierre RJ, Gregory RI. (2009). Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor. *Rna* **15**: 1005–1011.

Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Blelloch R. (2008). Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* **40**: 1478–1483.

Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* **39**: 380–385.

Welch C, Chen Y, Stallings RL. (2007). MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* **26**: 5017–5022.

Weng LP, Smith WM, Dahia PL, Ziebold U, Gil E, Lees JA *et al*. (1999). PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. *Cancer Res* **59**: 5808–5814.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)

LEGENDS FOR SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLE I

Supplementary Figure 1: Colony growth arrest induced by microprocessor inhibition is not senescence.

MCF-7 cells were transfected with vectors coding for shDro^{sp} or shDro, grown for 2 weeks under selection, and then fixed and stained for senescence-associated β-galactosidase activity. Phase contrast pictures of representative clones were taken at 2 different magnifications. Senescent cells could be observed in the center of overgrown clones of shDro^{sp} transfected cells (top), and served as a positive staining control.

Supplementary Figure 2: Screening for microprocessor-dependent cell lines.

The different cell lines were transfected at 80-90% confluency, plated at low density, and grown for 2-3 weeks under selection. They were then fixed and stained with methylene blue. Shown is 1 representative experiment out of at least 3.

Supplementary Figure 3: Efficient microprocessor knockdown in MDA-MB-231 cells.

Cells were transfected with vectors coding for the indicated shRNAs and grown for 2 weeks under selection. **(a)** Whole cell extracts were analyzed for Drosha and DGCR8 expression by western blotting. GRP94 was used as a loading control. The experiment was repeated 3 times with similar results. **(b)** Total RNA was extracted and assayed for the expression of a series of micro-RNAs, using RNU48 as a normalization target. Results are presented as the mean ± S.D (n = 2) of each micro-RNA expression relative to cells transfected with an empty vector.

Supplementary Figure 4: Phenotypic consequences of microprocessor inhibition are not due to off-target effects.

Cells were transfected with vectors coding for the indicated shRNAs (**(a)** shDro2 targets Drosha and **(b)** shDG2 targets DGCR8). Clones were allowed to grow for 2 weeks under selection, fixed,

and stained with methylene blue. The experiment was performed at least 3 times with similar results

Supplementary Figure 5: Efficient knockdown of Drosha in CoGAM-complemented cells

MCF-7 cells were transfected with pEBP, pEBP-shDro, or pEBP-shDG, together with an equal amount of pEBH or pEBH-miRx. They were then grown under selection for 14 days, except for pEBP-shDro + pEBH-miR-302 and pEBP shDro + pEBH-miR-372 (8 days) and pEBP-shDro + pEBH-miR-27b (18 days). Whole cell extracts were prepared and 20 µg total protein were analyzed for expression of Drosha (top) and DGCR8 (bottom) by western blotting. GRP94 was used as a loading control.

Supplementary Figure 6: Time-course of CoGAM complementation.

Complementation was performed as detailed in Figure 3c. One representative experiment is presented.

Supplementary Figure 7: CoGAM is resistant to knockdown of p21 in double transfection experiments.

MCF-7 cells were transfected with vectors coding for the indicated shRNAs, grown for 2 weeks, fixed, and stained with methylene blue. The experiment was performed twice with similar results.

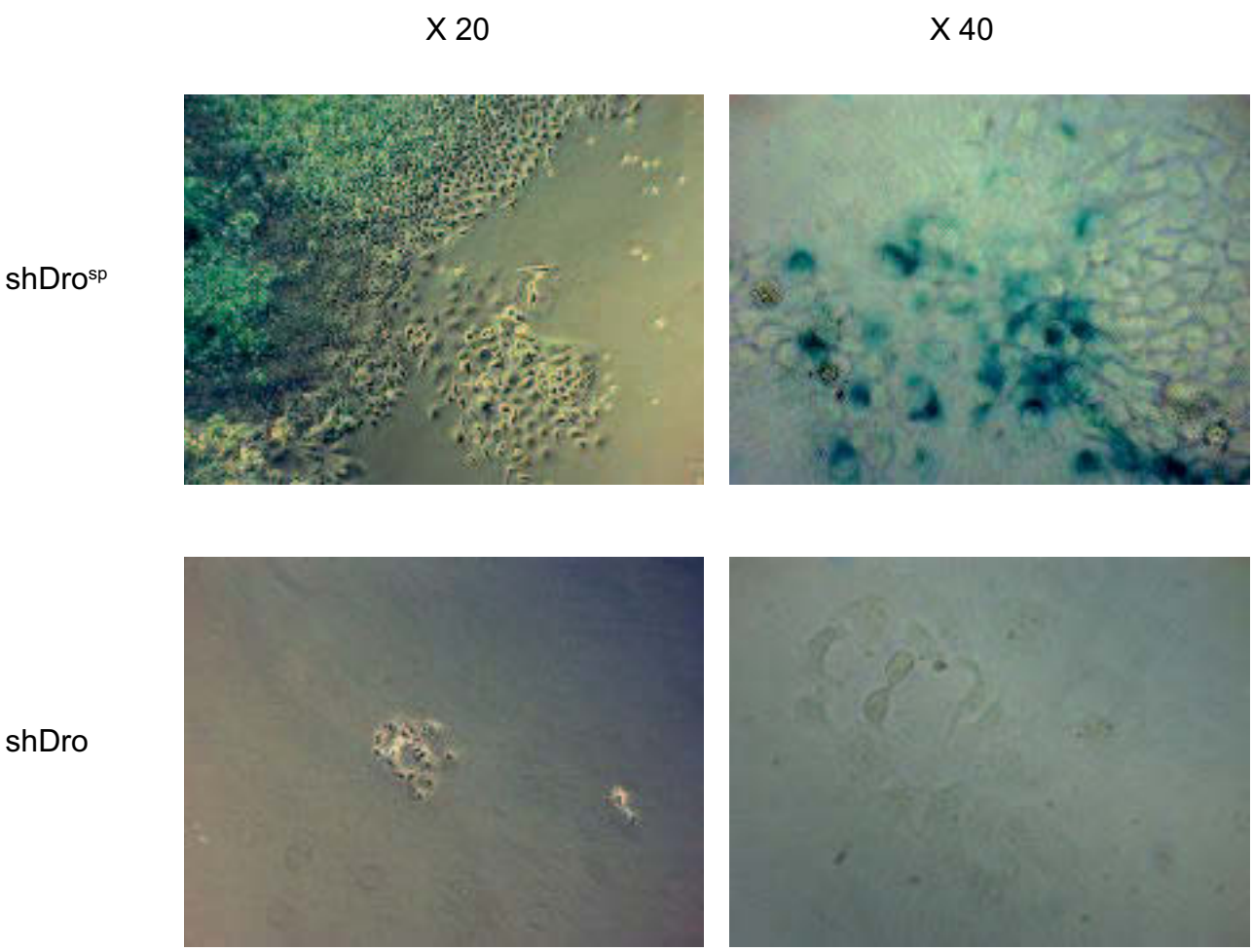
Supplementary Figure 8: Drosha knockdown induces a reproducible increase in PTEN mRNA levels

MDA-MB-231 cells were transfected with vectors coding for the indicated shRNAs and grown for two weeks under selection. Total RNA was prepared with the miRNeasy kit (Qiagen) and assayed for expression of the indicated genes with Taqman gene expression assays (Applied Biosystems). Results were normalized with GAPDH. B2M: β-2-microglobulin.

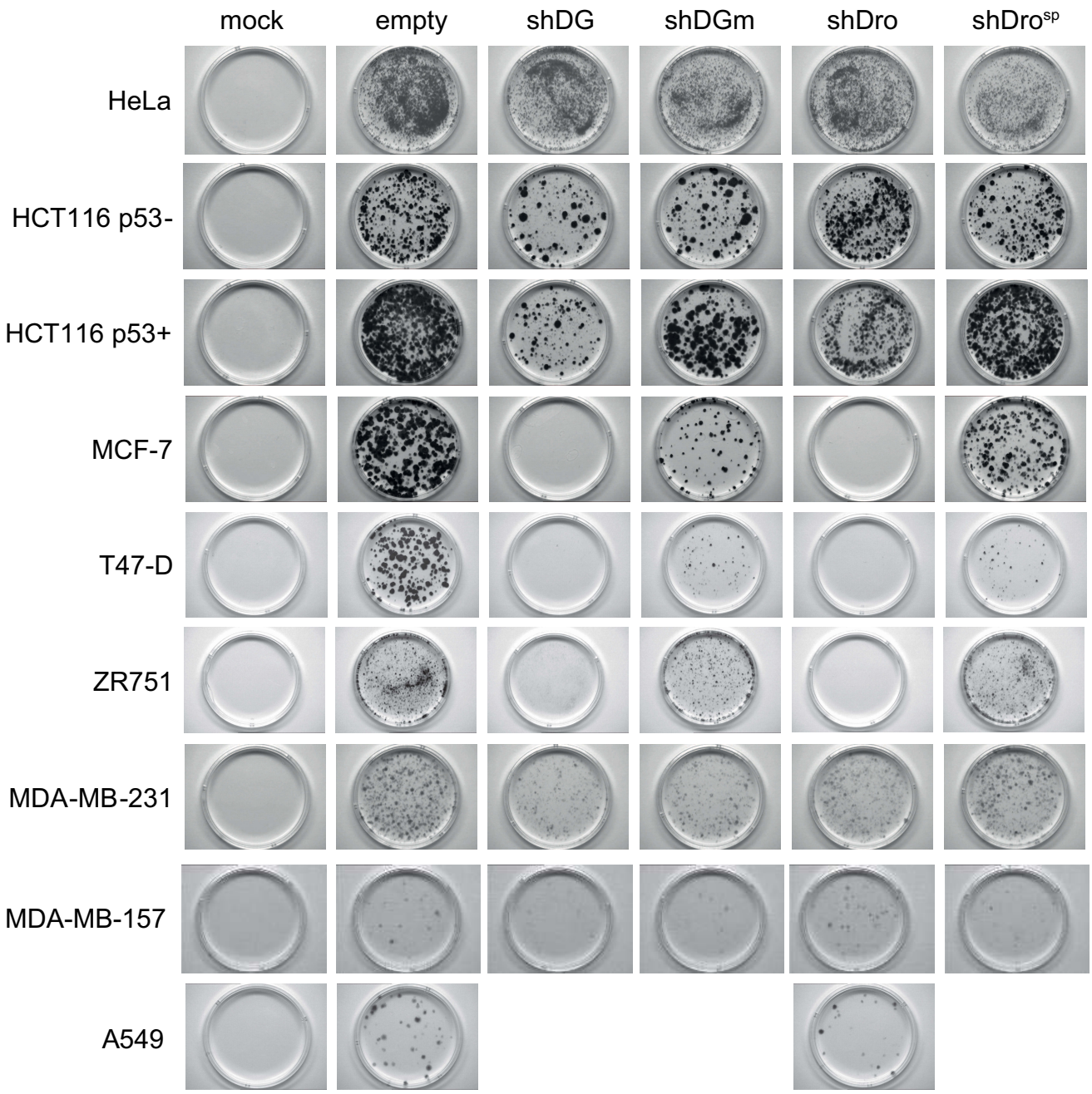
Supplementary Table I: Expression of micro-RNAs from pEBH-miRx vectors

Individual pre-miRNAs coding vectors were transfected in HeLa cells, and total RNA was extracted 24 hrs after. Expression of the mature micro-RNA was assayed by RT-qPCR and normalized with RNU48. Shown are the fold changes between cells transfected with pre-miRNAs coding vectors *vs* empty vector transfected cells (FC *vs* empty). The threshold cycle in non-transfected cells (Ct in empty) is indicated in brackets as an indication of the level of expression of the endogenous micro-RNA. ND: not detected.

Peric et al., Supplementary Figure 1

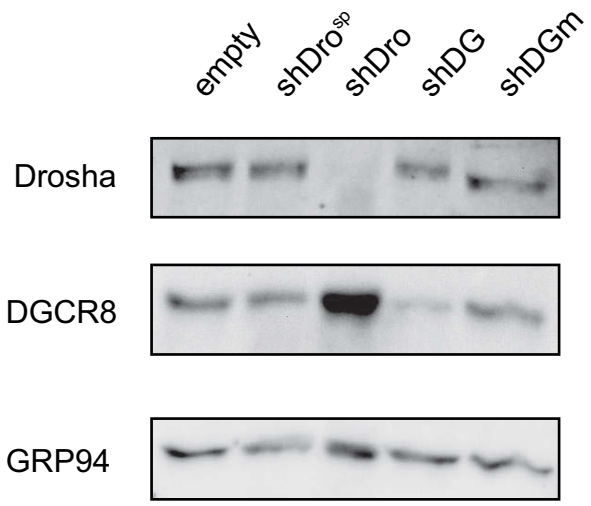


Peric et al., Supplementary Figure 2

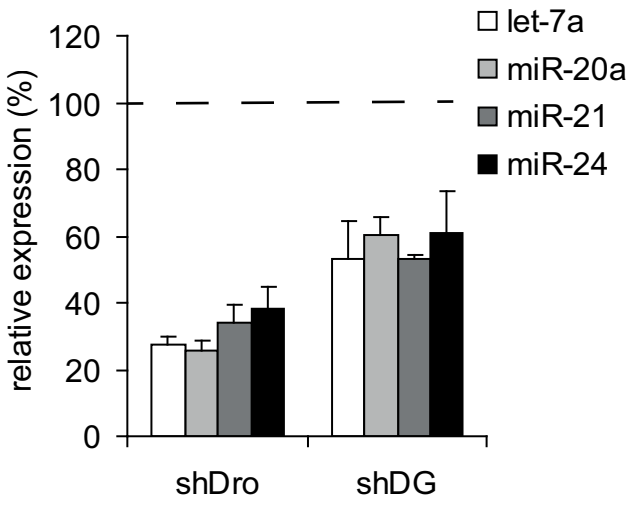


Peric et al., Supplementary Figure 3

a

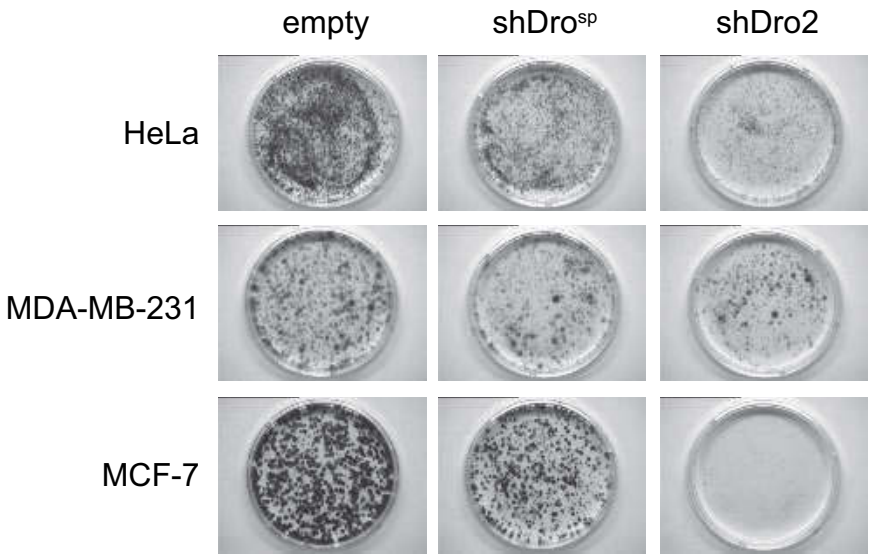


b

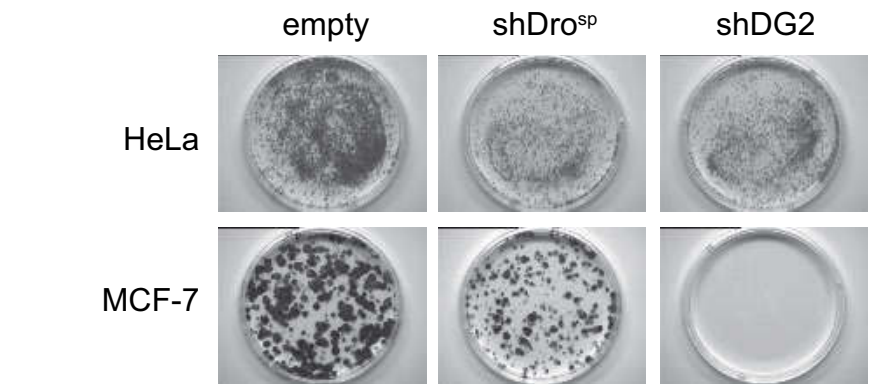


Peric et al., Supplementary Figure 4

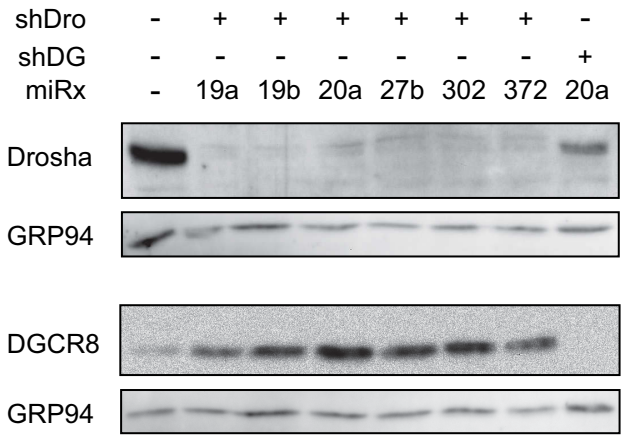
a



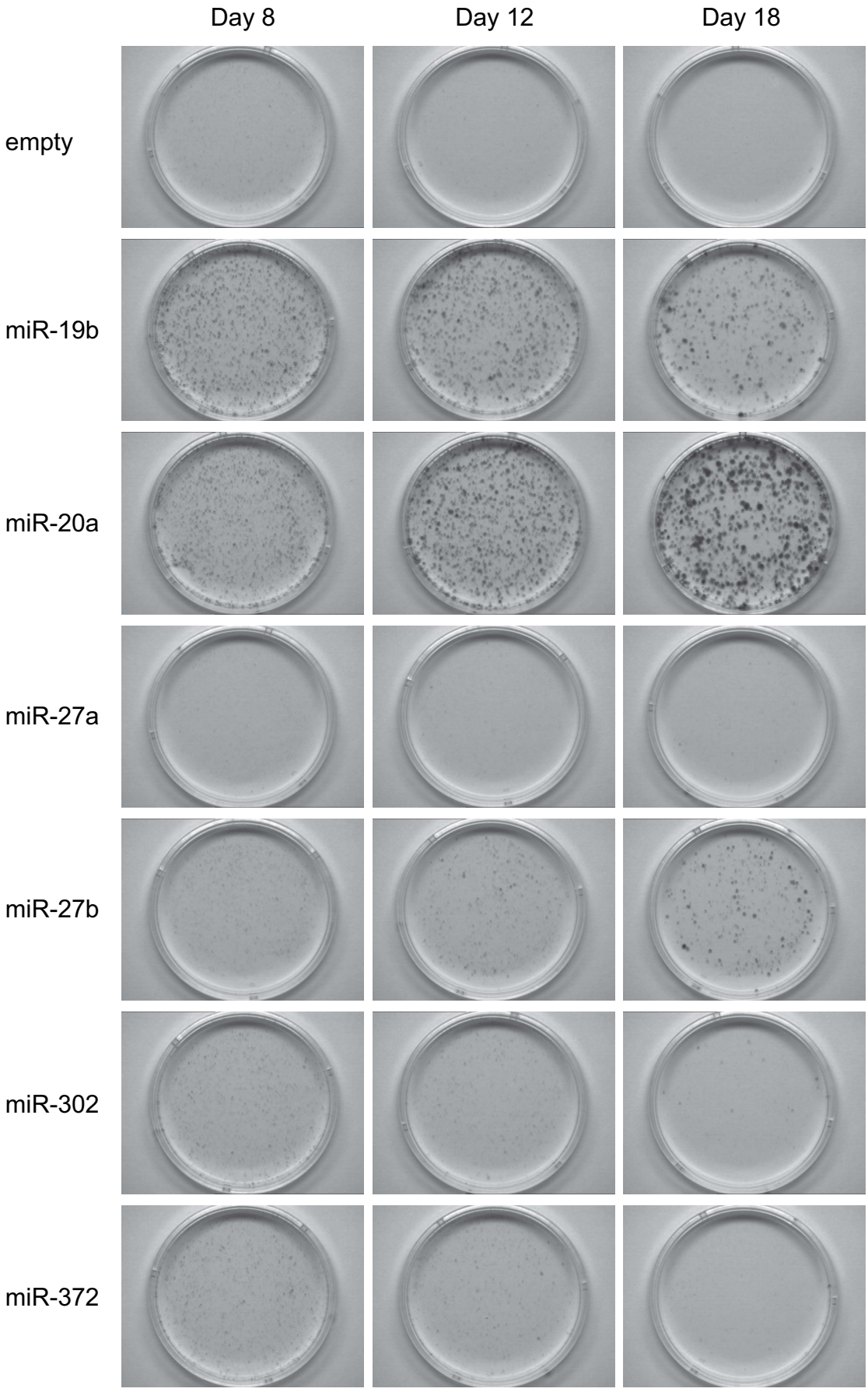
b



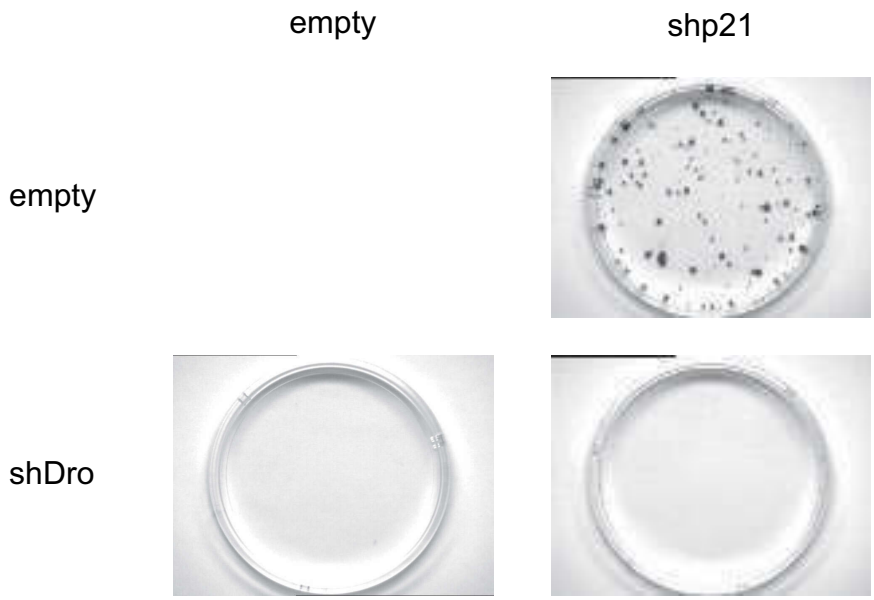
Peric et al., Supplementary Figure 5



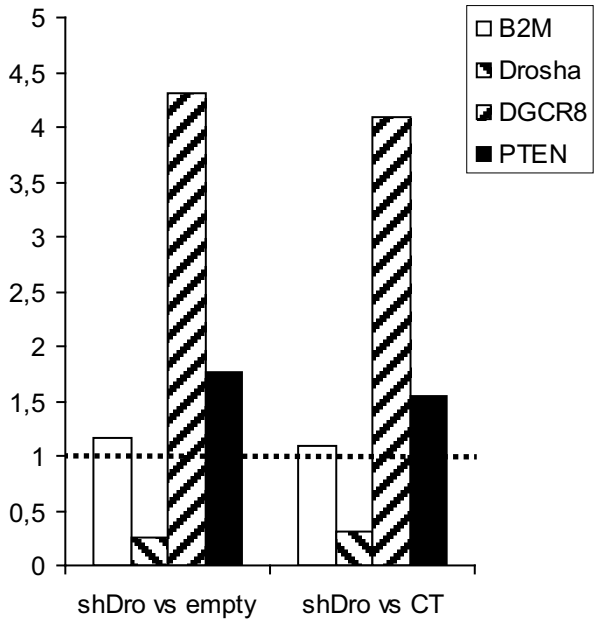
Peric et al., Supplementary Figure 6



Peric et al., Supplementary Figure 7



Peric et al., Supplementary Figure 8



Peric et al., Supplementary Table I

micro-RNA	Ct in empty	FC *vs* empty
let-7g	27.7	20.7
miR-7-1	36.9	19.4
miR-15b	27	2.4
miR-17	29.9	13.6
miR-18a	28.5	1.8
miR-19a	28.5	4.4
miR-19b-1	22.8	3.3
miR-20a	25	3.4
miR-21	24.5	1.5
miR-23a	28.7	1.1
miR-24-1	25.6	1.1
miR-24-2	24.6	1.1
miR-26a-1	26.7	3.2
miR-27a	27.9	10.1
miR-27b	30.9	62.2
miR-29a	26.9	2.1
miR-34a	34.3	32.1
miR-92a-1	24.4	8.3
miR-96	31.6	1.1
miR-100	26.9	6.3
miR-143	ND	∝
miR-182	31.6	3.8
miR-191	24.4	11.2
miR-221	29.9	14.0
miR-222	23.9	17.6
miR-302b	32.8	3666
miR-371	ND	∝
miR-372	35.6	166673
miR-373	35.6	365.4

I.2 Résultats additionnels

I.2.1 L'inhibition du microprocesseur n'est pas améliorée par l'inhibition concomitante de Drosha et DGCR8

Nous avons regardé s'il était possible d'obtenir une meilleure inhibition du microprocesseur en inhibant à la fois Drosha et DGCR8. Pour cela, nous avons ciblé Drosha et DGCR8 dans des cellules HCT116 p53$^{-/-}$ en les co-transfectant avec les plasmides shDro et shDG, chacun portant un marqueur de sélection différent (Figure 20). Cependant, l'inhibition concomitante de Drosha et DGCR8 n'a pas amélioré l'inhibition du microprocesseur (Figure 20A) ni l'inhibition de la maturation des miRNAs (Figure 20B). La Figure 20A montre d'ailleurs que l'augmentation de DGCR8 induite par shDro compense l'inhibition de DGCR8 par shDG lorsque les 2 protéines ont été inhibées en même temps, ramenant DGCR8 à un niveau comparable au niveau normal. Ces résultats sont cohérents avec le fait que les 2 protéines font partie du même complexe et que les 2 protéines sont nécessaires à la maturation des miRNAs par le complexe. Ainsi, l'inhibition de l'une ou de l'autre suffit à inhiber la maturation des miRNAs et l'inhibition des deux protéines en même temps n'a pas d'effet additif.

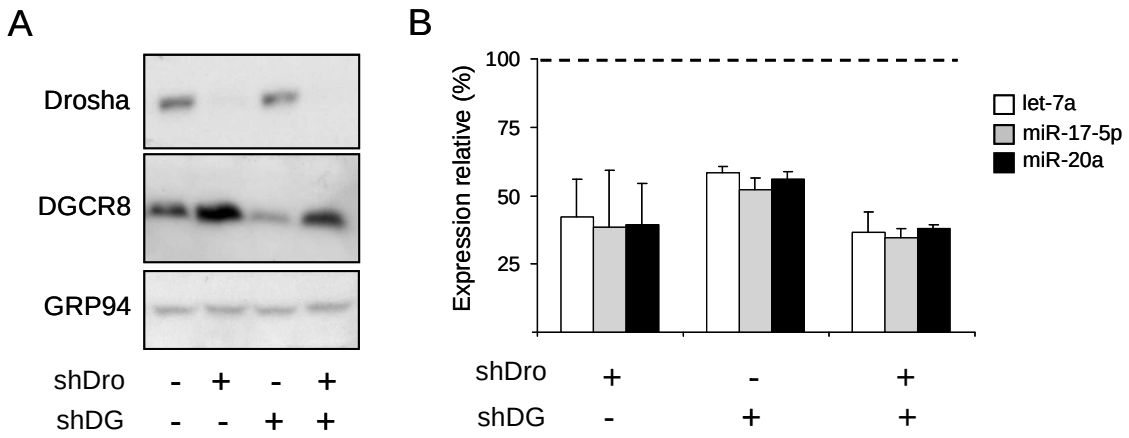


Figure 20 : Comparaison des efficacités de différents types d'inhibition du microprocesseur.
A) Des cellules HCT116 p53$^{-/-}$ ont été co-transfectées avec les vecteurs codant pour les séquences indiquées («-» signifie plasmide vide) et sélectionnées avec de l'hygromycine et de la puromycine. Les protéines totales ont été extraites et 20 µg ont été analysées par western-blot pour l'expression de Drosha, DGCR8 et GRP94 comme contrôle de chargement. B) L'ARN total a été extrait et l'expression de 3 miRNAs a été analysée par qRT-PCR en utilisant l'expression de RNU48 comme contrôle de normalisation. Le graphique montre l'expression relative des miRNAs par rapport aux cellules HCT116 p53$^{-/-}$ transfectées avec les 2 vecteurs vides (moyenne ± S.D., n = 2).

I.2.2 PTEN est une cible de la famille miR-20

Au moment de notre étude, PTEN était une cible déjà validée de miR-19 (Lewis et al., 2003; Olive et al., 2009) mais pas de miR-20. Puisque miR-20 est le miRNA qui complémente le mieux le phénotype CoGAM et que nous avons montré que PTEN est partiellement impliqué dans ce phénotype, nous avons voulu valider que PTEN était une cible de miR-20. Nous avons identifié 3 sites prédits des miRNAs de la famille miR-20 dans le 3'UTR de PTEN. Dans l'ordre d'apparition dans le 3'UTR, le 1er site est prédit par les logiciels miRanda et Pictar, le 2e et le 3e (avec un mésappariement ou un appariement bancal dans la séquence noyau) uniquement par Pictar. Nous avons cloné le 3'UTR de PTEN en aval d'un gène rapporteur de la luciférase et nous avons mesuré l'effet de la mutation de 3 nucléotides au cœur de la séquence noyau de ces sites de réponse (Figure 21A).

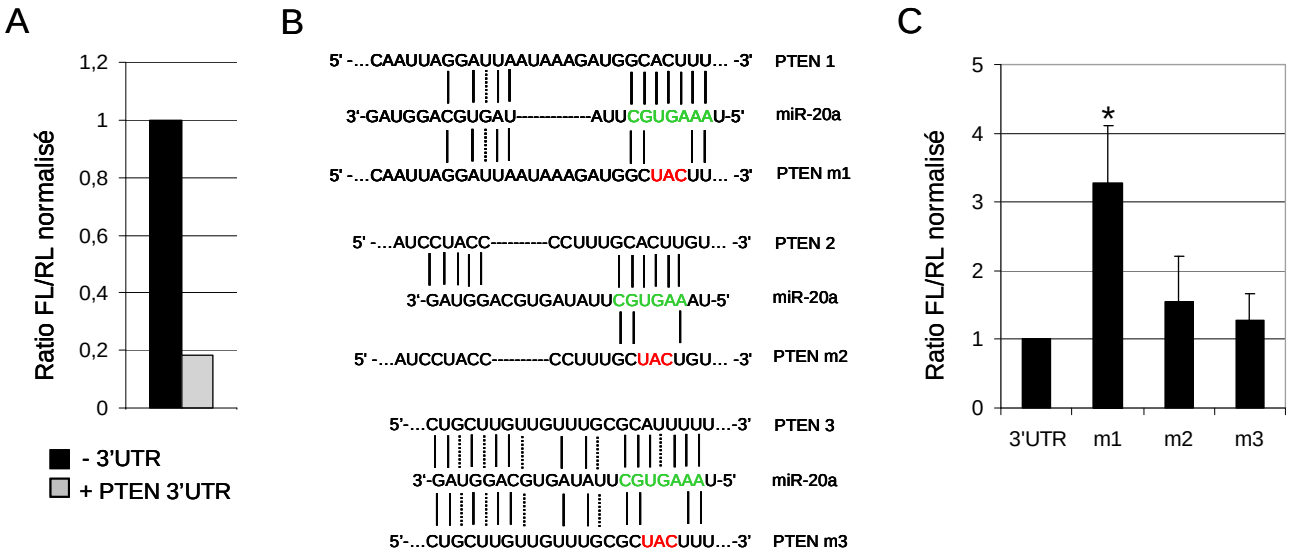


Figure 21 : Effet du 3'UTR de PTEN sauvage et muté au niveau de sites prédits pour miR-20 sur l'expression d'un gène rapporteur. *A) Environ 2 kb du 3'UTR de PTEN contenant les 3 sites prédits pour miR-20 ont été clonés en aval du gène rapporteur de la luciférase de luciole (FL pour « firefly luciferase) dans le plasmide pmirGLO (Promega) contenant également le gène de la luciférase de Renilla (RL) servant de contrôle de normalisation de l'intensité lumineuse. Le 3'UTR cloné a été entièrement vérifié en séquence. 2,5.10⁴ cellules HeLa (exprimant miR-20) ont été ensemencées en plaque 96 puits et transfectées en triplicats 24h plus tard avec 200 ng de pmirGLO sans 3'UTR (-3'UTR) ou 200 ng de pmirGLO avec le 3'UTR de PTEN (+PTEN 3'UTR). 24h après transfection, l'activité des gènes rapporteurs a été mesurée avec le kit « Dual GLO Luciferase Assay » (Promega). Les résultats sont présentés comme le ratio de l'activité FL sur celle de RL, normalisé par rapport à pmirGLO sans 3'UTR (n=1). La présence du 3'UTR entraine une répression de l'expression de la FL de 80%. B) Le 3'UTR de PTEN contenu dans pmirGLO a ensuite été muté au niveau de 3 nucléotides consécutifs (en rouge) dans la séquence complémentaire à la séquence noyau (en vert) des 3 sites prédits de la famille des miRNAs miR-20, générant les plasmides PTEN m1 (muté site 1), m2 (muté site 2) et m3 (muté site 3). C) Des cellules HeLa ont été transfectées en triplicats avec ces plasmides et soumises au « Dual GLO Luciferase Assay » comme décrit en (A). Les résultats sont présentés comme le ratio de l'activité FL sur celle de RL, normalisé par rapport à pmirGLO avec le 3'UTR non muté (3'UTR) (moyenne ± S.E.M., n = 3). La mutation du site 1 lève significativement la répression exercée sur le gène de la luciférase (*p<0,05).*

La présence du 3'UTR sauvage a entrainé une répression de l'activité du gène rapporteur de 80% dans les cellules HeLa exprimant fortement miR-20 (Figure 21B). Seule la mutation du 1er site a permis de lever la répression exercée sur le gène rapporteur (Figure 21C), confirmant que ce site de réponse à la famille miR-20 est fonctionnel. Pour que ces résultats soient complets, il nous aurait fallu co-transfecter ces plasmides avec un plasmide permettant de surexprimer miR-20 ou avec des molécules de type miR-20, dans des cellules exprimant peu ou pas de miRNAs de la famille miR-20. Cette expérience doit permettre de montrer que la surexpression de miR-20 entraine une inhibition du gène rapporteur, dépendante de la présence du site de réponse. Nous n'avons pas eu le temps de développer cette partie de la démonstration. Cependant, nos résultats ont entre-temps été confirmés par la publication des travaux de Poliseno et al. qui montrent également par une approche plus complète que PTEN est bien une cible de la famille miR-20 (Poliseno et al., 2010a).

II. Mise en place d'un système inductible pour l'inhibition de Drosha

II.1 Intérêt

Une des limites du système expérimental basé sur les vecteurs épisomaux est qu'il nous oblige à travailler après sélection à moyen terme des cellules transfectées, ce qui nous empêche d'étudier les étapes initiales du phénotype d'arrêt de prolifération. De plus, suite à la sélection, les cellules dépendantes du microprocesseur sont complètement arrêtées par l'inhibition de Drosha ou de DGCR8 avec les vecteurs épisomaux, ce qui limite la possibilité d'étudier ce phénotype d'arrêt de prolifération des colonies. Nous avons donc mis au point un système inductible pour l'inhibition de Drosha grâce à des vecteurs lentiviraux permettant l'expression de shDro sous contrôle d'un promoteur dépendant de la tétracycline (Wiederschain et al., 2009). La possibilité d'inhiber Drosha en absence des effets liés à la sélection antibiotique et sur des durées de cinétiques choisies permettrait de tester les caractéristiques moléculaires (niveau d'expression de Drosha et des miRNAs, niveau d'expression de PTEN et d'autres cibles potentiellement impliquées) et cellulaires (cycle cellulaire, apoptose, prolifération) des différentes étapes de l'arrêt de prolifération.

II.2 Matériel et méthodes

Du sérum de veau fœtal certifié sans contaminant dérivé de la tétracycline (« FBS, Tet System Approved Serum », Clontech) a été utilisé pour l'ensemble des cultures cellulaires de cette partie expérimentale (production des lentivirus, transduction et culture des lignées inductibles établies).

II.2.1 Plasmides et production des particules lentivirales

Les séquences du shRNA contrôle shDro^{sp} ou du shRNA shDro ont été insérées dans le plasmide « pLKO-Tet-on-puro » (Addgene) (Wiederschain et al., 2009) digéré avec AgeI et EcoRI, puis vérifiées par séquençage. Le plasmide pLKO-shDro^{sp} ou pLKO-shDro a été mélangé avec un plasmide codant pour la protéine VSV-G (protéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire) et le plasmide pCMV-dR8.91 (Delta 8.9) codant pour gag, pol et rev. Du $Cacl_2$ (concentration finale 0,25 M) est ajouté au mélange de plasmides, ce qui permet de précipiter le mélange par ajout au goutte-à-goutte à une solution tamponnée de HBS 2x (pH=7,2). Le précipité est ajouté au milieu de culture de cellules 293T à 70-80% de confluence afin de les transfecter avec les 3 plasmides. Le milieu est changé 24h plus tard. Après 48h, le milieu contenant les particules lentivirales produites est récupéré, centrifugé à 1200 rpm pendant 5 min pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est filtré à 0,8 µm, aliquoté et conservé à -80°C.

II.2.2 Transduction cellulaire et établissement de lignées stables

L'établissement de lignées inductibles a été réalisé grâce à la transduction de la lignée MCF-7 (dépendante du microprocesseur) ainsi que, pour comparaison, la lignée de cancer du sein MDA-MB-231. 2.10^5 (MDA-MB-231) ou 5.10^5 (MCF-7) cellules ont été ensemencées dans une boite de culture de 3,5 cm de diamètre. Après 24h, 200 µl (MDA-MB-231) ou 1 ml (MCF-7) de surnageant contenant les particules lentivirales ont été ajoutés aux cultures cellulaires. Après 72h (MDA-MB-231) ou 48h (MCF-7), les cellules ont été trypsinées, passées au 1/500 dans des boites de culture de 6 cm de diamètre puis sélectionnées à la puromycine pendant environ 14 jours. Par comptage des clones résistants à la puromycine, nous avons déterminé que dans les conditions utilisées, l'efficacité de transduction était comprise entre 55% et 83%. Les cellules sélectionnées ont été rassemblées pour constituer les lignées inductibles (i-shDro^{sp} et ishDro).

II.3 Résultats préliminaires

II.3.1 Validation de la fonctionnalité du système inductible

Les cellules MDA-MB-231 i-shDro ont été traitées à la doxycyline sur une durée 8 jours pour induire l'expression de shDro. L'expression de Drosha a été mesurée à différents temps de la cinétique (Figure 22A). Sous l'effet de l'induction de shDro, l'expression de Drosha a graduellement diminué pour atteindre un minimum à partir de 72h environ. Nous avons également pu vérifier que l'expression de DGCR8 était augmentée parallèlement à l'inhibition de Drosha, confirmant l'inhibition fonctionnelle de Drosha. Nous avons ensuite regardé si le traitement à la doxycycline des MCF-7 i-shDro permettait également d'inhiber l'expression de Drosha. Les cellules MCF-7 i-shDro^{sp} (comme contrôle) et i-shDro ont donc été traitées ou non pendant 4 jours avec de la doxycycline et les expressions de Drosha et DGCR8 ont été comparées dans ces différentes conditions (Figure 22B). Nous avons observé une diminution significative de l'expression de Drosha dans les MCF-7 i-shDro traitées à la doxycycline, accompagnée d'une augmentation de l'expression de DGCR8.

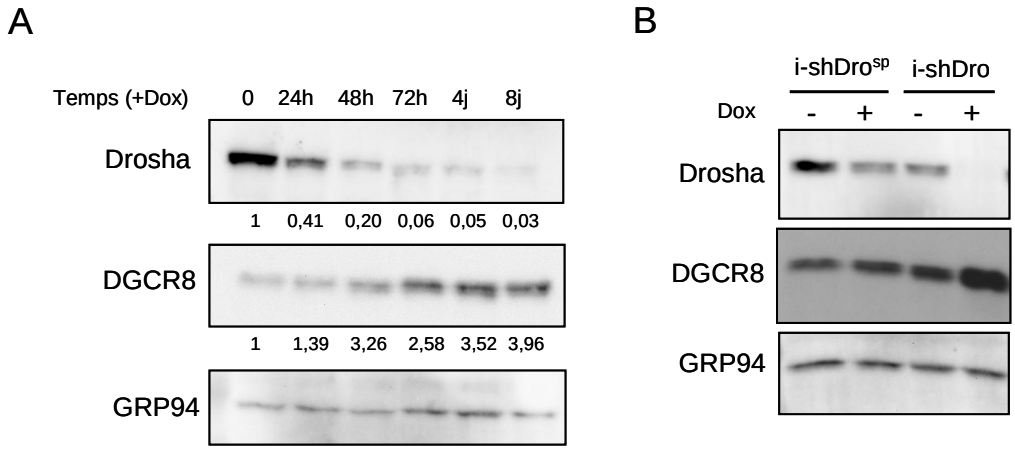


Figure 22 : Le traitement à la doxycycline des lignées i-shDro entraine une inhibtion de l'expression de Drosha. *A) Les cellules MDA-MB-231 i-shDro ont été traitées à la doxycycline (Dox) à 100 ng/ml pendant les durées indiquées pour induire l'expression de shDro. Les protéines totales ont été extraites et 30 µg ont été analysées par western-blot pour l'expression de Drosha, DGCR8 et GRP94 comme contrôle de chargement. Les chiffres en dessous des images des western-blots indiquent le ratio de l'intensité des bandes sur celles de GRP94 (quantification réalisée avec ImageJ), normalisé par rapport aux cellules non traitées à la doxycycline. B) Les cellules MCF-7 i-shDro^{sp} et i-shDro ont été traitées à la doxycycline (100 ng/ml) pendant 4 jours. Les protéines totales ont été extraites et 25 µg ont été analysées par western-blot pour l'expression de Drosha, DGCR8 et GRP94 comme contrôle de chargement.*

Nous avons ensuite mesuré l'effet de l'induction de l'inhibition de Drosha sur la maturation des miRNAs. Pour cela, nous avons traité les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 i-shDro avec de la

doxycycline pendant 21 jours et nous avons mesuré la quantité de 3 miRNAs matures à différents temps de cette cinétique. Nous avons tout d'abord vérifié que Drosha pouvait être inhibée en continu sur cette durée plus importante (Figure 23A). Le traitement continu à la doxycycline pendant 21 jours a permis de maintenir l'inhibition de Drosha dans les cellules MDA-MB-231 i-shDro, même si cette inhibition semble être un peu plus importante à 7 jours que par la suite. La Figure 23B montre que, après induction de l'inhibition de Drosha, nous avons mesuré dans les 2 lignées une diminution de l'expression de la majorité des miRNAs matures à partir de 7 jours. Entre 7 et 21 jours, nous avons mesuré une inhibition moyenne des miRNAs matures fluctuant entre 41% et 57% dans les MDA-MB-231, et entre 40% et 69% dans les MCF-7. Ces résultats suggèrent que les miRNAs matures sont très stables puisque, malgré une inhibition très efficace de Drosha à partir de 3 jours, il a fallu attendre 7 jours pour voir diminuer l'expression des miRNAs matures. Bien que ces résultats soient préliminaires car les expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois, ils montrent dans leur ensemble que le système inductible pour l'inhibition de Drosha est fonctionnel dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231.

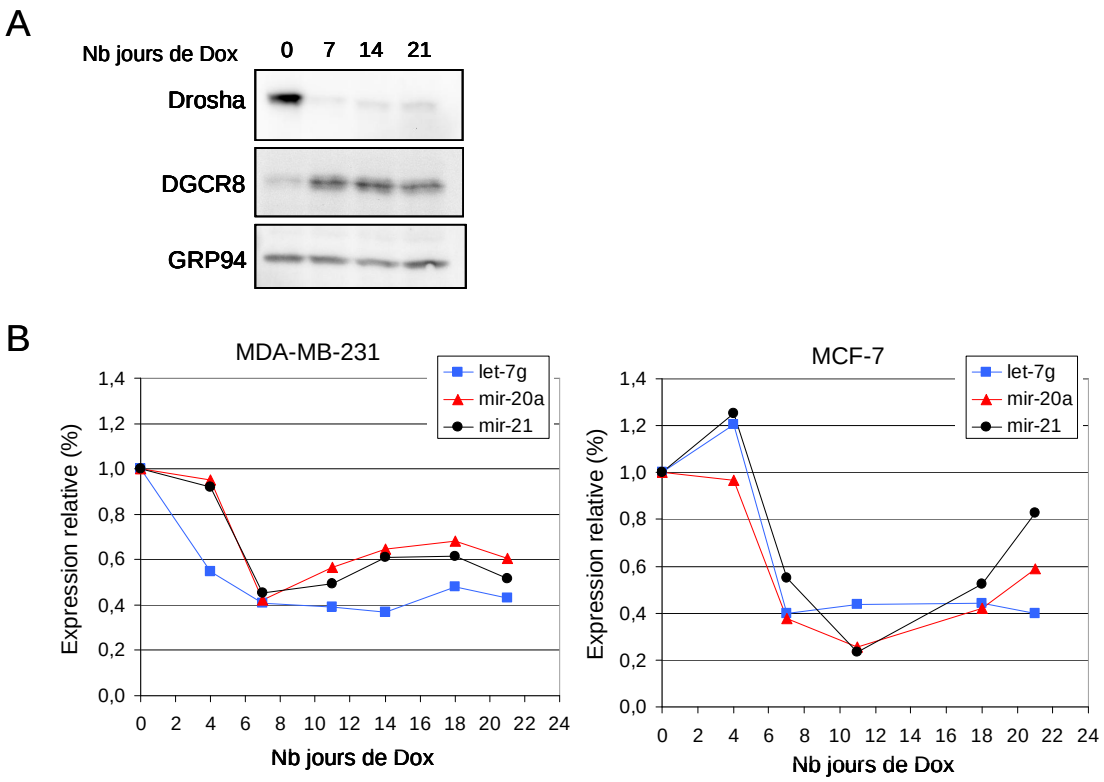


Figure 23 : Le traitement à la doxycycline des lignées inductibles i-shDro entraine une inhibtion de l'expression des miRNAs. *A) Les cellules MDA-MB-231 i-shDro ont été traitées à la doxycycline (Dox) à 100 ng/ml pendant le nombre de jours indiqués pour induire l'expression de shDro. Les protéines totales ont été extraites à 7, 14 et 21 jours, et 30 µg de protéines ont été analysées par western-blot pour l'expression de Drosha, DGCR8 et GRP94 comme contrôle de chargement. B) Les cellules MDA-MB-231 i-shDro (à gauche) et MCF-7 i-shDro (à droite) ont été traitées à la doxycycline (Dox) à 100 ng/ml pendant le nombre de jours indiqués pour induire l'expression de shDro. L'ARN total a été extrait à chaque point de la cinétique et l'expression de 3 miRNAs a été analysée par qRT-PCR en utilisant l'expression de RNU48 comme contrôle de normalisation. Le graphique montre l'expression relative des miRNAs par rapport aux cellules i-shDro non traitées à la doxycycline (n = 1).*

II.3.2 Effets de l'inhibition de Drosha sur la capacité des cellules dépendantes du microprocesseur à former des colonies

En induisant l'inhibition de Drosha dans les cellules MCF-7 i-shDro en conditions de culture classiques, nous avons constaté que les cellules étaient capables de proliférer. Nous nous sommes demandé si le phénotype d'arrêt de croissance des colonies observé avec le système de vecteurs épisomaux (CoGAM) pouvait être lié à l'isolation des cellules (nécessaire avec ce système pour les sélectionner) et donc représenter une inhibition de la capacité de cellules individuelles à cloner. Afin d'étudier cette hypothèse dans les MCF-7 i-shDro et en prenant les MDA-MB-231 i-shDro comme contrôle résistant au phénotype CoGAM, nous nous sommes tout d'abord placés dans des conditions où les miRNAs matures étaient effectivement inhibés. Pour cela, nous avons pré-traité ou non (contrôle) les cellules à la doxycycline pendant 10 jours avant de les ensemencer à densité non clonale (Figure 24A) ou clonale (Figure 24B).

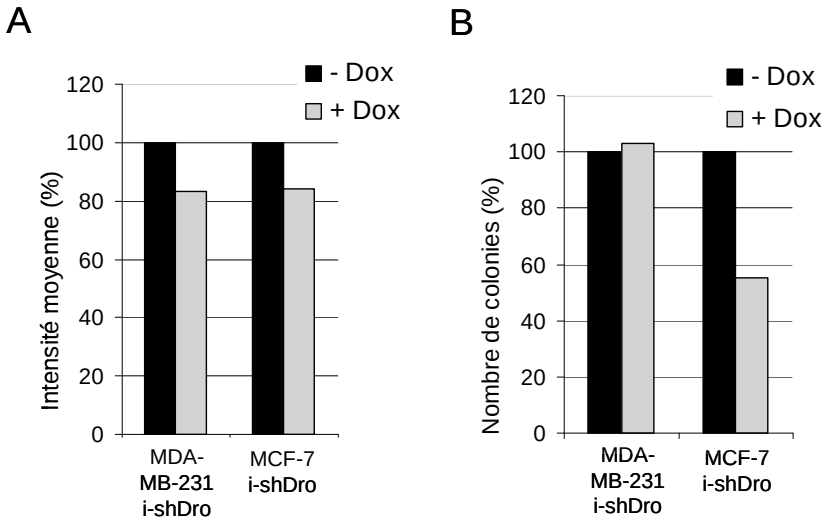


Figure 24 : Effet de l'inhibition de Drosha sur la capacité à former des colonies. *Les cellules MDA-MB-231 i-shDro et MCF-7 i-shDro ont été traitées (+Dox) ou non (-Dox) à la doxycycline à 100 ng/ml pendant 10 jours avant d'être ensemencées à 10^5 cellules (A) ou 10^3 cellules (dilution clonale) (B) dans une boite de culture de 6 cm de diamètre. Les cellules ont été cultivées pendant 4 jours (A) et 10 jours (B) avant d'être fixées au formaldéhyde (4%) et colorées au bleu de méthylène. L'intensité de la coloration des boites ensemencées à densité moyenne (A) a été mesurée avec ImageJ. Les résultats en (A) sont présentés comme la moyenne de l'intensité des pixels par boite, normalisée par rapport aux cellules non traitées à la doxycycline (n=1). Le nombre de colonies formées à partir des cellules ensemencées à très faible densité (B) a été compté avec le système Colcount (Oxford Optronics). Les résultats en (B) sont représentés comme le nombre de colonies, normalisé par rapport aux cellules non traitées à la doxycycline (n=1).*

Nous avons laissé proliférer les cellules pendant 4 ou 10 jours respectivement avant de les fixer, de les colorer et de les quantifier. Dans le 1er cas, la prolifération des cellules n'a pas semblé être affectée par l'inhibition de Drosha, comme le montre la Figure 24A. Dans le cas de la dilution clonale des cellules, les colonies formées ont été dénombrées et nous avons mesuré une diminution d'environ 50% de la formation des colonies dans les MCF-7 inhibées pour Drosha alors que la formation des colonies n'a pas été affectée par l'inhibition de Drosha dans les MDA-MB-231 (Figure 24B). Encore une fois préliminaires, ces résultats suggèrent que le phénotype CoGAM pourrait se caractériser, au moins en partie, par une diminution de la capacité des cellules dépendantes du microprocesseur à former des colonies.

III. Modifications protéomiques induites par l'inhibition du microprocesseur (Article II)

Dans cette partie, il sera fait référence aux Figures de l'article II (soumis à Proteomics).

Dans le but initial d'identifier des protéines cibles des miRNAs jouant potentiellement un rôle dans le phénotype CoGAM, nous avons décidé de réaliser une analyse des modifications protéomiques induites par l'inhibition du microprocesseur dans les cellules MCF-7. De plus, ce phénotype ne s'apparente à aucun état cellulaire connu, tel que la sénescence, l'activation d'un point de contrôle du cycle cellulaire ou encore l'apoptose. Ainsi, la caractérisation protéomique du phénotype CoGAM pouvait nous apporter des informations sur cet état cellulaire particulier.

Or, l'analyse protéomique des cellules MCF-7 shDro (présentant le phénotype CoGAM) a mis en évidence un résultat inattendu, à savoir un biais dans la taille des protéines dont l'expression était modifiée par rapport aux cellules MCF-7 contrôles (Figures 1C et 1D). En effet, nous avons montré que les protéines induites étaient significativement plus petites (27,5 ± 6,0 kDa en moyenne) que les protéines réprimées (87,4 ± 25,7 kDa). Ce biais de taille était spécifique de la taille des protéines car indépendant du point isoélectrique et du niveau d'expression des protéines dans les cellules contrôles (Figures 1E, 1F, 1G et 1H). De plus, le biais de taille ne nous a pas semblé correspondre à une dégradation généralisée non spécifique des grandes protéines dans les cellules CoGAM puisque l'expression de seulement 85 protéines sur 535 (15,9%) était diminuée.

Afin d'évaluer si l'arrêt de croissance en lui-même pouvait être à l'origine du biais de taille observé, nous avons comparé les modifications du protéome entre les cellules MCF-7 shDro (CoGAM) et les cellules MCF-7 shDro dont l'arrêt de prolifération est complémenté par l'expression de miR-20a (Figures 2C et 2D). Cette comparaison nous a permis de montrer que la complémentation de CoGAM sans ré-exprimer Drosha induisait un biais de taille en sens inverse. Nous en avons conclu que le biais de taille observé était au moins en partie dû au phénotype CoGAM lui-même.

Nous avons également évalué les modifications protéomiques induites par l'inhibition de Drosha indépendamment du phénotype CoGAM. Pour cela, nous avons comparé les protéomes des cellules MCF-7 shDro complémentées avec miR-20 avec des MCF-7 surexprimant uniquement miR-20. Nous avons également comparé les protéomes des cellules de carcinome du colon HCT116 contrôles et shDro, ces cellules ne présentant pas de phénotype CoGAM. Dans les deux

cas, nous avons trouvé un biais de taille moins marqué que dans les cellules arrêtées mais statistiquement significatif (Figure 3). Ces résultats montrent que l'inhibition de Drosha est responsable en partie du biais dans la taille des protéines modifiées, indépendamment de l'établissement du phénotype CoGAM.

Nous avons ensuite voulu identifier les protéines induites par l'inhibition de Drosha dans les cellules MCF-7, ces protéines étant des cibles potentielles des miRNAs. Afin de s'affranchir de l'effet indirect que pourrait avoir le phénotype CoGAM, nous avons identifié les protéines dérégulées dans les cellules MCF-7 shDro complémentées avec miR-20a (inhibition de Drosha sans CoGAM) par rapport aux MCF-7 surexprimant miR-20a, grâce à une analyse en spectrométrie de masse des spots modifiés. Toutes les protéines qui ont été identifiées ont un poids moléculaire théorique cohérent avec celui des spots modifiés, confirmant que le biais de taille n'était pas dû, dans ces conditions, à une protéolyse des protéines de haut poids moléculaire. Une analyse GO (« Gene Ontology ») des protéines identifiées nous a indiqué que parmi les 35 processus biologiques significativement enrichis, 7 concernent la réponse cellulaire au stress, dont 6 spécifiquement liés au stress oxydatif. La réponse à l'inhibition de Drosha présente donc des caractéristiques de réponse à un stress oxydatif. Or, les seuls biais de taille dans la réponse protéomique portés à notre connaissance concernaient ceux induits par différents stress chez la levure, notamment le stress oxydatif (Vilaprinyo et al., 2010) (communication personnelle de Jean Labarre, voir Figures 4A et 4B). Nous nous sommes donc demandé si, dans les cellules MCF-7, le traitement au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), générant un stress oxydatif, pouvait entrainer de la même manière que chez la levure un biais dans la taille des protéines modifiées. Nous avons pour cela analysé les résultats d'une étude précédente mesurant les modifications du transcriptome de cellules MCF-7 traitées à l'H_2O_2 (Desaint et al., 2004). Nous avons utilisé la taille prédite des protéines correspondant aux transcrits modifiés pour montrer que le traitement à l'H_2O_2 des cellules MCF-7 entrainait également un biais dans la taille des protéines modifiées. Ces résultats suggèrent qu'il existe un lien entre l'inhibition globale de la voie miRNA, le stress oxydatif et un biais de taille dans les modifications protéomiques induites.

Impairing the micro-RNA pathway induces proteome modifications characterized by size bias and enrichment in anti-oxidant proteins.

Delphine Peric[1], Jean Labarre[2], François Chevalier[3,*], and Germain Rousselet[1,*]

[1]CEA, DSV, iRCM, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, Fontenay aux Roses, France

[2]CEA, DSV, iBiTec-S, Laboratoire de Biologie Intégrative, Gif sur Yvette, France

[3]CEA, DSV, iRCM, Plateforme de Protéomique, Fontenay aux Roses, France

*: these 2 authors contributed equally to this work

Send correspondence to Germain Rousselet, Laboratoire de Génétique de la Radiosensibilité, iRCM, CEA, 18 route du panorama, 92260 Fontenay aux Roses, France; e-mail: germain.rousselet@cea.fr; phone: (33) 1 46 54 70 41; fax: (33) 1 46 54 87 34; or François Chevalier, Plateforme de Protéomique, iRCM, CEA, 18 route du panorama, 92260 Fontenay aux Roses, France; e-mail: francois.chevalier@cea.fr; phone: (33) 1 46 54 83 26; fax: (33) 1 46 54 89 55.

Abbreviations: CoGAM: Colony Growth Arrest induced by Microprocessor inhibition

Keywords: Drosha, microprocessor, proteostasis, stress

Total number of words: 4995

ABSTRACT

Perturbation of individual micro-RNAs, or of the micro-RNA pathway, plays a role in carcinogenesis. In certain cancer cells, inhibition of the micro-RNA pathway leads to a growth arrest state (CoGAM for Colony Growth Arrest induced by Microprocessor inhibition), which can be rescued by re-expression of individual micro-RNAs such as miR-20a. We now report that the proteome of cells undergoing CoGAM is characterized by massively size-biased modifications, with induction of small proteins and inhibition of large ones. This atypical pattern of proteome modification is in part due to the growth arrest itself. However, a size bias in differentially expressed proteins is also observed upon microprocessor inhibition in CoGAM resistant cells, and upon microprocessor inhibition in CoGAM sensitive cells rescued by miR-20a. In this case, GO analysis of induced proteins identified by mass spectrometry revealed a significant enrichment in proteins involved in resistance to oxidative stress. In addition, H_2O_2 treatment of CoGAM sensitive cells led to similarly size-biased proteome modifications. Our results point to size bias as a relevant readout of proteome modifications, in particular in conditions of stress such as CoGAM or oxidative stress. They also suggest research avenues to study the role of the micro-RNA pathway in proteostasis.

1 Introduction

Micro-RNAs are a family of ~22 nucleotide RNAs controlling genome expression by inhibiting translation and/or inducing degradation of specific target mRNAs [reviewed in 1]. These small RNAs are encoded in the genome, either in dedicated polymerase II transcription units, or in the introns of protein coding genes. Their biogenesis requires 2 distinct steps [2]. In the nucleus, the microprocessor, a complex composed of the RNase III Drosha and its RNA binding partner DGCR8, excises a stem-loop RNA (pre-miRNA) from the primary transcript (pri-miRNA). After export to the cytoplasm, the loop is removed by the RNase III Dicer, and the mature miRNA is loaded onto a functional RISC complex (RNA-Induced Silencing Complex). Target mRNAs are then recognized by hybridization of the micro-RNA component of the RISC, leading to decrease of the encoded protein, generally accompanied by mRNA degradation [3].

It is now established that micro-RNAs participate in multiple biological functions, in particular in relation to cell differentiation and proliferation [4]. In addition, deregulation of micro-RNAs has been observed in tumor tissues and cells [5], and oncogenic [6] or tumor suppressive [7, 8] properties have been assigned to specific micro-RNAs. Therefore, functional studies in the context of transformed cells are of primary importance to identify cancer-related micro-RNAs, as well as the pathways they control. However, the micro-RNA pathway is endowed with redundancy, at both structural and functional levels. As a consequence, inhibition of single micro-RNAs is often phenotypically silent [9], which hampers classical reverse genetics approaches.

As an alternative, we have developed a molecular genetics approach combining a specific inhibition of the micro-RNA pathway at large, by inhibiting the microprocessor, and a complementation of the observed phenotypes by re-expression of individual microprocessor-independent pre-miRNAs [10]. We have used this approach to identify cancer cell lines whose proliferation depends on the microprocessor, describing a new phenotype of colony growth

arrest that we have called CoGAM. This phenotype was observed only in certain cell lines, where it is characterized by a long term growth arrest with an increase of the fraction of cells in G0/G1 in the absence of senescence. In CoGAM resistant cells, microprocessor inhibition led to an increase of the transformed phenotype, as already established in other tumor models [11]. CoGAM could be complemented by re-expression of individual micro-RNAs, such as miR-20a, showing that it involved micro-RNA-controlled biological pathways.

CoGAM is a cellular state that cannot be easily ascribed to already known situations, such as senescence, checkpoint activation, or apoptosis. In this report, we present the proteomic characterization of CoGAM, highlighting a size bias in differentially expressed proteins.

2 Materials and methods

2.1 Cell cultures and treatments

MCF-7 (breast carcinoma) and HCT116 (colon carcinoma) cells were grown and transfected as previously described [10]. Cells were selected for at least 14 days before analysis.

2.2 Total protein extraction

Cells were scraped in phosphate buffered saline (PBS), washed 3 times in PBS, and dissolved in proteomic sample buffer (9 M urea, 4% CHAPS, 0.05% Triton-X100, 65 mM DTT and protease inhibitors (cOmplete, Roche, Meylan, France)). After centrifugation at 68000 rpm for 60 min, supernatants were collected, aliquoted, and stored at −20 °C until use. Protein content was estimated using the Bradford method [12].

2.3 Two-dimensional electrophoresis

2-DE was performed as previously described [13] with three technical replicates. Briefly, precast 18 cm strips, pH range 3-10 NL (GE Healthcare, Velizy, France), were rehydrated in the presence of 100 µg of protein. Isoelectric focusing was carried out using a Protean IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) isoelectric focusing system until 80 KV h-1. The strips were then incubated in ES1 (50 mM Tris–HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS) with 130 mM DTT and then in ES1 supplemented with 130 mM iodoacetamide. Strips were then embedded using 1% low-melt agarose on top of acrylamide gels. SDS-PAGE was carried out on a 12% acrylamide gel, using the Dodeca Cell electrophoresis unit (Bio-Rad). Gels were batch-stained with silver nitrate [14] with a Dodeca stainer unit (Bio-Rad) and scanned to images which were digitized with a GS 800 densitometer (Bio-Rad).

2.4 Image analysis

Images from stained gels were digitalized at 300 dpi with a GS 710 densitometer (Biorad) and analysed using the Samespots software v4.1 (Non-linear Dynamics, UK). Gel replicates were grouped to create a global analysis with all conditions. A multivariate statistic analysis was

performed using the statistic mode of the Samespots software v4.1. Spots were considered differentially expressed at $p < 0.05$ (Anova t-test).

2.5 MALDI-TOF MS analysis

Spots were excised from preparative 2-DE gels, and processed using a Packard Multiprobe II robot (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). After washing successively with water, 25 mM ammonium bicarbonate, acetonitrile / 25 mM ammonium bicarbonate (1:1, v/v), and acetonitrile, gel fragments were dried at 37°C. Protein digestion was carried out at 37°C for 5 hours following addition of 0.125 µg trypsin (sequencing grade, modified, Promega, Charbonières, France), and resulting fragments were extracted twice with 50 µL acetonitrile / water (1:1, v/v) containing 0.1 % trifluoroacetic acid for 15 min. Pooled supernatants were concentrated with a speedvac to a final volume of 20 µL. Peptides were simultaneously desalted and concentrated with C18 Zip-Tip micro-columns to a final volume of 3 µL, an aliquot of each sample was mixed (1/1) with the alpha-cyano-4- hydroxycinnamic acid matrix at half saturation in acetonitrile/water (1:1, v/v) and the mixture was immediately spotted on the MALDI target by the Multiprobe II robot. Mass spectra were recorded in the reflector mode on a UltraFlex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Automatic annotation of monoisotopic masses was performed using Bruker's SNAPTM procedure. The MASCOT search engine software (Matrix Science, London, UK) was used to search the NCBInr database. The following parameters were used: mass tolerance of 30 to 100 ppm, a minimum of five peptides matching to the protein, carbamidomethylation of cysteine as fixed modification, oxidation of methionine as variable modifications, and one missed cleavage allowed.

2.6 Nano LC MS analysis

When spots could not be identified by PMF, LC-MS/MS analysis was conducted. Stained protein spots were excised manually, washed, digested with trypsin and extracted using formic acid. Protein digests were analysed using an ion trap mass spectrometer (Esquire HCT plus; Bruker, Billerica, MA, USA) coupled to a nano-chromatography system (HPLC 1200, Agilent, Santa Clara,

CA, USA) interfaced with an HPLC-Chip system (Chip Cube, Agilent). MS/MS data were searched against NCBI and MSDB databases using Mascot software.

3 Results

3.1 Proteome changes during CoGAM

In order to identify protein expression changes upon CoGAM induction, we transfected the CoGAM-sensitive MCF-7 breast cancer cells with a vector coding or not for a Drosha-targeting shRNA, selected transfected cells in the presence of puromycin for 14-21 days, and extracted total proteins as described in Materials and Methods. Whole cell extracts were separated by 2-DE and protein spots were revealed by silver staining. Experiments were performed at least in triplicate and all gel pictures were compared within the same plan. The 3-10 pI range allowed the detection of 1332 spots observed at least in one sample. A representative 2-DE gel is presented for each sample (Figure 1A and B). We identified 171 spots (12.8 %) as being significantly modified by Drosha inhibition, including 85 decreased (outlined in blue in Fig. 1A) and 86 increased (outlined in red in Fig. 1B).

3.2 A shift in protein size

We noticed that decreased proteins appeared larger than increased ones (Fig. 1). Analysis of the fold change as a function of protein size confirmed this observation (Fig. 1C and D). Induced proteins had a mean size of 27.5 ± 6.0 kDa (mean ± S.D.), whereas the mean size of repressed proteins was 87.4 ± 25.7 kDa. This difference was significant ($p < 10^{-48}$), and specific for the protein size, as induced and repressed proteins had not significantly different pIs (6.2 ± 1.3 vs 6.3 ± 1.2, $p > 0.67$) (Fig. 1E and F). We suspected that this size bias could be due to non-specific proteolysis during CoGAM, to which large proteins could be more sensitive. Such a non-specific degradation of proteins should also preferentially target highly expressed proteins. However, this was not the case ($p > 0.95$; Fig. 1G and H). In addition, non-specific proteolysis should indiscriminately decrease the bulk of large proteins. Again, this was not the case. Among the proteins with a size over 60 kDa, only 85 out of 535 (15.9 %) were decreased. Although these observations do not exclude the possibility that at least part of the decrease of large proteins could be due to CoGAM-induced proteases, they reveal some kind of specificity in this potential

mechanism (see also section 3.4). Altogether, these results demonstrate a correlation between CoGAM and a strongly size-biased modification of the proteome.

3.3 Protein size shift is multifactorial

Two clues suggested that the protein size shift described above could be an indirect consequence of the inhibition of the micro-RNA pathway in CoGAM sensitive cells : (i) as micro-RNAs are inhibitors of protein expression, micro-RNA inhibition should lead mainly to protein induction, whereas 2-DE revealed equivalent numbers of induced and repressed spots (86 *vs* 85, see above); (ii) CoGAM is a long-term growth arrest that might by itself induce modifications of the proteome. To assess the role of CoGAM in protein size shift, we took advantage of the fact that over-expression of miR-20a was able to rescue the growth of Drosha^{kd} MCF-7 cells [10]. By itself, over-expression of miR-20a modified the expression of a small number of 2-DE spots (5 induced and 8 repressed; Fig. 2A). In addition, the mean sizes of the induced and repressed spots were not significantly different (53.0 ± 14.8 kDa *vs* 42.2 ± 18.8, respectively; $p = 0.3$) (Fig. 2B). Therefore, comparing the proteome of Drosha^{kd}-miR-20a cells to the proteome of Drosha^{kd} cells should mainly reveal the consequences of CoGAM in the context of a similar microprocessor inhibition (for a rationale of 2-DE comparisons, see Fig. 5A). Figure 2C shows that rescuing CoGAM with miR-20a was accompanied with a reversion of the protein size shift observed in Drosha^{kd} cells. The mean molecular weight of the 54 spots increased upon CoGAM rescuing was 75.2 ± 29.3 kDa, whereas that of the 83 decreased spots was 26.2 ± 6.0 kDa ($p < 10^{-29}$) (Fig. 2D). Therefore, we concluded that at least part of the protein size shift induced by Drosha inhibition in MCF-7 cells is an indirect consequence of CoGAM.

We then wanted to unveil the proteome consequences of Drosha inhibition that were independent of CoGAM. To do this, we analyzed the proteomic consequences of Drosha knockdown in MCF-7 cells over-expressing the CoGAM-complementing miR-20a (Dro^{kd}-miR-20a *vs* miR-20a in Fig. 3). We detected only 31 spots that were modified (Fig. 3A), a majority of them being increased (23 *vs* 8 decreased). Size analysis (Fig. 3B) revealed that Drosha inhibition in the

absence of CoGAM also led to size-biased modifications of the proteome. Induced spots had a mean size of 30.6 ± 7.9 kDa, whereas decreased ones had a mean size of 91.2 ± 24.5 kDa ($p < 10^{-10}$). In addition, we compared the proteomes of Drosha^{kd} and control HCT116 cells, because these cells do not undergo CoGAM upon microprocessor inhibition [10]. Size analysis of differentially expressed spots again revealed a size bias (Fig. 3 C and D), with a mean size of 44.9 ± 12.3 kDa for induced proteins *vs* 65.0 ± 25.7 kDa for repressed ones ($p < 5.10^{-2}$). Altogether, these data demonstrate that Drosha inhibition induced size biased modifications of the proteome that are in part independent from the establishment of CoGAM.

3.4 A link between micro-RNAs, protein size shift and stress response

To our knowledge, the only reported protein size shift reported in the literature has been suggested in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in response to several types of environmental stresses [15]. In this study, H_2O_2 treatment appeared to be the stress condition causing the most important bias. However, these data were based on transcriptome experiments, from which protein sizes were computed. We therefore re-examined our previous proteome analysis of the yeast response to H_2O_2 [16], probing for a potential size shift. Indeed, upon H_2O_2 treatment, proteins with fold changes higher than 3 had an average MW of 42.6 ± 24.0 kDa (n = 31), compared to an average of 65.9 ± 28.6 kDa (n = 16) for the most repressed proteins (Fig 4A and B; $p < 10^{-2}$).

We therefore wondered whether the size-biased response that we observed upon Drosha inhibition could be interpreted as a stress response. To answer this question, we identified by mass spectrometry the spots that were induced by Drosha knockdown in the presence of miR-20a (Dro^{kd}-miR-20a *vs* miR-20a; Supplementary Table 1). All the identified proteins had theoretical MWs that were consistent with the observed size of the original spots. This result showed that increased proteins were not proteolytic fragments from large degraded proteins, demonstrating that, in this setting, the size-biased proteome modification was not due to proteolysis. Strikingly, out of 18 proteins, 3 were known to be involved in the cellular response

to an oxidative stress by scavenging reactive oxygen species (2 thioredoxin-dependent peroxidases PRDX1 and PRDX3 [17], and the biliverdin reductase BLVRB [18]), one by reducing NADP+ to NADPH (the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase IDH1 [19]), and one as a molecular chaperone (the heat shock protein HSP27 [20]). The statistical significance of this enrichment was tested by performing a GO analysis using DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/). Indeed, among the 35 Biological Processes GO terms found to be significantly enriched ($p < 0.05$), 7 concerned the cellular response to stress (with enrichment folds going from 3.72 for "response to stress" to 92.26 for "hydrogen peroxide catabolic process"), among which 6 related specifically to oxidative stress (Supplementary Table 2). The second highly represented biological process was apoptosis inhibition (7 GO terms with enrichment folds going from 4.81 for "regulation of cell death" to 11.42 for "anti-apoptosis"). Therefore, the proteome response to Drosha inhibition has characteristics of a cellular response to oxidative stress.

Reciprocally, we wondered whether the response of a mammalian cell to oxidative stress also involved a size bias in differentially expressed proteins. We therefore analyzed the results of micro-array experiments that we performed after H_2O_2 treatment of MCF-7 cells [21]. For genes identified as being induced or repressed more than 2 fold, we retrieved predicted protein sizes from Uniprot (http://www.uniprot.org/), using the reference isoform when a gene coded for more than one protein. The mean protein size of induced genes was 59.7 ± 49.2 kDa (n = 143), and 81.9 ± 80.2 kDa for repressed genes (n = 67) (Fig. 4C and D). This size bias was statistically significant ($p < 2.10^{-2}$). We conclude that the mammalian cell response to an oxidative stress also involved a size bias in regulated proteins.

4 Discussion

In this manuscript, we report that impairment of the micro-RNA pathway, obtained by knocking down the microprocessor RNase Drosha, resulted in a proteome modification characterized by a size bias in differentially expressed proteins. Repressed proteins were found to have a significantly higher mean molecular weight than induced proteins. This seldom described phenotype was reproducible in MCF-7 cells undergoing CoGAM, in MCF-7 cells rescued for CoGAM, and in the CoGAM-resistant HCT116 cells. In addition, Such a size bias was also observed in *S. cerevisiae* or MCF-7 cells submitted to an oxidative stress. Reciprocally, proteins induced by the inhibition of Drosha included enzymes involved in reactive oxygen species detoxification and chaperones, leading to a significant enrichment of proteins annotated as participating in the cell response to an oxidative stress.

During the last decade, the sequencing of genomes from several species, including Homo sapiens, paved the way for global *in silico* analyses of protein length. Significant size differences were reported to correlate with different types of protein classification. Morbid genes, i.e. genes whose mutations adversely affect health, code for proteins that are on average longer than other proteins [22]. Conversely, housekeeping genes have been reported to code for short proteins [23]. More generally, mean protein sizes are different in functional classes of proteins characterized in the COG (Clusters of Orthologous Groups) database [24], or when *S. cerevisiae* proteins are grouped according to their biochemical activity [25]. On the other hand, the size of proteins impacts the cost of their biosynthesis, which constitutes the major energy consuming process of a cell [26]. Balch and collaborators [27] have proposed that the maintenance of a functional proteome (proteostasis) is a *bona fide* cellular system integrating signals from environmental and intrinsic clues through specialized signaling pathways. This proteostasis network might control protein size, at least as an indirect consequence of energy saving or functional reorientation of the proteome. Indeed, Vilaprinyo *et al.* [15] have shown that the proteostasis network response to certain stresses in *S cerevisiae* was characterized by a size-biased modification of protein expression, similar to the one we report herein, and that they

attributed to a minimization of biosynthetic costs. Our data confirm that, in different experimental settings, the size of regulated proteins is a readout of modifications of the proteostasis network.

The mechanism leading from Drosha inhibition to size-biased modifications of the proteome has to be explored. We report that in CoGAM-sensitive cells, this mechanism is in part indirect, because complementing CoGAM without re-expressing Drosha is sufficient to revert part of the size bias. However, in CoGAM-resistant or CoGAM-complemented cells, Drosha inhibition still induced size-biased proteome modifications. In these settings, one possibility would be that micro-RNAs preferentially target mRNAs coding for small proteins. Another possibility would be that impairing the micro-RNA pathway affects the proteostasis network, either because major regulatory proteins of this network are micro-RNA targets, or because metabolic changes induced by microprocessor inhibition are sensed by proteostasis regulating pathways.

In this regard, the link between Drosha inhibition, size-biased proteome modifications and oxidative stress, is puzzling. On the one hand, in *S cerevisiae*, oxidative stress induces a response marked by a size bias in differentially expressed proteins [this manuscript and 15]. Whether this corresponds to a minimization of biosynthetic costs [15], or to the fact that anti-oxidant proteins are smaller than average [25], is not clear. Our results extend this observation to a mammalian cell line, suggesting that such a size-biased proteome modification is a general feature of the response to an oxidative stress. On the other hand, proteins induced by Drosha inhibition are enriched for known effectors of an anti-oxidative response. Therefore, it would be tempting to hypothesize that Drosha inhibition induces an oxidative stress, which in turn induces a size-biased proteome modification. Conversely, it is intriguing that Dicer, the pre-miRNA maturing RNase III, is transcriptionally inhibited by H_2O_2 in several mammalian cells [21]. Furthermore, DGCR8, the RNA binding partner of Drosha, is a double-cysteine-ligated heme dependent protein [28], that might thus be sensitive to oxidation. Therefore, we cannot exclude that in mammalian cells, an oxidative stress could induce a global inhibition of the micro-RNA pathway. These 2

possibilities, and their possible integration in a double positive feedback loop (see Fig. 5B), are under investigation.

In conclusion, our data suggest that size biases in proteome changes should be more systematically analyzed, because they could bring information on the biology of the studied cells in general, and on their proteostasis network and regulatory pathways in particular.

Acknowledgements

We thank J. Depagne for expert technical assistance, and acknowledge the support of the Proteomic Platform of Montpellier-LR Genopole. This work was supported by the Electricité de France grant n° V3-104 to G.R.

The authors declare no conflict of interest.

References

[1] Bartel, D. P., MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009, *136*, 215-233.

[2] Kim, V. N., Han, J., Siomi, M. C., Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, *10*, 126-139.

[3] Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., Bartel, D. P., Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010, *466*, 835-840.

[4] Ivey, K. N., Srivastava, D., MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell* 2010, *7*, 36-41.

[5] Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J. *et al.*, MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005, *435*, 834-838.

[6] He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D. *et al.*, A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005, *435*, 828-833.

[7] Mayr, C., Hemann, M. T., Bartel, D. P., Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 2007, *315*, 1576-1579.

[8] Welch, C., Chen, Y., Stallings, R. L., MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2007, *26*, 5017-5022.

[9] Wang, Y., Baskerville, S., Shenoy, A., Babiarz, J. E., Baehner, L. *et al.*, Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 2008, *40*, 1478-1483.

[10] Peric, D., Chvalova, K., Rousselet, G., Identification of microprocessor-dependent cancer cells allows screening for growth-sustaining micro-RNAs. *Oncogene* 2011, in press.

[11] Kumar, M. S., Lu, J., Mercer, K. L., Golub, T. R., Jacks, T., Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007, *39*, 673-677.

[12] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, *72*, 248-254.

[13] Chevalier, F., Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics. *Proteome Sci* 2010, *8*, 23.

[14] Chevalier, F., Centeno, D., Rofidal, V., Tauzin, M., Martin, O. *et al.*, Different impact of staining procedures using visible stains and fluorescent dyes for large-scale investigation of proteomes by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Proteome Res* 2006, *5*, 512-520.

[15] Vilaprinyo, E., Alves, R., Sorribas, A., Minimization of biosynthetic costs in adaptive gene expression responses of yeast to environmental changes. *PLoS Comput Biol* 2010, *6*, e1000674.

[16] Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S. *et al.*, The H2O2 stimulon in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* 1998, *273*, 22480-22489.

[17] Hall, A., Karplus, P. A., Poole, L. B., Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *FEBS J* 2009, *276*, 2469-2477.

[18] Baranano, D. E., Rao, M., Ferris, C. D., Snyder, S. H., Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, *99*, 16093-16098.

[19] Reitman, Z. J., Yan, H., Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2010, *102*, 932-941.

[20] Arrigo, A. P., Virot, S., Chaufour, S., Firdaus, W., Kretz-Remy, C. *et al.*, Hsp27 consolidates intracellular redox homeostasis by upholding glutathione in its reduced form and by decreasing iron intracellular levels. *Antioxid Redox Signal* 2005, *7*, 414-422.

[21] Desaint, S., Luriau, S., Aude, J. C., Rousselet, G., Toledano, M. B., Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H2O2. *J Biol Chem* 2004, *279*, 31157-31163.

[22] Kondrashov, F. A., Ogurtsov, A. Y., Kondrashov, A. S., Bioinformatical assay of human gene morbidity. *Nucleic Acids Res* 2004, *32*, 1731-1737.

[23] Eisenberg, E., Levanon, E. Y., Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 2003, *19*, 362-365.

[24] Brocchieri, L., Karlin, S., Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes. *Nucleic Acids Res* 2005, *33*, 3390-3400.

[25] Warringer, J., Blomberg, A., Evolutionary constraints on yeast protein size. *BMC Evol Biol* 2006, *6*, 61.

[26] Russell, J. B., Cook, G. M., Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol Rev* 1995, *59*, 48-62.

[27] Roth, D. M., Balch, W. E., Modeling general proteostasis: proteome balance in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2011, *23*, 126-134.

[28] Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J. A., Guo, F., Heme is involved in microRNA processing. *Nat Struct Mol Biol* 2007, *14*, 23-29.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1: Proteome changes during CoGAM

Whole cell extracts from MCF-7 cells transfected with **(A)** an empty vector or **(B)** a vector coding for a Drosha-targeting shRNA were analyzed by 2-DE. One representative gel out of 3 is shown. Differentially expressed spots were delineated either in blue (repressed in Drosha^{kd} cells) or in red (induced in Drosha^{kd} cells). The Log_2 of the fold change (Log FC) of differentially expressed spots between Drosha^{kd} and control MCF-7 cells were individually analyzed as a function of **(C)** molecular weight, **(E)** isoelectric point, and **(G)** level of expression in control cells. Results were also edited as mean ± S.D. of induced or repressed spots for **(D)** molecular weight, **(F)** isoelectric point, and **(H)** level of expression in control cells. * : $p < 10^{-48}$.

Figure 2: The size-biased proteome modification is in part due to CoGAM

(A) Whole cell extracts were prepared from MCF-7 cells over-expressing miR-20a, and analyzed by 2-DE. Spots that were significantly increased or decreased when compared to control cells are outlined in red or blue, respectively. **(B)** Size bias in miR-20a induced proteome modifications was analyzed by comparing the mean ± S.D. of the molecular weights of induced and repressed spots identified in (A). **(C)** Whole cell extracts were prepared from MCF-7 cells co-transfected with both a Drosha-targeting shRNA and miR-20a (microprocessor inhibition without CoGAM), and analyzed by 2-DE. Spots that were significantly increased or decreased when compared to cells transfected with only a Drosha-targeting shRNA (microprocessor inhibition with CoGAM) are outlined in red or blue, respectively. **(D)** CoGAM-dependent size bias in proteome modification was analyzed by comparing the mean ± S.D of the molecular weights of induced and repressed spots identified in (C). * : $p < 10^{-29}$.

Figure 3: Drosha inhibition induces a size-biased proteome modification in the absence of CoGAM

(A) Whole cell extracts were prepared from MCF-7 cells over-expressing both a Drosha-targeting shRNA and miR-20a (microprocessor inhibition without CoGAM), and analyzed by 2-DE. Numbered spots were significantly increased (circled) or decreased (non circled) when compared to cells expressing miR-20a without Drosha inhibition, and were identified by mass spectrometry (Supplementary Table I). **(B)** A CoGAM independent size bias in proteome modifications induced by Drosha knockdown was assayed by comparing the mean ± S.D. of the molecular weights of repressed and induced spots identified in (A). **(C)** Whole cell extracts were prepared from HCT116 cells transfected with a plasmid expressing or not a Drosha targeting shRNA, and compared by 2-DE. The Log2 of the fold changes of differentially expressed spots (Log FC) was plotted as a function of the molecular weight of the spots. **(D)** Mean ± S.D. of the molecular weights of induced or repressed spots identified in (C). * : $p < 3.10^{-2}$; ** : $p < 2.10^{-11}$.

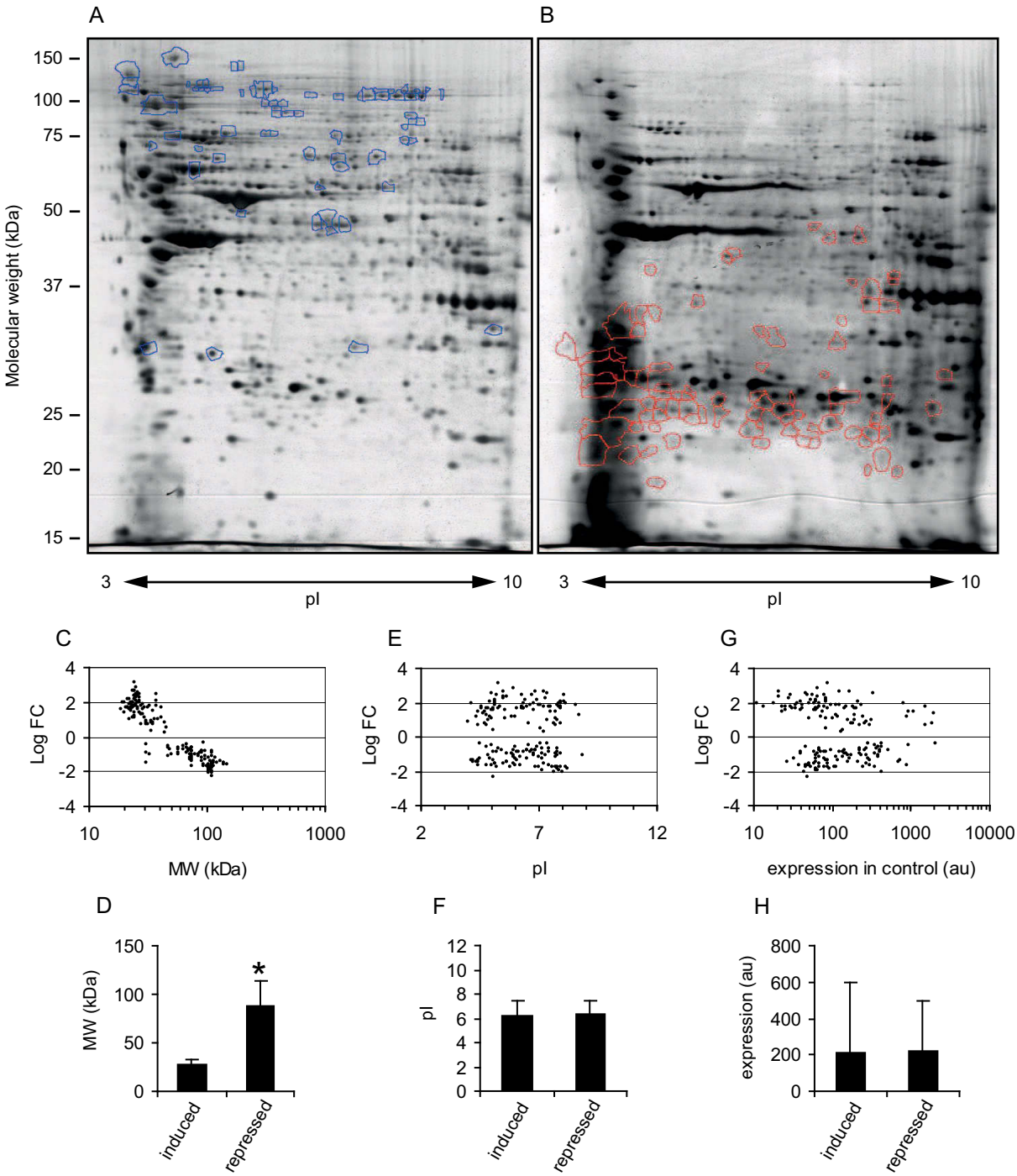
Figure 4: H_2O_2 induces size-biased proteome modifications in *S. cerevisiae* and MCF-7 cells

(A) Proteomic data from *S. cerevisiae* cells treated with 400 µLM H_2O_2 were retrieved from [16] and plotted as the Log_2 of the fold change (Log FC) as a function of the observed molecular weight for spots with Log FC > 1.6 or Log FC < -1.6. **(B)** The same data as in (A) were analyzed by comparing the mean ± S.E.M. of the molecular weights of repressed and induced protein. **(C)** The theoretical molecular weight of proteins whose mRNAs were found to be differentially expressed more than 2 fold after a 100 µM H_2O_2 treatment of MCF-7 cells [21] was retrieved from Uniprot. The Log_2 of the fold change (Log FC) was plotted as a function of this molecular weight. **(D)** The data shown in (C) were analyzed by comparing the mean ± S.E.M. of the molecular weights of repressed and induced protein. * : $p < 2.10^{-2}$.

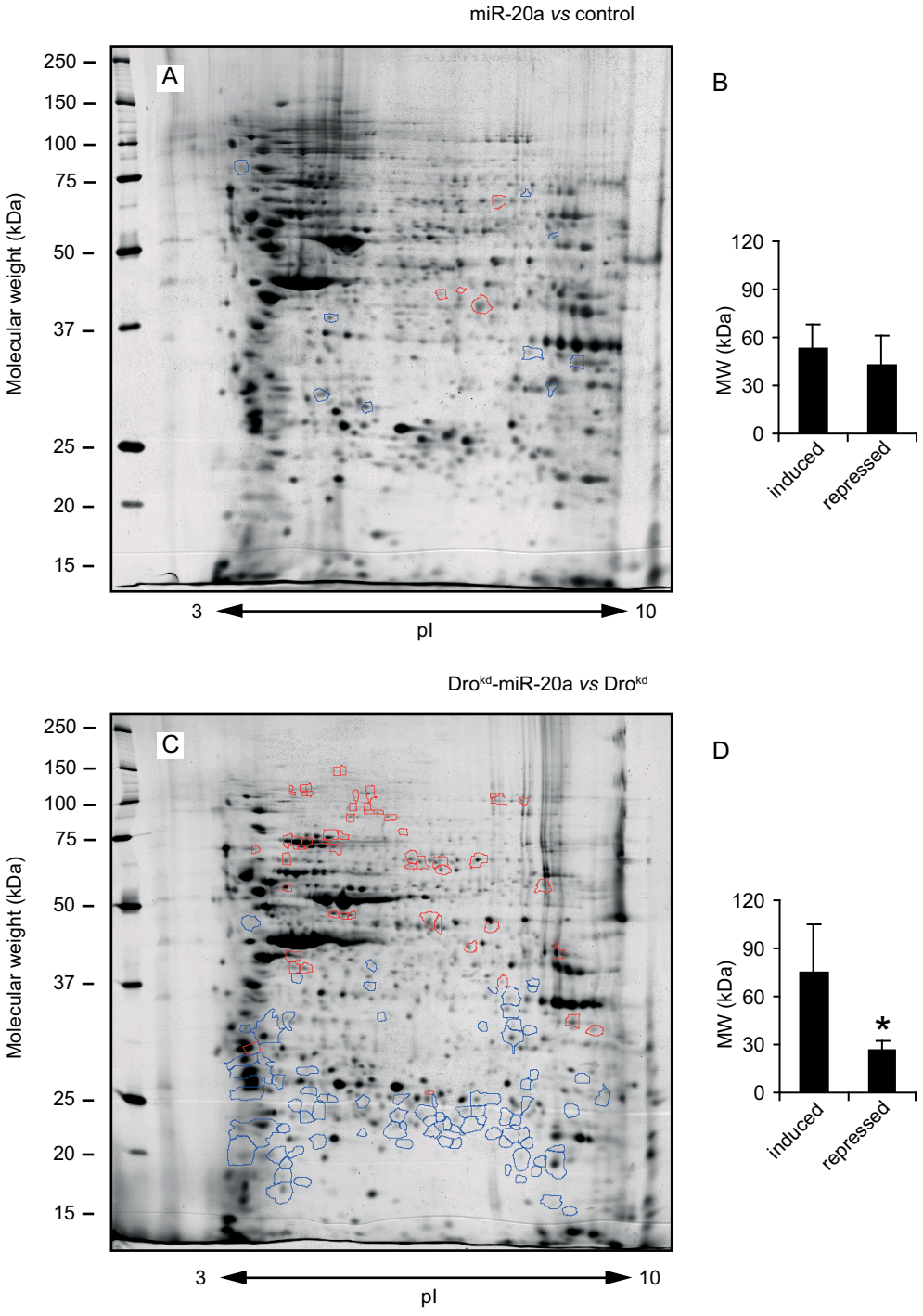
Figure 5: Experimental layout and deduced working model

(A) The different 2-DE comparisons performed are presented as a function of background cell line and conditions compared. The figures in which results are shown are indicated in the column "Fig". The difference in phenotype with regard to microprocessor inhibition (low miRNA) and CoGAM induction (CoGAM) is indicated for each experiment. **(B)** A schematic view of the working model. Solid arrows represent conclusions from 2-DE comparisons performed as depicted in (A), whereas dotted arrows are hypothetical.

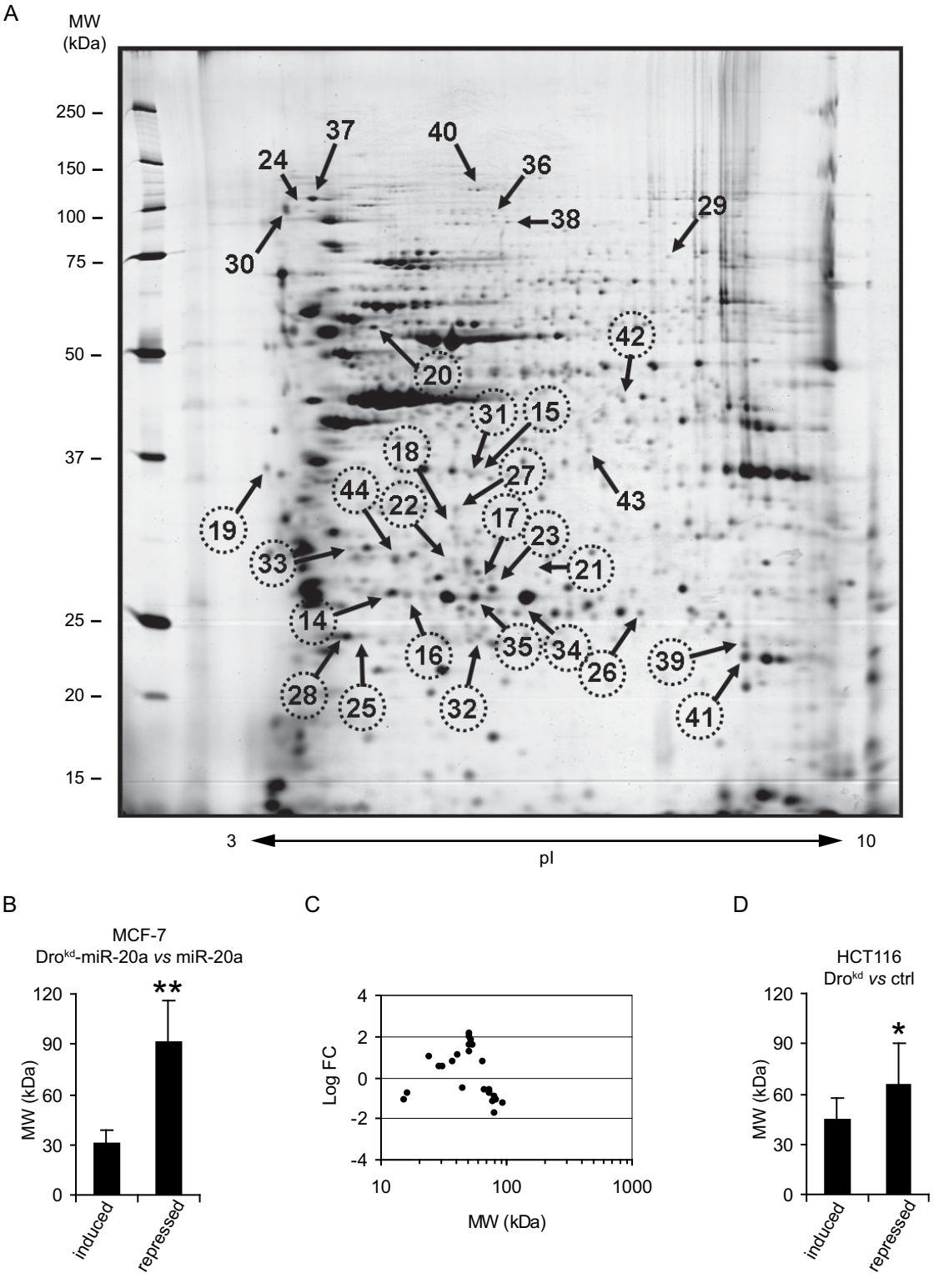
Peric et al., Figure 1



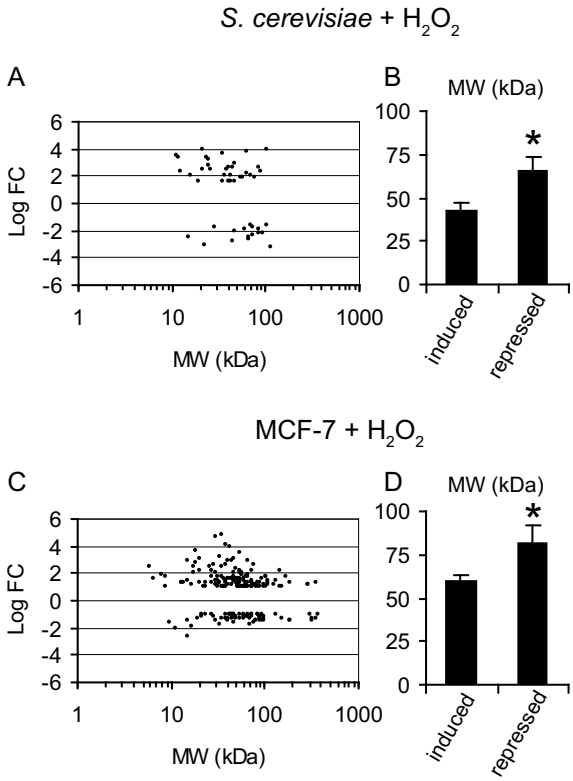
Peric et al., Figure 2



Peric et al., Figure 3



Peric et al., Figure 4

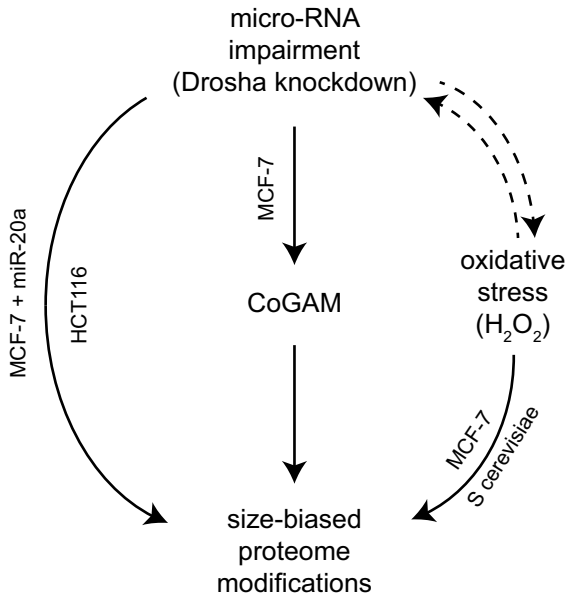


Peric et al., Figure 5

A

Experiment		Fig	Comparative Phenotype	
cell	comparison		low miRNA	CoGAM
MCF-7	Dro^{kd} *vs* CT	1	+	+
	Dro^{kd}+miR-20a *vs* Dro^{kd}	2	-	+
	Dro^{kd}+miR-20a *vs* miR-20a	3	+	-
	H_2O_2	4	?	-
HCT116	Dro^{kd} *vs* CT	3	+	-
yeast	H_2O_2	4	-	-

B



Supplementary Table 1: Mass spectrometry identification of differentially expressed spots in ctrl/miR-20a and miR-20a/Dro^{kd}-miR-20a comparisons

Spot n°	method	Protein name	N°/ accession	Fold	Anova (p)	comparison	Over-expressed	Score	Matching peptides	% coverage	Theoric pI	Observed pI	Theoric MW	Observed MW
2	MALDI-MS	78 kDa glucose-regulated protein	P11021	1,9	0,020	Ctr / Mir20	Ctr	198	16	28	5,01	3,73	70,4	81
3	MALDI-MS	Extracellular signal-related kinase 1c	Q8NHX0	1,8	0,016	Ctr / Mir20	Mir20	115	9	23	5,8	6,79	38,2	43
4	MALDI-MS	Proteasome activator complex subunit 2	Q9UL46	1,8	0,013	Ctr / Mir20	Ctr	151	10	47	5,54	5,1	27,4	31
5	LC-MS	hnRNP A2/B1	P22626	1,7	0,001	Ctr / Mir20	Ctr	217	6	23	8,97	8,32	37	34
6	MALDI-MS	Septin-2	Q15019	1,6	0,001	Ctr / Mir20	Mir20	144	8	31	6,15	6,58	41,5	43
8	MALDI-MS	Proteasome activator complex subunit 1	Q06323	1,6	0,036	Ctr / Mir20	Ctr	137	12	53	5,78	5,71	28,7	29
9	MALDI-MS	TGF-beta receptor interacting protein 1	Q13347	1,6	0,035	Ctr / Mir20	Ctr	173	12	57	5,38	5,24	36,5	39
10	MALDI-MS	Lamin-A/C	P02545	1,5	0,007	Ctr / Mir20	Mir20	166	14	26	6,44	7,23	72,2	67
11	MALDI-MS	Annexin A2	P07355	1,4	0,037	Ctr / Mir20	Ctr	164	13	44	7,56	7,63	38,5	35
12	LC-MS	Annexin XI	P50995	1,4	0,029	Ctr / Mir20	Ctr	614	15	25	7,53	7,91	54	55
13	MALDI-MS	Poly(rC)-binding protein 1	Q15365	1,3	0,000	Ctr / Mir20	Mir20	119	9	37	6,7	7	38	41
14	MALDI-MS	Heat shock protein beta-1	P04792	2,4	0,008	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	98	6	46	6	4,89	22,8	28
16	LC-MS	HSP 27	P04792	2,2	0,013	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	494	12	48	5,98	5,05	22,8	28
17	LC-MS	PA28alpha	Q06323	2,1	0,032	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	674	16	39	5,78	5,76	28,7	29
18	MALDI-MS	F-actin-capping protein subunit beta	P47756	2,0	0,037	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	103	8	29	5,36	5,49	31,3	32
19	LC-MS	Proteolysis inducing factor	Q53YJ2	1,9	0,009	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	132	2	22	6,01	3,29	11,3	37
20	LC-MS	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	Q5XJ04	1,8	0,009	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	776	16	18	5,16	4,62	57,3	58
21	LC-MS	40S ribosomal protein S4	P62701	1,8	0,007	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	422	11	27	10,2	6,13	29,5	29
22	MALDI-MS	Cathepsin D heavy chain	P07339	1,8	0,015	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	89	6	29	5,56	5,63	26,6	30
23	MALDI-MS	Endoplasmic reticulum resident protein 29	P30040	1,8	0,002	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	99	9	52	6,1	5,84	25,9	28
24	LC-MS	Tumor rejection antigen 1	Q5CAQ5	1,8	0,005	Mir20 / Dro-Mir20	Mir20	911	19	25	4,77	3,69	92,3	99
26	LC-MS	Triosephosphate isomerase	P60174	1,7	0,005	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	763	13	31	6,51	7,06	26,5	27
27	LC-MS	Annexin A3	P12429	1,7	0,012	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	832	16	45	5,63	5,53	36,2	34
28	MALDI-MS	Catechol O-methyltransferase	P21964	1,7	0,036	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	127	7	46	5,26	4,38	30	25
30	MALDI-MS	Glucosidase 2 subunit beta	P14314	1,6	0,003	Mir20 / Dro-Mir20	Mir20	90	9	21	4,33	3,54	57,8	98
31	MALDI-MS	Pyridoxal kinase	O00764	1,6	0,026	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	128	8	30	5,75	5,65	35,1	36
32	MALDI-MS	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	P30048	1,6	0,023	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	84	5	38	5,77	5,74	21,5	25
33	LC-MS	Cathepsin D	P07339	1,6	0,045	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	539	11	22	5,6	4,46	37,9	30
34	LC-MS	HSP 27	P04792	1,6	0,007	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	636	15	55	5,98	6,11	22,8	26
35	MALDI-MS	Enoyl-CoA hydratase	P30084	1,5	0,007	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	122	9	42	5,88	5,68	28,3	28

36	MALDI-MS	Mitofilin	Q16891	1,5	0,016	Mir20 / Dro-Mir20	Mir20	102	8	36	6,08	5,97	83,7	90
37	MALDI-MS	Tumor rejection antigen 1	Q5CAQ5	1,5	0,044	Mir20 / Dro-Mir20	Mir20	106	10	21	4,77	3,91	92,3	104
38	MALDI-MS	Mitofilin	Q16891	1,5	0,013	Mir20 / Dro-Mir20	Mir20	123	10	20	6,08	6,05	83,7	88
39	LC-MS	Flavin reductase	P30043	1,4	0,039	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	547	10	38	7,31	8,01	22	21
40	MALDI-MS	Alpha-glucosidase 2	Q14697	1,4	0,002	Mir20 / Dro-Mir20	Mir20	224	18	28	5,58	5,8	103	109
41	LC-MS	Peroxiredoxin-1	Q06830	1,4	0,019	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	707	16	52	8,27	8,02	22,1	20
42	MALDI-MS	Isocitrate dehydrogenase	O75874	1,4	0,010	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	122	10	28	6,53	6,94	46,7	44
43	MALDI-MS	Poly(rC)-binding protein 1	Q15365	1,3	0,010	Mir20 / Dro-Mir20	Mir20	113	10	47	6,7	6,76	38	41
44	MALDI-MS	Cathepsin D heavy chain	P07339	1,6	0,050	Mir20 / Dro-Mir20	Dro-Mir20	85	7	20	5,56	4,92	26,6	30

Peric et al., Supplementary Table 2

GO Term	P Value	Enrichment
GO:0009056~catabolic process	0,00004	5,63
GO:0044248~cellular catabolic process	0,00011	6,13
GO:0006950~response to stress	0,00224	3,72
GO:0042221~response to chemical stimulus	0,00284	4,29
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	0,00819	8,86
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	0,00851	8,74
GO:0060548~negative regulation of cell death	0,00858	8,71
GO:0010033~response to organic substance	0,00943	5,44
GO:0048523~negative regulation of cellular process	0,01028	3,31
GO:0044237~cellular metabolic process	0,01335	1,65
GO:0042981~regulation of apoptosis	0,01370	4,88
GO:0043067~regulation of programmed cell death	0,01417	4,83
GO:0006732~coenzyme metabolic process	0,01427	15,38
GO:0010941~regulation of cell death	0,01435	4,81
GO:0048519~negative regulation of biological process	0,01559	3,03
GO:0006979~response to oxidative stress	0,01627	14,35
GO:0019725~cellular homeostasis	0,01722	6,73
GO:0006739~NADP metabolic process	0,01911	98,03
GO:0042744~hydrogen peroxide catabolic process	0,02029	92,26
GO:0070301~cellular response to hydrogen peroxide	0,02147	87,14
GO:0051186~cofactor metabolic process	0,02253	12,06
GO:0006916~anti-apoptosis	0,02496	11,42
GO:0065008~regulation of biological quality	0,02581	3,20
GO:0042743~hydrogen peroxide metabolic process	0,02970	62,74
GO:0006081~cellular aldehyde metabolic process	0,03321	56,02
GO:0034614~cellular response to reactive oxygen species	0,03554	52,28
GO:0050896~response to stimulus	0,03847	2,02
GO:0055114~oxidation reduction	0,03910	4,91
GO:0006769~nicotinamide metabolic process	0,04712	39,21
GO:0046496~nicotinamide nucleotide metabolic process	0,04712	39,21
GO:0009987~cellular process	0,04713	1,26
GO:0051092~positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	0,04827	38,25
GO:0009820~alkaloid metabolic process	0,04827	38,25
GO:0019362~pyridine nucleotide metabolic process	0,04942	37,34
GO:0032787~monocarboxylic acid metabolic process	0,04993	7,82

Supplementary Table 2: significant GO terms enrichment in proteins induced by Drosha knockdown. The list of proteins induced by Drosha knockdown in the absence of CoGAM was established by mass spectrometry of spots found to be induced in whole cell extracts from MCF-7 cells transfected with both a Drosha-targeting shRNA and miR-20a vs MCF-7 cells transfected with miR-20a. GO term enrichment was computed with the DAVID web server (http://david.abcc.ncifcrf.gov/). Only GO terms with a statistically significant enrichment ($p < 5.10\text{-}2$) are shown. GO terms from the stress response family have a green background, whereas those from the apoptosis inhibition family have a yellow background.

DISCUSSION

I. Approche de génétique moléculaire de la voie micro-ARN

Afin d'aborder la problématique du rôle des miRNAs dans la biologie des cellules tumorales, nous avons choisi d'utiliser une approche de génétique moléculaire de la voie miRNA. Cette approche est basée sur une inhibition globale de la voie en ciblant le microprocesseur et une complémentation phénotypique par l'expression de miRNAs individuels. L'intérêt d'une telle approche pour l'étude fonctionnelle des miRNAs réside essentiellement dans le fait qu'elle permet de s'affranchir de leur redondance structurale et fonctionnelle. Cette approche nous a permis d'identifier des cellules tumorales dans lesquelles l'inhibition de la voie miRNA entraine un arrêt de la prolifération. L'approche de complémentation nous a permis d'identifier des miRNAs capables de restaurer individuellement la prolifération de ces cellules.

Pendant la période de ce travail de thèse, l'équipe de Robert Blelloch a publié une étude basée sur une approche similaire dans les cellules ES de souris dont le gène de DGCR8 a été inactivé (Wang et al., 2008d). Dans une étude préalable, son équipe avait montré que l'inhibition de la voie miRNA par l'inactivation génique de DGCR8 entrainait un défaut de différentiation et un ralentissement de la prolifération des cellules ES (Wang et al., 2007). L'équipe de Blelloch a alors développé un crible permettant d'identifier des miRNAs individuels capables de complémenter le défaut de prolifération des cellules ES déficientes pour l'expression de DGCR8 ($DGCR8^{-/-}$) (Wang et al., 2008d). Ce crible leur a permis d'identifier une série de miRNAs partageant la même séquence noyau, dont plusieurs spécifiques des cellules souches (familles miR-290 et miR-302), capables de complémenter individuellement le défaut de prolifération des cellules ES déficientes pour DGCR8. Cette étude a également montré que la surexpression de ces miRNAs individuels n'avait pas d'effet sur la prolifération des cellules ES sauvages, indiquant que, dans ce contexte, les miRNAs nécessaires à la prolifération sont déjà présents à un niveau saturant. De même, l'inhibition de ces miRNAs individuels par des anti-miRs dans les cellules ES sauvages n'a montré qu'un effet très subtil sur la prolifération, confirmant la redondance de la famille de miRNAs identifiés. Dans notre modèle de cellules dépendantes de la voie miRNA, nous avons également testé l'inhibition de miRNAs individuels avec des anti-miRs sans obtenir d'effet significatif sur la prolifération (données personnelles non publiées), confirmant la redondance des miRNAs et l'intérêt d'utiliser une stratégie d'inhibition globale.

D'autres approches de cribles fonctionnels ont été utilisées sans à priori sur les miRNAs d'intérêt, pour identifier des miRNAs permettant l'acquisition d'une caractéristique que ne possède pas la cellule étudiée. Notamment, dans le contexte tumoral, on peut citer l'étude de l'équipe d'Agami, décrite dans l'introduction, qui a recherché des miRNAs favorisant la transformation en permettant d'inhiber la sénescence induite par l'expression de l'oncogène H-Ras^{V12} (Voorhoeve et al., 2007). En transduisant une banque de vecteurs rétroviraux exprimant différents miRNAs avec un vecteur exprimant l'oncogène H-Ras^{V12} dans des fibroblastes immortalisés, cette étude a identifié miR-372 et miR-373 comme favorisant la tumorigenèse en inhibant la sénescence induite par cet oncogène. Une autre approche de crible fonctionnel a été utilisée pour identifier des miRNAs permettant à des cellules tumorales de cancer du sein hormono-dépendantes (ER+) de devenir hormono-indépendantes (forme plus agressive) (Sachdeva et al., 2011). Pour cela, les auteurs ont transduit les cellules MCF-7, dépendantes aux œstrogènes, avec un mélange de vecteurs lentiviraux permettant chacun l'expression d'un pre-miRNA et les ont injectées dans la glande mammaire de souris immunodéficientes. Les cellules contrôles ne peuvent pas développer de tumeurs sans traitement des souris au 17β-œstradiol. Ainsi, les tumeurs formées en absence de traitement au 17β-œstradiol, à partir des cellules transduites avec le mélange de miRNAs, ont été récupérées et les miRNAs provenant du vecteur lentiviral et ayant donc favorisé la prolifération hormono-indépendante ont été identifiés. Cette approche a permis aux auteurs d'identifier et de valider ensuite *in vitro* miR-101 comme un miRNA permettant la prolifération indépendante des œstrogènes. L'intérêt de ces approches est l'aspect fonctionnel de l'identification des miRNAs pour lesquels des cibles potentiellement impliquées dans le phénotype sont recherchées dans un deuxième temps. Puisque chaque miRNA possède plusieurs protéines cibles, le phénotype induit par son expression peut être lié à l'inhibition de plusieurs cibles et plusieurs voies. Ces approches semblent donc plus pertinentes d'un point de vue fonctionnel que la démarche inverse consistant à rechercher quels miRNAs régulent une cible en particulier.

A la différence des approches citées ci-dessus, qui permettent d'étudier l'acquisition d'une caractéristique que ne possède pas la cellule, l'inhibition globale associée à un crible de complémentation par des miRNAs individuels permet d'identifier un phénotype lié à la dépendance à des miRNAs endogènes, puis d'identifier des miRNAs individuels capables de complémenter ce phénotype. A notre connaissance, cette approche n'a été utilisée que dans nos travaux sur les cellules tumorales et dans ceux de l'équipe de Blelloch sur les cellules ES. L'intérêt majeur du phénotype que nous avons obtenu, à savoir un arrêt total de la prolifération, avec une absence de colonies macroscopiques, est qu'il nous a permis de mettre en place un crible positif facile de complémentation, consistant en la présence ou non de colonies

macroscopiques. Pourtant, nous pensons que cette approche est un outil qui pourrait s'appliquer à l'étude d'autres processus biologiques régulés par des miRNAs en s'intéressant à d'autres phénotypes induits par l'inhibition du microprocesseur dans différents types cellulaires.

II. Réponse à l'inhibition du microprocesseur dépendante du contexte cellulaire et phénotype CoGAM

II.1 La réponse à l'inhibition du microprocesseur dépend du contexte cellulaire

Nos travaux ont permis d'identifier des cellules cancéreuses dépendantes de la voie miRNA. Dans ces cellules, l'inhibition du microprocesseur conduit à un arrêt de la prolifération des colonies que nous avons appelé CoGAM (« Colony Growth Arrest induced by Microprocessor inhibition »). Ce phénotype se caractérise par un arrêt de la prolifération cellulaire après quelques divisions des cellules transfectées et sélectionnées à faible densité, donnant lieu à des petits clones d'une dizaine de cellules incapables de former des colonies macroscopiques. Ce phénotype ne semble s'apparenter à aucun mécanisme connu. Nous avons montré que les cellules n'étaient pas sénescentes. De plus, elles peuvent être maintenues dans cet état d'arrêt cellulaire, avec des cellules adhérentes visibles, jusqu'à environ un mois en culture sans reprise de la prolifération ni mort cellulaire, ce qui semble peu compatible avec l'activation d'un point de contrôle du cycle cellulaire sur une aussi longue période, les cellules subissant généralement une adaptation avec reprise du cycle cellulaire au bout d'un certain temps (Syljuasen, 2007). Nous ne pouvons formellement exclure que les cellules soient entrées dans un état quiescent même si plusieurs évidences vont à l'encontre de cette hypothèse. Tout d'abord, l'analyse du cycle cellulaire dans ces cellules a montré que, malgré une augmentation significative des cellules en G0/G1 du cycle cellulaire, une quantité non négligeable des cellules arrêtées étaient en phases S et G2/M. De plus, la privation en sérum des cellules MCF-7 ne les empêche pas de proliférer (données personnelles), confirmant la difficulté de faire entrer en quiescence ces cellules tumorales.

Le fait que l'inhibition du microprocesseur entraine un arrêt de la prolifération dans des cellules tumorales n'a jusqu'à présent jamais été décrit. Au contraire, la diminution globale des miRNAs et l'inhibition de la voie miRNA ont été associées à une augmentation de la tumorigenèse dans les cellules transformées (Lu et al., 2005; Kumar et al., 2007; Kumar et al., 2009; Melo et al., 2009; Lambertz et al., 2010; Melo et al., 2010). Toutefois, les liens entre inhibition globale de la voie miRNA et augmentation de la tumorigenèse ne sont pas encore très clairs. En effet, une majorité de miRNAs est diminuée dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux, et il a été proposé que cela puisse refléter un état de dé-différentiation des tumeurs (Lu et al., 2005), la

diminution des miRNAs constituant dans ce cas plus un marqueur de dé-différentiation qu'une cause de la tumorigenèse. On sait en effet que de nombreux miRNAs interviennent dans les processus de différentiation, et que les miRNAs supportant la prolifération, notamment dans les cellules souches, sont beaucoup moins nombreux. L'approche réciproque, consistant à inhiber de manière globale la voie miRNA et ayant conduit à une augmentation de la tumorigenèse dans certains modèles tumoraux, passe vraisemblablement par l'inhibition de miRNAs suppresseurs de tumeurs dans les modèles utilisés. Kumar et al. ont par exemple montré que, dans leur modèle de tumeurs du poumon induites par K-Ras^{G12D}, l'augmentation de tumorigenèse pourrait être liée en partie à la diminution de l'expression de miRNAs de la famille let-7, inhibiteurs des oncogènes K-ras et c-myc (Kumar et al., 2007). La diminution globale des miRNAs n'est donc pas incompatible avec une diminution d'une majorité de miRNAs intervenant dans la différentiation, plutôt suppresseurs de tumeurs, et une augmentation de certains miRNAs individuels jouant un rôle oncogénique en soutenant la prolifération ou la survie dans certaines cellules tumorales.

Notre approche a permis de montrer que, parmi toutes les lignées cellulaires tumorales testées, les 3 lignées dépendantes du microprocesseur sont des lignées de cancer du sein de type luminal (MCF-7, T47-D et ZR-75-1) (Neve et al., 2006; Kao et al., 2009), tandis que 2 lignées de cancer du sein de type basal continuent de proliférer après inhibition du microprocesseur. Bien qu'il ne s'agisse que d'une corrélation à ce stade, ce résultat confirme que la réponse à l'inhibition du microprocesseur est spécifique du contexte cellulaire. Notons que nous avons testé un nombre limité de lignées cellulaires et qu'il est très probable que d'autres types tumoraux puissent dépendre de la même manière de la voie miRNA. Le fait que la réponse à l'inhibition de la voie miRNA dépende du type cellulaire tumoral est cohérent avec (i) l'existence de profils d'expression des miRNAs très spécifiques du tissu et du type tumoral, (ii) des voies de prolifération et/ou de survie activées ou mutées également très spécifiques de chaque type tumoral, et (iii) l'existence de miRNAs suppresseurs de tumeurs et de miRNAs oncogènes (oncomiRs), dont les rôles dépendent également du type et du contexte cellulaire, comme cela a été décrit dans l'introduction. Nos résultats montrent donc que, dans les cellules de cancer du sein de type luminal, certains miRNAs seraient impliqués dans le contrôle de voies importantes pour la prolifération ou la capacité des cellules à cloner. Notre découverte de plusieurs miRNAs individuels capables de complémenter le phénotype CoGAM dans les cellules MCF-7 a constitué un point de départ à la recherche de ces voies de signalisation importantes dans les cellules dépendantes du microprocesseur. Nous avons pour cela recherché des cibles des miRNAs identifiés, potentiellement impliquées dans le phénotype CoGAM. Nous avons montré que l'inhibition de la voie p53/p21 n'avait pas d'effet sur la mise en place du phénotype CoGAM. En revanche, nous avons montré que l'inhibition concomitante de PTEN avec celle du

microprocesseur permettait de restaurer partiellement la prolifération des cellules dépendantes du microprocesseur, ce qui suggère un rôle de la voie PI3K/Akt dans la biologie de ces cellules tumorales. Or, les lignées considérées sont précisément mutées dans la voie PI3K/Akt (Hollestelle et al., 2007), ce qui suggère que cette voie est en effet importante dans la tumorigenèse de ces cellules. Les lignées MCF-7 et T47-D possèdent une mutation activatrice de PIK3CA. La lignée ZR-75-1 possède en revanche une mutation d'un allèle de PTEN et une délétion de l'autre allèle, mais exprime tout de même une faible quantité de la protéine PTEN mutée (Weng et al., 1999; Hlobilkova et al., 2000). Il n'est pas établi si cette version de PTEN est fonctionnelle. Ce point soulève donc la question de l'implication directe de PTEN dans le phénotype CoGAM. Etant donné que nous avons déterminé l'implication de PTEN dans la lignée MCF-7, il n'est pas exclu que, dans les cellules ZR-75-1, le phénotype CoGAM passe également par une inhibition de la voie PI3K/Akt indépendamment de PTEN. Une autre hypothèse est que la faible quantité de PTEN muté qui s'exprime dans les ZR-75-1 soit fonctionnelle. Auquel cas, la dé-répression de PTEN par l'inhibition des miRNAs pourrait également intervenir dans le phénotype CoGAM dans les ZR-75-1. Par ailleurs, il faut noter qu'un rôle de PTEN indépendant de son activité phosphatase des lipides (nécessaire à l'activation de la voie PI3K/Akt) mais dépendant de son activité phosphatase des protéines a été décrit dans l'arrêt du cycle cellulaire induit dans les cellules MCF-7 (Hlobilkova et al., 2000; Weng et al., 2001). Weng et al. ont montré que l'activité phosphatase des protéines de PTEN était suffisante pour inhiber l'expression de la cycline D1 dans les MCF-7 (Weng et al., 2001), ce qui n'est pas le cas dans des lignées cellulaires de glioblastome déficientes pour PTEN, où seule la version sauvage de PTEN, possédant l'activité phosphatase des lipides, a permis d'inhiber la cycline D1 (Radu et al., 2003). Ainsi, si l'activation de la voie PI3K/Akt semble l'hypothèse la plus vraisemblable dans la complémentation de CoGAM obtenue par l'inhibition de PTEN dans les MCF-7, on ne peut exclure des effets dépendants de PTEN mais indépendants de cette voie.

Récemment, une étude a décrit l'effet de l'inhibition de la voie miRNA sur le potentiel invasif de lignées de cancers du sein (Noh et al., 2011). En inhibant Drosha, DGCR8 ou Dicer par des shRNA produits à partir de lentivirus, les auteurs ont montré que des lignées métastatiques de type basal, comme MDA-MB-231, présentaient une augmentation de leur potentiel invasif *in vitro*, tandis que le potentiel invasif les lignées de type luminal MCF-7 et T47-D n'était pas augmenté. L'étude a montré que cette différence passait par l'augmentation de l'expression de la protéine uPA (« urokinase-type plasminogen activator ») suite à l'inhibition des miRNAs dans les lignées invasives, qui expriment déjà de base cette protéine impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire et donc l'invasion. Les résultats de cette étude montrent donc une différence fonctionnelle de réponse à l'inhibition du microprocesseur concernant un autre processus,

l'invasion, dans ces deux types de lignées de cancers du sein. Si les auteurs ne mentionnent pas d'effet sur la prolifération ou la capacité à cloner des lignées non invasives, c'est peut-être parce qu'ils n'ont pas analysé ces phénomènes. En effet, avec le système inductible pour l'inhibition de Drosha que nous avons mis en place, nos résultats préliminaires suggèrent qu'il faille passer par une dilution clonale des cellules pour visualiser une diminution de la capacité des cellules à former des colonies. Une autre possibilité concerne l'aspect quantitatif de l'inhibition. En effet, il semble que l'inhibition de Drosha et DGCR8 soit moins efficace dans cette étude qu'entre nos mains avec les vecteurs épisomaux. Ce dernier point soulève la possibilité que les différences de réponse à l'inhibition du microprocesseur obtenues en fonction des lignées cellulaires que nous avons étudié puissent être liées en partie à des différences dans l'efficacité de l'inhibition du microprocesseur.

II.2 Potentielle implication d'une composante quantitative dans la réponse à l'inhibition du microprocesseur

Des résultats provenant de plusieurs études montrent en effet que des différences quantitatives de l'inhibition de Dicer en particulier entrainent des effets différents. Dans l'étude de Martello et al. (voir *Introduction II.2.3. Conséquences fonctionnelles sur la tumorigenèse et la progression tumorale*), l'inhibition modérée de Dicer par siRNA (environ 50%) augmente la capacité de migration des cellules MDA-MB-231, tandis qu'une inhibition plus forte par des doses plus élevées de siRNA affecte la viabilité cellulaire et inhibe au contraire la migration (Martello et al., 2010). De même, dans les études décrivant Dicer comme un suppresseur de tumeur haploinsuffisant, la délétion d'un allèle de Dicer accélère la formation des tumeurs mais la délétion totale de Dicer est au contraire délétère à la tumorigenèse (Kumar et al., 2009; Lambertz et al., 2010). Arrate et al. ont montré que la délétion hétérozygote de Dicer n'augmentait pas la lymphomagenèse induite par c-myc mais ont confirmé que la délétion homozygote de Dicer inhibait la formation des lymphomes et entrainait la mort cellulaire de clones cellulaires issus de lymphomes Eμ-myc établis (Arrate et al., 2010). Il convient ici de repréciser que Dicer a été impliqué dans d'autres processus que la maturation des miRNAs, comme la formation et le maintien de l'hétérochromatine, le maintien de l'hyperméthylation des promoteurs dans des cellules cancéreuses ou encore la maturation d'endo-siRNAs (Fukagawa et al., 2004; Kanellopoulou et al., 2005; Babiarz et al., 2008; Tam et al., 2008; Ting et al., 2008; Watanabe et al., 2008). Même si la présence d'endo-siRNAs a pour l'instant été décrite uniquement dans les oocytes et les cellules ES, il n'est pas exclu qu'ils puissent exister et jouer un rôle dans les tissus somatiques. Ainsi, en plus de l'inhibition des miRNAs, la délétion totale de Dicer peut donc avoir d'autres conséquences affectant la viabilité cellulaire. De plus, les miRNAs sont essentiels à la différentiation (Chen et al., 2004; Wu and Belasco, 2005; Wang et al., 2007;

Rybak et al., 2008; Tay et al., 2008; Xu et al., 2009; Rosa and Brivanlou, 2011). Ainsi dans le modèle de Lambertz et al., la délétion totale de Dicer dans les progéniteurs de la rétine au stade embryonnaire a en fait un effet délétère sur le développement de la rétine, entrainant sa dégénérescence, comme cela avait déjà été montré (Damiani et al., 2008). Nous savons que le phénotype CoGAM est obtenu avec un seuil minimum d'inhibition du microprocesseur. En effet, des shRNA moins efficaces à l'encontre de Drosha n'ont pas entrainé l'arrêt de prolifération des colonies dans les cellules dépendantes du microprocesseur (données personnelles non publiées). Nous savons donc qu'une inhibition efficace du microprocesseur est nécessaire à l'observation du phénotype. On peut se demander si cette forte inhibition peut entrainer un phénotype non spécifique associé à une toxicité de la perte de la voie miRNA. Les résultats de plusieurs études montrent que différents types de cellules peuvent survivre et proliférer sans miRNAs. Les délétions de DGCR8 ou Drosha sont létales au stade embryonnaire post-implantatoire, ce qui est cohérent avec le rôle clé que jouent les miRNAs dans les processus de différentiation (Wang et al., 2007; Chong et al., 2010). En revanche, les cellules ES de souris délétées pour le gène DGCR8 présentent essentiellement un défaut de différentiation et un ralentissement de la prolifération, pour autant les cellules sont viables et ne présentent pas un arrêt total de la prolifération (Wang et al., 2007). Dans les oocytes de souris, la délétion de Dicer entraine des défauts sévères de la maturation tandis que la délétion de DGCR8 n'a pas d'effet sur la maturation ni sur le développement de l'embryon précoce, indiquant un rôle majeur des endo-siRNAs dans l'oocyte mais pas des miRNAs. Par ailleurs, bien qu'entrainant des perturbations fonctionnelles des cellules, des inactivations totales de la voie miRNA ont été réalisées dans des tissus adultes somatiques sans que cela n'entraine une toxicité directe ou un arrêt de la prolifération cellulaire (Lynn et al., 2007; Chong et al., 2008; Cuellar et al., 2008; Hand et al., 2009; Konopka et al., 2010). De plus, nous avons montré que les cellules MCF-7 inhibées à la fois pour Drosha et pour PTEN prolifèrent. Même si la prolifération n'est pas équivalente aux cellules contrôles, ce résultat confirme que l'arrêt de prolifération que nous observons dépend du contexte et qu'il ne constitue pas une réponse non spécifique à un effet toxique de l'inhibition de Drosha. Une comparaison précise des degrés d'inhibition entre les lignées dépendantes du microprocesseur et les autres lignées n'a été possible que dans les cellules dont le défaut de prolifération était complémenté, et ce à cause de la difficulté de quantifier les inhibitions de Drosha et DGCR8 dans les cellules arrêtées. Ainsi, dans les cellules inhibées pour DGCR8 endogène avec shDG mais dont la prolifération est restaurée par l'expression d'une version de DGCR8 résistante à shDG, nous avons mesuré une inhibition similaire de la protéine DGCR8 endogène dans les cellules MDA-MB-231 et MCF-7.

Pour autant, il est possible qu'une meilleure inhibition de la voie miRNA ait lieu dans les cellules arrêtées. En effet, puisque les niveaux d'inhibition n'ont pu être mesurés avec précision que dans les cellules complémentées pour la prolifération, on peut se demander si l'arrêt cellulaire lui-même peut avoir un effet sur la diminution des miRNAs dans les cellules dépendantes du microprocesseur. Récemment, l'équipe de V. Narry Kim a publié un travail montrant que lorsque les cellules, notamment des MCF-7, sont ensemencées à faible densité ou perdent l'adhésion entre elles par le traitement à la trypsine, la dégradation d'un certain nombre de miRNAs matures est spécifiquement accélérée par rapport aux cellules ensemencées à plus haute densité, et le retour au niveau d'origine après détachement par la tryspine et ré-ensemencement est accéléré par le retour du contact cellulaire (Kim et al., 2011). Ce résultat fait écho à une précédente étude qui a montré une augmentation d'une majorité de miRNAs dans différentes lignées cellulaires cultivées à confluence par rapport aux cellules non confluentes (Hwang et al., 2009). Cette étude a montré que le contact cellulaire était responsable de cette augmentation, et qu'elle impliquait des processus post-transcriptionnels, dont une amélioration de la maturation des miRNAs par le microprocesseur, mais aussi des étapes post-maturation. Il est possible d'imaginer que dans cette étude, une partie de la différence quantitative de l'expression des miRNAs observée provienne également d'une accélération de la dégradation dans les cellules non confluentes. Quoi qu'il en soit, ces études suggèrent que la diminution de contact cellulaire est associée à une diminution des miRNAs. Puisque le phénotype CoGAM semble spécifique à une dilution clonale des cellules, il est tout à fait possible que, dans les cellules dépendantes du microprocesseur, l'absence de contact cellulaire, associée à l'inhibition de Drosha ou DGCR8, accentue la diminution des miRNAs et participe ainsi au phénotype observé.

On notera ici que si la voie de biogenèse des miRNAs est désormais assez bien décrite, peu de choses sont connues sur la stabilité et la dégradation de ces petits ARNs. Récemment, une équipe a étudié la stabilité des miRNAs en mesurant leur vitesse de dégradation après délétion génétique inductible de Dicer dans des cellules MEFs immortalisées (Gantier et al., 2011). Si les auteurs mesurent de grandes différences inter-miRNAs, ils montrent par une modélisation mathématique s'affranchissant de la perte des miRNAs par la division cellulaire que, dans une cellule qui ne se diviserait pas, la demi-vie moyenne d'un miRNA serait de 5 jours, soit dix fois plus qu'un ARNm. Cette étude confirme l'idée que les miRNAs sont généralement très stables, même s'il existe des cas particuliers, par exemple dans le cerveau, où une dégradation très rapide de certains miRNAs particuliers peut avoir lieu (Sethi and Lukiw, 2009; Krol et al., 2010). Le système inductible que nous avons développé serait un bon outil permettant de suivre l'élimination des miRNAs après blocage de la maturation par Drosha. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus vont dans le sens des résultats publiés puisque, malgré une inhibition

très efficace de Drosha au bout de 3 jours, il nous a fallu attendre 7 jours pour visualiser la diminution des miRNAs matures. De plus, cet outil d'inhibition inductible de Drosha nous permettrait d'étudier l'impact de la dilution ou de la perte de contact cellulaire sur l'élimination des miRNAs et de regarder si ce phénomène peut avoir un rôle dans le phénotype d'arrêt de prolifération des colonies.

II.3 Autres composantes pouvant intervenir dans le phénotype CoGAM

Bien que le microprocesseur semble jusqu'à présent spécifique de la voie canonique de maturation des miRNAs, on peut se demander si le phénotype CoGAM est bien une conséquence directe de l'inhibition des miRNAs. Une équipe a proposé que Drosha intervienne dans la maturation de certains ARNr (Wu et al., 2000; Liang and Crooke, 2011). Cependant, le phénotype CoGAM est commun à l'inhibition de Drosha ou DGCR8, ce qui indique que le phénotype est spécifique de l'inhibition du microprocesseur. De plus, nos résultats, ainsi que ceux d'autres équipes (Wang et al., 2007; Chong et al., 2008), indiquent que l'inhibition du microprocesseur n'a pas d'effet sur la production des ARNr. Par ailleurs, un mécanisme d'auto-régulation de DGCR8 par le microprocesseur a été mis en évidence (Han et al., 2009; Kadener et al., 2009; Triboulet et al., 2009), démontrant que Drosha est capable de cliver d'autres substrats que des pri-miRNAs. Le fait que Drosha puisse cliver l'ARNm de DGCR8 suggère qu'elle puisse cliver d'autres ARNs présentant des structures de type tige-boucle. Cependant, une analyse comparative poussée de profils d'expression de cellules ES de souris sauvages avec des cellules ES déficientes pour DGCR8 ou déficientes pour Dicer, complétée par des prédictions de structures tige-boucle et des données de séquençage à haut débit, n'a pas pu mettre en évidence d'autres ARNm régulés directement par le microprocesseur, et suggère donc que cette régulation soit spécifique à l'ARNm de DGCR8 (Shenoy and Blelloch, 2009). Au contraire, une autre étude a montré que des ARNm autres que celui de DGCR8 étaient induits dans des thymocytes de stade précoce déficients pour Drosha mais n'étaient pas affectés par la déficience pour Dicer (Chong et al., 2010). Ces ARNm ayant des structures tige-boucle conservées prédites, les auteurs suggèrent une régulation directe grâce au clivage de ces structures par Drosha. La réalité et l'importance de ce type de régulation négative par clivage direct des ARNm par Drosha est donc encore sujette à controverse. Par conséquent, nous ne pouvons formellement exclure que l'inhibition du microprocesseur ne modifie pas l'expression d'autres ARNs que celle des miRNAs.

Par ailleurs, une analyse protéomique nous a permis de montrer que le phénotype CoGAM était caractérisé par un biais de taille massif dans les protéines modifiées. Nous avons montré que le biais de taille était en partie dépendant de l'inhibition du microprocesseur et en partie

dépendant du phénotype CoGAM lui-même. Nos résultats et ceux publiés chez la levure indiquent que le biais dans la taille des protéines modifiées semble être caractéristique d'une réponse à différentes formes de stress, comme le stress oxydatif (Vilaprinyo et al., 2010). La diminution de la production de grandes protéines au profit des plus petites peut représenter une forme d'économie de l'énergie de la cellule en conditions de stress. L'inhibition globale des miRNAs pourrait constituer une forme de stress cellulaire. En effet, il est possible qu'une inhibition globale des miRNAs conduise à une augmentation générale de la traduction. Or, la traduction et le repliement des protéines nécessitent de l'énergie fournie principalement par la chaîne respiratoire. La production importante d'ATP par la chaine respiratoire est génératrice de ROS (espèces oxygénées réactives) et donc de stress oxydatif. Il est donc possible que, dans certaines cellules, l'inhibition globale de la voie miRNA conduise à un stress, en l'occurrence une augmentation de la traduction que la cellule ne réussirait pas à gérer, responsable du biais de taille observé et éventuellement également de l'arrêt du cycle cellulaire. Cette hypothèse semble toutefois peu cohérente avec la possibilité de complémenter le phénotype d'arrêt de prolifération et le biais de taille en ré-introduisant un seul miRNA. Si toutefois un miRNA suffisait à complémenter ce stress indirectement lié à l'inhibition de la voie miRNA, cela devrait se faire indépendamment de la séquence. Or, seuls certains miRNAs sont capables de complémenter le phénotype CoGAM. Cependant, si l'induction majeure de la traduction est responsable du stress en question, on ne peut pas exclure que seule l'expression de certains miRNAs fonctionnels dans les cellules dépendantes du microprocesseur, conduisant à l'inhibition de la traduction de nombreuses cibles, et donc à une diminution de la traduction, suffise indirectement à supprimer le stress et à permettre que les cellules prolifèrent. Afin d'exclure que le phénotype CoGAM puisse constituer en partie une réponse au stress lié à une induction majeure de la traduction, il serait intéressant de tester si le traitement concomitant avec un inhibiteur de la traduction des cellules MCF-7 inhibées pour l'expression du microprocesseur inhibe le phénotype CoGAM.

Par ailleurs, le concept de ceRNAs (« competitive endogenous RNAs » = RNAs endogènes compétiteurs pour les miRNAs) a été proposé par l'équipe de Pier Paolo Pandolfi, qui a montré qu'un pseudogène de PTEN pouvait réguler l'expression de ce dernier en étant en compétition avec les mêmes miRNAs (Poliseno et al., 2010b; Salmena et al., 2011). Récemment, l'équipe de Pandolfi a renforcé ce concept en mettant au point un logiciel permettant de prédire des ceRNAs de PTEN (Tay et al., 2011). Ces prédictions ont permis d'identifier plusieurs transcrits codant pour des protéines capables de moduler l'expression de PTEN et les niveaux de phospho-Akt, d'une manière dépendante des miRNAs. L'expression de certains de ces ceRNAs corrèle positivement avec l'expression de PTEN dans des échantillons tumoraux et ces ceRNAs

présentent des propriétés de suppresseur de tumeur non connues auparavant, que les auteurs attribuent à la dé-répression de PTEN grâce à la compétition pour les mêmes miRNAs. Cette dimension rajoute de la complexité au réseau de connexions entre les miRNAs et leurs cibles. Si l'équipe de Pandolfi s'est focalisée ici sur l'inter-régulation entre des ARNm codant pour des protéines, une régulation de ce type avait déjà été mise en évidence par la démonstration qu'un long ARN « non-codant » (HULC) était capable de fixer miR-372 et ainsi inhiber son activité (Wang et al., 2010a). Si ce concept s'étend donc probablement à d'autres transcrits, les études de Pandolfi impliquent PTEN en particulier au cœur d'un réseau dont la communication est médiée par les miRNAs. Dans les cellules dépendantes du microprocesseur, il est donc possible que la dé-répression de PTEN ait un impact sur l'expression de tout un réseau de transcrits, et que cet impact global joue un rôle dans le phénotype CoGAM observé. L'inhibition de PTEN en absence de miRNAs dans les cellules inhibées pour le microprocesseur ne peut avoir d'effet sur l'expression de ces ceRNAs, ce qui pourrait expliquer qu'elle ne restaure que partiellement le phénotype.

III. Identification de micro-ARNs soutenant individuellement la prolifération tumorale

Notre approche de crible de complémentation du phénotype CoGAM dans les cellules MCF-7 inhibées pour l'expression de Drosha nous a permis d'identifier plusieurs miRNAs capables de soutenir individuellement la prolifération de ces cellules tumorales. Nous avons testé la complémentation par une trentaine de miRNAs individuels. Idéalement, notre système pourrait être utilisé pour cribler une banque de vecteurs d'expression de tous les miRNAs humains connus, ce qui permettrait éventuellement d'identifier d'autres miRNAs d'intérêt dans le soutien de la prolifération tumorale. Parmi les miRNAs que nous avons identifiés, miR-19a, miR-19b et miR-20a, 3 miRNAs du cluster oncogène miR-17-92, se sont avérés les plus efficaces dans la restauration de la formation des colonies. miR-19 et miR-20 appartiennent au même cluster mais ne possèdent pas la même séquence noyau. Il est intéressant de noter que ces miRNAs oncogènes ont aussi été identifiés par l'équipe de Blelloch dans le crible de complémentation de la prolifération des cellules ES de souris DGCR8$^{-/-}$ (Wang et al., 2008d) (Figure 25). Dans notre crible de complémentation, nous avons identifié d'autres miRNAs possédant la même séquence noyau que miR-20, mais plutôt spécifiques des cellules souches : miR-302b et miR-372. Des miRNAs de ces familles ont aussi été identifiés par l'équipe de Blelloch, les miRNAs de la famille miR-290 (ici miR-291, 294 et 295) chez la souris étant les homologues de la famille miR-372/373 chez l'homme (Figure 25). Ces résultats dans deux contextes cellulaires différents sont donc cohérents avec l'implication de ces miRNAs dans le soutien de la prolifération. Cependant,

des cinétiques de complémentation nous ont permis de mettre en évidence des différences fonctionnelles entre ces miRNAs de la même famille. En effet, la complémentation par miR-302b ou miR-372 est beaucoup moins efficace dans les cellules MCF-7 que celle obtenue par miR-20, et, sur le long terme, les colonies formées grâce à l'expression de miR-302b ou miR-372 régressent tandis que celles formées grâce à l'expression de miR-20 continuent de proliférer. Ceci suggère que miR-20 et les miRNAs des cellules souches possèdent certaines cibles en commun mais que la répression d'autres cibles spécifiques à miR-20 permet de complémenter plus efficacement le défaut de prolifération dans le contexte des cellules tumorales MCF-7.

				Complémentation de la prolifération dans les cellules ES DGCR8$^{-/-}$ de souris (Wang et al., 2008)	Complémentation de la prolifération dans les cellules MCF-7 shDro (Peric et al., 2011)
Spécifiques cellules ES		UAAGUGCUUCCAUGUUUUAGUAG	miR-302b	+	+ (1)
		UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	miR-302c	+	ND
		UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	miR-302d	+	ND
	humain	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU	miR-372	ND	+ (1)
	souris	AAAGUGCUUCCACUUUGUGUGC	miR-291a-3p	+	ND
		AAAGUGCAUCCAUUUUGUUUGU	miR-291-b-3p	+	ND
		AAAGUGCUUCCCUUUUGUGUGU	mir-294	+	ND
		AAAGUGCUACUACUUUUGAGUCU	mir-295	+	ND
		UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	miR-20a	+	+ (2)
		CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG	miR-20b	+	ND
		AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	miR-106a	+	ND
		CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	miR-93	+	ND
		UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	miR-19a	+	+ (3)
		UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA	miR-19b	-	+ (3)
		GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA	miR-33a	+	+
		UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	miR-27b	-	+ (4)
		(UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC	mir-27a)	-	-
		AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	miR-27b*	-	?
		(AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	mir-27a*)	-	-

Figure 25 : Comparaison de nos résultats de complémentation dans les cellules MCF-7 shDro avec ceux dans les cellules ES DGCR8$^{-/-}$. *Récapitulatif et comparaison des miRNAs identifiés dans notre crible de complémentation du phénotype CoGAM dans les cellules MCF-7 shDro (Peric et al., 2011) avec ceux identifiés par l'équipe de Robert Blelloch dans le crible de complémentation du défaut de prolifération des cellules ES DGCR8$^{-/-}$ (Wang et al., 2008d). Les régions des séquences noyau communes à plusieurs miRNAs sont surlignées de la même couleur, indiquant des miRNAs de la même famille. miR-27a (et miR-27a*), qui ne complémente pas, est représenté à titre indicatif pour comparaison avec la séquence miR-27b (et miR-27b*). Les nucléotides qui distinguent miR-27a de miR-27b, et miR-27a* de miR-27b* sont en rouge. (1)peu de clones et régression avec le temps, (2)beaucoup de clones et durable, (3)beaucoup de clones et régression avec le temps, (4)peu de clones mais durable. ND = non déterminé.*

Cette différence fonctionnelle est également mise en évidence par les différences des complémentations obtenues avec miR-19b et miR-20a. De la même manière, des cinétiques de complémentation montrent que si miR-19b complémente très efficacement la formation des colonies dans un premier temps, celles-ci régressent sur le plus long-terme. L'identification de ces miRNAs nous a permis de montrer que PTEN, une de leur cible commune, était impliquée dans le phénotype CoGAM. Cependant, les différences observées suggèrent là encore que l'inhibition conjointe d'autres cibles régulées par miR-20, par exemple des facteurs pro-apoptotiques, permet de restaurer une prolifération durable en l'absence d'autres miRNAs. L'équipe de Blelloch a proposé que la dé-répression de cibles inhibitrices de la transition G1-S, dont p21, soit responsable du ralentissement de la prolifération dans les cellules ES. Ils ont montré que l'expression de p21 était induite dans les cellules ES DGCR8$^{-/-}$ et inhibée par l'expression des miRNAs de la famille miR-290 et miR-302 dans ces cellules (Wang et al., 2008d). Toutefois, ils n'ont pas pu inhiber l'expression de p21 dans ces cellules afin de voir si cela permettait de complémenter le défaut de prolifération, ce qui aurait permis de confirmer l'implication directe de p21. Dans les cellules dépendantes du microprocesseur, nous avons montré que l'inhibition de p21 ne suffisait pas à restaurer la prolifération des colonies.

Nous avons par ailleurs identifié 2 autres miRNAs capables de complémenter partiellement le phénotype CoGAM : miR-33a et miR-27b. Ces deux miRNAs ont peu été associés à la tumorigenèse. Notre approche permet de montrer qu'ils sont capables de soutenir individuellement la prolifération de cellules tumorales, indiquant un rôle potentiellement oncogénique de ces miRNAs. Une étude a montré que la surexpression de miR-33a avec l'oncogène Ras^{V12} permettrait de transformer des MEFs, grâce à la répression de p53 par miR-33a (Herrera-Merchan et al., 2010). Les auteurs ont identifié 2 sites potentiels de réponse à miR-33a, sans séquence noyau, dans le 3'UTR de p53. Cette étude met donc en évidence un rôle oncogène de miR-33, alors qu'une autre étude a proposé que miR-33 agisse plutôt comme un suppresseur de tumeur en ciblant le proto-oncogène Pim-1 dans certaines lignées tumorales (Thomas et al., 2011). Si le rôle de miR-33 dans les tumeurs n'est donc pas très clair, nous pouvons cependant tirer plusieurs remarques de nos résultats. D'abord, miR-33 fait aussi partie des miRNAs capables de complémenter le défaut de prolifération des cellules ES DGCR8$^{-/-}$, ce qui confirme que ce miRNA favorise la prolifération dans différents contextes cellulaires. Ensuite, dans la séquence 5' de miR-33, nous avons noté 5 nucléotides en commun avec la séquence noyau de miR-19 (Figure 25), ce qui suggère que miR-33 puisse complémenter partiellement la formation des colonies grâce à la répression de cibles communes avec miR-19. Enfin, malgré l'étude indiquant que p53 serait une cible de miR-33, l'inhibition de p53 dans les cellules MCF-7 n'a pas permis de complémenter la prolifération des cellules inhibées pour Drosha. La

complémentation partielle par miR-33 passe donc vraisemblablement par l'inhibition d'autres cibles.

miR-27b a été associé à des signatures de mauvais pronostic et aux tumeurs plus invasives dans les cancers du sein (Buffa et al., 2011) (voir Tableau 1 dans l'introduction). Une autre étude a montré que miR-27b était surexprimé dans des échantillons de tumeurs du sein par rapport au tissu normal, et a montré que la surexpression de miR-27b dans les cellules ZR-75-1 favorisait la prolifération, l'invasion et la migration, et que son inhibition dans une lignée métastatique avait les effets inverses (Wang et al., 2009). miR-27a est également exprimé dans les lignées de cancer du sein et il a été décrit comme favorisant la prolifération des cellules MDA-MB-231 (Mertens-Talcott et al., 2007). miR-27a et miR-27b ne diffèrent que par un nucléotide hors de la séquence noyau (Figure 25). Pourtant, miR-27a ne permet pas de restaurer la formation des colonies dans notre crible, tandis que miR-27b est capable de complémenter, partiellement mais durablement, la formation des colonies. Cette différence semble peu attribuable au seul nucléotide hors de la séquence noyau qui différencie miR-27a de miR-27b. Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer la différence obtenue entre miR-27a et miR-27b. Tout d'abord, notons que dans notre approche de complémentation, les miRNAs sont exprimés à partir des séquences naturelles des pre-miRNAs qui permettent de produire également les miRNA*. Si les brins miRNA* ou passagers ont longtemps été considérés comme éliminés et non fonctionnels, différentes études montrent aujourd'hui que les ratios miRNA /miRNA* varient considérablement (entre 1 et plus de 100) en fonction du pre-miRNA et en fonction du tissu ou du type cellulaire considéré (Ro et al., 2007; Biasiolo et al., 2011; Kuchenbauer et al., 2011). Les brins miRNA* sont donc dans certains cas exprimés de manière non négligeable et il a été montré qu'ils permettaient également de réprimer l'expression de cibles (Ro et al., 2007; Okamura et al., 2008; Yang et al., 2011). Dans le crible de complémentation de l'équipe de Blelloch, des duplexes de miRNAs, optimisés pour intégrer préférentiellement le brin mature dans le complexe RISC, ont été utilisé (www.dharmacon.com). Ceci suggère que les complémentations que nous avons obtenues par plusieurs miRNAs trouvés en commun avec cette étude et qui de plus, partagent la même séquence noyau, passe vraisemblablement par le brin mature. Dans le cas de miR-27b en revanche, il est possible que le brin miR-27b*, qui diffère de miR-27a* de plusieurs nucléotides dont un dans la séquence noyau (Figure 25), intervienne dans la complémentation. Il serait intéressant de tester différentes combinaisons de miRNA/miRNA* en modifiant les séquences naturelles des pre-miR-27a et pre-miR-27b dans nos vecteurs d'expression, afin de voir si miR-27b* est effectivement nécessaire à la complémentation. On pourrait également regarder si miR-27b* seul suffit à complémenter ou s'il est possible que le brin mature et le brin passager coopèrent dans la complémentation du

phénotype CoGAM. Une expression et une action coordonnée de miR-9 et miR-9* a par exemple été démontrée dans les cellules souches cancéreuses de glioblastome (Schraivogel et al., 2011). Une autre possibilité est que, grâce à un mécanisme de régulation spécifique de pre-miR-27a, celui-ci ne s'exprime pas dans les cellules MCF-7. En effet, nous avons contrôlé l'expression de tous nos vecteurs d'expression de pre-miRNAs par une méthode standardisée que nous avons mis au point dans les cellules HeLa. Nous savons donc que le vecteur d'expression de pre-miR-27a est fonctionnel. Cependant, il est possible qu'une séquence, présente par exemple dans la boucle de pre-miR-27a, permette de réguler spécifiquement sa maturation ou sa dégradation dans le contexte cellulaire des MCF-7. Il conviendrait donc de vérifier que miR-27a s'exprime dans les MCF-7. Dans le cas contraire, il serait intéressant de déterminer par quel élément dans la séquence et par quel mécanisme miR-27a ne s'exprime pas. Nous disposons d'un système nous permettant de tester facilement ces différentes hypothèses en modifiant les séquences des pre-miRNAs naturels et en testant lesquels sont capables de faire pousser des colonies MCF-7 shDro. Cela pourrait permettre de mettre en évidence un rôle fonctionnel majeur d'un miRNA* ou bien un mécanisme de régulation spécifique d'un pre-miRNA, expliquant une telle différence fonctionnelle entre 2 miRNAs homologues.

IV. Conclusion

La dépendance de tumeurs à un oncomiR a été montrée par Medina et al. à l'aide d'un modèle de tumeurs induites par la surexpression de miR-21 (Medina et al., 2010). L'intérêt de notre approche est qu'elle permet de montrer que certaines cellules tumorales dépendent de miRNAs endogènes, sans avoir à passer par un modèle de surexpression d'une version exogène d'un oncomiR. Pour aller plus loin, il serait intéressant de démontrer cette dépendance à la voie miRNA *in vivo* dans un modèle tumoral non induit par un miRNA, ou dans un modèle de développement spontané de tumeurs. La recherche actuelle en cancérologie vise à développer de plus en plus des thérapies ciblées, spécifiques de chaque type tumoral, de manière à ce qu'elles soient plus efficaces et présentent moins d'effets secondaires que les chimiothérapies classiques. Dans ce contexte, l'identification de cellules tumorales dépendantes du microprocesseur ouvre des pistes quant à sa considération comme une cible thérapeutique potentielle dans certaines tumeurs. Par ailleurs, nos résultats montrent que certaines cellules cancéreuses dépendent de miRNAs oncogéniques. Notre approche de complémentation fonctionnelle par des miRNAs individuels a permis d'identifier ou de confirmer des miRNAs avec un potentiel oncogénique car ils soutiennent individuellement la prolifération tumorale. L'identification future de miRNAs endogènes essentiels dans certaines tumeurs ouvrirait également les portes vers de nouvelles approches thérapeutiques ciblant spécifiquement des

miRNAs. Le fait de cibler des miRNAs dans les cancers présente l'intérêt majeur qu'ils régulent plusieurs cibles intervenant dans le phénotype tumoral (cycle cellulaire, apoptose etc.). Ceci est confirmé par les différences fonctionnelles obtenues par différents miRNAs dans notre crible de complémentation. Nous avons identifié PTEN comme une cible suppresseur de tumeur partiellement impliquée dans la dépendance au microprocesseur, mais les différences de complémentations obtenues avec plusieurs miRNAs, comme miR-19 et miR-20, suggèrent que d'autres cibles sont impliquées dans le phénotype CoGAM. Par ailleurs, le fait que les miRNAs régulent de nombreuses cibles, et que les profils d'expression des miRNAs soient très spécifiques de chaque type tumoral, suggère que le réseau tumoral dans la cellule soit coordonné par quelques miRNAs. Le concept des ceRNAs démontré entre autres avec PTEN ajoute de la complexité au réseau transcriptionnel coordonné par l'expression des miRNAs. Si on imagine donc que quelques miRNAs oncogènes soient au cœur du réseau tumoral de la cellule, leur inhibition pourrait constituer une stratégie qui aurait un impact beaucoup plus important que de cibler une protéine oncogène. Les thérapies ciblant des miRNAs ne sont à l'heure actuelle qu'une perspective. Si l'inhibition de miRNAs *in vivo* par différents types d'anti-miRs a déjà été démontrée chez la souris et certains primates, elle l'a été essentiellement pour le miRNA spécifique du foie, miR-122 (Krutzfeldt et al., 2005; Elmen et al., 2008a; Elmen et al., 2008b). Ce type de démonstration de l'inhibition de miRNAs oncogènes *in vivo* n'a pas encore été faite dans des modèles tumoraux, ni sur des miRNAs redondants appartenant à la même famille. Une autre option encore peu explorée pour inhiber des miRNAs cibles en thérapeutique est celle de l'utilisation de molécules chimiques qui inhiberaient spécifiquement certains miRNAs. Gumireddy et al. ont apporté la preuve du concept en mettant au point une méthode de criblage pour identifier des petites molécules inhibitrices de miR-21 (Gumireddy et al., 2008). Un premier criblage de plus de 1000 composés leur a permis d'identifier une molécule inhibant spécifiquement la transcription de miR-21. L'intérêt de l'utilisation de tels composés est qu'il existe souvent déjà des études de toxicité et de biodistribution de ces molécules, réduisant le chemin vers l'application clinique.

Compte-tenu de la découverte relativement récente de l'existence des miRNAs, le champ de compréhension de leurs modes d'action, de leurs rôles physiologiques exacts, ou encore des cibles qu'ils régulent est encore en plein progrès. En parallèle, progressent également nos connaissances sur leurs implications dans différentes pathologies, dont le cancer, et le développement d'outils techniques pertinents pour leur étude, voire leur ciblage thérapeutique. Nous espérons que ce travail aura contribué, en apportant une petite pièce au puzzle, à la compréhension du rôle complexe que jouent les miRNAs dans la biologie des cellules tumorales.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abbott, A.L., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E.A., Lau, N.C., Bartel, D.P., Horvitz, H.R., and Ambros, V. (2005). The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Dev Cell* ***9***, 403-414.

Adams, M.R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G., and Nevins, J.R. (2000). Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol Cell Biol* ***20***, 3633-3639.

Ambros, V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in C. elegans. *Cell* ***57***, 49-57.

Ambros, V., and Horvitz, H.R. (1984). Heterochronic mutants of the nematode Caenorhabditis elegans. *Science* ***226***, 409-416.

Ambs, S., Prueitt, R.L., Yi, M., Hudson, R.S., Howe, T.M., Petrocca, F., Wallace, T.A., Liu, C.G., Volinia, S., Calin, G.A*., et al.* (2008). Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res* ***68***, 6162-6170.

Ameres, S.L., Martinez, J., and Schroeder, R. (2007). Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell* ***130***, 101-112.

Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* ***277***, 965-968.

Arrate, M.P., Vincent, T., Odvody, J., Kar, R., Jones, S.N., and Eischen, C.M. (2010). MicroRNA biogenesis is required for Myc-induced B-cell lymphoma development and survival. *Cancer Res* ***70***, 6083-6092.

Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S., and Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* ***27***, 2128-2136.

B

Babak, T., Zhang, W., Morris, Q., Blencowe, B.J., and Hughes, T.R. (2004). Probing microRNAs with microarrays: tissue specificity and functional inference. *RNA* ***10***, 1813-1819.

Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev* ***22***, 2773-2785.

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

Baer, M.F., Wesolowski, D., and Altman, S. (1989). Characterization in vitro of the defect in a temperature-sensitive mutant of the protein subunit of RNase P from Escherichia coli. *J Bacteriol* ***171***, 6862-6866.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* ***122***, 553-563.

Baglioni, C., Minks, M.A., and Maroney, P.A. (1978). Interferon action may be mediated by activation of a nuclease by pppA2'p5'A2'p5'A. *Nature* ***273***, 684-687.

Bar, M., Wyman, S.K., Fritz, B.R., Qi, J., Garg, K.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Bendoraite, A., Mitchell, P.S., Nelson, A.M*., et al.* (2008). MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells* ***26***, 2496-2505.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* ***136***, 215-233.

Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* ***11***, 241-247.
Bates, G.J., Nicol, S.M., Wilson, B.J., Jacobs, A.M., Bourdon, J.C., Wardrop, J., Gregory, D.J., Lane, D.P., Perkins, N.D., and Fuller-Pace, F.V. (2005). The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *EMBO J* ***24***, 543-553.
Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* ***20***, 1885-1898.
Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* ***28***, 328-336.
Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* ***409***, 363-366.
Beuvink, I., Kolb, F.A., Budach, W., Garnier, A., Lange, J., Natt, F., Dengler, U., Hall, J., Filipowicz, W., and Weiler, J. (2007). A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res* ***35***, e52.
Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* ***125***, 1111-1124.
Biard, D.S., Despras, E., Sarasin, A., and Angulo, J.F. (2005). Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* ***3***, 519-529.
Biasiolo, M., Sales, G., Lionetti, M., Agnelli, L., Todoerti, K., Bisognin, A., Coppe, A., Romualdi, C., Neri, A., and Bortoluzzi, S. (2011). Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA* expression. *PLoS One* ***6***, e23854.
Blenkiron, C., Goldstein, L.D., Thorne, N.P., Spiteri, I., Chin, S.F., Dunning, M.J., Barbosa-Morais, N.L., Teschendorff, A.E., Green, A.R., Ellis, I.O.*, et al.* (2007). MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol* ***8***, R214.
Bloomston, M., Frankel, W.L., Petrocca, F., Volinia, S., Alder, H., Hagan, J.P., Liu, C.G., Bhatt, D., Taccioli, C., and Croce, C.M. (2007). MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* ***297***, 1901-1908.
Blow, M.J., Grocock, R.J., van Dongen, S., Enright, A.J., Dicks, E., Futreal, P.A., Wooster, R., and Stratton, M.R. (2006). RNA editing of human microRNAs. *Genome Biol* ***7***, R27.
Bogenhagen, D.F., and Brown, D.D. (1981). Nucleotide sequences in Xenopus 5S DNA required for transcription termination. *Cell* ***24***, 261-270.
Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* ***10***, 185-191.
Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., D'Urso, L., Pagliuca, A., Biffoni, M., Labbaye, C.*, et al.* (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* ***14***, 1271-1277.
Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* ***13***, 1097-1101.
Borgdorff, V., Lleonart, M.E., Bishop, C.L., Fessart, D., Bergin, A.H., Overhoff, M.G., and Beach, D.H. (2010). Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene* ***29***, 2262-2271.
Bortolin-Cavaille, M.L., Dance, M., Weber, M., and Cavaille, J. (2009). C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res* ***37***, 3464-3473.
Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* ***49***, 4682-4689.
Bracken, C.P., Gregory, P.A., Kolesnikoff, N., Bert, A.G., Wang, J., Shannon, M.F., and Goodall, G.J. (2008). A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* ***68***, 7846-7854.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* ***3***, e85.

Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L., and Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* ***34***, 263-264.

Broderick, J.A., Salomon, W.E., Ryder, S.P., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2011). Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA* ***17***, 1858-1869.

Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* ***296***, 550-553.

Bueno, C., Montes, R., Catalina, P., Rodriguez, R., and Menendez, P. (2011). Insights into the cellular origin and etiology of the infant pro-B acute lymphoblastic leukemia with MLL-AF4 rearrangement. *Leukemia* ***25***, 400-410.

Bueno, M.J., Gomez de Cedron, M., Laresgoiti, U., Fernandez-Piqueras, J., Zubiaga, A.M., and Malumbres, M. (2010). Multiple E2F-induced microRNAs prevent replicative stress in response to mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* ***30***, 2983-2995.

Bueno, M.J., Perez de Castro, I., Gomez de Cedron, M., Santos, J., Calin, G.A., Cigudosa, J.C., Croce, C.M., Fernandez-Piqueras, J., and Malumbres, M. (2008). Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* ***13***, 496-506.

Buffa, F.M., Camps, C., Winchester, L., Snell, C.E., Gee, H.E., Sheldon, H., Taylor, M., Harris, A.L., and Ragoussis, J. (2011). microRNA-Associated Progression Pathways and Potential Therapeutic Targets Identified by Integrated mRNA and microRNA Expression Profiling in Breast Cancer. *Cancer Res* ***71***, 5635-5645.

C

Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* ***10***, 1957-1966.

Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K.*, et al.* (2002). 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* ***99***, 15524-15529.

Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M.*, et al.* (2005). A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* ***353***, 1793-1801.

Calin, G.A., Liu, C.G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M.*, et al.* (2004a). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***101***, 11755-11760.

Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M.*, et al.* (2004b). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***101***, 2999-3004.

Cantley, L.C., and Neel, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***96***, 4240-4245.

Caplen, N.J., Fleenor, J., Fire, A., and Morgan, R.A. (2000). dsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* ***252***, 95-105.

Carbon, P., Murgo, S., Ebel, J.P., Krol, A., Tebb, G., and Mattaj, L.W. (1987). A common octamer motif binding protein is involved in the transcription of U6 snRNA by RNA polymerase III and U2 snRNA by RNA polymerase II. *Cell* ***51***, 71-79.

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C.*, et al.* (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* ***309***, 1559-1563.

Castellano, L., Giamas, G., Jacob, J., Coombes, R.C., Lucchesi, W., Thiruchelvam, P., Barton, G., Jiao, L.R., Wait, R., Waxman, J.*, et al.* (2009). The estrogen receptor-alpha-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***106***, 15732-15737.

Chalfie, M., Horvitz, H.R., and Sulston, J.E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of C. elegans. *Cell* ***24***, 59-69.

Chan, J.A., Krichevsky, A.M., and Kosik, K.S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* ***65***, 6029-6033.

Chang, J., Guo, J.T., Jiang, D., Guo, H., Taylor, J.M., and Block, T.M. (2008a). Liver-specific microRNA miR-122 enhances the replication of hepatitis C virus in nonhepatic cells. *J Virol* ***82***, 8215-8223.

Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. (2008b). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* ***40***, 43-50.

Chen, C., Ridzon, D., Lee, C.T., Blake, J., Sun, Y., and Strauss, W.M. (2007). Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets. *Mamm Genome* ***18***, 316-327.

Chen, C.Y., Zheng, D., Xia, Z., and Shyu, A.B. (2009). Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* ***16***, 1160-1166.

Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* ***303***, 83-86.

Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., and Shiekhattar, R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* ***447***, 823-828.

Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* ***436***, 740-744.

Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G.*, et al.* (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* ***308***, 1149-1154.

Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Acquafondata, M., McHale, T., Sobol, R.W., and Dhir, R. (2006). Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* ***169***, 1812-1820.

Choi, S.H., Takahashi, K., Eto, H., Yoon, S.S., and Tanabe, K.K. (2000). CD44s expression in human colon carcinomas influences growth of liver metastases. *Int J Cancer* ***85***, 523-526.

Chong, M.M., Rasmussen, J.P., Rudensky, A.Y., and Littman, D.R. (2008). The RNAseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J Exp Med* ***205***, 2005-2017.

Chong, M.M., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T.A., Hannon, G.J., and Littman, D.R. (2010). Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes Dev* ***24***, 1951-1960.

Chu, C.Y., and Rana, T.M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* ***4***, e210.

Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M.*, et al.* (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***102***, 13944-13949.

Clemens, M.J. (1997). PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* ***29***, 945-949.

Clemens, M.J., and Williams, B.R. (1978). Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts. *Cell* ***13***, 565-572.

Clurman, B.E., and Hayward, W.S. (1989). Multiple proto-oncogene activations in avian leukosis virus-induced lymphomas: evidence for stage-specific events. *Mol Cell Biol* ***9***, 2657-2664.

Corcoran, D.L., Pandit, K.V., Gordon, B., Bhattacharjee, A., Kaminski, N., and Benos, P.V. (2009). Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One* ***4***, e5279.

Costinean, S., Sandhu, S.K., Pedersen, I.M., Tili, E., Trotta, R., Perrotti, D., Ciarlariello, D., Neviani, P., Harb, J., Kauffman, L.R.*, et al.* (2009). Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood* ***114***, 1374-1382.

Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C.M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***103***, 7024-7029.

Cuellar, T.L., Davis, T.H., Nelson, P.T., Loeb, G.B., Harfe, B.D., Ullian, E., and McManus, M.T. (2008). Dicer loss in striatal neurons produces behavioral and neuroanatomical phenotypes in the absence of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***105***, 5614-5619.

Cummins, J.M., He, Y., Leary, R.J., Pagliarini, R., Diaz, L.A., Jr., Sjoblom, T., Barad, O., Bentwich, Z., Szafranska, A.E., Labourier, E.*, et al.* (2006). The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***103***, 3687-3692.

D

Dalerba, P., Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* ***58***, 267-284.

Damiani, D., Alexander, J.J., O'Rourke, J.R., McManus, M., Jadhav, A.P., Cepko, C.L., Hauswirth, W.W., Harfe, B.D., and Strettoi, E. (2008). Dicer inactivation leads to progressive functional and structural degeneration of the mouse retina. *J Neurosci* ***28***, 4878-4887.

Davidson, B.L., and McCray, P.B., Jr. (2011). Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* ***12***, 329-340.

Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* ***454***, 56-61.

Davis, B.N., Hilyard, A.C., Nguyen, P.H., Lagna, G., and Hata, A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol Cell* ***39***, 373-384.

Davis, E., Caiment, F., Tordoir, X., Cavaille, J., Ferguson-Smith, A., Cockett, N., Georges, M., and Charlier, C. (2005). RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus. *Curr Biol* ***15***, 743-749.

Dedes, K.J., Natrajan, R., Lambros, M.B., Geyer, F.C., Lopez-Garcia, M.A., Savage, K., Jones, R.L., and Reis-Filho, J.S. (2011). Down-regulation of the miRNA master regulators Drosha and Dicer is associated with specific subgroups of breast cancer. *Eur J Cancer* ***47***, 138-150.

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

Deo, M., Yu, J.Y., Chung, K.H., Tippens, M., and Turner, D.L. (2006). Detection of mammalian microRNA expression by in situ hybridization with RNA oligonucleotides. *Dev Dyn* ***235***, 2538-2548.

Desaint, S., Luriau, S., Aude, J.C., Rousselet, G., and Toledano, M.B. (2004). Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H2O2. *J Biol Chem* ***279***, 31157-31163.

Dey, B.K., Gagan, J., and Dutta, A. (2011). miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol Cell Biol* ***31***, 203-214.

Didiano, D., and Hobert, O. (2006). Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* ***13***, 849-851.

Ding, L., Spencer, A., Morita, K., and Han, M. (2005). The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in C. elegans. *Mol Cell* ***19***, 437-447.

Ding, X.C., and Grosshans, H. (2009). Repression of C. elegans microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J* ***28***, 213-222.

Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* ***18***, 504-511.

Dong, J.T., Boyd, J.C., and Frierson, H.F., Jr. (2001). Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate **49***, 166-171.
Du, T., and Zamore, P.D. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development **132***, 4645-4652.
Duursma, A.M., Kedde, M., Schrier, M., le Sage, C., and Agami, R. (2008). miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA **14***, 872-877.
Dye, M.J., Gromak, N., and Proudfoot, N.J. (2006). Exon tethering in transcription by RNA polymerase II. *Mol Cell **21***, 849-859.

E
Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., and Cory, S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A **101***, 6164-6169.
Eis, P.S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M.F., Lund, E., and Dahlberg, J.E. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A **102***, 3627-3632.
el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell **75***, 817-825.
Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature **411***, 494-498.
Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev **15***, 188-200.
Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H.F., Berger, U.*, et al.* (2008a). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature **452***, 896-899.
Elmen, J., Lindow, M., Silahtaroglu, A., Bak, M., Christensen, M., Lind-Thomsen, A., Hedtjarn, M., Hansen, J.B., Hansen, H.F., Straarup, E.M.*, et al.* (2008b). Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res **36***, 1153-1162.
Esquela-Kerscher, A., Trang, P., Wiggins, J.F., Patrawala, L., Cheng, A., Ford, L., Weidhaas, J.B., Brown, D., Bader, A.G., and Slack, F.J. (2008). The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle **7***, 759-764.
Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007a). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol **27***, 3970-3981.
Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol **15***, 346-353.
Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA **15***, 21-32.
Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S.F., Doerks, T., Dorner, S., Bork, P., Boutros, M., and Izaurralde, E. (2007b). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev **21***, 2558-2570.
Eystathioy, T., Chan, E.K., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Griffith, K., and Fritzler, M.J. (2002). A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell **13***, 1338-1351.
Eystathioy, T., Jakymiw, A., Chan, E.K., Seraphin, B., Cougot, N., and Fritzler, M.J. (2003). The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA **9***, 1171-1173.

F
Faber, C., Horst, D., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2011). Overexpression of Dicer predicts poor survival in colorectal cancer. *Eur J Cancer **47***, 1414-1419.

Fabian, M.R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V., Rivas, F., Jinek, M., Wohlschlegel, J., Doudna, J.A., *et al.* (2009). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* ***35***, 868-880.

Faggad, A., Budczies, J., Tchernitsa, O., Darb-Esfahani, S., Sehouli, J., Muller, B.M., Wirtz, R., Chekerov, R., Weichert, W., Sinn, B., *et al.* (2010). Prognostic significance of Dicer expression in ovarian cancer-link to global microRNA changes and oestrogen receptor expression. *J Pathol* ***220***, 382-391.

Faller, M., Toso, D., Matsunaga, M., Atanasov, I., Senturia, R., Chen, Y., Zhou, Z.H., and Guo, F. (2010). DGCR8 recognizes primary transcripts of microRNAs through highly cooperative binding and formation of higher-order structures. *RNA* ***16***, 1570-1583.

Faraoni, I., Antonetti, F.R., Cardone, J., and Bonmassar, E. (2009). miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* ***1792***, 497-505.

Farazi, T.A., Horlings, H.M., Ten Hoeve, J.J., Mihailovic, A., Halfwerk, H., Morozov, P., Brown, M., Hafner, M., Reyal, F., van Kouwenhove, M., *et al.* (2011). MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res* ***71***, 4443-4453.

Farh, K.K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B.P., Johnston, W.K., Lim, L.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* ***310***, 1817-1821.

Fazi, F., Rosa, A., Fatica, A., Gelmetti, V., De Marchis, M.L., Nervi, C., and Bozzoni, I. (2005). A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* ***123***, 819-831.

Fedele, M., Battista, S., Manfioletti, G., Croce, C.M., Giancotti, V., and Fusco, A. (2001). Role of the high mobility group A proteins in human lipomas. *Carcinogenesis* ***22***, 1583-1591.

Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* ***17***, 1115-1129.

Ferracin, M., Pedriali, M., Veronese, A., Zagatti, B., Gafa, R., Magri, E., Lunardi, M., Munerato, G., Querzoli, G., Maestri, I., *et al.* (2011). MicroRNA profiling for the identification of cancers with unknown primary tissue-of-origin. *J Pathol* ***225***, 43-53.

Field, S.J., Tsai, F.Y., Kuo, F., Zubiaga, A.M., Kaelin, W.G., Jr., Livingston, D.M., Orkin, S.H., and Greenberg, M.E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* ***85***, 549-561.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* ***9***, 102-114.

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

Foekens, J.A., Sieuwerts, A.M., Smid, M., Look, M.P., de Weerd, V., Boersma, A.W., Klijn, J.G., Wiemer, E.A., and Martens, J.W. (2008). Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***105***, 13021-13026.

Fontana, L., Fiori, M.E., Albini, S., Cifaldi, L., Giovinazzi, S., Forloni, M., Boldrini, R., Donfrancesco, A., Federici, V., Giacomini, P., *et al.* (2008). Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One* ***3***, e2236.

Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Coller, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***105***, 14879-14884.

Frankel, L.B., Christoffersen, N.R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A., and Lund, A.H. (2008). Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem* ***283***, 1026-1033.

Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* ***19***, 92-105.

Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T., and Oshimura, M. (2004). Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* ***6***, 784-791.

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T.*, et al.* (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* ***9***, 604-611.

Fulci, V., Chiaretti, S., Goldoni, M., Azzalin, G., Carucci, N., Tavolaro, S., Castellano, L., Magrelli, A., Citarella, F., Messina, M.*, et al.* (2007). Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* ***109***, 4944-4951.

G

Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F.*, et al.* (2011). Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res* ***39***, 5692-5703.

Gaur, A., Jewell, D.A., Liang, Y., Ridzon, D., Moore, J.H., Chen, C., Ambros, V.R., and Israel, M.A. (2007). Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res* ***67***, 2456-2468.

Geurts, J.M., Schoenmakers, E.F., and Van de Ven, W.J. (1997). Molecular characterization of a complex chromosomal rearrangement in a pleomorphic salivary gland adenoma involving the 3'-UTR of HMGIC. *Cancer Genet Cytogenet* ***95***, 198-205.

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

Gironella, M., Seux, M., Xie, M.J., Cano, C., Tomasini, R., Gommeaux, J., Garcia, S., Nowak, J., Yeung, M.L., Jeang, K.T.*, et al.* (2007). Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***104***, 16170-16175.

Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J.S., Favre, G., and Vagner, S. (2011). HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ*.

Gomez-Cabello, D., Callejas, S., Benguria, A., Moreno, A., Alonso, J., and Palmero, I. (2010). Regulation of the microRNA processor DGCR8 by the tumor suppressor ING1. *Cancer Res* ***70***, 1866-1874.

Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* ***10***, 593-601.

Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* ***123***, 631-640.

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

Greither, T., Grochola, L.F., Udelnow, A., Lautenschlager, C., Wurl, P., and Taubert, H. (2010). Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* ***126***, 73-80.

Grelier, G., Voirin, N., Ay, A.S., Cox, D.G., Chabaud, S., Treilleux, I., Leon-Goddard, S., Rimokh, R., Mikaelian, I., Venoux, C.*, et al.* (2009). Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype. *Br J Cancer* ***101***, 673-683.

Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* ***36***, D154-158.

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

Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degnan, B.M., Rokhsar, D.S., and Bartel, D.P. (2008). Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* ***455***, 1193-1197.

Gu, J., He, T., Pei, Y., Li, F., Wang, X., Zhang, J., Zhang, X., and Li, Y. (2006). Primary transcripts and expressions of mammal intergenic microRNAs detected by mapping ESTs to their flanking sequences. *Mamm Genome* ***17***, 1033-1041.

Gumireddy, K., Young, D.D., Xiong, X., Hogenesch, J.B., Huang, Q., and Deiters, A. (2008). Small-molecule inhibitors of microrna miR-21 function. *Angew Chem Int Ed Engl* ***47***, 7482-7484.

Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* ***466***, 835-840.

Guo, S., and Kemphues, K.J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* ***81***, 611-620.

Gupta, V., Huang, X., and Patel, R.C. (2003). The carboxy-terminal, M3 motifs of PACT and TRBP have opposite effects on PKR activity. *Virology* ***315***, 283-291.

H

Ha, I., Wightman, B., and Ruvkun, G. (1996). A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for Caenorhabditis elegans lin-14 temporal gradient formation. *Genes Dev* ***10***, 3041-3050.

Hagan, J.P., Piskounova, E., and Gregory, R.I. (2009). Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* ***16***, 1021-1025.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* ***404***, 293-296.

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

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

Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.K., Yeom, K.H., Yang, W.Y., Haussler, D., Blelloch, R., and Kim, V.N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* ***136***, 75-84.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* ***144***, 646-674.

Hand, N.J., Master, Z.R., Le Lay, J., and Friedman, J.R. (2009). Hepatic function is preserved in the absence of mature microRNAs. *Hepatology* ***49***, 618-626.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* ***75***, 805-816.

Hassan, M.Q., Gordon, J.A., Beloti, M.M., Croce, C.M., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. (2010). A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***107***, 19879-19884.

Hatley, M.E., Patrick, D.M., Garcia, M.R., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., van Rooij, E., and Olson, E.N. (2010). Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* ***18***, 282-293.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* ***65***, 9628-9632.

He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D.*, et al.* (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* ***447***, 1130-1134.

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., *et al.* (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* ***435***, 828-833.

Helgason, C.D., Kalberer, C.P., Damen, J.E., Chappel, S.M., Pineault, N., Krystal, G., and Humphries, R.K. (2000). A dual role for Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase (SHIP) in immunity: aberrant development and enhanced function of b lymphocytes in ship -/- mice. *J Exp Med* ***191***, 781-794.

Hendrickson, D.G., Hogan, D.J., McCullough, H.L., Myers, J.W., Herschlag, D., Ferrell, J.E., and Brown, P.O. (2009). Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol* ***7***, e1000238.

Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C.G., Fehr, C., Junemann, C., and Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* ***27***, 3300-3310.

Heo, I., Joo, C., Kim, Y.K., Ha, M., Yoon, M.J., Cho, J., Yeom, K.H., Han, J., and Kim, V.N. (2009). TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* ***138***, 696-708.

Herrera-Merchan, A., Cerrato, C., Luengo, G., Dominguez, O., Piris, M.A., Serrano, M., and Gonzalez, S. (2010). miR-33-mediated downregulation of p53 controls hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Cycle* ***9***, 3277-3285.

Hill, D.A., Ivanovich, J., Priest, J.R., Gurnett, C.A., Dehner, L.P., Desruisseau, D., Jarzembowski, J.A., Wikenheiser-Brokamp, K.A., Suarez, B.K., Whelan, A.J., *et al.* (2009). DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science* ***325***, 965.

Hirai, H., Zhang, P., Dayaram, T., Hetherington, C.J., Mizuno, S., Imanishi, J., Akashi, K., and Tenen, D.G. (2006). C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* ***7***, 732-739.

Hlobilkova, A., Guldberg, P., Thullberg, M., Zeuthen, J., Lukas, J., and Bartek, J. (2000). Cell cycle arrest by the PTEN tumor suppressor is target cell specific and may require protein phosphatase activity. *Exp Cell Res* ***256***, 571-577.

Hock, J., Weinmann, L., Ender, C., Rudel, S., Kremmer, E., Raabe, M., Urlaub, H., and Meister, G. (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* ***8***, 1052-1060.

Hollestelle, A., Elstrodt, F., Nagel, J.H., Kallemeijn, W.W., and Schutte, M. (2007). Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Res* ***5***, 195-201.

Hong, L., Lai, M., Chen, M., Xie, C., Liao, R., Kang, Y.J., Xiao, C., Hu, W.Y., Han, J., and Sun, P. (2010). The miR-17-92 cluster of microRNAs confers tumorigenicity by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Res* ***70***, 8547-8557.

Hossain, A., Kuo, M.T., and Saunders, G.F. (2006). Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol* ***26***, 8191-8201.

Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* ***5***, 351-358.

Hsiao, K.M., McMahon, S.L., and Farnham, P.J. (1994). Multiple DNA elements are required for the growth regulation of the mouse E2F1 promoter. *Genes Dev* ***8***, 1526-1537.

Huang, J., Liang, Z., Yang, B., Tian, H., Ma, J., and Zhang, H. (2007). Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J Biol Chem* ***282***, 33632-33640.

Huang, Q., Gumireddy, K., Schrier, M., le Sage, C., Nagel, R., Nair, S., Egan, D.A., Li, A., Huang, G., Klein-Szanto, A.J., *et al.* (2008). The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* ***10***, 202-210.

Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***102***, 16961-16966.

Huntzinger, E., Braun, J.E., Heimstadt, S., Zekri, L., and Izaurralde, E. (2010). Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J* ***29***, 4146-4160.

Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* ***12***, 99-110.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* ***293***, 834-838.

Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* ***9***, 22-32.

Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* ***297***, 2056-2060.

Hwang, H.W., Wentzel, E.A., and Mendell, J.T. (2009). Cell-cell contact globally activates microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***106***, 7016-7021.

I, J

Ibanez-Ventoso, C., Vora, M., and Driscoll, M. (2008). Sequence relationships among C. elegans, D. melanogaster and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One* ***3***, e2818.

Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Luhrmann, R., and Achsel, T. (2002). The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA* ***8***, 1489-1501.

Inomata, M., Tagawa, H., Guo, Y.M., Kameoka, Y., Takahashi, N., and Sawada, K. (2009). MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood* ***113***, 396-402.

Inoue, N., Izui-Sarumaru, T., Murakami, Y., Endo, Y., Nishimura, J., Kurokawa, K., Kuwayama, M., Shime, H., Machii, T., Kanakura, Y.*, et al.* (2006). Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* ***108***, 4232-4236.

Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M.*, et al.* (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* ***65***, 7065-7070.

Iorio, M.V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C.G., Alder, H.*, et al.* (2007). MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* ***67***, 8699-8707.

Ivanovska, I., Ball, A.S., Diaz, R.L., Magnus, J.F., Kibukawa, M., Schelter, J.M., Kobayashi, S.V., Lim, L., Burchard, J., Jackson, A.L.*, et al.* (2008). MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol Cell Biol* ***28***, 2167-2174.

Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* ***11***, 113-127.

Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., and Chan, E.K. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol* ***7***, 1267-1274.

Jiang, S., Zhang, H.W., Lu, M.H., He, X.H., Li, Y., Gu, H., Liu, M.F., and Wang, E.D. (2010). MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res* ***70***, 3119-3127.

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

Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J.*, et al.* (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* ***67***, 7713-7722.

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

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* ***120***, 635-647.

Johnston, R.J., Jr., Chang, S., Etchberger, J.F., Ortiz, C.O., and Hobert, O. (2005). MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***102***, 12449-12454.

Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Bartel, B. (2006). MicroRNAS and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* ***57***, 19-53.

Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* ***309***, 1577-1581.

K

Kadener, S., Rodriguez, J., Abruzzi, K.C., Khodor, Y.L., Sugino, K., Marr, M.T., 2nd, Nelson, S., and Rosbash, M. (2009). Genome-wide identification of targets of the drosha-pasha/DGCR8 complex. *RNA* ***15***, 537-545.

Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* ***19***, 489-501.

Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F.*, et al.* (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One* ***4***, e6146.

Karres, J.S., Hilgers, V., Carrera, I., Treisman, J., and Cohen, S.M. (2007). The conserved microRNA miR-8 tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in Drosophila. *Cell* ***131***, 136-145.

Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T.*, et al.* (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* ***96***, 111-115.

Kawahara, Y., Megraw, M., Kreider, E., Iizasa, H., Valente, L., Hatzigeorgiou, A.G., and Nishikura, K. (2008). Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res* ***36***, 5270-5280.

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

Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* ***95***, 1017-1026.

Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., and Segal, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* ***39***, 1278-1284.

Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans. *Genes Dev* ***15***, 2654-2659.

Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* ***115***, 209-216.

Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* ***10***, 126-139.

Kim, Y.K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* ***26***, 775-783.

Kim, Y.K., Yeo, J., Ha, M., Kim, B., and Kim, V.N. (2011). Cell Adhesion-Dependent Control of MicroRNA Decay. *Mol Cell* ***43***, 1005-1014.

Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* ***129***, 1141-1151.

Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Ambesi-Impiombato, A., Califano, A., Migliazza, A., Bhagat, G.*, et al.* (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* ***17***, 28-40.

Kloosterman, W.P., Wienholds, E., Ketting, R.F., and Plasterk, R.H. (2004). Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res* ***32***, 6284-6291.

Kluiver, J., Poppema, S., de Jong, D., Blokzijl, T., Harms, G., Jacobs, S., Kroesen, B.J., and van den Berg, A. (2005). BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* ***207***, 243-249.

Kondo, N., Toyama, T., Sugiura, H., Fujii, Y., and Yamashita, H. (2008). miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Res* ***68***, 5004-5008.

Kong, W., He, L., Coppola, M., Guo, J., Esposito, N.N., Coppola, D., and Cheng, J.Q. (2010). MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J Biol Chem* ***285***, 17869-17879.

Konopka, W., Kiryk, A., Novak, M., Herwerth, M., Parkitna, J.R., Wawrzyniak, M., Kowarsch, A., Michaluk, P., Dzwonek, J., Arnsperger, T.*, et al.* (2010). MicroRNA loss enhances learning and memory in mice. *J Neurosci* ***30***, 14835-14842.

Krek, A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M.*, et al.* (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* ***37***, 495-500.

Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M.B., Ribi, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H.J., Schubeler, D.*, et al.* (2010). Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell* ***141***, 618-631.

Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* ***438***, 685-689.

Kuchenbauer, F., Mah, S.M., Heuser, M., McPherson, A., Ruschmann, J., Rouhi, A., Berg, T., Bullinger, L., Argiropoulos, B., Morin, R.D.*, et al.* (2011). Comprehensive analysis of mammalian miRNA* species and their role in myeloid cells. *Blood*.

Kumar, M.S., Erkeland, S.J., Pester, R.E., Chen, C.Y., Ebert, M.S., Sharp, P.A., and Jacks, T. (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***105***, 3903-3908.

Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* ***39***, 673-677.

Kumar, M.S., Pester, R.E., Chen, C.Y., Lane, K., Chin, C., Lu, J., Kirsch, D.G., Golub, T.R., and Jacks, T. (2009). Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev* ***23***, 2700-2704.

L

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* ***294***, 853-858.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* ***12***, 735-739.

Lambertz, I., Nittner, D., Mestdagh, P., Denecker, G., Vandesompele, J., Dyer, M.A., and Marine, J.C. (2010). Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death Differ* ***17***, 633-641.

Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M.*, et al.* (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* ***129***, 1401-1414.

Landthaler, M., Gaidatzis, D., Rothballer, A., Chen, P.Y., Soll, S.J., Dinic, L., Ojo, T., Hafner, M., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2008). Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA* ***14***, 2580-2596.

Landthaler, M., Yalcin, A., and Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* ***14***, 2162-2167.
Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science* ***294***, 858-862.
Laurent, L.C. (2008). MicroRNAs in embryonic stem cells and early embryonic development. *J Cell Mol Med* ***12***, 2181-2188.
Lazzaretti, D., Tournier, I., and Izaurralde, E. (2009). The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA* ***15***, 1059-1066.
Lee, E.J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G.J., Lerner, M.R., Frankel, W.L., Morgan, D.L., Postier, R.G., Brackett, D.J., and Schmittgen, T.D. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* ***120***, 1046-1054.
Lee, K.H., Goan, Y.G., Hsiao, M., Lee, C.H., Jian, S.H., Lin, J.T., Chen, Y.L., and Lu, P.J. (2009). MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer. *Exp Cell Res* ***315***, 2529-2538.
Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. *Science* ***294***, 862-864.
Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* ***75***, 843-854.
Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S*., et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* ***425***, 415-419.
Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* ***25***, 522-532.
Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* ***21***, 4663-4670.
Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004a). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* ***23***, 4051-4060.
Lee, Y.S., and Dutta, A. (2007). The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* ***21***, 1025-1030.
Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W. (2004b). Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* ***117***, 69-81.
Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* ***120***, 15-20.
Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* ***115***, 787-798.
Li, N., Flynt, A.S., Kim, H.R., Solnica-Krezel, L., and Patton, J.G. (2008). Dispatched Homolog 2 is targeted by miR-214 through a combination of three weak microRNA recognition sites. *Nucleic Acids Res* ***36***, 4277-4285.
Li, X., and Carthew, R.W. (2005). A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the Drosophila eye. *Cell* ***123***, 1267-1277.
Li, X., Cassidy, J.J., Reinke, C.A., Fischboeck, S., and Carthew, R.W. (2009a). A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development. *Cell* ***137***, 273-282.
Li, Y., Pei, J., Xia, H., Ke, H., Wang, H., and Tao, W. (2003). Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition. *Oncogene* ***22***, 4398-4405.
Li, Y., Tan, W., Neo, T.W., Aung, M.O., Wasser, S., Lim, S.G., and Tan, T.M. (2009b). Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* ***100***, 1234-1242.
Lian, S.L., Li, S., Abadal, G.X., Pauley, B.A., Fritzler, M.J., and Chan, E.K. (2009). The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *RNA* ***15***, 804-813.

Liang, X.H., and Crooke, S.T. (2011). Depletion of key protein components of the RISC pathway impairs pre-ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* ***39***, 4875-4889.
Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* ***433***, 769-773.
Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003). The microRNAs of Caenorhabditis elegans. *Genes Dev* ***17***, 991-1008.
Lin, R.J., Lin, Y.C., Chen, J., Kuo, H.H., Chen, Y.Y., Diccianni, M.B., London, W.B., Chang, C.H., and Yu, A.L. (2010). microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res* ***70***, 7841-7850.
Lin, S.L., Chang, D.C., Lin, C.H., Ying, S.Y., Leu, D., and Wu, D.T. (2011). Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res* ***39***, 1054-1065.
Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol* ***11***, 576-577.
Linsley, P.S., Schelter, J., Burchard, J., Kibukawa, M., Martin, M.M., Bartz, S.R., Johnson, J.M., Cummins, J.M., Raymond, C.K., Dai, H.*, et al.* (2007). Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* ***27***, 2240-2252.
Liu, C.G., Calin, G.A., Meloon, B., Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Zupo, S., Dono, M.*, et al.* (2004a). An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***101***, 9740-9744.
Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004b). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* ***305***, 1437-1441.
Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., 3rd, Parker, R., and Hannon, G.J. (2005a). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* ***7***, 1261-1266.
Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005b). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* ***7***, 719-723.
Liu, Q., Fu, H., Sun, F., Zhang, H., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., and Zheng, X. (2008). miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res* ***36***, 5391-5404.
Lopez, J.I., Camenisch, T.D., Stevens, M.V., Sands, B.J., McDonald, J., and Schroeder, J.A. (2005). CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res* ***65***, 6755-6763.
Louie, M.C., Zou, J.X., Rabinovich, A., and Chen, H.W. (2004). ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* ***24***, 5157-5171.
Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A.*, et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* ***435***, 834-838.
Lu, Z., Liu, M., Stribinskis, V., Klinge, C.M., Ramos, K.S., Colburn, N.H., and Li, Y. (2008). MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* ***27***, 4373-4379.
Lui, W.O., Pourmand, N., Patterson, B.K., and Fire, A. (2007). Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res* ***67***, 6031-6043.
Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* ***303***, 95-98.
Lynn, F.C., Skewes-Cox, P., Kosaka, Y., McManus, M.T., Harfe, B.D., and German, M.S. (2007). MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* ***56***, 2938-2945.
Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***104***, 9667-9672.

M

Ma, J.B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* ***429***, 318-322.

Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. *Nature* ***434***, 666-670.

Ma, X., Kumar, M., Choudhury, S.N., Becker Buscaglia, L.E., Barker, J.R., Kanakamedala, K., Liu, M.F., and Li, Y. (2011). Loss of the miR-21 allele elevates the expression of its target genes and reduces tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***108***, 10144-10149.

Ma, Z., Swede, H., Cassarino, D., Fleming, E., Fire, A., and Dadras, S.S. (2011). Up-regulated Dicer expression in patients with cutaneous melanoma. *PLoS One* ***6***, e20494.

MacRae, I.J., and Doudna, J.A. (2007). Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* ***17***, 138-145.

MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***105***, 512-517.

Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* ***311***, 195-198.

Makeyev, E.V., Zhang, J., Carrasco, M.A., and Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* ***27***, 435-448.

Manche, L., Green, S.R., Schmedt, C., and Mathews, M.B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* ***12***, 5238-5248.

Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* ***19***, 2979-2990.

Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M., and Nicolas, J.C. (1999). Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol* ***73***, 4385-4392.

Markou, A., Tsaroucha, E.G., Kaklamanis, L., Fotinou, M., Georgoulias, V., and Lianidou, E.S. (2008). Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem* ***54***, 1696-1704.

Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* ***13***, 1102-1107.

Martello, G., Rosato, A., Ferrari, F., Manfrin, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Enzo, E., Guzzardo, V., Rondina, M., Spruce, T.*, et al.* (2010). A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell* ***141***, 1195-1207.

Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Garcia-Palencia, P., and Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res* ***61***, 6234-6238.

Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* ***110***, 563-574.

Marton, S., Garcia, M.R., Robello, C., Persson, H., Trajtenberg, F., Pritsch, O., Rovira, C., Naya, H., Dighiero, G., and Cayota, A. (2008). Small RNAs analysis in CLL reveals a deregulation of miRNA expression and novel miRNA candidates of putative relevance in CLL pathogenesis. *Leukemia* ***22***, 330-338.

Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S.*, et al.* (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* ***317***, 1764-1767.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* ***123***, 607-620.

Mattick, J.S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* ***5***, 316-323.

Mattie, M.D., Benz, C.C., Bowers, J., Sensinger, K., Wong, L., Scott, G.K., Fedele, V., Ginzinger, D., Getts, R., and Haqq, C. (2006). Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* ***5***, 24.

Mayr, C., Hemann, M.T., and Bartel, D.P. (2007). Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* ***315***, 1576-1579.

Medina, P.P., Nolde, M., and Slack, F.J. (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* ***467***, 86-90.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* ***15***, 185-197.

Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* ***15***, 2149-2155.

Melo, S.A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G.*, et al.* (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* ***18***, 303-315.

Melo, S.A., Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C.*, et al.* (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet* ***41***, 365-370.

Mendell, J.T. (2008). miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* ***133***, 217-222.

Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J.T., Jiang, J., Schmittgen, T.D., and Patel, T. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* ***130***, 2113-2129.

Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., and Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* ***133***, 647-658.

Merritt, W.M., Lin, Y.G., Han, L.Y., Kamat, A.A., Spannuth, W.A., Schmandt, R., Urbauer, D., Pennacchio, L.A., Cheng, J.F., Nick, A.M.*, et al.* (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med* ***359***, 2641-2650.

Mertens-Talcott, S.U., Chintharlapalli, S., Li, X., and Safe, S. (2007). The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* ***67***, 11001-11011.

Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., Viehmann, S., and Borkhardt, A. (2004). High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* ***39***, 167-169.

Mi, S., Li, Z., Chen, P., He, C., Cao, D., Elkahloun, A., Lu, J., Pelloso, L.A., Wunderlich, M., Huang, H.*, et al.* (2010). Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***107***, 3710-3715.

Michael, M.Z., SM, O.C., van Holst Pellekaan, N.G., Young, G.P., and James, R.J. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* ***1***, 882-891.

Michlewski, G., Guil, S., Semple, C.A., and Caceres, J.F. (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell* ***32***, 383-393.

Minks, M.A., West, D.K., Benvin, S., and Baglioni, C. (1979). Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem* ***254***, 10180-10183.

Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Abbott, A.L., Lau, N.C., Hellman, A.B., McGonagle, S.M., Bartel, D.P., Ambros, V.R., and Horvitz, H.R. (2007). Most Caenorhabditis elegans microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS Genet* ***3***, e215.

Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* ***16***, 495-505.

Morin, R.D., O'Connor, M.D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A.L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M.*, et al.* (2008). Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* ***18***, 610-621.

Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., and Proudfoot, N.J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol* ***15***, 902-909.

Mortensen, R.D., Serra, M., Steitz, J.A., and Vasudevan, S. (2011). Posttranscriptional activation of gene expression in Xenopus laevis oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc Natl Acad Sci U S A* ***108***, 8281-8286.

Moss, E.G., Lee, R.C., and Ambros, V. (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in C. elegans and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell* ***88***, 637-646.

Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* ***16***, 720-728.

Muralidhar, B., Goldstein, L.D., Ng, G., Winder, D.M., Palmer, R.D., Gooding, E.L., Barbosa-Morais, N.L., Mukherjee, G., Thorne, N.P., Roberts, I.*, et al.* (2007). Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J Pathol* ***212***, 368-377.

Muralidhar, B., Winder, D., Murray, M., Palmer, R., Barbosa-Morais, N., Saini, H., Roberts, I., Pett, M., and Coleman, N. (2011). Functional evidence that Drosha overexpression in cervical squamous cell carcinoma affects cell phenotype and microRNA profiles. *J Pathol* ***224***, 496-507.

Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S., and Hannon, G.J. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***102***, 12135-12140.

Myslinski, E., Ame, J.C., Krol, A., and Carbon, P. (2001). An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res* ***29***, 2502-2509.

N

Naguibneva, I., Ameyar-Zazoua, M., Polesskaya, A., Ait-Si-Ali, S., Groisman, R., Souidi, M., Cuvellier, S., and Harel-Bellan, A. (2006). The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol* ***8***, 278-284.

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). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol* ***4***, 859-864.

Nakamura, T., Canaani, E., and Croce, C.M. (2007). Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***104***, 10980-10985.

Nanbo, A., Sugden, A., and Sugden, B. (2007). The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *EMBO J* ***26***, 4252-4262.

Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* ***2***, 279-289.

Navon, R., Wang, H., Steinfeld, I., Tsalenko, A., Ben-Dor, A., and Yakhini, Z. (2009). Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types. *PLoS One* ***4***, e8003.

Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F.*, et al.* (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* ***10***, 515-527.

Newman, M.A., and Hammond, S.M. (2010). Lin-28: an early embryonic sentinel that blocks Let-7 biogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* ***42***, 1330-1333.

Nielsen, C.B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J., and Burge, C.B. (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* ***13***, 1894-1910.
Nissan, X., Denis, J.A., Saidani, M., Lemaitre, G., Peschanski, M., and Baldeschi, C. (2011). miR-203 modulates epithelial differentiation of human embryonic stem cells towards epidermal stratification. *Dev Biol* ***356***, 506-515.
Noh, H., Hong, S., Dong, Z., Pan, Z.K., Jing, Q., and Huang, S. (2011). Impaired MicroRNA Processing Facilitates Breast Cancer Cell Invasion by Upregulating Urokinase-Type Plasminogen Activator Expression. *Genes Cancer* ***2***, 140-150.
Northcott, P.A., Fernandez, L.A., Hagan, J.P., Ellison, D.W., Grajkowska, W., Gillespie, Y., Grundy, R., Van Meter, T., Rutka, J.T., Croce, C.M.*, et al.* (2009). The miR-17/92 polycistron is up-regulated in sonic hedgehog-driven medulloblastomas and induced by N-myc in sonic hedgehog-treated cerebellar neural precursors. *Cancer Res* ***69***, 3249-3255.
Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* ***13***, 1108-1114.
Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* ***107***, 309-321.

O

O'Connell, R.M., Rao, D.S., Chaudhuri, A.A., Boldin, M.P., Taganov, K.D., Nicoll, J., Paquette, R.L., and Baltimore, D. (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* ***205***, 585-594.
O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., and Huang, D.C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* ***17***, 384-395.
O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* ***435***, 839-843.
Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* ***326***, 1275-1279.
Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. *Cell* ***130***, 89-100.
Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* ***18***, 1655-1666.
Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y.T., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* ***15***, 354-363.
Okazaki, Y., Furuno, M., Kasukawa, T., Adachi, J., Bono, H., Kondo, S., Nikaido, I., Osato, N., Saito, R., Suzuki, H.*, et al.* (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* ***420***, 563-573.
Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.J., Lowe, S.W., Hannon, G.J., and He, L. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev* ***23***, 2839-2849.
Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* ***216***, 671-680.
Olson, P., Lu, J., Zhang, H., Shai, A., Chun, M.G., Wang, Y., Libutti, S.K., Nakakura, E.K., Golub, T.R., and Hanahan, D. (2009). MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer. *Genes Dev* ***23***, 2152-2165.
Orom, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* ***30***, 460-471.
Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., and Seto, M. (2004). Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* ***64***, 3087-3095.

Ozen, M., Creighton, C.J., Ozdemir, M., and Ittmann, M. (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene **27***, 1788-1793.
Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev **22***, 3172-3183.

P

Paddison, P.J., Caudy, A.A., and Hannon, G.J. (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A **99***, 1443-1448.
Pampalakis, G., Diamandis, E.P., Katsaros, D., and Sotiropoulou, G. (2010). Down-regulation of dicer expression in ovarian cancer tissues. *Clin Biochem **43***, 324-327.
Park, H., Davies, M.V., Langland, J.O., Chang, H.W., Nam, Y.S., Tartaglia, J., Paoletti, E., Jacobs, B.L., Kaufman, R.J., and Venkatesan, S. (1994). TAR RNA-binding protein is an inhibitor of the interferon-induced protein kinase PKR. *Proc Natl Acad Sci U S A **91***, 4713-4717.
Park, S.M., Gaur, A.B., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev **22***, 894-907.
Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2004). Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J **23***, 4727-4737.
Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature **434***, 663-666.
Patel, R.C., and Sen, G.C. (1998). PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J **17***, 4379-4390.
Pauley, K.M., Eystathioy, T., Jakymiw, A., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., and Chan, E.K. (2006). Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis. *EMBO Rep **7***, 904-910.
Pavlidis, N., and Fizazi, K. (2005). Cancer of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol **54***, 243-250.
Pawlicki, J.M., and Steitz, J.A. (2008). Primary microRNA transcript retention at sites of transcription leads to enhanced microRNA production. *J Cell Biol **182***, 61-76.
Peric, D., Chvalova, K., and Rousselet, G. (2011). Identification of microprocessor-dependent cancer cells allows screening for growth-sustaining micro-RNAs. *Oncogene*.
Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell **21***, 533-542.
Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M.R., Shah, M.H., Nicoloso, M.S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pilozzi, E., Liu, C.G., Negrini, M.*, et al.* (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell **13***, 272-286.
Pham, J.W., Pellino, J.L., Lee, Y.S., Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in Drosophila. *Cell **117***, 83-94.
Pickering, M.T., Stadler, B.M., and Kowalik, T.F. (2009). miR-17 and miR-20a temper an E2F1-induced G1 checkpoint to regulate cell cycle progression. *Oncogene **28***, 140-145.
Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science **309***, 1573-1576.
Piskounova, E., Viswanathan, S.R., Janas, M., LaPierre, R.J., Daley, G.Q., Sliz, P., and Gregory, R.I. (2008). Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *J Biol Chem **283***, 21310-21314.
Poliseno, L., Salmena, L., Riccardi, L., Fornari, A., Song, M.S., Hobbs, R.M., Sportoletti, P., Varmeh, S., Egia, A., Fedele, G.*, et al.* (2010a). Identification of the miR-106b~25 microRNA cluster as a proto-oncogenic PTEN-targeting intron that cooperates with its host gene MCM7 in transformation. *Sci Signal **3***, ra29.
Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J., and Pandolfi, P.P. (2010b). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature **465***, 1033-1038.

Poy, M.N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P.E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P.*, et al.* (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* ***432***, 226-230.
Prochnik, S.E., Rokhsar, D.S., and Aboobaker, A.A. (2007). Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor. *Dev Genes Evol* ***217***, 73-77.

R

Radu, A., Neubauer, V., Akagi, T., Hanafusa, H., and Georgescu, M.M. (2003). PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol* ***23***, 6139-6149.
Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* ***123***, 621-629.
Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* ***11***, 1640-1647.
Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature* ***403***, 901-906.
Ren, B., Yu, G., Tseng, G.C., Cieply, K., Gavel, T., Nelson, J., Michalopoulos, G., Yu, Y.P., and Luo, J.H. (2006). MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene* ***25***, 1090-1098.
Reynolds, A., Anderson, E.M., Vermeulen, A., Fedorov, Y., Robinson, K., Leake, D., Karpilow, J., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2006). Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA* ***12***, 988-993.
Ritzi, M., Tillack, K., Gerhardt, J., Ott, E., Humme, S., Kremmer, E., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2003). Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Cell Sci* ***116***, 3971-3984.
Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., and Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* ***35***, 5944-5953.
Robb, G.B., and Rana, T.M. (2007). RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell* ***26***, 523-537.
Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* ***14***, 1902-1910.
Rogalla, P., Drechsler, K., Frey, G., Hennig, Y., Helmke, B., Bonk, U., and Bullerdiek, J. (1996). HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol* ***149***, 775-779.
Rosa, A., and Brivanlou, A.H. (2011). A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation. *EMBO J* ***30***, 237-248.
Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A.*, et al.* (2008). MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* ***26***, 462-469.
Rothe, F., Ignatiadis, M., Chaboteaux, C., Haibe-Kains, B., Kheddoumi, N., Majjaj, S., Badran, B., Fayyad-Kazan, H., Desmedt, C., Harris, A.L.*, et al.* (2011). Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PLoS One* ***6***, e20980.
Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* ***448***, 83-86.
Ruvkun, G., and Giusto, J. (1989). The Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-14 encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch. *Nature* ***338***, 313-319.
Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol* ***10***, 987-993.

S

Sachdeva, M., Wu, H., Ru, P., Hwang, L., Trieu, V., and Mo, Y.Y. (2011). MicroRNA-101-mediated Akt activation and estrogen-independent growth. *Oncogene* ***30***, 822-831.

Saetrom, P., Heale, B.S., Snove, O., Jr., Aagaard, L., Alluin, J., and Rossi, J.J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res* ***35***, 2333-2342.

Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., and Enright, A.J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***104***, 17719-17724.

Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., Hatano, E., Fukushima, A., Taniguchi, T., and Agata, Y. (2009). The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Mol Cell Biol* ***29***, 3754-3769.

Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., and Pandolfi, P.P. (2011). A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell* ***146***, 353-358.

Salzman, D.W., Shubert-Coleman, J., and Furneaux, H. (2007). P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *J Biol Chem* ***282***, 32773-32779.

Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., and Krueger, L.J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* ***67***, 9762-9770.

Sarhadi, V.K., Wikman, H., Salmenkivi, K., Kuosma, E., Sioris, T., Salo, J., Karjalainen, A., Knuutila, S., and Anttila, S. (2006). Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol* ***209***, 206-212.

Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., and Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics* ***82***, 323-330.

Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N., Yuen, S.T., Chan, T.L., Kwong, D.L., Au, G.K.*, et al.* (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* ***299***, 425-436.

Schnall-Levin, M., Zhao, Y., Perrimon, N., and Berger, B. (2010). Conserved microRNA targeting in Drosophila is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***107***, 15751-15756.

Schraivogel, D., Weinmann, L., Beier, D., Tabatabai, G., Eichner, A., Zhu, J.Y., Anton, M., Sixt, M., Weller, M., Beier, C.P.*, et al.* (2011). CAMTA1 is a novel tumour suppressor regulated by miR-9/9(*) in glioblastoma stem cells. *EMBO J* ***30***, 4309-4322.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* ***115***, 199-208.

Screpanti, I., Romani, L., Musiani, P., Modesti, A., Fattori, E., Lazzaro, D., Sellitto, C., Scarpa, S., Bellavia, D., Lattanzio, G.*, et al.* (1995). Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J* ***14***, 1932-1941.

Sears, J., Kolman, J., Wahl, G.M., and Aiyar, A. (2003). Metaphase chromosome tethering is necessary for the DNA synthesis and maintenance of oriP plasmids but is insufficient for transcription activation by Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Virol* ***77***, 11767-11780.

Sears, R., Ohtani, K., and Nevins, J.R. (1997). Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol Cell Biol* ***17***, 5227-5235.

Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev Biol* ***243***, 215-225.

Seitz, H., and Zamore, P.D. (2006). Rethinking the microprocessor. *Cell* ***125***, 827-829.

Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* ***455***, 58-63.

Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* ***5***, R13.

Sen, G.L., and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* ***7***, 633-636.
Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* ***88***, 593-602.
Sethi, P., and Lukiw, W.J. (2009). Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. *Neurosci Lett* ***459***, 100-104.
Shabalina, S.A., Ogurtsov, A.Y., Kondrashov, V.A., and Kondrashov, A.S. (2001). Selective constraint in intergenic regions of human and mouse genomes. *Trends Genet* ***17***, 373-376.
Shan, S.W., Lee, D.Y., Deng, Z., Shatseva, T., Jeyapalan, Z., Du, W.W., Zhang, Y., Xuan, J.W., Yee, S.P., Siragam, V.*, et al.* (2009). MicroRNA MiR-17 retards tissue growth and represses fibronectin expression. *Nat Cell Biol* ***11***, 1031-1038.
Shell, S., Park, S.M., Radjabi, A.R., Schickel, R., Kistner, E.O., Jewell, D.A., Feig, C., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2007). Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***104***, 11400-11405.
Shenoy, A., and Blelloch, R. (2009). Genomic analysis suggests that mRNA destabilization by the microprocessor is specialized for the auto-regulation of Dgcr8. *PLoS One* ***4***, e6971.
Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* ***300***, 805-808.
Shin, C., Nam, J.W., Farh, K.K., Chiang, H.R., Shkumatava, A., and Bartel, D.P. (2010). Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell* ***38***, 789-802.
Shiohama, A., Sasaki, T., Noda, S., Minoshima, S., and Shimizu, N. (2007). Nucleolar localization of DGCR8 and identification of eleven DGCR8-associated proteins. *Exp Cell Res* ***313***, 4196-4207.
Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., and Mo, Y.Y. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* ***26***, 2799-2803.
Sohn, S.Y., Bae, W.J., Kim, J.J., Yeom, K.H., Kim, V.N., and Cho, Y. (2007). Crystal structure of human DGCR8 core. *Nat Struct Mol Biol* ***14***, 847-853.
Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* ***10***, 1026-1032.
Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* ***305***, 1434-1437.
Sood, P., Krek, A., Zavolan, M., Macino, G., and Rajewsky, N. (2006). Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***103***, 2746-2751.
Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S.*, et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***98***, 10869-10874.
Soussi, T., and Beroud, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* ***1***, 233-240.
Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* ***123***, 1133-1146.
Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D.G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G.*, et al.* (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* ***317***, 376-381.
Strauss, W.M., Chen, C., Lee, C.T., and Ridzon, D. (2006). Nonrestrictive developmental regulation of microRNA gene expression. *Mamm Genome* ***17***, 833-840.
Su, H., Trombly, M.I., Chen, J., and Wang, X. (2009). Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev* ***23***, 304-317.

Su, X., Chakravarti, D., Cho, M.S., Liu, L., Gi, Y.J., Lin, Y.L., Leung, M.L., El-Naggar, A., Creighton, C.J., Suraokar, M.B.*, et al.* (2010). TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature* ***467***, 986-990.

Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R.L., Liu, J.Y., Bucay, N., Derynck, R., and Blelloch, R. (2011). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* ***29***, 443-448.

Sugito, N., Ishiguro, H., Kuwabara, Y., Kimura, M., Mitsui, A., Kurehara, H., Ando, T., Mori, R., Takashima, N., Ogawa, R.*, et al.* (2006). RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res* ***12***, 7322-7328.

Suh, M.R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.K., Moon, S.H., Lee, J.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y.*, et al.* (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* ***270***, 488-498.

Sun, G., Li, H., and Rossi, J.J. (2010). Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR. *Nucleic Acids Res* ***38***, 239-252.

Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* ***460***, 529-533.

Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H., and Schultz, R.M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* ***127***, 4147-4156.

Syljuasen, R.G. (2007). Checkpoint adaptation in human cells. *Oncogene* ***26***, 5833-5839.

Sylvestre, Y., De Guire, V., Querido, E., Mukhopadhyay, U.K., Bourdeau, V., Major, F., Ferbeyre, G., and Chartrand, P. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem* ***282***, 2135-2143.

Szafranska, A.E., Davison, T.S., John, J., Cannon, T., Sipos, B., Maghnouj, A., Labourier, E., and Hahn, S.A. (2007). MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* ***26***, 4442-4452.

T

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* ***126***, 663-676.

Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y.*, et al.* (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* ***64***, 3753-3756.

Takimoto, K., Wakiyama, M., and Yokoyama, S. (2009). Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA* ***15***, 1078-1089.

Talotta, F., Cimmino, A., Matarazzo, M.R., Casalino, L., De Vita, G., D'Esposito, M., Di Lauro, R., and Verde, P. (2009). An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation. *Oncogene* ***28***, 73-84.

Tam, O.H., Aravin, A.A., Stein, P., Girard, A., Murchison, E.P., Cheloufi, S., Hodges, E., Anger, M., Sachidanandam, R., Schultz, R.M.*, et al.* (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* ***453***, 534-538.

Tam, W. (2001). Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* ***274***, 157-167.

Tam, W., Ben-Yehuda, D., and Hayward, W.S. (1997). bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol Cell Biol* ***17***, 1490-1502.

Tam, W., Hughes, S.H., Hayward, W.S., and Besmer, P. (2002). Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis. *J Virol* ***76***, 4275-4286.

Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S.M., Ala, U., Karreth, F., Poliseno, L., Provero, P., Di Cunto, F.*, et al.* (2011). Coding-Independent Regulation of the Tumor Suppressor PTEN by Competing Endogenous mRNAs. *Cell* ***147***, 344-357.

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* ***455***, 1124-1128.

Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E.L., and Lipp, M. (1989). Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev* ***3***, 527-536.

Thermann, R., and Hentze, M.W. (2007). Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* ***447***, 875-878.

Thomas, J.W., Touchman, J.W., Blakesley, R.W., Bouffard, G.G., Beckstrom-Sternberg, S.M., Margulies, E.H., Blanchette, M., Siepel, A.C., Thomas, P.J., McDowell, J.C.*, et al.* (2003). Comparative analyses of multi-species sequences from targeted genomic regions. *Nature* ***424***, 788-793.

Thomas, M., Lange-Grunweller, K., Weirauch, U., Gutsch, D., Aigner, A., Grunweller, A., and Hartmann, R.K. (2011). The proto-oncogene Pim-1 is a target of miR-33a. *Oncogene*.

Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T., and Hammond, S.M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* ***20***, 2202-2207.

Tian, R.Q., Wang, X.H., Hou, L.J., Jia, W.H., Yang, Q., Li, Y.X., Liu, M., Li, X., and Tang, H. (2011). MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin A1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis. *J Biol Chem* ***286***, 25556-25563.

Till, S., Lejeune, E., Thermann, R., Bortfeld, M., Hothorn, M., Enderle, D., Heinrich, C., Hentze, M.W., and Ladurner, A.G. (2007). A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* ***14***, 897-903.

Ting, A.H., Suzuki, H., Cope, L., Schuebel, K.E., Lee, B.H., Toyota, M., Imai, K., Shinomura, Y., Tokino, T., and Baylin, S.B. (2008). A requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res* ***68***, 2570-2575.

Torres-Arzayus, M.I., Font de Mora, J., Yuan, J., Vazquez, F., Bronson, R., Rue, M., Sellers, W.R., and Brown, M. (2004). High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell* ***6***, 263-274.

Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A.D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* ***459***, 1010-1014.

Tran, N., McLean, T., Zhang, X., Zhao, C.J., Thomson, J.M., O'Brien, C., and Rose, B. (2007). MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* ***358***, 12-17.

Trang, P., Medina, P.P., Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Homer, R., Brown, D., Bader, A.G., Weidhaas, J.B.*, et al.* (2010). Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* ***29***, 1580-1587.

Triboulet, R., Chang, H.M., Lapierre, R.J., and Gregory, R.I. (2009). Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor. *RNA* ***15***, 1005-1011.

Tsai, N.P., Lin, Y.L., and Wei, L.N. (2009). MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem J* ***424***, 411-418.

U, V

Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y., and Saigo, K. (2000). Sensitive assay of RNA interference in Drosophila and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett* ***479***, 79-82.

van den Berg, A., Kroesen, B.J., Kooistra, K., de Jong, D., Briggs, J., Blokzijl, T., Jacobs, S., Kluiver, J., Diepstra, A., Maggio, E.*, et al.* (2003). High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* ***37***, 20-28.

van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Seraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J* ***21***, 6915-6924.

Vasudevan, S., and Steitz, J.A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* ***128***, 1105-1118.

Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* ***318***, 1931-1934.

Vella, M.C., Choi, E.Y., Lin, S.Y., Reinert, K., and Slack, F.J. (2004). The C. elegans microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. *Genes Dev* ***18***, 132-137.

Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R.*, et al.* (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* ***132***, 875-886.

Vilaprinyo, E., Alves, R., and Sorribas, A. (2010). Minimization of biosynthetic costs in adaptive gene expression responses of yeast to environmental changes. *PLoS Comput Biol* ***6***, e1000674.

Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J.W., and Lee, S.K. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* ***21***, 744-749.

Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* ***320***, 97-100.

Viswanathan, S.R., Powers, J.T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T.L., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L.A., Lockhart, V.L.*, et al.* (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet* ***41***, 843-848.

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

Voorhoeve, P.M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A.J., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y.P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A.*, et al.* (2007). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Adv Exp Med Biol* ***604***, 17-46.

W

Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* ***21***, 1857-1862.

Walters, R.W., Bradrick, S.S., and Gromeier, M. (2010). Poly(A)-binding protein modulates mRNA susceptibility to cap-dependent miRNA-mediated repression. *RNA* ***16***, 239-250.

Wang, B., Love, T.M., Call, M.E., Doench, J.G., and Novina, C.D. (2006). Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell* ***22***, 553-560.

Wang, B., Yanez, A., and Novina, C.D. (2008a). MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***105***, 5343-5348.

Wang, J., Liu, X., Wu, H., Ni, P., Gu, Z., Qiao, Y., Chen, N., Sun, F., and Fan, Q. (2010a). CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Res* ***38***, 5366-5383.

Wang, Q., Sun, Z., and Yang, H.S. (2008b). Downregulation of tumor suppressor Pdcd4 promotes invasion and activates both beta-catenin/Tcf and AP-1-dependent transcription in colon carcinoma cells. *Oncogene* ***27***, 1527-1535.

Wang, W., Peng, B., Wang, D., Ma, X., Jiang, D., Zhao, J., and Yu, L. (2011). Human tumor microRNA signatures derived from large-scale oligonucleotide microarray datasets. *Int J Cancer* ***129***, 1624-1634.

Wang, X., Tang, S., Le, S.Y., Lu, R., Rader, J.S., Meyers, C., and Zheng, Z.M. (2008c). Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One* ***3***, e2557.

Wang, Y., Baskerville, S., Shenoy, A., Babiarz, J.E., Baehner, L., and Blelloch, R. (2008d). Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* ***40***, 1478-1483.

Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* ***39***, 380-385.

Wang, Y., Rathinam, R., Walch, A., and Alahari, S.K. (2009). ST14 (suppression of tumorigenicity 14) gene is a target for miR-27b, and the inhibitory effect of ST14 on cell growth is independent of miR-27b regulation. *J Biol Chem* ***284***, 23094-23106.

Wang, Y., Yu, Y., Tsuyada, A., Ren, X., Wu, X., Stubblefield, K., Rankin-Gee, E.K., and Wang, S.E. (2010b). Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM. *Oncogene*.

Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T.*, et al.* (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* ***453***, 539-543.

Weng, L.P., Brown, J.L., and Eng, C. (2001). PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* ***10***, 599-604.

Weng, L.P., Smith, W.M., Dahia, P.L., Ziebold, U., Gil, E., Lees, J.A., and Eng, C. (1999). PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death. *Cancer Res* ***59***, 5808-5814.

Wianny, F., and Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* ***2***, 70-75.

Wiederschain, D., Wee, S., Chen, L., Loo, A., Yang, G., Huang, A., Chen, Y., Caponigro, G., Yao, Y.M., Lengauer, C.*, et al.* (2009). Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle* ***8***, 498-504.

Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell* ***75***, 855-862.

Witkos, T.M., Koscianska, E., and Krzyzosiak, W.J. (2011). Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med* ***11***, 93-109.

Wong, P., Iwasaki, M., Somervaille, T.C., Ficara, F., Carico, C., Arnold, C., Chen, C.Z., and Cleary, M.L. (2010). The miR-17-92 microRNA polycistron regulates MLL leukemia stem cell potential by modulating p21 expression. *Cancer Res* ***70***, 3833-3842.

Woods, K., Thomson, J.M., and Hammond, S.M. (2007). Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem* ***282***, 2130-2134.

Wu, H., Neilson, J.R., Kumar, P., Manocha, M., Shankar, P., Sharp, P.A., and Manjunath, N. (2007). miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PLoS One* ***2***, e1020.

Wu, H., Xu, H., Miraglia, L.J., and Crooke, S.T. (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol Chem* ***275***, 36957-36965.

Wu, J.F., Shen, W., Liu, N.Z., Zeng, G.L., Yang, M., Zuo, G.Q., Gan, X.N., Ren, H., and Tang, K.F. (2011). Down-regulation of Dicer in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* ***28***, 804-809.

Wu, L., and Belasco, J.G. (2005). Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* ***25***, 9198-9208.

Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***103***, 4034-4039.

Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J.*, et al.* (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* ***414***, 457-462.

X, Y

Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J.M., Kutok, J.L., and Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* ***9***, 405-414.

Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J.A., and Kosik, K.S. (2009). MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* ***137***, 647-658.

Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N.J. (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* ***85***, 537-548.

Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., and Zhou, M.M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* ***426***, 468-474.

Yan, L.X., Huang, X.F., Shao, Q., Huang, M.Y., Deng, L., Wu, Q.L., Zeng, Y.X., and Shao, J.Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* ***14***, 2348-2360.

Yan, M., Huang, H.Y., Wang, T., Wan, Y., Cui, S.D., Liu, Z.Z., and Fan, Q.X. (2011). Dysregulated Expression of Dicer and Drosha in Breast Cancer. *Pathol Oncol Res*.

Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T.*, et al.* (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* ***9***, 189-198.

Yang, H.S., Knies, J.L., Stark, C., and Colburn, N.H. (2003). Pdcd4 suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting AP-1 transactivation. *Oncogene* ***22***, 3712-3720.

Yang, J.S., Phillips, M.D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A.C., Chen, K.C., and Lai, E.C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* ***17***, 312-326.

Yang, S., Tutton, S., Pierce, E., and Yoon, K. (2001). Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* ***21***, 7807-7816.

Yang, W., Chendrimada, T.P., Wang, Q., Higuchi, M., Seeburg, P.H., Shiekhattar, R., and Nishikura, K. (2006). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol* ***13***, 13-21.

Yekta, S., Shih, I.H., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* ***304***, 594-596.

Yeom, K.H., Lee, Y., Han, J., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* ***34***, 4622-4629.

Yi, R., O'Carroll, D., Pasolli, H.A., Zhang, Z., Dietrich, F.S., Tarakhovsky, A., and Fuchs, E. (2006). Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet* ***38***, 356-362.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* ***17***, 3011-3016.

Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* ***17***, 17-23.

Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G.S., Jackson, P., Groopman, J.D., Manning, J.E., Harris, C.C., and Herman, J.G. (2001). SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* ***28***, 29-35.

Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J.*, et al.* (2007). let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* ***131***, 1109-1123.

Yu, Z., Willmarth, N.E., Zhou, J., Katiyar, S., Wang, M., Liu, Y., McCue, P.A., Quong, A.A., Lisanti, M.P., and Pestell, R.G. (2010). microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***107***, 8231-8236.

Yuan, Y.R., Pei, Y., Ma, J.B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.Y., Dauter, Z., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005). Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell* ***19***, 405-419.

Z

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* ***101***, 25-33.

Zdanowicz, A., Thermann, R., Kowalska, J., Jemielity, J., Duncan, K., Preiss, T., Darzynkiewicz, E., and Hentze, M.W. (2009). Drosophila miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression. *Mol Cell* ***35***, 881-888.

Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstadt, S., and Izaurralde, E. (2009). The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol Cell Biol* ***29***, 6220-6231.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* ***32***, 4776-4785.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* ***280***, 27595-27603.

Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* ***118***, 57-68.

Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R.*, et al.* (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* ***103***, 9136-9141.

Zhong, X., Li, N., Liang, S., Huang, Q., Coukos, G., and Zhang, L. (2010). Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *J Biol Chem* ***285***, 41961-41971.

Zhu, S., Si, M.L., Wu, H., and Mo, Y.Y. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* ***282***, 14328-14336.

Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., and Mo, Y.Y. (2008). MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* ***18***, 350-359.

Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA* ***15***, 781-793.