HAL
open science

Petits ARN régulateurs (microARN, siARN, piARN)

Hervé Seitz, Sophie Mockly

To cite this version:

Hervé Seitz, Sophie Mockly. Petits ARN régulateurs (microARN, siARN, piARN) : Cours introductif donné dans le cadre de l'école thématique du CNRS " InteRNAt " du 6 au 10 octobre 2019 (https://internat.sciencesconf.org/).. 2020. hal-02615462

HAL Id: hal-02615462

https://hal.science/hal-02615462

Submitted on 30 Nov 2020

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.

Petits ARN régulateurs (microARN, siARN, piARN)

Hervé Seitz et Sophie Mockly

Contenu des cours introductifs donnés dans le cadre de l'école thématique du CNRS « InteRNAt », organisée à Sète du 6 au 10 octobre 2019.

Table des matières

1 Avant-propos **5**

2 L'interférence à ARN : une introduction **7**
2.1 Mise en évidence 7
2.2 Dissection du mécanisme 10
2.3 Application de l'interférence à ARN 14
2.4 Fonctions naturelles de l'interférence à ARN 15

3 microARN : une introduction **17**
3.1 La découverte des microARN 17
3.2 Mode d'action des microARN 21
3.3 Maturation des microARN 24

4 La biochimie du complexe RISC **27**
4.1 Définition du complexe RISC 27
4.2 La famille protéique Argonaute 28
4.3 Spécialisation des protéines Argonaute 31
4.4 Brin guide et brin passager 33
4.5 La règle d'asymétrie 34

5 Conclusion **35**

6 Matériel pour l'enseignant : notions et exercices **37**
6.1 Analyse d'un corpus de documents : Caractérisation du mécanisme d'interférence à ARN 37
6.2 Analyse d'article : Stratégie virale de suppression de la régulation post-transcriptionnelle par les microARN chez l'hôte 43
6.3 Analyse d'article : Biogenèse DICER-indépendante de miR-451 47
6.4 Analyse d'article : Régulation du développement de la Drosophile à l'échelle cellulaire par le microARN *bantam* 51

Bibliographie **55**

Index **72**

Table des figures

2.1 Origine des ARN double-brin dans les expériences de répression « par ARN antisens » 9
2.2 Biogenèse et caractéristiques biochimiques des siARN 12

3.1 Mise en évidence de la répression de *lin-14* par le microARN *lin-4* 18
3.2 Biogenèse canonique des microARN 25

4.1 Classification des protéines Argonaute 29
4.2 Structure du complexe RISC humain 32

Chapitre 1

Avant-propos

Ce document rassemble le contenu de plusieurs cours introductifs de la première demi-journée de l'école thématique du CNRS « InteRNAt », qui s'est tenue à Sète du 6 au 10 octobre 2019, devant 35 participants.

L'objectif de cette école thématique était de fournir à l'assistance, composée de chercheurs (personnels statutaires, post-doctorants et doctorants), une vision d'ensemble aussi complète que possible sur le domaine des petits ARN régulateurs eucaryotiques. À la différence d'un congrès classique, les conférences données dans le cadre d'une école thématique du CNRS constituent un ensemble cohérent, progressif, un véritable enseignement qui doit être suivi dans son intégralité par les participants. Le but de l'école thématique « InteRNAt » était de faire le point sur les connaissances établies sur ces petits ARN, de mentionner les controverses actuelles, de donner tous les éléments objectifs sur les controverses passées, de lever les ambiguïtés de nomenclature et de vocabulaire, de façon à donner aux participants les connaissances leur permettant de comprendre l'ensemble de la littérature du domaine.

Nous avons décidé de rendre public en langue française, pour une large diffusion, le contenu des cours introductifs donnés pendant la première demi-journée de l'école thématique : c'est l'objet des chapitres 2 à 4 du présent document. Dans le but de faciliter l'enseignement de ces notions par la communauté universitaire, le chapitre 6 propose des exercices sur les notions abordées dans les chapitres précédents.

Nous prévoyons d'organiser de nouvelles sessions de cette école thématique, *a priori* tous les deux ans (la prochaine édition pourrait donc avoir lieu en octobre 2021). Les informations pratiques (date, lieu, modalités d'inscription) seront diffusées sur la page des écoles thématiques de l'INSB du CNRS, et par les canaux de communication habituels de la communauté des chercheurs en biologie.

À titre indicatif, le programme de la session 2019 de l'école thématique était le suivant (les enseignements étaient dispensés en anglais) :

Date	**Cours**
Dimanche 6 octobre (après-midi)	*Biogenesis and mode of action of small RNAs (1)* (intervenants : H. Seitz, A. Verdel, K. Mochizuki)
Lundi 7 octobre (matin)	*Biogenesis and mode of action of small RNAs (2)* (intervenants : H. Seitz, S. Chambeyron)
Lundi 7 octobre (après-midi)	*Physiological roles of small RNAs* (intervenants : J. Cavaillé, H. Seitz)
Lundi 7 octobre (fin d'après-midi)	*The pecularities of* C. elegans *small RNA pathways* (intervenant : G. Cecere)
Mardi 8 octobre (matin)	*Transposable element repression, transcriptional effects of small RNAs* (intervenants : A. Verdel, K. Mochizuki, A. Pélisson, M. van den Beek)
Mardi 8 octobre (après-midi)	*Detection and quantification methods (theoretical lecture and practical class)* (intervenants : H. Seitz, M. van den Beek)
Mercredi 9 octobre (matin)	*Target identification methods (theoretical lecture and practical class)* (intervenants : H. Seitz, J. Cavaillé)
Mercredi 9 octobre (après-midi)	*Analysis of studies from the literature* (intervenants : S. Pfeffer, A. Verdel, M. van den Beek)
Mercredi 9 octobre (fin d'après-midi)	*The peculiarities of plant small RNA pathways* (intervenant : H. Vaucheret)
Jeudi 10 octobre (matin)	*Small RNAs in host-virus interactions* (intervenant : S. Pfeffer)
Jeudi 10 octobre (début d'après-midi)	*On-site evaluation of the school, open questions* (évaluation à chaud de l'école par les participants)

Ce document, à l'exception des figures du chapitre 6, est distribué sous la licence CC BY-ND 3.0 FR, qui autorise le partage libre de son contenu par tous moyens et sous tous formats, selon les conditions suivantes :

— **Attribution :** vous devez créditer le document, et intégrer un lien vers sa licence. Vous devez indiquer ces informations par tous les moyens raisonnables, sans toutefois suggérer que les auteurs vous soutiennent ou soutiennent la façon dont vous avez utilisé le contenu du document.
— **Pas de modification :** dans le cas où vous transformez ou créez à partir du matériel composant ce document, vous n'êtes pas autorisé à distribuer ou mettre à disposition le document modifié.

Les figures présentées dans le chapitre 6 (à partir de la page 37) ne sont pas concernées par cette licence : elles sont tirées d'articles publiés, couverts par d'autres licences, incompatibles avec la licence CC BY-ND 3.0 FR. Elles sont reproduites ici avec l'aimable autorisation des éditeurs de *Genes and Development*, *Nature* et *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* Faute d'autorisation d'utilisation de la part de l'éditeur *Elsevier*, certaines figures des exercices 6.1, 6.2 et 6.4 ont dû être remplacées par des liens hypertexte pointant vers ces figures sur le site web des journaux *Cell* et *Developmental Cell*.

À propos des auteurs : H. Seitz est directeur de recherche au CNRS ; il a rédigé les chapitres 2 à 5. S. Mockly est doctorante, monitrice de l'enseignement supérieur ; elle a rédigé le chapitre 6.

Remerciements : Les auteurs remercient chaleureusement Isabelle Busseau et Germain Busto pour leur relecture attentive et leurs suggestions d'amélioration du document.

Chapitre 2

L'interférence à ARN : une introduction

2.1 Mise en évidence

C'est en 1990 qu'ont été rapportées les premières observations des phénomènes dont nous allons parler : dans l'objectif de produire des fleurs de Pétunia plus intensément colorées, deux laboratoires avaient généré des plants transgéniques, qui surexprimaient les gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse des pigments de la fleur – et curieusement, dans plusieurs lignées transgéniques indépendantes, le gène ciblé n'était pas sur-exprimé, mais sous-exprimé, et leurs fleurs, au lieu d'être plus intensément colorées, étaient partiellement ou totalement blanches (van der Krol *et al.*, 1990; Napoli *et al.*, 1990). Il semblait donc que les copies transgéniques ajoutées, mais également, le gène endogène pré-existant à l'expérience, avaient été réprimés. On pouvait facilement proposer des explications à la répression du transgène (son intégrité avait pu être compromise au moment de l'insertion dans le génome ; il aurait pu s'insérer dans une région chromatinienne inactive), mais comment expliquer que le gène endogène ait également été réprimé ? D'autant que le phénomène n'était pas propre à un seul gène-cible : Napoli *et al.* (1990) avaient observé cette répression sur le gène de la chalcone synthase, et van der Krol *et al.* (1990) l'avaient également observé sur le gène de la chalcone synthase, et sur celui de la dihydroflavonol-4-reductase. Il semblait donc s'agir d'un phénomène général, qui réprimait à la fois le transgène, et tout gène endogène qui présentait une longue homologie avec le transgène ; cette répression dépendante de l'homologie a initialement été baptisée « co-suppression ». Quelques mois plus tard, un autre laboratoire rapportait une observation semblable, chez la Tomate, avec la répression du gène de la polygalacturonase par un transgène contenant une partie de la séquence du gène endogène (Smith *et al.*, 1990).

Ces observations rappelaient les interactions répressives entre transgènes, qui avaient été observées dans une variété de systèmes expérimentaux (voir Flavell (1994) pour une revue). Le mécanisme en restait mystérieux, mais il impliquait parfois des modifications chromatiniennes qui réprimaient la transcription des gènes ciblés. La co-suppression du gène de la chalcone synthase, quant à elle, était post-transcriptionnelle : dans les fleurs de Pétunia qui répriment simultanément le gène endogène et le transgène, chacun est transcrit à des taux similaires à ceux des fleurs qui ne répriment pas le gène (Van Blokland *et al.*, 1994). Il existe donc deux types de répression guidée par l'homologie : la répression transcriptionnelle (TGS, pour *transcriptional gene silencing*) et la répression post-transcriptionnelle (PTGS, pour *post-transcriptional gene silencing*), cette dernière étant à l'œuvre dans la répression de la chalcone synthase dans les pétunias transgéniques.

Dans la première moitié des années 1990, de nombreuses observations similaires de répression post-transcriptionnelle guidée par l'homologie se sont accumulées (chez les Plantes, parce qu'à l'époque la transgenèse était peu développée chez les Animaux). À chaque fois, un gène de Plante ou un virus était réprimé à la suite de l'introduction d'un transgène présentant une longue homologie avec la cible (Baulcombe, 1996). Le mécanisme de détection de l'homologie était encore inconnu ; il semblait peu crédible qu'il implique une reconnaissance de séquence par une protéine (puisque le PTGS est observé avec différents transgènes inducteurs, certains non-codants, et d'autres, codant des protéines très différentes

les unes des autres, il faudrait une coïncidence invraisemblable pour que chacun des transgènes testés se trouve coder une protéine qui reconnaîtrait spécifiquement les ARN qui lui sont homologues) : le seul mécanisme qu'on pouvait imaginer, pour reconnaître aussi universellement les homologies de séquence, impliquait l'appariement de deux brins d'acides nucléiques de séquence complémentaire (Baulcombe, 1996). Comme la cible du processus semblait être l'ARN transcrit par le transgène et par le gène endogène (puisque le PTGS réduit la concentration de l'ARN-cible sans affecter son taux de transcription), et comme l'ADN du transgène (nucléaire) pourrait difficilement s'apparier aux ARN-cibles viraux (qui sont cytoplasmiques), il fallait s'attendre à ce que la détection d'homologie se fasse par un appariement entre deux ARN (Baulcombe, 1996). D'autres raisonnements (tirés des similarités entre PTGS et répression par un ARN antisens, et de la présence d'unités de transcription en tête-bêche dans des constructions transgéniques provoquant le PTGS) aboutissaient également à l'hypothèse selon laquelle le PTGS découlait d'une hybridation entre ARN-cible et ARN antisens (Grierson *et al.*, 1991; Lindbo *et al.*, 1993).

Ce modèle impliquait que le transgène déclencheur soit transcrit sous la forme d'un ARN antisens, ou alors, qu'il soit transcrit sous la forme d'un ARN sens qui servirait ensuite de matrice à une polymérase à ARN dépendant de l'ARN (RdRP, pour : *RNA-dependent RNA polymerase*). Le PTGS serait alors la manifestation de l'existence d'un système de détection d'ARN aberrants (la nature de cette « aberration » restait vague, mais elle semblait distinguer les produits de transcription des transgènes, introduits artificiellement par l'Homme, des produits de transcription naturelle du génome), et qui déclencherait leur répression par dégradation des ARN homologues à l'ARN aberrant déclencheur.

C'est finalement du monde animal qu'est venue la confirmation expérimentale de cette idée. Des biologistes qui souhaitaient réprimer artificiellement et spécifiquement l'expression de gènes d'intérêt chez le Nématode *Cœnorhabditis elegans* utilisaient la technique dite des « ARN antisens » : en introduisant des ARN antisens de l'ARNm du gène ciblé (par un transgène sous le contrôle d'un promoteur en antisens, ou en injectant directement l'ARN antisens dans les cellules étudiées), il était possible d'inhiber spécifiquement l'expression du gène-cible (Fire *et al.*, 1991; Guo et Kemphues, 1995). On estimait à l'époque que ces ARN agissaient en s'hybridant sur l'ARN-cible, et que cet appariement inhiberait des étapes tardives de sa maturation, son export nucléo-cytoplasmique ou sa traduction en protéine. Mais, curieusement, il arrivait qu'un ARN contrôle (en orientation sens plutôt qu'antisens) réprime le gène-cible aussi efficacement (Fire *et al.*, 1991; Guo et Kemphues, 1995).

Pour expliquer que des ARN sens et des ARN antisens aient le même effet répresseur, Fire *et al.* (1998) ont imaginé que l'effet commun pouvait être dû à un contaminant commun. Un transgène, censé exprimer un ARN antisens, produit souvent également des ARN aberrants, transcrits à partir de promoteurs cryptiques, ou à partir de copies supplémentaires du transgène (les transgènes ajoutés au génome de *C. elegans* ont tendance à se concaténer sous forme de répétitions de copies multiples, éventuellement tronquées, et éventuellement orientées en tête-bêche). De la même manière, les ARN transcrits *in vitro* pour être injectés, sont produits par des polymérases recombinantes, dont la spécificité de promoteur n'est pas absolue : des événements de transcription peuvent s'initier, à basse fréquence, hors de leur promoteur dédié, dans une orientation ou dans l'autre (voir Figure 2.1). Il est donc prévisible que les ARN antisens, utilisés pour réprimer un gène d'intérêt dans le Nématode, soient contaminées par une petite dose d'ARN sens (susceptible de s'apparier à l'ARN antisens pour former un ARN double-brin) ; de la même manière, les ARN sens (qui devaient servir de contrôles négatifs) doivent être contaminés par une petite dose d'ARN antisens, auquel ils pourront s'hybrider. Il était donc concevable que l'effet répresseur, commun aux deux orientations d'ARN, soit dû à leur contaminant commun : l'ARN double-brin.

Effectivement, après purification soigneuse de l'ARN simple-brin (sens ou antisens), son injection chez le Nématode ne provoque plus de répression ; en revanche, l'injection de quantités même très faibles d'ARN double-brin provoque une répression efficace, et spécifique des gènes partageant une longue homologie avec l'ARN double-brin déclencheur (Fire *et al.*, 1998). C'est de cet article qu'on date habituellement la découverte de l'interférence à ARN (RNAi, pour : *RNA interference*). Pour la plus grande part de la communauté scientifique, le RNAi est donc une répression post-transcriptionnelle

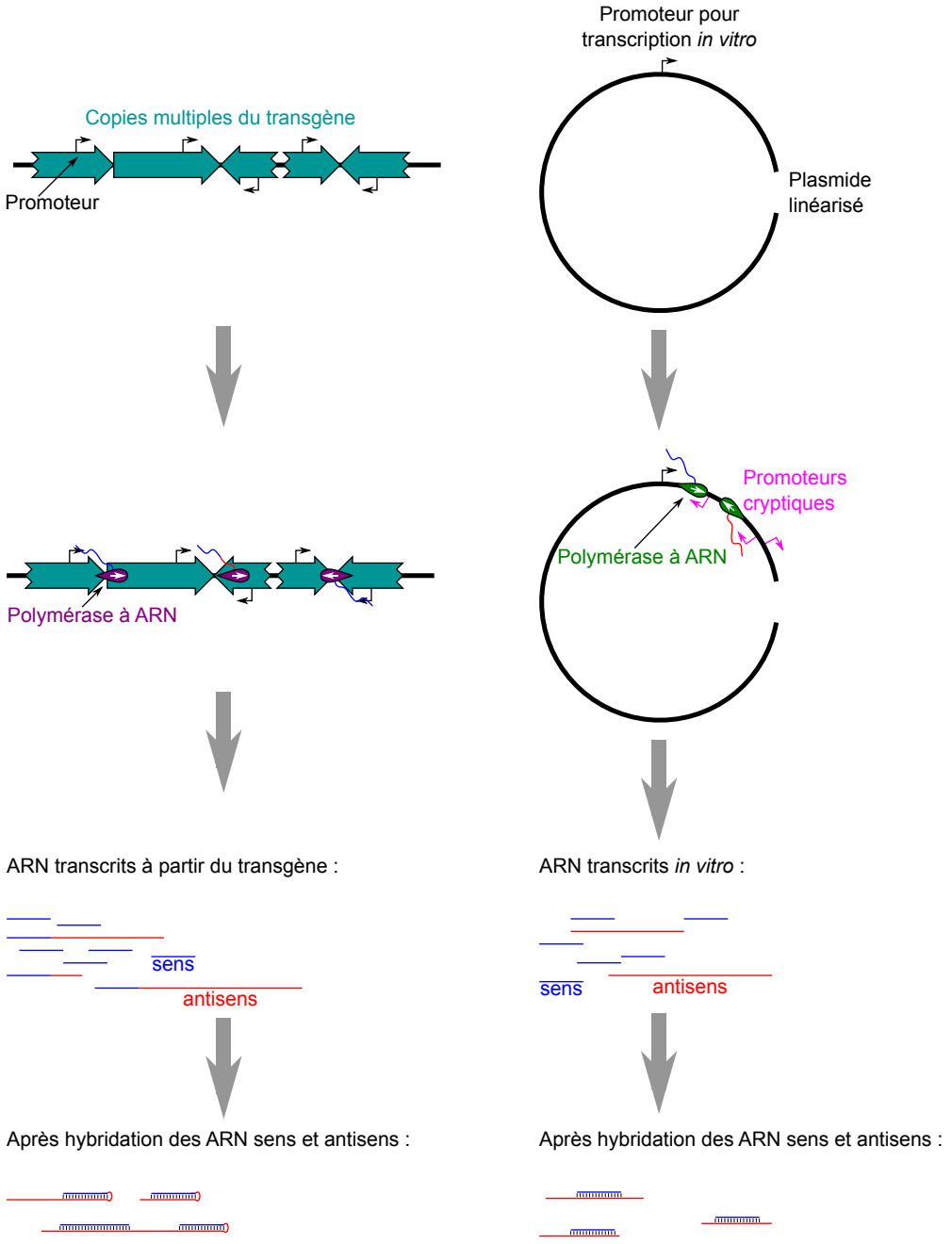


Figure 2.1 – **Origine des ARN double-brin dans les expériences de répression « par ARN antisens ».** Colonne de gauche : l'expression d'ARN à partir de transgènes (concaténés dans des orientations quelconques) produit des ARN bipartites sens et antisens, qui peuvent s'hybrider sur eux-mêmes, ou s'hybrider avec des ARN de polarité opposée. Colonne de droite : la transcription *in vitro* produit principalement l'ARN désiré, mais également de petites quantités d'ARN d'orientation quelconque (notamment : d'orientation opposée à celle de l'ARN désiré), issus d'événements de transcription initiés sur des promoteurs cryptiques.

spécifique de séquence, initiée par un ARN double-brin [1] ; mais les auteurs de cet article de 1998 posaient

1. Si cet article de 1998 résolvait beaucoup de mystères, il passait sous silence quelques détails : dans la description initiale de la stratégie des ARN antisens, l'ARNm ciblé ne semblait pas être dégradé par la répression (Fire *et al.*, 1991) ; et certaines régions de l'ARN en orientation « sens » ne déclenchaient pas de répression (Guo et Kemphues, 1995). Il est probable que ces incohérences soient dues à des problèmes expérimentaux dans les articles initiaux.

une définition différente du phénomène ; ils insistaient sur deux autres particularités étonnantes du RNAi :

— l'injection d'une petite quantité d'ARN double-brin dans la cavité de la tête ou de la queue suffisait à réprimer le gène-cible dans une grande partie de l'organisme du ver (même à de grandes distances du lieu d'injection), ce qui signifie qu'il existe des mécanismes de transport intercellulaire, et, probablement, d'amplification du signal de répression ;
— la répression du gène-cible est observée chez l'individu injecté, mais également chez sa descendance, la descendance de sa descendance, ..., sur plusieurs générations.

Pour les auteurs, le RNAi est donc un phénomène observable à l'échelle de l'organisme, alors que pour la plupart de leurs collègues, c'est un phénomène moléculaire : une répression post-transcriptionnelle initiée par les ARN double-bin (observable en cellules, et récapitulable *in vitro*). C'est cette définition « moléculaire » qui s'est imposée, et c'est celle que nous utiliserons dans le reste de cet ouvrage. Les aspects macroscopiques du RNAi chez le Nématode (diffusion inter-cellulaire, transmission transgénérationnelle et amplification) ont fait l'objet d'études dédiées (voir notamment Grishok *et al.* (2000); Smardon *et al.* (2000); Winston *et al.* (2002)).

L'initiation, par l'ARN double-brin, d'une répression post-transcriptionnelle spécifique des séquences homologues de l'ARN double-brin déclencheur, pouvait aussi expliquer le PTGS observé chez les Plantes (où, également, les transgènes s'insèrent essentiellement sous la forme de longues concaténations de copies plus ou moins tronquées, et dans des orientations quelconques), ainsi qu'un phénomène similaire chez un autre Eucaryote, le Champignon *Neurospora crassa* (Cogoni *et al.*, 1996).

2.2 Dissection du mécanisme

Nous avons vu que certains auteurs avaient imaginé que le PTGS chez les Plantes impliquait un appariement entre un ARN-cible et un ARN antisens (Grierson *et al.*, 1991; Lindbo *et al.*, 1993; Baulcombe, 1996). La principale difficulté de ce modèle tenait à l'observation de cet hypothétique ARN antisens : il n'était pas systématiquement observé dans les plantes qui manifestaient le PTGS, ou ne leur était pas spécifique. Partant du principe que cet ARN pouvait exister, mais qu'il échappait aux techniques de détection courantes (Baulcombe, 1996), Hamilton et Baulcombe (1999) ont cherché des petits ARN (trop courts pour être observés avec les protocoles expérimentaux publiés) spécifiques des cibles de PTGS. Ils ont ainsi détecté, dans plusieurs cas établis de PTGS chez la Tomate, le Tabac, le Pétunia et l'arabette *Arabidopsis thaliana*, une population d'ARN longs d'environ 25 nucléotides (nt), reconnus par une sonde spécifique des séquences de la cible du PTGS, et qui s'accumulaient dans les plantes soumises au PTGS, et seulement elles. Les petits ARN détectés étaient en orientation antisens (révélés par une sonde sens, de même polarité que l'ARN-cible du PTGS), mais, sur un exemple chez la Tomate, les auteurs ont également recherché des petits ARN sens (révélés avec une sonde antisens), et les ont également détectés, spécifiquement dans les plants soumis au PTGS (Hamilton et Baulcombe, 1999).

Dans le même temps, un autre laboratoire parvenait à récapituler la réaction de RNAi *in vitro*, dans un lysat d'embryon de Drosophile (Tuschl *et al.*, 1999). L'incubation d'un ARN double-brin synthétique, dans ce lysat, provoque la dégradation spécifique d'un ARNm-cible synthéthique (qui contient une région d'identité parfaite à l'un des deux brins de l'ARN double-brin – et donc une complémentarité parfaite à l'autre brin). La disponibilité d'un système *in vitro* a grandement accéléré l'analyse mécanistique du RNAi ; elle a notamment permis d'établir que la réaction nécessitait un apport d'ATP, qu'elle s'accompagnait, comme chez les Plantes *in vivo*, de l'accumulation de petits ARN double-brin (ici mesurés entre 21 et 23 nt par brin), et que ces petits ARN dérivaient du clivage du long ARN double-brin déclencheur (Zamore *et al.*, 2000). L'ARN-cible est clivé à de multiples sites dans sa région d'homologie avec l'ARN double-brin, et ces sites tendent à être espacés régulièrement, tous les 21 à 23 nt environ, ce qui suggérait que les petits ARN servaient de guides à la réaction de clivage. Un autre système acellulaire (un lysat de cellules de Drosophile en culture) peut également récapituler le RNAi *in vitro*, qui s'accompagne aussi de l'accumulation de petits ARN (Hammond *et al.*,

2000) ; et la co-injection d'ARN double-brin et d'ARN-cible dans des embryons de Drosophile provoque à la fois la dégradation de l'ARN-cible, et la conversion du long double-brin en petits duplex de 21 à 23 nt (Yang *et al.*, 2000).

Ces petits duplex d'ARN, qui ont été baptisés « siARN » (en anglais : *siRNA*, pour : *short interfering RNA* ; Elbashir *et al.* (2001b)), portent une extrémité 5´ phosphorylée et une extrémité 3´ diol (2´ OH et 3´ OH) [2] (Elbashir *et al.*, 2001b). La conversion du long ARN double-brin en siARN n'est pas due à un clivage aléatoire le long de la molécule : elle génère des populations phasées de siARN, où l'extrémité d'un siARN se situe immédiatement en aval de l'extrémité du précédent (voir Figure 2.2), ce qui suggère un clivage séquentiel, tous les 21 à 23 nt, à partir d'une extrémité (Elbashir *et al.*, 2001b).

L'introduction de siARN synthétiques dans le lysat (plutôt qu'un long ARN double-brin) déclenche aussi le clivage de l'ARN-cible ; cette fois, comme la population de siARN est simplifiée (un seul siARN agit sur la cible, contre une population complexe de siARN différents si on introduit un long ARN double-brin), il est possible de localiser sans ambiguïté la position du clivage : l'ARN-cible est clivé sur le pont phosphodiester qui sépare les nucléotides appariés aux 10ème et 11ème nucléotides du brin « antisens » du siARN (voir Figure 2.2) Elbashir *et al.* (2001b,c).

On ne connaissait qu'une famille de RNases qui coupe les ARN double-brin à des sites spécifiques (ce qui semble nécessaire à la production de populations phasées de siARN), et il se trouve qu'elle laisse sur les produits de clivage un 5´ monophosphate et un 3´ diol : la famille RNase III ; on a donc rapidement soupçonné cette famille d'être responsable de la conversion des longs ARN double-brin en siARN (Bass, 2000; Elbashir *et al.*, 2001b). Les RNases III coupent les deux brins d'ARN de façon décalée : leurs produits portent des extrémités 3´ sortantes, de 2 nt principalement (voir Figure 2.2).

Le génome de la Drosophile venait d'être séquencé (Adams *et al.*, 2000), une quinzaine de mois après celui du Nématode (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), ce qui permettait une recherche bio-informatique exhaustive des membres de la famille RNase III dans ces deux espèces. Les candidats se classaient en trois catégories : la RNase III canonique, qui contient un unique domaine « RNase III » et un domaine « dsRBD » d'interaction à l'ARN double-brin ; les RNases « Drosha », qui contiennent chacune deux domaines RNase III et un domaine « dsRBD » ; et une troisième catégorie, dont les membres contiennent deux domaines RNase III chacun, ainsi qu'un domaine « hélicase ». Le génome de la Drosophile ne contient pas de gène de RNase III canonique, mais un gène Drosha et deux gènes de la troisième catégorie : Bernstein *et al.* (2001) ont donc choisi d'évaluer l'activité de ces deux catégories de RNases putatives. L'enzyme Drosha, étiquetée avec un épitope T7 et purifiée par immuno-précipitation, ne peut pas digérer un long ARN double-brin *in vitro*, alors que dans les mêmes conditions, l'une des enzymes de la troisième catégorie y parvient, et libère des petits ARN d'environ 22 nt (qu'on présume appariés en duplex). Cette enzyme possède donc l'activité de conversion des longs ARN double-brin en siARN, et elle a été baptisée « Dicer-1 » (le deuxième membre de cette catégorie chez la Drosophile, dont l'activité nucléasique n'a pas été vérifiée dans cet article, a été baptisé « Dicer-2 »). Il semble exister des orthologues des enzymes Dicer dans toutes les espèces où le RNAi a été observé : les Plantes possèdent, en général, plusieurs gènes Dicer ; le Nématode en possède un ; les organismes-modèles de Vertébrés en possèdent un chacun ; la Levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* en possède un ; les organismes-modèles de Ciliés en possèdent plusieurs ; ..., et dans chaque espèce où l'information est connue, Dicer est requise pour le RNAi (voir notamment Knight et Bass (2001); Ketting *et al.* (2001); Bernstein *et al.* (2003); Catalanotto *et al.* (2004); Xie *et al.* (2004); Sigova *et al.* (2004)) [3].

2. Ces conclusions, acquises dans le système expérimental basé sur le lysat d'embryon de Drosophile, et fondées sur des données non montrées dans l'article, sont, maintenant, partiellement discutables. Il a en effet été établi depuis que les siARN de Drosophile portent une 2´-*O*-méthylation sur leur extrémité 3´ (Pélisson *et al.*, 2007), et pas une extrémité 3´ diol. Il est possible que l'introduction de grandes quantités d'ARN double-brin déclencheur sature la machinerie de méthylation présente dans le lysat, ce qui expliquerait que les siARN soient incomplètement méthylés dans cette expérience.

3. Il faut cependant remarquer que, parmi les deux enzymes Dicer de Drosophile, seule l'activité nucléasique de Dicer-1 a été vérifiée par Bernstein *et al.* (2001) ; une expérience de répression de Dicer en cellules en culture montre que la production des siARN est affectée, mais dans cette expérience, à la fois Dicer-1 et Dicer-2 ont été réprimées. Strictement parlant, cet article n'a donc démontré la production de siARN que par Dicer-1, pas par Dicer-2 ... or il a été établi, trois

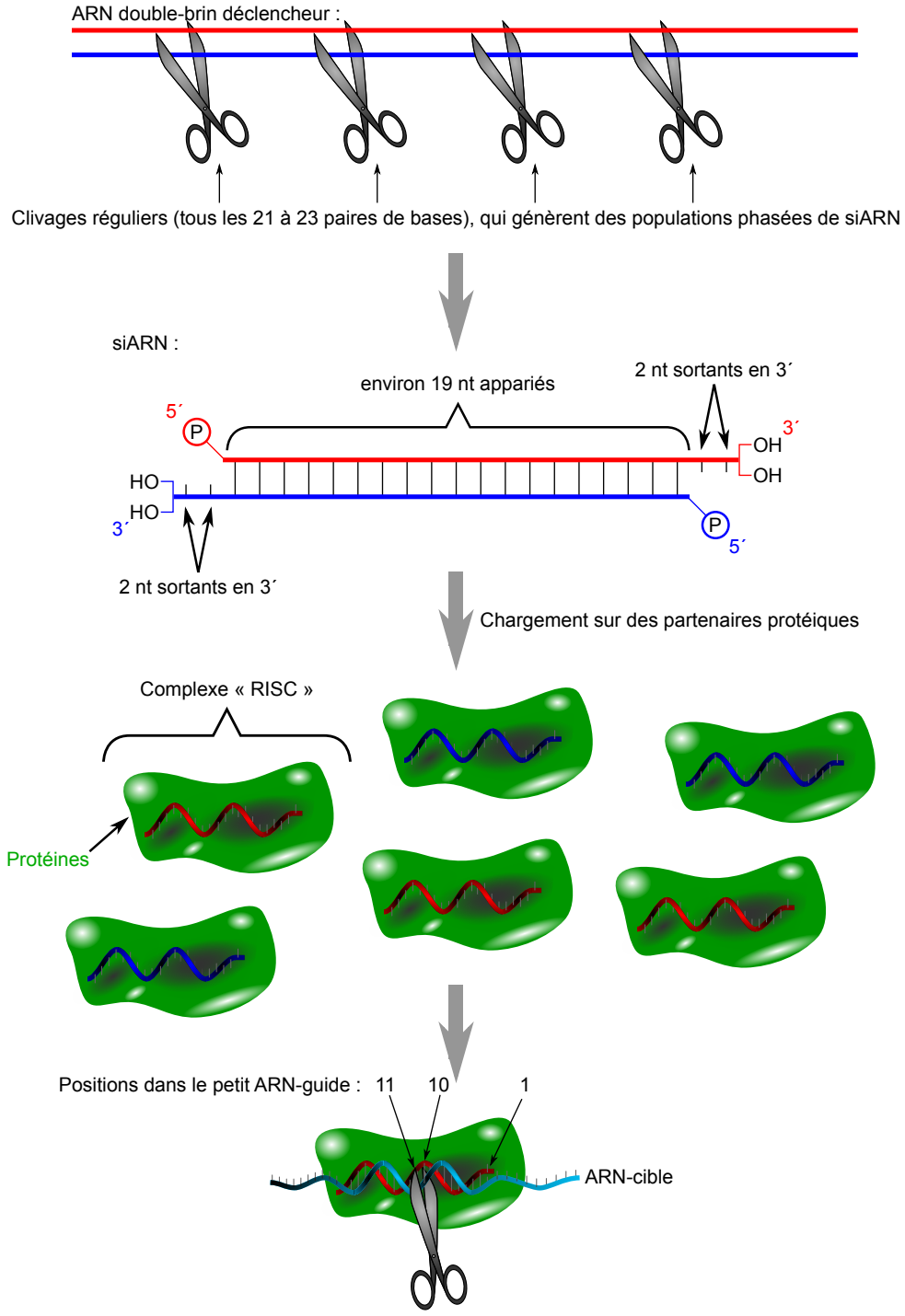


FIGURE 2.2 – **Biogenèse et caractéristiques biochimiques des siARN.** L'ARN double-brin déclencheur du RNAi est clivé à intervalles réguliers (toutes les ≈21–23 paires de bases), libérant des siARN (duplex de petits ARN monophosphorylés en 5´, 2´ et 3´ diol en 3´, et aux extrémités sortantes de 2 nt). Après chargement du duplex sur ses partenaires protéiques, un seul brin d'ARN est conservé. Le complexe ainsi formé est appelé « RISC ». Sous certaines conditions (voir section 4.2), il a la capacité de cliver des ARN-cibles à une position stéréotypée (entre les nucléotides faisant face aux nucléotides 10 et 11 du petit ARN-guide).

ans plus tard, que dans un contexte *in vivo*, c'est Dicer-2 qui produit les siARN (Dicer-1 produit une autre classe de petits ARN, les miARN : voir chapitre 3) (Lee *et al.*, 2004). Il apparaît donc que l'activité de production de siARN par

Le clivage endonucléolytique de l'ARN-cible fait certainement intervenir un partenaire protéique [4]. Le complexe effecteur du RNAi a été baptisé « RISC », pour *RNA-induced silencing complex* (Hammond *et al.*, 2000), et c'est le nom qui s'est imposé, bien qu'un autre terme ait également été proposé (« siRNP », pour *small interfering ribonucleoprotein particle* ; Elbashir *et al.* (2001b)). La possibilité de programmer le lysat d'embryon de Drosophile avec des siARN synthétiques a permis d'explorer les tolérances de la réaction de clivage vis-à-vis de mésappariements entre les deux ARN. Des substitutions assez lourdes (mésappariant 4 nucléotides consécutifs à chaque fois) abolissent à peu près complètement l'activité de clivage [5], de même que le mésappariement d'un seul nucléotide, situé à proximité du site de clivage (le 10ème ou le 9ème nucléotide du petit ARN-guide) (Elbashir *et al.*, 2001c).

L'observation qu'un unique mésappariement entre le petit ARN-guide et l'ARN-cible bloquait la réaction de clivage a parfois été vue comme la preuve de la très grande spécificité du RNAi (seule une complémentarité parfaite entre les deux ARN pourrait guider un clivage ; Chiu et Rana (2002); Brummelkamp *et al.* (2002); Moss (2003)). C'est une erreur de raisonnement : les mésappariements qui inhibent fortement la réaction de clivage sont rares, et localisés dans le voisinage immédiat du site de coupure (au milieu du duplex, comme justement les deux positions testées par Elbashir *et al.* (2001c)). En particulier, les mésappariements d'un seul nucléotide sont très bien tolérés sur le tiers 3´ de la séquence (Wee *et al.*, 2012).

L'attention du lecteur est attirée sur une controverse concernant le mode d'action du RNAi : puisqu'à la fois le long ARN double-brin déclencheur, et l'ARN-cible, sont clivés au cours du processus, certains auteurs se sont demandés si la même RNase était responsable des deux étapes. Il se serait agi d'une RNase spécifique des ARN double-brin, et la cible serait donc d'abord convertie en ARN double-brin (suite à la polymérisation d'un ARN antisens, par une polymérase à ARN dépendant de l'ARN recrutée sur l'ARN-cible ; ou suite à la ligation entre eux de nombreux petits ARN antisens qui couvriraient l'ARN sens). Les brins antisens des siARN auraient notamment pu jouer le rôle d'amorces dans cette réaction de polymérisation, participant donc à une réaction en chaîne (la dégradation de ce long double-brin par Dicer produisant encore davantage de siARN, susceptibles d'initier la conversion de nouvelles molécules d'ARN-cibles en double-brin) (Lipardi *et al.*, 2001). Cette interprétation a été démentie par la suite (notamment, par la démonstration que les siARN conservent leur efficacité s'ils portent des modifications chimiques en 3´, qui les empêcheraient de servir d'amorces pour une polymérisation, ou d'être ligués entre eux) : les siARN sont des guides de clivage, plutôt que les deuxièmes brins d'un ARN double-brin substrat de Dicer (Martinez *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 2002).

Les siARN sont des petits ARN double-brin, mais ces deux brins doivent être séparés avant que le brin antisens ne puisse s'apparier à un éventuel ARN-cible. Il était possible que le complexe RISC mature ne contienne qu'un seul des deux brins du siARN, ou qu'il contienne des siARN double-brin (qui pourraient, par exemple, se séparer transitoirement avant l'appariement et le clivage d'une cible, puis se refermer ensuite). Le complexe RISC purifié à partir de lysat d'embryon de Drosophile ou de cellules humaines ne semble contenir qu'un seul brin, et il est même possible de programmer RISC *in vitro* avec un petit ARN simple-brin s'il est fourni en grande quantité (à la fois parce que des ARN simple-brin sont beaucoup moins stables biochimiquement dans le lysat que les duplex ; et éventuellement aussi, parce qu'ils sont chargés moins efficacement sur le complexe RISC) (Martinez *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 2002).

Quant à la réaction de clivage par le complexe RISC, elle libère deux fragments de l'ARN-cible : le fragment 5´ porte une extrémité 3´ hydroxyl, alors que le fragment 3´ porte une extrémité 5´

Dicer-1, telle que démontrée *in vitro* par Bernstein *et al.* (2001), soit finalement assez artificielle, et qu'elle ne reflète pas la biogenèse réelle des siARN chez la Drosophile.

4. Il existe des ARN dotés d'une activité nucléasique (Lilley, 1999), mais ils sont nettement plus longs que les siARN, et cette activité dépend de leur séquence – alors que les siARN actifs peuvent avoir des séquences quelconques.

5. Dans cette expérience, les mésappariements les mieux tolérés impliquent les nucléotides 4 à 7 du petit ARN-guide : nous verrons, en section 4.2, que le mésappariement de cette région réduit pourtant fortement la cinétique d'association de RISC avec l'ARN-cible ; mais une complémentarité extensive sur le reste du duplex permet en général de compenser partiellement ce défaut cinétique. Il faut également remarquer que la mutation des extrémités du duplex peut perturber l'asymétrie d'efficacité entre les deux brins (voir section 4.5), ce qui complique l'interprétation des résultats de certains des mésappariements analysés par Elbashir *et al.* (2001c).

monophoshorylée (Martinez et Tuschl, 2004; Schwarz *et al.*, 2004).

2.3 Application de l'interférence à ARN

La découverte du RNAi a rapidement inspiré son application biotechnologique : il fournirait un outil de répression de gènes-cibles spécifiques, qui faisait défaut à l'époque (chez les Plantes et les Animaux, où la mutagenèse par recombinaison homologue n'était pas aussi simple que chez la Levure, on manquait de méthodes pour invalider spécifiquement un gène d'intérêt ; le *knock-out* chez la Souris nécessitait plusieurs années de travail, pour un résultat incertain).

Effectivement, la transfection de cellules S2 de Drosophile avec un ARN double-brin synthétique, dont un brin est complémentaire à l'ARNm de la cycline E, provoque un arrêt du cycle cellulaire, phénotype attendu après répression de ce gène (Hammond *et al.*, 2000). Les utilisations du RNAi chez la Drosophile et chez le Nématode se sont multipliées [6]

Chez les Vertébrés, les ARN double-brin déclenchent des répressions traductionnelles globales, principalement la « réponse interféron », qui participent à la défense antivirale [7]. Introduire de longs ARN double-brin dans des cellules de Vertébrés ne pouvait donc pas servir pour la répression spécifique de gènes d'intérêt ; mais les siARN, eux, ne semblent pas induire de réponse interféron, et peuvent être utilisés en remplacement de leurs longs précurseurs (Elbashir *et al.*, 2001a). Cette découverte a ouvert des possibilité immenses en génétique moléculaire chez les Vertébrés, et le RNAi s'est rapidement démocratisé dans les laboratoires. Cependant, plusieurs observations suggèrent que même les siARN, malgré leur courte taille, peuvent induire des réponses non-spécifiques, spécialement s'ils sont transfectés à haute concentration (de l'ordre de 100 nM), parfois même, pour certains siARN, dès 1 nM (Bridge *et al.*, 2003; Semizarov *et al.*, 2003; Sledz *et al.*, 2003; Persengiev *et al.*, 2004; Karikó *et al.*, 2004; Sioud, 2005).

Lorsqu'il est difficile ou inefficace d'introduire des petits ARN synthétiques, il peut être préférable de les faire exprimer par la cellule elle-même. Des plasmides exprimant des ARN auto-complémentaires (donc capables de se replier en tige-boucle ; ces ARN double-brin monomoléculaires peuvent être clivés par Dicer s'ils sont assez longs – mais assez courts pour limiter les risques de réponse non-spécifique aux ARN double-brins – et libérer des duplex de petits ARN qui entreront dans la voie du RNAi) ont été développés pour cibler des gènes d'intérêt (Brummelkamp *et al.*, 2002; Paddison *et al.*, 2002a; Zeng *et al.*, 2002). Ces constructions ont été nommées en anglais « shRNA » (*short hairpin RNAs*), et de multiples améliorations ont depuis été apportées à ces plasmides (marqueurs fluorescents, promoteurs régulables, constructions lentivirales, ...) pour faciliter et améliorer leur usage.

Sa capacité à réprimer spécifiquement des gènes d'intérêt a également encouragé le développement de thérapies basées sur le RNAi. La répression d'ARN viraux par RNAi semble efficace (voir Silva *et al.* (2002) pour une revue), mais la grande mutabilité des virus, et la difficulté d'administrer aux cellules-cibles des siARN ou des ADN permettant leur expression, ont limité les possibilités de développement (comparer par exemple l'optimisme de Knoepfel *et al.* (2012) avec la prudence tempérée de Herrera-Carrillo *et al.* (2019)). La répression de gènes endogènes a eu plus de succès, avec un premier médicament (un siARN modifié, dirigé contre un ARNm exprimé dans le foie, et responsable d'une maladie rare appelée « amylose héréditaire ») approuvé aux États-Unis en 2018 (voir Setten *et al.* (2019) pour une

6. Chez le Nématode notamment, la mise en œuvre du RNAi peut être très simple, puisqu'il suffit de nourrir les vers avec des bactéries qui expriment un ARN double-brin, pour réprimer un gène homologue de cet ARN dans de nombreuses cellules de l'organisme (Timmons et Fire, 1998). Cette observation surprenante démontre que les ARN double-brin résistent suffisamment bien à l'ingestion et à la digestion, et qu'ils sont ensuite internalisés par des cellules du ver, avant de subir le même sort que des ARN double-brin injectés – avec notamment une amplification et une distribution systémique des longs ARN déclencheurs ou des siARN. La même méthode a pu être utilisée avec succès chez d'autres espèces, se nourrissant naturellement de bactéries ou pas (voir notamment Galvani et Sperling (2002); Newmark *et al.* (2003); Chera *et al.* (2006)).

7. Ces réponses aux ARN double-brin semblent peu actives en début de développement embryonnaire chez les Mammifères, ce qui permet donc d'y utiliser le RNAi pour des répressions spécifiques (Paddison *et al.*, 2002b).

revue des avancées récentes du RNAi thérapeutique). L'administration des siARN *in vivo* continue à poser problème : les siARN injectés dans la circulation sanguine ont tendance à s'accumuler dans les organes de détoxification (foie et reins), et sont donc principalement actifs dans ces deux organes ; la grande instabilité biochimique des ARN a également contraint la recherche clinique à multiplier les modifications chimiques des siARN pour améliorer leur demi-vie sans trop perturber leur activité répressive (Setten *et al.*, 2019).

2.4 Fonctions naturelles de l'interférence à ARN

Chez plusieurs organismes-modèles, chez les Plantes (Ratcliff *et al.*, 1997; Mourrain *et al.*, 2000) et les Insectes (Keene *et al.*, 2004; van Rij *et al.*, 2006), le RNAi joue un rôle antiviral : la réplication ou la transcription des génomes des virus à ARN fait intervenir des intermédiaires ARN double-brin, qui semblent alimenter la production de siARN spécifiques du virus par les cellules de l'hôte (et par conséquent, des mutants de la voie du RNAi sont particulièrement sensibles à certains virus).

La fonction antivirale du RNAi est également mise en évidence, un peu paradoxalement, par l'absence de réponse RNAi chez un Champignon, la Levure *Saccharomyces cerevisiae*. Un virus connu pour infecter cette espèce, le *Killer virus*, est efficacement réprimé par le RNAi – mais un ARN de ce virus code une toxine qui tue la Levure, tout en conférant lui-même une immunité aux cellules qu'il infecte. Ce virus addictif procure donc un avantage aux cellules infectées, et son existence pourrait avoir promu la perte récente du RNAi dans le lignage de *S. cerevisiae* (le même mécanisme pourrait avoir été à l'œuvre chez plusieurs autres Champignons : les espèces connues pour être infectées par un *Killer virus* ont toutes perdu le RNAi, et seulement elles) (Drinnenberg *et al.*, 2011).

Cette fonction antivirale du RNAi n'est pas nécessairement universelle : chez les Mammifères, les cellules-souches embryonnaires semblent également produire des siARN à partir des virus qui les infectent (Maillard *et al.*, 2013), mais la réplication du virus n'est pas affectée par la mutation de Dicer (qui fait disparaître ces petits ARN) – quant aux autres types cellulaires mammifères, une éventuelle fonction antivirale du RNAi y est très controversée (Cullen *et al.*, 2013).

Chez le Nématode *C. elegans*, le seul virus actuellement connu (un virus nommé « Orsay ») semble plus virulent chez des vers mutés sur la voie du RNAi (Félix *et al.*, 2011). Mais ce RNAi antiviral semble mécanistiquement différent du RNAi induit expérimentalement par l'introduction d'ARN double-brin : il ne fait pas intervenir de diffusion systémique dans l'organisme, ni de transmission transgénérationnelle (Ashe *et al.*, 2015).

Outre un éventuel rôle antiviral, le RNAi pourrait participer à la régulation des gènes endogènes. On s'attendrait alors à ce que des siARN endogènes puissent être observés ; c'est effectivement le cas chez :

— le Champignon *Schizosaccharomyces pombe* (la plupart des siARN observés proviennent de séquences répétées centromériques ; (Reinhart et Bartel, 2002) ; ces siARN ne semblent pas participer à une répression post-transcriptionnelle, mais au guidage de l'hétérochromatinisation : Volpe *et al.* (2002); Hall *et al.* (2002)) ;
— la Plante *Arabidopsis thaliana* (Peragine *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004), où ils participent au contrôle développemental de certains gènes ;
— le Nématode *C. elegans*, où des candidats siARN endogènes sont détectés en orientation antisens de certains ARNm, notamment des ARNm de transposons (Ambros *et al.*, 2003).

Mais il a fallu attendre le développement du séquençage à haut débit (extrêmement sensible) pour que des siARN endogènes soient clairement mis en évidence chez la Drosophile (Ghildiyal *et al.*, 2008; Kawamura *et al.*, 2008; Czech *et al.*, 2008; Okamura *et al.*, 2008) et chez les Mammifères (Tam *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008). Les petits ARN détectés étaient alors homologues de divers gènes endogènes, notamment, souvent, de transposons. Les mutants de Drosophile qui affectent spécifiquement la voie du RNAi (mutants *dcr-2* (Lee *et al.*, 2004) et *ago2* (Okamura *et al.*, 2004)) parviennent à survivre,

se développer et se reproduire normalement, au moins en apparence : les siARN endogènes de Drosophile ne semblent donc pas jouer de rôle biologique immédiatement visible à l'échelle macroscopique, dans les conditions de laboratoire.

Un point de nomenclature mérite d'être souligné : des petits ARN, spécifiques d'une séquence répétée appelée « *Stellate* », avaient été détectés dans les testicules de Drosophile en 2001 (Aravin *et al.*, 2001). Ils ont été nommés « rasiRNA » (pour : siARN associés aux séquences répétées, *repeat-associated siRNA*) en 2003, après la découverte de nouveaux petits ARN spécifiques de séquences répétées (aussi bien *Stellate* que des transposons, ou de courtes séquences répétées en *cis*) (Aravin *et al.*, 2003). On avait cru à l'époque qu'il s'agissait de siARN endogènes, mais des analyses plus précises ont montré qu'ils ne sont pas générés sous forme de petits duplex, que Dicer n'est pas nécessaire à leur maturation, et qu'ils ne sont pas chargés sur des protéines de la sous-famille « Ago » de la famille « Argonaute » (voir section 4.2), comme le sont les siARN (Vagin *et al.*, 2006). Ces « rasiRNA » ne sont en réalité pas des siARN, mais des piARN (*Piwi-associated RNA*), une autre classe de petits ARN dont la biogenèse et les protéines partenaires sont uniques.

Chapitre 3

microARN : une introduction

3.1 La découverte des microARN

Un crible génétique, mené chez le Nématode *Cœnorhabditis elegans*, avait isolé deux mutants présentant des défauts développementaux. Parmi les phénotypes observés chez le mutant du locus baptisé « *lin-4* »[1], plusieurs cellules de l'hypoderme réitèrent, de façon anormale, des destinées cellulaires spécifiques des stades larvaires les plus précoces (dans le ver mutant, ces cellules présentent donc des caractéristiques habituellement restreintes aux stades précoces) (Chalfie *et al.*, 1981). Les mutants « perte de fonction » d'un autre locus, « *lin-14* », isolé quelques années plus tard, présentaient un phénotype opposé : ces lignages cellulaires s'engagaient, de façon précoce, dans des destinées cellulaires habituellement spécifiques des stades plus tardifs (Ambros et Horvitz, 1984).

Les produits de ces deux gènes semblaient donc avoir des effets antagonistes, et des expériences d'épistasie ont montré que *lin-4* était un répresseur de *lin-14* (Ambros, 1989). D'autre part, plusieurs classes d'allèles de *lin-14* avaient été décrites : outre les mutations « perte de fonction », aux effets opposés à celui de la mutation de *lin-4*, des allèles « gain de fonction », semi-dominants, avaient pu être isolés, qui surexprimaient *lin-14* (et avaient donc un effet similaire à celui de la mutation de *lin-4*) (Ambros et Horvitz, 1987). Ces mutations délétaient une grande partie de la 3´ UTR du gène *lin-14* (Wightman *et al.*, 1991).

Il semblait donc que le gène *lin-4* exprimait un répresseur de *lin-14*, dont l'action répressive nécessitait des éléments de séquence présents dans la 3´ UTR de *lin-14*. Mais la nature exacte du produit du gène *lin-4* restait inconnue.

C'est en 1993 que la séquence du gène *lin-4* a été révélée : ce locus génomique ne semble pas contenir de longue phase ouverte de lecture, et la phase ouverte la plus longue (143 codons) peut être mutée sans abolir la fonction du locus (Lee *et al.*, 1993). Ce locus, en revanche, est transcrit, et accumule deux ARN : le plus court (long de seulement 22 nt) est le plus abondant ; le plus long (61 nt), moins abondant, pouvait être un précurseur du plus court (ce qui a été confirmé par la suite). L'ARN de 61 nt présentait la particularité d'être imparfaitement auto-complémentaire, donc de pouvoir se replier en tige-boucle (voir Figure 3.1**C**). Simultanément, un autre laboratoire montrait que la répression développementale de *lin-14* par *lin-4* était post-transcriptionnelle : l'abondance de l'ARNm de *lin-14* ne semble pas affectée chez un mutant *lin-4*, tandis que la protéine Lin-14p est sur-accumulée (Wightman *et al.*, 1993). Surtout, la 3´ UTR de *lin-14* contient des régions phylogénétiquement conservées, qui présentent des complémentarités imparfaites à la séquence du petit ARN *lin-4* fraîchement découvert (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993). Ces observations suggéraient que le produit fonctionnel du gène *lin-4*, un petit ARN, avait la capacité de réprimer la traduction de l'ARNm lin-14 en s'appariant sur des sites de reconnaissance localisés dans sa 3´ UTR (voir Figure 3.1**D**).

1. « *lin* » est ici l'abréviation de *lineage*, « lignage » en anglais : le phénotype décrit concernait des défauts de chronologie du développement de certains lignages cellulaires.

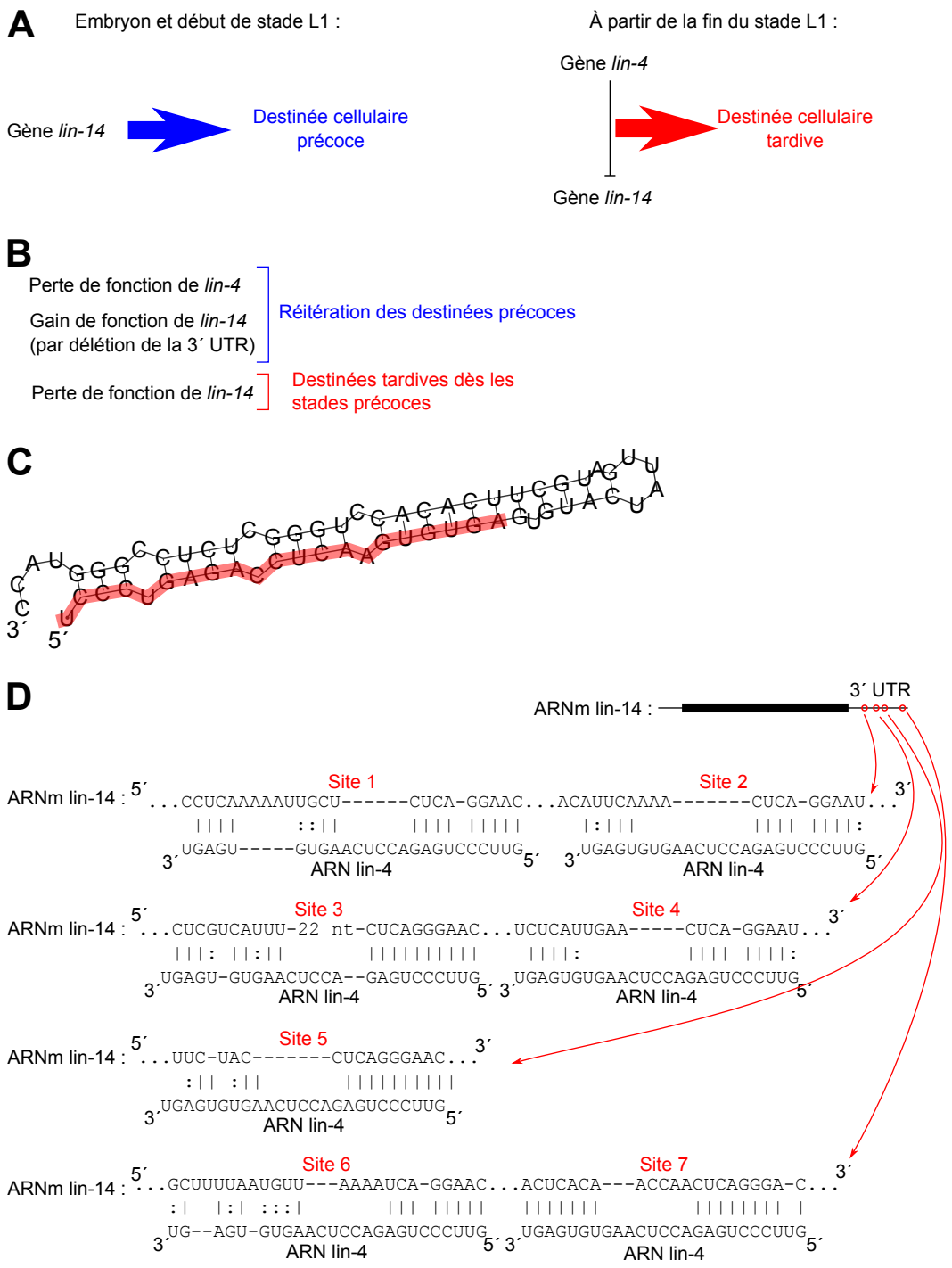


FIGURE 3.1 – **Mise en évidence de la répression de *lin-14* par le microARN *lin-4*. A.** Les pertes de fonction de *lin-14* et de *lin-4* ont des effets opposés. **B.** La répression de *lin-14* fait intervenir des éléments situés dans sa 3´ UTR. **C.** Les deux ARN produits par le gène *lin-4*, détectés par Lee *et al.* (1993) : la tige-boucle de 61 nt contient (surlignée en rouge) la séquence du petit ARN de 22 nt. **D.** Les sites de complémentarité imparfaite entre le petit ARN *lin-4* et la 3´ UTR de *lin-14*, tels que décrits par Lee *et al.* (1993); Wightman *et al.* (1993). *N.B.* : ces complémentarités ne satisfont pas toutes les critères maintenant connus (par exemple, seuls les sites n°3, 5 et 7 sont prédits par la version actuelle, la n°6.2, du programme *TargetScanWorm*). Notez que dans le site n°3, le segment mésapparié non détaillé est en réalité long de 24 nt, et pas 22.

Quelques années plus tard, un nouveau petit ARN, également impliqué dans le contrôle du développement du Nématode, était identifié par une approche similaire : l'ARN *let-7*. Il tire son nom du phénotype de son mutant : la mutation homozygote de *let-7* est létale (« *let* » est ici l'abréviation de *lethal*). Le premier allèle de ce locus avait été isolé par Meneely et Herman (1979). Avec une définition peu précise des sites de fixation de ces petits ARN (le nombre et la position des mésappariements tolérables étaient inconnus), et (en généralisant à partir du seul exemple connu, celui de *lin-4*) en restreignant la recherche aux 3´ UTR des gènes hétérochroniques [2], des complémentarités imparfaites ont été décrites entre le petit ARN *let-7* et plusieurs cibles potentielles (Reinhart *et al.*, 2000). Pour l'une d'entre elles (le gène *lin-41*), plusieurs données semblaient confirmer l'interaction : la surexpression de *lin-41* provoque une létalité semblable à celle causée par la mutation de *let-7* (suite à un problème de différenciation de ses cellules, la cuticule de la vulve du ver explose, et les organes se déversent à l'extérieur) ; et un gène rapporteur, placé sous le contrôle de la 3´ UTR de *lin-41*, est réprimé *in vivo* dans des cellules hypodermales de vers sauvages, mais pas chez les mutants *let-7* (Reinhart *et al.*, 2000).

Il s'agissait donc du 2ème exemple de petit ARN régulateur chez les Animaux, et à nouveau, il contrôlait la chronologie du développement chez le Nématode. Mais, si *let-7* avait été découvert chez le Nématode, il ne lui était pas spécifique : le séquençage d'une première version du génome humain et du génome de la Drosophile était pratiquement terminé, et de nombreux fragments de séquence de ces génomes étaient déjà disponibles. Une recherche de séquences homologues à celles des petits ARN de Nématode a ainsi pu montrer que ces deux autres génomes contenaient des orthologues crédibles à *let-7* (aucun orthologue à *lin-4* n'était identifié en dehors des *Cœnorhabditae*). Pour chaque orthologue potentiel, son locus génomique était imparfaitement auto-complémentaire, ce qui suggérait que dans ces différentes espèces animales, l'ARN *let-7* était maturé à partir d'un ARN plus long, replié en tige-boucle. Et il était possible de détecter expérimentalement un petit ARN *let-7* dans des échantillons d'ARN d'une grande variété d'espèces : une Annélide, des Mollusques, des cellules humaines en culture et plusieurs autres Vertébrés, un Oursin, ... (Pasquinelli *et al.*, 2000). Parmi les Métazoaires analysés, il semblait que tous les Triblastiques [3] exprimaient un petit ARN *let-7*, et seuls les Diblastiques (une Méduse, une Anémone de mer, des Coraux, des Éponges) semblaient dépourvus de *let-7*. Chez plusieurs de ces espèces, on montrait que l'expression de *let-7* était régulée temporellement, tout comme *lin-4* chez le Nématode : ces deux petits ARN ont donc été temporairement baptisés « stRNA » (*small temporal RNA*, petits ARN régulés temporellement) (Pasquinelli *et al.*, 2000).

Pour *let-7* comme pour *lin-4*, on pouvait détecter un ARN plus long, imparfaitement auto-complémentaire, probable précurseur, qui contenait la séquence du petit ARN mature : il semblait donc que ces « stRNA » soient maturés à partir de précurseurs repliés en double-brin. D'autre part l'ARN *let-7* porte un monophosphate sur son extrémité 5´, et un 2´, 3´ diol sur son extrémité 3´ (Hutvágner *et al.*, 2001). Il présente donc plusieurs caractéristiques communes avec les siARN, et pourrait, comme eux, dériver du clivage du précurseur double-brin par une RNase III (voir section 2.2), et peut-être par la même enzyme, Dicer. Ces réflexions ont donc amené Hutvágner *et al.* (2001) à mesurer l'expression de *let-7* dans des cellules humaines où Dicer était réprimé par la transfection de siARN spécifiques : cette répression fait disparaître le petit ARN *let-7* mature, et sur-accumuler son précurseur en tige-boucle. La même année, deux autres études venaient confirmer, chez le Nématode, et par la génétique *in vivo*, l'implication de Dicer dans la maturation de l'ARN *let-7* (Ketting *et al.*, 2001) ou, plus généralement, dans le contrôle du développement (Knight et Bass, 2001; Ketting *et al.*, 2001).

La découverte de la grande conservation phylogénétique de *let-7* semblait signifier que ces petits ARN non-codants n'étaient pas une particularité du Nématode, mais qu'ils pouvaient être beaucoup plus répandus. Ces considérations ont encouragé quelques laboratoires à chercher de nouveaux exemples

2. Ce sont les gènes dont la mutation entraîne une désynchronisation de la différenciation de certains types cellulaires, vis-à-vis du reste de l'organisme.

3. Ce sont les Animaux dont le développement précoce fait ségréger trois feuillets embryonnaires (l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme). Ce sont également les Animaux dont le plan d'organisation présente approximativement une symétrie planaire (ils sont donc également nommés « Bilatériens »).

de ces petits ARN. D'autre part, le laboratoire de T. Tuschl, qui étudiait le mécanisme du RNAi, était amené à cloner les siARN produits dans le lysat d'embryon de Drosophile (voir section 2.2). Il arrivait que, parmi les petits ARN clonés et séquencés, se trouvent des petits ARN dont la séquence n'apparaissait pas dans le long ARN double-brin déclencheur du RNAi, ce qui suggérait qu'il s'agissait de petits ARN endogènes, qui préexistaient à l'expérience dans l'embryon de Drosophile (Elbashir *et al.*, 2001b).

Trois laboratoires ont donc recherché de nouveaux petits ARN régulateurs, par une approche expérimentale dédiée : la purification des ARN de petite taille, suivie de la ligation d'adaptateurs de part et d'autre (en utilisant un protocole adapté à la ligation sur des ARN qui portent un monophosphate sur leur extrémité 5´, et un 2´, 3´ diol sur leur extrémité 3´), puis une transcription inverse (ou « réverse-transcrition »), une amplification par PCR, et le clonage dans un plasmide, pour séquençage. Deux laboratoires (celui de V. Ambros, qui avait découvert en 1993 que le produit fonctionnel de *lin-4* est un petit ARN ; et celui de D. Bartel, biochimiste de l'ARN) ont mené cette expérience sur le Nématode. Le troisième laboratoire (celui de T. Tuschl, qui avait cloné accidentellement de tels petits ARN endogènes en étudiant le RNAi) l'a menée chez la Drosophile et dans des cellules humaines en culture. Ces trois groupes ont publié simultanément leur découverte de nombreux nouveaux petits ARN endogènes, qu'ils ont décidé de baptiser « microARN » (abrégé en : « miARN ») (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee et Ambros, 2001).

Il est important de se rappeler que les ARN sont, de manière générale, très instables biochimiquement. Quand un expérimentateur prépare un échantillon d'ARN, il est presque inévitable qu'une partie de ces ARN se dégraderont – et quand des grands ARN se dégradent, ils produisent des petits. Il était donc connu, depuis des décennies, que les petits ARN sont contaminés par des produits de dégradation artefactuels, sans fonction biologique. Culturellement, les biologistes de l'ARN avaient pris l'habitude de négliger le bas des gels d'électrophorèse, les fractions de petite taille. Les trois laboratoires ont suspecté qu'ils étaient très probablement en train d'observer de véritables petits ARN naturels lorsqu'ils ont réalisé que le locus génomique de chaque miARN était imparfaitement auto-complémentaire, sur une longueur totale voisine de 60 à 70 nt. Il serait très inattendu que des produits de dégradation partagent tous cette particularité : il devait plutôt s'agir d'une classe de petits ARN, maturés naturellement par Dicer à partir de précurseurs repliés en tige-boucles.

Par la suite, de nombreux laboratoires ont recherché de nouveaux miARN dans une grande variété d'espèces, et il est apparu que les miARN sont très répandus chez les Animaux et chez les Plantes, et absents des autres lignages eucaryotiques (et, *a fortiori*, procaryotiques) :

— chez la Plante *Arabidopsis thaliana*, dont plusieurs présentant des orthologues dans le génome du Riz (Reinhart *et al.*, 2002; Llave *et al.*, 2002a) ;
— chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Zhao *et al.*, 2007; Molnár *et al.*, 2007) ; on avait cru, jusque-là, que les miARN étaient spécifiques des Eucaryotes pluricellulaires, et selon certaines spéculations, les possibilités de régulation offertes par ces petits ARN auraient facilité l'émergence de la multicellularité (Bartel, 2004) : finalement il apparaît qu'un lignage unicellulaire ait conservé la machinerie de biogenèse et d'action des miARN depuis des centaines de millions d'années ;
— dans des génomes de virus qui infectent des hôtes eucaryotiques (Pfeffer *et al.*, 2004, 2005) ;
— chez des Animaux non-Bilatériens (un Cnidaire et une Éponge), mais pas chez un Placozoaire (Grimson *et al.*, 2008).

On considère maintenant que les miARN sont retrouvés chez les Métazoaires, chez les Métaphytes, chez quelques clades apparentés (*Chlamydomonas*), et dans des clades eucaryotiques mal classifiés (Tarver *et al.*, 2015). Parmi les espèces étudiées, les Champignons, notamment, ne semblent jamais posséder de miARN[4]. L'origine évolutive des miARN apparaît complexe : les précurseurs de miARN

4. Des observations de molécules « similaires aux miARN » (*microRNA-like*) ont été rapportées chez *Neurospora*, mais leur biogenèse semble tout à fait différente de celles des authentiques miARN (Lee *et al.*, 2010).

de Plantes sont beaucoup plus hétérogènes que ceux des miARN d'Animaux (les précurseurs en tige-boucle sont de taille très variable, et certains génèrent plusieurs miARN à partir du même brin de la tige ; Meyers *et al.* (2008)), au point qu'on peut imaginer que les miARN de Plantes et les miARN d'Animaux n'ont pas d'origine commune, ils seraient apparus indépendamment dans les deux lignages (sachant que les deux lignages devaient déjà posséder une machinerie de RNAi [5], et que l'apparition fortuite de séquences auto-complémentaires dans un génome pourrait alimenter cette machinerie en néo-miARN ; Axtell *et al.* (2011)).

3.2 Mode d'action des microARN

La similarité des miARN avec les siARN (les miARN sont des petits ARN simple-brin d'environ 22 nt, 5´ monophosphate et 3´ diol, produits par Dicer à partir de précurseurs en double-brin monomoléculaire ; les siARN sont des petits duplex d'une vingtaine de paires de bases, dont chaque brin porte un 5´ monophosphate et un 3´ diol, produits par Dicer à partir de précurseurs en double-brin ; également, la similarité de leurs protéines-partenaires : voir section 4.2) suggérait que les miARN pouvaient se comporter comme des brins de siARN, et guider le clivage d'ARN-cibles qui leur seraient parfaitement complémentaires. Effectivement, quand on fournit à un lysat cytoplasmique de cellules humaines HeLa, un ARN parfaitement complémentaire à la séquence du miARN *let-7*, il est clivé à la position prédite (entre les nucléotides appariés aux 10ème et 11ème nucléotides du miARN) (Hutvágner et Zamore, 2002). Le complexe RISC bâti sur *let-7* est une enzyme capable de catalyser plusieurs réactions de clivage (environ 10 molécules d'ARN-cibles clivés par complexe RISC dans cette expérience). Il semblerait donc que, au moins sur cet exemple, un miARN (pourtant simple-brin) puisse entrer dans la voie du RNAi, et fonctionner comme un siARN (pourtant double-brin). Il était possible d'expliquer cette propriété en imaginant que les miARN sont produits par Dicer sous la forme de petits duplex d'ARN (comme les siARN), dont le deuxième brin serait ensuite détruit (Hutvágner et Zamore, 2002).

Dès la découverte des premiers miARN de Plante (chez *Arabidopsis thaliana*), il est apparu que le miARN « MIR171 » présente une complémentarité parfaite, sur ses 21 nt de longueur, à trois ARNm similaires entre eux, les ARNm de trois gènes de la famille *Scarecrow-like* (Reinhart *et al.*, 2002; Llave *et al.*, 2002a). Ces gènes (qui codent des facteurs de transcription impliqués dans des transitions développementales) pourraient donc être réprimés par MIR171 selon le mécanisme du RNAi. En généralisant à partir de cet exemple, Rhoades *et al.* (2002) ont recherché dans le transcriptome d'*Arabidopsis* des complémentarités presque parfaites (en tolérant 4 mésappariements au maximum) aux 16 miARN d'*Arabidopsis* décrits par Reinhart *et al.* (2002). De tels sites sont identifiés pour 14 des 16 miARN, ils sont plus nombreux que des sites de complémentarité de même qualité pour des séquences artificielles (issues de permutations aléatoires des séquences de miARN), et ils tendent à être conservés phylogénétiquement. Ces prédictions ont d'abord été confirmées pour les ARNm *Scarecrow-like*, dont on peut effectivement détecter expérimentalement des produits de clivage, à la position prédite ou dans son voisinage immédiat (Llave *et al.*, 2002b). Par la suite, la mise au point d'une méthode de détection à haut débit des produits de clivage de RISC allait confirmer un grand nombre de cibles prédites (Addo-Quaye *et al.*, 2008). Il est cependant important de remarquer que ces méthodes (la « 5´-RACE » dans sa version à bas débit, le « séquençage du dégradome » dans la version à haut débit) sont spécifiquement destinées à la détection des produits de clivage (plus précisément : des fragments 3´ du clivage), et elles ne mesurent pas l'abondance de l'ARN intact ni celle des fragments d'ARN qui ne porteraient pas un 5´ monophosphate (rappel : le fragment 3´ du clivage porte un 5´ monophosphate : voir section 2.2, et les méthodes de détection des produits de clivage ont été optimisées de manière à ne détecter que les ARN monophosphorylés en 5´). Si un ARN-cible donné est très rarement clivé par RISC (par exemple : moins d'1% des molécules de cible), la 5´-RACE et le séquençage du dégradome le détecteront probablement, au même titre qu'un ARN-cible dont 100% des molécules seraient clivées.

5. Le RNAi semble plus ancien que la voie des miARN, puisque de nombreux clades eucaryotiques dépourvus de miARN possèdent le RNAi : Champignons, Ciliés, *Excavata*, ... (Shabalina et Koonin, 2008), alors que la réciproque n'a jamais été observée.

Ces méthodes ne donnent donc pas accès à l'ampleur de la répression de la cible par RISC.

Des complémentarités de qualité suffisante pour guider un clivage sont très rares pour les miARN chez les organismes-modèles animaux habituels : chez les Mammifères, les miARN miR-127 et miR-136 sont parfaitement complémentaires de l'ARNm Rtl1 (les gènes de ces miARN se trouvent sur le brin antisens du gène *Rtl1*) (Seitz *et al.*, 2003), et on peut détecter le produit 3´ du clivage de l'ARNm Rtl1 (Davis *et al.*, 2005) ; et le miARN miR-196 est presque parfaitement complémentaire de l'ARNm HOXB8, dont il guide le clivage (Yekta *et al.*, 2004). Il arrive que certaines complémentarités très imparfaites puissent permettre le clivage, si au moins le milieu du duplex est parfaitement apparié (Karginov *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010) – mais elles sont très rares chez les Mammifères (Shin *et al.*, 2010).

Chez la plupart des autres Animaux étudiés, la situation semble similaire : on ne connaît pas de cible de clivage pour les miARN de Drosophile par exemple. En revanche, chez un Diblastique, l'Anémone de mer *Nematostella vectensis*, le séquençage du dégradome révèle de nombreuses cibles de clivage guidé par les miARN (Moran *et al.*, 2014) : il est donc possible que la rareté des cibles de clivage soit une spécificité des Triblastiques (ou : Bilatériens).

Lorsque la cible ne peut pas être clivée (ce qui est, donc, un cas très fréquent chez les Triblastiques), elle est quand même réprimée, mais par un autre mécanisme. Il avait d'abord semblé, sur l'exemple de la répression de *lin-14* par le miARN *lin-4*, que la répression était purement traductionnelle : l'accumulation de la protéine-cible était réprimée par le miARN, mais l'abondance de son ARNm ne semblait pas affectée (ou du moins, pas autant que celle de la protéine LIN-14) (Wightman *et al.*, 1993; Olsen et Ambros, 1999). Le mécanisme de cette inhibition restait mystérieux : à la précision permise par les méthodes employées, la longueur de la queue poly(A) de l'ARN-cible, et son association avec les polysomes, ne semblaient pas perturbées par le miARN, suggérant que la répression avait lieu après l'initiation de la traduction, probablement même après l'élongation (une répression de l'élongation de la traduction aurait dû changer le profil d'association de l'ARNm aux polysomes) (Olsen et Ambros, 1999). Une répression post-élongation pourrait par exemple signifier que l'ARNm est correctement traduit, mais que le peptide naissant est dégradé immédiatement, ce que quelques données semblaient indiquer (Nottrott *et al.*, 2006).

Mais l'amélioration de la précision des mesures expérimentales a remis en cause les fondements de ces raisonnements. D'une part, *in vivo* pour les miARN *lin-4* et *let-7* de Nématode, on peut mesurer une perte d'accumulation de l'ARN-cible, dont l'ampleur est très similaire à celle de la perte de la protéine qu'il code (Bagga *et al.*, 2005). D'autre part, *ex vivo*, la transfection de duplex d'ARN mimant des duplex miARN/miARN*[6] dans des cellules humaines en culture induit une diminution de l'accumulation de nombreux ARNm (principalement ceux dont la 3´ UTR présente une complémentarité parfaite au segment situé en 5´ du miARN synthétique) (Lim *et al.*, 2005). Il semble donc que la répression guidée par les miARN implique, au moins partiellement, une perte de l'ARNm. Des méthodes plus modernes, à haut débit, ont permis de mesurer simultanément l'ampleur de la répression de l'accumulation des ARNm (par *microarrays*), et celle de la répression de l'accumulation des protéines qu'ils codent (par spectrométrie de masse) : il apparaît que les miARN guident à la fois une dégradation des ARNm, et une diminution de la traduction des molécules d'ARNm qui n'auraient pas été dégradées ; ces deux phénomènes sont d'ampleur très modeste (la grande majorité des cibles sont réprimées de moins d'un facteur 1,5), et l'ampleur de la dégradation de l'ARNm semble dominer celle de la perte de traductibilité (Selbach *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2008). Des mesures supplémentaires, dans une variété de types cellulaires mammifères, et en quantifiant les ARN par *microarray* ou par RNA-Seq, ont confirmé la prédominance de la dégradation des ARN sur l'inhibition traductionnelle (Hendrickson *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010; Eichhorn *et al.*, 2014).

6. On appelle « miARN* » le petit ARN temporairement apparié au miARN, pendant sa biogenèse (voir section 3.3). La séquence de l'un des deux brins du duplex était bien la séquence d'un miARN naturel, mais la séquence de l'autre brin n'était pas identique à la séquence d'un miARN* naturel : c'était l'antisens parfait du miARN, avec éventuellement quelques mutations pour mésapparier son 5´.

Mécanistiquement, ces deux effets du complexe RISC impliquent parfois les mêmes acteurs : chez les organismes-modèles animaux courants (Mammifères et Drosophile), RISC recrute le plus souvent une protéine de la famille GW182 (appelées TNRC6A, TNRC6B, et TNRC6C chez les Mammifères, et GW182, ou Gawky, chez la Drosophile). GW182 recrute plusieurs effecteurs (notamment les complexes CCR4-NOT et PAN2-PAN3, qui détruisent la queue poly(A) de l'ARN-cible et attirent le complexe de *decapping*, qui élimine la coiffe en 5´ de l'ARN-cible ; Rehwinkel *et al.* (2005); Behm-Ansmant *et al.* (2006)). La perte de la queue poly(A) et de la coiffe permet l'initiation de la dégradation de l'ARN par des exonucléases, tout en réduisant également l'initiation de la traduction. Mais le complexe RISC réprime également, directement, la traduction, en interférant avec l'assemblage du complexe d'initiation, selon au moins deux mécanismes (l'un dépend de GW182, l'autre non ; Fukaya et Tomari (2012)). Chez les Plantes, qui ne possèdent pas de protéine GW182, la répression traductionnelle emploie un mécanisme différent, et encore mal caractérisé. La découverte initiale que les miARN de Plantes sont souvent capables de guider un clivage endonucléolytique des ARN-cibles (voir le deuxième paragraphe de cette section 3.2), a conduit certains auteurs à penser qu'il s'agissait du seul mode d'action des miARN de Plantes. En réalité, plusieurs cas de répression traductionnelle guidée par les miARN ont été décrits chez les Plantes (Aukerman et Sakai, 2003; Chen, 2004; Brodersen *et al.*, 2008) et il semble que les deux mécanismes y cohabitent, de même que chez les Animaux. Pour plus de détails et de références bibliographiques sur les mécanismes moléculaires de la dégradation des ARN cibles et de l'inhibition de la traduction, chez les Animaux et chez les Plantes, le lecteur est renvoyé vers la revue de Iwakawa et Tomari (2015).

Le premier exemple connu de régulation par un miARN, la répression de *lin-14* par *lin-4*, impliquait des appariements entre le petit ARN et la 3´ UTR de la cible (voir Figure 3.1**D** ; il est possible que seuls certains des 7 sites proposés à l'époque contribuent effectivement à la répression, et éventuellement, que des sites additionnels y contribuent aussi) (Wightman *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993). En partant de cette constatation, c'est uniquement dans les 3´ UTR de cibles présomptives que des complémentarités ont ensuite été recherchées pour le 2ème miARN découvert, *let-7* (Reinhart *et al.*, 2000). Plusieurs laboratoires ont également cherché de nouvelles cibles pour ces deux miARN, en ne cherchant des complémentarités que dans les 3´ UTR (Moss *et al.*, 1997; Slack *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2003; Abrahante *et al.*, 2003). De la même manière, c'est dans les 3´ UTR que Brennecke *et al.* (2003) ont recherché des complémentarités pour le miARN *bantam* de Drosophile, qu'ils venaient d'identifier. Partant du principe que tous les exemples connus impliquaient des sites de fixation du miARN dans les 3´ UTR des cibles, les auteurs des premiers programmes informatiques de prédiction de cibles ont restreint leurs recherches aux 3´ UTR (Enright *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2003) [7].

Naturellement, il y avait là un biais d'observation : en ne cherchant des sites-cibles que dans les 3´ UTR, on n'allait en trouver que dans les 3´ UTR ... et renforcer encore davantage l'impression que les miARN ne fonctionnent qu'en ciblant des 3´ UTR. S'ajoutait une raison technique : puisque les règles biochimiques de reconnaissance des cibles par les miARN n'étaient pas encore précisément connues, ces programmes de prédiction devaient faire appel à un autre type d'information : la conservation phylogénétique des sites-cibles identifiés. Partant du principe que les séquences les mieux conservées dans l'évolution sont les plus susceptibles d'être fonctionnelles, ces trois programmes sélectionnaient (parmi les nombreuses complémentarités imparfaites aux séquences de miARN) les sites qui apparaissaient les plus profondément conservés dans l'évolution.

On dispose maintenant de données expérimentales qui indiquent que les sites de fixation de miARN sont plus efficaces s'ils sont situés dans les 3´ UTR (Grimson *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2009a), et les identifications à haut débit d'ARN reconnus par le complexe RISC identifient principalement des sites de fixation dans les 3´ UTR (Chi *et al.*, 2009). Il semble donc, avec le recul, qu'il était raisonnablement

7. Il faut remarquer que la recherche de cibles pour le miARN *bantam* n'est pas détaillée par Brennecke *et al.* (2003), les auteurs renvoient à un article qu'ils annoncent en préparation – et qui sera effectivement publié quelques mois plus tard (Stark *et al.*, 2003). Mais ce deuxième article restreint sa recherche aux 3´ UTR, et le justifie en citant les cibles proposées pour les miARN de Nématode, ainsi que la cible proposée pour le miARN *bantam*. L'argument est circulaire, et n'apporte donc pas de nouvelle raison de négliger les 5´ UTR ou les séquences codantes.

approximatif de ne chercher des sites-cibles de miARN que dans les 3´ UTR.

3.3 Maturation des microARN

Nous avons vu, en section 3.1, que la RNase Dicer est responsable de la maturation du précurseur en tige-boucle des miARN : en clivant le sommet de la tige, elle libère la boucle (qui sera rapidement dégradée), et les deux brins appariés de la tige. L'un de ces deux brins s'accumulera davantage que l'autre : ce brin du duplex est le miARN. L'autre brin (qui, en général, est dégradé rapidement) est appelé « microARN star » (abrégé en : miARN*) (Lau *et al.*, 2001).

Le précurseur en tige-boucle est appelé « pré-miARN ». Dans la grande majorité des cas, le pré-miARN n'est pas le transcrit primaire du gène de miARN : c'est un intermédiaire de maturation, issu du clivage d'un autre précurseur plus précoce, appelé « pri-miARN » (Lee *et al.*, 2002). Le pri-miARN est le transcrit primaire, dont le pré-miARN est excisé par une enzyme de la famille RNase III : chez les Plantes, pour les quelques miARN analysés, c'est une enzyme Dicer qui convertit le pri-miARN en pré-miARN (Kurihara et Watanabe, 2004), alors que chez les Animaux, c'est une autre enzyme de la famille RNase III, nommée « Drosha » (Lee *et al.*, 2003). Cette différence mécanistique s'accompagne d'une différence de localisation sub-cellulaire : chez la Plante *Arabidopsis thaliana*, où l'enzyme Dicer responsable de la maturation des miARN (cette enzyme s'appelle DCL1, pour : *Dicer-like 1*) est nucléaire, les deux réactions de clivage (pri-miARN $\longrightarrow$ pré-miARN, puis : pré-miARN $\longrightarrow$ duplex miARN/miARN*) sont nucléaires (Papp *et al.*, 2003). Chez les Animaux, Drosha est nucléaire et Dicer est cytoplasmique : la conversion du pri-miARN en pré-miARN est nucléaire, et la conversion du pré-miARN en duplex miARN/miARN* est cytoplasmique (Lee *et al.*, 2002). Chez *Arabidopsis*, de nombreux duplex miARN/miARN* sont exportés du noyau par l'exportine « HASTY » (Park *et al.*, 2005). Chez les Animaux, c'est l'exportine-5 qui est responsable de l'export nucléo-cytoplasmique des pré-miARN (Yi *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004; Bohnsack *et al.*, 2004).

Le duplex miARN/miARN* est ensuite chargé sur une protéine de la famille Argonaute (voir section 4.2), dans le cytoplasme. Nous verrons, dans la section 4.5, comment le duplex est converti en miARN simple-brin.

Dans certains cas, les miARN subissent une modification post-transcriptionnelle au cours de leur maturation : l'oxygène 2´ de leur dernier nucléotide peut être méthylé (ces petits ARN perdent donc leur fonction 2´, 3´ diol sur l'extrémité 3´). C'est le cas chez la Plante *Arabidopsis thaliana* (Yu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006), et probablement également chez une Plante qui en est très éloignée phylogénétiquement, la Mousse *Physcomitrella patens*, dont les miARN portent également une modification chimique sur leur extrémité 3´ (Axtell *et al.*, 2007). La méthylation est déposée sur les extrémités 3´ de chacun des deux brins du duplex miARN/miARN* (Vilkaitis *et al.*, 2010). Une 2´-*O*-méthylation du dernier nucléotide des miARN a également été observée dans un cas particulier chez les Animaux : chez la Drosophile, les miARN chargés sur la protéine Argonaute nommée « Ago2 » [8] sont également méthylés sur l'oxygène 2´ de leur extrémité 3´ (Horwich *et al.*, 2007) [9]. Mais chez la Drosophile, c'est après ouverture du duplex que le petit ARN est méthylé (l'autre brin n'est donc pas méthylé) (Horwich *et al.*, 2007).

La biogenèse canonique des miARN, chez les Animaux et chez les Plantes, est résumée en Figure 3.2. Certains miARN font exception (certains miARN chez les Animaux ne sont pas maturés par Drosha, d'autres ne sont pas maturés par Dicer) : nous n'aborderons pas ces exceptions dans ce cours introductif.

8. Ce qui est rare : comme nous le verrons en section 4.3, la plupart des miARN de Drosophile sont essentiellement chargés sur une autre protéine, Ago1. Mais le tri entre Ago1 et Ago2 n'est pas absolu, et certains miARN sont parfois chargés sur Ago2 – notamment le miARN appelé « miR-277 », qui est chargé principalement sur Ago2 dans des cellules S2 en culture (Förstemann *et al.*, 2007).

9. Strictement parlant, cet article ne démontre pas qu'il s'agit d'une méthylation : il démontre que la fraction de miR-277 qui est chargée sur Ago2 est également modifiée chimiquement sur son extrémité 3´, et que cette modification dépend de la présence de la 2´-*O*-méthylase « Hen1 », orthologue de la méthyl-transférase responsable de la méthylation des miARN d'*Arabidopsis* (Yu *et al.*, 2005). Chez la Drosophile, cette enzyme a été nommée « DmHen1 » (*Drosophila melanogaster Hen1*), mais aussi, simultanément, « Pimet » (*piRNA methyltransferase*) (Saito *et al.*, 2007).

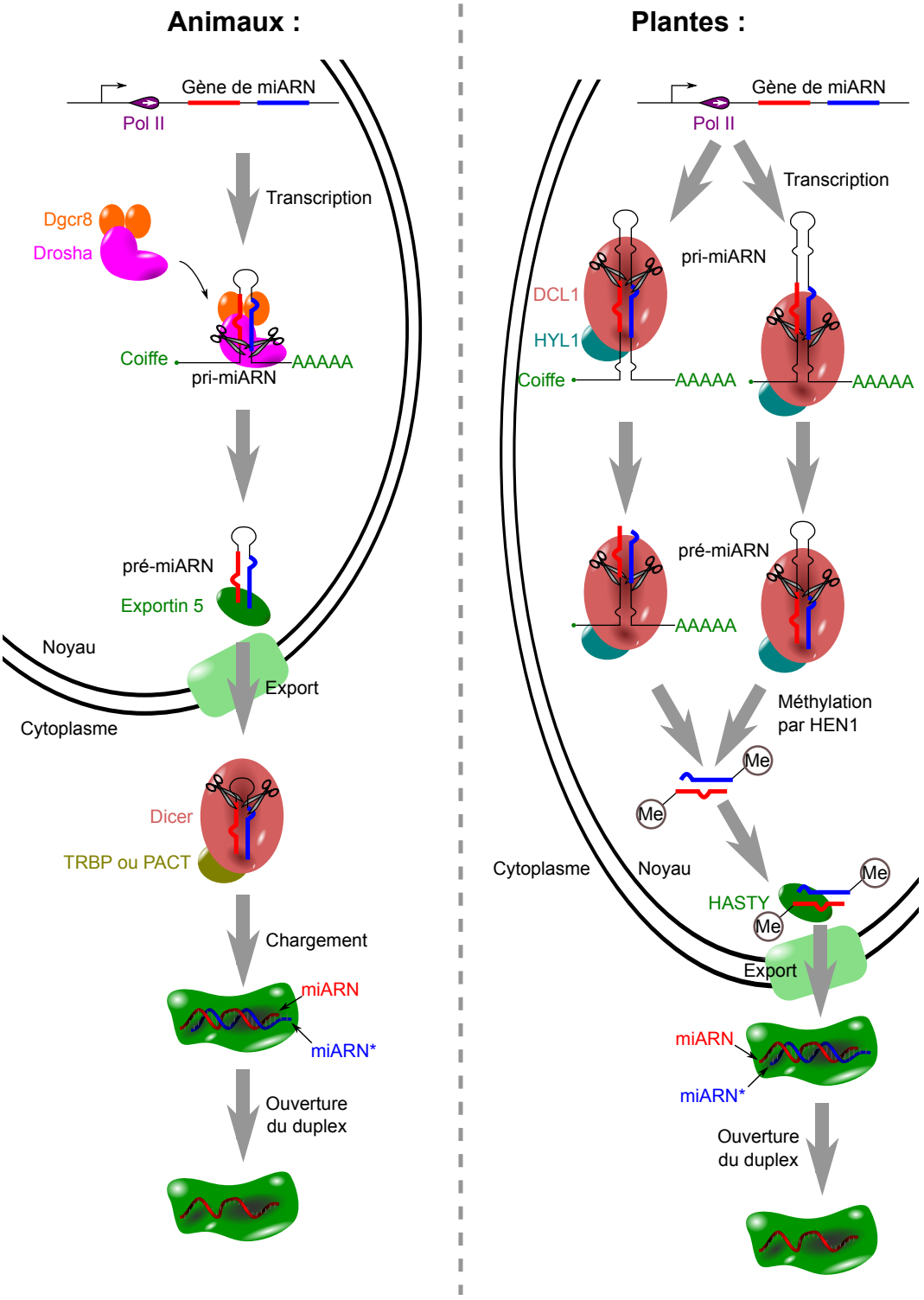


Figure 3.2 – **Biogenèse canonique des microARN.** Voir le texte pour les détails.

Chapitre 4

La biochimie du complexe RISC

4.1 Définition du complexe RISC

Rapidement, le même nom, « RISC », avait été donné aux complexes ribonucléoprotéiques bâtis sur les siARN, et sur les miARN (certains auteurs, pour distinguer, les ont respectivement appelés « siRISC » et « miRISC »). Il restait à démontrer qu'il s'agissait effectivement du même complexe.

La purification d'un complexe associé aux protéines Gemin3 et Gemin4 (deux protéines impliquées dans l'assemblage de ribonucléoparticules), à partir de cellules humaines en culture, avait révélé qu'il contenait à la fois la protéine Ago2 (également appelée « eIF2C2 » ; elle avait, un temps, été prise pour un facteur d'initiation de la traduction, dont les noms débutent souvent par « eIF », pour : *eukaryotic initiation factor*), et une variété de miARN (Mourelatos *et al.*, 2002). La protéine Ago2 est un membre de la famille « Argonaute » (voir section 4.2), déjà connue pour participer au RNAi : des cribles génétiques chez le Nématode (Tabara *et al.*, 1999), chez le Champignon *Neurospora crassa* (Cogoni et Macino, 1997) et chez la Plante *Arabidopsis thaliana* (Fagard *et al.*, 2000) avaient isolé des mutants de gènes Argonaute déficients pour le RNAi, et la purification d'un complexe effecteur du RNAi, à partir de cellules de Drosophile en culture, avait démontré qu'il contenait une protéine Argonaute (Hammond *et al.*, 2001). Dans un lysat de cellules humaines en culture, la fraction biochimique qui contient le complexe RISC bâti autour du miARN *let-7* contient également Ago2 et les protéines Gemin3 et Gemin4 (Hutvágner et Zamore, 2002).

Une autre propriété semblait partagée entre le siRISC et le miRISC : après ultra-centrifugation, chacun des deux est enrichi dans les fractions les plus lourdes, qui contiennent les polysomes (Olsen et Ambros, 1999; Djikeng *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2004).

Il était donc apparu que les deux complexes étaient difficiles à distinguer, et la plupart des auteurs ont cessé de faire la différence – et ont appelé « RISC », indistinctement, les complexes effecteurs des siARN et des miARN. On aurait pu croire que, quelle que soit la biogenèse des petits ARN (qu'ils soient des siARN ou des miARN), ils allaient connaître le même sort, s'associer aux mêmes protéines-partenaires, qui réaliseraient les mêmes actions moléculaires. En réalité, il subsiste des différences entre le miRISC et le siRISC, au moins chez la Drosophile : voir section 4.3.

Il faut également souligner un problème épistémologique essentiel en biochimie : la définition d'un « complexe biochimique » est beaucoup plus arbitraire qu'il y paraît. Si, à la suite d'une immuno-précipitation d'une protéine « A » quelconque, un expérimentateur conclut qu'elle interagit avec une protéine « B » (et que, donc, les protéines A et B forment un complexe), alors qu'elle n'interagit pas avec une protéine « C » (qui ne ferait donc pas partie du complexe A-B), il ne faudrait surtout pas s'imaginer qu'*in vivo* A et B sont irrémédiablement associées l'une à l'autre, et qu'elles n'interagissent jamais avec la protéine C. En réalité, les protéines A et B se dissocient et se réassocient fréquemment, et il leur arrive de s'associer aussi, mais moins stablement, avec la protéine C. Dans l'environnement intracellulaire, très concentré, les molécules passent leur temps à se rentrer dedans, à interagir plus ou moins longtemps avant de se dissocier (la durée de leur association dépend de la répartition des charges électrostatiques à leur surface ; il y aura toujours quelques charges positives à la surface de la protéine

C, pour interagir avec quelques charges négatives à la surface du complexe A-B, et leur permettre de rester en contact quelque temps avant de se dissocier). Finalement, il n'y a pas de différence qualitative entre, d'une part, les interactions qui maintiennent ensemble A et B, et celles qui existent entre A-B et C ; la différence est seulement quantitative : l'interaction entre A et B est plus stable que celle entre C et le complexe A-B, et, dans les conditions expérimentales choisies pour l'immunoprécipitation (température, composition des tampons de lavage, ...), il se trouve que l'interaction entre A et B était suffisamment bien maintenue pour être détectée, alors que celle entre C et le complexe A-B a été perdue. Mais il faut bien voir qu'*in fine*, tous les composants de la cellule (et même : tous les composants de l'organisme) ont toujours, deux à deux, un peu d'affinité mutuelle, et que c'est simplement le choix arbitraire des conditions expérimentales qui décide de ce que seront les « complexes biochimiques » qu'on dira avoir découverts.

Dans le cas précis du complexe RISC, selon les auteurs (donc : selon les conditions expérimentales), diverses molécules ont été, ou non, considérées comme des composants du complexe RISC (les protéines FMR1, Gemin, Dicer, ...). La variété de point de vue sur la question souligne surtout la vanité de la définition précise de ce que serait un « complexe biochimique ». On considère maintenant que le complexe RISC contient un petit ARN et une protéine Argonaute, et que cet ensemble a ensuite la capacité d'interagir plus ou moins stablement avec d'autres partenaires (les protéines GW182, Dicer, ...), et la question de savoir si ces protéines devraient être considérées comme des composants de RISC, ou comme des partenaires de RISC, n'est finalement pas si importante.

4.2 La famille protéique Argonaute

Le premier membre de cette famille protéique a été identifié à la suite d'un crible génétique chez *Arabidopsis thaliana* : les homozygotes du gène nommé *AGO1* (abréviation pour : « Argonaute n°1 ») présentent des défauts morphologiques, notamment des feuilles très fines et recourbées, qui donnent à la plante l'apparence d'une petite pieuvre (d'où le nom d'« Argonaute »). Ce gène était en réalité le premier membre découvert d'une famille plus nombreuse (on sait maintenant qu'il y a 10 gènes Argonaute chez *Arabidopsis*, nommés AGO1 à AGO10), et retrouvée chez de nombreux Eucaryotes.

Certains auteurs ont également nommé cette famille « PPD » (pour : *PAZ and PIWI domains*, du nom de deux domaines protéiques reconnaissables chez tous les membres de la famille). Comme exposé en section 4.1, des cribles génétiques menés chez un Animal, un Champignon et une Plante avaient montré que des gènes Argonaute étaient nécessaires au RNAi chez des espèces éloignées (Cogoni et Macino, 1997; Tabara *et al.*, 1999; Fagard *et al.*, 2000).

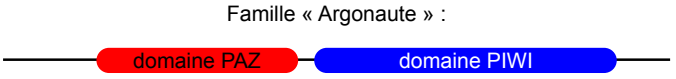
La comparaison des séquences protéiques des Argonautes de divers clades phylogénétiques permet de distinguer plusieurs sous-familles. Par malheur, la nomenclature a été très mal choisie :

— Une sous-famille est appelée « Ago », elle est représentée notamment chez les Plantes, les Champignons et les Animaux (Carmell *et al.*, 2002).
— Une sous-famille est appelée « Piwi », elle n'est retrouvée que chez les Animaux (Carmell *et al.*, 2002).
— Chez le Nématode, de nombreuses protéines Argonaute semblent aussi différentes de Ago que des Piwi : elles ont été regroupées dans une troisième sous-famille, appelée « Wago » (*worm-specific Ago* ; Gu *et al.* (2009b)). Alors que les Ago sont similaires entre elles, et les Piwi similaires entre elles, les Wago regroupent des protéines très variables (Wedeles *et al.*, 2013), qui ne constituent pas un clade à proprement parler : ce sont les Argonautes de Nématode, qu'on n'a pas su classer dans l'une des deux autres sous-familles.

La nomenclature des protéines Argonaute pose plusieurs problèmes. D'une part, de nombreux auteurs confondent « Argonaute » (le nom de la famille entière) et « Ago » (le nom d'une des trois sous-familles ; il faut dire qu'« Ago » était initialement l'abréviation d'« Argonaute »). Dans tout ce document, nous tâcherons de nous en tenir à la nomenclature officielle, mais l'attention du lecteur est attirée sur les confusions fréquentes entre ces deux termes, qui sont parfois utilisés comme s'ils étaient synonymes.

D'autre part, le nom de la sous-famille « Piwi » est également source d'ambiguïté : cette sous-famille a été nommée d'après le nom d'un de ses membres (il existe une protéines de Drosophile appelée « Piwi », elle est produite à partir du gène appelé *piwi*). Le même nom a donc été donné à deux choses différentes : un membre de la sous-famille, et la sous-famille elle-même. Et même, à trois choses différentes, puisque, comme nous allons le voir un peu plus loin, l'un des domaines protéiques des Argonautes s'appelle « Piwi » (là aussi, des auteurs peu inspirés ont simplement donné à ce domaine, le nom d'une protéine où il apparaissait) ... or ce domaine « Piwi » est partagé par toutes les Argonautes (pas seulement celles de la sous-famille « Piwi », mais également celles des sous-familles « Ago » et « Wago »).

Enfin, les noms des protéines individuelles n'ont pas suivi une nomenclature uniforme. Certaines de ces protéines ont été baptisées « Ago1 », « Ago2 », ..., ce qui est assez naturel pour les membres de la sous-famille « Ago ». Mais chez la Drosophile, une protéine a été baptisée « Ago3 » (Williams et Rubin, 2002) alors qu'elle appartient à la sous-famille « Piwi » plutôt qu'à la sous-famille « Ago ».



	Sous-famille « Ago » :	Sous-famille « Piwi » :	Sous-famille « Wago » :
D. melanogaster :	Ago1, Ago2	Piwi, Aubergine, Ago3	(aucune)
C. elegans :	ALG-1, ALG-2, ALG-3, ALG-4, T23D8.7, RDE-1	PRG-1, PRG2, ERGO-1	WAGO-1 à WAGO-12, CSR-1, C04F12.1
M. musculus :	Ago1, Ago2, Ago3, Ago4	Miwi, Mili, Miwi2	(aucune)
A. thaliana :	AGO1, AGO2, AGO3, AGO4, AGO5, AGO6, AGO7, AGO8, AGO9, AGO10	(aucune)	(aucune)

Figure 4.1 – **Classification des protéines Argonaute.** Recensement des protéines Argonaute chez quatre organismes-modèles, réparties par sous-famille. Chaque protéine, dans chaque sous-famille, contient à la fois un domaine « PAZ » et un domaine « PIWI » (schématisés en haut de la figure).

Parmi les constituants que les expériences de biochimie identifiaient dans le complexe RISC, et hormis les petits ARN eux-mêmes, seule la famille Argonaute était systématiquement retrouvée. Par une approche différente, les cribles génétiques suggéraient également un rôle important des protéines Argonaute dans le RNAi. Encouragés par ces données, plusieurs laboratoires ont concentré leurs efforts sur cette famille de protéines.

Ainsi l'équipe de T. Tuschl, en immunoprécipitant séparément chacune des quatre protéines Ago (sur-exprimée dans des cellules humaines en culture sous forme taggée avec un épitope, pour faciliter sa purification), a montré que chacun des quatre immunoprécipitats contenait des miARN, mais que seul l'immunoprécipitat d'Ago2 contenait une activité de clivage pour des ARN-cibles complémentaires de deux de ces miARN (et seule la répression d'Ago2, pas celle des trois autres Ago, inhibait fortement la répression d'une cible-rapportrice) (Meister *et al.*, 2004).

D'autre part, l'équipe de L. Joshua-Tor a cristallisé une protéine Argonaute procaryotique [1] et

1. Alors que le RNAi et les miARN n'existent que chez les Eucaryotes, de même que les enzymes Dicer, certaines Eubactéries et certaines Archae possèdent des protéines Argonaute. Ces protéines n'y participent vraisemblablement pas à une répression post-transcriptionnelle comme chez les Eucaryotes, mais à la dégradation d'ADN invasifs (par exemple, des plasmides), guidées soit par de petits ARN (Olovnikov *et al.*, 2013), soit par de petits ADN (Swarts *et al.*, 2014).

établi sa structure tridimensionnelle. Il est apparu que le domaine Piwi présente de grandes similitudes structurales avec le domaine « RNase H », qui clive les ARN dans un duplex ARN/ADN (Song *et al.*, 2004). Cette information suggérait que l'endonucléase responsable de l'activité catalytique de clivage des cibles du RNAi [2] était une protéine Argonaute. Effectivement, l'équipe de G. Hannon montrait dans le même temps que des souris mutantes pour *Ago2* mouraient dès le stade embryonnaire, et que des cellules purifiées d'embryons $Ago2^{-/-}$ sont incapables de réprimer un gène-cible après transfection de siARN ; même de simples mutations ponctuelles dans la protéine Ago2 suffisent à abolir le RNAi (Liu *et al.*, 2004).

Ces données suggéraient fortement que, chez les Mammifères, Ago2 est la fameuse enzyme *Slicer*. La confirmation est venue l'année suivante, quand le même laboratoire a pu reconstituer un complexe RISC fonctionnel en incubant une protéine Ago2 recombinante et un petit ARN (Rivas *et al.*, 2005). Mis à part la nature du petit ARN (le complexe RISC est chargé par un siARN, double-brin, alors que la protéine Ago2 recombinante doit être incubée avec un petit ARN simple-brin : il est probable qu'une machinerie de chargement, absente dans la reconstitution *in vitro*, soit nécessaire au chargement du double-brin, alors que le simple-brin peut venir se loger, avec une efficacité faible mais suffisante, dans la protéine Ago2 purifiée), le complexe RISC reconstitué présentait les caractéristiques biochimiques attendues (clivage de la cible à la position prédite, implication d'un cation divalent dans la catalyse du clivage, ...). La similitude structurale du domaine Piwi avec le domaine RNase H, déjà très bien étudié, a également permis de comprendre le mécanisme moléculaire de la réaction de clivage, par analogie (Rivas *et al.*, 2005).

Depuis, d'autres structures cristallographiques ont pu être établies : une protéine Argonaute eubactérienne, chargée avec un petit ADN-guide (cette Argonaute, issue de *Thermus thermophilus*, a une bonne affinité pour les petits ADN-guides, mais ne semble pas fixer stablement de petits ARN-guides) (Wang *et al.*, 2008b) ; la même protéine Argonaute eubactérienne, chargée avec un ADN-guide, et fixée, en plus, sur un ARN-cible (Wang *et al.*, 2008a). Ces structures ont montré que le petit ADN-guide, chargé sur la protéine, exposait ses nucléotides 2 à 6 (pour le complexe protéine-ADN) ou 2 à 8 (pour le complexe protéine-ADN-ARN) en conformation hélicoïdale, tournés vers le solvant (donc : accessibles à l'appariement avec l'ARN-cible). Le reste de la molécule d'ADN-guide, plus désorganisé, n'était pas en conformation hélicoïdale dans ces structures. Ces observations s'accordaient assez bien avec des données de génétique, de biologie moléculaire et de phylogénie moléculaire, qui avaient montré que les nucléotides 2 à 7, ou 2 à 8, des miARN étaient les principaux déterminants de la reconnaissance des cibles (Bartel, 2009) (le segment 2–7 est appelé « graine », ou *seed* en anglais ; il y a longtemps eu une certaine ambiguïté sur la définition exacte du terme : certains auteurs considéraient que la graine s'étendait du nucléotide 2 au nucléotide 8 ; une nomenclature plus précise a été proposée plus récemment, mais elle reste confuse et ne semble pas avoir été adoptée largement par la communauté : la *seed* couvrirait les nucléotides 2 à 7, et la *extended seed*, également appelée *seed region*, couvrirait les nucléotides 2 à 8 ; Bartel (2018)). L'exposition de la graine du miARN par la protéine Argonaute expliquerait bien cette importance disproportionnée de la graine dans la reconnaissance des ARN-cibles : lors d'une collision entre le complexe RISC et un ARN-cible, si celui-ci présente une complémentarité parfaite à la graine, il pourra s'y apparier rapidement, sans attendre une transconformation du complexe RISC ; si la complémentarité entre le reste du miARN et la cible est bonne également, les deux ARN pourront ensuite s'enrouler l'un autour de l'autre, moyennant des changements de conformation de la protéine et des pertes de contacts entre le petit ARN et la protéine – mais cet appariement du 3´ du petit ARN ne se fera que difficilement de façon spontanée, s'il n'est pas d'abord nucléé par l'appariement sur le 5´ du petit ARN, qui stabilise leur interaction suffisamment longtemps pour permettre cette gymnastique.

On le voit, les interprétations de ces structures d'Argonautes procaryotiques ont atteint un niveau de détail très fin, alors qu'on n'était pas sûrs de la conservation des propriétés biochimiques de ces protéines sur d'aussi longues divergences phylogénétiques (et le simple fait que la protéine cristallisée soit chargée avec un petit ADN plutôt qu'un petit ARN, n'incitait pas à l'optimisme ...). Mais la cristallisation de la protéine Ago2 humaine (qui s'est trouvée être chargée par des petits ARN qui ont été co-purifiés

2. Cette enzyme avait temporairement été nommée « *Slicer* » avant qu'on ne l'identifie.

pendant la préparation – ce qui a donné quelques indications sur la structure du petit ARN-guide, en plus d'en donner sur celle de la protéine) a confirmé que cette protéine eucaryotique exposait elle aussi la graine de ses petits ARN-guides, en conformation hélicoïdale, prête à l'appariement (Schirle et MacRae, 2012). La cristallisation d'Ago2 humaine, chargée avec une population homogène de petits ARN (un oligo ARN constitué des 20 premiers nucléotides du miARN miR-20 humain) a permis d'évaluer plus précisément la structure du petit ARN : la protéine humaine expose la graine vers le solvant, accessible à l'appariement avec une cible, mais dans une conformation hélicoïdale moins longue que sur les protéines procaryotiques (les bases sont correctement empilées jusqu'au 6ème nucléotide du miARN, puis la structure hélicoïdale est interrompue entre le 6ème et le 7ème nucléotide) (Elkayam *et al.*, 2012). Enfin, la cristallisation d'un complexe contenant Ago2 humaine, un petit ARN homogène, et un ARN-cible minimal (long de 11 nucléotides) a permis d'établir un scénario de transconformations du complexe RISC humain au cours de la reconnaissance de la cible (Schirle *et al.*, 2014). Les structures d'autres Argonautes eucaryotes ont également confirmé l'essentiel des scénarios qui avaient été extrapolés à partir des structures procaryotiques (Nakanishi *et al.*, 2012, 2013; Faehnle *et al.*, 2013). Un aperçu de la structure tridimensionnelle du complexe RISC humain (protéine Ago2 chargée par un petit ARN-guide), fixé sur un ARN-cible, est donné en Figure 4.2.

Il avait été établi que la réaction de clivage endonucléolytique nécessitait une complémentarité parfaite entre le petit ARN-guide et son ARN-cible, au moins dans le milieu du duplex, au voisinage du site de clivage (voir section 2.2). Il existe donc une deuxième condition : il faut que le petit ARN-guide soit chargé sur une protéine Ago compétente pour cette réaction de clivage (par exemple, la protéine Ago2 de Mammifère).

4.3 Spécialisation des protéines Argonaute

Puisqu'il existe quatre protéines Ago chez les Mammifères, et que seule Ago2 joue le rôle de *Slicer*, les trois autres Ago ne participent vraisemblablement qu'à l'autre mode de répression des cibles : la répression traductionnelle et la dégradation exonucléolytique. La purification des petits ARN associés à chacune des quatre protéines Ago de Mammifères (par immunoprécipitation de constructions taggées et surexprimées, dans des cellules en culture) semble indiquer qu'elles sont toutes chargées avec la même population de miARN, sans préférence de certaines Ago pour certains miARN (Meister *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Il faut cependant remarquer que la surexpression pourrait, en tant que telle, amener chaque protéine (peut-être en large excès vis-à-vis des autres protéines, et de la population de petits ARN) à charger tous les petits ARN disponibles, alors que dans des conditions naturelles elle aurait pu avoir des préférences.

Chez la Drosophile, la situation semble clairement différente : il existe deux protéines Ago (nommées Ago1 et Ago2), et elles sont chargées avec des populations de petits ARN distinctes. Ago1 est principalement chargée avec des miARN, alors qu'Ago2 est principalement chargée avec des siARN (qu'ils soient endogènes ou exogènes) (Caudy *et al.*, 2002; Okamura *et al.*, 2004). Les activités biochimiques de ces deux protéines sont également différentes, puisqu'Ago2 est une endonucléase très efficace, alors qu'Ago1 a une activité endonucléolytique certes détectable, mais très lente (au point qu'elle a probablement peu de conséquences physiologiques : si Ago1 met plusieurs heures à cliver une molécule de cible, ou à se débarrasser des produits de clivage après la réaction, il est prévisible que l'ARN-cible soit dégradé par d'autres mécanismes avant que le clivage guidé par Ago1 ait réellement porté à conséquence) (Förstemann *et al.*, 2007).

Il apparaît donc que, chez la Drosophile, les deux protéines Ago soient spécialisées dans des voies biologiques distinctes. Ago1 est principalement chargée avec des miARN, dont les cibles sont très imparfaitement complémentaires. Elle en guide la répression traductionnelle et la dégradation exonucléolytique. Ago2 est essentiellement chargée avec des siARN, et elle est très efficace pour cliver leurs cibles parfaitement ou presque parfaitement complémentaires, et relarguer rapidement les produits de clivage (ce qui la rend disponible pour de nouveaux cycles réactionnels) (Förstemann *et al.*, 2007). C'est la machinerie de chargement des Ago qui est responsable du triage des petits ARN : les siARN,

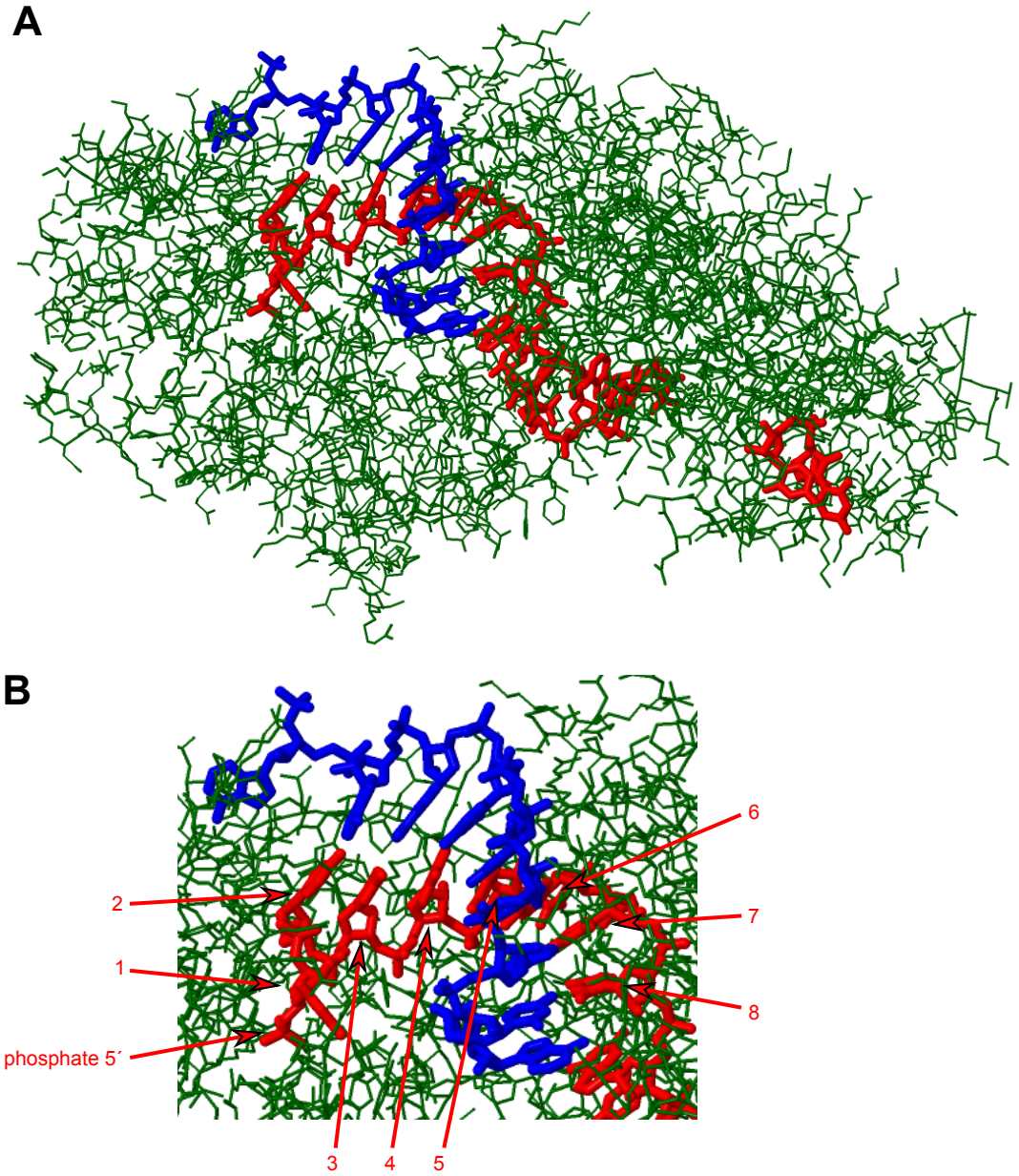


FIGURE 4.2 – **Structure du complexe RISC humain.** Coordonnées atomiques tirées du numéro d'accession 4W5T de la banque de données PDB (Schirle *et al.*, 2014). En vert : protéine Ago2 humaine. En rouge : brin guide du siARN. En bleu : ARN-cible. **A.** L'extrémité 5´ du brin guide est à gauche, son extrémité 3´ à droite (*N.B.* : plusieurs nucléotides de la moitié 3´ du brin guide sont désordonnés dans le cristal, ils ne sont pas représentés). **B.** Détail sur l'extrémité 5´ du brin guide. Les 8 premiers nucléotides du brin guide sont numérotés. Le 1er nucléotide n'est pas apparié (même s'il se trouve que le nucléotide de l'ARN-cible, une adénosine ici, est complémentaire de ce nucléotide, une uridine ici) : il est orienté dans une autre direction, par l'ancrage du phosphate 5´ dans une poche de la protéine. Notez que le 8ème nucléotide du brin guide (une uridine) n'est ici pas apparié en géométrie « Watson-Crick » au nucléotide de la cible qui lui fait face (une cytidine), bien que leurs bases azotées soient à proximité l'une de l'autre.

aussi bien que les duplex miARN/miARN*, sont produits par une enzyme Dicer (chez la Drosophile : Dicer-1 pour les miARN, Dicer-2 pour les siARN ; voir note de bas de page n° 3 du chapitre 2). Ces deux populations de duplex sont ensuite dirigées vers le chargement sur Ago1 ou sur Ago2 selon la structure

de leur duplex, et indépendamment de leur mode de biogenèse [3] : les duplex qui ne présentent pas de mésappariement au milieu de leur séquence tendent à être chargés sur Ago2 (c'est le cas en général des siARN), alors que ceux qui sont mésappariés en milieu de séquence sont principalement chargés sur Ago1 (c'est le cas de la plupart des duplex miARN/miARN*, à l'exception de miR-277/miR-277*) (Tomari *et al.*, 2007).

Un phénomène similaire a été décrit chez le Nématode, où les duplex miARN/miARN* sont chargés sur une protéine Ago ou une autre, en fonction de la structure secondaire du duplex (Steiner *et al.*, 2007). Il faut toutefois remarquer que certaines données présentées dans cet article apparaissent frauduleuses (`https://pubpeer.com/publications/E59CC87A3223D6D46EC93B7110F829?utm_source=Firefox&utm_medium=BrowserExtension&utm_campaign=Firefox`), et que le statut exact des conclusions de l'article n'a jamais été clarifié par les auteurs.

4.4 Brin guide et brin passager

Dans un duplex (siARN, ou duplex miARN/miARN*), on appelle « brin guide » le petit ARN qui restera stablement associé à la protéine (c'est lui qui se nichera dans le sillon de la protéine, et servira de guide pour la reconnaissance des futures cibles), et on appelle « brin passager » l'autre brin (qui, après chargement sur Ago, sera rapidement dégradé). Quand le duplex est suffisamment complémentaire pour permettre le clivage endonucléolytique, et qu'il est chargé sur une protéine compétente pour le clivage (par exemple, la protéine Ago2 de Drosophile, ou la protéine Ago2 humaine), le brin passager sera clivé, exactement comme un ARN-cible du RNAi (de ce point de vue, le brin passager est la première cible, chronologiquement, de son brin guide) ; les deux fragments issus de ce clivage seront ensuite libérés passivement (puisque le clivage a lieu à proximité du milieu du brin passager, chaque fragment n'est plus apparié au guide que par une dizaine de paires de bases) (Matranga *et al.*, 2005; Rand *et al.*, 2005). Dans les autres cas (par exemple, quand le duplex est très imparfaitement apparié : c'est le cas de la plupart des duplex miARN/miARN*), les deux brins sont séparés par un processus de relaxation structurale de la protéine (déformée au moment du chargement du duplex, et qui ouvre le duplex en se restructurant ; Iwasaki *et al.* (2010)). Le brin passager, relâché dans le cytoplasme, est ensuite rapidement dégradé.

Il est important de souligner un point de vocabulaire : certains auteurs confondent la distinction « brin guide/brin passager » avec la distinction « miARN/miARN* ». Ce sont deux concepts différents : la différence entre le brin guide et le brin passager se détermine à l'échelle de la molécule unique (enfin, du duplex unique) : pour une molécule d'ARN donnée, appariée à une autre molécule d'ARN, l'une des deux ira se loger dans le sillon de la protéine Ago, et y restera stablement associée, alors que l'autre sera rapidement dégradée. Il est possible que, juste à côté, un autre duplex, constitué des deux mêmes séquences d'ARN, soit chargé sur une autre protéine Ago, mais dans l'autre sens : et son brin guide aura donc la séquence du brin passager du premier duplex, et réciproquement. La notion de « miARN/miARN* », quant à elle, s'apprécie à l'échelle de la population de molécules : pour une séquence donnée de duplex, on s'aperçoit que c'est, en général, la même séquence qui sera choisie comme brin guide, et l'autre séquence qui sera généralement choisie comme brin passager (nous reviendrons, en section 4.5, sur les déterminants de cette sélection). Par exemple, dans le duplex entre les ARN <->sub*cmtt/m/n`UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU` et `CUAUGCAAUUUUCUACCUUACC`, le premier brin sera utilisé comme brin guide dans la grande majorité des cas, et seules quelques molécules d'Ago utiliseront le deuxième brin comme guide. On appelle « miARN » le brin qui est, le plus souvent, choisi comme brin guide, et « miARN* » celui qui est le plus souvent choisi comme brin passager [4].

3. C'est ainsi que le miARN miR-277, dont la biogenèse est typique des miARN canoniques de Drosophile, est principalement chargé sur Ago2 alors que les autres miARN sont principalement chargés sur Ago1 : c'est parce que son duplex miARN/miARN* présente des similitudes de structure avec un siARN (Förstemann *et al.*, 2007).

4. Cette définition n'a de sens que si, d'un type cellulaire à l'autre, le duplex conserve la même asymétrie (*i.e.* : le même brin est préférentiellement sélectionné comme brin-guide, donc stabilisé par son interaction avec Ago ; ce qui implique que c'est lui qui s'accumulera le plus en régime stationnaire). C'est généralement le cas (il y a donc, souvent, un sens à identifier un miARN et un miARN*), mais il existe des exceptions (des duplex dont l'abondance relative des deux

4.5 La règle d'asymétrie

Alors que les siARN d'une part, et les duplex miARN/miARN* d'autre part, sont des duplex, le complexe RISC mature ne contient qu'un seul brin d'ARN (le brin guide). Or, pour un duplex donné, le brin sélectionné tend à être souvent le même (ce qui fait que, dans un duplex miARN/miARN*, on peut ensuite distinguer un miARN d'un miARN*). Il doit donc exister des déterminants de sélection d'un brin d'ARN par rapport à l'autre, et leur nature est d'abord apparue très mystérieuse : d'un point de vue biochimique, les deux brins sont très similaires (ce sont de petits ARN, d'une vingtaine de nucléotides chacun, monophosphorylés en 5´, et parmi lesquels il nous serait difficile, à nous scientifiques, de dire lequel nous préférons – et pourtant les protéines de chargement du complexe RISC parviennent apparemment à les distinguer et à choisir souvent le même).

L'analyse comparative de l'efficacité des deux brins d'un duplex, dans le guidage du clivage d'une cible qui lui serait spécifique, a permis de remarquer que le brin le plus efficace (c'est à dire : celui qui sera le plus souvent choisi comme brin guide) tend à être celui dont l'extrémité 5´ est la moins stablement appariée (Aza-Blanc *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Selon la répartition des mésappariements, selon la richesse relative des deux extrémités en paires `A-U`, `G-C` ou en paires *wobble* `G-U`, l'un des deux brins sera certainement moins stablement apparié que l'autre, sur son 5´. Ce brin tend à être, fréquemment, le brin guide, et il est possible de modifier à volonté l'asymétrie de choix du brin guide en perturbant la différence de stabilité des deux extrémités du duplex. Quant aux duplex miARN/miARN* naturels, la plupart d'entre eux semblent également suivre cette règle (dans la plupart des duplex analysés, le miARN est le brin dont l'extrémité 5´ est la moins stablement appariée). Cette règle semble généralement respectée si on mesure la stabilité d'appariement en comparant la stabilité d'appariement du tétranucléotide en 5´ de chaque brin (Schwarz *et al.*, 2003).

On avait d'abord cru que le mécanisme moléculaire de lecture de la différence de stabilité d'appariement allait impliquer une hélicase, qui ouvrirait (avec plus ou moins de difficultés) le duplex à partir d'une extrémité ou d'une autre. Le mécanisme n'a, pour le moment, été élucidé que dans un cas : pour les duplex chargés sur la protéine Ago2 de Drosophile. Dans ce cas particulier, aucune hélicase ne semble participer au processus ; les duplex sont pris en charge par un hétérodimère de protéines (constitué des protéines Dicer-2 et R2D2 ; Dicer-2 joue donc deux rôles distincts dans la biogenèse des siARN : elle clive les longs ARN double-brin en siARN, puis, en association avec R2D2, elle charge les siARN, de manière orientée, sur la protéine Ago2). Dans cet hétérodimère, R2D2 interagit préférentiellement avec l'extrémité du duplex la plus stablement appariée, tandis que Dicer-2 interagit préférentiellement avec l'autre extrémité (Tomari *et al.*, 2004). Cette association polarisée détermine l'identité du brin guide : elle oriente le duplex au moment de son chargement sur Ago2, en glissant le futur brin guide dans le sillon de la protéine, tandis que le futur brin passager occupe l'emplacement des futures cibles du complexe.

L'hétérodimère entre Dicer-2 et R2D2 est appelé « RLC » (*RISC-loading complex*). La machinerie de chargement des autres protéines Ago (que ce soit Ago1 de Drosophile, ou les Ago d'autres organismes) est encore mal connue [5], et, bien que la règle d'asymétrie d'appariement semble s'appliquer aussi aux petits ARN chargés sur ces protéines, on ne sait pas encore comment leurs machineries de chargement la mesurent.

brins est très variable dans certains échantillons biologiques, au point que le brin le plus abondamment détecté n'est pas le même en fonction des échantillons ; Ro *et al.* (2007); Chiang *et al.* (2010)).

5. Il existe une controverse concernant l'identité de la machinerie de chargement du complexe RISC humain. Certains auteurs ont proposé qu'elle était composée d'un complexe contenant Dicer et Trbp (qui est, comme R2D2 chez la Drosophile, une protéine contenant deux domaines « dsRBD » d'interaction aux ARN double-brin) (Maniataki et Mourelatos, 2005; MacRae *et al.*, 2008). Cette analogie avec le complexe RLC de Drosophile (qui contient lui aussi une enzyme Dicer et une protéine à deux domaines dsRBD) est séduisante, mais elle s'accorde mal avec certaines données expérimentales (Betancur et Tomari, 2012).

Chapitre 5

Conclusion

Les quatre chapitres précédents reprennent le contenu des cours introductifs de la première demi-journée de l'édition 2019 de l'école thématique « InteRNAt », consacrée aux petits ARN régulateurs. Cette première demi-journée proposait une session de présentation de deux classes de petits ARN, les siARN et les miARN. Il existe une troisième classe (reconnue en 2006, bien que les premières observations soient plus anciennes – ces petits ARN avaient initialement été pris, par erreur, pour des siARN : voir le dernier paragraphe de la section 2.4) : la classe des « piARN » (*Piwi-interacting RNAs*). Les piARN sont spécifiques des Métazoaires, ils sont principalement exprimés dans les gonades. Leur biogenèse est distincte de celle des siARN ou des miARN (ils ne dérivent pas du clivage d'ARN double-brin par des enzymes de la famille RNase III), et participent, au moins, à la répression des éléments transposables, principalement en guidant l'hétérochromatinisation de cibles génomiques spécifiques. Plusieurs cours de l'école thématique ont été consacrés aux piARN, ainsi qu'au détail de quelques aspects de la biologie des siARN ou des miARN.

Il est probable que de nouvelles éditions de l'école thématique InteRNAt soient organisés dans le futur (nous envisageons une 2ème édition à l'automne 2021, sous réserve d'acceptation par le CNRS). Ce document sera alors mis à jour et complété, notamment avec un chapitre consacré aux piARN.

Chapitre 6

Matériel pour l'enseignant : notions et exercices

6.1 Analyse d'un corpus de documents : Caractérisation du mécanisme d'interférence à ARN

Ressources

— Figures 1–4 : Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., et Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, 13(24) : 3191–3197. **Texte intégral** : `http://genesdev.cshlp.org/content/13/24/3191.full.pdf+html` (*copyright : Cold Spring Harbor Laboratory Press*)

— Figures 5–8 : Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., et Bartel, D. P. (2000). RNAi : double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1) : 25–33. **Texte intégral** : `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2980620-0`

— Figure 9 : Elbashir, S. M., Lendeckel, W., et Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2) : 188–200. **Texte intégral** : `http://genesdev.cshlp.org/content/15/2/188.full.pdf+html` (*copyright : Cold Spring Harbor Laboratory Press*)

Notions étudiées dans l'exercice

— **Cours :** inhibition de l'expression de gènes par interférence à ARN ; biogenèse des siARN ; notion d'ARN simple-brin sens ou antisens et double-brin ; coiffe de l'ARNm

— **Techniques d'analyse :** northern-blotting ; mesure de la répression des ARNm grâce à un ARNm rapporteur ; luciférase et mesure de luminescence

Énoncé

Cette étude de documents est composée de figures issues d'articles scientifiques. Vous devez analyser chaque figure en 3 parties : une rapide explication du système expérimental utilisé, une description des résultats, et une interprétation avec, au besoin, apport de connaissances. Les questions posées ont pour objectif de vous guider dans vos analyses. Vous pouvez donc y répondre en conclusion de chaque analyse de figure, à l'exception des questions 1 et 11.

Dans les années 90, Andrew Fire et Craig Mello étudiaient la régulation de l'expression des gènes chez le nématode *Cœnorhabditis elegans*. Ils se sont notamment intéressés au développement d'un système de répression artificielle de l'expression d'un gène d'intérêt dans cet organisme. D'après leurs observations, l'injection d'ARNm codant une protéine musculaire n'entraîne aucun changement dans

le comportement des vers. La séquence nucléotidique de l'ARNm est décrite comme étant la séquence « sens » et l'injection d'ARN « antisens », qui peut s'apparier avec l'ARNm, n'a également aucun effet. Mais lorsque Fire et Mello ont injecté un duplex (ARN sens et antisens appariés), ils ont observé que les vers présentaient des mouvements de contraction anormaux. Des mouvements similaires avaient déjà été observés chez les vers mutants ne codant plus la protéine musculaire fonctionnelle. Ils ont ainsi démontré qu'il était possible de réprimer l'expression d'un gène spécifique en injectant de l'ARN double-brin partageant une longue homologie avec ce gène (Fire *et al.*, 1998).
Afin d'étudier ce mécanisme *in vitro*, des chercheurs d'une autre équipe utilisent des ARNm rapporteurs issus de deux gènes luciférases : *Renilla reniformis* luciferase (Rr-Luc) et *Photinus pyralis* luciferase (Pp-Luc), qui peuvent être incubés dans du lysat embryonnaire de Drosophile.

Question 1 : A partir de vos connaissances, définissez brièvement le mécanisme de régulation des gènes découvert par Fire et Mello.

Cliquer ici (Fig. 2 de Tuschl *et al.* (1999)).

Figure 1 – **(A)** Ratio of luciferase activities after targeting Pp-Luc mRNA with ssRNA (sense RNA), asRNA (antisense RNA), or dsRNA (double-strand RNA) from the Pp-Luc gene. Luciferase activity was normalized to the buffer control. **(B)** Ratio of luciferase activities after targeting Rr-Luc mRNA with ssRNA, asRNA, or dsRNA from the Rr-Luc gene.

Question 2 : D'après la Figure 1, le système expérimental développé par cette équipe pour l'étude *in vitro* de ce mécanisme est-il opérationnel ?

Cliquer ici (Fig. 3 de Tuschl *et al.* (1999)).

Figure 2 – **(A)** Experimental strategy. The same dsRNAs used in Figure 1 (or buffer) was serially preincubated with twofold dilutions in six successive reactions with *Drosophila* embryo lysate, then tested for its capacity to block mRNA expression. As a control, the same amount of dsRNA or buffer was diluted directly in buffer and incubated with Pp-Luc and Rr-Luc mRNAs and lysate. **(B)** Ratio of luciferase activities when targeting Pp-Luc mRNA. Black columns indicate the dsRNA or the buffer was serially preincubated ; white columns correspond to a direct 32-fold dilution of the dsRNA. Values were normalized to those of the buffer controls. **(C)** Ratio of luciferase activities when targeting Rr-Luc mRNA. The corresponding buffer control is shown in B.

Question 3 : Quelle information importante apporte l'analyse de la Figure 2 ?

Cliquer ici (Fig. 4 de Tuschl *et al.* (1999)).

Figure 3 – Increasing concentrations of dsRNA targeting nanos mRNA were added to reactions containing 5 nM dsRNA (the same dsRNAs used in Figure 1) targeting Pp-Luc mRNA (black columns, left axis) or Rr-Luc mRNA (white columns, right axis). Each reaction contained both a target mRNA (Pp-Luc for the black columns, Rr-Luc for the white) and an unrelated control mRNA (Rr-Luc for the black columns, Pp-Luc for the white). Values were normalized to the buffer control (not shown).

Question 4 : D'après la Figure 3, quel est l'impact de l'ajout de *dsRNA* contre l'ARNm nanos sur ce mécanisme de répression ? Proposez une explication.

Cliquer ici (Fig. 5 de Tuschl *et al.* (1999)).

FIGURE 4 – **(A)** Pp-Luc mRNA or Rr-Luc mRNA were incubated in lysate with either buffer or Pp-dsRNA. Samples were deproteinized after the indicated times and the ^{32}P-radiolabeled mRNAs were then resolved by denaturing gel electrophoresis. The band marked with an asterisk likely results from radioactivity being swept ahead of the abundant ribosomal RNA in the lysate. **(B)** Quantitation of the data in A. (•) Pp-Luc mRNA + buffer ; (■) Rr-Luc mRNA + buffer ; (∘) Pp-Luc mRNA + Pp-dsRNA ; (□) Rr-Luc mRNA + Pp-dsRNA. **(C)** Rr-Luc mRNA was incubated with Rr-dsRNA or Pp-dsRNA. (■) buffer ; (□) Pp-dsRNA ; (∘) Rr-dsRNA. **(D)** Pp-Luc mRNA was incubated in lysate in the presence of buffer or dsRNAs of different lengths. (■) Buffer ; (∘) 49-bp dsRNA ; (▽) 149-bp dsRNA ; (△) 505-bp dsRNA ; (◊) 997-bp dsRNA.

QUESTION 5 : Quels sont les paramètres du mécanisme analysés dans la Figure 4 ?

Panels **A** et **B** : cliquer ici (panels **A** et **B** de la Fig. 1 de Zamore *et al.* (2000)).

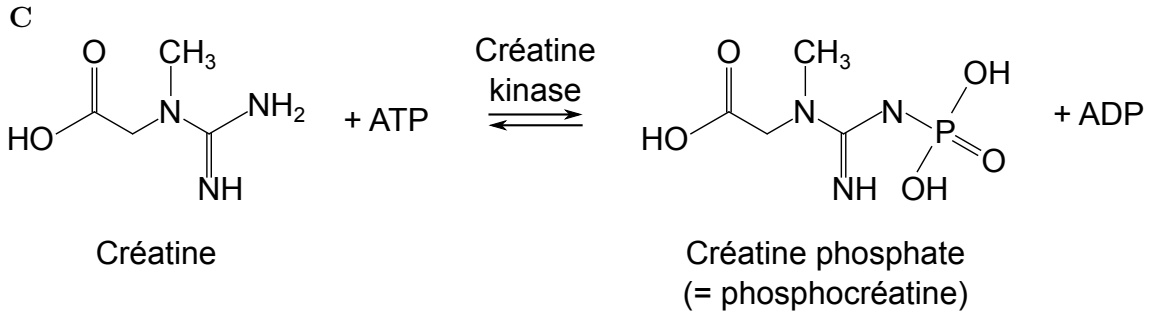


FIGURE 5 – **(A)** Denaturing agarose-gel analysis of 5´-^{32}P-radiolabeled Rr-Luc mRNA incubated for the indicated times in *Drosophila* embryo lysate with dsRNA from the Rr-Luc gene with or without ATP, creatine phosphate (CP), or creatine kinase (CK) **(B)** Quantitation of the data in (A). (∘) +ATP, +CP, +CK ; (□) -ATP, +CP, +CK ; (△) -ATP, -CP, +CK ; (▽) -ATP, +CP, -CK. **(C)** Catalytic reaction of CK.

QUESTION 6 : A quelle question le système expérimental mis en place dans la Figure 5 permet-il de répondre ? Quel est le résultat obtenu ?

Cliquer ici (Fig. 2 de Zamore *et al.* (2000)).

Figure 6 – **(A)** Protein synthesis, as reflected by luciferase activity produced after incubation of Rr-Luc mRNA in *Drosophila* embryo lysate with dsRNA from the Rr-Luc gene for 1 hr, in the presence of the protein synthesis inhibitors anisomycin, cycloheximide, or chloramphenicol, relative to a reaction without any inhibitor. **(B)** Denaturing agarose-gel analysis of 5´-^{32}P-radiolabeled Pp-Luc mRNA after incubation for the indicated times in lysate with dsRNA from the Pp-Luc gene with and without protein synthesis inhibitors. The arrowhead indicates the position of full-length mRNA in the gel, and the bracket marks the position of stable, 5´ cleavage products. **(C)** Translation of 7-methyl-guanosine- and adenosine-capped Pp-Luc mRNAs (• and ■, respectively) in lysate in the absence of dsRNA, as measured by luciferase activity produced in a 1 hr incubation. **(D)** Incubation in lysate of uniformly ^{32}P-radiolabeled 7-methyl-guanosine-capped Pp-Luc mRNA and adenosine-capped Pp-Luc mRNA, in the absence (• and ■) and presence (○ and □) of 505 bp Pp-Luc dsRNA.

Question 7 : Justifiez l'utilisation d'ARNm *7-methyl-guanosine-* et *adenosine-capped* dans le système expérimental de la Figure 6. Que peut-on conclure de ces résultats ?

Cliquer ici (panels **A**, **B** et **C** de la Fig. 3 de Zamore *et al.* (2000)).

Figure 7 – **(A)** Denaturing acrylamide-gel analysis of the products formed in a 2 hr incubation of uniformly ^{32}P-radiolabeled dsRNAs or capped as RNA (see annotation above the gel) in *Drosophila* embryo lysate with or without a target mRNA (see panel **B**). **(B)** An enlargement of the portion of the gel in (**A**) corresponding to 17 to 27 nt. For Pp-dsRNA, the sense (lanes 4 and 5) or the antisense (lanes 6 and 7) or both strands (lanes 1, 2, and 3) were labeled. For Rr-Luc dsRNA, both strands were radioactive (lanes 8, 9, and 10). **(C)** An enlargement of the 17 to 27 nt region of a gel showing the products formed upon incubation of uniformly ^{32}P-radiolabeled dsRNAs in lysate without and with ATP.

Question 8 : Quelle est la nature des produits ARN observés dans la Figure 7 ? Quelles informations supplémentaires cette figure apporte-t-elle sur leur synthèse ?

Cliquer ici (Fig. 5 de Zamore *et al.* (2000)).

Figure 8 – **(A)** Schematic of the positions of the three dsRNAs, A, B, and C, relative to the Rr-luc mRNA. **(B)** Denaturing acrylamide-gel analysis of the stable, 5´ cleavage products produced after incubation of the Rr-luc mRNA for the indicated times with each of the three dsRNAs, A, B, and C, or with buffer (zero with strikethrough)

Question 9 : Quelle nouvelle information tirez-vous des résultats de la Figure 8 quant à la synthèse de ces produits ARN ?

Cliquer ici (Panels A et B de la Fig. 5 de Elbashir *et al.* (2001b)).

FIGURE 9 – **(A)** Graphic representation of control 52-bp dsRNA and synthetic 21- and 22-nt dsRNAs. The sense strand of 21- and 22-nt short interfering RNAs (siRNAs) is shown in blue, the antisense strand in red. The target RNA cleavage sites directed by the siRNA duplexes are indicated as orange circles. **(B)** Ratio of target Pp-Luc to control Rr-Luc activity were normalized to a buffer control (black bar). Control 52-bp dsRNA or 21- and 22-nt RNA duplexes 1–7 were pre-incubated in *Drosophila* embryo lysate before addition of Pp-Luc and Rr-Luc mRNAs.

QUESTION 10 : À quelle question répond le système expérimental de la Figure 9 ? Proposez une (des) hypothèse(s) expliquant les résultats obtenus.

QUESTION 11 : Proposez une application technologique dérivée des résultats précédents.

6.2 Analyse d'article : Stratégie virale de suppression de la régulation post-transcriptionnelle par les microARN chez l'hôte

Ressources

— Figures : Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., Carrington, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA Function. *Dev Cell.* 4(2) :205-17. **Texte intégral** : `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1534-5807%2803%2900025-X`

Notions étudiées dans l'exercice

— **Cours :** biogenèse et mode d'action des microARN chez les Plantes ; bases de physiologie végétale ; prédiction bioinformatique des cibles de microARN
— **Techniques d'analyse :** northern-blotting ; western-blotting ; coupes d'histologie végétale ; agro-infitration ; 5´ RACE

Énoncé

Cette étude de documents est composée de figures issues d'un article scientifique. Vous devez analyser chaque figure en 3 parties : une rapide explication du système expérimental utilisé, une description des résultats, et une interprétation avec, au besoin, apport de connaissances. Les questions posées ont pour objectif de vous guider dans vos analyses. Vous pouvez donc y répondre en conclusion de chaque analyse de figure, à l'exception de la question 9.

Le virus de la mosaïque du navet (TuMV) est un potyvirus de la famille des *Potyviridae* qui provoque des maladies chez les Crucifères (ou Brassicacées), entre autres. Le virus se propage généralement via différentes espèces de pucerons et les plantes infectées présentent des lésions chlorotiques locales, des plissements ou de la rugosité. Le TuMV est un virus à ARN simple brin, constitué d'une capside hélicoïdale. Parmi les protéines codées par les virus de la famille des potyvirus, on retrouve deux facteurs : P1 et le composant auxiliaire-protéinase HC-Pro, qui dérivent de l'extrémité N de la polyprotéine virale. La protéine P1 n'est pas essentielle au virus, bien qu'elle stimule la réplication du génome de manière transactive. La protéine HC-Pro favorise la réplication et l'accumulation du génome viral et en stimule le transport via le système vasculaire de l'hôte. Il a été observé que la protéine HC-Pro améliore l'amplification virale chez de nombreux virus à ARN non-apparentés, suggérant que l'effet stimulant de HC-Pro est une conséquence indirecte de la modulation des fonctions de l'hôte. Dans cet exercice, nous allons étudier, avec l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana*, un possible mode d'action du TuMV contre la défense antivirale de son hôte.

Cliquer ici (Fig. 1 de Kasschau *et al.* (2003)).

FIGURE 1 – **(A)** General vegetative effects of TuMV infection and P1/HC-Pro transgene expression. **(B)** Expression of constructs containing the TuMV P1/HC-Pro polyprotein coding sequence or empty vector in transgenic plants. The vector contained CaMV 35S promoter (filled arrow) and terminator (filled rectangle) sequences. Transgenic plants were analyzed by immunoblot assay with anti-TEV HC-Pro serum and by RNA blot assay. The severity of developmental defects in P1/HC-Pro transgenic plants was rated as follows : -, no defects ; +, mild defects in some, but not all, flowers, fertile, some stunting, and some lobed leaves ; ++, narrow sepals in all flowers, infertile, deep lobing of leaves, slow growing, and stunted. **(C)** Sepal phenotype in developing flowers of normal, P1/HC-Pro transgenic, and TuMV-infected plants. The arrows in the SEM images of stage 4–5 flowers indicate the junction or space between sepals. The arrows in the cross-section images indicate the boundaries of individual sepals. S, sepal. Bars are 20 μm in stage 4–5 images and 100 μm in stage 11 and cross-section images. **(D)** Split or nonfused carpel phenotype in developing flowers of normal, P1/HC-Pro transgenic, and TuMV-infected plants. C, carpel. Bar is 100 μm.

QUESTION 1 : A partir de la Figure 1, décrivez succinctement l'impact d'une infection par TuMV ou de l'expression des protéines P1/HC-Pro sur le développement d'*A. thaliana*. Que suggèrent ces résultats ?

Cliquer ici (Fig. 2 de Kasschau *et al.* (2003)).

FIGURE 2 – **(A)** Narrow sepal phenotype in P1/HC-Pro transgenic and *dcl1-9* and *dcl1-7* mutant plants. Macroscopic images of stage 11 or 12 flowers are shown. S, sepal. Bars are 300 μm. **(B)** Split or nonfused carpel phenotype in P1/HC-Pro transgenic and *dcl1-9* mutant plants. Macroscopic images of dissected stage 11 or 12 carpels are shown. C, carpel. Bars are 300 μm.

QUESTION 2 : Quelle est la fonction de DCL1 et que suggèrent les résultats de la Figure 2 ?

Cliquer ici (Fig. 3 de Kasschau *et al.* (2003)).

FIGURE 3 – **(A)** Model for miR171 generation and activity. **(B)** Effect of TuMV infection and P1/HC-Pro on SCL6-III and SCL6-IV mRNA in inflorescence tissue. Tissues were analyzed by RNA blot assay with a probe corresponding to the 3´ end of the SCL6-III or SCL6-IV genes. **(C)** Effect of *dcl1-9* and *dcl1-7* mutations on SCL6-IV mRNA in inflorescence tissue. Samples were analyzed as in panel (B). **(D)** Effect of TuMV infection, P1/HC-Pro, and *dcl1* mutations on miR171 in inflorescence tissue. Small RNA preparations were analyzed by RNA blot assay with an miR171-specific probe. The mean relative accumulation (RA) level for each set of samples is indicated (level from control plants was arbitrarily designated as 1.0 in each set).

QUESTION 3 : Expliquez le modèle d'étude schématisé en Figure 3A et analysez les résultats de la Figure 3.

Cliquer ici (Fig. 4 de Kasschau *et al.* (2003)).

Figure 4 – **(A)** Constructs for expression of miR171 (35S:IGR-miR171), SCL6-IV mRNA (35S:SCL6-IV), and wild-type (35S:TEV P1/HC-Pro) or mutant (35S:TEV P1/HC-Pro/AS9) forms of TEV (Tobacco Etch Virus) P1/HC-Pro. The miR171 sequence from the 35S:IGR-miR171 construct and the miR171 complementary sequence in the 35S:SCL6-IV construct are indicated. **(B)** Effect of wild-type and mutant TEV P1/HC-Pro on miR171-guided cleavage of SCL6-IV mRNA. *N. benthamiana* leaves were co-Agro injected with constructs as indicated, and SCL6-IV RNA species were detected by RNA blot assay. **(C)** Effect of TEV P1/HC-Pro on miR171 accumulation in the Agro injection assay. miR171 was detected in the same Agro injection samples that were shown in (**B**).

Question 4 : D'après la Figure 4, quel est l'effet de l'expression de P1/HC-Pro chez une plante hôte, ici *Nicotiana benthamiana* ?

Cliquer ici (Fig. 5 de Kasschau *et al.* (2003)).

Figure 5 – Small RNA preparations from leaf and inflorescence tissue of vector transgenic plants were analyzed by RNA blot assay with oligonucleotide probes that were complementary to miR167, miR160, miR172, miR164, and miR156. The mean relative accumulation (RA) level for each set of samples is indicated (levels in tissue from vector transformed and La-*er* control plants were arbitrarily designated as 1.0). Predicted mRNA targets for each miRNA are listed to the right.

Question 5 : Quelle observation confirmez-vous à partir de l'analyse de la Figure 5 ? Proposez une explication.

Question 6 : Comment est réalisée la prédiction bioinformatique des cibles de microARN ?

Cliquer ici (Fig. 6 de Kasschau *et al.* (2003)).

Figure 6 – **(A)** Ethidium bromide-stained agarose gel showing the 5´ RACE products for ten miRNA targets. Numbers on top of each lane correspond to 5´ RACE reactions specific for each of the ten genes listed in (**B**). Lane M, 100 bp DNA ladder. **(B)** Diagrammatic representation of target mRNA cleavage sites. Thick black lines represent open reading frames (ORFs), while the flanking thin lines represent nontranslated regions. The putative miRNA interaction site is shown as a gray box, with the nucleotide position within the ORF indicated. The miRNA sequence and partial sequence of the target mRNA are shown in the expanded regions. The positions inferred as 5´ ends of miRNA-guided cleavage products, as revealed by 5´ RACE, and the number of sequenced 5´ RACE clones corresponding to each site are indicated by vertical arrowheads. Horizontal arrowheads indicate gene-specific primer sites used for 5´ RACE.

Question 7 : Détaillez le principe du 5´ RACE et analysez les résultats de la Figure 6.

Cliquer ici (Fig. 7 de Kasschau *et al.* (2003)).

FIGURE 7 – Pooled samples from leaf and inflorescence tissue of transgenic plants were analyzed by blot assay with probes for nine miRNA target genes and two control genes. The arrow in each panel indicates the full-length mRNA. The mean relative accumulation (RA) level for each set of samples is indicated (levels in tissue from vector-transformed Col-0 and La-*er* control plants were designated as 1.0). Ethidium bromide-stained rRNA for each blot is shown.

QUESTION 8 : Décrivez succintement et interprétez les résultats de la Figure 7.

QUESTION 9 : Concluez quant à un mode d'action potentiel du TuMV qui combat la défense antivirale des plantes.

6.3 Analyse d'article : Biogenèse DICER-indépendante de miR-451

Ressources

— Figure introductive : Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M., Hannon, G.J. (2010). A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*. 465(7298) : 584–589. **Texte intégral** : `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995450/`

— Figures : Yang, J.S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K.D., Jeffrey, K.L., Chandwani, R., Papapetrou, E.P., Sadelain, M., O'Carroll, D., Lai, E.C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(34) :15163-8. **Texte intégral** : `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699384`

Notions étudiées dans l'exercice

— **Cours :** biogenèse et mode d'action des microARN chez l'Homme ; différence miARN mature/star et 5p/3p ; géométrie des microARN matures et des précurseurs ; domaine catalytique de clivage fonctionnel pour Ago2 chez les Mammifères

— **Techniques d'analyse :** northern-blotting ; mesure de l'effet répresseur d'un microARN par *reporter assay* ; séquençage des ARN par microarray (*RNA-seq* et *small RNA-seq*)

Énoncé

Cette étude de documents est composée de figures issues de deux articles scientifiques. Vous devez analyser chaque figure en 3 parties : une rapide explication du système expérimental utilisé, une description des résultats, et une interprétation avec, au besoin, apport de connaissances. Les questions posées ont pour objectif de vous guider dans vos analyses. Vous pouvez donc y répondre en conclusion de chaque analyse de figure, à l'exception de la question 7.

Chez les Animaux , de nombreux loci de miARN sont regroupés en cluster, dont miR-451 et miR-144, distants de 100 pb et issus d'un même transcrit. Comme pour la majorité des gènes de miARN conservés dans l'évolution, le précurseur de miR-144, qui présente une géométrie en épingle à cheveux (ou « *hairpin* »), contient beaucoup plus de substitutions nucléotidiques au niveau de sa boucle terminale que dans sa tige et la séquence de miR-144* est moins bien conservée que la séquence de miR-144. Au contraire, pour miR-451, sa boucle terminale est très conservée, tandis que des nucléotides spécifiques de la tige sont variables. De plus, le précurseur de miR-451 et son brin mature présentent une caractéristique inhabituelle : les six nucléotides terminaux du miR-451 mature (de 23 nucléotides) s'étendent sur la boucle jusqu'au brin complémentaire du précurseur. Cette structure semble incompatible avec les activités enzymatiques des acteurs connus de la biogenèse des miARN qui ne libéreraient normalement que des miARN matures issus de la tige du précurseur. Des chercheurs étudient donc la biogenèse de miR-451 afin d'éclaircir la conservation atypique de son locus et la géométrie de son précurseur.

Panel **A** : panel A de la Figure 1 de Yang *et al.* (2010).
Panel **B** : panel c de la Figure 3 de Cheloufi *et al.* (2010).

FIGURE INTRODUCTIVE – **(A)** *mir-144/mir-451* region from the UCSC Genome Browser ; mir-144 exhibits a typical evolutionary pattern with far greater divergence in the terminal loop (triangle) than in mature miRNA (green) or star arm (yellow). mir-451 is more conserved in its terminal loop than its 3´ hairpin arm. **(B)** The unique structure of the miR-451 hairpin compared to miR-144 with the miRBase annotation of mature miR-451 and miR-144 mapped to the predicted secondary hairpin structure shown. Mature strand in red and star strand in blue.

Panel **A** : panel D de la Figure 1 de Yang *et al.* (2010).
Panel **B** : panel E de la Figure 1 de Yang *et al.* (2010).

FIGURE 1 – **(A)** Northern analysis of human erythroleukemia (K562) and induced murine erythroleukemia cells (MEL). Ectopic miRNAs were generated by transfection of HeLa cells with mir-144/451 plasmid or transduction of MEL cells with mir-144/451 lentivirus. Probe against miR-144-3p is used to stain miR-144-derived species (pre=precursor, mat=mature). The blot was stripped and reprobed for U6 (U6 snRNA) as a loading control. **(B)** Probe against miR-451 is used to stain miR-451-derived species.

QUESTION 1 : Quel est l'intérêt d'analyser miR-144 en parallèle de miR-451 et quelle observation majeure faites-vous à partir des résultats de la Figure 1 ?

Panel G de la Figure 1 de Yang *et al.* (2010).

Figure 2 – Sensor assays in HeLa cells transfected with mir-144/451. 2X-perfect refers to 2 recognition sites in the 3´ UTR of a reporter gene with perfect complementarity to the miRNA. 4X-bulge refers to 4 imperfect recognition sites in the 3´ UTR of a reporter gene with seed complementarity to the miRNA. Sensor values were normalized against mir-1-2 construct.

Question 2 : Détaillez le principe du système expérimental utilisé dans la Figure 2 et interprétez les résultats.

Figure 2 de Yang *et al.* (2010).

Figure 3 – **(A)** Schematic of human mir-451 hairpin. Site mutants were generated in the context of a functional mir-144/451 plasmid. **(B)** Sensor assay in HeLa cells transfected with mir-451 variants using a 2x-perfect sensor normalized to its activity in the presence of mir-1-2. **(C)** Northern analysis of control and transfected cells with mir-451 probe or **(D)** miR-144 probe.

Question 3 : Décrivez les résultats obtenus dans la Figure 3 et proposez une interprétation.

Figure 3 de Yang *et al.* (2010).

Figure 4 – **(A)** Northern analysis of siRNA-mediated knockdown of DGCR8 and Drosha in HeLa cells transfected or not with mir-144/mir-451 cluster. A probe against the 3p arm of mir-451 hairpin defines pre-mir-451 hairpin bands (pre). **(B)** Western blot of Dicer in a viable *Dicer*-/- MEF cell line. Northern analysis of these cells transfected with mir-144/mir-451. **(C)** Sensor assay in HeLa and *Dicer*-/- MEFs with both perfect and bulged sensors. Tests with 2x-perfect sensors were normalized to mir-1-2, whereas tests with 4x-bulge sensors were normalized to mir-144/451 construct in which miR-451 hairpin was replaced by miR-23a-3p.

Question 4 : Qu'est-ce qu'un *scramble siRNA* et quel est l'intérêt de son utilisation ?

Question 5 : D'après la Figure 4, quelles sont les protéines nécessaires à la biogenèse de miR-451 ? Est-ce surprenant ?

Panels A, B, C et D de la Figure 4 de Yang *et al.* (2010).

FIGURE 5 – **(A)** Scatter plot from microarray data showing the log (base 10)-intensity of small RNAs in wild-type bone marrow plotted against the log (base 10)-intensities in *Ago2*$^{-/-}$ bone marrow. **(B)** Northern analysis of miR-451 intermediates in wildtype and *Ago2*$^{-/-}$ marrow. **(C)** Top : Western blot verification of *Ago2*$^{-/-}$ MEFs reconstituted with control virus, Ago2-expressing virus, or catalytically inactive *Ago2*[D669A] virus. Bottom : Northern analysis of the transfection of mir-144/mir-451 construct. **(D)** AGO2 proteins were immunoprecipitated from the panel of reconstituted *Ago2*$^{-/-}$ MEFs. Associated small RNAs were analyzed by Northern blot and probed for miR-451.

QUESTION 6 : Interprétez les résultats obtenus dans la Figure 5 et proposez une explication.

QUESTION 7 : Proposez un schéma bilan illustrant le cas particulier de la biogenèse de miR-451.

6.4 Analyse d'article : Régulation du développement de la Drosophile à l'échelle cellulaire par le microARN *bantam*

Ressources

— Figures : Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M. (2003). *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell.* 113(1) :25-36. **Texte intégral** : `https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(03)00231-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867403002319%3Fshowall%3Dtrue`

Notions étudiées dans l'exercice

— **Cours :** biogenèse et mode d'action des microARN chez les Animaux ; géométrie des microARN matures et précurseurs ; transposons ; rôle des caspases dans l'apoptose ; prédiction bioinformatique des cibles de microARN
— **Techniques d'analyse :** northern-blotting ; système inductible UAS/GAL4 associé à des promoteurs ubiquitaires ou tissu-spécifiques ; physiologie de la Drosophile ; immunohistochimie ; mesure de l'effet répresseur d'un microARN par *reporter assay*

Énoncé

Cette étude de documents est composée de figures issues d'un article scientifique. Vous devez analyser chaque figure en 3 parties : une rapide explication du système expérimental utilisé, une description des résultats, et une interprétation avec, au besoin, apport de connaissances. Les questions posées ont pour objectif de vous guider dans vos analyses. Vous pouvez donc y répondre en conclusion de chaque analyse de figure, à l'exception de la question 12.

Dans la publication d'Hipfner *et al.* (2002), le laboratoire de Stephen M. Cohen rapporte les conséquences de mutations dans un nouveau locus, nommé *bantam*, dont le produit est impliqué dans la régulation de la croissance chez *Drosophila melanogaster*. Les animaux mutants *bantam* sont plus petits que le type sauvage, en raison d'une réduction du nombre de cellules mais pas de la taille des cellules, et ne présentent pas de perturbations significatives dans la structuration des différents organes. Inversement, la surexpression du produit de *bantam* par activation transcriptionnelle de l'élément transposable P EP(3)3622 (inséré à proximité du gène *bantam*) provoque une surprolifération des tissus au niveau des ailes et des yeux. La surexpression dans les clones de cellules entraîne une augmentation du taux de prolifération cellulaire et une augmentation correspondante de la croissance cellulaire, de sorte que le tissu résultant est composé de plus de cellules mais de taille comparable au type sauvage. Ces effets sont étonnamment similaires à ceux associés aux altérations de l'activité du complexe CYCLIND-CDK4. Cependant, les analyses d'épistasie et d'interaction génétique indiquent que *bantam* et *cyclinD-cdk4* agissent indépendamment. Ainsi, le locus *bantam* représente un nouveau régulateur de la croissance tissulaire et son mode d'action reste inconnu.

Cliquer ici (Fig. 1 de Brennecke *et al.* (2003)).

FIGURE 1 – **(A)** Schematic representation of the *bantam* locus in a region of ≈41 kb that lacks predicted genes with several EP elements inserted as studied in Hipfner et al., 2002 (*Genetics*). The extent of the 21 kb *bantam*$^{\Delta 1}$ deletion is indicated by the box and enlarged below. EP (Element P) indicated in red are hypomorphic mutant for *bantam* and they have been designed to allow inducible expression of sequences flanking the insertion site under control of the yeast transcription factor Gal4. The arrow indicates the orientation of GAL4-dependent transcription. Rescue transgenes are indicated below. These transgenes have been defined by their ability to rescue the growth defects and pupal lethality of flies homozygous for the *bantam*$^{\Delta 1}$ deletion. The overlap of the 6.7 kb BamHI and 9.6 kb SpeI fragments defines the minimal essential *bantam* locus : RE64518. Arrow indicates the position and size of this cDNA clone (2.2 kb, unspliced). Green arrow : position of a conserved hairpin sequence. **(B)** ClustalW alignment of a short sequence conserved between *Anopheles gambiae* (Ag) and *Drosophila melanogaster* (Dm), indicated by the green arrow in (**A**). Shading indicates the region of highest sequence identity. **(C)** Secondary structures for the conserved hairpin sequences. Shading corresponds to (**B**).

QUESTION 1 : Dans cet exercice, les cas suivants vont être étudiés :
- **génotype homozygote bantam**^{WT,}
- **génotype homozygote bantam**$^{\Delta 1}$**,**
- **génotype homozygote bantam**$^{\Delta 1}$ **+ rescue transgene,**
- **génotype homozygote EP(3)3622,**
- **génotype homozygote EP(3)3622 + expression Gal4**

Pour chaque cas, en vous aidant de la Figure 1A, justifiez le niveau d'expression de *bantam* attendu par rapport au contrôle sauvage.

QUESTION 2 : D'après la figure 1B et 1C, quel est le produit du locus *bantam* ?

Cliquer ici (**A** : panel C de la Fig. 2 de Brennecke *et al.* (2003) ; **B** : panel E de la Fig. 2 ; **C** : panel A de la Fig. 2 ; et **D** : panel D de la Fig. 2).

Figure 2 – **(A)** UAS transgenes. The green arrow indicates the predicted hairpin. Rescue assays were performed in the absence of a GAL4 driver. Overgrowth was assayed using *engrailed*-Gal4. UAS-A is the 6.7 kb BamHI fragment in antisense orientation and contains the endogenous promoter and primary transcript. UAS-B is the same as UAS-A, except that it lacks 81 nt containing the predicted hairpin. UAS-C is the 584 nt HpaI-SpeI fragment cloned into the 3´ UTR of UAS-EGFP. (This fragment does not overlap with EST RE64518). UAS-D is a 100 nt fragment including the hairpin cloned into the 3´ UTR of UAS-EGFP. **(B)** Quantitation of overgrowth in the wing expressed as the ratio of P:A area. P = the area bounded by vein 4 and the posterior of the wing. A = the area anterior to vein 3. The following transgenes were expressed under *engrailed*-Gal4 control : EP, EP(3)3622 ; (A, B, and C) refer to the constructs in (**A**). +, no UAS transgene. **(C)** Northern blot comparing *bantam* miRNA levels. Lanes 1–5 : third instar larvae. WT : wild-type ; EP : *Actin*-Gal4 > EP(3)3622 ; A : *Actin*-Gal4 > UAS-A ; C : *engrailed*-Gal4 > UAS-C. Lane 5 : *bantam*$^{\Delta 1}$ mutant larvae. Lane 6 : S2 cells (*D. melanogaster* cell line). Arrow : 21 nt RNA species. The blot was probed with a 31 nt 5´ end-labeled oligonucleotide complementary to the green-shaded side of the stem in Figure 1C. **(D)** Homozygous *bantam*$^{\Delta 1}$ deletion mutant pupae. The pupa at right also expressed UAS-C under *armadillo*-GAL4 control. Left : bright field image. Right : epifluorescence image showing GFP. Adult structures visible through the pupal case : the eyes are red, wings appear dark.

Question 3 : Expliquez les résultats de *rescue* et de *GAL-4 dependent rescue overgrowth* présentée dans la Figure 2A et 2B.

Question 4 : Décrivez comment les Figures 2C et 2D confirment la nature du produit de *bantam* et son impact sur le développement de la Drosophile.

Cliquer ici (panels **A**, **B** et **C** de la Fig. 3 de Brennecke *et al.* (2003))

Figure 3 – **(A)** Northern blot showing *bantam* miRNA at different stages of development. Lanes : 3–12 hr and 12–24 hr old embryos ; first, second, early, and late third larval stages ; early and mid pupal stages ; female and male adults. tRNA, loading control. **(B–C)** Wing discs expressing the tubulin-EGFP reporter gene imaged with identical confocal microscope settings. **(B)** Control sensor transgene lacking *bantam* target sequences. **(C)** *bantam* sensor transgene containing two copies of a 31 nt sequence perfectly complementary to the conserved sequence highlighted in Figure 1C.

Question 5 : Expliquez le principe expérimental du transgène *sensor* de microARN utilisé dans les Figures 3B et 3C.

Question 6 : Quelles conclusions pouvez-vous tirer des résultats de la Figure 3 ?

Cliquer ici (panels **A**, **B** et **C** de la Fig. 4 de Brennecke *et al.* (2003))

FIGURE 4 – **(A)** *bantam* sensor levels (green) in proliferating (labeled by BrdU incorporation, purple) and non proliferating cells of the brain hemisphere. **(B)** *bantam* sensor levels (green) in wing disc expressing the *bantam* miRNA sensor during late third instar. BrdU and sensor images shown separately at right. **(C)** Wing disc expressing UAS-C and EGFP under *ptc*-Gal4 control (green) labeled by BrdU incorporation.

QUESTION 7 : D'après la figure 4, quel est l'impact de l'expression de *bantam* sur la prolifération cellulaire ?

Cliquer ici (Fig. 5 de Brennecke *et al.* (2003))

FIGURE 5 – Wing discs labeled with antibody to activated caspase (green). DAPI-labeled nuclei (purple). All images were taken with identical settings on the confocal microscope to permit comparison of the intensity of activated caspase. (**A** and **C**) Single apical optical sections. (**B** and **D**) Projections of several optical sections in the basal region of the discs. **(A-B)** *ptc*-GAL4 directed expression of E2F and DP. **(C-D)** *ptc*-GAL4 directed expression of E2F and DP with EP(3)3622.

QUESTION 8 : Sachant que la surexpression d'E2F et de son cofacteur DP entraîne l'apoptose dans les disques imaginaux (*wing discs*) de la Drosophile, quelle information tirez-vous de la Figure 5 ?

Cliquer ici (Fig. 6 de Brennecke *et al.* (2003))

FIGURE 6 – **(A)** Schematic representation of the 3´ UTR of *hid* from *D. melanogaster*. Blocks highly conserved in *D. pseudoobscura* are indicated by color. Alignment of *bantam* miRNA with the predicted target sites from the *hid* UTRs are shown below. **(B)** Wing disc showing expression of the Tubulin–EGFP transgene with the *hid* 3´ UTR (green). Wg protein (red) is shown to visualize the dorso-ventral boundary. **(C)** As in (**B**) with *ptc*-Gal4 directing expression of EP(3)3622. **(D)** Wing disc showing expression of the *hid* 3´ UTR sensor with *bantam* sites 1 and 4 deleted. **(E)** As in (**D**) with *ptc*-Gal4 directing expression of EP(3)3622.

QUESTION 9 : Comment est réalisée la prédiction bioinformatique des cibles de microARN ?

QUESTION 10 : Expliquez les résultats la Figure 6.

Cliquer ici (Fig. 7 de Brennecke *et al.* (2003))

FIGURE 7 – **(A–C)** *ptc*-GAL4 directed expression of *hid* using EP(3)30060 (EP inserted close to *hid* locus) in wing discs. **(D–F)** as in (**A**–**C**) plus *bantam* expressed by EP(3)3622. (**A** and **D**) Discs labeled with antibody to Hid protein. (**B** and **E**) In situ hybridization with anti-sense RNA probes to detect *hid* mRNA. (**C** and **F**) Discs labeled with antibody to activated caspase 3 (green). DAPI-labeled nuclei (blue). (**C** and **F**) are projections of several optical sections.

QUESTION 11 : Quelle information importante tirez-vous de la Figure 7 ?

QUESTION 12 : Proposez un modèle expliquant le contrôle de la prolifération par *bantam*.

Bibliographie

Abrahante, J. E., Daul, A. L., Li, M., Volk, M. L., Tennessen, J. M., Miller, E. A., et Rougvie, A. E. (2003). The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell*, 4(5) : 625–637. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1534-5807%2803%2900127-8`.

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de, Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., WoodageT, Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M., et Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461) : 2185–2195. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731132`.

Addo-Quaye, C., Eshoo, T. W., Bartel, D. P., et Axtell, M. J. (2008). Endogenous siRNA and miRNA targets identified by sequencing of the *Arabidopsis* degradome. *Curr Biol*, 18(10) : 758–762. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2808%2900528-9`.

Ambros, V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell*, 57(1) : 49–57. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2702689`.

Ambros, V. et Horvitz, H. R. (1984). Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 226(4673) : 409–416. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6494891`.

Ambros, V. et Horvitz, H. R. (1987). The lin-14 locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes Dev*, 1(4) : 398–414. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/1/4/398.long`.

Ambros, V., Lee, R. C., Lavanway, A., Williams, P. T., et Jewell, D. (2003). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*, 13(10) : 807–818. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2803%2900287-2`.

Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., et Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, 5(2) : 337–350. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1534-5807%2803%2900228-4`.

Aravin, A. A., Naumova, N. M., Tulin, A. V., Vagin, V. V., Rozovsky, Y. M., et Gvozdev, V. A. (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol*, 11(13) : 1017–1027. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2801%2900299-8`.

Ashe, A., Sarkies, P., Le Pen, J., Tanguy, M., et Miska, E. A. (2015). Antiviral RNA interference against Orsay virus is neither systemic nor transgenerational in *Caenorhabditis elegans*. *J Virol*, 89(23) : 12035–12046. **Texte intégral :** `https://jvi.asm.org/content/jvi/89/23/12035.full.pdf`.

Aukerman, M. J. et Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *Plant Cell*, 15(11) : 2730–2741. **Texte intégral :** `http://www.plantcell.org/content/plantcell/15/11/2730.full.pdf`.

Axtell, M. J., Snyder, J. A., et Bartel, D. P. (2007). Common functions for diverse small RNAs of land plants. *Plant Cell*, 19(6) : 1750–1769. **Texte intégral :** `http://www.plantcell.org/content/plantcell/19/6/1750.full.pdf`.

Axtell, M. J., Westholm, J. O., et Lai, E. C. (2011). Vive la différence : biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol*, 12(4) : 221. **Texte intégral :** `https://genomebiology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/gb-2011-12-4-221`.

Aza-Blanc, P., Cooper, C. L., Wagner, K., Batalov, S., Deveraux, Q. L., et Cooke, M. P. (2003). Identification of modulators of TRAIL-induced apoptosis via RNAi-based phenotypic screening. *Mol Cell*, 12(3) : 627–637. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2803%2900348-4`.

Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., et Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209) : 64–71. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668037`.

Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., et Pasquinelli, A. E. (2005). Regulation by *let-7* and *lin-4* miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 122(4) : 553–563. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2805%2900801-9`.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2) : 281–297. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2804%2900045-5`.

Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs : target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2) : 215–233. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2809%2900008-7`.

Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1) : 20–51. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2818%2930286-1`.

Bass, B. L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell*, 101(3) : 235–238. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2802%2971133-1.

Baulcombe, D. C. (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 32(1–2) : 79–88. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980475.

Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., et Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4 :NOT deadenylase and DCP1 :DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*, 20(14) : 1885–1898. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/20/14/1885.full.pdf+html.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., et Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818) : 363–366. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201747.

Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., et Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, 35(3) : 215–217. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528307.

Betancur, J. G. et Tomari, Y. (2012). Dicer is dispensable for asymmetric RISC loading in mammals. *RNA*, 18(1) : 24–30. **Texte intégral :** https://rnajournal.cshlp.org/content/18/1/24.full.pdf+html.

Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., et Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2) : 185–191. **Texte intégral :** https://rnajournal.cshlp.org/content/10/2/185.full.pdf+html.

Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B., et Cohen, S. M. (2003). bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113(1) : 25–36. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2803%2900231-9.

Bridge, A. J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A. L., et Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*, 34(3) : 263–264. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796781.

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., et Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880) : 1185–1190. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483398.

Brummelkamp, T. R., Bernards, R., et Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296(5567) : 550–553. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910072.

Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., et Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family : tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, 16(21) : 2733–2742. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/16/21/2733.full.pdf+html.

Catalanotto, C., Pallotta, M., ReFalo, P., Sachs, M. S., Vayssie, L., Macino, G., et Cogoni, C. (2004). Redundancy of the two Dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol*, 24(6) : 2536–2545. **Texte intégral :** https://mcb.asm.org/content/mcb/24/6/2536.full.pdf.

Caudy, A. A., Myers, M., Hannon, G. J., et Hammond, S. M. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*, 16(19) : 2491–2496. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/16/19/2491.full.pdf+html`.

Chalfie, M., Horvitz, H. R., et Sulston, J. E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*, 24(1) : 59–69. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7237544`.

Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W., et Hannon, G. J. (2010). A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 465(7298) : 584–589. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995450/pdf/nihms254544.pdf`.

Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science*, 303(5666) : 2022–2025. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5127708/pdf/nihms832113.pdf`.

Chera, S., de, Rosa, R., Miljkovic-Licina, M., Dobretz, K., Ghila, L., Kaloulis, K., et Galliot, B. (2006). Silencing of the hydra serine protease inhibitor Kazal1 gene mimics the human SPINK1 pancreatic phenotype. *J Cell Sci*, 119((Pt 5)) : 846–857. **Texte intégral :** `https://jcs.biologists.org/content/joces/119/5/846.full.pdf`.

Chi, S. W., Zang, J. B., Mele, A., et Darnell, R. B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, 460(7254) : 479–486. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2733940/pdf/nihms-120632.pdf`.

Chiang, H. R., Schoenfeld, L. W., Ruby, J. G., Auyeung, V. C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W. K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J. E., Blelloch, R., Schroth, G. P., Nusbaum, C., et Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs : experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev*, 24(10) : 992–1009. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/24/10/992.full.pdf+html`.

Chiu, Y. L. et Rana, T. M. (2002). RNAi in human cells : basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell*, 10(3) : 549–561. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2802%2900652-4`.

Cogoni, C., Irelan, J. T., Schumacher, M., Schmidhauser, T. J., Selker, E. U., et Macino, G. (1996). Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J*, 15(12) : 3153–3163. **Texte intégral :** `https://www.embopress.org/doi/epdf/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00678.x`.

Cogoni, C. et Macino, G. (1997). Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(19) : 10233–10238. **Texte intégral :** `https://www.pnas.org/content/pnas/94/19/10233.full.pdf`.

Cullen, B. R., Cherry, S., et tenOever, B. R. (2013). Is RNA interference a physiologically relevant innate antiviral immune response in mammals ? *Cell Host Microbe*, 14(4) : 374–378. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1931-3128%2813%2900331-4`.

Czech, B., Malone, C. D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J. A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J., et Brennecke, J. (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*, 453(7196) : 798–802. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895258/pdf/nihms59563.pdf`.

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

15(8) : 743–749. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2805%2900233-2.

Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., Shen, S., et Ullu, E. (2003). An siRNA ribonucleoprotein is found associated with polyribosomes in *Trypanosoma brucei*. *RNA*, 9(7) : 802–808. **Texte intégral :** https://rnajournal.cshlp.org/content/9/7/802.full.pdf+html.

Drinnenberg, I. A., Fink, G. R., et Bartel, D. P. (2011). Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. *Science*, 333(6049) : 1592. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3790311/pdf/nihms515555.pdf.

Eichhorn, S. W., Guo, H., McGeary, S. E., Rodriguez-Mias, R. A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S. H., Ghoshal, K., Villén, J., et Bartel, D. P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell*, 56(1) : 104–115. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2814%2900706-0.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., et Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836) : 494–498. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373684.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., et Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2) : 188–200. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/15/2/188.full.pdf+html.

Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., et Tuschl, T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, 20(23) : 6877–6888. **Texte intégral :** https://www.embopress.org/doi/epdf/10.1093/emboj/20.23.6877.

Elkayam, E., Kuhn, C. D., Tocilj, A., Haase, A. D., Greene, E. M., Hannon, G. J., et Joshua-Tor, L. (2012). The structure of human Argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell*, 150(1) : 100–110. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2812%2900618-6.

C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans* : a platform for investigating biology. *Science*, 282(5396) : 2012–2018. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851916.

Enright, A. J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., et Marks, D. S. (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*, 5(1) : R1. **Texte intégral :** https://genomebiology.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/gb-2003-5-1-r1.

Faehnle, C. R., Elkayam, E., Haase, A. D., Hannon, G. J., et Joshua-Tor, L. (2013). The making of a slicer : activation of human Argonaute-1. *Cell Rep*, 3(6) : 1901–1909. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S2211-1247%2813%2900266-0.

Fagard, M., Boutet, S., Morel, J. B., Bellini, C., et Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(21) : 11650–11654. **Texte intégral :** https://www.pnas.org/content/pnas/97/21/11650.full.pdf.

Félix, M. A., Ashe, A., Piffaretti, J., Wu, G., Nuez, I., Bélicard, T., Jiang, Y., Zhao, G., Franz, C. J., Goldstein, L. D., Sanroman, M., Miska, E. A., et Wang, D. (2011). Natural and experimental infection of Caenorhabditis nematodes by novel viruses related to nodaviruses. *PLoS Biol*, 9(1) : e1000586. **Texte intégral :** https://journals.plos.org/plosbiology/article/file?id=10.1371/journal.pbio.1000586&type=printable.

Fire, A., Albertson, D., Harrison, S. W., et Moerman, D. G. (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*, 113(2) : 503–514. **Texte intégral :** https://dev.biologists.org/content/develop/113/2/503.full.pdf.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., et Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669) : 806–811. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486653.

Flavell, R. B. (1994). Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(9) : 3490–3496. **Texte intégral :** https://www.pnas.org/content/pnas/91/9/3490.full.pdf.

Förstemann, K., Horwich, M. D., Wee, L., Tomari, Y., et Zamore, P. D. (2007). *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by Dicer-1. *Cell*, 130(2) : 287–297. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2807%2900760-X.

Fukaya, T. et Tomari, Y. (2012). MicroRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in *Drosophila*. *Mol Cell*, 48(6) : 825–836. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2812%2900824-6.

Galvani, A. et Sperling, L. (2002). RNA interference by feeding in *Paramecium*. *Trends Genet*, 18(1) : 11–12. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750689.

Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M. D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E. L., Zapp, M. L., Weng, Z., et Zamore, P. D. (2008). Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*, 320(5879) : 1077–1081. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2953241/pdf/nihms-90320.pdf.

Grierson, D., Fray, R. G., Hamilton, A. J., Smith, C. J. S., et Watson, C. F. (1991). Does co-suppression of sense genes in transgenic plants involve antisense RNA ? *Trends Biotechnol*, 9(1) : 122–123. **Article payant :** https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016777999190042G.

Grimson, A., Farh, K. K., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., et Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals : determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27(1) : 91–105. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2807%2900407-8.

Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B. J., Chiang, H. R., King, N., Degnan, B. M., Rokhsar, D. S., et Bartel, D. P. (2008). Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*, 455(7217) : 1193–1197. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837422/pdf/nihms515906.pdf.

Grishok, A., Tabara, H., et Mello, C. C. (2000). Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science*, 287(5462) : 2494–2497. **Texte intégral :** https://science.sciencemag.org/content/287/5462/2494/tab-pdf.

Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Sarnow, P., et Kay, M. A. (2009a). Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3´ untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 16(2) : 144–150. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182800.

Gu, W., Shirayama, M., Conte Jr., D., Vasale, J., Batista, P. J., Claycomb, J. M., Moresco, J. J., Youngman, E. M., Keys, J., Stoltz, M. J., Chen, C. C., Chaves, D. A., Duan, S., Kasschau, K. D., Fahlgren, N., Yates, J. R. r., Mitani, S., Carrington, J. C., et Mello, C. C. (2009b). Distinct argonaute-mediated 22G-RNA pathways direct genome surveillance in the *C. elegans* germline. *Mol Cell*, 36(2) : 231–244. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2809%2900678-9.

Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., et Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308) : 835–840. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703300`.

Guo, S. et 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(4) : 611–620. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(95)90082-9.pdf`.

Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A., et Grewal, S. I. (2002). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science*, 297(5590) : 2232–2237. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215653`.

Hamilton, A. J. et Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441) : 950–952. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542148`.

Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., et Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775) : 293–296. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749213`.

Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., et Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293(5532) : 1146–1150. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498593`.

Hendrickson, D. G., Hogan, D. J., McCullough, H. L., Myers, J. W., Herschlag, D., Ferrell, J. E., et Brown, P. O. (2009). Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol*, 7(11) : e1000238. **Texte intégral :** `https://journals.plos.org/plosbiology/article/file?id=10.1371/journal.pbio.1000238&type=printable`.

Herrera-Carrillo, E., Gao, Z., et Berkhout, B. (2019). CRISPR therapy towards an HIV cure. *Brief Funct Genomics*, Brief Funct Genomics. 2019 Nov 8. pii : Brief Funct Genomics. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31711197`.

Hipfner, D. R., Weigmann, K., et Cohen, S. M. (2002). The bantam gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics*, 161(4) : 1527–1537. **Texte intégral :** `https://www.genetics.org/content/genetics/161/4/1527.full.pdf`.

Horwich, M. D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P., et Zamore, P. D. (2007). The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol*, 17(14) : 1265–1272. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2807%2901567-9`.

Hutvágner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, E., Tuschl, T., et 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(5531) : 834–838. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452083`.

Hutvágner, G. et Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297(5589) : 2056–2060. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154197`.

Iwakawa, H. O. et Tomari, Y. (2015). The functions of microRNAs : mRNA decay and translational repression. *Trends Cell Biol*, 25(11) : 651–665. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437588`.

Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., et Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell*, 39(2) : 292–299. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2810%2900377-1`.

Karginov, F. V., Cheloufi, S., Chong, M. M., Stark, A., Smith, A. D., et Hannon, G. J. (2010). Diverse endonucleolytic cleavage sites in the mammalian transcriptome depend upon microRNAs, Drosha, and additional nucleases. *Mol Cell*, 38(6) : 781–788. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2810%2900416-8`.

Karikó, K., Bhuyan, P., Capodici, J., et Weissman, D. (2004). Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol*, 172(11) : 6545–6549. **Texte intégral :** `https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/172/11/6545.full.pdf`.

Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., et Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA unction. *Dev Cell*, 4(2) : 205–217. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1534-5807%2803%2900025-X`.

Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada, T. N., Siomi, M. C., et Siomi, H. (2008). *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature*, 453(7196) : 793–797. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18463636`.

Keene, K. M., Foy, B. D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B. J., Blair, C. D., et Olson, K. E. (2004). RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (*Alphavirus* ; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(49) : 17240–17245. **Texte intégral :** `https://www.pnas.org/content/pnas/101/49/17240.full.pdf`.

Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., et 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(20) : 2654–2659. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/15/20/2654.full.pdf+html`.

Khvorova, A., Reynolds, A., et Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2) : 209–216. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2803%2900801-8`.

Knight, S. W. et Bass, B. L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 293(5538) : 2269–2271. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1855227/pdf/nihms18723.pdf`.

Knoepfel, S. A., Centlivre, M., Liu, Y. P., Boutimah, F., et Berkhout, B. (2012). Selection of RNAi-based inhibitors for anti-HIV gene therapy. *World J Virol*, 1(3) : 79–90. **Texte intégral :** `https://www.wjgnet.com/2220-3249/full/v1/i3/79.htm`.

Kurihara, Y. et Watanabe, Y. (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(34) : 12753–12758. **Texte intégral :** `https://www.pnas.org/content/pnas/101/34/12753.full.pdf`.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., et Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543) : 853–858. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679670`.

Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., et Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543) : 858–862. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679671`.

Lee, H. C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S. K., Pertsemlidis, A., Lewis, Z. A., Freitag, M., Selker, E. U., Mello, C. C., et Liu, Y. (2010). Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Mol Cell*, 38(6) : 803–814. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2810%2900282-0`.

Lee, R. C. et Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543) : 862–864. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679672`.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., et Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5) : 843–854. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(93)90529-Y.pdf`.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956) : 415–419. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508493`.

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., et Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation : stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*, 21(17) : 4663–4670. **Texte intégral :** `https://www.embopress.org/doi/epdf/10.1093/emboj/cdf476`.

Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., et Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117(1) : 69–81. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2804%2900261-2`.

Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., et Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7) : 787–798. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2803%2901018-3`.

Lilley, D. M. (1999). Structure, folding and catalysis of the small nucleolytic ribozymes. *Curr Opin Struct Biol*, 9(3) : 330–338. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361084`.

Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., et Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027) : 769–773. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685193`.

Lin, S. Y., Johnson, S. M., Abraham, M., Vella, M. C., Pasquinelli, A., Gamberi, C., Gottlieb, E., et Slack, F. J. (2003). The C elegans hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev Cell*, 4(5) : 639–650. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1534-5807%2803%2900124-2`.

Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., et Dougherty, W. G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants : Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell*, 5(12) : 1749–1759. **Texte intégral :** `http://www.plantcell.org/content/plantcell/5/12/1749.full.pdf`.

Lipardi, C., Wei, Q., et Paterson, B. M. (2001). RNAi as random degradative PCR : siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 107(3) : 297–307. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2801%2900537-2`.

Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., et Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689) : 1437–1441. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284456`.

Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., et Carrington, J. C. (2002a). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, 14(7) : 1605–1619. **Texte intégral :** `http://www.plantcell.org/content/plantcell/14/7/1605.full.pdf`.

Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., et Carrington, J. C. (2002b). Cleavage of *Scarecrow-like* mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, 297(5589) : 2053–2056. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242443`.

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., et Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654) : 95–98. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631048`.

MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., et Doudna, J. A. (2008). *In vitro* reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(2) : 512–517. **Texte intégral :** `https://www.pnas.org/content/pnas/105/2/512.full.pdf`.

Maillard, P. V., Ciaudo, C., Marchais, A., Li, Y., Jay, F., Ding, S. W., et Voinnet, O. (2013). Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science*, 342(6155) : 235–238. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3853215/pdf/nihms534017.pdf`.

Maniataki, E. et Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*, 19(24) : 2979–2990. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/19/24/2979.full.pdf+html`.

Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., et Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5) : 563–574. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2802%2900908-X`.

Martinez, J. et Tuschl, T. (2004). RISC is a 5´ phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*, 18(9) : 975–980. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/18/9/975.full.pdf+html`.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., et Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123(4) : 607–620. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2805%2900922-0`.

Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., et Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15(2) : 185–197. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2804%2900415-0`.

Meneely, P. M. et Herman, R. K. (1979). Lethals, steriles and deficiencies in a region of the X chromosome of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 92(1) : 99–115. **Texte intégral :** `https://www.genetics.org/content/genetics/92/1/99.full.pdf`.

Meyers, B. C., Axtell, M. J., Bartel, B., Bartel, D. P., Baulcombe, D., Bowman, J. L., Cao, X., Carrington, J. C., Chen, X., Green, P. J., Griffiths-Jones, S., Jacobsen, S. E., Mallory, A. C., Martienssen, R. A., Poethig, R. S., Qi, Y., Vaucheret, H., Voinnet, O., Watanabe, Y., Weigel, D., et Zhu, J. K. (2008). Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *Plant Cell*, 20(12) : 3186–3190. **Texte intégral :** `http://www.plantcell.org/content/plantcell/20/12/3186.full.pdf`.

Molnár, A., Schwach, F., Studholme, D. J., Thuenemann, E. C., et Baulcombe, D. C. (2007). miRNAs control gene expression in the single-cell alga Chlamydomonas reinhardtii. *Nature*, 447(7148) : 1126–1129. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17538623`.

Moran, Y., Fredman, D., Praher, D., Li, X. Z., Wee, L. M., Rentzsch, F., Zamore, P. D., Technau, U., et Seitz, H. (2014). Cnidarian microRNAs frequently regulate targets by cleavage. *Genome Res*, 24(4) :

651–663. **Texte intégral :** https://genome.cshlp.org/content/24/4/651.full.pdf+html?sid=0c5bff97-466b-44d4-aeba-06a4347e4b2d.

Moss, E. G. (2003). Silencing unhealthy alleles naturally. *Trends Biotechnol*, 21(5) : 185–187. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727375.

Moss, E. G., Lee, R. C., et 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(5) : 637–646. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2981906-6.

Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., et Dreyfuss, G. (2002). miRNPs : a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*, 16(6) : 720–728. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/16/6/720.full.pdf+html.

Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Rémoué, K., Sanial, M., Vo, T. A., et Vaucheret, H. (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, 101(5) : 533–542. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2980863-6.

Nakanishi, K., Ascano, M., Gogakos, T., Ishibe-Murakami, S., Serganov, A. A., Briskin, D., Morozov, P., Tuschl, T., et Patel, D. J. (2013). Eukaryote-specific insertion elements control human ARGONAUTE slicer activity. *Cell Rep*, 3(6) : 1893–1900. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S2211-1247%2813%2900288-X.

Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P., et Patel, D. J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature*, 486(7403) : 368–374. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3853139/pdf/nihms377159.pdf.

Napoli, C., Lemieux, C., et 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(4) : 279–289. **Texte intégral :** http://www.plantcell.org/content/plantcell/2/4/279.full.pdf.

Newmark, P. A., Reddien, P. W., Cebrià, F., et Sánchez, Alvarado, A. (2003). Ingestion of bacterially expressed double-stranded RNA inhibits gene expression in planarians. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 Suppl 1 : 11861–11865. **Texte intégral :** https://www.pnas.org/content/pnas/100/suppl_1/11861.full.pdf.

Nottrott, S., Simard, M. J., et Richter, J. D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 13(12) : 1108–1114. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17128272.

Okamura, K., Chung, W. J., Ruby, J. G., Guo, H., Bartel, D. P., et Lai, E. C. (2008). The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature*, 453(7196) : 803–806. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735555/pdf/nihms110585.pdf.

Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., et Siomi, M. C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev*, 18(14) : 1655–1666. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/18/14/1655.full.pdf+html.

Olovnikov, I., Chan, K., Sachidanandam, R., Newman, D. K., et Aravin, A. A. (2013). Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol Cell*, 51(5) : 594–605. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2813%2900587-X.

Olsen, P. H. et 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(2) : 671–680. **Texte intégral :** `https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0012160699995234`.

Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., et Conklin, D. S. (2002a). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev*, 16(8) : 948–958. **Texte intégral :** `https://www.pnas.org/content/pnas/99/3/1443.full.pdf`.

Paddison, P. J., Caudy, A. A., et Hannon, G. J. (2002b). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(3) : 1443–1448. **Texte intégral :** `https://www.pnas.org/content/99/3/1443.full.pdf`.

Papp, I., Mette, M. F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S. E., Ray, A., van der Winden, J., Matzke, M., et Matzke, A. J. (2003). Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. *Plant Physiol*, 132(3) : 1382–1390. **Texte intégral :** `http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/132/3/1382.full.pdf`.

Park, M. Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H., et Poethig, R. S. (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(10) : 3691–3696. **Texte intégral :** `https://www.pnas.org/content/pnas/102/10/3691.full.pdf`.

Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., et Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808) : 86–89. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081512`.

Pélisson, A., Sarot, E., Payen-Groschêne, G., et Bucheton, A. (2007). A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway downregulates complementary sense *gypsy* transcripts in somatic cells of the *Drosophila* ovary. *J Virol*, 81(4) : 1951–1960. **Texte intégral :** `https://jvi.asm.org/content/jvi/81/4/1951.full.pdf`.

Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L., et Poethig, R. S. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 18(19) : 2368–2379. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/18/19/2368.full.pdf+html`.

Persengiev, S. P., Zhu, X., et Green, M. R. (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*, 10(1) : 12–18. **Texte intégral :** `https://rnajournal.cshlp.org/content/10/1/12.full.pdf+html`.

Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F. A., van, Dyk, L. F., Ho, C. K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B. D., Rice, C. M., Simon, V., Ho, D. D., Zavolan, M., et Tuschl, T. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2(4) : 269–276. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15782219`.

Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C., et Tuschl, T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304(5671) : 734–736. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15118162`.

Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W., et Sontheimer, E. J. (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell*, 117(1) : 83–94. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2804%2900258-2`.

Rand, T. A., Petersen, S., Du, F., et Wang, X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123(4) : 621–629. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2805%2901107-4.

Ratcliff, F., Harrison, B. D., et Baulcombe, D. C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, 276(5318) : 1558–1560. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18610513.

Rehwinkel, J., Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., et Izaurralde, E. (2005). A crucial role for GW182 and the DCP1 :DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, 11(11) : 1640–1647. **Texte intégral :** https://rnajournal.cshlp.org/content/11/11/1640.full.pdf+html.

Reinhart, B. J. et Bartel, D. P. (2002). Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science*, 297(5588) : 1831. **Texte intégral :** https://science.sciencemag.org/content/297/5588/1831.long.

Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., et Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772) : 901–906. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706289.

Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., et Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 16(13) : 1616–1626. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/16/13/1616.full.pdf+html.

Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., et Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110(4) : 513–520. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2802%2900863-2.

Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., et Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol*, 12(4) : 340–349. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800637.

Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K. M., et Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 35(17) : 5944–5953. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2034466/pdf/gkm641.pdf.

Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H., et Siomi, M. C. (2007). Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2´-*O*-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3´ ends. *Genes Dev*, 21(13) : 1603–1608. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/21/13/1603.full.pdf+html.

Schirle, N. T. et MacRae, I. J. (2012). The crystal structure of human Argonaute2. *Science*, 336(6084) : 1037–1040. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3521581/pdf/nihms421689.pdf.

Schirle, N. T., Sheu-Gruttadauria, J., et MacRae, I. J. (2014). Structural basis for microRNA targeting. *Science*, 346(6209) : 608–613. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313529/pdf/nihms-657126.pdf.

Schwarz, D. S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., et Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2) : 199–208. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2803%2900759-1.

Schwarz, D. S., Hutvágner, G., Haley, B., et Zamore, P. D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell*, 10(3) : 537–548. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2802%2900651-2.

Schwarz, D. S., Tomari, Y., et Zamore, P. D. (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg^{2+}-dependent endonuclease. *Curr Biol*, 14(9) : 787–791. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2804%2900176-9.

Seitz, H., Youngson, N., Lin, S. P., Dalbert, S., Paulsen, M., Bachellerie, J. P., Ferguson-Smith, A. C., et Cavaillé, J. (2003). Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene. *Nat Genet*, 34(3) : 261–262. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796779.

Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., et Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209) : 58–63. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668040.

Semizarov, D., Frost, L., Sarthy, A., Kroeger, P., Halbert, D. N., et Fesik, S. W. (2003). Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(11) : 6347–6352. **Texte intégral :** https://www.pnas.org/content/pnas/100/11/6347.full.pdf.

Setten, R. L., Rossi, J. J., et Han, S. P. (2019). The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 18(6) : 421–446. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30846871.

Shabalina, S. A. et Koonin, E. V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol*, 23(10) : 578–587. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2695246/pdf/nihms-101859.pdf.

Shin, C., Nam, J. W., Farh, K. K., Chiang, H. R., Shkumatava, A., et Bartel, D. P. (2010). Expanding the microRNA targeting code : functional sites with centered pairing. *Mol Cell*, 38(6) : 789–802. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2810%2900446-6.

Sigova, A., Rhind, N., et Zamore, P. D. (2004). A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev*, 18(19) : 2359–2367. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/18/19/2359.full.pdf+html.

Silva, J. M., Hammond, S. M., et Hannon, G. J. (2002). RNA interference : a promising approach to antiviral therapy ? *Trends Mol Med*, 8(11) : 505–508. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421679.

Sioud, M. (2005). Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol*, 348(5) : 1079–1090. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15854645.

Slack, F. J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H. R., et Ruvkun, G. (2000). The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*, 5(4) : 659–669. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2800%2980245-2.

Sledz, C. A., Holko, M., de, Veer, M. J., Silverman, R. H., et Williams, B. R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 5(9) : 834–839. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12942087.

Smardon, A., Spoerke, J. M., Stacey, S. C., Klein, M. E., Mackin, N., et Maine, E. M. (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol*, 10(4) : 169–178. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2800%2900323-7.

Smith, C. J., Watson, C. F., Bird, C. R., Ray, J., Schuch, W., et Grierson, D. (1990). Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, 224(3) : 477–481. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2266949`.

Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., et Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689) : 1434–1437. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284453`.

Stark, A., Brennecke, J., Russell, R. B., et Cohen, S. M. (2003). Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol*, 1(3) : E60. **Texte intégral :** `https://journals.plos.org/plosbiology/article/file?id=10.1371/journal.pbio.0000060&type=printable`.

Steiner, F. A., Hoogstrate, S. W., Okihara, K. L., Thijssen, K. L., Ketting, R. F., Plasterk, R. H., et Sijen, T. (2007). Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol*, 14(10) : 927–933. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891148`.

Swarts, D. C., Jore, M. M., Westra, E. R., Zhu, Y., Janssen, J. H., Snijders, A. P., Wang, Y., Patel, D. J., Berenguer, J., Brouns, S. J. J., et van der Oost, J. (2014). DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*, 507(7491) : 258–261. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4697943/pdf/nihms-743928.pdf`.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., et Mello, C. C. (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, 99(2) : 123–132. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2981644-X`.

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 Hannon, G. J. (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, 453(7194) : 534–538. **Texte intégral :** `https://www.nature.com/articles/nature06904`.

Tarver, J. E., Cormier, A., Pinzón, N., Taylor, R. S., Carré, W., Strittmatter, M., Seitz, H., Coelho, S. M., et Cock, J. M. (2015). microRNAs and the evolution of complex multicellularity : identification of a large, diverse complement of microRNAs in the brown alga Ectocarpus. *Nucleic Acids Res*, 43(13) : 6384–6398. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4513859/pdf/gkv578.pdf`.

Timmons, L. et Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6705) : 854. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804418`.

Tomari, Y., Du, T., et Zamore, P. D. (2007). Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell*, 130(2) : 299–308. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2807%2900761-1`.

Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., et Zamore, P. D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science*, 306(5700) : 1377–1380. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15550672`.

Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., et Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, 13(24) : 3191–3197. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/13/24/3191.full.pdf+html`.

Vagin, V. V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., et Zamore, P. D. (2006). A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*, 313(5785) : 320–324. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809489`.

Van Blokland, R., Van der Geest, N., Mol, J. N. M., et Kooter, J. M. (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J*, 6(6) : 861–877. **Texte intégral :** `https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-313X.1994.6060861.x`.

van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N., et Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia : addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2(4) : 291–299. **Texte intégral :** `http://www.plantcell.org/content/plantcell/2/4/291.full.pdf`.

van Rij, R. P., Saleh, M. C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., et Andino, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev*, 20(21) : 2985–2995. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/20/21/2985.full.pdf+html`.

Vazquez, F., Vaucheret, H., Rajagopalan, R., Lepers, C., Gasciolli, V., Mallory, A. C., Hilbert, J. L., Bartel, D. P., et Crété, P. (2004). Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Mol Cell*, 16(1) : 69–79. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2804%2900581-7`.

Vilkaitis, G., Plotnikova, A., et Klimasauskas, S. (2010). Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1 : the catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA. *RNA*, 16(10) : 1935–1942. **Texte intégral :** `https://rnajournal.cshlp.org/content/16/10/1935.full.pdf+html`.

Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I., et Martienssen, R. A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, 297(5588) : 1833–1837. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193640`.

Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Tuschl, T., et Patel, D. J. (2008a). Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature*, 456(7224) : 921–926. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2765400/pdf/nihms136881.pdf`.

Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., et Patel, D. J. (2008b). Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature*, 456(7219) : 209–213. **Texte intégral :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689319/pdf/nihms744874.pdf`.

Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., Surani, M. A., Sakaki, Y., et Sasaki, H. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 453(7194) : 539–543. **Texte intégral :** `https://www.nature.com/articles/nature06908`.

Wedeles, C. J., Wu, M. Z., et Claycomb, J. M. (2013). A multitasking Argonaute : exploring the many facets of *C. elegans* CSR-1. *Chromosome Res*, 21(6–7) : 573–586. **Fiche Pubmed :** `https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24178449`.

Wee, L. M., Flores-Jasso, C. F., Salomon, W. E., et Zamore, P. D. (2012). Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell*, 151(5) : 1055–1067. **Texte intégral :** `https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2812%2901299-8`.

Wightman, B., Bürglin, T. R., Gatto, J., Arasu, P., et Ruvkun, G. (1991). Negative regulatory sequences in the lin-14 3´-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev*, 5(10) : 1813–1824. **Texte intégral :** `http://genesdev.cshlp.org/content/5/10/1813.long`.

Wightman, B., Ha, I., et Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5) : 855–862. **Texte intégral :** https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(93)90530-4.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867493905304%3Fshowall%3Dtrue.

Williams, R. W. et Rubin, G. M. (2002). ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(10) : 6889–6894. **Texte intégral :** https://www.pnas.org/content/pnas/99/10/6889.full.pdf.

Winston, W. M., Molodowitch, C., et Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295(5564) : 2456–2459. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834782.

Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., et Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*, 2(5) : E104. **Texte intégral :** https://journals.plos.org/plosbiology/article/file?id=10.1371/journal.pbio.0020104&type=printable.

Yang, D., Lu, H., et Erickson, J. W. (2000). Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, 10(19) : 1191–1200. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0960-9822%2800%2900732-6.

Yang, J.-S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., CHandwani, R., Papapetrou, E. P., Sadelain, M., O'Carroll, D., et Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(34) : 15163–15168. **Texte intégral :** https://www.pnas.org/content/pnas/107/34/15163.full.pdf.

Yang, Z., Ebright, Y. W., Yu, B., et Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2´ OH of the 3´ terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res*, 34(2) : 667–675. **Texte intégral :** https://academic.oup.com/nar/article/34/2/667/2401719.

Yekta, S., Shih, I. H., et Bartel, D. P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science*, 304(5670) : 594–596. **Fiche Pubmed :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15105502.

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., et Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17(24) : 3011–3016. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/17/24/3011.full.pdf+html.

Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward, R., et Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307(5711) : 932–935. **Texte intégral :** https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5137370/pdf/nihms832116.pdf.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., et Bartel, D. P. (2000). RNAi : double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1) : 25–33. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2980620-0.

Zeng, Y., Wagner, E. J., et Cullen, B. R. (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell*, 9(6) : 1327–1333. **Texte intégral :** https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2802%2900541-5.

Zhao, T., Li, G., Mi, S., Li, S., Hannon, G. J., Wang, X. J., et Qi, Y. (2007). A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev*, 21(10) : 1190–1203. **Texte intégral :** http://genesdev.cshlp.org/content/21/10/1190.full.pdf+html.

Index

Ago, 28
Arabidopsis thaliana, 10, 15, 24, 27, 28
ARNi, *voir* RNAi

Bilatérien, *voir* Triblastique
Brin guide, 33
Brin passager, 33

Cœnorhabditis elegans, *voir* Nématode

Dégradome, 21
Diblastique, 19, 21
Dicer, 11
Drosha, 11, 23

Gène hétérochronique, 19
Graine, 30

Hen1, 24

Immunoprécipitation, 27, 29, 31

miARN*, 23

Nématode, 8, 10, 14, 15, 17, 27, 28, 32
Neurospora crassa, 10, 20, 27

Pétunia, 7, 10
Physcomitrella patens, 24
piARN, 35
Pimet, *voir* Hen1
Piwi, 28
Polymérase à ARN dépendant de l'ARN , *voir* RdRP
Polysomes, 22, 27
Procaryotes, 29
PTGS, 7

Queue poly(A), 22

rasiRNA, 15
RdRP, 8, 13
Répression traductionnelle, 22
RISC, 11, 12
RISC-loading complex, 34
RNAi, 8
RNase III, 11

Saccharomyces cerevisiae, 15
Schizosaccharomyces pombe, 11, 15
Seed, *voir* Gaine30
siARN, 10
siRNP, 11
stRNA, 19

Tabac, 10
TGS, 7
Thermus thermophilus, 30
Tomate, 7, 10
Triblastique, 19, 22

UTR, 17, 19, 23

Wago, 28