

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EXPRESSION ET ÉTUDE FONCTIONNELLE DU GROUPE MIR-106-363

À L'AIDE DES VECTEURS RÉTROVIRAUX

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

OULIANA SOUCHKOVA

JUIN, 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche Dr Éric Rassart, qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a confié un projet très intéressant. Son esprit critique et sa façon d'encadrer les étudiants me rappelaient toujours mon père. J'étais toujours fière de faire partie de son équipe.

Je tiens à remercier particulièrement Dre Elsy Édouard pour ses conseils précieux, pour son esprit analytique et pour son implication dans nos problèmes scientifiques et personnels. Je remercie Philippe Legault, l'assistant de recherche de notre laboratoire, pour m'avoir guidé dans mon parcours expérimental. Je veux exprimer toute ma gratitude à mon collègue du labo Fadila Larget qui a été toujours disponible pour répondre à mes questions, corriger mes textes en français et pour discuter les problèmes de toutes sortes. Elle savait bien trouver le mot d'encouragement et de réconfort pour m'avoir aidé à surmonter les moments difficiles.

Un merci très spécial va à trois personnes qui m'ont apporté de l'aide avec la correction de mon mémoire – Elsy, Fadila et Syndia. Je n'aurais pas pu réaliser ce travail sans vous.

Je suis très reconnaissante aux autres membres de notre laboratoire pour le partage de l'expertise et pour la bonne ambiance de travail: Sonia, Louis-Charles, Azadeh, Wafa, Sébastien.

Je remercie aussi ma famille pour la patience, le support et l'encouragement.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Les rétrovirus.....	3
1.1.1 Structure de rétrovirus.....	3
1.1.2 Cycle de réplication des rétrovirus.....	4
1.1.3 Sites d'intégration.....	6
1.1.4 Mutagénèse rétroviral.....	7
1.2 Les miARN.....	9
1.2.1 Introduction générale.....	9
1.2.2 MiARN et cancer. Implication dans des leucémies.....	13
1.3 Locus Kis2 : surexpression dans les tumeurs provoquées par l'intégration rétrovirale.....	14
1.4 Vecteurs pour l'expression des miARN.....	18
1.5 Vecteurs d'expression à base de rétrovirus.....	19
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	23
2.1 Lignées cellulaires.....	23

2.1.1 Lignée d'encapsulation Phoenix.....	23
2.1.2 Lignée NIH 3T3.....	24
2.1.3 Lignée Ti6.....	24
2.2 Vecteurs rétroviraux et constructions.....	24
2.2.1 pMSCV et pMSCV-Kis2.....	24
2.2.2 pLXSN et pLXSN-Kis2.....	26
2.2.3 pLNSX et pLNSX-Kis2miR.....	27
2.3 Préparation du vecteur.....	28
2.4 Préparation de l'insert.....	29
2.5 Ligation.....	29
2.6 Transformation de bactéries compétentes <i>Escherichia coli</i> par les produits de ligation.....	29
2.7 Préparation de petites quantités d'ADN (mini-prep).....	30
2.8 Production des rétrovirus recombinants.....	30
2.8.1 Transfection d'ADN.....	30
2.8.2 Titration du virus.....	30
2.9 Infection des cellules.....	31
2.10 Détection des transcrits Kis2 par RT-PCR.....	31
2.11 Détection de l'expression des miARN par Northern blot.....	33
2.11.1 Électrophorèse.....	33
2.11.2 Transfert.....	33
2.11.3 Préparation de la sonde pour miARN.....	33
2.11.4 Hybridation radioactive.....	34
2.12 Test de pouvoir transformant du groupe miR-106-363: perte d'ancrage...	35
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	36

3.1 Clonage de fragments contenant le locus miR 106-363 (3.2 kb) et (1.04 kb) dans les vecteurs rétroviraux pLNSX, pLXSN et pMSCV.....	36
3.2 Titration des virus par infection des cellules NIH 3T3.....	39
3.3 Détection des miARN.....	41
3.3.1 Détection des miARN dans les NIH 3T3.....	41
3.3.2 Détection des miARN dans les Ti6.....	44
3.4 Northern blot des miARN.....	52
3.5 Test de transformation cellulaire: perte de la capacité d'ancrage.....	57
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	62
4.1 Titration des virus par infection des cellules NIH 3T3.....	62
4.2 Détection des miARN par RT-PCR.....	64
4.3 Northern blots de miARN.....	65
4.4 Indépendance d'ancrage.....	68
CONCLUSION.....	71
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	73

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.1 Structure du rétrovirus.....	3
Figure 1.1.2 Représentation schématique du rétrovirus.....	4
Figure 1.1.3 ADN proviral d'un rétrovirus.....	5
Figure 1.1.4 Mécanisme de répllication des rétrovirus.....	6
Figure 1.1.5 Mécanismes de mutagenèse rétroviral.....	8
Figure 1.2.1 Voie de biogenèse d'un microARN et mode d'action.....	10
Figure 1.3.1 Situation des miARN du groupe miR-106-363 dans la région Kis2.....	15
Figure 1.3.2 Combinaison d'inhibition/activation d'épissage à l'origine des transcrits Kis2.....	16
Figure 1.5.1 Construction du vecteur rétroviral pour l'expression du groupe des miARN miR 17-92.....	22
Figure 2.2.1 Construction du plasmide recombinant pMSCV-Kis2.....	25
Figure 2.2.2 Construction du plasmide recombinant pLXSN-Kis2.....	27
Figure 2.2.3 Construction du plasmide recombinant pLNSX-Kis2miR.....	28
Figure 3.1.1 Clonage des fragments contenant le locus miR-106-363 dans les vecteurs rétroviraux.....	36
Figure 3.1.2 Analyse du plasmide recombinant pLXSN-Kis2 par les enzymes de restriction.....	37
Figure 3.1.3 Analyse du plasmide recombinant pMSCV-Kis2 par les enzymes de restriction.....	38
Figure 3.1.4 Analyse du plasmide recombinant pLNSX-Kis2miR par les enzymes de restriction.....	39
Figure 3.2.1 Titration des virus recombinants (pLXSN-Kis2, pLNSX-Kis2miR et pMSCV-Kis2) et des virus contrôle (particules contenant vecteurs vides: pLXSN, pLNSX et pMSCV).....	40
Figure 3.3.1 Amplification du pri-miARN du groupe miR-106-363 par RT-	

PCR nichée.....	43
Figure 3.3.2 Amplification du pri-miARN du groupe miR-106-363 par RT-PCR.....	44
Figure 3.3.3 Amplification de la partie non codante du gène Kis2 par RT-PCR.....	46
Figure 3.3.4 Les différents transcrits produits par le gène Kis2 dans la lignée Ti6.....	47
Figure 3.3.5 Amplification du fragment Kis2 exprimé de manière stable dans la lignée Ti6.....	49
Figure 3.3.6 Détection par Northern blot des transcrits du gène Kis2 exprimé de façon stable dans la lignée Ti6.....	50
Figure 3.3.7 Amplification du pri-miARN du groupe miR-106-363 exprimé de manière stable dans la lignée Ti6.....	51
Figure 3.4.1 Expression des miARN du groupe miR-106-363 dans des lignées NIH 3T3 et Ti6.....	53
Figure 3.4.2 Expression des miR-19 et miR-92 dans des lymphocytes (Ti6, BL/VL3) et des NIH 3T3.....	54
Figure 3.4.3 Polymorphisme des miR-106 et miR-19 matures.....	55
Figure 3.4.4 Expression des miR-106 et miR-20 dans des lymphocytes (Ti6, BL/VL3) et des NIH 3T3.....	56
Figure 3.5.1 Nombre de colonies formées par les cellules NIH 3T3 infectées dans le milieu semi-liquide (agar mou).....	59
Figure 3.5.2 Test d'indépendance d'ancrage.....	60

LIST DES TABLEAUX

Tableau 1.5.1 Avantages et désavantages des systèmes d'expression rétroviraux.....	21
Tableau 2.10.1 Amorces pour la détection des transcrits Kis2.....	32
Tableau 2.11.1 Sondes pour la détection des miARN.....	34
Tableau 3.2.1 Titration des virus recombinants (pLXSN-Kis2, pLNSX-Kis2miR et pMSCV-Kis2) et des virus contrôles (particules contenant vecteurs vides pLXSN, pLNSX et pMSCV).....	41

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAV	<i>Adenovirus Associated Viruses</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Amp ^r	Gene de résistance à l'ampicilline
API	<i>activator protein 1</i>
ASLV	<i>avian sarcoma leukosis virus</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
ARNss	<i>single-stranded RNA</i>
bpb	<i>bromophenol blue</i>
CA	capside
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
DMEM	<i>Dulbecco modified Eagles medium</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
G 418	Généticine
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Hipk3	<i>Homeodomain Interacting Protein Kinase 3</i>
hnRNP	<i>heterogeneous RiboNuclear Protein</i>
HTLV	<i>Human T cell leukemia/lymphoma virus type 1</i>

IN	intégrase
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
Kb	<i>Kilobases</i>
<i>Kis2</i>	<i>Kaplan Integration Site 2</i>
KSRP	<i>K-Homology Splicing Regulatory Protein</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MA	matrice virale
MESV	<i>Murine Embryonic Stem Cell Virus</i>
MF	fibroblastes mitotiques
miARN	microARN
miRNP/RISC	<i>microribonucleoprotein/RNA-induced silencing complex</i>
MoMuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MoMuSV	<i>Moloney murine sarcoma virus</i>
MyIip	<i>Myosin regulatory Light chain Interacting Protein</i>
NC	Nucléocapside
Neo ^r	Gene de résistance à la néomycine
nt	Nucléotide
pb	paires de bases
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBS	<i>tRNA primer binding site</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMF	fibroblastes post mitotiques
PPT	<i>poly-purine tract</i>
PR	Protéase
Pre-ARNm	ARNm non épissé
pre-miARN	précurseur intermédiaire de miARN

pri-miARN	premier précurseur de miARN
PSF	<i>PTB associated Splicing Factor</i>
PTB	<i>Polypyrimidine Track Binding protein</i>
RadLV	<i>Radiation Leukemia Virus</i>
RBP	<i>RNA Binding Proteins</i>
Rbp1-like	<i>Retinoblastoma-Binding Protein 1-like</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	<i>Reverse Transcriptase</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>
SA, SAE	Site Accepteur d'Épissage
SCI	Site Commun d'Intégration
SD, SDE	Site Donneur d'Épissage
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
siARN	<i>small interfering RNA</i>
SU	glycoprotéines de surface
TM	glycoprotéines transmembranaires
TPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
TRE	<i>TPA-response element</i>
TSS	<i>Transcription start site</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
XC	xylène cyanol

RÉSUMÉ

Récemment, notre laboratoire a identifié un nouveau site commun d'intégration rétrovirale sur le chromosome X chez la souris (S. Landais et al., 2005). Ce site a été associé à un nouveau gène, appelé *Kaplan integration site 2* (Kis2), dont l'expression est augmentée dans les cellules tumorales. De façon surprenante, il ne code pour aucune protéine, et produit cinq transcrits d'ARN non codant comportant le précurseur (pré-miARN) du groupe de six micro-ARN (miARN): miR-106-363 (S. Landais et al., 2007). La compréhension de la fonction des produits de ce gène ainsi que les voies métaboliques dans lesquelles ils sont impliqués pourraient approfondir notre connaissance de la régulation de l'expression des miARN regroupés. L'expression transitoire de ce locus dans des vecteurs d'expression eucaryotes s'est avérée non fructueuse. Afin de contourner cet obstacle, nous avons eu recours à l'infection des cellules par les rétrovirus recombinants contenant le groupe miR-106-363 comme outil permettant l'expression stable du gène d'intérêt. Dans ce travail nous avons établi deux lignées cellulaires, NIH 3T3 (fibroblastes murins) et Ti6 (lymphocytes), qui expriment le gène Kis2 et le groupe miR-106-363 à l'aide de trois constructions rétrovirales. Grâce à la construction pMSCV-Kis2, nous avons surexprimé les miARN du groupe miR-106-363 dans les NIH 3T3 et les Ti6. La construction pLXSN-Kis2 a permis de produire l'un des plus grands transcrits du gène Kis2 (1.7 kb) dans la lignée Ti6. Le test d'indépendance d'ancrage réalisé sur les cellules exprimant le groupe miR-106-363 de façon stable a confirmé son implication dans la transformation maligne et a établi une corrélation entre le niveau d'expression des ces miARN et la gravité de la transformation.

L'obtention d'un système d'expression efficace de Kis2/miR-106-363 nous permettra d'étudier plus en détail la fonction de ces miARN, d'identifier leurs cibles et leurs partenaires d'interaction ainsi que d'étudier leur rôle *in vivo* chez la souris.

De plus, les cellules qui expriment le gène de manière stable seront la source infinie du matériel permettant de conduire les expériences à plus grande échelle y compris l'étude des molécules inhibitrices pour le traitement de la leucémie de type T.

Mots clés: oncogenèse, ARN non codant, miARN, système d'expression rétroviral.

INTRODUCTION

La dérégulation de l'expression de certains gènes est responsable de l'apparition de plusieurs types de cancers. L'implication des micro-ARN (miARN) dans le processus de l'oncogenèse a été prouvée par la localisation de nombreux miARN au niveau des sites de translocation et de délétions, qui sont des phénomènes souvent associés aux leucémies autant chez l'homme que chez la souris.

Une étude réalisée par S. Landais dans notre laboratoire a révélé l'implication de miARN dans la leucémie de type T (S. Landais et al., 2007). Le rétrovirus RadLV (*Radiation Leukemia Virus*) qui provoque exclusivement des leucémies de type T chez la souris a été utilisé comme outil de recherche pour identifier de nouveaux oncogènes. Un nouveau site commun d'intégration pour RadLV a été trouvé sur le chromosome X de souris (S. Landais et al., 2005). De plus, la surexpression d'un gène inconnu situé à proximité de ce site dans des tumeurs réarrangées a été démontrée. Ce nouveau gène, appelé Kis2, produit cinq transcrits d'ARN non codant (ARNnc) contenant le pri-miARN du groupe de six miARN: miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-92-2 et miR-363 (miR-106-363). La production de ces transcrits différents pourrait résulter d'une combinaison d'inhibition/activation des différents sites d'épissage, contrôlée par des protéines régulatrices (Landais, thèse de doctorat, 2007).

D'une façon intéressante, le groupe miR-106-363 est très homologue au groupe miR-17-92, qui se trouve sur le chromosome 14 de souris et qui est connu pour son implication dans la leucémie de type B. Pourtant, en dépit de sa haute homologie avec le groupe miR-17-92, le potentiel oncogénique de miR-106-363 n'avait jamais été étudié et n'avait jamais été associé à la leucémie avant cette étude (Landais, 2007).

Dans une première étape de l'étude de fonction biologique du gène *Kis2* dans le laboratoire, les séquences d'ADN complémentaires aux transcrits de ce gène ont été clonées dans le vecteur pCMV5. Cependant, la transfection d'ADNc correspondant aux différents transcrits exprimés par les vecteurs d'expression a résulté en l'obtention uniquement du plus petit transcrit *Kis2* (0,6 kb) (S. Landais, communication personnelle). De plus, le niveau d'expression des miARN dans ces expériences s'est avéré insuffisant pour des analyses ultérieures. Pour pouvoir étudier et caractériser la fonction de ces miARN, nous avons conclu de la nécessité de développer un système d'expression plus efficace.

Plusieurs systèmes d'expression adaptés pour les miARN ont été rapportés dans la littérature. La majorité de ces systèmes permettait l'expression de miARN synthétique unique caché dans le contexte de miR-155 ou miR-30 sous le contrôle du promoteur de type Polymérase III. Une seule construction permettant l'expression d'un groupe de miARN avait été décrite (Hammond et al. 2005). Dans cette construction, le groupe miR-17-92 placé dans l'environnement de miR-30 était exprimé sous le contrôle du promoteur rétroviral présent dans le LTR du vecteur pMSCV. En tenant compte que notre groupe miR-106-363 partage une certaine homologie de séquence avec le groupe miR-17-92 et que l'utilisation des vecteurs rétroviraux pourrait nous permettre d'introduire le gène d'intérêt dans les chromosomes de façon très efficace, nous avons entrepris d'exprimer le groupe miR-106-363 sous la forme du transcrit pleine longueur du locus *Kis2* dans des vecteurs rétroviraux pMSCV, pLXSN et pLNSX. Deux vecteurs, pMSCV et pLXSN, avaient déjà été utilisés pour l'expression des miARN.

Notre objectif final était d'obtenir des lignées stables exprimant les miARN du groupe miR106-363.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 LES RÉTROVIRUS

1.1.1 Structure de rétrovirus

Les rétrovirus sont des virus enveloppés possédant un génome composé d'un dimère d'ARN simple brin de polarité positive, associé à différentes protéines. Les chaînes d'ARN identiques sont reliées à leur extrémité 5'. Une capside inclue les 2 brins d'ARN et les protéines qui lui sont associées. Ensemble, ils forment la nucléocapside qui est entourée par une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique ainsi que de glycoprotéines transmembranaires et celles de surface. Les protéines de la matrice se situent directement sous l'enveloppe virale (fig. 1.1.1, 1.1.2).

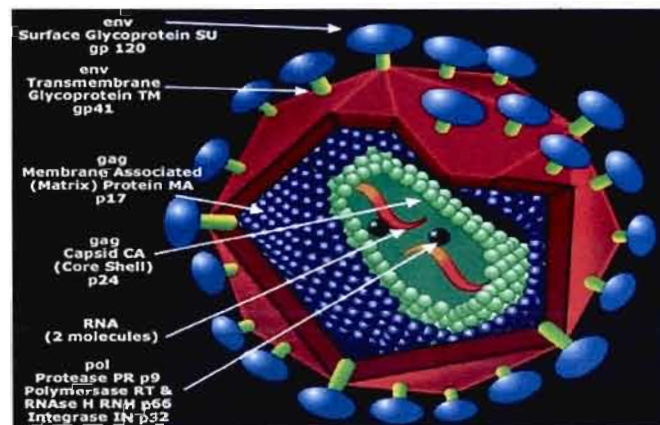


Figure 1.1.1 Structure du rétrovirus. Tiré de http://www.stanford.edu/group/nolan/tutorials/ret_6_gpedesc.html

Le génome des rétrovirus est constitué des gènes de l'enveloppe (*env*) qui codent pour les glycoprotéines de surface (SU) et pour les glycoprotéines transmembranaires (TM). Il est aussi constitué par le gène *gag* codant pour la matrice virale (MA), pour la capside (CA) et pour la nucléocapside (NC). Les rétrovirus contiennent aussi le gène *pol* codant pour la transcriptase inverse (RT) et pour l'intégrase (IN). Deux molécules d'ARN constituent le génome des rétrovirus.

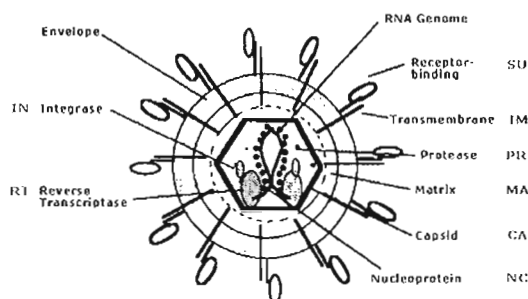


Figure 1.1.2 Représentation schématique du rétrovirus.

Tiré de http://www.stanford.edu/group/nolan/tutorials/ret_5_struct.html

SU : glycoprotéines de surface, TM : glycoprotéines transmembranaires, PR : protéase, MA : matrice, CA : capsid, NC : nucléocapside, RT : transcriptase inverse, IN : intégrase.

Le gène *gag* code pour la synthèse des protéines de la matrice, de la capsid et de la nucléocapside. Le gène *pol* code pour les enzymes de la transcriptase inverse et de l'intégrase. Le gène *env*, quant à lui, code pour les glycoprotéines de surface et transmembranaires de l'enveloppe virale (fig.1.1.3). Il existe un autre domaine appelé **pro** codant pour la protéase du virion (Coffin et al , 1997). Aux extrémités du génome viral, se trouvent trois régions U3, R et U5 constituant le LTR et contenant les signaux de contrôle de l'expression virale.

1.1.2 Cycle de réplication des rétrovirus

Le cycle de réplication des rétrovirus est très particulier: le virus est absorbé à l'intérieur de la cellule hôte par attachement de la glycoprotéine (*env*) de surface aux récepteurs membranaires plasmiques qui lui sont spécifiques. Une fois dans le cytoplasme, la transcriptase inverse produite par le rétrovirus, transcrit l'ARN viral en un ADNc (ADN proviral, fig.1 1.3). Ce dernier est constitué de séquences LTR encadrant les gènes codant pour les protéines virales.

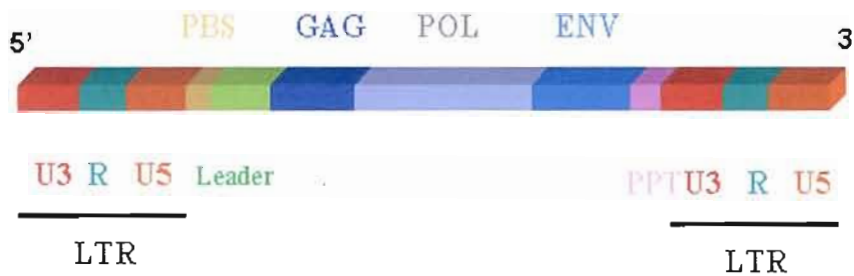


Figure 1.1.3 ADN proviral d'un rétrovirus.

(Tiré de <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/RETRO.HTM>)

R: une petite région de 18 à 250 nt formant une région unique répétée à chacune des extrémités de l'ADN proviral. **U5**: séquence unique non codante (taille 75-250 nt) qui représente un promoteur puissant de la transcription. **U3**: région unique non codante (taille 200-1200 nt), possède les signaux terminateurs de transcription dont le signal de polyadénylation. Elle constitue aussi un promoteur potentiellement capable d'activer un gène cellulaire situé à proximité. **PBS**: site de liaison d'ARNt (*tRNA primer binding site*). **PPT**: *poly-purine tract*.

Acheminé vers le noyau, l'ADNc est inséré dans l'ADN chromosomique à l'aide de l'intégrase virale pour former un provirus stable. A partir de ce moment, les rétrovirus vont détourner en leur faveur la machinerie transcriptionnelle cellulaire. Étant donné qu'ils sont intégrés, leur génome se comporte comme de l'ADN cellulaire et dépend donc de l'état de la cellule hôte créant une interaction entre le virus et la cellule.

L'ARN polymérase II cellulaire se charge de la transcription du provirus. Non seulement les éléments de régulation contenus dans les LTR du côté 5' ont un rôle très important dans cette transcription mais aussi ceux contenus du côté 3'. En plus de posséder des signaux de polyadénylation définissant la fin du génome rétroviral, le côté 3' peut jouer le rôle d'un promoteur en activant les gènes cellulaires situés en aval. Suite à cette étape de transcription, il y a production d'ARN représentant à la fois le matériel génétique viral et les ARNm (épissé ou non) des protéines constituant le rétrovirus. Ces deux produits seront assemblés en particules virales au niveau de la membrane plasmique de la cellule et sont libérés par

bourgeonnement pour former des virions matures qui à leur tour, vont infecter d'autres cellules (fig. 1.1.4).

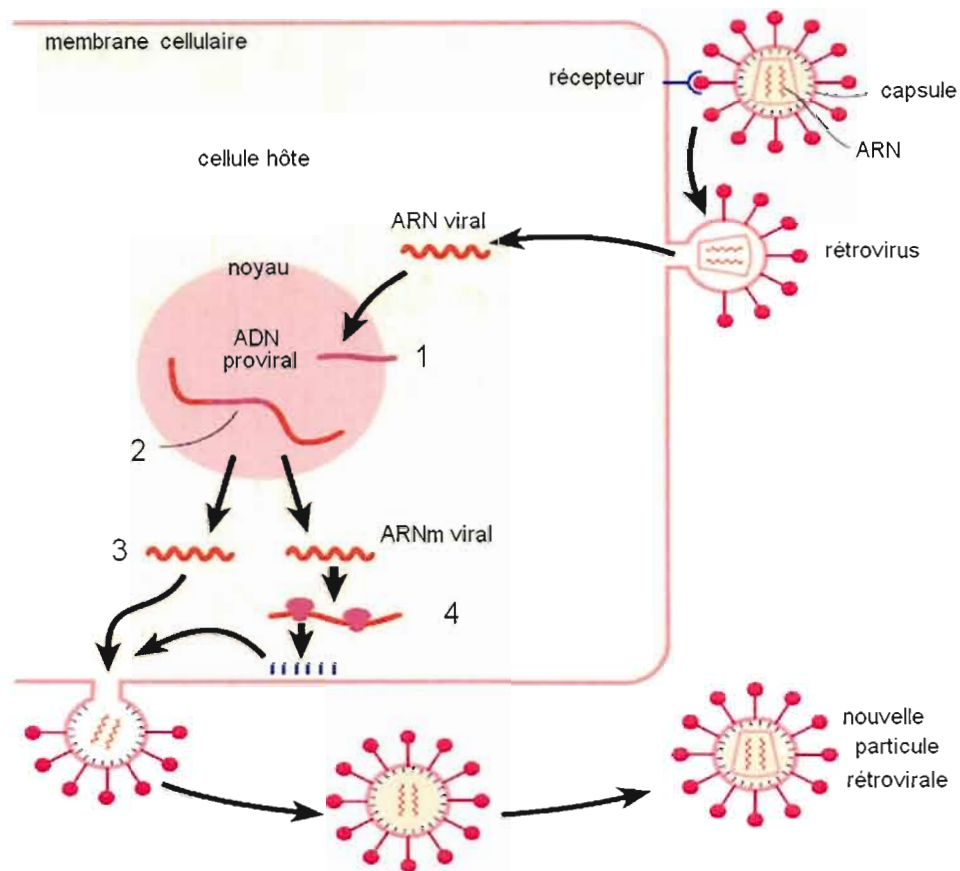


Figure 1.1.4 Mécanisme de réplication des rétrovirus.

Tiré de <http://www.bioscience-explained.org/EN1.2/pdf/virusEN.pdf>

1- La transcriptase réverse utilise l'ARN viral comme matrice pour produire l'ADN double brin; 2 – l'ADN viral s'intègre au chromosome de l'hôte; 3 – l'ARN viral est produit par transcription; 4 – synthèse de nouvelles protéines de la capsule virale.

1.1.3 Sites d'intégration

La caractéristique principale des rétrovirus réside dans leur capacité à intégrer un intermédiaire d'ADN double brin dans le génome de la cellule hôte grâce à l'intégrase. Le provirus est transmis à chaque division cellulaire aux cellules filles selon les lois de la

génétique mendélienne. Cette étape d'intégration est requise pour l'expression stable des gènes viraux.

L'intégration ne se fait pas au hasard: les rétrovirus s'intègrent de façon préférentielle dans les régions du génome activement transcrites par l'ARN polymérase II dans un type cellulaire donné. Ces régions ont été appelées «les sites commun d'intégration» (SCI). Cependant, ceux-ci d'ASLV sont localisés préférentiellement hors des régions de transcription. MoMuLV s'intègre de façon préférentielle dans une région de 5 kpb en amont ou en aval du site d'initiation de la transcription des gènes, contrairement au VIH-1 qui cible spécifiquement les unités de transcription actives, mais sur toute leur longueur, sans préférence pour la région 5' du gène (Mitchell et al., 2004).

1.1.4 Mutagenèse rétroviral

Du fait de leur intégration dans l'ADN cellulaire, les rétrovirus agissent comme des agents mutagènes et présentent la capacité d'activer le potentiel transformant d'un gène voisin (appelé alors oncogène) par différents mécanismes. Tous impliquent le rôle majeur des régions non codantes présentes dans les LTR viraux qui contiennent des séquences activatrices de la transcription présentes aux deux extrémités du provirus. Trois mécanismes peuvent être décrits:

- – le promoteur utilisé est celui du gène cellulaire et la région U3 du LTR apporte seulement une région «*enhancer*»: les transcrits débutent alors au site d'initiation physiologique et l'intégration conduit à l'expression dérégulée d'un gène qui peut être situé à plusieurs centaines de kpb du provirus intégré (Jonkers et al., 1996) ;

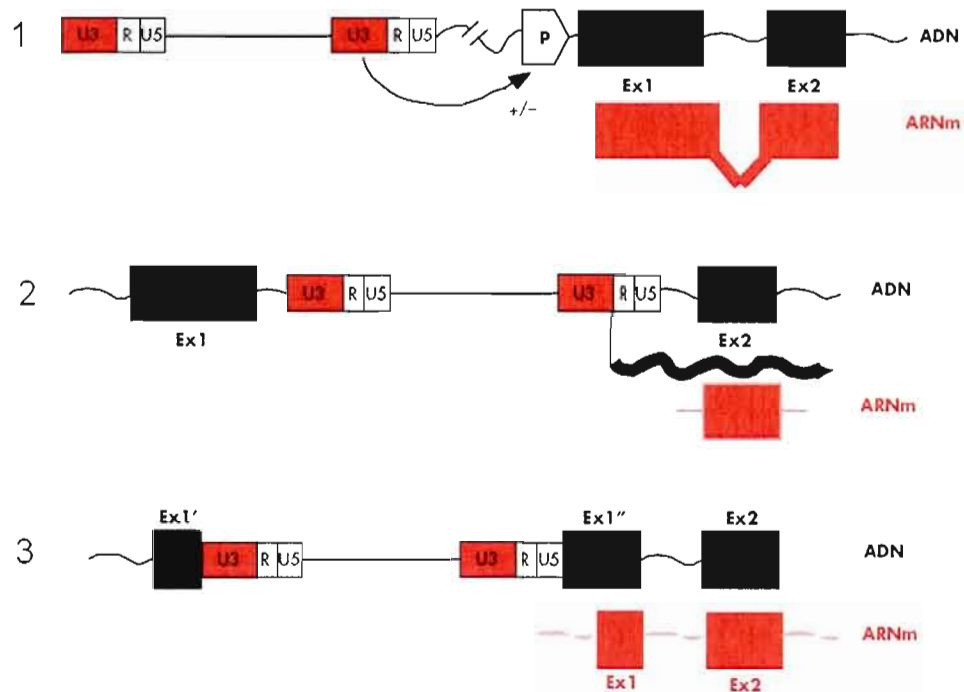


Figure 1.1.5 Mécanismes de mutagenèse rétroviral. Tirée de Cavazzana-Calvo, 2005.

1 – Action *enhancer* : perturbation à distance de la régulation transcriptionnelle d'un gène cellulaire; 2 – promotion des éléments situés en aval d'insertion rétrovirale; 3 – intégration dans une région codante.

- l'initiation de la transcription a lieu au niveau du promoteur viral : le provirus est alors toujours en 5' et dans la même orientation que le gène (promotion en aval) ;
- enfin, l'ARNm est stabilisé à la suite d'intégrations dans la région 3' du gène par la perte de séquences situées dans le 3' non codant.

Plus rarement, le provirus est intégré à l'intérieur d'une région codante conduisant soit à la surexpression d'une protéine tronquée, comme cela a été décrit pour c-myc et pour un membre de la famille Notch, soit à l'absence d'expression de l'allèle remanié, phénomène rapporté pour deux suppresseurs de tumeur Evi2/NF1 et p53.

Bien que l'activation monoallélique en cis des gènes cellulaires soit le mécanisme prédominant par lequel les rétrovirus compétents pour la réplication exercent leur potentiel transformant, une activation en trans de gènes cellulaires par des protéines virales a été décrite pour le virus de la leucémie bovine et pour HTLV-1. De façon intéressante, il a été rapporté pour MoMuLV l'existence de transcrits non codant initiés dans la région U3 du LTR capables, à travers l'activation du facteur de transcription AP1, de réguler l'expression de gènes cellulaires qui contiennent dans leur promoteur un élément de réponse au TPA (TRE) (Choi, Faller, 1995).

1.2 Les miARN

1.2.1 Introduction générale

Les microARN (miARN) sont de petits transcrits d'ARN non codant d'environ 18 à 25 nt qui régulent négativement et spécifiquement l'expression des gènes (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Exprimés chez la plupart des organismes eucaryotes, les gènes de miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II en pri-miARN qui présente une coiffe à l'extrémité 5' et un segment polyadénylé à l'extrémité 3' (Lee et al., 2004).

Le pri-microARN double brin (pri-miARN), transcrit à partir du gène, donne naissance à un précurseur intermédiaire (pre-miARN) par action d'une ribonucléase III Drosha (fig. 1.2.1). Après une exportation active du précurseur dans le cytoplasme, une forme double brin

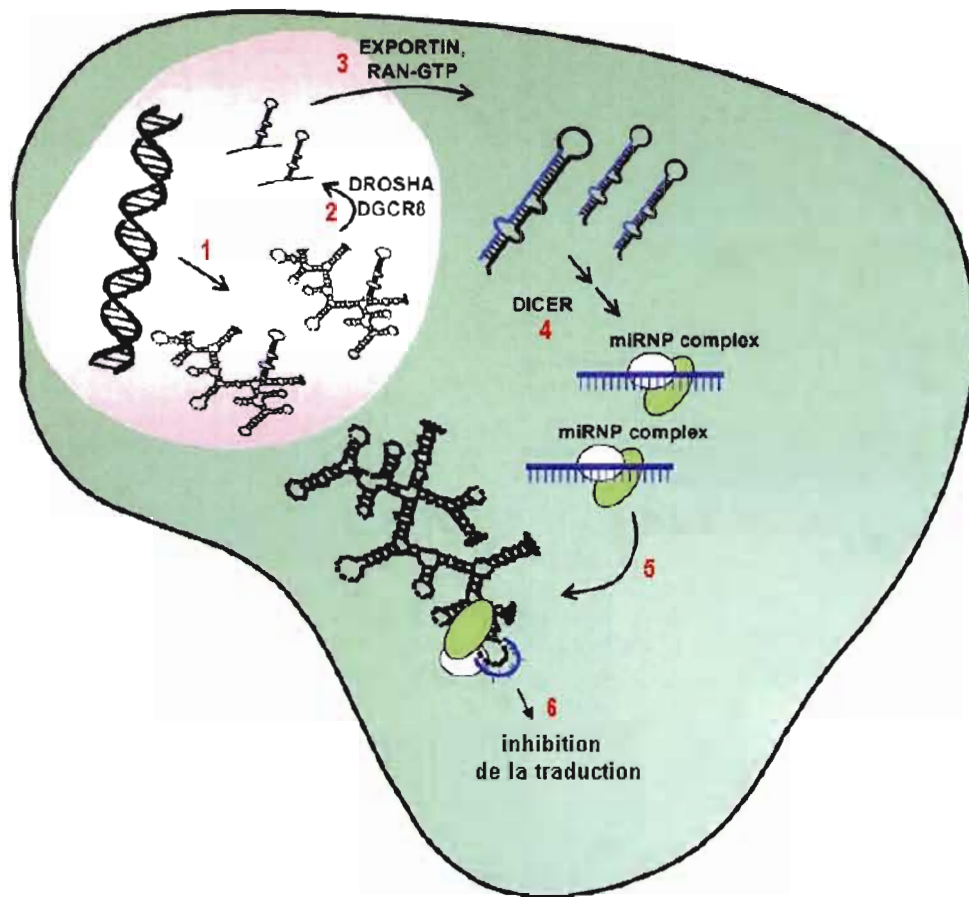


Figure 1.2.1 Voie de biogenèse d'un microARN et mode d'action. Tirée de Weiler, 2006. Les chiffres en rouge correspondent aux étapes de biogenèse des miARN: 1 – transcription des gènes codant pour miARN résulte en génération de longues transcrits primaires (pri-miARN) coiffés et polyadénylés; 2 – excision des motifs «épingle à cheveux» par le complexe Drosha/DGCR8 résultant en précurseur secondaire – pre-miARN; 3 - export des pre-miARN dans le cytoplasme par l'Exportin 5; 4 – maturation par le Dicer et génération des miARN matures; 5 – association des miARN avec la protéine Argonaute 2 (Ago-2) et activation du complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) qui dirige les miARN vers leur ARNm cibles; 6 – l'action des miARN par l'inhibition de la traduction.

du micro ARN est produit par l'action de la protéine Dicer. Une étape de maturation supplémentaire, à laquelle participe vraisemblablement une hélicase, est ensuite nécessaire avant que le microARN simple brin mature se fixe sur le complexe miRNP/RISC (*microribonucleoprotein/RNA-induced silencing complex*). Ce complexe guide ensuite le microARN vers la région 3' non codante (3'UTR) de l'ARNm cible. Après hybridation imparfaite entre le microARN et la cible, la traduction de la protéine correspondante est inhibée (Bartel, 2004).

Les miARN sont souvent organisés en groupe sous le contrôle d'un même promoteur (miARN polycistronique) ou ils peuvent être isolés. Ils proviennent de régions génomiques diversifiées: la plupart des miARN sont codés dans les régions intergéniques. Près de 25 % se trouvent dans des introns des ARNm (co-exprimés avec leurs gènes hôtes) ou codés par les gènes d'ARN non-codants. Le miARN hsa-miR-198 se situe sur un exon d'ARNm codant pour une protéine (Rodriguez et al., 2004; Weber, 2005). Lorsqu'ils sont regroupés au même locus, ces gènes peuvent être transcrits sous la forme d'un polycistron. Par contre, les gènes dispersés correspondent à des unités de transcription indépendantes.

Chez *C. elegans*, le taux d'accumulation de différents microARN a été déterminé : il peut varier de 1000 à 50 000 molécules par cellule (Lim et al., 2003). Chez les mammifères, plusieurs centaines de gènes codant pour des miARN ont été recensés. Représentant environ 1% du génome humain, certains chercheurs prévoient que les miARN peuvent réguler l'expression de plus de 30% des gènes (Bartel, 2004).

Des travaux de l'équipe de V. Ambros ont permis l'identification des deux premiers miARN, le lin-4 et le lin-7, chez le nématode *C. elegans* (Lee and Ambros, 2001; Lee et al.,

1993). Ces derniers sont requis pour la transition temporelle des stades larvaires au cours du développement post-embryonnaire du vers en inhibant la traduction des ARNm lin-14, lin-28, lin-41 et lin-57 codant pour des gènes hétérochroniques (Banerjee and Slack, 2002; Lee and Ambros, 2001; Lee et al., 1993). Des études chez *C. elegans* ont également démontré que lin-4 pouvait se lier à plus de 7 sites dans la région 3' non traduite de l'ARNm cible de lin-14 avec une complémentarité imparfaite, bloquant ainsi sa traduction (Lee et al., 1993; Moss et al., 1997). Lin-4 inhibe la traduction d'un autre ARNm cible, soit lin-28, de façon analogue, suggérant une pluralité d'ARNm cible pour certains miARN.

Dans la grande majorité des cas, les analyses transcriptionnelles ont révélé la présence simultanée du précurseur double brin et du microARN mature simple brin, comme précédemment décrit pour lin-4 et let-7. Plusieurs microARN présentent une modification de leur taux d'accumulation en fonction du stade de développement examiné et/ou de l'organe considéré, arguments en faveur de leur implication dans les mécanismes moléculaires régissant le développement et la différenciation cellulaire (Lagos-Quintana et al., 2001). Au cours des dernières années, plusieurs démonstrations pertinentes de l'implication de ce type d'ARN dans la différenciation et la mort cellulaire ont été publiées. Au vu des profils d'expression observés et du nombre de gènes de microARN caractérisés chez les métazoaires, Bartel (2004) propose que chaque type tissulaire à un stade de développement particulier puisse avoir un pool spécifique de microARN qui réglerait le transcriptome. Outre leur rôle dans la transition des stades larvaires chez le nématode, les miARN exercent des fonctions biologiques variées d'un organisme à l'autre, et peuvent être impliqués dans le développement, l'hématopoïèse, la différenciation cellulaire, l'apoptose, l'organogénèse et la prolifération cellulaire (Bartel, 2004). Les microARN contrôlent la structure de la

chromatine, la méthylation et l'expression des gènes codant pour des facteurs de transcription.

1.2.2 MiARN et cancer. Implication dans des leucémies

Il a été montré que les miARN contribuent aussi à l'oncogenèse. La dérégulation de l'expression de certains gènes est à l'origine de l'apparition d'un grand nombre de cancers. L'implication des miARN dans les processus de l'oncogenèse est prouvée par la localisation de nombreux miARN aux sites de translocation et de délétions - deux phénomènes souvent associés aux leucémies humaines (Calin et al., 2004). L'expression altérée de certains miARN dans les tumeurs solides et les hémopathies ouvre des perspectives inédites pour la compréhension de l'oncogenèse.

Une expression anormale de miARN spécifiques à certains types tumoraux, des cancers coliques, des leucémies lymphoïdes chroniques et des lymphomes à cellules B a été rapportée par Eis *et al.* (2005)

Il est connu que plusieurs tumeurs humaines se caractérisent par une amplification de la région 13q31-32: c'est le cas des lymphomes diffus à grandes cellules B, des lymphomes folliculaires, du lymphome du manteau et des lymphomes cutanés à grandes cellules B. Dans «l'épicentre» de l'amplicon se distinguent deux gènes annotés C13orf25 et Glypican-5 (GPC5) (Ota et al., 2004). Les études de l'équipe de Scott Hammond ont montré que C13orf25 est apparu comme un marqueur candidat de cet amplicon associé à la transformation (He et al., 2005). Le transcrit C13orf25 apparaît comme le précurseur fonctionnel d'une série composée de sept miARN : miR17-5p, miR17-3p, miR18, miR19,

miR20, miR19b-1 et miR92-1. Une comparaison du locus humain et de son orthologue murin a révélé une conservation de séquence restreinte au polycistron miR17-92 et à ses séquences flanquantes immédiates.

Les expériences ont permis d'identifier six miARN dont le haut niveau d'expression était corrélé à l'accroissement du dosage génique de C13orf25. L'expression du miARN mature miR17-92 dans 46 lymphomes était significativement supérieure (cinq fois de plus) à celle des tissus normaux dans 65 % des cas. Il a été aussi montré que ce groupe de miARN était capable de moduler la tumorigénèse dans les modèles animaux. Leur implication dans la détermination du lignage et la perte de prolifération lors du développement, leur localisation aux sites fragiles du génome soulignent le rôle important de miARN dans la cancérogenèse. Mais il reste encore beaucoup à faire pour comprendre leur régulation, leur rôle biologique et établir leur champ d'application en clinique.

1.3 LOCUS KIS2: SUREXPRESSION DANS LES TUMEURS PROVOQUÉS PAR L'INTÉGRATION RÉTROVIRALE

Une étude réalisée dans le Laboratoire de Biologie moléculaire de l'UQAM a révélé l'implication de miARN dans la leucémie de la cellule T chez la souris. Le rétrovirus RadLV (Radiation Leukemia Virus) provoquant la leucémie de type T a été utilisé comme outil dans le recherche de nouveaux oncogènes. Un nouveau site commun d'intégration de RadLV a été localisé sur le chromosome X de souris, ainsi que la surexpression d'un gène inconnu situé à

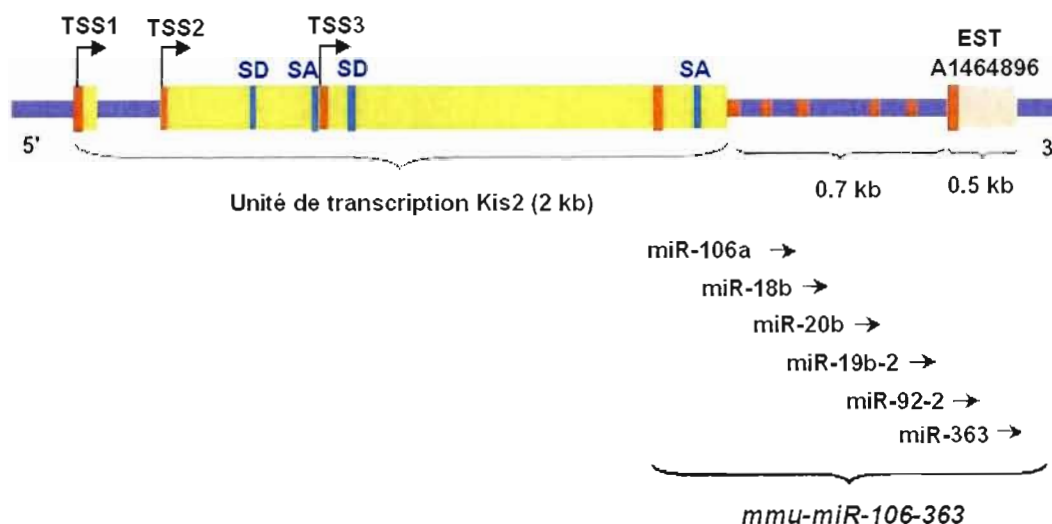


Figure 1.3.1 Situation des miARN du groupe miR-106-363 dans la région Kis2. (Extrait de Landais, thèse de doctorat, 2007)

Les traits rouges correspondent à une zone conservée entre souris, rat et humain. La zone conservée en 3' du gène Kis2 correspond à un miARN du groupe miR-106-363. Les traits bleus correspondent aux sites donneurs (SD) et sites accepteurs (SA) d'épissage du gène Kis2. La partie en jaune (et à partir de TSS2) correspond à la portion du pri-miARN de miR-106-363 visible en Northern blot.

proximité de ce site dans les tumeurs réarrangées (Landais et al., 2005). Le nouveau gène a été appelé Kis2, il contient trois sites différents d'initiation de la transcription (TSS) et produit 5 espèces d'ARN matures surexprimés dans plusieurs tumeurs (fig. 1.3.1, 1.3.2). Ces ARN ne possèdent pas de cadre de lecture susceptible de coder pour des protéines et appartiennent à la famille des ARN non codant. La production des différents transcrits Kis2 résulte de l'utilisation des différents sites d'épissage, contrôlée par des protéines régulatrices (Landais, thèse, 2007).

Plus tard, suite à la mise à jour des bases de données des miARN, notre équipe a découvert qu'un groupe de six miARN (miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-92-2 et miR-363) se trouve directement en 3' du gène Kis2. D'une façon intéressante, ce groupe est très

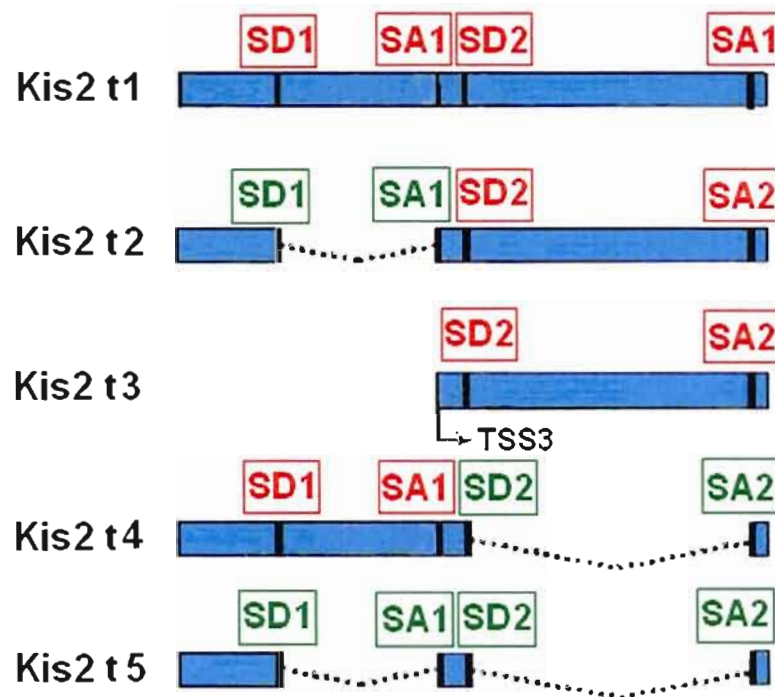


Figure 1.3.2. Utilisation de différents sites d'épissage est à l'origine des cinq transcrits Kis2. (Tirée de Landais, thèse de doctorat, 2007).

Les différents transcrits Kis2 résultent d'un ensemble d'inhibition (en rouge) et d'activation (vert) des sites donneurs (SD) et accepteurs (SA) d'épissage

homologue au groupe miR-17-92 trouvé sur le chromosome 14 de souris, qui a été impliqué dans la leucémie de cellules B (He et al., 2005).

Il a été observé que miR-92-2 et miR-19b-2 de notre groupe des miARN (miR-106a-363) sont identiques aux miR-92-1 et miR-19-1 du groupe miR-17-92. MiR-106a, miR-20b, et miR-18b de notre groupe révèlent une haute homologie avec miR-17-5p, miR-20a et miR-18a du groupe miR-17-92, mais ils ne sont pas identiques et sont ainsi spécifiques à notre groupe miR-106a-363.

Il faut noter que le niveau d'expression n'est pas équivalent pour chacun des miARN de ce groupe. Dans les tumeurs provoquées par RadLV, les miR-106a, miR-19b-2 miR-92-2 sont surexprimés, tandis que le signal de miR-20b est plus faible. Aucun signal n'a été observé pour miR-18b et miR-363 (Landais et al., 2007).

Les données publiées en 2007 accentuent l'importance du groupe miR-106a-363 dans la leucémie. Cette étude fournit trois nouveaux gènes-candidats possédant le potentiel de suppresseur de tumeurs, qui devraient être considérés comme les cibles du groupe miR-106a-363 ainsi que son homologue miR-17-92. Il est révélé que Mylip (*Myosin regulatory Light chain Interacting Protein*), Hipk3 (*Homeodomain Interacting Protein Kinase 3*) et Rbpl-like (*Retinoblastoma-Binding Protein 1-like*) sont ciblés par le groupe miR-106a-363 dans les tumeurs montrant sa surexpression (Landais et al., 2007).

La question la plus intrigante et la plus difficile à investiguer dans cette étude, c'est l'existence et la fonction des cinq transcrits du gène Kis2. En combinant des approches expérimentales et bioinformatiques, l'hypothèse suivante a été émise: les différents transcrits Kis2 pourront être à la base de régulation post-transcriptionnelle de la production des miARN. Les expériences réalisées *in vitro* ont révélé que les protéines hnRNP A2/B1, hnRNP A3, PTB et KSRP étant impliquées dans la régulation de l'épissage des ARNm interagissent avec des pri-miARN de miR-106-363 (Landais, thèse de doctorat, 2007). La partie de l'étude réalisée *in vivo* pourrait aider à établir le lien de la régulation post-transcriptionnelle via l'épissage des pri-miARN du groupe miR-106-363 et leur potentiel oncogénique.

1.4 VECTEURS POUR EXPRESSION DES miARN

Pour étudier des miARN *in vivo*, quelques stratégies furent élaborées au cours des dernières années. Le clonage des miARN a été une des approches les plus fructueuses. La majorité des articles publiés sur les systèmes d'expression décrivent les vecteurs optimisés pour l'expression d'un seul miARN synthétique résultant dans le *silencing* des gènes par les ARNi.

Plusieurs groupes ont axé leurs recherches sur la conception de nouveaux types de vecteurs en permettant une expression plus longue des miARN. Ces nouveaux vecteurs permettent l'expression intracellulaire des siARN en utilisant des promoteurs contrôlés par l'ARN polymérase III. Celle-ci transcrit normalement les petits ARN essentiels non codants, comme les ARN de transfert ou l'ARN ribosomique 5S, qui ne sont ni coiffés en 5', ni polyadénylés en 3'. L'ARN polymérase III a l'avantage d'initier la transcription à partir d'un nucléotide défini. De plus, elle arrête la transcription après le second nucléotide quand elle rencontre une suite de 4 à 5 thymidines. L'utilisation d'un promoteur contrôlé par la polymérase III permet donc la synthèse de miARN de taille spécifique et possédant des extrémités 3' débordant nécessaires à la reconnaissance par le complexe RISC. C'est le cas du vecteur pSuper sous le contrôle du promoteur H1 (Brummelkamp *et al.*, 2002) ou des vecteurs contrôlés par le promoteur U6 (Yu *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Miyagishi et Taira, 2002)

Un autre type de vecteur permet la synthèse intracellulaire des miARN. Ce sont les vecteurs viraux dont l'ADN peut être encapsidé dans des molécules virales qui vont infecter

les cellules hôtes. L'infection des cellules hôtes par les particules virales fait pénétrer le vecteur miARN de façon très efficace et conduit à l'intégration de sa cassette dans le génome cellulaire. Ces vecteurs sont particulièrement adaptés dans le cas des cellules ou des tissus difficilement transfectables. Les rétrovirus et les virus AAV ont déjà été utilisés pour administrer efficacement les miARN (Brummelkamp et al., 2002; Devroe et Silver, 2002). D'autres vecteurs viraux comme l'adénovirus ou le lentivirus ont été adaptés pour l'expression intracellulaire des miARN (Shen et al., 2003; Robinson et al., 2003).

La découverte des miARN provenant des introns a inspiré le groupe de Shi-Lung Lin qui a élaboré un nouveau vecteur pour l'expression des siARN. Ils ont effectué l'insertion de la structure d'épingle-à-cheveux dans un intron du gène synthétique du vecteur d'expression. Le miARN a été transcrit par l'ARN polymérase II comme la partie de l'ARN messenger. Ils ont montré l'excision-épissage de ce transcrit par les mécanismes d'épissage et de maturation d'ARN (Ying et Lin., 2004). En conjuguant cette structure et le système de transfection rétroviral, ils ont généré des modèles animaux transgéniques pour la recherche de gènes ciblés par les miARN.

1.5 VECTEURS D'EXPRESSION À BASE DE RÉTROVIRUS

Les rétrovirus sont des virus à ARN monocaténaire, de polarité positive, infectant les vertébrés. Ils se distinguent notamment par la présence d'une enzyme virale, la transcriptase reverse (TR), qui convertit leur génome d'ARN en ADN pour être intégré par la suite dans le génome de la cellule.

Les vecteurs rétroviraux dérivés du virus Moloney de la leucémie murine (MoMLV) ont été utilisé pour délivrer des gènes depuis plus de 20 ans et ils continuent d'être le meilleur outil disponible pour transférer de façon stable et efficace des gènes dans différents types de cellules produisant des effets à long terme.

Les systèmes d'expression rétroviraux comportent le vecteur et la lignée cellulaire d'encapsulation. Dans le vecteur (ADN proviral) les gènes codant pour les protéines structurales des rétrovirus (*gag*, *pol*, *env*) sont remplacés par d'autres gènes: ce sont souvent des marqueurs de sélection (résistance aux antibiotiques) ou encore des traceurs (β -galactosidases ou protéines fluorescentes). La formation des particules rétrovirales se produit par la suite dans les cellules portant les gènes *gag*, *pol*, *env* dans leur génome.

L'avantage majeur des systèmes rétroviraux est la transmission stable de la séquence intégrée à travers la division cellulaire. Cela nous assure que, dans le cas des cellules ayant plusieurs étapes de maturation indépendantes comme les cellules hématopoïétiques, la construction rétrovirale se conservera et continuera son expression. Un autre avantage est l'efficacité de transfert de gènes. Hwang et al. démontrent que les gènes introduits dans les cellules via une infection rétrovirale avaient une expression 10-fois plus élevée par rapport à la transfection (Hwang et Gilboa, 1984).

Les vecteurs rétroviraux possèdent certains avantages qui leur ont permis de devenir un outil principal du transfert des gènes pour la thérapie génique. En même temps, ils ont quelques inconvénients (tableau 1.5.1).

Tableau 1.5.1 Avantages et désavantages des systèmes d'expression rétroviraux

Avantages	Désavantages
• Intégration dans la cellule hôte • Expression de longue durée • Efficacité très élevée	• Infection seulement des cellules se divisant rapidement (ex. les cellules cancéreuses)
Flexibilité génétique	La taille de l'insert est restreinte à 8 000 pb
• Pas de toxicité pour la cellule hôte • Pas d'induction de forte réponse du système immunitaire	Intégration pourrait interrompre l'expression des gènes des cellules hôtes ou induire l'expression de proto-oncogène
Grande variété de cellules cibles	Suppression de l'expression des transgènes in vivo causée par l'inactivation des promoteurs rétroviraux par l'interféron α et γ .

L'expression du transgène dans les cellules infectées à partir d'un vecteur de la leucémie murine peut être assurée par différents promoteurs. Le transgène peut être placé uniquement sous contrôle du promoteur situé dans la région U3 du LTR. Un promoteur interne comme le promoteur du cytomégalo virus (CMV) peut être ajouté en amont du transgène. Dans ce cas, il est préférable, pour augmenter l'expression, d'amputer la région U3 afin d'éliminer le phénomène de compétition ou interférence entre le promoteur endogène du LTR et le

promoteur interne. Pour un suivi plus aisé de l'expression du vecteur, un gène rapporteur est souvent introduit dans le vecteur.

Récemment le groupe de recherche de S. Hammond a démontré la possibilité d'expression du groupe des miARN à l'aide d'un vecteur rétroviral. Ils ont généré le plasmide contenant la cassette PIG (puro-IRES-GFP) dans le vecteur pMSCV (dérivé de *Murine Embryonic Stem Cell Virus*). Le groupe des six miARN est exprimé sous le contrôle du 5'LTR (fig.1.5.1).

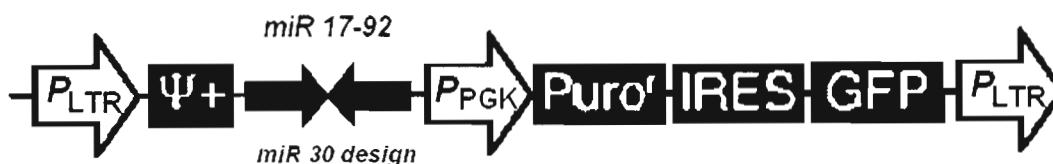


Figure 1.5.1. Construction du vecteur rétroviral pour l'expression du groupe des miARN miR 17-92. (Extrait de He et al., 2005).

Séquence codant pour le groupe miR-17-92 est exprimée sous le promoteur de 5'LTR; la cassette PIG contenant le gène-rapporteur (GFP) et le gène de sélection (résistance à la puromycine) est exprimée sous le promoteur de phosphoglycerol kinase.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'ADNc a été obtenu à partir de l'ARN extrait des lymphomes de type T de souris infectées avec le virus RadLV. Les séquences d'ADN complémentaire des transcrits du gène *Kis2* surexprimé dans certaines tumeurs ont été amplifiées par RT-PCR et ensuite clonées dans le vecteur pCMV5. Ces séquences ont été ensuite sous-clonées dans les constructions rétrovirales afin de produire les particules rétrovirales à l'aide d'une lignée d'encapsidation Phoenix.

2.1 LIGNÉES CELLULAIRES

2.1.1 Lignée d'encapsidation Phoenix

La lignée Phoenix représente la deuxième génération des cellules productrices basée sur la lignée 293T qui a été créée dans le Laboratoire de Garry Nolan (Stanford University) afin de minimiser le risque des recombinaisons indésirables menant à l'apparition de virus-«helper» compétent pour la réplication. Le système de complémentation utilisé pour la production des rétrovirus conduit à la formation de pseudotypes exprimant des protéines d'enveloppe virale comme l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (glycoprotéine G) ou l'enveloppe du virus de la leucémie du gibbon.

La lignée Phoenix est capable de maintenir des épisomes pour la production de rétrovirus de manière stable et prolongée. Elle permet la production du virus en aussi peu que 3 jours.

En utilisant une infection rétrovirale standard en présence de Polybrène, le titre viral est estimé à environ 10^7 virus par ml (<http://www.stanford.edu/group/nolan/index.html>).

2.1.2 Lignée NIH 3T3

Les cellules NIH 3T3 sont des fibroblastes embryonnaires murins (Shih *et al.* 1979). Cette lignée est sensible à l'inhibition par contact, propriété qui les rend utile pour les études de transformation cellulaire. Elles sont maintenues dans un milieu DMEM complété avec 10 % de sérum de veau (FBS, *fetal bovine serum*), de la L-glutamine (1%) et des antibiotiques (pénicilline G et streptomycine, 1%).

2.1.3 Lignée Ti6

C'est une lignée cellulaire issue d'un lymphome de type T (*thymic lymphoma cell line*) établie par l'équipe de P. Jolicoeur (Rassart, 1988). Elles sont maintenues dans un milieu RPMI avec 10% de sérum de veau (FBS), de la L-glutamine (1%) et des antibiotiques (pénicilline G/streptomycine, 1%).

2.2 VECTEURS RÉTROVIRAUX ET CONSTRUCTIONS

2.2.1 pMSCV et pMSCV-Kis2

Le vecteur de base pMSCVneo a été dérivé de MESV (*Murine Embryonic Stem Cell Virus*) et du vecteur rétroviral LN (Hawley *et al.*, 1994). Une fois transfecté dans la lignée d'encapsulation, pMSCVneo exprime le transcrit contenant le signal d'encapsulation Ψ^+ , le gène de résistance à la néomycine et le gène d'intérêt. Le vecteur permet l'expression stable

Les LTR proviennent du virus murin PCMV (PCC4 *cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus*) et diffèrent du LTR de MoMuLV par plusieurs mutations ponctuelles et une délétion.

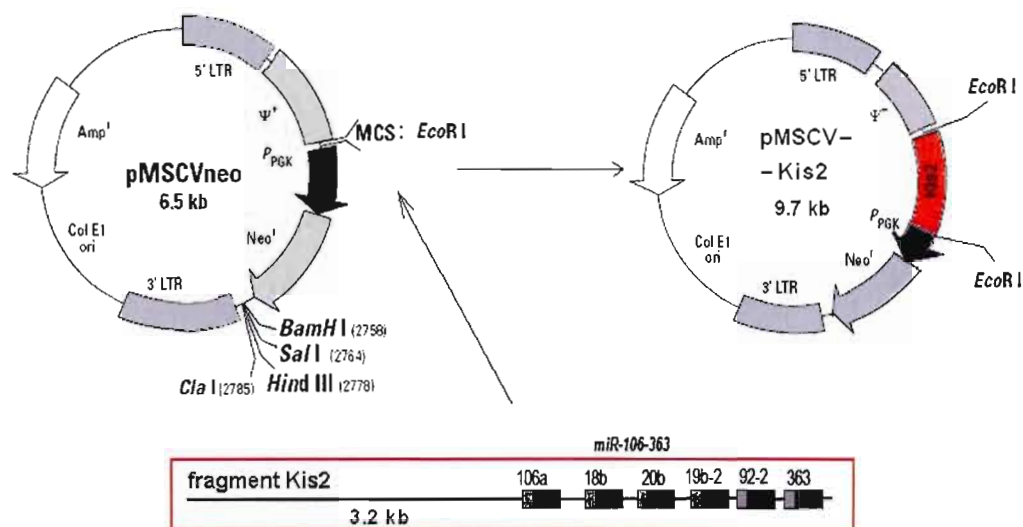


Figure 2.2.1 Construction du plasmide recombinant pMSCV-Kis2: insertion du fragment Kis2 (3,2 kpb) (représenté en rouge) dans le site EcoRI du vecteur pMSCV.

Le gène d'intérêt peut être cloné dans le site multiple du clonage en aval de ses LTR (fig. 2.2.1).

Le promoteur murin de la *phosphoglycérol kinase* (PGK) contrôle l'expression du gène de résistance à la néomycine (Neo^r) pour la sélection dans les cellules eucaryotes. pMSCVneo contient une origine de répllication de *E. coli* et le gène Amp^r pour la propagation et la sélection de la résistance à l'antibiotique dans des bactéries.

Le plasmide recombinant pMSCV-Kis2 a été généré par insertion de la séquence d'ADNc du gène Kis2 dans le site EcoRI du site du clonage multiple du vecteur de base pMSCV (fig.2.2.1).

2.2.2 pLXSN et pLXSN-Kis2

Le plasmide de base pLXSN contient des éléments dérivés du virus leucémogène murin de Moloney (MoMuLV) et du virus du sarcome murin de Moloney (MoMuSV) (Miller et Rosman, 1989). Une fois transfecté dans la lignée d'encapsidation, pLXSN peut s'exprimer de façon transitoire ou s'intégrer et exprimer de façon stable le transcrit contenant le signal d'encapsidation Ψ^+ , le gène d'intérêt et le marqueur sélectif (gène de résistance à la néomycine). Le 5'LTR viral de ce vecteur contient les séquences du promoteur qui contrôlent l'expression du gène d'intérêt inséré dans le site multiple de clonage. Le promoteur SV40 «early» (P_{SV40e}) contrôle l'expression du gène de résistance à la néomycine (Neo^r) permettant la sélection dans des cellules eucaryotes. Le vecteur pLXSN possède aussi une origine de réplication de *E. coli* et le gène de Amp^r pour la propagation et la sélection dans des bactéries.

Comme une partie du système d'expression pLXSN peut être transfecté dans la lignée d'encapsidation (lignée Phœnix dans notre cas), l'ARN provenant du vecteur, une fois dans les cellules, sera encapsidé dans des particules rétrovirales infectieuses incompetentes pour la réplication.

Le plasmide recombinant pLXSN-Kis2 a été généré par l'insertion de la séquence d'ADNc du gène Kis2 dans le site EcoRI du site du clonage multiple du vecteur pLXSN (fig. 2.2.2).

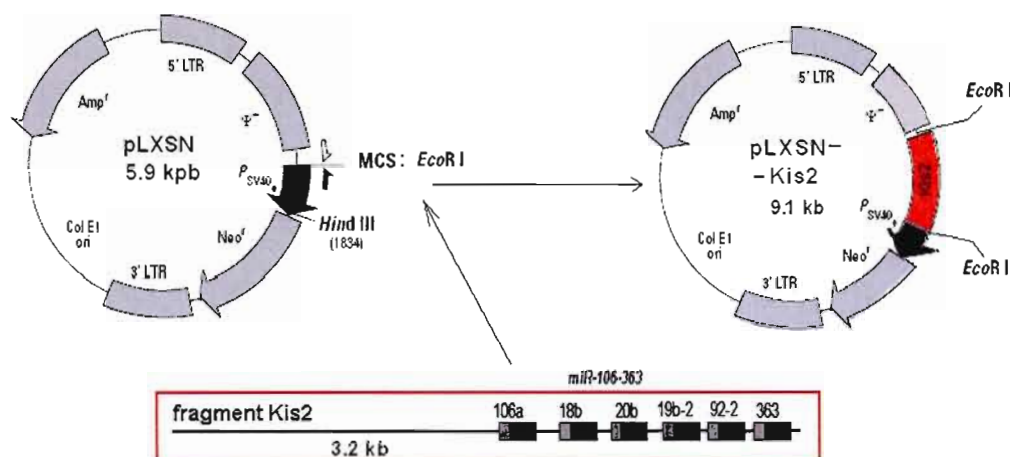


Figure 2.2.2 Construction du plasmide recombinant pLXSN-Kis2: insertion du fragment Kis2 (3,2 kpb) (représenté en rouge) dans le site EcoRI du vecteur pLXSN.

2.2.3 pLNSX et pLNSX-Kis2miR

Le vecteur de base pLNSX contient le gène de résistance à la néomycine (Neo^r) (marqueur sélectif) sous le contrôle de 5'LTR. Le site de clonage multiple comporte les sites uniques pour StuI, HindIII et ClaI permettant l'insertion de l'ADNc en aval du promoteur SV40. Le vecteur ne contient pas de séquences *env*, et un codon ATG du gène *gag* a été changé pour un codon TAG (Miller et Rosman, 1989).

Le plasmide pLNSX-Kis2miRs a été produit par l'insertion de la séquence d'ADNc du groupe miR-106-363 dans les sites StuI et Hind III (fig. 2.2.3).

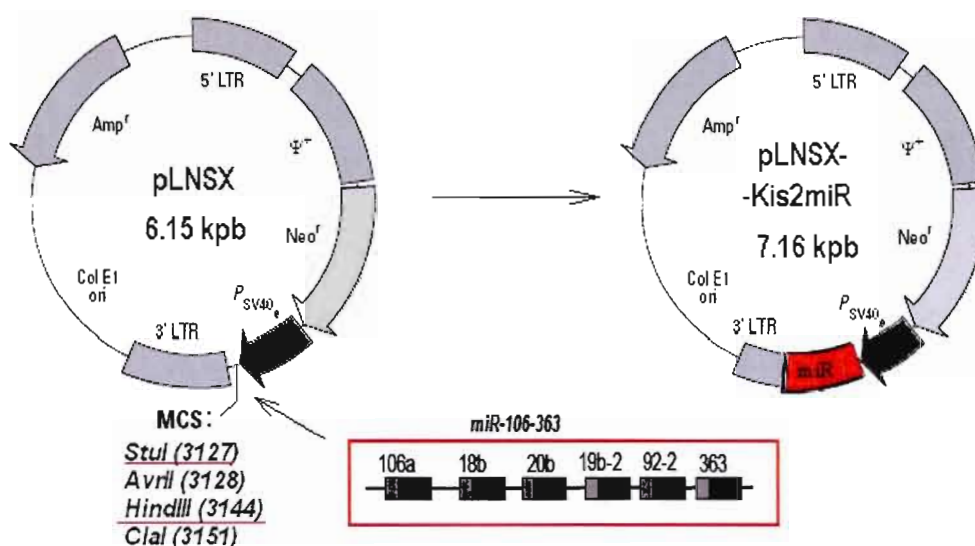


Figure 2.2.3 Construction du plasmide recombinant pLNSX-Kis2miR: insertion du fragment Kis2miR (1 kpb) (représenté en rouge) dans le site EcoRI du vecteur pLNSX.

2.3 PRÉPARATION DU VECTEUR

Le kit de Qiagen «QIAGEN~Plasmid Maxi Kit» a été utilisé pour la préparation du vecteur suivi de la digestion par les enzymes de restriction appropriées (NEB) selon les recommandations du fournisseur. Le vecteur digéré ayant des extrémités collantes compatibles a été traité à la phosphatase alcaline (Roche) pour empêcher sa refermeture. La digestion a été vérifiée par séparation des bandes sur le gel d'agarose 1% à 100 volts et coloration au bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). Le marqueur de poids moléculaire était l'ADN du phage λ digéré par HindIII.

L'extraction des fragments d'ADN du gel d'agarose a été effectuée en suivant le protocole du «QIAquick Gel Extraction Kit» de QIAGEN.

2.4 PRÉPARATION DE L'INSERT

Le fragment Kis2 (3,2 kpb) a été préparé en digérant le plasmide pCMV5-Kis2 avec l'enzyme de restriction EcoRI (NEB) suivant la séparation par migration sur gel d'agarose 1% et élution du gel avec le «*Qiagen PCR purification kit*» (Qiagen).

Le fragment Kis2miR a été amplifié par PCR en utilisant le «*Phusion high fidelity PCR kit*» à partir du fragment Kis2 suivant les instructions du fournisseur. Les amorces miR-106-363-sense (5'GCTCTAGAATCCACTCCAAATGTGTTCAAAGCAATGACTA 3') et l'amorce 3 (5'CAGACTTATATATCAGCTTTATTTTG 3') ont été utilisés à une concentration de 20 pmol par réaction. L'amplification a été réalisée à 58°C. L'ADN amplifié a été purifié avec le «*Qiagen PCR purification kit*» (Qiagen) et vérifié sur le gel d'agarose 1%.

2.5 LIGATION

La ligation du vecteur et de l'insert a été catalysée par l'ADN ligase du phage T4 (NEB) pendant 16-20 h à 16°C dans le tampon fourni avec l'enzyme.

2.6 TRANSFORMATION DE BACTÉRIES COMPÉTENTES *ESCHERICHIA COLI* PAR LES PRODUITS DE LIGATION

Pour l'amplification des produits de ligation, des bactéries compétentes *Escherichia coli* de la souche DH5α ont été utilisées. 10 µl de produit de ligation et 100 µl de bactéries sont mélangés et incubés pendant 15 minutes dans la glace. Le choc thermique pendant 30 secondes à 42°C sert à augmenter la perméabilité de la membrane bactérienne et permet au

plasmide de pénétrer dans les bactéries. Ensuite, le tube est remis sur la glace pour 5 minutes. Le mélange est ajouté à 500 µl du milieu LB, placé pendant 1 h à 37°C sous agitation, et 100-200 µl sont ensuite étalés sur des Pétris (LB-agar additionné de 50 µg/ml d'ampicilline) afin de sélectionner les colonies transformées par le plasmide recombinant.

2.7. PRÉPARATION DE PETITES QUANTITÉS D'ADN (MINI-PREP)

La procédure de mini-prep (lyse alcaline) est utilisée pour des volumes de culture de 1,5 - 2 ml afin d'obtenir de petites quantités d'ADN pour l'analyse des clones recombinants portant les constructions d'intérêt (Maniatis et al., 1982)

2.8. PRODUCTION DES RÉTROVIRUS RECOMBINANTS

2.8.1 Transfection d'ADN

Les constructions d'ADN ont été transfectées dans les cellules Phoenix (70-80 % de confluence) avec du PolyFect (Qiagen) suivant le protocole du fournisseur. Le milieu de culture contenant les particules rétrovirales a été purifié des débris cellulaires par la centrifugation (200 g, 5 minutes) 48 heures suivant la transfection et conservés à -80°C.

2.8.2 Titration du virus

Pour la titration du virus, les cellules NIH 3T3 ont été utilisées. Elles ont étéensemencées à 200,000 cellules par pétri de 6 cm de diamètre et ont été infectées par différentes dilutions du surnageant dans un volume total de 200 µl contenant 5 µg/ml de Polybrène. Après 2

heures d'incubation avec agitation, du milieu de culture frais a été ajouté et l'incubation est poursuivie pendant 48 heures. Ensuite, la néomycine à une concentration de 400 µg/ml a été ajoutée pour la sélection. Le titre infectieux a été déterminé 3 semaines plus tard en comptant les colonies résistantes à la néomycine.

Titre infectieux = N de colonies × Facteur de dilution/ml.

2.9 INFECTION DES CELLULES

Pour réaliser l'infection avec des particules rétrovirales recombinantes, les cellules ont été sensibilisées avec le Polybrène (5 µg/ml pour les NIH 3T3, 2 µg/ml pour les Ti6) ajouté la veille au milieu de culture (Rassart, 1988). Le lendemain, le milieu a été aspiré et les cellules ont été incubées en présence de 0,2 ml de surnageants rétroviraux. Après 2 heures, du milieu frais (DMEM pour les NIH 3T3 ou RPMI pour les Ti6) a été ajouté. Le milieu a été changé 24 heures plus tard, et après encore 24 heures une solution de G-418 (400 µg/ml) a été ajoutée pour la sélection.

2.10 DÉTECTION DES TRANSCRITS KIS2 PAR RT-PCR

Pour étudier le profil d'expression du gène Kis2, nous avons réalisé la RT-PCR sur des ARN totaux. Les ARN sont extraits avec du Trizol, traités à l'ADNase, dosés et congelés à -80°C. L'ADNc a été synthétisé à partir de 0,5µg d'ARN total avec la transcriptase inverse (RT) (Omniscript, Qiagen) selon le protocole fourni.

Tableau 2.10.1 Amorces pour la détection des transcrits Kis2

Nom	Séquence
Oligo 733 (sense)	5'CGG AAT TCG TGA GTC TGC AGA TCT GGC A 3'
Oligo 3 (anti-sense)	5'CAG ACT TAT ATA TCA GCT TTA TTT TG 3'
Oligo 800 (anti-sense)	5'GCT CTA GAA TCC ACT CCA AAT GTG TTC AAA GCA ATG ACT A 3'
Oligo is4bis (sense)	5'ATC GGG CTT TGG GAC GCA GCT CGA G 3'
Oligo B (anti-sense)	5'GAC ATG GCC AAG GCA TAC TCC AGG AGT GTA ACC 3'
Actine-sense	5'CTA GAA GCA CTT GCG GTG CAC GAT GGA GGG 3'
Actine-anti-sense	5'GAC GGG GTC ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3'

La réaction a été réalisée dans un volume total de 20µl contenant 10 pmol de l'amorce B (5'GAC ATG GCC AAG GCA TAC TCC AGG AGT GTA ACC 3'), ou 5 pmol de l'amorce pour l'actine (utilisé comme contrôle) (5'GACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA 3'). La PCR a été réalisée avec 9µl du mélange de la réaction RT afin d'amplifier le gène Kis2 et avec 2µl de la même réaction RT pour l'amplification de l'actine. La séquence des amorces pour l'actine est 5'CTA GAA GCA CTT GCG GTG CAC GAT GGA GGG 3' (sense), 5'GAC GGG GTC ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA 3' (anti-sense), pour Kis2 – 5'ATC GGG CTT TGG GAC GCA GCT CGA G 3' (is4bis, sense), 5'CAG ACT TAT ATA TCA GCT TTA TTT TG 3' (oligo 3, anti-sense). Le programme PCR a consisté en cycles suivants: 94°C 2 min, 35 cycles à 94°C 30 sec, 53°C 30 sec, 72°C 30 sec suivi par 10

min à 72°C. La réaction de PCR a été faite dans un volume final de 50 µl à partir de 50-150 ng d'ADNc en utilisant la Taq DNA Polymérase pour l'amplification. Le protocole fourni par la compagnie a été utilisé.

La PCR nichée a été réalisée avec des amorces 5'ATC GGG CTT TGG GAC GCA GCT CGA G 3' (is4bis, sense) et GCT CTA GAA TCC ACT CCA AAT GTG TTC AAA GCA ATG ACT A (oligo 800, anti-sense) et le programme de 94°C 2 min, 25 cycles à 94°C 30 sec, 53°C 30 sec, 72°C 30 sec suivi par 10 min à 72°C.

2.11 DÉTECTION DE L'EXPRESSION DES miARN PAR NORTHERN BLOT

2.11.1 Électrophorèse

L'électrophorèse pour la séparation des miARN a été réalisée sur le gel de 12.5% polyacrilamide/8M urée. Les ARN totaux (15 µg) ont été chargés pour une migration de 2 heures à 250 volts. La bande correspondant à miARN se trouvait à mi-distance (entre bromophenol bleu et XC (xylène cyanol)).

2.11.2 Transfert

Le transfert d'ARN a été effectué durant 1 heure à 80 volts dans le tampon TBE 1/2x sur une membrane de nylon (Osmonics) à la température de pièce à l'aide de l'appareil Transblot semi-dry (BioRad). Les ARN ont été fixés sur la membrane aux UV (120 mJoules) puis incubés 1 heure à 80°C.

2.11.3 Préparation de la sonde pour miARN

Les sondes pour la détection des miARN ont été synthétisées par phosphorylation des amorces oligonucléotidiques complémentaires des miARN (tabl. 2.11.1) par 10 unités de T4

polynucléotide kinase en présence de 2 μ l de tampon de T4 polynucléotide kinase et de 5 μ Ci de γ -32P-dCTP, dans un volume réactionnel de 20 μ l.

Le marquage a été effectué pendant 1 h à 37°C, et la sonde marquée a été purifiée sur une colonne Sephadex-G25 (Amersham) avant d'être dénaturée et incorporée au tampon d'hybridation.

Tableau 2.11.1 Sondes pour la détection des miARN

Nom	Séquence
miR-106a	5'TACCTGCACTGTTAGCACTTTG 3'
miR-18	5'TAACAGCACTAGATGCACATTA 3'
miR-20	5'TACCTGCACTATGAGCACTTTG 3'
miR-19	5'TCAGTTTTGCATGGATTTGCACA 3'
miR-92	5'CAGGCCGGGACAAGTGCAATA 3'
miR-363	5'TTACAGATGGATAACCGTGCAAT 3'
5.8S	5'GCGTTGTTCATCGATGC 3'

2.11.4 Hybridation radioactive

L'hybridation de la sonde avec les miARN fixés sur la membrane a été réalisée à 42°C dans un tampon contenant 7% SDS, 0.2 M Na₂PO₄, pH 7 pendant la nuit. La membrane a été lavée trois fois dans une solution de SSPE 2x, 0.1% SDS, ensuite exposée à un film et développée à l'aide de PhosphorImager (BioRad).

2.12 TEST DE POUVOIR TRANSFORMANT DU GROUPE miR-106-363: PERTE D'ANCRAGE

Les cellules cancéreuses peuvent se diviser sans s'attacher à une surface solide (perte de la dépendance d'ancrage) et poussent dans des milieux semi-solides tels que l'agar mou.

Le milieu sous forme de deux couches d'agar: de 0,6% la première et de 0,3% la deuxième, a été coulé dans des plaques de 6 puits pour la culture semi-solide (Costar). L'agar a été préparé avec du DMEM. Nous avons coulé la première couche d'agar à 0,6% dans la plaque de culture, puis ajouté un mélange de 10^4 cellules NIH/3T3 et de 0,3% agar sur la première couche. Cette dernière a été couverte par 1,5 ml du DMEM contenant du G418 (changé aux 3 jours). Après 3 semaines, nous avons compté et photographié les colonies. Cellules représentant contrôle négatif, NIH3T3 non transfectées et non infectées, ont été incubé en milieu sans G418.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1. CLONAGE DES FRAGMENTS CONTENANT LE LOCUS miR-106-363 (3.2 kb ET 1.04 kb) DANS LES VECTEURS RÉTROVIRAUX

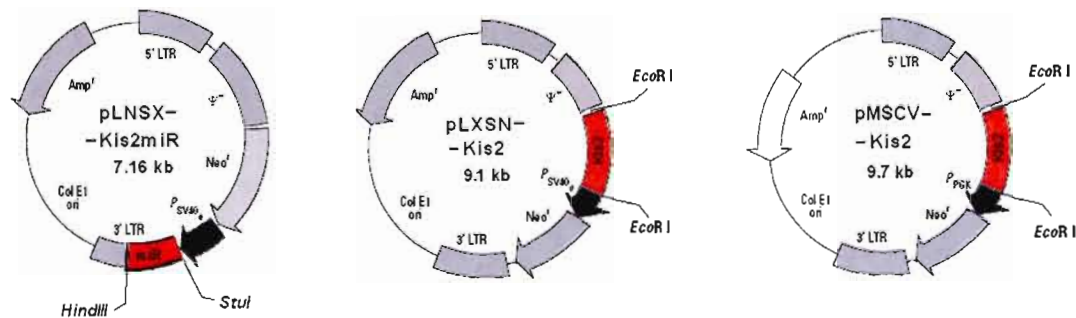


Fig. 3.1.1 Clonage des fragments contenant le locus miR 106-363 dans les vecteurs rétroviraux

Pour générer des constructions permettant l'expression du locus miR 106-363 nous avons choisi trois vecteurs rétroviraux: pMSCV, pLXSN et pLNSX en fonction de données de la littérature et de leur disponibilité. La construction à base de pMSCV a été utilisée pour l'expression du groupe miR17 – 92 (travail de l'équipe de S.Hammond), pLXSN a été employé pour élaborer un système rétroviral codant pour des shARN placés sous le contrôle des promoteurs U6 et H1 (*convergent U6/H1 expression cassette*) et dirigés contre le gène p53 (Lai et al., 2009). Le vecteur pLNSX n'a été jamais utilisé pour l'expression de miARN.

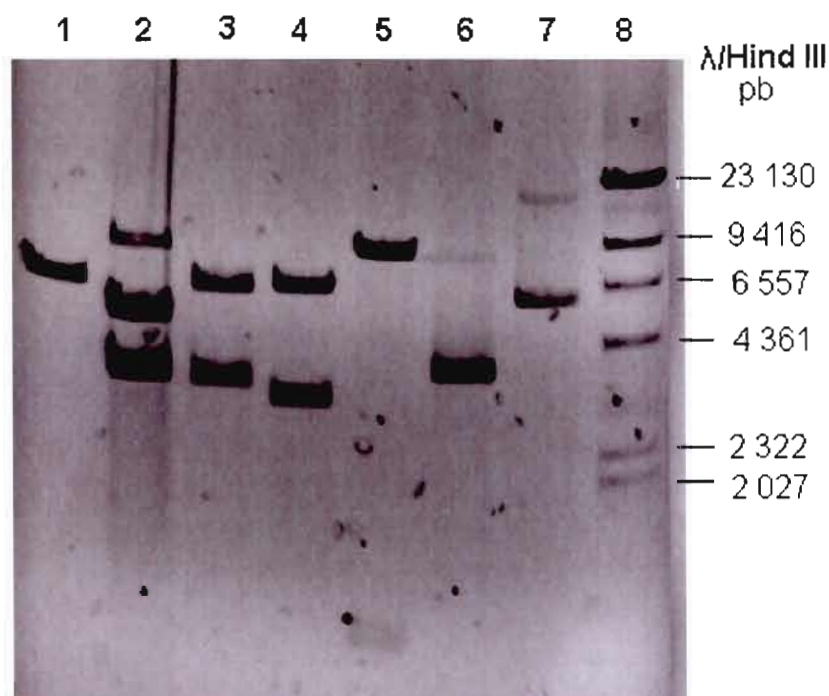


Figure 3.1.2 Analyse du plasmide recombinant pLXSN-Kis2 par les enzymes de restriction. 1 – pLXSN, vecteur vide, linéarisé par EcoRI; 2 – la source de l'insert, plasmide pCMV5-Kis2, digéré par EcoRI; 3 – plasmide recombinant, pLXSN -Kis2, digéré par EcoRI: en bas se trouve l'insert Kis2, en haut – vecteur pLXSN (5,9 kpb); 4 - pLXSN-Kis2 digéré par Hind III (2 sites de restriction); 5 - pLXSN-Kis2 linéarisé par BamHI (un site de restriction se trouve dans l'insert Kis2 et un site – dans le *polylinker* du vecteur); 6 – pLXSN non digéré, 7 - pLXSN-Kis2 non digéré; 8 - marqueur du poids moléculaire, l'ADN du phage λ digéré par Hind III.

Nous avons choisi deux fragments contenant le locus miR 106-363 pour les cloner dans les vecteurs rétroviraux. Le premier, Kis2 (3.2 kb), représente la séquence d'ADNc du plus grand transcrit du gène Kis2, cloné dans le vecteur pCMV5. Nous avons sous-cloné Kis2 dans le site EcoRI des vecteurs pMSCV et pLXSN pour obtenir les constructions pMSCV-Kis2 et pLXSN-Kis2. La sélection des clones portant le fragment Kis2 dans la bonne orientation a été faite selon l'analyse par les enzymes de restriction (fig. 3.1.2, 3.1.3).

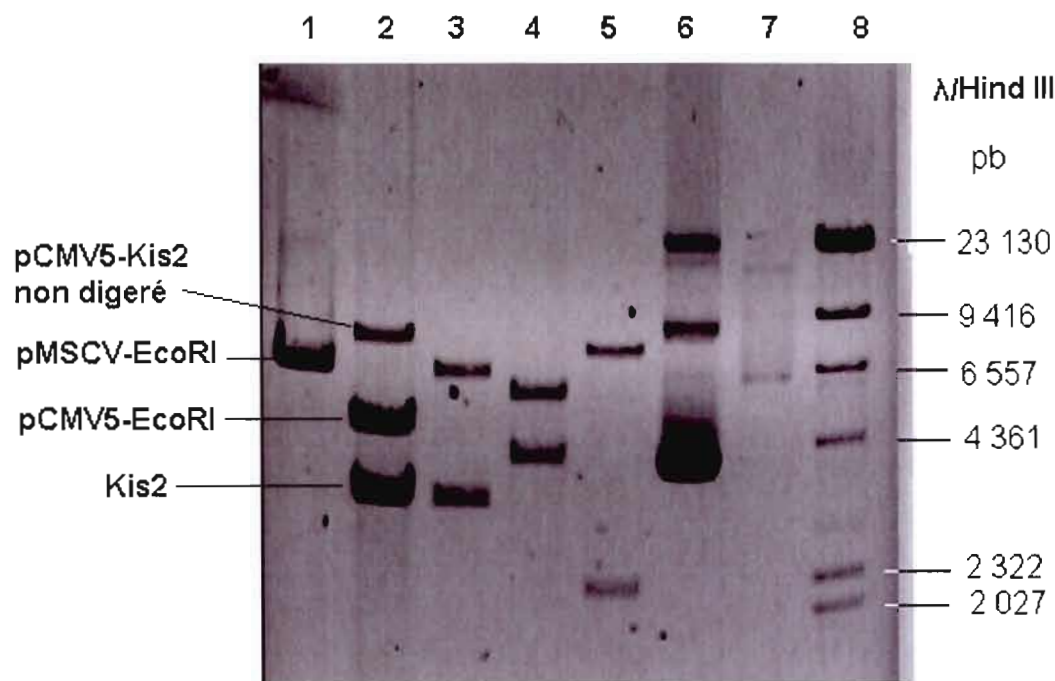


Figure 3.1.3. Analyse du plasmide recombinant pMSCV-Kis2 par les enzymes de restriction. 1 – pMSCV (6,5 kpb), vecteur vide, linéarisé par EcoRI; 2 – la source de l'insert, plasmide pCMV5-Kis2, digéré par EcoRI; 3 – plasmide recombinant, pMSCV-Kis2, digéré par EcoRI: en bas se trouve l'insert Kis2 (3,2 kpb), en haut – vecteur pMSCV (6,5 kpb); 4 - pMSCV-Kis2 digéré par Hind III; 5 - pMSCV-Kis2 digéré par BamHI; 6 – pMSCV non digéré; 7 – pMSCV-Kis2 non digéré; 8 - marqueur du poids moléculaire, l'ADN du phage λ digéré par Hind III.

Le deuxième fragment, Kis2miR (1.04 kb), correspond à la partie 3' terminale du fragment Kis2 et représente le pri-miARN du groupe miR-106-363. Il a été amplifié par PCR à partir du fragment Kis2 et ensuite cloné dans le vecteur pDrive. Afin de réaliser son sous-clonage dans le vecteur pLNSX, il a été excisé par les enzymes de restriction SnaBI et HindIII et liguée dans les sites StuI et HindIII du vecteur pLNSX. Les résultats du clonage ont été confirmés par digestion enzymatique (fig. 3.1.4).

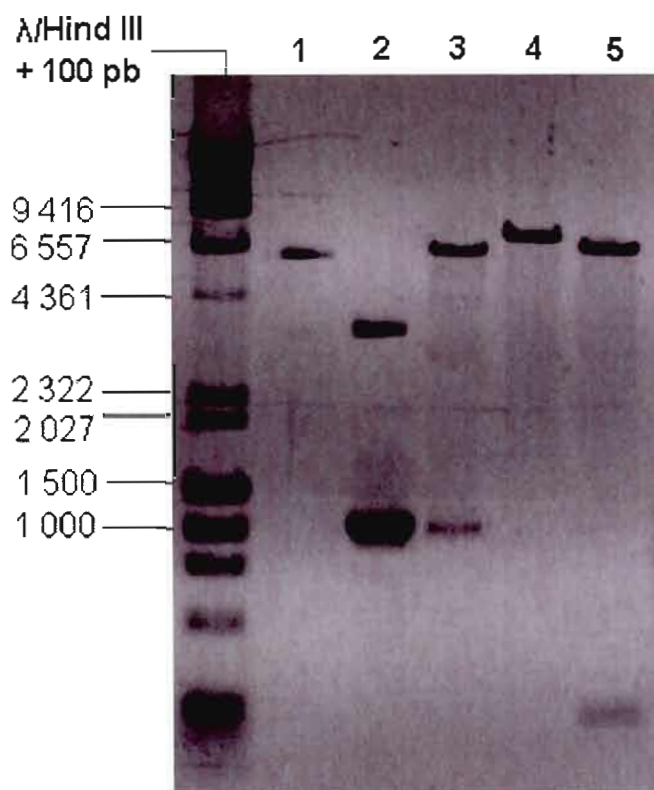


Figure 3.1.4 Analyse du plasmide recombinant pLNSX-Kis2miR par les enzymes de restriction.

1 – pLNSX, vecteur vide, linéarisé par *Stu*I; **2** – la source de l'insert, plasmide pDrive-Kis2miR, digéré par *Sna*BI et *Hind* III: le fragment Kis2miR (1,02 kpb) est en bas, vecteur pDrive (4 kpb) en haut; **3** – plasmide recombinant, pLNSX -Kis2miR, digéré par *Stu*I et *Hind* III: en bas se trouve l'insert Kis2miR, en haut – vecteur pLNSX (6,1 kpb); **4** - pLNSX -Kis2miR linéarisé par *Bgl*II; **5** - pLNSX -Kis2miR digéré par *Bam*HI (2 sites de restriction, 2 bandes: 6,1 kpb, 500 pb et 485 pb).

3.2 Titration des virus par infection des cellules NIH 3T3

Les rétrovirus recombinants ont été produits à l'aide de la lignée d'encapsidation Phoenix_{eco}. Pour titrer le virus, nous avons infecté la lignée fibroblastique murine NIH 3T3 avec plusieurs dilutions de surnageants rétroviraux. Les résultats sont présentés dans la figure

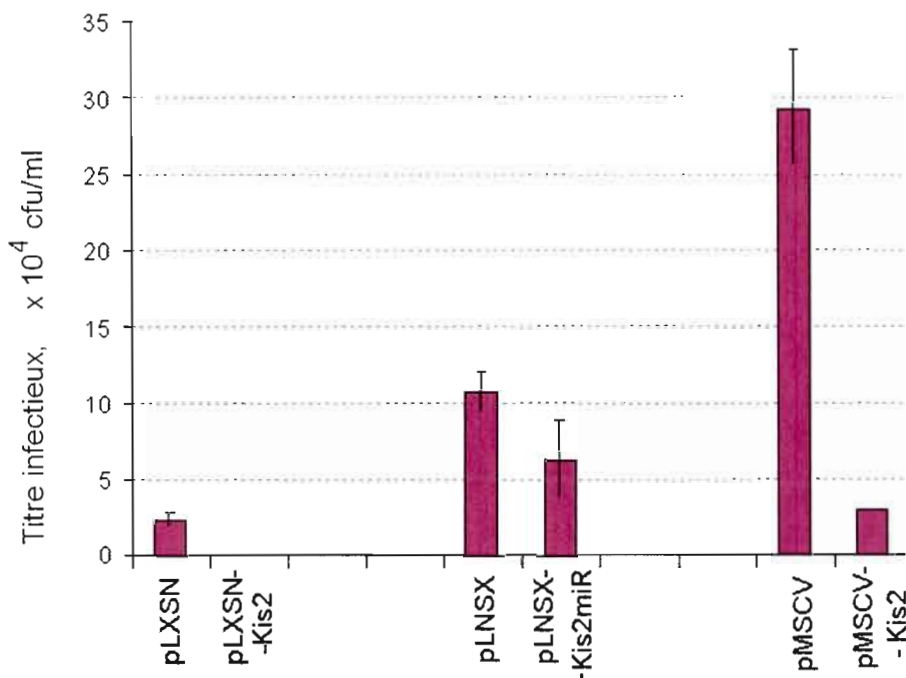


Figure 3.2.1 Titration des virus recombinants (pLXSN-Kis2, pLNSX-Kis2miR et pMSCV-Kis2) et des virus contrôles (particules contenant vecteurs vides: pLXSN, pLNSX et pMSCV). Les résultats représentent la moyenne d'un triplicata (n=3) sauf pMSCV-Kis2 où n=1.

3.2.1 et le tableau 3.2.1. La titration sert à normaliser la quantité de virus utilisé pour infection des cellules Ti6.

En comparant la capacité infectieuse des vecteurs d'expression, nous avons constaté que pMSCV était le plus efficace (voir fig. 3.2.1, tabl. 3.2.1). Son titre atteint 2.9×10^5 cfu par ml. Le titre du vecteur pLNSX était presque 3 fois moins fort – 1.07×10^5 cfu par ml alors que le vecteur pLXSN empaqueté a été 12 fois moins infectieux que pMSCV – 2.4×10^4 cfu par ml.

Tableau 3.2.1 Titration des virus recombinants (pLXSN-Kis2, pLNSX-Kis2miR et pMSCV-Kis2) et des virus contrôles (particules contenant vecteurs vides pLXSN, pLNSX et pMSCV). Chaque valeur est la moyenne d'un triplicata (n=3), pour l'échantillon pMSCV-Kis2 n=1.

Nom d'échantillon	cfu/ml
pLXSN	$2.4 \cdot 10^4 \pm 4 \cdot 10^3$
pLXSN-Kis2	35 ± 20
pLNSX	$1.07 \cdot 10^5 \pm 1.3 \cdot 10^4$
pLNSX-Kis2miR	$6.3 \cdot 10^4 \pm 2.4 \cdot 10^4$
pMSCV	$2.9 \cdot 10^5 \pm 3.7 \cdot 10^4$
pMSCV-Kis2	$3.0 \cdot 10^4$

La présence de l'insert contenant le groupe miR 106–363 dans les rétrovirus recombinants a diminué la production des virus. Une forte diminution (10 et 700 fois) a été observée dans le cas des recombinants portant le fragment Kis2 3.2 kb, pMSCV-Kis2 et pLXSN-Kis2.

3.3 DÉTECTION DES miARN

3.3.1 Détection des miARN dans les NIH 3T3

Après l'infection des cellules (NIH 3T3, Ti6) par les particules virales contenant les constructions pLXSN-Kis2, pLNSX-Kis2miR et pMSCV-Kis2, et la sélection avec du G418, nous avons obtenu les cellules résistantes au G418 (ce gène a été apporté par l'infection rétrovirale). Par la suite, il fallait vérifier que les cellules sélectionnées (NIH 3T3 et Ti6) étaient capables d'exprimer le gène d'intérêt - Kis2 et le groupe miR106-363.

Afin de détecter le fragment Kis2miR dans les NIH 3T3, la RT-PCR nichée a été choisie comme outil pour permettre l'amplification du fragment à partir de quelques copies d'ARNm de façon très spécifique. Nous avons recouru à cette technique car les études antérieures réalisées dans le laboratoire à l'aide d'ARN extrait des lymphomes induits par le virus RadLV n'ont pas permis d'amplifier le pri-miARN par RT-PCR. Les résultats de la RT-PCR nichée sont montrés dans la figure 3.3.1. Une bande de taille anticipée (d'environ 1 kpb) a été obtenue témoignant de l'expression stable du pri-miARN de miR-106-363 dans les cellules sélectionnées. Dans notre contrôle négatif nous avons obtenue la bande de plus petite taille (environ 600-700 pb) que nous avons considérés non-spécifique. En tenant compte de la sensibilité très élevée de la PCR nichée, nous pensons que cela due au *false priming* entre une amorce et le vecteur.

En parallèle nous avons essayé d'amplifier le même fragment par RT-PCR à 35 cycles. Les bandes d'environ 1 kpb ont été obtenues pour toutes les constructions (fig. 3.3.2). L'intensité des bandes n'était pas forte mais elles sont spécifiques aux constructions à l'étude et peuvent confirmer le fait que dans les cellules NIH 3T3 l'expression de deux fragments - Kis2 et Kis2miR- se fait de façon stable.

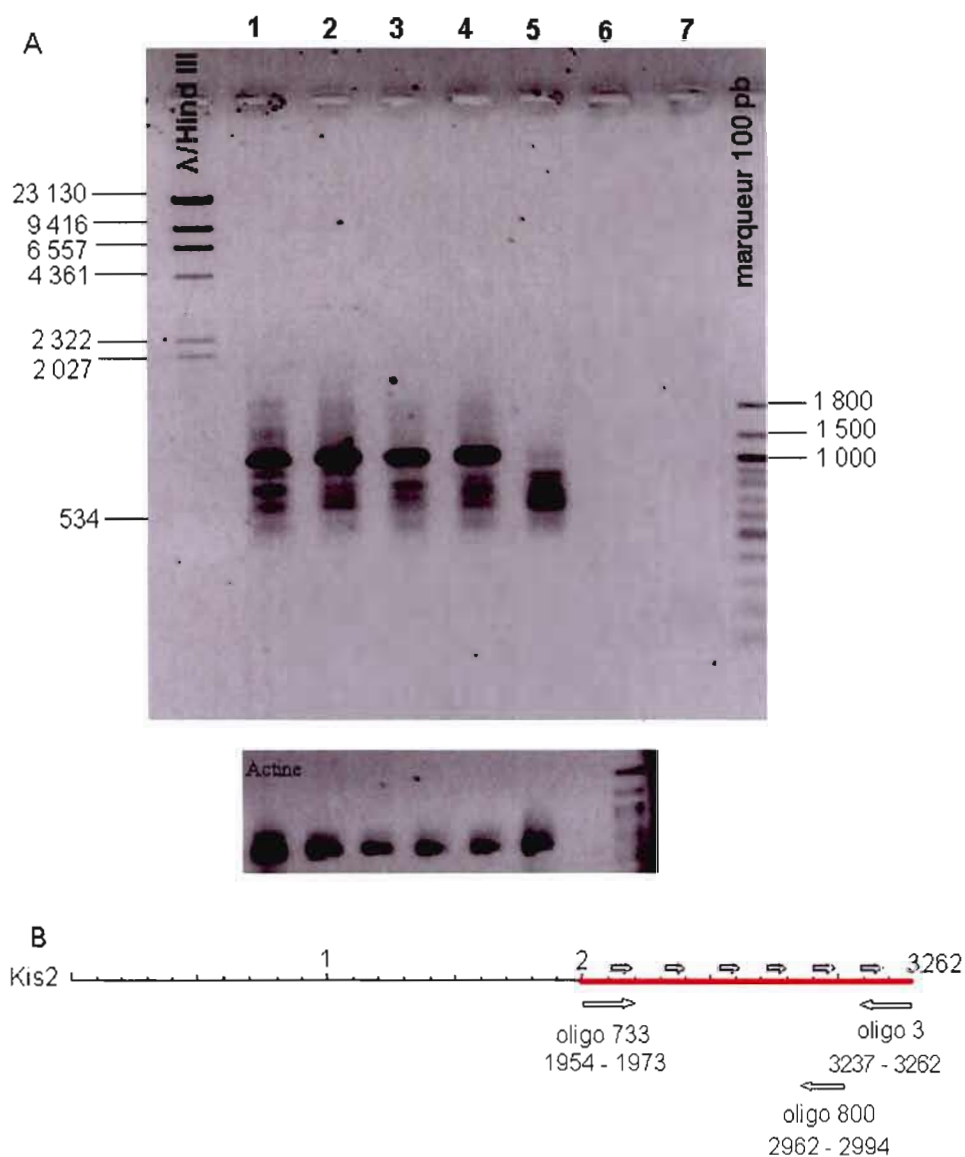


Figure 3.3.1 Amplification du pri-miARN du groupe miR-106-363 par RT-PCR nichée.

A. L'expérience est réalisée sur les ARN totaux extraits des cellules NIH 3T3 exprimant le groupe miR-106-363 de manière stable. **1** – pLXSN-Kis2; **2** – pMSCV-Kis2; **3** – pLNSX-Kis2miR-1; **4** – pLNSX-Kis2miR-2; **5** – pLNSX; **6** – NIH 3T3; **7** – input (contrôle PCR). **B.** La partie en rouge correspond au pri-miARN du groupe miR-106-363. Les flèches montrent la position des amorces.

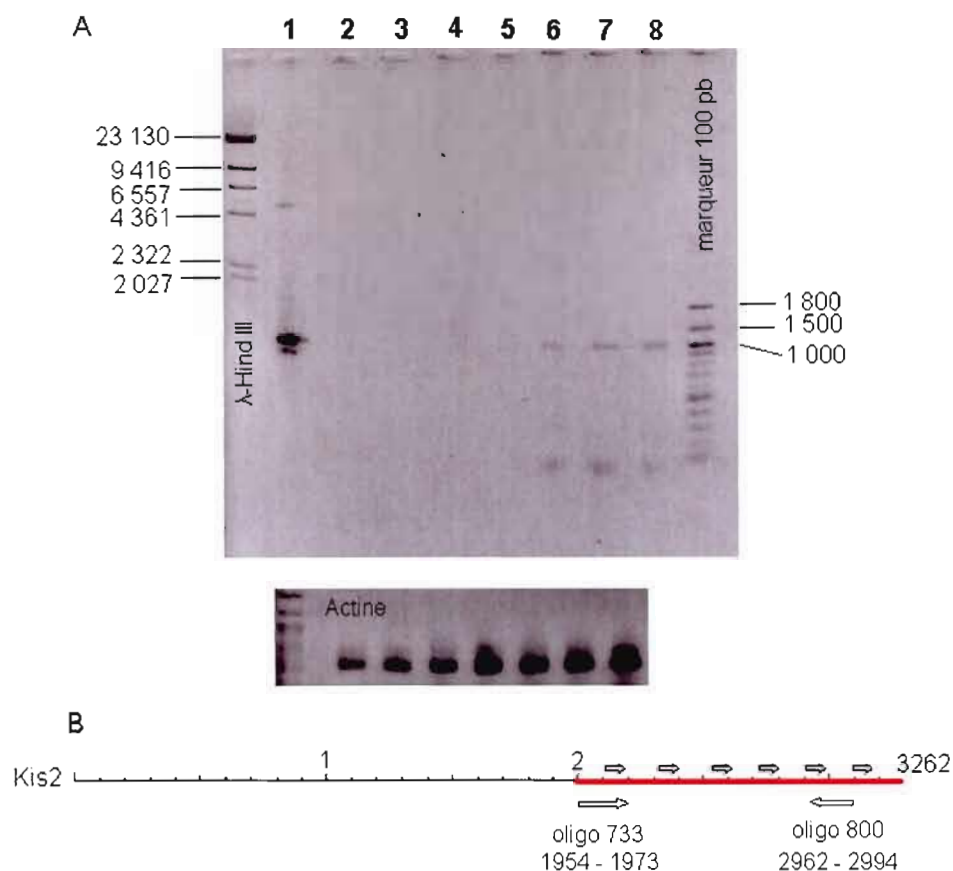


Figure 3.3.2 Amplification du pri-miARN du groupe miR-106-363 par RT-PCR.

A. L'expérience est réalisée sur les ARN totaux extraits des cellules NIH 3T3 exprimant le groupe miR-106-363 de manière stable. Les numéros des pistes correspondent aux échantillons suivants: **1** – ADN du plasmide contenant fragment Kis2 (pCMV5-Kis2); **2** – NIH 3T3; **3** – pMSCV; **4** – pLXSN; **5** – pLNSX; **6** – pMSCV-Kis2; **7** – pLXSN-Kis2; **8** – pLNSX-Kis2miR. **B.** La partie en rouge correspond au pri-miARN du groupe miR-106-363. Les flèches montrent la position des amorces.

3.3.2 Détection des miARN dans les cellules Ti6

Par la suite nous nous sommes intéressés à étudier l'expression de deux fragments (Kis2 et Kis2miR) dans la lignée lymphocytaire Ti6 infectée par les virus à l'étude. Le gène Kis2 est légèrement exprimé dans les lymphocytes. Les études de S. Landais, présentées dans sa thèse, montrent que l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la maturation des

transcrits de Kis2 varie entre les lymphocytes et les fibroblastes (S. Landais, thèse de doctorat, 2007). Ainsi, nous nous attendions à ce que le profil d'épissage des transcrits du Kis2 dans les cellules Ti6 soit différent de celui dans les NIH 3T3. Tout d'abord, nous avons tenté d'amplifier par RT-PCR la partie non codante du gène Kis2 en reproduisant les conditions de réaction décrites dans l'article de S. Landais (2007).

Dans la figure 3.3.3, nous pouvons constater que les cellules Ti6 non infectées ainsi que les cellules contenant le vecteur vide et la construction pLNSX-Kis2miR montrent le profil d'épissage typique aux lymphocytes en produisant 5 espèces d'ARNm de 2.1 kb, 1.7 kb, 1.3 kb, 0.9 kb et 0.6 kb.

Les résultats de la figure 3.3.4 suggèrent que les lymphocytes exprimant les constructions pLXSN-Kis2 et pMSCV-Kis2 ont le profil d'épissage altéré: l'espèce dominante dans les Ti6- pMSCV-Kis2 et Ti6- pLXSN-Kis2 a la taille de 570 pb. Nous pouvons voir que dans les cellules exprimant pLXSN-Kis2, il y a aussi une autre bande, très faible, et dans pMSCV-Kis2 il y a trois ou quatre transcrits plus visibles.

Par la suite, nous avons analysé l'amplification du fragment Kis2 au complet (fig. 3.3.5). Dans les cellules Ti6-pLXSN-Kis2 nous avons observé deux bandes: 570 pb et 1.7 kpb. Dans le cas de la construction pMSCV-Kis2 deux bandes (570 pb et 750 pb) ont été obtenus. La bande de 1.7 kpb est très faible, elle correspond vraisemblablement à un ARN qui a subi la maturation. Ainsi, le fragment Kis2 exprimé sous différents promoteurs donne des profils d'épissage différents (voir chapitre 2.2.1, discussion p. 65).

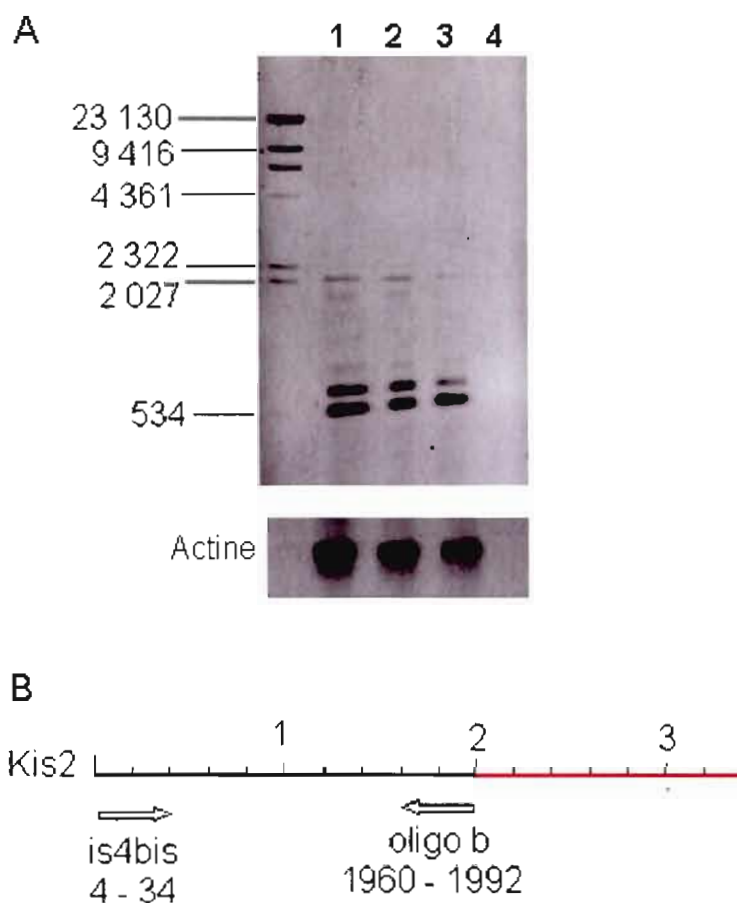


Figure 3.3.3 Amplification de la partie non codant du gène Kis2 par RT-PCR.

A. Épipissage des ARNm produit par Kis2 dans la lignée Ti6 (où Kis2 est légèrement exprimé). **1** – Ti6; **2** – pLNSX; **3** – pLNSX-Kis2miR; **4** – contrôle PCR. **B.** Schéma du gène Kis2. La partie en rouge correspond au pri-miARN du groupe miR-106-363. Les flèches montrent la position des amorces.

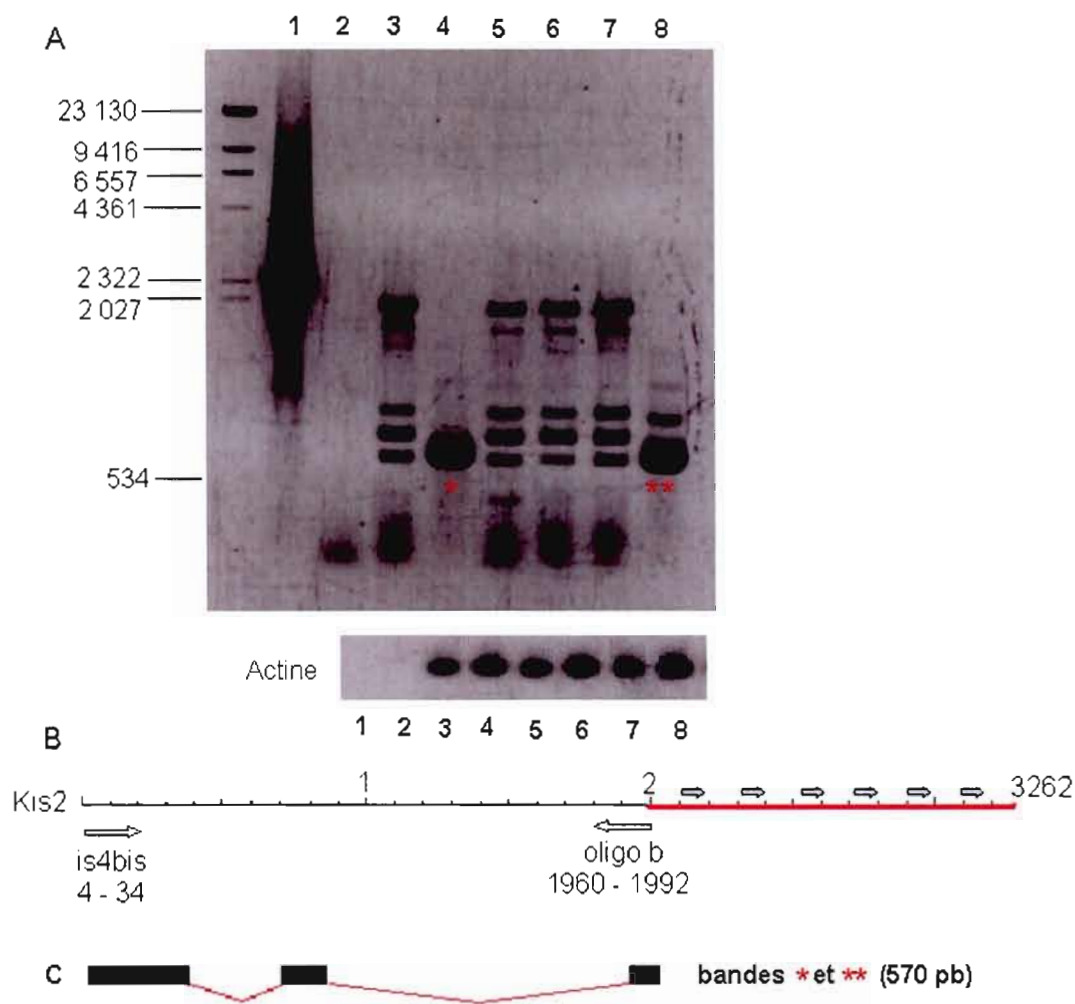


Figure 3.3.4 Les différents transcrits produits par le gène Kis2 dans la lignée Ti6. Amplification est réalisée par RT-PCR à partir des ARN totaux. **A.** Le profil d'épissage des cellules exprimant le fragment Kis2 (pistes 4 et 8) est différent au celui des cellules contrôles (cellules contenant le vecteur vide, pistes 3, 5 et 7) et de la construction pLNSX-Kis2miR. **1** – contrôle positif: ADNc du fragment Kis2 (3,2 kpb); **2** – contrôle PCR; **3** – pLNSN; **4** – pLNSN-Kis2; **5** – pLNSX; **6** – pLNSX-Kis2miR; **7** – pMSCV; **8** – pMSCV-Kis2. **B.** Schéma du gène Kis2. La partie en rouge correspond au pri-miARN du groupe miR-106-363. Les flèches montrent la position des amorces. **C.** Résultats de séquençage des bandes * et ** (taille 570 pb).

Nous avons déterminé la séquence de trois bandes. Le séquençage a révélé que les bandes de 570 pb amplifiées à partir des Ti6-pMSCV-Kis2 et Ti6-pLXSN-Kis2 sont identiques. Leur partie 3' se termine au site donneur de l'épissage SD2 (voir fig. 1.3.2) et ne porte alors aucun miARN. La bande pMSCV-Kis2-2 (fig. 3.3.5) de taille 748 pb contient le miR-363. Le séquençage du plus grand transcrit (bande pLXSN-Kis2-4) n'a pas fonctionné malgré plusieurs essais pour une raison que l'on ignore. Afin de prouver que cette bande a le lien avec le gène Kis2, nous avons réalisé le buvardage de type Northern avec la sonde complémentaire à la partie non codante de Kis2 (1,4 kpb). Le résultat de ce test a confirmé l'expression stable et abondante des transcrits pLXSN-Kis2-4 (1,7 kb) et pLXSN-Kis2-3 (0,57 kb) (fig. 3.3.5, 3.3.6). Le transcrit de grande taille (1,7 kb) n'a pas été détecté par Northern blot dans les cellules infectées par pMSCV-Kis2. Dans les cellules Ti6-pMSCV-Kis2, nous pouvons voir deux transcrits légers correspondant aux bandes 1 et 2 (0,57 kb et 0,75 kb) amplifiées par RT-PCR (fig. 3.3.5, 3.3.6).

Pour finaliser les tests d'expression du fragment Kis2 dans les cellules Ti6, nous avons voulu amplifier la partie correspondant au pri-miARN. Des amorces correspondant aux extrémités du fragment Kis2miR donnant le fragment de 1.3 kpb ont été choisies. Les résultats montrent que les cellules Ti6 infectées par les constructions avec Kis2 expriment ce fragment (fig. 3.3.7). Il a été détecté au complet dans les Ti6-pLXSN-Kis2, mais dans les Ti6-pMSCV-Kis2 il est maturé. Les cellules non infectées ou infectées par les vecteurs vides servant de contrôle ne permettaient pas l'amplification de ce fragment. Ceci montre que nous avons pu obtenir la lignée lymphocytaire qui exprime le groupe miR-106-363 de manière

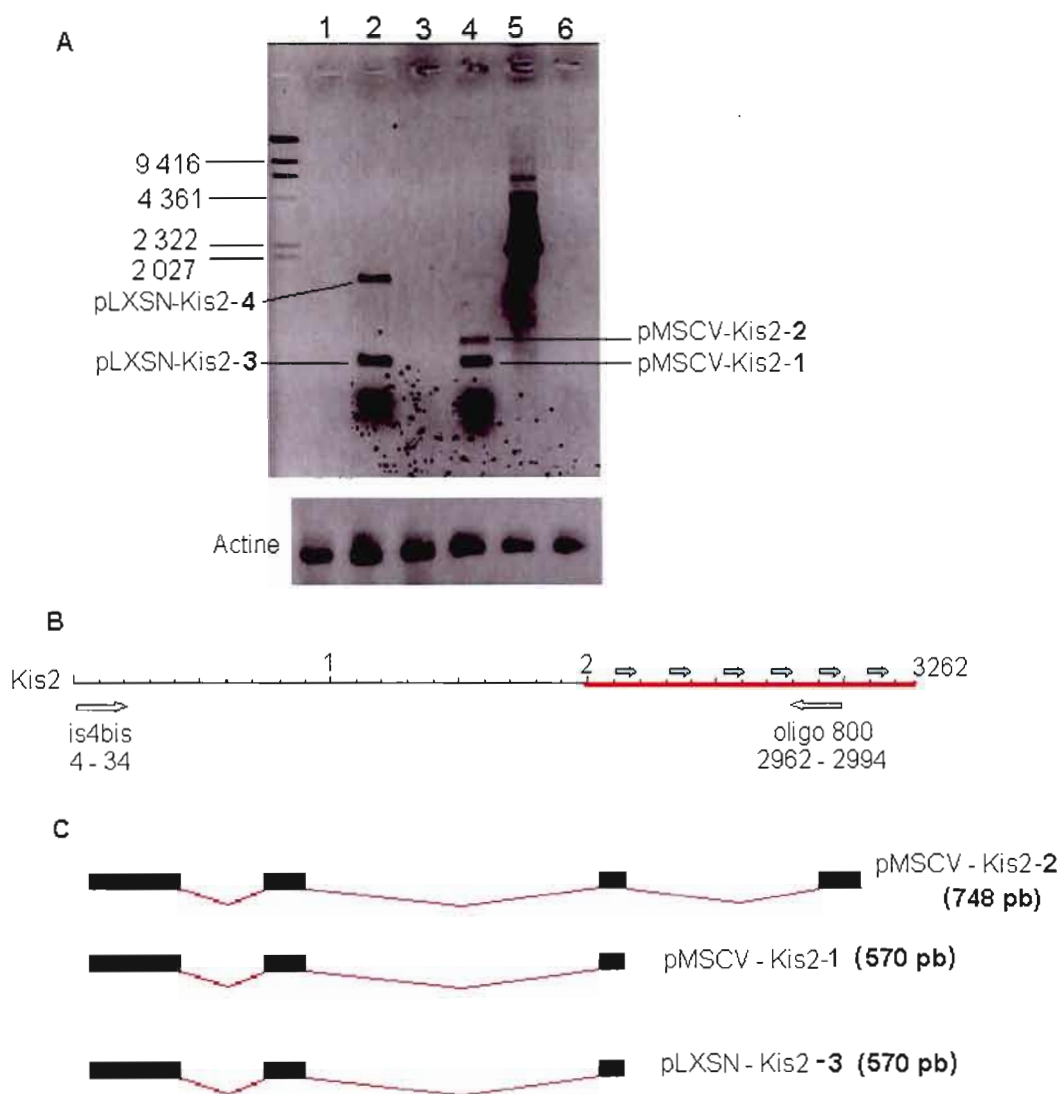


Figure 3.3.5 Amplification du fragment Kis2 exprimé de manière stable dans la lignée Ti6. La RT-PCR est réalisé sur les ARN totaux extraits des cellules Ti6. **A.** Les transcrits produits par les constructions pLXSN-Kis2 (3 et 4) et pMSCV-Kis2 (1 et 2). **1** – pLXSN; **2** – pLXSN-Kis2; **3** – pMSCV; **4** – pMSCV-Kis2; **5** - contrôle positif: ADNc du fragment Kis2 (3,2 kpb) provenant du plasmide pCMV5-Kis2; **6** – Ti6. **B.** Schéma du fragment Kis2. La partie en rouge correspond au pri-miARN du groupe miR-106-363. Les flèches montrent la position des amorces. **C.** Résultats de séquençage des bandes pMSCV-Kis2-2 (748 pb), pMSCV-Kis2-1 (570 pb) et pLXSN-Kis2-3 (570 pb).

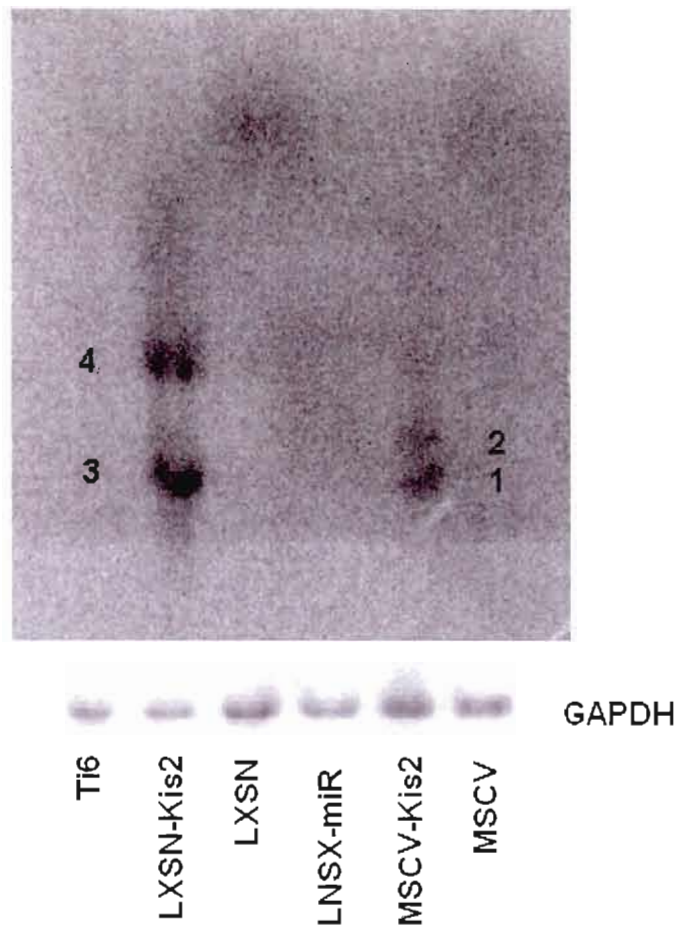


Figure 3.3.6 Détection par Northern blot des transcrits du gène *Kis2* exprimé de façon stable dans la lignée Ti6.

Les bandes 1 et 2 correspondent aux transcrits pMSCV-Kis2-1 (570 b) et pMSCV-Kis2-2 (750 b) respectivement. La bande 3 correspond au transcrit pLXSN-Kis2-3 (570 b) et la bande 4 – au transcrit pLXSN-Kis2-3 (environ 1,7 kb).

stable. Puisque le niveau d'expression de ce groupe est supérieur en comparant avec celui de cellules contrôles, nous pouvons considérer que les cellules sous étude surexpriment le groupe miR-106-363.

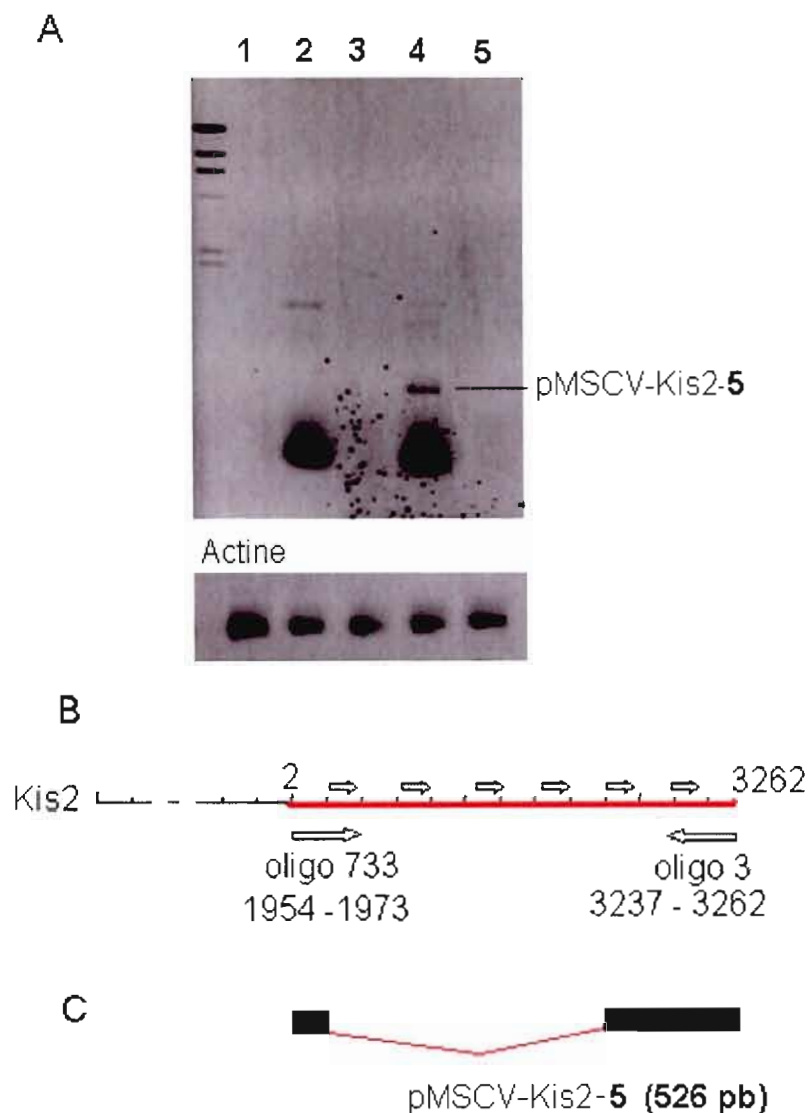


Figure 3.3.7 Amplification du pri-miARN du groupe miR-106-363 exprimé de manière stable dans la lignée Ti6. La RT-PCR est réalisée sur les ARN totaux extrait de cellules Ti6. **A.** 1 -pLXSN; 2 - pLXSN-Kis2; 3 - pMSCV; 4 - pMSCV-Kis2; 5 - Ti6. Le signal de très faible poids moléculaire représente le mélange des transcrits qui résultent de la maturation de plus grandes transcrits. **B.** Schéma du fragment Kis2. La partie en rouge correspond au pri-miARN du groupe miR-106-363. Les flèches montrent la position des amorces. **C.** Résultats de séquençage de la bande pMSCV-Kis2-5 (526 pb).

Afin de vérifier l'appartenance d'au moins un de ces transcrits au groupe miR106-363, la bande pMSCV-Kis2-5 a été séquencé et le résultat a démontré qu'elle contient le miR-363 et compte 526 nt (fig. 3.3.7).

Les résultats obtenus nous ont poussés à croire qu'il serait possible de détecter les autres miARN du groupe par la technique de buvardage de type Northern.

3.4 NORTHERN BLOT DES miARN

Afin de confirmer le succès de nos démarches expérimentales, nous avons testé la production des miARN du groupe miR106-363 exprimés de manière stable dans deux lignées cellulaires (NIH 3T3 et Ti6). Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 3.4.1. Il a été possible de visualiser quatre des six miARN – miR-106, miR-20, miR-19 et miR-92. Comme dans les expériences antérieures réalisées avec les tumeurs induites par RadLV, nous n'avons pas pu détecter miR-18 et miR-363 par la technique de Northern blot (Landais et al., 2007).

Nous avons observé que dans les NIH 3T3, la différence d'expression entre le contrôle (vecteurs vides) et les cellules portant les constructions a été plus remarquable que dans les Ti6. Ceci serait dû à une expression endogène du gène Kis2 dans des lymphocytes qui masquait la différence entre le contrôle et l'expérience. Par ailleurs, le groupe miR 106-363 est plus exprimé dans les Ti6, moins dans BLVL3, mais n'est pas exprimé dans les NIH 3T3.

Deux miARN, miR-19 et miR-92, sont plus abondants dans les Ti6 infectées que dans les NIH 3T3 infectées. Leur profil d'expression ne reflète toujours pas la surexpression de

constructions dans la lignée Ti6: le niveau d'expression du plasmide pLNSX est plus élevé tandis qu'il est à la baisse dans la construction pLXSN-Kis2miR (fig. 3.4.1, 3.4.2). La différence entre l'expression de miR-19 et miR-92 dans le contrôle et l'échantillon expérimental se manifeste plus dans les NIH 3T3 mais elle est moins évidente dans les Ti6.

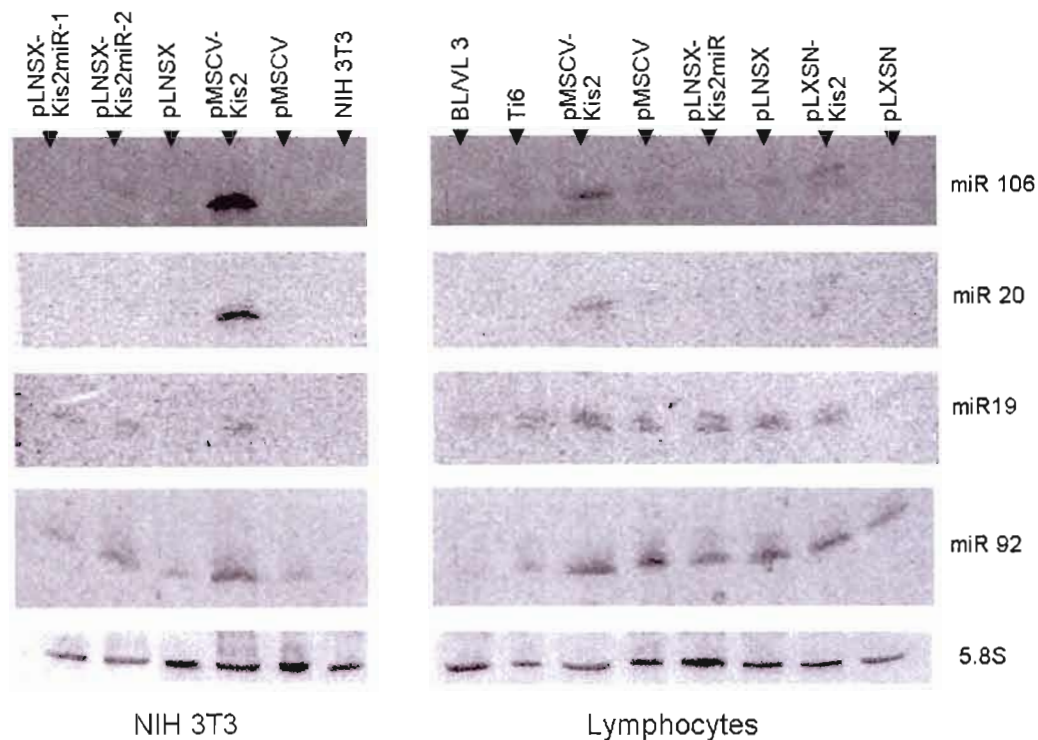


Figure 3.4.1 Expression des miARN du groupe miR-106-363 dans des lignées NIH 3T3 et Ti6. L'image obtenue suite des hybridations consécutives des sondes radioactives complémentaires aux miARN du groupe miR-106-363 avec une membrane. Visualisation est réalisée à l'aide de PhosphorImager (BioRad).

Dans les lignées Ti6 et BLVL3, nous avons observé deux bandes de même intensité correspondant au miR-19, mais dans les NIH 3T3 nous ne pouvons pas affirmer qu'il en avait vraiment deux à cause de la qualité de l'image et de la faible concentration de ce miARN.

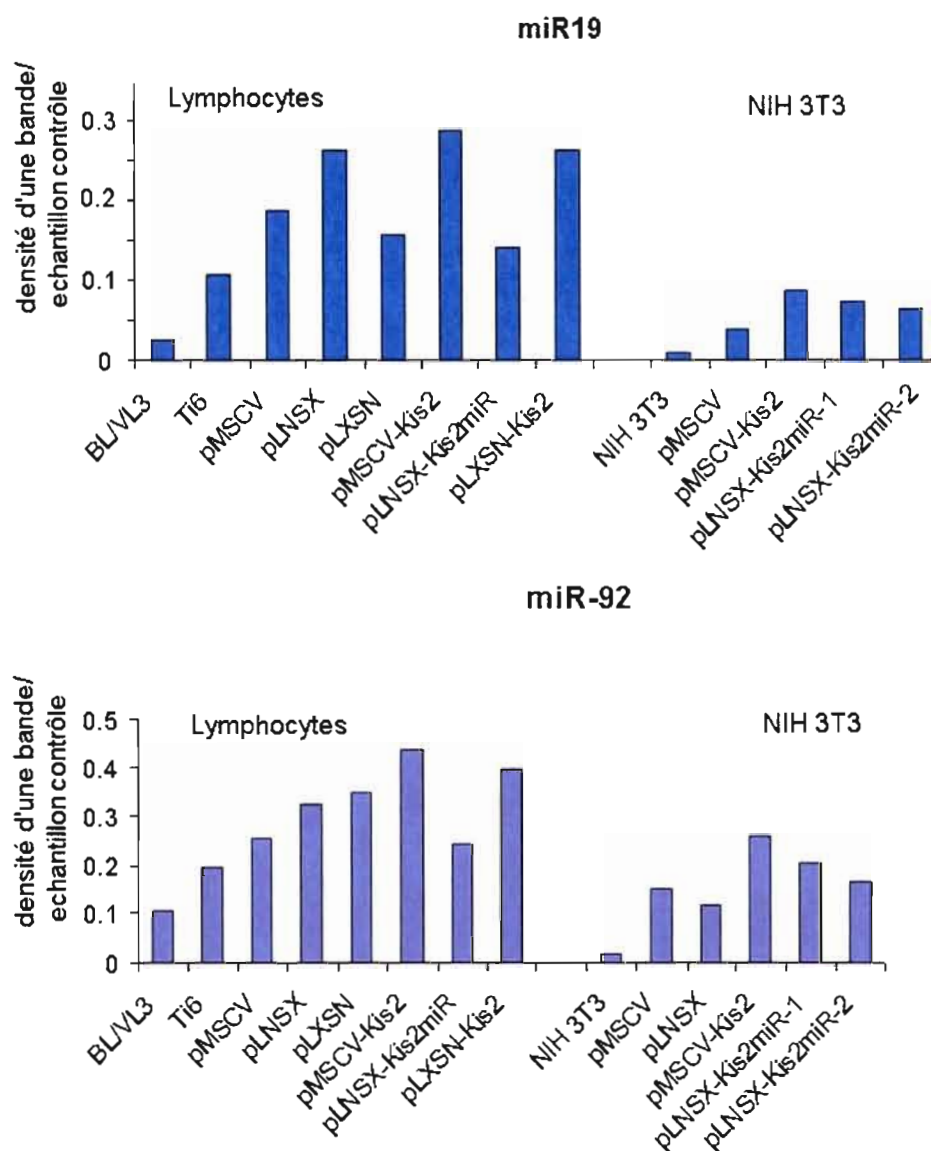


Figure 3.4.2 Expression des miR-19 et miR-92 dans des lymphocytes (Ti6, BL/VL3) et des NIH 3T3 (quantification de la figure 3.4.1). Les barres colorées représentent les valeurs relatives obtenues par rapport aux valeurs contrôles de l'ARN 5.8S à l'aide du logiciel QuantityOne (BioRad) à partir des images de Northern blot. Les cellules non infectées et infectées par les vecteurs vides ont servi comme contrôle négatif, n=1.

Pour miR-106, deux bandes dans des lymphocytes ont été détectées, mais la bande plus petite était moins exprimée (fig. 3.4.3).

Deux miARN, miR-106 et miR-20, ont montré un profil d'expression dépendant de la présence de nos constructions dans le génome de cellules (fig. 3.4.4). Nous avons observé la différence significative entre le niveau d'expression de miR-106 par les cellules Ti6-pMSCV-Kis2, Ti6-pLXSN-Kis2 et NIH 3T3-pLNSX-Kis2miR et le niveau d'expression contrôles (NIH 3T3, BLVL3 et Ti6 non infectés, Ti6-pMSCV, Ti6-pLXSN- et NIH 3T3-pLNSX). La différence significative du niveau d'expression de miR-20 a été montrée pour les lignées Ti6-pMSCV-Kis2, Ti6-pLXSN-Kis2 et NIH 3T3- pMSCV-Kis2 par rapport aux leurs contrôles (NIH 3T3, BLVL3 et Ti6 non infectés, ainsi que Ti6-pMSCV, Ti6-pLXSN- et NIH 3T3-pMSCV).

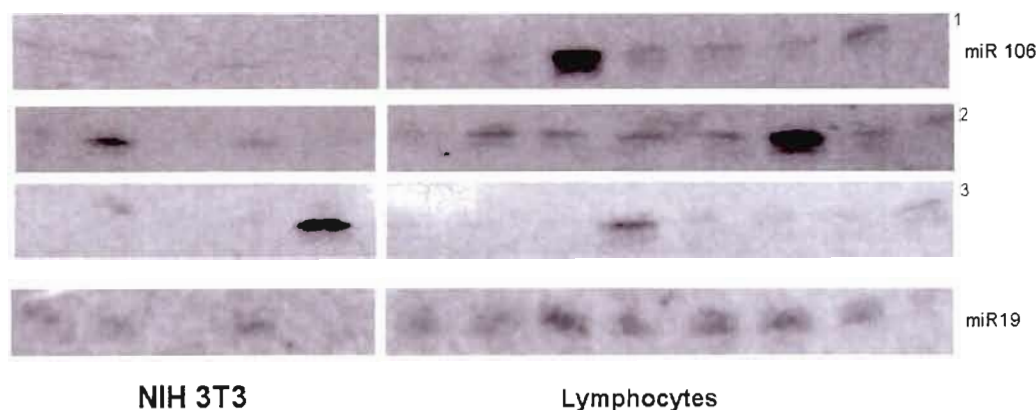


Figure 3.4.3 Polymorphisme des miR-106 et miR-19 matures. Résultats de Northern blots réalisés sur les ARN totaux extraits des cellules de deux lignées –NIH 3T3 et Ti6. Les panneaux 1, 2 et 3 correspondent aux trois expériences différentes (l'infection de cellules par les rétrovirus recombinants). Trois membranes ont été hybridées avec la sonde radioactive complémentaire au miR-106.

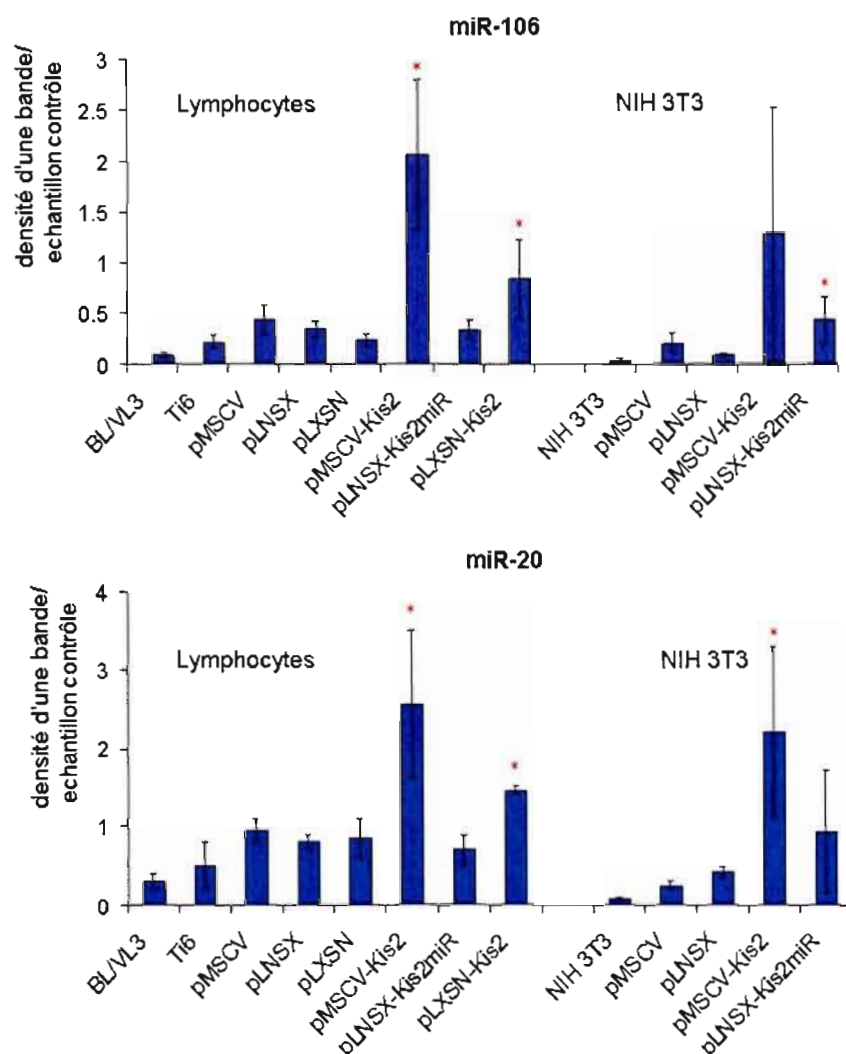


Figure 3.4.4 Expression des miR-106 et miR-20 dans des lymphocytes (Ti6, BL/VL3) et des NIH 3T3. Les barres colorées représentent les valeurs relatives obtenues à l'aide du logiciel QuantityOne (BioRad) à partir des images de Northern blot. Les cellules non infectées (NIH 3T3, BL/VL3, Ti6) et infectées par les vecteurs vides (pMSCV, pLXSN, pLNSX) ont servi comme contrôle négatif. L'hybridation de la sonde radioactive complémentaire au miR-106 avec la membrane issues des expériences indépendantes été faite trois fois (n=3), celle avec la sonde de miR-20 a été faite 2 fois (n=2). * - différences significatives.

En comparant le profil d'expression des miARN du groupe miR-106-363 dans les tumeurs induites par RadLV et dans des cellules obtenues au cours de notre expérience, nous

avons observé la même tendance: miR-106, miR-19 et miR-92 sont surexprimés alors que miR-20 est moins exprimé. Pourtant, la surexpression de miR-19 et miR-92 dans des lignées lymphocytaires ne dépendait pas de l'infection par les constructions contenant le groupe miR-106-363. Dans les NIH 3T3, le niveau d'expression de miR-19 et miR-92 concordait bien avec la présence de constructions portant Kis2 ou Kis2miR.

La comparaison d'expression des miARN de deux types des cellules (NIH 3T3 et Ti6) laisse penser que le groupe miR-17-92 qui partage une homologie avec le groupe miR-106-363, contribue à la surexpression de miR-19 et miR-92 dans des lymphocytes (Landais et al., 2007).

3.5 TEST DE TRANSFORMATION CELLULAIRE : PERTE DE LA CAPACITÉ D'ANCRAGE

La dernière partie de notre travail visait à vérifier la fonctionnalité du modèle cellulaire obtenu. Précédemment, l'étude de Séverine Landais (2007), qui a révélé le pouvoir transformant du groupe miR 106-363, avait été réalisée à l'aide de transfection des miARN matures dans les fibroblastes NIH 3T3. Dans le présent travail, nous avons produit les cellules qui expriment les miARN du groupe miR106-363 de façon stable. Ce test a pour but de confirmer que ces cellules subissent une série de modifications qui les amènent à la transformation. Les changements incluent la perte de l'inhibition de croissance dépendant de la densité ou perte de «l'inhibition de contact» qui cause l'empilement des cellules, l'acquisition de la capacité de proliférer malgré l'absence d'adhérence, propriété essentielle des cellules cancéreuses. Les cellules à une densité 10^4 par pétri de 10 cm de diamètre, ont

été ensemencées dans de l'agar semi-liquide, 0.6% et 0.3%, et les colonies formées ont été comptées et mesurées. Dans cette expérience, nous avons pu tester seulement deux des lignées stables – NIH 3T3-pMSCV-Kis2 et NIH 3T3-pLNSX-Kis2miR, ayant des difficultés à faire pousser la lignée NIH 3T3-pLXSN-Kis2.

Nous avons utilisé les cellules NIH 3T3 non infectées et infectées par les vecteurs vides comme contrôle négatif. En parallèle le même test a été réalisé avec des fibroblastes transfectées par le plasmide codant pour le mutant actif du gène *ras*. Sachant que ce dernier possède une forte propriété transformant il nous a servi comme contrôle positif mais aussi comme témoin d'une coopération éventuelle du locus *Kis2* avec *ras* pour l'acquisition du phénotype transformé.

La première observation qui a été faite est la hausse de nombre de colonies dans l'agar mou avec les fibroblastes exprimant le groupe miR106-363. Dans la figure 3.5.1 nous pouvons voir que les NIH 3T3 infectées par les vecteurs vides (NIH-pMSCV et NIH-pLNSX) ont donné très peu de colonies: de 5 à 10 par un pétri. Les cellules infectées par les constructions pMSCV-Kis2 et pLNSX-Kis2miR ont montré une capacité de former les colonies 6 fois plus élevée que celle de contrôle négatif.

L'expression du mutant *ras* dans les cellules n'a pas augmenté le nombre de colonies formées avec les cellules contrôles comme on s'y attendait (fig. 3.5.1).

Nous avons, par la suite, estimé la taille des colonies formées par les cellules exprimant les miARN et les cellules contrôles. Les NIH 3T3 infectées par les vecteurs vides (contrôle négatif) ont donné les colonies de plus petite taille (diamètre maximal de 0.25 mm pour pMSCV et de 0.3 mm pour pLNSX).

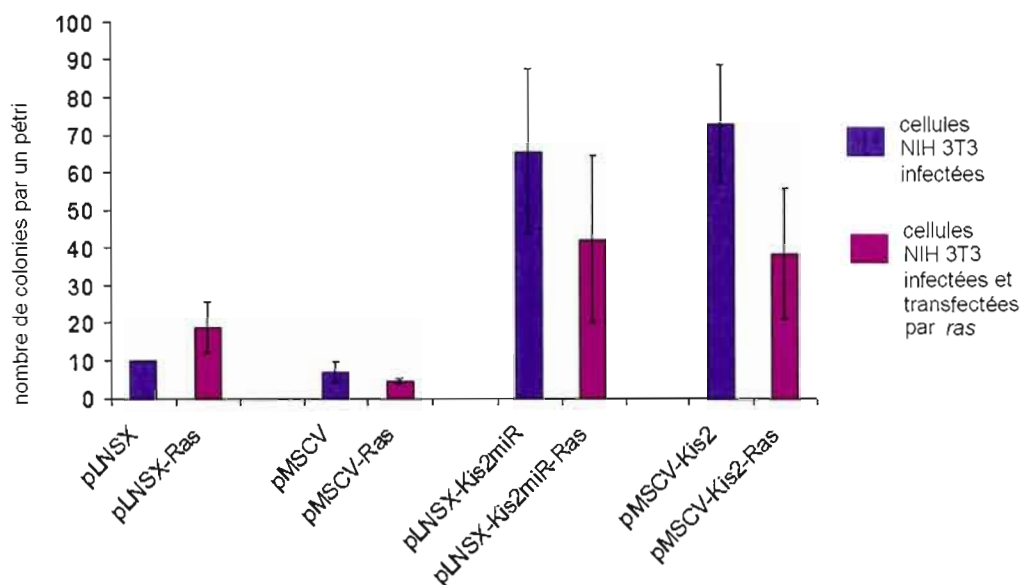


Figure 3.5.1 Nombre de colonies formées par les cellules NIH 3T3 infectées dans le milieu semi-liquide (agar mou). Les NIH 3T3 infectées par les vecteurs pLNSX et pMSCV ont été utilisées comme contrôle négatif, les cellules transfectées par *ras* ont servi comme contrôle positif, n=3.

Les cellules NIH 3T3 non infectées et non transfectées (un autre contrôle négatif) ont montré la capacité de proliférer dans le milieu semi-liquide en produisant les colonies de diamètre maximal 0.5 mm. Compte tenu que, dans ces cellules, une bonne différence a été observée entre le contrôle (NIH 3T3 non traitées) et l'expérience (transfection par *ras*), nous n'avons pas éliminé NIH 3T3 du groupe de contrôle négatif, et elles nous ont servi comme seuil (fig. 3.5.2).

La surexpression du groupe miR 106-363 a induit la formation de colonies de plus grande taille –jusqu'à 0,6 mm dans les NIH-pMSCV-Kis2 comparé à 0,25 mm dans les NIH 3T3-pLNSX. L'indépendance d'ancrage s'est davantage manifestée dans la série pMSCV, et 0,7 mm dans les NIH 3T3-pLNSX-Kis2miR comparé à 0,3 mm dans les NIH d'expérience

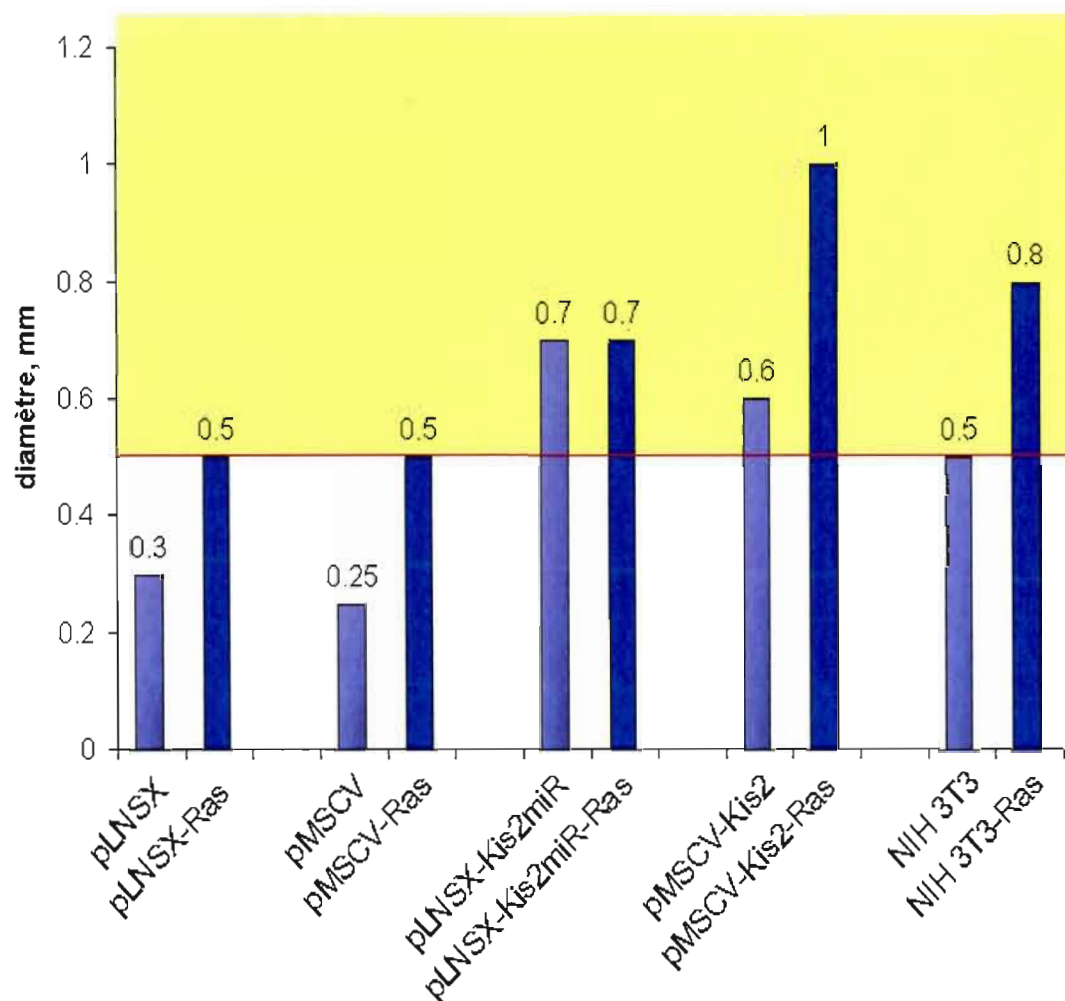


Figure 3.5.2 Test d'indépendance d'ancrage (estime la grandeur des colonies formées dans le milieu semi-liquide). Réalisé sur les cellules de la lignée NIH 3T3 infectées par les constructions pMSCV-Kis2 et pLNSX-Kis2miR. Les cellules NIH 3T3 non infectées et infectées par les vecteur pMSCV et pLNSX ont servi comme contrôle négatif. Les cellules NIH 3T3 transfectées par le plasmide exprimant le gène *ras* ont servi comme contrôle positif. Les cellules exprimant les constructions pMSCV-Kis2 et pLNSX-Kis2miR transfectées par *ras* ont été utilisées comme témoins de coopération entre le gène *ras* et le groupe miR-106-363. La ligne rouge correspond au seuil. Le champ coloré en jaune correspond aux résultats positifs de notre expérience.

réalisée avec la transfection par le mutant *ras*. Le diamètre de colonies de NIH 3T3-*ras* est passé de 0,5 à 0,8 mm. La plus grande hausse de cet indice a été observée dans les NIH 3T3-

pMSCV-Kis2-*ras*: de 0.6 mm à 1 mm, ce qui pourrait s'expliquer par une coopération entre Kis2 et *ras*. Par contre, l'apport du gène *ras* dans les cellules exprimant la construction NIH 3T3-pLNSX-Kis2miR-*ras* n'a pas résulté en une augmentation du diamètre des colonies.

Nous avons donc démontré que l'expression stable du groupe miR-106-363 dans les fibroblastes conduisait à la perte d'ancrage. Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans les expériences avec la transfection des miR-106 et miR-20 matures (Landais, 2007). Également, nos résultats suggèrent que les miARN de ce groupe coopèrent avec le mutant du gène *ras* car la plus grande perte d'ancrage a été observée dans les cellules exprimant le gène Kis2 et transfectées par *ras*.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 TITRATION DES VIRUS PAR INFECTION DES CELLULES NIH 3T3

En commençant nos expériences, nous avons anticipé que trois vecteurs rétroviraux différents produiront les miARN avec différentes efficacités. Elle sera d'abord dépendante de la capacité infectieuse des vecteurs et ensuite de la propriété de l'insert. Nous n'avons pas de données de littérature où tous ces vecteurs sont testés dans un même système cellulaire. Pourtant, nous avons trouvé que dans d'autres conditions expérimentales, le vecteur pMSCV a été plus efficace que pLXSN (Norris et al., 1998). L'information sur le vecteur pLNSX ne comportait pas la comparaison avec d'autres vecteurs que nous avons utilisés pour l'expression des miARN.

En comparant la capacité infectieuse des virus exprimant les vecteurs d'expression (virus contrôle), nous avons constaté que les virus portant pMSCV ont été les plus efficaces (voir fig. 3.2.1, tabl. 2.11.1). Les titres des vecteurs pLNSX et de pLXSN ont été respectivement 3 fois et 12 fois moins forts que pMSCV. Aucun de nos virus n'a atteint un titre équivalent à ceux décrits par Miller – de $8 \cdot 10^5$ à $2 \cdot 10^7$ cfu/ml (Miller, Rosman, 1989).

Pourquoi avons nous observé cette variation du titre infectieux? Cela pourrait s'expliquer par la différence dans la construction des vecteurs. Par exemple, le vecteur pLXSN avec lequel le titre viral a était le plus faible est dérivé de MoMuLV et contient les LTR non

modifiés. Le vecteur pMSCV a subi plusieurs modifications contribuant à la forte expression des gènes qui par conséquent, résulte en une production de grande quantité d'ARN viral génomique et en titre viral très fort. Premièrement, un élément enhancer a été enlevé de la région U3 de LTR. Cet enhancer est inhibé par E1A, et donc sa délétion facilite l'expression génique. Deuxièmement, les LTR de pMSCV contiennent le site de liaison pour le facteur de transcription SP-1. Il a été montré que ce site augmente l'expression des gènes sous les promoteurs rétroviraux dans des cellules du carcinome embryonnaire (Norris et al., 1998). De plus, pMSCV contient le site de liaison pour l'ARNt spécifique de la glutamine en aval du LTR tandis que dans MoMuSV, on retrouve le site de liaison pour l'ARNt spécifique de la proline. Il a été montré que cette modification a diminué la répression de transcription dans des cellules du carcinome embryonnaire (Greze et al., 1990).

Le vecteur pLNSX est le moins utilisé selon la littérature, mais il nous a donné un titre rétroviral assez fort.

Nous avons montré que la présence de l'insert contenant le groupe miR 106 – 363 dans les rétrovirus recombinants a diminué leur capacité d'infecter les cellules. Il est connu que la nature de l'insert peut influencer la production des rétrovirus s'il a un effet négatif sur la prolifération des cellules d'encapsulation. La baisse du titre rétroviral pourrait indiquer une interférence des miARN du groupe miR-106 – 363 avec l'ARN viral pendant le cycle réplcatif du virus recombinant. Il n'est pas exclu que les différences des titres rétroviraux pourraient être dues à une différence dans l'efficacité de transfection de la lignée Phoenix, un paramètre qu'il serait intéressant de contrôler. Par ailleurs, la taille élevée du plasmide pourrait diminuer l'efficacité de la transfection, ce qui peut expliquer la baisse des titres des virus exprimant les constructions à l'étude.

4.2 DÉTECTION DES miARN PAR RT-PCR

Dans cette série d'expérience, nous avons confirmé l'expression stable du groupe miR-106-363 dans la lignée NIH 3T3, mais nous nous sommes plus intéressés à l'expression des miARN dans la lignée lymphocytaire Ti6. La particularité du gène Kis2 consiste en la production de cinq espèces d'ARN non codant toutes additionnées du pri-miARN du groupe miR-106-363 (fig. 1.3.1, 1.3.2). La production de ces transcrits est le résultat d'activation et d'inhibition de sites donneurs et de sites accepteurs d'épissage (Landais, thèse de doctorat, 2007).

Dans les cellules contrôle et cellules Ti6 infectées par pLNSX-Kis2miR qui ne contient que partie d'ARN non codant, nous avons observé la présence de cinq transcrits du gène Kis2. Dans les cellules portant pMSCV-Kis2 et pLXSN-Kis2, nous avons constaté l'accélération de l'épissage résultant en la détection du plus petit transcrit d'environ 0,6 kb. Nous pensons que, dans ce cas, une régulation de type *feed-forward* est mise en jeu: le surplus de production d'ARN conduit à l'activation du système d'épissage. Cette suggestion paraît vraisemblable car plusieurs protéines (hnRNP A2/B1, hnRNP A3, PTB, KSRP) impliquées dans la régulation de l'épissage ont été identifiées comme facteurs potentiellement associés aux ARN Kis2 (Landais, thèse de doctorat, 2007).

Une autre observation joue en faveur de cette suggestion: la construction pMSCV-Kis2 produit plus des miARN (voir fig. 3.4.1, 3.4.4), et la maturation des transcrits Kis2 se fait de manière plus efficace. En conséquence, nous n'avons détecté que les transcrits de petite taille: 0,8 kb et 0,6 kb (voir fig. 3.3.4-3.3.7). La production des miARN par la construction pLXSN-Kis2 n'était pas forte et comme résultat de maturation nous avons observé le grand transcrit

(1.7 kb). Il serait intéressant de déterminer la séquence de ce dernier pour faire une comparaison plus argumentée.

4.3 NORTHERN BLOT DES miARN

Le groupe miR106-363 partage une forte homologie avec un autre groupe des miARN localisé sur le chromosome 14 de la souris, miR-17-92, qui est connu pour un fort potentiel oncogénique et son implication dans les leucémies B. MiR-92-2 et miR-19b-2 du groupe miR-106a-363 sont identiques aux miR-92-1 et miR19b-1 du groupe miR-17-92. Trois autres miARN- miR-106a, miR-20b et miR-18b sont très homologues mais ne sont pas identiques aux miR-17-5p, miR-20a et miR-18a provenant de miR-17-92. De cette façon, ils sont spécifiques du groupe miR-106-363.

Dans les lignées cellulaires stables qui ont été obtenues, nous avons pu visualiser par Northern blot quatre miARN du groupe miR-106-363: miR-106a, miR-20b, miR-92-2 et miR-19b. Par contre, miR-18 et miR-363 n'ont pas été détectés. La même observation a été faite dans l'étude réalisée sur les tumeurs (Landais, 2007). Pourtant, par RT-PCR nous avons déterminé que miR-363 se trouve non excisé dans la partie 3' terminale du transcrit de la taille 526 nt (voir fig. 3.3.7).

Il a été montré que les miARN du groupe miR-106-363 ne sont pas produits en même temps: l'analyse bioinformatique de la structure secondaire des différents transcrits a révélé qu'elle varie d'un transcrit à l'autre (S. Landais, thèse de doctorat, 2007). Cela concerne surtout le miR-18 dont la tige-boucle est présente dans les petits transcrits et absente dans les grands. Même si nos systèmes d'expression permettent d'obtenir les transcrits de différentes

tailles, nous n'avons pas détecté le miR-18. Il est probablement peu abondant à cause de la sous-régulation dans l'ensemble des miARN de son groupe ou à cause de l'excision post-transcriptionnelle.

Dans la lignée Ti6, deux miARN, miR-92-2 et miR-19b-2, n'ont pas montré un profil d'expression qui reflétait l'introduction du groupe miR106-363 par l'infection. Par contre, dans les NIH 3T3, nous avons observé que les cellules exprimant les constructions avec miR106-363 produisaient une quantité plus importante de miR-92-2 et miR-19b-2 que les cellules contrôles. L'expression du groupe miR-17-92 dans des lymphocytes, dont les deux miARN identiques à miR-92-2 et miR-19b-2 du groupe miR-106-363, camouflait vraisemblablement la contribution de miR-106-363. Dans les NIH 3T3, le groupe miR-17-92 n'est pas exprimé, c'est pourquoi la différence entre l'expérience et le contrôle devient apparente.

Les résultats obtenus avec miR-106 et miR-20 nous permettent de conclure que l'expression de ces deux miARN était dépendante de l'infection rétrovirale.

Une autre observation intéressante est que miR-19b-2 et miR-106a sont représentés par deux bandes dans les cellules Ti6 tandis que dans les NIH 3T3, il y a eu seulement une (voir fig. 3.4.3). L'examen d'autres résultats de Northern blots trouvés dans des articles déjà publiés a révélé l'existence de deux ou trois et même plus de bandes pour plusieurs miARN: miR-150, miR-181a et miR-195 dans les précurseurs des cellules T du thymus (Zhou et al., 2007), miR-16, miR-142s, miR-223 (4 bandes) dans les cellules de la moelle osseuse de la souris (Chen et al. 2004). Également, pour le miR-18a du groupe miR-17-92, Reddy et al. ont montré la présence de deux bandes par Northern blot dans tous les tissus porcins (Reddy et al., 2009).

Le travail de H. Wu et al. attire l'attention sur le polymorphisme des séquences des miARN matures dans les cellules T murines. Ils ont montré que dans ce type cellulaire la majorité des miARN matures existait dans deux ou plusieurs variations. La plupart des altérations (délétions ou extensions) a été observée à l'extrémité 3' (51%), l'hétérogénéité en 5' a été observée dans 4% des cas. Cela pourrait affecter la stabilité, la localisation subcellulaire, l'efficacité fonctionnelle des miARN, et même la spécificité pour leur cibles, surtout dans le cas des altérations de 5' «seed» région (Wu et al., 2007).

Le polymorphisme terminal des miARN apparaît comme un phénomène surprenant car l'exactitude des extrémités devrait assurer la spécificité de liaison des miARN à leurs ARNm cibles. En effet, la mutation d'un seul nucléotide peut amener à l'abolition de la répression (Brennecke et al., 2005). La production de plusieurs variations de miARN par les cellules T rapproche ces miARN aux siARN qui manifestent une hétérogénéité élevée au niveau des extrémités. Compte tenu de la grande précision de l'excision réalisée par Drosha/Dicer, il est peu probable que cette réaction soit à l'origine de ce polymorphisme. Wu et al. suggèrent qu'il serait probablement généré, en aval de la maturation par Drosha/Dicer, par une enzyme hypothétique qui posséderait une activité de modification des extrémités (Wu, et al, 2007).

Quelles sont les origines de ce polymorphisme dans les T lymphocytes? Même si les hypothèses essaient d'établir un lien entre le polymorphisme des miARN matures et la longue maturation des lymphocytes, leurs fonctions dans la cellule, ou leur implication dans la transformation maligne, la question demeure jusqu'ici sans réponse. L'absence d'hétérogénéité terminale dans les NIH 3T3 pourrait encore une fois souligner la différence entre les deux types cellulaires au niveau de la régulation par le réseau des miARN.

4.4 INDÉPENDANCE D'ANCRAGE

Dans le test d'indépendance d'ancrage, nous avons observé la concordance entre la production des miARN par les cellules et la capacité de ces dernières à proliférer en l'absence d'ancrage. Les cellules NIH 3T3-pMSCV-Kis2 qui ont montré la plus forte production des miARN du groupe miR106-363 ont également montré une plus importante perte d'ancrage (taille et nombre des colonies) par rapport aux cellules contrôle négatif (NIH-pMSCV). Dans les cellules NIH 3T3-pLNSX-Kis2miR, la production des miARN a été moins abondante mais cela était suffisant pour que les cellules forment 2 fois plus de colonies avec un diamètre important (0,7 mm) par rapport au contrôle négatif (NIH 3T3-pLNSX).

Un résultat, à première vue paradoxal, a été observé: la grandeur et le nombre de colonies formées par les fibroblastes non infectés ont été de même niveau que ceux des fibroblastes exprimant le groupe miR 106-363. En même temps, les colonies produites par les cellules infectées par les vecteurs vides ont été 2 fois plus petites et moins nombreuses.

Théoriquement, étant des cellules différenciées, les fibroblastes devraient être incapables de former des colonies en agar mou. Pourtant, plusieurs études soulignent que la population des fibroblastes en culture est hétérogène: il existe au moins sept phénotypes de fibroblastes ayant les morphologies différentes (Bayreuther et al. 1991). Ils se divisent en deux groupes – fibroblastes mitotiques (MF I, MF II, MF III) et post mitotiques (PMF IV, PMF V, PMF VI, PMF VII). Ces phénotypes évoluent de façon différentielle au cours des passages. Les conditions environnementales comme la qualité nutritionnelle du milieu de culture ou le stress pharmacologique modifient le pourcentage relatif des différents phénotypes non seulement pour le passage en cours mais aussi pour les passages ultérieurs. Lorsqu'on

sélectionne les cellules infectées dans le milieu contenant l'antibiotique, on peut accélérer l'évolution des fibroblastes post mitotiques jusqu'à leur stade terminal PMF VIIa où ils s'éliminent par apoptose. D'autres entrent en voie de transformation (stade PMF VIIb) et continuent à proliférer en donnant des colonies en milieu semi-liquide. Alors, c'est grâce à la plus grande hétérogénéité de la population que les NIH 3T3 non infectés ont formé deux fois plus de colonies que les cellules infectées par les vecteurs vides ayant subi la sélection.

Par ailleurs, la concentration de l'antibiotique que l'on utilise pour la sélection est assez élevée et représente un facteur de stress pour les cellules. La croissance cellulaire peut être affectée suite à l'inhibition de la synthèse des protéines induite par l'antibiotique. Cela pourrait résulter en une diminution du nombre et de la grandeur des colonies dans les cellules qui expriment seulement le vecteur vide.

Dans l'expérience où les cellules ont été transfectées avec l'oncogène *ras*, nous avons documenté une augmentation de la perte d'ancrage par rapport aux cellules non transfectées. Les gènes *ras* étant à l'origine de la transformation cellulaire permettent à la cellule de contourner au moins 3 obstacles de la voie de la transformation. En activant la cascade des MAP-kinase, les gènes *ras* confèrent aux cellules l'indépendance aux facteurs de croissance; en activant la voie Akt, ils leur permettent de résister à l'apoptose et en activant la voie Rac/PAK-kinase, ils induisent des changements morphologiques (cellules fusiformes contenant moins de fibres de stress) et la perte de l'inhibition par le contact (Kawada et al, 1997). La capacité de coopérer avec d'autres gènes est aussi la propriété reconnue de la famille *ras*. Les résultats de nos expériences suggèrent l'existence de coopération entre *ras* et le groupe miR106-363. Nous avons observé une hausse de la perte d'ancrage dans le contrôle négatif, dans le contrôle positif et dans les NIH 3T3-pMSCV-Kis2, mais il n'y avait pas de

changement dans les NIH 3T3-pLNSX-Kis2miR. Outre cela, nous n'avons pas observé l'indépendance aux facteurs de croissance, toutes les cellules expérimentales et contrôles ne poussaient pas dans le milieu dépourvu du sérum (résultats non inclus).

Ainsi, nous pouvons conclure, que l'expression stable des miARN du groupe miR 106-363 dans les fibroblastes NIH 3T3 a contribué à leur croissance maligne et montré la coopération avec *ras*.

CONCLUSION

En utilisant des vecteurs d'expression rétroviraux, nous avons établi des lignées stables dans deux types cellulaires différents, fibroblastique (NIH 3T3) et lymphocytaire (Ti6), qui surexpriment les miARN du groupe miR-106-363. Ces lignées pourront servir comme modèle pour l'étude de la fonction biologique de ce groupe, la recherche des partenaires d'interaction de ces miARN et surtout de nouvelles cibles.

L'expression du gène Kis2 sous différents promoteurs nous a permis d'obtenir plusieurs transcrits autres que la plus petite espèce de taille 0,6 kb qui apparaît comme résultat de transfection transitoire. Il s'agit de transcrit de taille 1,7 kb qui est produit par la construction pLXSN-Kis2 et de transcrit de taille 0,8 kb produit par la construction pMSCV-Kis2. Cela représente un modèle intéressant pour l'étude du rôle de l'épissage alternatif dans la régulation d'expression des miARN du groupe miR-106-363.

Les particules rétrovirales que nous avons produites pourront être utilisées pour infecter d'autres lignées cellulaires et réaliser des études *in vivo* chez la souris.

Les cellules qui expriment le gène de manière stable serviront comme source infinie du matériel permettant de conduire les expériences à plus grande échelle y compris l'étude des molécules inhibitrices pour le traitement de la leucémie de type T.

Pour finir, j'aimerais souligner les difficultés rencontrées au cours de mon travail et les améliorations que je pourrais apporter à ce projet.

- Il aurait été intéressant d'obtenir une construction contenant le gène-traceur EGFP. Ceci aurait facilité la détection de l'expression de mes constructions dans les cellules.
- Malgré mes efforts répétés pour détecter miR-363 en modifiant les conditions d'hybridation, cela s'est avéré sans succès. Il aurait été intéressant de déterminer l'expression de ce miARN car il est le seul du groupe qui ne soit pas exprimé par le groupe miR-17-92.
- De plus, la perte de la lignée NIH 3T3 -pLXSN-Kis2 ne m'a pas permis d'évaluer l'efficacité de cette construction.
- Il aurait été très instructif d'obtenir la séquence du transcrit de taille 1,7 kb produit par la lignée Ti6-pLXSN-Kis2.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ambros, V, Lee, R.C. 2004. «*Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning*». *Methods of Molecular Biology*, vol. 265, p.131-158.

Banerjee, D., Slack, F. 2002. «*Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression*». *Bioessays*, vol. 24(2), p.119-129.

Bartel, D.P. 2004. «*MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function*». *Cell*, vol. 116, p. 281-297.

Bayreuther K, Francz, P.I., Gogol, J., Hapke, C., Maier, M., Meinrath, H.G. 1991. «*Differentiation of primary and secondary fibroblasts in cell culture systems*». *Mutational Research*, vol. 256, p. 233–242.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M. 2005. «*Principles of microRNA-target recognition*». *PLoS Biology*, vol. 3, p. 404–418.

Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R. 2002. «*Stable suppression of tumorigenicity by virus mediated RNA interference*». *Cancer Cell*, vol. 2, p. 243-247.

Brummelkamp, T.R., Bernards, R., Agami, R. 2002. «*A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*». *Science*, vol. 296, p. 550-553.

Calin, G.A., Liu, C.G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., Dell'Aquila, M.L., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T.J., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M. 2004. «*Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*». *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 101, p. 2999-3004.

Cavazzana-Calvo, M., Gisselbrecht, S. 2005. «Mutagenèse insertionnelle et thérapie génique». *Hématologie*; vol. 11, n°3, p. 173-180

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. 1994. «*Green fluorescent protein as a marker for gene expression*». *Science*, vol. 263, p. 802-805.

Chan, J. A., Krichevsky, A.M., and Kosik, K.S. 2005. «*MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells*». *Cancer Research*, vol. 15; n° 65(14), p. 6029-6033.

Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F., Bartel, D.P. 2004. «*MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*». *Science*, vol. 303, p. 83-86.

Choi, S.Y., Faller, D.V. 1995. «*A transcript from the long terminal repeats of a murine retrovirus associated with trans activation of cellular genes*». *Journal of Virology*; vol. 69, p. 7054-7060

Coffin, J.M., Hughes, S.H., et Varmus, H.E. 1997. "Retroviruses". *Plainview (New York). Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

Devroe, E., Silver, P.A. 2002. «*Retrovirus-delivered siRNA*». *BMC Biotechnology*, vol. 2, p. 15.

Du, G., Yonekubo, J., Zeng, Y., Osisami, M., Frohman, M.A. 2006. «*Design of expression vectors for RNA interference based on miRNAs and RNA splicing*». *FEBS Journal*, vol. 273(23), p. 5421–5427.

Eis, P S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M.F., Lund, E., and Dahlberg, J.E. 2005. «*Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas*». *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 102(10), p. 3627-3632.

Grez, M., Akgün, E., Hilberg, F., Ostertag, W. 1990. «*Embryonic stem cell virus, a recombinant mirine retrovirus with expression in embryonic stem cells*». *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 87, p. 9202-9206.

Hartmann, C., Corre-Menguy, F., Boualem, A., Jovanovic, M., et Lelandais-Brière, C. 2004. «Les microARN: Une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique». *Medecine sciences*, vol. 20, p. 10.

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

Hwang, H.-W., and Mendel, J.T. 2006. *MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis*. *British Journal of Cancer*, vol. 94, p. 776-780.

Hwang, L.H., Gilboa, E. 1984. «*Expression of genes introduced into cells by retroviral infection is more efficient than that of genes introduced into cells by DNA transfection*». *Journal of Virology*, vol. 50(2), p. 417-424.

Hawley, R.G., Lieu, F.H., Fong, A.Z., Hawley, T.S. 1994. «*Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy*». *Gene Therapy*, vol.2, p. 136-138.

Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., Wimmer, E. 1988. «*A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation*». *Journal of Virology*, vol. 62, p. 2636-2643.

Jiang, J., Lee, E.J., Gusev, Y., Schmittgen, T.D. 2005. «*Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines*». *Nucleic Acids Research*, vol. 33(17), p. 5394-5403.

Jonkers, J, Bern, S. 1996. «*Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes*». *Biochemistry Biophysics Acta*, vol. 1287, p. 29-57.

Kawada, M., Yamagoe, S., Murakami, Y., Suzuki, K., Mizuno, S., Uehara, Y. 1997. «*Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway*». *Oncogene*, vol. 15, p. 629-637.

Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Kharpo, K., and Kosik, K.S. 2003. «*A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development*». *RNA*, vol. 9, p. 1274–1281.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. 2001. «*Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*». *Science*, vol. 294, p. 853-858.

Landais, S., Quantin, R., and Rassart, E. 2005. «*Radiation Leukemia Virus Common Integration at the Kis2 Locus: Simultaneous Overexpression of a Novel Noncoding RNA and of the Proximal Phf6 Gene*». *Journal of Virology*, vol. 79, n°17, p.11443-11456.

Landais, S., Landry, S., Legault, P. and Rassart, E. 2007. «*Oncogenic potential of the miR-106-363 cluster and its Implication in human T-cell leukemia*». *Cancer research*, vol. 67, p. 5699-5707.

Landais, S. 2007. «Caractérisation du site commun d'intégration Kis2: implication de miR-106-363 dans les leucémies de type T». Thèse de doctorat, Montréal, Université du Québec à Montréal.

Lai, A., Cairns, M.J., Tran, N., Zhang, H.P., Cullen, L., Arndt, G.M. 2009. «*RNA modulators of complex phenotypes in mammalian cells*». *PLoS One*, vol. 4(3), p. 47 58.

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P. 2001. «*An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*». *Science*, vol. 294(5543), p.858-862.

Lecellier, C.-H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann,-Che, J., Eyquem, S., Himber,, C., Saïb, A., Voinnet, O. A 2005. «*Cellular MicroRNA Mediates Antiviral Defense in Human Cells*». *Science*, vol. 308(5721), p.557-560.

Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.J., Ehsani, A., Salvaterra, P., Rossi, J. 2002. «*Expression of small interfering RNAs targeted against HIV1 rev transcripts in human cells*». *Natural Biotechnology*, vol.20, p. 500-505.

Lee, R.C., Ambros, V. 2001. «*An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*». *Science*, vol. 294(5543), p.862-864.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. 1993. «*The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*». *Cell*, vol. 75(5), p. 843-854.

Leffell, S.M., Mabon, S.A., Stewart, J.N. 1997. «*Application of green fluorescent protein in plants*». *Biotechniques*, vol. 23, p. 917-918.

Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., Bartel, D.P. 2003. «*Vertebrate microRNA genes*». *Science*, vol. 299(5612), p. 1540.

Liu, C.G., Calin, G.A., Meloon, B., Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Zupo, S., Dono, M., Alder, H., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C. M. 2004. «*An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues*». *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 101, p. 9740–9744.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. «*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*», Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Miller, A.D., Rosman, G.J. 1989. «*Improved retroviral vectors for gene transfer and expression*». *Biotechniques*, vol. 7, p. 980–990.

Mitchell, R.S., Beitzel, B.F., Schroder, A.R. 2004. «*Retroviral DNA integration : ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences.*» *PLoS Biology*, vol. 2, p. 234.

Miyagishi, M., Taira, K. 2002. «*U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells*». *Natural Biotechnology*, vol. 20, p. 497-500.

Moss, E.G., Lee R.C., 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*, vol. 88(5), p. 637-646.

Norris, P.S., Jepsen, K., and Haas, M. 1998. «*High-titer MSCV-based retrovirus generated in the pCL acute virus packaging system confers sustained gene expression in vivo*». *Journal of Virological Methods*, vol. 75, issue 2, p. 161-167

Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., Seto, M. 2004. «*Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma*». *Cancer Research*, vol. 64, p. 3087–3095.

Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F. A., Chien, M. J. J., Russo, Ju J., John, B, Enright, A. J., Marks, D., Sander, C., Tuschl, T. 2004. «*Identification of Virus-Encoded MicroRNAs*». *Science*, vol. 304, n°5671, p. 734-736.

Reddy, A.M., Zheng, Y., Jagadeeswaran, G., Macmil, S.L., Graham, W.B, Roe, B.A, Desilva, U., Zhang, W., and Sunkar R. 2009. «*Cloning, characterization and expression analysis of porcine microRNAs*» *BMC Genomics*, vol.10, p. 65.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A. 2004. «*Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*». *Genome Research*, vol.14, p. 1902–1910.

Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A.V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D.L., Ihrig, M.M., McManus, M.T., Gertler, F.B., Scott, M.L., Van Parijs, L. 2003. «*A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference*». *Natural Genetics*, vol. 33(3), p. 401-406.

Shen, C., Buck, A.K., Liu, X., Winkler, M., Reske, S.N. 2003. «*Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA*». *FEBS Letters*, vol. 539, p. 111-114.

Weber, M.J. 2005. «*New human and mouse microRNA genes found by homology search*». *FEBS Journal*, vol. 272, p. 59–73.

Wu, H., Neilson, J.R., Kumar, P., Manocha, M., Shankar, P., Sharp, P.A., Manjunath, N. 2007. «*MiRNA Profiling of Naïve, Effector and Memory CD8 T Cells* ». *PLoS One*, vol. 2(10), p. 1020.

Ying, S.-Y., and Lin, S.-L. 2004. «*Intron-derived microRNAs—fine tuning of gene functions*». *Gene*, vol. 342(1), p. 25–28.

Yu, J.Y., DeRuiter, S.L., Turner, D.L. 2002. «*RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells*». *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 99, p. 6047-6052.

Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D.P., Lodish, H.F. 2007. «*MiR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely*». *Proceedings of National Academy of Science USA*, vol. 104, p. 7080–7085.

<http://www.ambion.com/catalog/CatNum.php?1552>

<http://www.bioscience-explained.org/EN1.2/pdf/virusEN.pdf>

<http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/RETRO.HTM>

<http://www.stanford.edu/group/nolan/index.html>