THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212, deux miRNAs induits lors de la stimulation par le lipopolysaccharide de la lignée monocytaire humaine THP-

Wanet, Anaïs

Award date: 2011

Awarding institution: Universite de Namur

Link to publication

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- · Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
 You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 05. Nov. 2024



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

Etude de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212, deux miRNAs induits lors de la stimulation par le lipopolysaccharide de la lignée monocytaire humaine THP-1

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Anaïs WANET

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

Etude de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212, deux miRNAs induits lors de la stimulation par le lipopolysaccharide de la lignée monocytaire humaine THP-1

WANET Anaïs

Résumé

Les miRNAs jouent un rôle important dans la régulation de nombreux processus physiologiques et l'identification de leurs cibles moléculaires ne cesse de progresser. En revanche, les mécanismes contrôlant leur propre expression sont moins bien connus.

Nous nous sommes intéressés au miR-132, induit dans des monocytes et macrophages en réponse à divers stimuli pro-inflammatoires tels que le LPS. L'objectif de ce mémoire consistait en l'étude des mécanismes responsables de l'induction de ce miRNA dans les cellules THP-1 stimulées par le LPS. Le gène codant pour le miR-132 est localisé à proximité du miR-212, pour lequel aucun lien n'avait été établi avec le LPS avant ce travail. Nous avons tout d'abord démontré que ces 2 miRNAs étaient transcriptionnellement induits en réponse au LPS sous forme d'un même pri-miRNA. Afin d'identifier les facteurs de transcription responsables de cette induction, nous avons développé trois types d'approches. Nous avons tout d'abord étudié les résultats d'analyses bioinformatiques de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212 afin de localiser une région promotrice putative et d'identifier les sites de liaison putatifs de différents facteurs de transcription. Ensuite, nous avons construit un plasmide rapporteur sous le contrôle d'une région promotrice putative de ces miRNAs. Nous avons aussi testé, par l'intermédiaire de siRNA et d'inhibiteurs chimiques, le rôle potentiel des facteurs de transcription AP-1, NF-κB et CREB dans l'expression des miR-132 et miR-212. Les résultats de ces études sont en faveur d'un rôle du facteur CREB dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS.

Enfin, nous avons étudié l'abondance protéique de deux cibles rapportées du miR-132, SirT1 et p300. Les données obtenues nous laissent spéculer que p300 pourrait intervenir dans une boucle de rétro-régulation de l'expression des miR-132 et miR-212.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2011

Promoteur: P. Renard

Remerciements

Arrivée au terme de ces 10 mois de mémoire, je tiens à remercier de nombreuses personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à son élaboration.

Je souhaite tout d'abord remercier Thierry Arnould, ainsi que les autres Seniors de l'URBC de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je tiens ensuite à remercier ma promotrice, Patsy Renard, pour sa disponibilité, son suivi, ses conseils et critiques qui m'ont aiguillée tout au long des recherches mais aussi au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Un immense merci également à Aurélie, ma tutrice, pour sa présence, son aide, ses réponses à mes nombreuses questions, l'apprentissage des techniques, sa bonne humeur au quotidien et les nombreux fous rires que nous avons partagés au cours de ces 10 mois de recherche.

Merci aux membres de l'équipe Dyso, pour leurs remarques constructives lors des réunions, aux techniciens de l'URBC, pour leurs conseils, et de façon plus générale à tous les membres de l'URBC pour leur accueil.

Je remercie également Xavier De Bolle, pour son aide dans la construction du plasmide rapporteur et Frédéric Minner, pour ses conseils concernant les analyses statistiques des données.

Je tiens aussi à remercier mes cinq « co-bureauteurs » pour cette année passée en leur compagnie et particulièrement nos deux « Gossip girls » attitrées – elles se reconnaîtront – pour tous les bons moments que j'ai passé avec elles, ainsi qu'en présence des autres copains de bio.

Enfin, je tiens également à remercier mon entourage pour son soutien et ses encouragements tout au long de mes études.

Liste des abbréviations

5'TOP 5' terminal oligopyrimidine tract

AChE Acétylcholine estérase

ADAR Adenosine deaminases acting on RNA

ADN Acide désoxyribonucléique

Ago Argonaute

ALD Alcoholic liver disease AP-1 Activating protein 1

ARE Adenine/uridine rich elements

ARN Acide ribonucléique ARNm ARN messager

ARS2 Arsenate-resistance protein 2
ATF Activating transcription factor
BDNF Brain-derived neurotrophic factor
BMP Bone morphogenetic protein
BTG2 B-cell translocation gene 2
CBP CREB binding protein

CFU-GM Colony-forming unit for granulocytes-monocytes

ChIP Immunoprécipitation de chromatine

CMV Cytomégalovirus

CRE cAMP response element

CREB cAMP response element binding protein

DED Death effector domain

DGCR8 DiGeorge syndrome critical region gene 8

DMSO Diméthylsulfoxyde DTT Dithiothréitol

ECL Enhanced chemiluminescence EGF Epidermal growth factor

EGFR Epidermal growth factor receptor
Egr-1 Early growth response factor-1
eIF Eukaryotic initiation factor
Elk-1 Ets-like transcription factor-1

ERK Extracellular signal-regulated kinases

EST Expressed sequenced tag

ETF EGFR-specific transcription factor

Ets E-twenty six

Etv1 Ets transcript variant 1 FGF Fibroblast growth factor

FMRP Fragile-X-mental-retardation protein

g Gravité (9,81 m/sec²)

GADD45 α Growth Arrest and DNA Damage 45 α

GAP GTPase-activating protein

GM-CSF Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GnRH Gonadotropin-releasing hormone

HB-EGF Heparin-binding EGF-like growth factor hCG Gonadotrophine chorionique humaine

HCMV Human cytomegalovirus

HDAC Histone désacétylase

HEK 293 Human embryonic kidney 293 cells HMGN1 High-mobility group nucleosome

binding domain 1

HRP Horseradish peroxidase HSV-1 Herpes simplex virus-1

HUVEC Human Umbilical Vein Endothelial Cells

 $\begin{array}{ll} IKK & Kinases \ I\kappa B \\ IL & Interleukine \\ Inr-like & Initiator \ like \end{array}$

IPTGIsopropyl β-D-1-thiogalactopyranosideIRAK-1IL-1 receptor-associated kinase 1IRF3Interferon regulatory factor 3IRS-1Insulin receptor substrate 1

JARID1A Jumonji, AT-rich interactive domain 1A

JNK c-Jun NH2-terminal kinase

kb Kilobase kDa Kilo Dalton

KSHV Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus

LBP LPS-binding protein

LEC Cellules endothéliales lymphatiques

LH Hormone lutéïnisante LPS Lipopolysaccharide

MAPK Mitogen-activated protein kinase
MCP-1 Monocyte chemotactic protein-1
M-CSF Macrophage colony-stimulating factor

MeCP2 Methyl CpG-binding protein 2

mGluR Récepteur au glutamate métabotropique

miRNAs MicroRNAs

MMP-9 Matrix metalloproteinase 9

MSK Mitogen- and stress-activated protein kinase

NAD Nicotinamide adénosine dinucléotide

NF-кВ Nuclear factor-kappa B

NK Natural killer

PAIP2A Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2

PAMPs Pathogen-associated molecular patterns

pb Paires de bases

PBS Phosphate buffer saline

PED/PEA-15 Phosphoprotein enriched in diabetes/phosphoprotein enriched in

astrocytes

PI3K Phosphatidylinositol 3-kinase

PKA Protéine kinase A PKC Protéine kinase C

PMA Phorbol 12-myristate 13-acétate

polyA Poly-adénine

REST RE1 silencing transcription factor

RFX4 Regulatory factor X4

RISC RNA-induced silencing complex

ROCK-II Rho-associated kinase II RPM Rotations par minute

RSK Ribosomal s6 kinase RT Rétro-transcription

S6K1 p70 ribosomal protein S6 kinase 1

SACO Serial Analysis of Chromatin Occupancy

SAPK Stress-activated protein kinase SDN Small RNA degrading nuclease siCREB siRNA spécifiques de CREB

siNT siRNA non-target

sip65 siRNA spécifiques de p65 siRNA Small interfering RNA Sp1 Specificity protein 1

SPRED1 Sprouty-related, EVH1 domain containing 1

SRF Serum response factor

STAT-1 Signal transducers and activators of transcription-1

SV40 Simian virus 40

TAB
 TAK1-binding protein
 TAK
 TGF-β activated kinase
 TBK1
 TANK-binding kinase-1
 TBS
 Tris buffer saline

TF Tissue factor

TGF- β Transforming growth factor β TIR Toll/interleukin-1 receptor

TLR Toll-like receptor

TNF-α Tumor necrosis factor-α

TORC Transducer of regulated CREB
TRAF6 TNF receptor associated factor 6

TRAIL Tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

TRAM TRIF-related adapter molecule TRBP TAR RNA-binding protein

TRIF TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β

Tudor SN Tudor staphylococcal nuclease homolog

TUT4 Terminal uridylyltransferase 4

UTR Untranslated region

VSMC Vascular smooth muscle cells

ZO-1 Zonula occludens 1

Table des matières

| PREFACI | Ľ | , 4 |
|-------------|---|-------------|
| INTRODU | UCTION | 7 |
| | piogenèse, les mécanismes d'action et la régulation de | |
| | sion des microRNAs | 8 |
| | La biogenèse des miRNAs | |
| | Les fonctions des miRNAs | |
| 1.2.a. | | |
| | pression traductionnelle | |
| I.2.b. | | et |
| de la | transcription de gènes cibles | 10 |
| | La régulation de l'expression des miRNAs | |
| I.3.a. | | |
| | La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des miRNAs. | 14 |
| | plication des miRNAs dans l'inflammation et les contextes | |
| dans les | squels les miR-132 et miR-212 ont été décrits | . 15 |
| II.1. | Les miRNAs et l'inflammation se régulent mutuellement | . 15 |
| II.2. | Les miR-132 et miR-212 ont été décrits dans des contextes divers | : 16 |
| II.2.a | | |
| II.2.b | | |
| II.2.c | Les miR-132 et miR-212 dans le cadre du cancer | |
| II.2.d | • • • • • • • • • • • • • • • • • • • | |
| | es voies de signalisation induites par le LPS | |
| | Les PAMPs et TLR | |
| | L'activation des réponses cellulaires au LPS | 24 |
| III.2.a | | |
| dépe | endantes et indépendantes de MyD88 | 24 |
| III.2.k | | 25 |
| III.2.d | c. Les facteurs de transcription NF-кВ, AP-1 et CREB | 26 |
| OB.IECTI | FS | 27 |
| | | |
| MATERII | EL ET METHODES | 29 |
| I. Cult | ure et traitement des cellules THP-1 | . 30 |
| | Description de la lignée THP-1 | |
| | Culture cellulaire | |
| | Stimulation cellulaire | |
| I.3.a. | | |
| I.3.b. | | |
| I.3.c. | | |
| <i>I.4.</i> | Transfection de siRNA dans les THP-1 | |
| I.4.a. | Principe | 31 |
| I.4.b. | Optimisations de transfection de siRNA | 31 |
| I.4.c. | Transfection de sip65 et siCREB | 32 |
| II. Extr | actions protéiques et Western Blots | |
| | Extractions et dosages protéiques | |
| | Western Blots | |

| II.2.a. | Principe | |
|----------------|--|----------|
| II.2.b. | Méthode | |
| III. Extra | actions protéiques nucléaires et tests de liaison à l'AD | N de |
| facteurs de | e transcription | 35 |
| III.1. Ex | tractions protéiques nucléaires | 35 |
| III.1.a. | Principe | |
| III.1.b. | Méthode | |
| III.2. Tes | st de liaison à l'ADN (TransAM) | |
| III.2.a. | | |
| III.2.b. | Méthode | 36 |
| IV. Anal | yse de l'expression des miR-132 et miR-212 ainsi que d | de leur |
| | naire | |
| IV 1 | Extractions d'ARN | 36 |
| IV.1.a. | | 36 |
| | Extractions avec le TRI Reagent Solution (Ambion) | |
| IV.1.c. | | 37 |
| | Rétro-transcription et quantification de l'expression des mil | |
| | et du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel | |
| IV.2.a. | PrincipePrincipe | |
| IV.2.b. | Etude des formes matures | |
| IV.2.c. | Etude du pri-miR-132/212 | |
| = | struction d'un plasmide rapporteur encodant un promo | |
| | miR-132 et miR-212 et transfection de ce plasmide da | |
| • | • • • • • • • • • • • • • • • • • • • | |
| | IP-1 | |
| | ncipe | |
| | nstruction du plasmide rapporteur | |
| V.2.a. | Extraction de l'ADN génomique de cellules THP-1 et tentatives | |
| | fication du promoteur avec la Phusion polymérase | 40 |
| V.2.b. | Amplification et extraction des BAC (Bacterial Artificial Chrome 40 | osome) |
| V.2.c. | Amplification par PCR de la région promotrice putative des mil | D 122 of |
| v.z.c. -212 | 41 | n-132 et |
| V.2.d. | Purification et restriction diagnostique de la région promotrice | |
| putative | • | |
| V.2.e. | Clonage de la région promotrice putative des miR-132/212 | 41 |
| V.2.f. | Transformation du pSKOriTKan+promoteur en bactéries DH10 | |
| V.2.g. | Amplification des bactéries transformées par le pSKOriTKan+ | |
| | eur, vérification de la présence de l'insert par PCR et extraction o | du |
| plasmid | e42 | |
| V.2.h. | Clonage du promoteur putatif des miRNAs dans le pGL4.10 Lu | |
| V.2.i. | Transformation du pGL4.10 Luc2 + promoteur en bactéries DH | |
| amplific | ation des bactéries transformées, vérification de la présence de | l'insert |
| par PCF | Ret extraction du plasmide | 43 |
| | nnsfection du plasmide rapporteur dans les THP-1 | |
| V.3.a. | Optimisation de transfection plasmidique | |
| V.3.b. | Nucléofection et stimulation des cellules | |
| V.3.c. | Analyse des activités luciférase de Firefly et de Renilla | |
| VI. Anal | yses statistiques | 44 |
| RESULTAT | S ET DISCUSSION | 45 |
| I. Les mi | R-132 et miR-212 sont induits lors de la stimulation au | I PS |
| | s THP-1 | 46 |

| II. Etude de l'expression du pri-miR-132/212 | 48 |
|---|-----------|
| II.1. Les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique | |
| chez l'homme | 48 |
| II.2. Etude de l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel | 49 |
| III. Les miR-132 et miR-212 sont transcriptionnellement induits dan | |
| les cellules THP-1 stimulées au LPS | |
| IV. Les rôles d'AP-1, NF-κB et CREB dans l'expression des miR-132 | |
| · | |
| et miR-212 | ЭI |
| IV.1. Analyse bioinformatique de la région génomique encodant les | |
| miR-132 et miR-212 | <i>52</i> |
| IV.2. Inhibition du facteur de transcription AP-1 | |
| IV.3. Répression de CREB et p65 | 54 |
| IV.3.a. Optimisations de transfection de siRNA | 54 |
| IV.3.b. Transfection de siRNA contre CREB et p65 | |
| IV.4. Inhibition du facteur de transcription CREB | |
| V. Construction d'un plasmide rapporteur luciférase contenant un | |
| région promotrice putative des miR-132 et miR-212 | |
| V.1. Analyse de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212 | |
| sélection d'une région promotrice putative | |
| V.2. Construction du plasmide rapporteur | |
| V.3. Transfection du plasmide rapporteur dans les cellules THP-1 | 61 |
| V.3.a. Optimisation de la transfection plasmidique | 61 |
| V.3.b. Nucléofection du plasmide rapporteur contenant la région promotric | |
| putative des miR-132 et miR-212 | .61 |
| VI. Etude de l'expression de deux cibles du miR-132 : SirT1 et p300 | , |
| 64 | ~ 4 |
| VI.1. Etude de l'abondance de SirT1 | |
| VI.2. Etude de l'abondance de p300 | 65 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 67 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 76 |
| ANNEXES | 86 |
| | oo |
| Annexe 1 : Analyse des sites putatifs de liaison de facteurs de | |
| transcription dans la séquence génomique humaine comprise entre le | es |
| 5000 pb en amont du pre-miR-212 et l'extrémité avale pre-miR-132 | |
| (longueur totale : 5473 pb) | 87 |
| Annexe 2 : Résultats du séquençage de la région promotrice putative | |
| des miR-132 et miR-212 et alignement des séquences clonées à la | |
| séquence de référence « ref/NT_010718.16/ Homo sapiens | |
| · | |
| chromosome 17 genomic contig, GRCh37 reference primary | ^^ |
| • | 92 |
| Annexe 3 : Localisation des sites CREB importants pour la régulation | |
| transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 dans les neurones corticau | |
| murins stimulés par des neurotrophines | 97 |
| | |

Préface

Découverts en 1993 par Lee et ses collègues (Lee et al., 1993), les microRNAs (miRNAs) constituent une classe de petits ARN (acide ribonucléique) régulateurs d'environ 22 nucléotides capables de réguler l'expression des gènes essentiellement au niveau posttranscriptionnel en interagissant avec des ARN messagers (ARNm). Dans la plupart des cas, l'interaction entre les miRNAs et leurs ARNm cibles consiste en un appariement plus ou moins parfait entre la région 3'UTR (untranslated region) des ARNm et une région « seed » située entre les nucléotides 2 à 8 dans la région 5' des miRNAs. Selon le degré de complémentarité de cette interaction, les miRNAs induisent soit le clivage et la dégradation des ARNm (lorsque la complémentarité est parfaite ou presque parfaite), soit l'inhibition de leur traduction (lorsque l'appariement entre les miRNAs et leurs cibles est imparfait) (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Actuellement, environ 800 gènes encodant des miRNAs ont été identifiés dans le génome humain (Krol et al., 2010) et représenteraient 1 à 4% des gènes exprimés ; ils dépassent ainsi largement en nombre les autres grandes classes de régulateurs telles que les kinases (Ding et al., 2009). En outre, les prédictions bioinformatiques basées sur la reconnaissance entre la région « seed » des miRNAs et les 3'UTR des ARNm avancent que chaque miRNA pourrait avoir des douzaines voire des centaines de cibles (Ding et al., 2009, Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Un à deux tiers des gènes humains seraient ainsi sous le contrôle de miRNAs (Fabian et al., 2010), ce qui explique qu'ils soient impliqués dans de nombreux processus biologiques, tels que la différenciation cellulaire, le développement, la prolifération, l'apoptose, le contrôle du métabolisme ou encore l'inflammation (Kim et al., 2009, O'Connell et al., 2010), et que leur dérégulation soit associée à de nombreuses maladies (Ding et al., 2009, Breving and Esquela-Kerscher, 2009).

Afin de percevoir comment ces petits ARN régulateurs interviennent dans la physiologie cellulaire, il est nécessaire d'en identifier les cibles mais aussi de mieux comprendre comment leur propre expression est régulée. D'après les données de la littérature, il émerge que la régulation de l'expression des miRNAs s'effectue à trois niveaux principalement: au niveau de leur transcription, au niveau de leur biogenèse ainsi qu'au niveau de leur localisation subcellulaire (O'Connell et al., 2010). Au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à la régulation transcriptionnelle de deux miRNAs induits lors de la stimulation au lipopolysaccharide (LPS) de la lignée cellulaire monocytaire humaine THP-1, les miR-132 et miR-212 (Taganov et al., 2006, Pauley et al., 2010, Nahid et al., 2009). Afin d'aborder cette question, nous avons tout d'abord étudié la cinétique d'induction de ces deux miRNAs ainsi que celle de leur forme primaire. Nous avons ensuite combiné les prédictions bioinformatiques de différentes études (détaillées ultérieurement) afin de déterminer une région promotrice putative pour ces deux miRNAs et avons construit un plasmide rapporteur comportant cette région. Nous avons également testé le potentiel régulateur de plusieurs facteurs de transcription dans la régulation de l'expression des miR-132 et miR-212 au sein des cellules THP-1. Enfin, nous nous sommes aussi intéressés à l'expression protéique de deux cibles décrites du miR-132, qui pourraient elles-mêmes participer à des boucles de régulation de la transcription des miR-132 et miR-212, en modulant l'activité de facteurs de transcription jouant des rôles majeurs dans les réponses inflammatoires.

Afin de mieux comprendre le contexte dans lequel cette étude a été réalisée, nous reverrons tout d'abord les processus impliqués dans la biogenèse et la régulation de l'expression des miRNAs. Ensuite, nous décrirons brièvement les différents contextes dans lesquels les miR-132 et miR-212 ont été décrits et les rôles physiologiques qu'on leur connaît actuellement. Enfin, nous passerons également en revue les voies par lesquelles l'inflammation (et plus particulièrement l'exposition de cellules au LPS) induit l'activation de divers régulateurs

transcriptionnels, dont certains pourraient jouer un rôle dans l'expression des miR-132 et miR-212.

Introduction

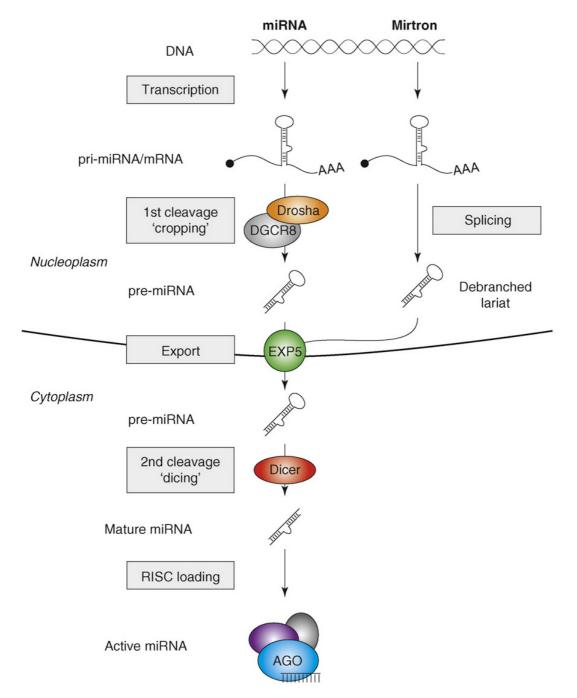


Figure 1.1: Biogenèse des miRNAs. Les gènes encodant les miRNAs sont tout d'abord transcrits en formes primaires, appelées pri-miRNAs, qui subissent dans le noyau une première étape de maturation par la protéine Drosha et son partenaire DGCR8 menant à la libération de pre-miRNAs. Les mirtrons génèrent directement des pre-miRNAs par épissage et échappent donc à cette étape de maturation. Les pre-miRNAs sont ensuite exportés dans le cytoplasme où un second clivage, réalisé par l'enzyme Dicer, permet la libération de duplexes de miRNAs. Les brins guides sont ensuite séparés des brins passagers et chargés sur des complexes RISC pour former des complexes miRISC actifs, lesquels peuvent se diriger vers des ARNm cibles afin de réprimer leur traduction ou induire leur dégradation (Ding, Weiler et al. 2009).

I. La biogenèse, les mécanismes d'action et la régulation de l'expression des microRNAs

I.1. La biogenèse des miRNAs

La biogenèse des miRNAs est un processus relativement complexe faisant intervenir différentes étapes de maturation (figure 1.1). La plupart des gènes encodant les miRNAs sont transcrits par l'ARN polymérase II (Lee et al., 2004) (la même enzyme que celle qui transcrit les gènes encodant des protéines) en une forme primaire, appelée « pri-miRNA », longue de plusieurs centaines ou milliers de nucléotides, portant une coiffe en son extrémité 5', une queue de poly-A (poly-adénine) au niveau de son extrémité 3' ainsi qu'une ou plusieurs structures secondaires en épingle à cheveux, ou « hairpin ». Ces structures sont reconnues et clivées au niveau de leur base dans le noyau par le complexe « Microprocesseur », composé d'une ribonucléase de type III, Drosha, ainsi que de protéines associées dont DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8). Ceci engendre la libération de précurseurs en hairpin nommés pre-miRNAs (Kim et al., 2009). Il est à noter que les mirtrons, une classe non canonique de miRNAs générés à partir de structures en hairpin introniques, sont directement convertis en pre-miRNAs suite à un évènement d'épissage et qu'ils échappent donc à l'étape de maturation dépendante de Drosha (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Les pre-miRNAs sont ensuite reconnus et exportés dans le cytoplasme par l'exportine 5 et son cofacteur Ran-GTP. Une fois dans le cytoplasme, les pre-miRNAs sont clivés à proximité de la boucle de la structure en hairpin par Dicer, une autre ribonucléase de type III opérant avec son partenaire protéique TRBP (TAR RNA-binding protein) et engendrant par ce processus la libération de duplexes de miRNAs d'environ 22 nucléotides (Kim et al., 2009). Ces duplexes sont composés d'un brin dit « guide » (miRNA) ainsi que d'un brin « passager » (miRNA*). Dans la plupart des cas, le brin guide est thermodynamiquement moins stable au niveau de son extrémité 5' et est, suite à l'action d'une hélicase, préférentiellement chargé sur le complexe effecteur RISC (RNA-induced silencing complex) pour former le complexe miRISC, tandis que le brin passager est dégradé. Néanmoins, certains exemples montrent qu'à la fois les miRNAs et miRNAs* peuvent être retenus dans les complexes RISC et cibler différentes populations d'ARNm (Breving and Esquela-Kerscher, 2009).

I.2. Les fonctions des miRNAs

En général, les miRNAs dirigent le complexe RISC vers leurs ARNm cibles suite à la complémentarité de séquence existant le plus souvent entre la région « seed » du miRNA et la 3'UTR de l'ARNm et induisent le clivage ou la répression de la traduction de l'ARNm selon le degré de complémentarité de l'appariement. Cette vision du mode d'action des miRNAs semble actuellement quelque peu simpliste car (i) des régions autres que la région « seed » des miRNAs interviennent aussi dans la reconnaissance des ARNm cibles ; (ii) les miRNAs reconnaissent des régions autres que la 3'UTR des ARNm (notamment des régions situées dans la 5'UTR ou dans la séquence codante) ; (iii) un appariement imparfait entre des miRNAs et leurs cibles conduit parfois à leur dégradation (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Par ailleurs, il a également été démontré que les miRNAs pouvaient moduler positivement l'expression des gènes au niveau de la traduction protéique ainsi qu'induire

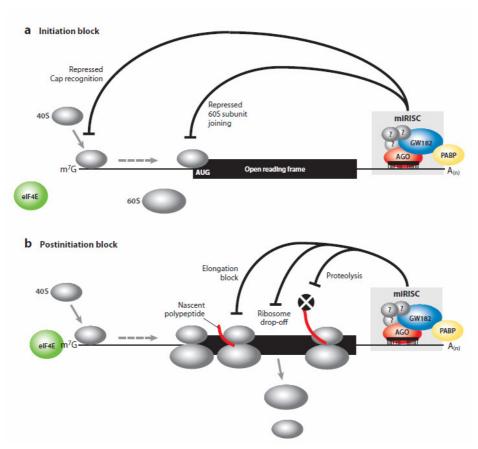


Figure 1.2: Répression de la traduction des ARNm par les miRNAs lors de l'initiation de la traduction (a) ou à un moment ultérieur (b). (a) Répression de la traduction des ARNm lors de l'initiation. Le complexe miRISC peut entrer en compétition avec le facteur eIF4F pour la liaison de la coiffe et empêcher de cette façon le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome, ou empêcher la liaison de la sous-unité 60S du ribosome et ainsi empêcher la formation du complexe ribosomal 80S. (b) Répression de la traduction des ARNm après l'initiation. Le complexe miRISC pourrait inhiber l'élongation du transcrit par les ribosomes, induire un décrochement des ribosomes ou favoriser la dégradation des transcrits naissant. Aucun mécanisme n'a cependant encore été mis en évidence pour supporter ces modèles (Fabian, Sonenberg et al. 2010).

l'expression de gènes en ciblant leur promoteur (Vasudevan et al., 2007, Verdel et al., 2009, Place et al., 2008, Huang et al., 2010).

I.2.a. Les fonctions répressives des miRNAs : dégradation des ARNm cibles et répression traductionnelle

Le composant clé du complexe RISC est la protéine Argonaute, dont il existe quatre membres (Ago1-4/eIF2C) chez les mammifères. Ago2 est le seul membre doué d'une activité de « slicing », c'est-à-dire de clivage endonucléolytique de l'ARNm cible au milieu de la région de complémentarité entre cet ARNm et le miRNA (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Toutes les protéines Ago présentent par contre la capacité de réprimer la traduction de l'ARNm en protéine ainsi que d'altérer la stabilité de l'ARNm cible par l'intermédiaire de mécanismes autres que le slicing (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Il est possible que l'abondance relative des différents membres de la famille Ago dans les cellules influence l'efficacité de la répression exercée par les miRNAs dans différents tissus ou types cellulaires (Krol et al., 2010). Outre ces protéines, le complexe miRISC est composé d'autres membres tels que le marqueur de corps P (« P bodies ») GW182, essentiel à la fonction répressive des miRNAs (Krol et al., 2010), des protéines liant l'ARN telles que la protéine FMRP (fragile-Xmental-retardation protein), ainsi que de protéines appartenant à la famille des hélicases DExD/H comme l'activateur de décoiffage RCK/p54. Il est probable que ce soit la combinaison de ces protéines dans le complexe miRISC qui influence le type de régulation de l'expression des cibles des miRNAs (dégradation de l'ARNm ou répression de la traduction) ainsi que son efficacité (Breving and Esquela-Kerscher, 2009, Krol et al., 2010).

Les miRNAs qui répriment la traduction protéique de leurs ARNm cibles exercent leur contrôle soit lors de l'initiation de la traduction, soit à une étape ultérieure (figure 1.2). Ici encore, ce sont probablement les diverses protéines entrant dans la composition du complexe miRISC qui déterminent ce choix. Il a été démontré que Ago2 pouvait bloquer l'initiation de la traduction en entrant en compétition avec eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) pour lier la coiffe de l'ARNm ou en interagissant avec eIF6, empêchant ainsi l'assemblage des sous-unités 40S et 60S du ribosome. Les miRNAs peuvent également perturber l'initiation de la traduction des ARNm auxquels ils sont associés en bloquant la liaison de la poly-A binding protein (Zhao and Liu, 2009, Breving and Esquela-Kerscher, 2009, Ding et al., 2009). D'autres études ont montré que dans certains cas, l'initiation de la traduction se déroulait normalement mais que par un mécanisme encore inconnu, l'élongation était stoppée et le transcrit naissant, dégradé. Selon certaines hypothèses, il se pourrait que la présence des miRNAs sur les ARNm provoque un décrochage accru des ribosomes, conduisant à une terminaison précoce de la traduction et à la formation de protéines immatures rapidement dégradées (Zhao and Liu, 2009, Fabian et al., 2010).

Différents mécanismes sont également impliqués lorsque les miRNAs entraînent une dégradation de leurs ARNm cibles. L'ARNm peut être slicé, clivé en dehors de sa région de complémentarité avec le miRNA, déadénylé ou encore décoiffé et ensuite dégradé. Enfin, les ARNm associés aux complexes miRISC peuvent être relocalisés au niveau de structures cytoplasmiques appelées corps P, enrichies en facteurs de dégradation et de répression traductionnelle des ARNm (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). La formation des corps P et la répression exercée par les miRNAs seraient d'ailleurs liées : il a été remarqué que la répression de la formation des corps P inhibait la répression exercée par les miRNAs au niveau de la traduction et que la répression des fonctions exercées par le complexe RISC

inhibait non seulement le silençage dépendant des miRNAs mais aussi la formation des corps P (Zhao and Liu, 2009).

I.2.b. Les fonctions activatrices des miRNAs : activation de la traduction et de la transcription de gènes cibles

Outre les fonctions classiques de répression traductionnelle et de dégradation des ARNm, de nouvelles fonctions non canoniques des miRNAs ont été découvertes. Par exemple, il a été démontré que des miRNAs pouvaient réprimer ou activer la traduction protéique en fonction de la présence ou non de sérum dans le milieu de culture au cours du cycle cellulaire (Vasudevan et al., 2007). Cette capacité des miRNAs à activer la traduction dépend de la présence d'éléments ARE (adenine/uridine rich elements) dans les séquences de leurs ARNm cibles. Les éléments ARE sont situés dans la région 3'UTR de certains ARNm dont ils réduisent fortement la stabilité. Cependant, lorsque les miRNAs et les protéines Ago et FXRP qui composent le complexe miRISC sont recrutés au niveau de ces éléments, la traduction des ARNm cibles est augmentée. D'autres miRNAs activent la traduction de leurs cibles en agissant par des mécanismes différents. Les miR-10a et miR-122 par exemple, se lient aux motifs 5'TOP (5' terminal oligopyrimidine tract) situés dans les 5'UTR de certains ARNm et favorisent leur traduction (Breving and Esquela-Kerscher, 2009, Zhao and Liu, 2009, Krol et al., 2010).

Par ailleurs, il a également été démontré que le miR-373 était capable d'induire la transcription de gènes cibles en se liant à des séquences complémentaires situées dans le promoteur de ces gènes. Si le mécanisme exact d'activation de la transcription reste encore obscur à l'heure actuelle, on sait qu'il nécessite une complémentarité entre le miRNA et la région promotrice ciblée et qu'il fait intervenir des remaniements de la chromatine (Place et al., 2008). Bien qu'à l'heure actuelle et à notre connaissance, le miR-373 soit le seul pour lequel il ait été démontré une telle aptitude, de futures recherches devraient permettre de déterminer si cette fonction est partagée par d'autres miRNAs.

I.3. La régulation de l'expression des miRNAs

Comme nous l'avons mentionné précédemment, on considère actuellement que l'expression des miRNAs est régulée à trois niveaux principalement : au niveau de leur transcription, au niveau de leur maturation ainsi qu'au niveau de leur localisation subcellulaire (O'Connell et al., 2010) ; chacun de ces niveaux pouvant être lui-même affecté par différentes formes de stress cellulaires, dont l'inflammation.

I.3.a. La régulation transcriptionnelle des miRNAs

Bien que la régulation transcriptionnelle soit considérée comme la principale étape de contrôle de l'expression des miRNAs (Fazi and Nervi, 2008), elle est nettement moins connue que leur biogenèse. Les gènes encodant les miRNAs présentent différents types d'organisation génomique, illustrés à la figure 1.3. On distingue les miRNAs intergéniques (qui représentent environ 50% des miRNAs), situés en dehors des unités de transcription connues, des miRNAs géniques, introniques ou exoniques, situés au sein de gènes annotés, codants ou non codants (Kim et al., 2009). Les miRNAs intergéniques disposent de leur

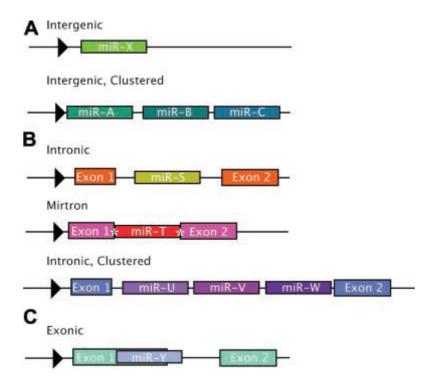


Figure 1.3: Localisation et organisation génomique des miRNAs. A. Les miRNAs intergéniques sont situés en dehors des unités de transcription connues ; ils disposent de leur propre promoteur (illustré par une flèche noire) et peuvent se présenter sous forme monocistronique (au-dessus) ou polycistronique (en dessous). B. Les miRNAs introniques sont situés au sein des introns de gènes annotés et sont la plupart du temps transcrits à partir du même promoteur que leur gène hôte. Ils peuvent également se présenter sous forme monocistronique (au-dessus) ou polycistronique (en dessous). Les mirtrons constituent une forme particulière de miRNAs introniques dont la séquence du pre-miRNA coïncide exactement avec celle de l'intron (les sites d'épissage sont représentés par des étoiles blanches). C. Les miRNAs exoniques, plus rares, chevauchent la plupart du temps un exon et un intron d'un gène non codant. Ils sont également le plus souvent sous le contrôle du promoteur de leur gène hôte (Olena and Patton 2010).

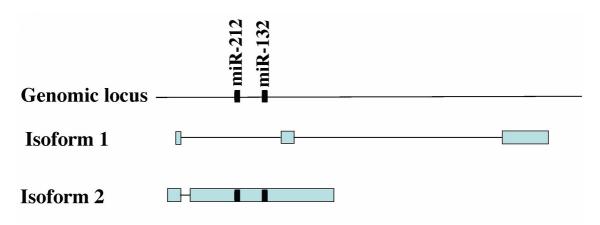


Figure 1.4: Identification de variants d'épissage alternatif du locus encodant les miR-132 et miR-212 murins. Les rectangles noirs illustrent les séquences des pre-miR-132 et pre-miR-212, les boîtes bleues représentent les exons et les lignes entre les boîtes bleues, les introns (Ucar, Vafaizadeh et al. 2010).

propre promoteur, tandis que les miRNAs géniques sont la plupart du temps transcrits sous le contrôle du promoteur de leur gène hôte (Olena and Patton, 2010), bien qu'il ait été suggéré récemment qu'une fraction considérable (25 à 35% environ) des miRNAs géniques disposeraient de leur propre promoteur (Corcoran et al., 2009, Wang et al., 2009, Ozsolak et al., 2008, Monteys et al., 2010). Selon Ozsolak, les miRNAs introniques situés assez loin du promoteur de leur gène hôte (plusieurs dizaines de kilobases (kb)) auraient rapidement évolué de façon à acquérir leur propre promoteur, afin de rendre la transcription plus rapide et efficace. En outre, il a été observé que les miRNAs introniques les mieux conservés au cours de l'évolution étaient ceux qui disposaient de leur propre promoteur. Ceci suggère que suite à leur apparition, les miRNAs introniques utiliseraient d'abord le promoteur de leur gène hôte et acquerraient par la suite un promoteur indépendant (Ozsolak et al., 2008). En ce qui concerne les miR-132 et -212 étudiés au cours de ce mémoire, ils sont situés en région intergénique chez l'homme; néanmoins, il est intéressant de noter que ces mêmes deux miRNAs sont situés au sein de l'intron 1 d'un gène non codant chez le rat (Vo et al., 2005) et la souris (Remenyi et al., 2010) ou, comme ce fut identifié plus récemment, au sein de l'exon 2 d'un variant d'épissage alternatif de ce gène (figure 1.4) (Ucar et al., 2010). Par ailleurs, il a été démontré que les miRNAs distants de moins de 5 kb avaient généralement des profils d'expression corrélés, ce qui suggère qu'ils seraient produits à partir d'un même transcrit polycistronique (Baskerville and Bartel, 2005). Environ 50% des miRNAs seraient ainsi disposés en clusters (Kim et al., 2009), configuration dans laquelle se situent les miR-132 et -212 chez la souris (Fiedler et al., 2008) mais aussi chez l'homme, comme cela a été démontré au cours de ce mémoire.

Plusieurs approches ont été proposées jusqu'à présent pour localiser et caractériser les promoteurs des gènes encodant les miRNAs. Certains auteurs (Barroso-delJesus et al., 2008, Fujita et al., 2008) ont par exemple réalisé des études de génomique comparative et ont analysé la conservation entre les espèces afin de déterminer les régions promotrices de miRNAs, avant de vérifier leurs prédictions de façon expérimentale. Néanmoins, ces études sont restreintes à quelques miRNAs et ne permettent pas une caractérisation détaillée et à large échelle des régions promotrices des miRNAs.

Pour aborder ce problème, Zhou et son équipe (Zhou et al., 2007) ont développé un algorithme appelé « CoVote » destiné à identifier les promoteurs putatifs de miRNAs intergéniques au sein de 4 espèces, Caenorhabditis elegans, Homo sapiens, Arabidopsis thaliana et Oryza sativa. Le promoteur putatif du miR-212 humain identifié par cet algorithme est illustré à la figure 1.5. L'algorithme CoVote est basé sur le fait que des gènes transcrits par l'ARN polymérase II devraient présenter des caractéristiques communes, notamment des motifs de liaison pour des facteurs de transcription impliqués dans le recrutement de la machinerie basale de transcription. En analysant les régions situées en amont des pre-miRNAs et pri-miRNAs, ces chercheurs ont mis en évidence que la plupart des promoteurs principaux (« core promoter ») des gènes encodant des miRNAs étaient situés assez près de la structure en hairpin du pre-miRNA et près de la première hairpin du premiRNA dans le cas des miRNAs en clusters transcrits de façon polycistronique. En outre, l'analyse des motifs situés au sein des promoteurs principaux indique que ceux-ci comportent de nombreux éléments en cis essentiels à l'initiation de la transcription. Les auteurs ont également révélé que des éléments Inr-like (initiator like), assez communs dans les promoteurs de gènes encodant des protéines, étaient également présents dans les promoteurs des gènes encodant des miRNAs. Par contre, les chercheurs ont déduit de leurs observations que chez l'homme, de même que chez C. elegans, les boîtes TATA ne semblaient pas nécessaires à la transcription de la plupart des miRNAs.

GGACGACACCCGGAGCCCTGAACGCCAGCCGCCAGCCGCGATGGGGCACCCGCGCCAGAAGATGCACCCGAGGCGGCCGA GCCGAGCTCTCCTGGAACTCCCCGTAGACATTACTGTACGGCACTGTCCACTTGGACGCACTCCCCAACACACCCCACCCTCA TGTTTCCAGAAGCACACCCGCCCTTCCCGCAGCCCTAGCGCTCTGGGATACTCCAGGGGCAGCCACGTAGGGCCCTCCGGG AACCTGGGCAGAGGTGTTACCCACACAGCCCGCCCTGAACTTTCGGGTCTCCTAAAGGAACCCACGACGAGTCATCAGGGC GACTGGAAGTGGCTGGACAGCGCCTCCGGGGGGTCCAAAGAAGTAACCATGGGGCCCTAGAATCCCCCTGTACGCCGTTTT ${\tt CCTCATAAGTGCTCCTAGAGCTGGGCTTTGACGGATGAATAGGAGTTCTTCTACCGAGCAGGAAGGCATTTGTGAATAACA}$ ${\tt CCATCTCTTTTATCTTTTTGATAGAGTCAGATCCCCCACCCCGACTTCCAAAGAGCCCCTCCGCCCCATGTATCTT}$ TCAAGCCCTCATTGCTTCTGTAAGGGAGGGTCTCACAGCCCTGCCCCAGCCCCAGGCCCCTAACCCCCTCCTCAAGCCCTCATTGCCCTCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCCCTGCCCGGCTCTTCCGGCCATGCCTTGCACAGCCCTCCCCATCCTG GTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTTAGACCCTTCCTCCATCTCGATGGAGCCAGGCTGGGCCAGGACCATGC ATTTCCCCGCTCCCAACCAGGGGAACTGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAACTT $\tt CTCCAGGAAACCGTCCTCATCCCCTGGGGGCCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTCTCCTTCACTCT {\color{red}} {\color{re$ ATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCCACCTTCCCCAACTTCTCTGCCGTCCCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTG CTTCTTCTCCCGGCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCCACGGGAGTCCAGCTTCCTCTCTCCCCCACCCTGGCGGCGGTGGGGCCCCTCCGGGGTGGGGATGGGGGCGGACGGGGGCACCGGGGTCCCCTCGCGGCTGCGGAGCC GGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGGCGCCCGATGGACAC▶ ▶ GCAGCTACTTCGGAGGAGCATCGA GGGCGCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGCGCCCACGGCTTCCCGCCTCTGCGAGCGGAGCTGTCCTCT $AGGCGGAGCAGCAGS {\tt tart} AGCCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGACCCGGCCCGGACAGCGCGCCGGCACCTT$ GGCTCTAGACTGCTTACTGCCCGGGCCGCCCTCAGTAACAGTCTCCAGTCACGGCCACCGACGCCTGGCCCCGCCCCAGGAC CCATGGTCGCCCGCAGCACGCCCACGCGCGCCCCCCCCGCGCCCCGAGCCGGGCTGGGGACGCGGAGCAGAAGGA

Zone de répétitions

Figure 1.5: Localisation des régions promotrices putatives des miR-132 et miR-212 prédites dans différentes publications. La séquence illustrée sur cette figure est extraite du contig «NT_010718.16l: 1556376-1562048 Homo Sapiens chromosome 17 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly » (disponible sur le site web du NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Elle s'étend de 5000 pb en amont du pre-miR-212 à 200 pb en aval du pre-miR-132. Les séquences correspondant aux miRNAs matures sont surlignées en gris foncé (miR-212 en amont; miR-132 en aval) et celles correspondant aux pre-miRNAs en gris clair. La région promotrice putative prédite par (Zhou, Ruan et al. 2007) est comprise entre les flèches rouges, celle prédite par (Marson, Levine et al. 2008) entre les flèches oranges et l'extrémité amont de celle définie par (Wang, Wang et al. 2010) est indiquée en bleu (l'extrémité avale du promoteur identifié au cours de cette étude est située 770 nucléotides en aval du pre-miR-132 et n'est donc pas illustrée sur cette figure). Ces derniers auteurs ont également identifié deux sites putatifs d'initiation de la transcription (indiqués en bleu); le plus en amont représente celui du miR-212 et le plus en aval celui du miR-132. Le site putatif d'initiation de la transcription identifié à l'aide du logiciel CoreBoost_HM est indiqué en vert (Wang, Xuan et al. 2009).

Afin d'étudier la structure des transcrits primaires de miRNAs intergéniques et d'en délimiter les extrémités, Saini et ses collègues (Saini et al., 2007) ont étudié à large échelle les sites d'initiation de la transcription, les signaux de polyadénylation, les îlots CpG, les données d'EST (expressed sequenced tag), les sites de liaison pour des facteurs de transcription ainsi que les signaux déterminant les extrémités 5' et 3' des transcrits. Ces données leur ont permis de mettre en évidence que les sites d'initiation de la transcription colocalisent avec les îlots CpG endéans les 4 kb en amont des séquences des miRNAs, ce qui suggère que le promoteur des miRNAs intergéniques se situerait dans la plupart des cas endéans les 4 kb en amont du pre-miRNA. L'analyse des sites de liaison putatifs pour les facteurs de transcription, qui permet de prédire la localisation du promoteur principal des gènes encodant des miRNAs, suggère également que celui-ci serait localisé à proximité du pre-miRNA, ce qui conforte les résultats obtenus par Zhou *et al*. Enfin, les auteurs ont également mis en évidence que la plupart des pri-miRNAs intergéniques auraient une longueur comprise entre 3 et 4 kb ainsi que des extrémités définies par le site d'initiation de la transcription d'une part et la présence d'un signal de queue poly(A) d'autre part.

Corcoran et ses collègues (Corcoran et al., 2009) ont quant à eux réalisé des immunoprécipitations de chromatine de l'ARN polymérase II suivies d'une analyse sur damier comportant des sondes de capture pour les régions bordant les gènes de miRNAs connus afin d'identifier les régions promotrices de ces miRNAs. Ils ont ensuite développé un programme nommé CPPP (Core Promoter Prediction Program) afin d'identifier les sites d'initiation de la transcription des miRNAs. Contrairement à ce qu'avaient suggéré Zhou et ses collègues, cette étude a démontré que les miRNAs intergéniques et quelques miRNAs géniques pouvaient être transcrits par l'ARN polymérase II au delà de 40 kb en amont du premiRNA, ce qui suggère que les pri-miRNAs pourraient être beaucoup plus longs que ce qui avait été initialement proposé. En revanche, ces chercheurs ont également observé que les promoteurs des miRNAs présentaient des caractéristiques semblables à celles que démontrent les promoteurs de gènes encodant des protéines, en ce qui concerne le contenu en GC et les profils de liaison des facteurs de transcription à l'ADN (acide désoxyribonucléique). Ceci conforte les résultats rapportés par Zhou. Une autre équipe s'est également basée sur des immunoprécipitations de chromatine pour déterminer les régions promotrices putatives de miRNAs. Ces chercheurs ont utilisé les données de ChIP-seq (immunoprécipitation de chromatine suivie du séquençage des régions immunoprécipitées) de l'ARN polymérase II et du facteur de transcription STAT-1 (signal transducers and activators of transcription-1) dans des cellules HeLa stimulées ou non à l'interféron gamma pour déterminer les régions promotrices putatives de 83 miRNAs présentant un promoteur actif dans ces conditions. Parmi ces 83 miRNAs sont inclus les miR-132 et miR-212 (la figure 1.5 illustre la région promotrice putative ainsi que les sites putatifs d'initiation de la transcription des miR-132 et miR-212). Ces chercheurs ont en outre déterminé que 60% des promoteurs identifiés avaient une longueur comprise entre 1 et 2 kb et que 34% des sites d'initiation de la transcription étaient situés endéans les 2 kb en amont du pre-miRNA considéré (figure 1.6) (Wang et al., 2010).

L'équipe de Marson (Marson et al., 2008) s'est quant à elle basée sur la présence d'une modification spécifique au niveau de l'histone H3 pour déterminer les régions d'initiation de la transcription. En effet, il a été démontré que l'histone H3 était triméthylée sur son résidu lysine 4 au niveau du site d'initiation de la transcription de la plupart des gènes, même lorsque ceux-ci sont peu transcrits. De plus, cette modification est spécifique aux sites d'initiation de la transcription (Barski et al., 2007). Marson et ses collègues ont donc utilisé cette

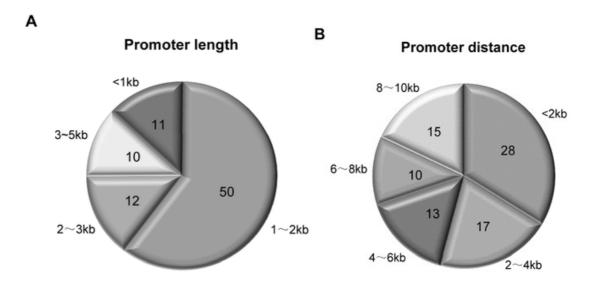


Figure 1.6 : Statistiques concernant les prédictions de promoteurs de miRNAs. Les diagrammes montrent le nombre de miRNAs (sur les 83 identifiés lors de l'étude) présentant les différentes gammes de longueur de promoteur (A) ainsi que les gammes de distance des sites d'initiation de la transcription par rapport aux pre-miRNAs annotés (B) (Wang, Wang et al. 2010).

caractéristique afin de déterminer des sites putatifs d'initiation de la transcription de gènes encodant des miRNAs candidats (la région promotrice putative des miR-132 et -212 identifiée par cette équipe est également illustrée à la figure 1.5). Ils ont ensuite conforté leurs prédictions en les conjuguant aux données d'annotation des miRNAs (un score élevé était attribué si le site putatif d'initiation de la transcription se trouvait endéans les 5 kb en amont du miRNA), aux sets d'EST disponibles, ainsi qu'en comparant la conservation entre l'homme et la souris. Grâce aux données des sets d'EST, les chercheurs ont démontré que les transcrits prédits trouvaient effectivement leur origine au niveau des sites d'initiation de la transcription identifiés par leur méthode et continuaient le long des loci annotés des miRNAs matures (Marson et al., 2008). De plus, les régions identifiées comme étant des sites d'initiation de la transcription contiennent des îlots CpG, or ceux-ci sont souvent associés aux promoteurs. En utilisant une approche tout à fait similaire, basée sur les modifications des histones et la présence de motifs particuliers sur l'ADN, Wang et ses collègues (Wang et al., 2009) ont développé un logiciel nommé CoreBoost_HM permettant d'identifier les promoteurs principaux de gènes transcrits par l'ARN polymerase II et applicable aux miRNAs. La figure 1.5 illustre le site d'initiation de la transcription des miR-132 et -212 identifié par ce logiciel.

Ozsolak et ses collègues (Ozsolak et al., 2008) ont également développé une stratégie basée sur les modifications liées à la chromatine afin d'identifier les régions promotrices et les sites d'initiation de la transcription des miRNAs. En effet, ces chercheurs ont basé leurs études sur des modifications spécifiques des histones, la méthylation du résidu lysine 4 de l'histone 3 déjà mentionnée, ainsi que l'acétylation des lysines 9 et 14 de cette même protéine, afin d'identifier les régions promotrices transcriptionnellement actives. En outre, ces chercheurs ont exploité l'observation – réalisée entre autres par cette même équipe – selon laquelle la chromatine située au niveau des gènes transcrits et des sites de liaison des facteurs de transcription est déplétée en nucléosomes autour des sites d'initiation de la transcription. Cette démarche leur a permis d'identifier les promoteurs de 175 miRNAs humains et de mettre en évidence qu'il existe une région d'environ 70 pb (paires de bases) déplétée en nucléosomes au niveau du promoteur principal et du site d'initiation de la transcription. Etant donné que les facteurs de transcription se lient préférentiellement au niveau de ces zones dépourvues en nucléosomes, les auteurs ont suggéré la présence, dans ces régions, de sites de liaison pour les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression des miRNAs. D'autre part, les chercheurs ont aussi observé que les régions correspondant aux formes matures des miRNAs étaient, contrairement aux régions promotrices, particulièrement enrichies en nucléosomes. Selon les auteurs, cette caractéristique pourrait résulter de marques épigénétiques encore non connues et jouer un rôle dans la maturation des miRNAs, en promouvant le recrutement des protéines impliquées dans leur biogenèse.

Si ces différentes études ont permis d'établir les caractéristiques générales et d'identifier des régions promotrices putatives pour de nombreux miRNAs, il en ressort que la régulation transcriptionnelle des miRNAs s'avère aussi complexe que celle des gènes encodant des protéines. En effet, il semble que les promoteurs des miRNAs soient sujets à des contrôles tant positifs que négatifs exercés par des facteurs de transcription, des enhancers, des éléments de silençage ainsi que des modifications épigénétiques (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Ainsi, afin de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle de miRNAs particuliers, des études au cas par cas impliquant des validations expérimentales semblent nécessaires. Au cours de ce mémoire, nous avons donc construit un plasmide rapporteur contenant une région promotrice putative des miR-132 et miR-212 humains, déterminée sur base des prédictions réalisées dans les études décrites ci-dessus. Cette approche a été développée dans l'optique de

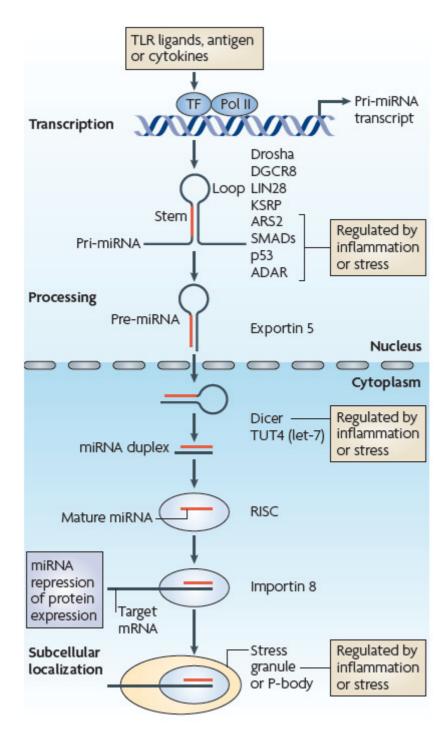


Figure 1.7: La régulation de l'expression des miRNAs par les stress. L'expression des miRNAs est régulée à trois niveaux essentiellement (au niveau de la transcription, de la maturation et de la localisation subcellulaire), chacun d'entre eux pouvant être affecté par l'inflammation ou différentes formes de stress cellulaire. Tout d'abord, la transcription des miRNAs peut être contrôlée par des facteurs de transcription induits lors des réponses immunes (suite à une stimulation des TLR (Toll-like receptors), à la détection de cytokines pro-inflammatoires ou d'antigènes). Ensuite, la maturation des primiRNAs en pre-miRNAs peut être modulée par la présence de toute une série de facteurs dont certains sont affectés par l'inflammation. La conversion des pre-miRNAs en miRNAs matures peut également être influencée par l'inflammation ou les stress cellulaires. Enfin, l'inflammation et les stress peuvent modifier la localisation subcellulaire des miRNAs matures, en dirigeant ceux-ci vers les granules de stress ou les corps P (O'Connell, Rao et al. 2010).

valider expérimentalement la localisation du promoteur principal de ces miRNAs ainsi que le rôle de certains facteurs de transcription dans le contrôle de l'expression des miR-132 et -212.

I.3.b. La régulation post-transcriptionnelle de l'expression des miRNAs

Bien que le contrôle transcriptionnel soit une étape clé de la régulation de l'expression des miRNAs (Fazi and Nervi, 2008), on n'observe pas toujours une corrélation exacte entre l'expression des pri-miRNAs et leur forme mature (Thomson et al., 2006); ceci suggère l'existence d'autres niveaux de contrôle assurant le maintien de taux optimaux de miRNAs dans les cellules.

Régulation de la voie de biogenèse des miRNAs

Au niveau de la biogenèse des miRNAs, l'étape de maturation dépendante de Drosha est sujette à différentes formes de régulation (figure 1.7). Par exemple, il a été démontré que l'activation des protéines SMAD en aval de la voie BMP (bone morphogenetic protein)/TGF-β (transforming growth factor β) stimulait la maturation du miR-21 par Drosha, selon un mécanisme encore peu compris (Kim et al., 2009). La protéine p53 favorise également la conversion des pri-miRNAs en pre-miRNAs en formant un complexe avec Drosha (O'Connell et al., 2010). Le clivage par Drosha du pri-miR-18 dépend quant à lui de la particule hétérogène ribonucléoprotéique A1. La protéine ARS2 (arsenate-resistance protein 2), exprimée dans les cellules hématopoïétiques en prolifération, appartient à un complexe liant les coiffes des ARN et favorise la maturation des pri-miRNAs. De nombreuses autres protéines liant l'ARN pourraient ainsi participer à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des miRNAs (O'Connell et al., 2010).

Outre Drosha, d'autres protéines impliquées dans la biogenèse des miRNAs (comme Dicer) sont régulées par différents acteurs induisant des modifications de l'efficacité de la maturation des miRNAs. La protéine LIN28 par exemple, qui lie l'ARN, participerait à la suppression de la biogenèse du miRNA let-7 en bloquant ou interférant avec l'étape de maturation dépendante de Dicer. En effet, LIN28 recruterait la protéine TUT4 (terminal uridylyltransferase 4) qui, en uridylant la forme précurseur de let-7, empêcherait la suite de sa maturation (figure 1.7). D'autre part, la réponse immune semble affecter l'abondance de différents acteurs de la voie de biogenèse des miRNAs. Par exemple, certaines cytokines telles que les interférons inhibent l'expression de Dicer et perturbent de cette façon la transformation des pre-miRNAs en miRNAs. Il semble également que la translocation des pre-miRNAs du noyau au cytoplasme puisse constituer un point de régulation de l'expression des miRNAs, bien que les mécanismes ne soient pas encore compris à l'heure actuelle (O'Connell et al., 2010, Yi et al., 2005).

Par ailleurs, il a été suggéré que des motifs en cis situés dans le promoteur des miRNAs pourraient influencer leur biogenèse. Le motif « A » (mA), par exemple, que l'on retrouve en amont d'à peu près tous les miRNAs intergéniques de *C. elegans* mais pas dans les promoteurs des gènes codant pour des protéines, ne semble pas intervenir dans la régulation transcriptionnelle des miRNAs mais pourrait réguler leur biogenèse au niveau post-transcriptionnel, selon un mécanisme encore obscur (Turner and Slack, 2009).

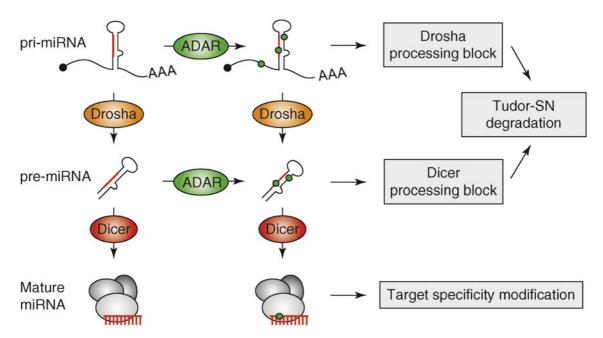


Figure 1.8 : Régulation de la maturation et de l'activité des miRNAs par les protéines ADAR. L'édition (indiquée par les points verts) des pri-miRNAs ou pre-miRNAs peut empêcher une maturation efficace par Drosha ou Dicer et entraîner la dégradation des molécules éditées par Tudor SN (Tudor staphylococcal nuclease homolog), tandis que l'édition au niveau de la séquence des miRNAs matures peut affecter la spécificité de reconnaissance des ARNm cibles (Ding, Weiler et al. 2009).

Le turnover des miRNAs

Un autre niveau de régulation post-transcriptionnelle concerne le turnover des miRNAs. Bien qu'encore peu étudié, le turnover pourrait concerner tant les formes matures des miRNAs que les formes primaires et précurseurs. Il a été démontré que les miRNAs liés aux protéines Ago étaient plus stables en moyenne que les ARNm (leur temps de demi-vie est supérieur à 14h); cependant, certains miRNAs sont dégradés plus rapidement que d'autres, ce qui suggère une reconnaissance spécifique de la séquence des miRNAs par des nucléases (Kim, Han et al. 2009) ou tout au moins certaines propriétés thermodynamiques. Chez les plantes et les vers, il a été démontré que les protéines SDN (small RNA degrading nucleases) régulaient la stabilité des miRNAs. Néanmoins, à notre connaissance, aucune nucléase participant au turnover des miRNAs chez les animaux n'a été identifiée à ce jour (Kim et al., 2009, O'Connell et al., 2010, Kai and Pasquinelli, 2010).

L'édition des ARN

Les protéines ADARs (adenosine deaminases acting on RNA), qui interviennent dans l'édition des ARN (c'est-à-dire la conversion des adénines en inosines) et sont surexprimées en conditions inflammatoires, participent également au contrôle post-transcriptionnel de certains miRNAs (les miR-142 et -151 par exemple), comme l'illustre la figure 1.8. Dans ce cas, la modification de base engendrée par les ADAR entraîne une diminution de la reconnaissance du pri-miRNA ou du pre-miRNA par les ribonucléases Drosha et Dicer, ce qui altére leur maturation. Par ailleurs, on peut noter que le changement de base, s'il intervient au niveau de la séquence mature du miRNA, peut également affecter la spécificité des cibles reconnues par le miRNA (Ding et al., 2009).

La localisation subcellulaire des miRNAs

Il a été rapporté que les miRNAs pouvaient s'associer aux granules de stress ainsi qu'aux corps P (figure 1.7). Pauley et son équipe (Pauley et al., 2010) ont d'ailleurs démontré que la formation des corps P en condition basale nécessitait la biogenèse de miRNAs. De plus, ces chercheurs ont suggéré qu'une augmentation de l'activité des miRNAs serait associée à une augmentation du nombre et de la taille des corps P. Plus précisément, ils ont remarqué que la stimulation au LPS de cellules THP-1 résultait en la surexpression du miR-146a et dans une moindre mesure des miR-155 et miR-132 ainsi qu'en une augmentation du nombre et de la taille des corps P, lesquels sont enrichis en complexes miRISC. Selon les auteurs, cette expansion des corps P pourrait participer de façon directe ou indirecte à une meilleure inhibition des cibles des miRNAs, ou pourrait être la conséquence de l'accumulation des ARNm cibles en cours de dégradation (Pauley et al., 2010).

II. L'implication des miRNAs dans l'inflammation et les contextes dans lesquels les miR-132 et miR-212 ont été décrits

II.1. Les miRNAs et l'inflammation se régulent mutuellement

L'inflammation peut moduler à plusieurs niveaux l'expression des miRNAs en interagissant avec des acteurs moléculaires participant à leur régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (voir point I.3.). Inversement, les miRNAs modulent le développement et

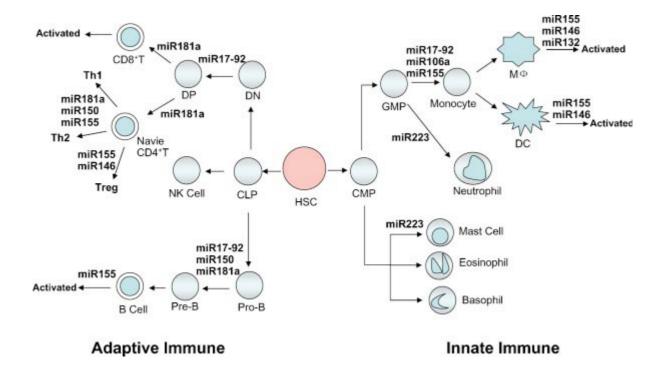


Figure 1.9 : MiRNAs majeurs impliqués dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules matures des systèmes immunitaires inné et adaptatif, ainsi que dans l'activation de ces cellules (Bi, Liu et al. 2009).

| Disease | Dysregulated miRNAs |
|------------------------------|---|
| Rheumatoid arthritis | Downregulated in RA synovium tissue: miR-124a; upregulated in RA synovium tissue: miR-146a, miR-155, miR-203; upregulated in RA PBMCs: miR-16, miR-132, miR-146, miR-155; upregulated in RA CD4* naive T-lymphocytes: miR-223 |
| Systemic lupus erythematosus | Downregulated in SLE PBMCs: miR-146, miR-17-5p, miR-112, miR-141, miR-184, miR-196a, miR-383, miR-409-3p; upregulated in SLE PBMCs: miR-21, miR-61, miR-78, miR-142-3, miR-189 miR-198, miR-298, miR-299-3p, miR-342 |
| Multiple sclerosis | Dysregulated in MS PBMCs: miR-18b, miR-599, miR-96 |
| Primary biliary cirrhosis | Downregulated in PBC liver tissue: miR-26a, miR-122a; upregulated in PBC liver tissue: miR-299-5p, miR-328 |
| Ulcerative colitis | Downregulated in the active UC tissue: miR-192 |
| Psoriasis | Upregulated in psoriatic skin: miR-146 (in Tregs); miR-203 |

Table 1.1 : Exemples de miRNAs dont l'expression dérégulée est associée à certaines maladies inflammatoires (Furer, Greenberg et al. 2010).

les réponses du système immunitaire, tant au niveau des réponses innées qu'adaptatives. Certains miRNAs jouent par exemple un rôle clé dans la réponse immune innée, comme les miR-155, miR-146 et miR-223, qui régulent la réponse inflammatoire aiguë résultant de la reconnaissance de pathogènes par les TLR (Toll-like receptors) (Bi et al., 2009). L'équipe de Baltimore a par exemple démontré que le miR-146, induit par le facteur de transcription NFκB lors de la stimulation de cellules THP-1 par du LPS, réprimait l'expression des protéines IRAK-1 (IL-1 (interleukin-1) receptor-associated kinase 1) et TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) impliquées dans la voie de signalisation du LPS et participait donc à une boucle de régulation négative de cette voie (Taganov et al., 2006). De nombreux miRNAs interviennent quant à eux dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules de l'immunité innée comme les granulocytes, monocytes, macrophages, cellules dendritiques et cellules NK (natural killer) ou de l'immunité adaptative comme les lymphocytes B et T, ainsi que dans l'activation de ces dernières comme le résume la figure 1.9 (Bi et al., 2009, O'Connell et al., 2010). Etant donné les rôles de tous ces miRNAs dans l'homéostasie du système immunitaire, une expression anormale de ces importants régulateurs peut conduire à l'apparition de maladies auto-immunes ou inflammatoires, telles que l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, etc. A l'heure actuelle, toute une série de miRNAs dont l'expression est dérégulée ont ainsi été associés à ces pathologies (table 1.1) (Sheedy and O'Neill, 2008).

II.2. Les miR-132 et miR-212 ont été décrits dans des contextes divers

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié quelques aspects de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et -212 au sein de la lignée monocytaire/macrophagique humaine THP-1 stimulée au LPS. Les rôles et le contrôle de l'expression de ces miRNAs dans le contexte inflammatoire sont encore peu connus à l'heure actuelle. En revanche, ces miRNAs ont été plus largement étudiés au niveau neuronal, contexte dans lequel quelques éléments concernant leur régulation transcriptionnelle ont été élucidés. Il a également été rapporté que les miR-132 et miR-212 semblaient intervenir dans des mécanismes liés à la tumorigenèse et plusieurs études relevant d'autres thématiques ont proposé quelques rôles physiologiques pour ces miRNAs. Jusqu'à présent, et comme nous le décrirons progressivement, douze cibles ont été validées pour le miR-132 et six pour le miR-212, dont deux leurs sont communes (tables 1.2 et 1.3). Il semble important de noter que la région seed de ces deux miRNAs est identique, ce qui suggère qu'ils pourraient partager d'autres cibles (Remenyi et al., 2010). Toutefois, on sait actuellement que d'autres régions des miRNAs que leur région seed participent à la spécificité de reconnaissance des ARNm cibles (Breving and Esquela-Kerscher, 2009). Il n'est donc pas exclu que les miR-132 et -212 aient des cibles distinctes in vivo (Remenyi et al., 2010).

II.2.a. Les miR-132 et -212 dans le contexte inflammatoire

La première étude rapportant une induction du miR-132 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS date de 2006, époque à laquelle l'équipe de Baltimore a réalisé un screening des miRNAs induits par le LPS dans ce type cellulaire, révélant l'induction des miR-146a/b, miR-132 et miR-155. Ces chercheurs ont démontré que l'expression du miR-146a/b était contrôlée par le facteur de transcription NF-κB, lui-même activé en aval de la voie de signalisation du TLR-4 déclenchée par la reconnaissance du LPS. De plus, comme ce fut cité précédemment, ils ont démontré que le miR-146 réprimait l'expression des protéines TRAF6 et IRAK-1 et

| Cible | | Type cellulaire, espèce et remarques | Auteurs |
|------------|---|--|---------------------------|
| | | éventuelles | |
| p250GAP | GTPase-activating protein | Neurones corticaux de rats en période | (Vo, Klein et al. 2005; |
| | | néonatale | Wayman, Davare et al. |
| | | Neurones de l'hippocampe de rats | 2008) |
| RXF4 | Regulatory factor X4 | HEK293 (Human embryonic kidney) | (Cheng, Papp et al. 2007) |
| MeCP2 | Methyl-CpG-binding | Neurones corticaux de rats en période | (Klein, Lioy et al. 2007; |
| | protein | néonatale | Alvarez-Saavedra, |
| | | Cellules neuro-2a (+ observation d'une | Antoun et al. 2010) |
| | | corrélation entre l'abondance de MeCP2 | |
| | | et du miR-132 dans des souris | |
| | | transgéniques exprimant le miR-132 de | |
| ATID | Dáramana da | façon inductible) | (Eltan Valan et al. 2000) |
| AT1R | Récepteur de type 1 à | VSMC (vascular smooth muscle cells) humaines | (Elton, Kuhn et al. 2008) |
| AChE | l'angiotensine II Acétyl-choline estérase | Splénocytes murins | (Shaked, Meerson et al. |
| ACIIE | Acetyr-choline esterase | Spienocytes marnis | 2009) |
| SirT1 | Sirtuin | Pré-adipocytes et adipocytes humains | (Strum, Johnson et al. |
| SHII | Sittain | différenciés in vitro | 2009) |
| p300 | Co-activateur | HeLa et cellules endothéliales | (Alvarez-Saavedra, |
| r | transcriptionnel | lymphatiques primaires humaines | Antoun et al. 2010; |
| | • | Cellules neuro-2a (+ corrélation entre | Lagos, Pollara et al. |
| | | l'abondance de p300 et du miR-132 dans | 2010) |
| | | des souris transgéniques exprimant le | |
| | | miR-132 de façon inductible) | |
| p120RasGAP | GTPase-activating protein | HUVEC (Human Umbilical Vein | (Anand, Majeti et al. |
| | | Endothelial Cells) | 2010) |
| MMP-9 | Matrix metalloproteinase 9 | HEK293 (+ corrélation entre l'abondance | (Ucar, Vafaizadeh et al. |
| | | du miR-132 et celle de MMP-9 in vivo, | 2010) |
| | | chez la souris) | |
| JARID1A | Jumonji, AT-rich interactive | Cellules neuro-2a (+ corrélation entre | (Alvarez-Saavedra, |
| | domain 1A | l'abondance de JARID1A et du miR-132 | Antoun et al. 2010) |
| | | dans des souris transgéniques exprimant | |
| DTC2 | Desillation of C | le miR-132 de façon inductible) | (41 0 1 |
| BTG2 | B-cell translocation gene 2 | Cellules neuro-2a (+ corrélation entre | (Alvarez-Saavedra, |
| | | l'abondance de BTG2 et du miR-132 | Antoun et al. 2010) |
| | | dans des souris transgéniques exprimant | |
| PAIP2A | Polyadenylate-binding | le miR-132 de façon inductible) Cellules neuro-2a (+ corrélation entre | (Alvarez-Saavedra, |
| FAIFZA | protein-interacting protein 2 | l'abondance de PAIP2A et du miR-132 | Antoun et al. 2010) |
| | protein-interacting protein 2 | dans des souris transgéniques exprimant | Amount and 2010) |
| | | le miR-132 de façon inductible) | |
| | | ie iiiik 152 de iaçon mudenoie) | |

Table 1.2 : Les cibles validées du miR-132.

| Cible | | Type cellulaire, espèce et remarques éventuelles | Auteurs |
|------------|-----------------------------|--|---------------------------|
| ZO-1 | Zonula occludens 1 | Cellules épithéliales intestinales humaines | (Tang, Banan et al. 2008) |
| MeCP2 | Methyl-CpG-binding | Lignées cellulaires de carcinomes | (Wada, Akiyama et al. |
| | protein | gastriques humains | 2009) |
| PED/PEA-15 | Protéine antiapoptotique de | Human non-small cell lung cancer | (Incoronato, Garofalo et |
| | la famille des DED (death | | al. 2010) |
| | effector domain) | | |
| SPRED1 | Sprouty-related, EVH1 | HEK293 | (Hollander, Im et al. |
| | domain containing 1 | | 2010) |
| HB-EGF | Heparin-binding EGF-like | Cellules de carcinomes squameux | (Hatakeyama, Cheng et |
| | growth factor | humains résistantes au cetuximab | al. 2010) |
| MMP-9 | Matrix metalloproteinase 9 | HEK293 (+ corrélation entre l'expression | (Ucar, Vafaizadeh et al. |
| | | du miR-212 et celle de MMP-9 in vivo, | 2010) |
| | | chez la souris) | |

Table 1.3 : Les cibles validées du miR-212.

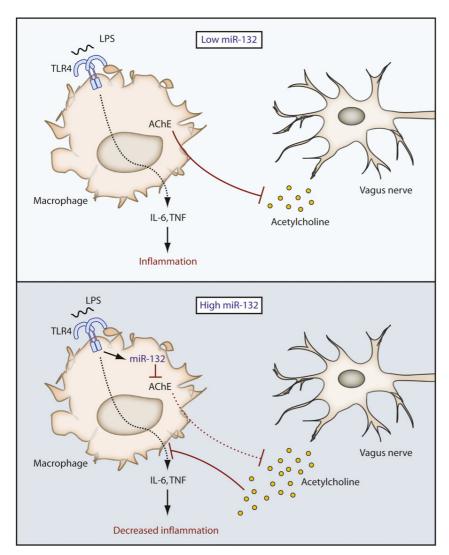


Figure 1.10 : Le miR-132 limite l'inflammation en ciblant l'acétylcholine estérase. Au-dessus : les stimuli proinflammatoires tels que la stimulation au LPS induisent la production de cytokines comme l'IL-6 ou le TNF via la voie du TLR-4. L'acétylcholine produite par le nerf vague tend à bloquer cette réponse ; néanmoins, la présence d'acétylcholine estérase contrecarre l'effet de l'acétylcholine, permettant de ce fait l'installation d'un processus inflammatoire. En dessous : le LPS induit l'expression du miR-132. Celui-ci, en ciblant l'acétylcholine estérase, permet une élévation des taux d'acétylcholine et ainsi, une diminution de l'inflammation (O'Neill 2009).

régulait de cette façon négativement la réponse inflammatoire. Néanmoins, ces chercheurs ne se sont intéressés ni aux processus régulant l'expression du miR-132, ni à ses cibles, ne fournissant dès lors aucune explication quant au rôle physiologique de l'induction de ce miRNA en réponse à la stimulation des cellules THP-1 par du LPS (Taganov et al., 2006).

Plus récemment, il a été rapporté que le miR-132 était aussi induit lors de la stimulation au LPS de macrophages humains primaires, de macrophages murins primaires provenant de la moelle osseuse et de la cavité intrapéritonéale ainsi que lors de l'injection de LPS dans un modèle murin in vivo (Shaked et al., 2009). Lors de cette dernière étude, Shaked et son équipe ont démontré que le miR-132 avait pour cible l'ARNm de l'acétylcholine estérase (AChE), et qu'il jouait donc un rôle direct dans l'inflammation. En effet, étant donné que l'AChE dégrade l'acétylcholine, un important inhibiteur de l'inflammation au niveau périphérique, la répression de l'AChE par le miR-132 permet de réprimer l'inflammation, comme l'illustre la figure 1.10. Le miR-132 pourrait donc jouer un rôle dans le contrôle de la résolution de l'inflammation (O'Neill, 2009). Les auteurs de cette étude ont également suggéré que l'interaction entre le miR-132 et l'AChE pourrait avoir lieu dans le cerveau et de cette façon participer au fonctionnement et à la régulation des rythmes circadiens (Shaked et al., 2009). En effet, des pics d'expression de l'AChE sont observés durant les phases de sommeil, tandis que son expression est minimale durant les heures d'activité. A l'inverse, l'expression du miR-132 est plus élevée durant la journée. Confortant cette hypothèse, d'autres auteurs ont démontré un rôle du miR-132 dans la régulation de l'horloge interne, comme cela sera décrit ultérieurement (Cheng et al., 2007).

Des chercheurs ont démontré que le miR-132 était aussi induit lors de l'infection de cellules endothéliales lymphatiques (LEC) primaires humaines par le virus KSHV (Kaposi's sarcomaassociated herpes virus), ainsi que lors de l'infection de monocytes THP-1 par les virus KSHV, HSV-1 (herpes simplex virus-1) et HCMV (human cytomegalovirus) (Lagos et al., 2010). L'induction du miR-132 dans ces contextes d'infection virale serait dépendante du facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) activé par phosphorylation par les protéines kinases MAPK (mitogen-activated protein kinase) et SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase), elles-mêmes activées suite à la liaison du KSHV aux cellules. En ce qui concerne le rôle du miR-132 lors de l'infection virale, les auteurs ont démontré que ce miRNA avait pour cible le co-activateur transcriptionnel p300 (CREB se liant à p300 pour activer la transcription du miR-132, ceci pourrait expliquer la nature transitoire de l'induction du miR-132 suite à l'infection virale); or cette protéine, ainsi que CBP (CREB binding protein) sont essentielles à l'initiation de la réponse antivirale. CBP et p300 sont deux protéines fortement apparentées appartenant à une famille de protéines co-activatrices conservées au cours de l'évolution. Ces protéines peuvent non seulement intervenir dans les processus transcriptionnels en créant des ponts entre les facteurs de transcription et la machinerie basale de transcription mais également en exerçant une fonction d'histone acétyltransférase leur permettant de participer au remodelage de la chromatine (Vo and Goodman, 2001). En outre, ces protéines modulent et connectent entre elles différentes voies de signalisation, ce qui leur permet de participer à toute une série de processus cellulaires. Au niveau de l'inflammation, les co-activateurs CBP et p300 semblent particulièrement importants, étant donné qu'ils interagissent avec des protéines « clés » de la réponse inflammatoire, comme les facteurs de transcription NF-κB, les membres de la famille AP-1 (activating protein 1) c-Fos, c-Jun, ATF-1 (activating transcription factor 1) et ATF-4, ou encore STAT-1 et CREB (Matt, 2002). Dans le contexte de l'étude publiée par Lagos et al., la surexpression du miR-132 faciliterait la réplication virale en inhibant l'expression des gènes stimulés par la réponse interféron. Il est d'ailleurs intéressant de noter que p300 et CBP sont des cibles communes au virus KSHV ainsi qu'à d'autres virus à ADN oncogéniques suite à l'inhibition desquelles ces virus échappent à l'immunité innée (Lagos et al., 2010). Etant donné que le miR-132 est surexprimé dans les cellules THP-1 stimulées au LPS, nous avons émis l'hypothèse que l'expression de p300 pourrait également être réprimée par ce miRNA dans ce type cellulaire et que p300 pourrait, tout comme l'ont suggéré Lagos et son équipe, participer à des boucles de régulation de la transcription des miR-132 et miR-212. En effet, p300 intervient dans la transactivation de gènes régulés par NF-κB, AP-1 et CREB. Or, l'expression des miR-132 et -212 se trouve sous le contrôle d'un promoteur comportant des sites consensus putatifs pour ces facteurs de transcription. C'est pourquoi nous avons étudié, au cours de ce mémoire, l'expression de p300 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS de façon à déterminer si elle pouvait participer à la régulation transcriptionnelle de ces deux miRNAs.

D'un point de vue clinique, l'équipe de Pauley (Pauley et al., 2008) a mis en évidence que les miR-146a, miR-155, miR-132 et miR-16 étaient surexprimés dans les cellules mononucléées du sang périphérique de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, par comparaison avec des individus sains. En outre, ces chercheurs ont montré que la surexpression des miR-146a, miR-155 et miR-132 était stable durant une période de plus de deux mois chez un patient atteint de la maladie ne démontrant pas d'amélioration suite à un traitement au methotrexate. Ceci suggère que l'expression élevée de ces miRNAs pourrait refléter l'absence de réponse du patient au traitement, bien que ces études devraient être confirmées sur une population de patients plus grande. Par ailleurs, cette équipe a également démontré que parmi les différentes sous-populations de cellules mononuclées du sang périphérique, les monocytes et macrophages étaient responsables de la surexpression des miRNAs. En effet, les miR-146a, miR-155, miR-16 et particulièrement le miR-132 sont surexprimés dans les monocytes par rapport aux lymphocytes. L'équipe de Murata et al., (Murata et al., 2010) s'est quant à elle intéressée à l'expression des miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 et miR-223 dans les liquides synoviaux et dans le plasma de patients atteints d'arthrite rhumatoïde ou d'ostéoarthrite, dans le but de déterminer si le lieu et l'intensité de l'expression d'un miRNA pouvaient servir de biomarqueur de l'une de ces deux maladies. Ils ont ainsi découvert que les concentrations synoviales des miR-16, miR-146a, miR-155 et miR-223 étaient plus élevées chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde que chez ceux atteints d'ostéoarthrite, tandis que la concentration plasmatique du miR-132 était plus élevée chez les personnes saines que chez les patients atteints de ces maladies inflammatoires. Les résultats à priori contradictoires obtenus par ces deux équipes pourraient être expliqués par le fait que les études de Pauley et al. ont été réalisées sur des cellules, tandis que celles de Murata ont été réalisées sur du plasma et du liquide synovial. Or, Murata et ses collègues ont démontré que les synoviocytes fibroblastiques et les tissus synoviaux « sécrétent » le miR-132 à une concentration relativement élevée (il n'est en réalité pas encore bien compris comment les miRNAs sont produits dans le plasma et le liquide synovial), alors que les cellules mononuclées ne « sécrètent » le miR-132 qu'à un très faible taux. En outre, ils ont également suggéré que si les miRNAs des fluides synoviaux provenaient essentiellement des tissus synoviaux et des cellules les infiltrant, en revanche, les miRNAs plasmatiques seraient générés par différents tissus et non dérivés des cellules mononuclées uniquement.

II.2.b. Les miR-132 et -212 dans le contexte neuronal

En 2005, Vo et ses collègues (Vo et al., 2005) ont identifié le miR-132 comme étant une cible du facteur de transcription CREB grâce à une approche dénommée SACO (Serial Analysis of

Chromatin Occupancy) permettant d'identifier les transcrits non codants et miRNAs auxquels sont associés des sites de liaison pour CREB¹. Ce facteur de transcription a été jusqu'à présent largement étudié dans le contexte neuronal; il est activé lors de la maturation et de la plasticité neuronale, joue un rôle régulateur clé dans la formation de la mémoire ainsi que dans les réponses comportementales adaptatives et participe à la régulation des rythmes circadiens et à la différenciation des neurones périphériques dépendante des neurotrophines (Vo et al., 2005). Etant donné que le miR-132 est fortement induit par les neurotrophines et que sa transcription dans ce contexte dépend de CREB, les chercheurs se sont intéressés aux rôles de ce miRNA dans la différenciation et la plasticité neuronale. Ils ont ainsi démontré que le miR-132 jouait un rôle clé dans la morphogenèse des neurones corticaux en réprimant l'expression de p250 GAP (GTPase-activating protein), une protéine impliquée dans la régulation de la différenciation neuronale (Vo et al., 2005). En outre, Wayman et ses collègues (Wayman et al., 2008) ont confirmé trois ans plus tard que le miR-132, également induit par l'activité neuronale, participait à la morphologie dendritique des neurones de l'hippocampe en réprimant cette même protéine. L'importance du miR-132 dans le développement et la maturation des dendrites a en outre été confirmée par la même équipe, in vivo, chez la souris (Magill et al., 2010). Par ailleurs, le miR-132 interviendrait également dans la plasticité dendritique en modulant l'expression d'une autre cible, MeCP2 (methyl CpG-binding protein 2) (Klein et al., 2007). En effet, il a été observé qu'une diminution de l'expression de cette protéine durant la période post-natale retardait la formation des synapses neuronales tandis que sa surexpression entraînait l'arborisation des dendrites et axones. Le miR-132 permettrait donc de maintenir les taux de protéines MeCP2 constants dans les neurones afin de permettre un développement neuronal contrôlé (Klein et al., 2007). Nudelman et ses collègues (Nudelman et al., 2010) ont quant à eux démontré que la forme primaire du miR-132 et dans une moindre mesure sa forme mature étaient également induites in vivo suite à l'exposition de souris à des stimuli neuronaux. Selon les auteurs, le miR-132, qui est spécifiquement localisé au niveau des synapses actives, pourrait jouer un rôle dans l'activation à plus long terme des synapses et contribuer à la mémorisation. Ainsi, en régulant de façon étroite l'expression de la protéine MeCP2, le miR-132 pourrait être particulièrement important pour le développement et le fonctionnement du cerveau (Nudelman et al., 2010).

Il est intéressant de noter, cependant, que Wibrand et ses collègues (Wibrand et al., 2010), qui ont observé une induction des miR-132 et -212 lors de la potentialisation à long terme par stimulation à haute fréquence du gyrus dentatus² de rats adultes, n'ont pas observé de changements de l'expression des protéines MeCP2 et p250 GAP. La transcription des miR-132 et miR-212 dépendrait dans ce contexte d'une cascade de signalisation activée en aval d'un autre récepteur que dans les cas précédents (récepteur au glutamate métabotropique (mGluR) au lieu du récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR)) (Wayman et al., 2008, Wibrand et al., 2010). Ceci suggère que les mécanismes induisant la transcription des miR-132 et -212, ainsi que les effets induits par ces miRNAs sur le protéome, seraient différents selon le stade de développement.

Cheng et ses collègues (Cheng et al., 2007) ont quant à eux remarqué que l'expression du miR-132 dans les noyaux suprachiasmatiques était étroitement régulée par la lumière et

¹ La même approche a également été employée par Conaco *et al.* pour identifier les miRNAs régulés par le répresseur transcriptionnel REST (RE1 silencing transcription factor). Ces auteurs ont ainsi identifié un site RE situé juste en amont du miR-132 dans une lignée cellulaire murine rénale (TCMK1); néanmoins, leurs recherches se sont portées sur le miR-124a.

² Structure du cerveau située au niveau de l'hippocampe et impliquée dans les fonctions d'apprentissage (www.futura-sciences.com/fr/definition/.../gyrus-dente_161/-).



Figure 1.11: Localisation des sites CRE impliqués dans l'induction des miR-212 et miR-132 murins en réponse aux neurotrophines dans les neurones corticaux. Les losanges gris représentent la localisation des miR-212 (à gauche) et miR-132 (à droite); les flèches blanches représentent les sites CRE étudiés au cours de l'étude de Remenyi; et les rectangles gris représentent les exons 1 (à gauche) et 2 (à droite) du gène non codant hébergeant les séquences des miR-212 et miR-132 murins (Remenyi, Hunter et al. 2010).

dépendante du facteur de transcription CREB. Or, ce facteur est connu pour jouer un rôle central dans les changements d'expression de gènes dépendant de la lumière. Ces chercheurs se sont donc intéressés au rôle potentiel que pourrait jouer le miR-132 dans les rythmes circadiens. Ils ont ainsi démontré que le miR-132 réprimait l'expression de la protéine RFX4 (regulatory factor X4, un facteur de transcription fortement exprimé dans les noyaux suprachiasmatiques et induit lors de l'exposition nocturne à la lumière) et qu'il pourrait intervenir dans une boucle de régulation négative de la réponse à la lumière. Plus récemment, il a été démontré que le miR-132 modulait l'expression des gènes period, mPer1 et mPer2 (ces gènes participent à la régulation de l'horloge interne) en réprimant l'expression de cinq cibles: MeCP2, p300, JARID1A (Jumonji, AT-rich interactive domain 1A) (également connue sous le nom de « retinoblastoma binding protein 2 »), BTG2 (B-cell translocation gene 2) et PAIP2A (polyadenylate-binding protein-interacting protein 2). Le miR-132 assurerait donc le contrôle de l'horloge interne en orchestrant le remodelage de la chromatine (via MeCP2, p300 et JARID1A) et en réprimant la traduction protéique (via BTG2 et PAIP2A) des gènes period au niveau des noyaux suprachiasmatiques (Alvarez-Saavedra et al., 2010).

Si le rôle de CREB dans la régulation transcriptionnelle des miR-132 et -212 avait déjà été suggéré à plusieurs reprises au cours des années précédentes (Wayman et al., 2008, Cheng et al., 2007, Nudelman et al., 2010, Vo et al., 2005, Lagos et al., 2010) et démontré dans une publication (Vo et al., 2005), ce n'est qu'au cours de cette année que Remenyi et son équipe (Remenyi et al., 2010) ont analysé plus en détails le rôle de ce facteur de transcription dans l'induction des deux miRNAs suite à une stimulation neuronale. Ces chercheurs ont montré que l'induction des miR-132 et -212 dans les neurones corticaux murins stimulés par des neurotrophines (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) était dépendante de l'activation des kinases ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) et partiellement liée à l'activation de CREB en aval de ces kinases. Chez la souris, quatre sites CRE (cAMP response elements) semblent intervenir, au moins en partie, dans la transcription des miR-132 et -212. Trois de ces quatre sites sont localisés au sein de l'intron 1 du gène non codant hébergeant les séquences des miR-132 et miR-212 (figure 1.11) et sont associés à une forte diminution de l'expression des deux miRNAs lorsqu'ils sont mutés ; en revanche, le site CRE situé en amont de l'exon 1, au sein d'une région conservée chez l'homme et la souris, n'induit pas à lui seul une diminution de l'expression des deux miRNAs lorsqu'il est muté. Il semble donc que les éléments les plus déterminants dans le contrôle transcriptionnel des miR-132 et -212 soient localisés dans l'intron 1 du gène encodant ces miRNAs chez la souris (Remenyi et al., 2010).

Toujours dans un contexte neuronal, il a également été démontré cette année que le miR-212, et dans une moindre mesure le miR-132, régulaient eux-mêmes l'activité du facteur de transcription CREB ainsi que celle de son co-activateur TORC (transducer of regulated CREB). Le miR-212, en réprimant l'expression de protéines limitant l'activité de Raf1 comme SPRED1 (sprouty-related, EVH1 domain containing 1), induit une augmentation de l'activité de Raf1. Etant donné que les protéines GTPases Raf1 régulent l'activité des adénylyl cyclases, la surexpression du miR-212 conduit à une élévation de la production d'AMP cyclique, permettant elle-même l'activation par phosphorylation du facteur de transcription CREB ainsi qu'une augmentation de l'expression du co-activateur TORC (Hollander et al., 2010).

II.2.c. Les miR-132 et miR-212 dans le cadre du cancer

Selon plusieurs études récentes, le miR-212 serait associé à certaines fonctions dans les cellules cancéreuses. Tout d'abord, l'équipe de Wada (Wada et al., 2009) a découvert que le miR-212 était moins exprimé dans les lignées de cellules de carcinomes gastriques que dans les cellules issues de tissus gastriques non cancéreux. Or, ces chercheurs ont montré que la transfection de précurseurs du miR-212 dans les cellules de carcinomes gastriques induisait une diminution de leur croissance. Ces observations suggèrent que le miR-212 exercerait un rôle de suppresseur de tumeur. Bien que deux cibles prédites du miR-212, E2F5 et SIRT1 (cette seconde cible a été validée pour le miR-132 dans un autre contexte au cours de la même année, comme cela sera décrit ultérieurement) pourraient participer à l'effet du miR-212 sur la carcinogenèse, ce miRNA ne semble pas pouvoir cibler les ARNm de ces deux protéines dans les cellules de carcinomes gastriques. Néanmoins, Wada et ses collègues ont mis en évidence que le miR-212 réprimait l'expression de MeCP2, une protéine également régulée par le miR-132 (voir point précédent) (Klein et al., 2007). La protéine MeCP2 représente un composant clé de la machinerie de méthylation de l'ADN; or, l'hyperméthylation de l'ADN est associée à une tumorigenèse accrue. De plus, il a été mis en évidence que la répression de MeCP2 dans les cellules de cancer de la prostate provoquait une augmentation de l'expression de GADD45α (growth arrest and DNA damage 45α), une protéine capable de bloquer la progression du cycle cellulaire au niveau de la transition G2-M (Ramachandran et al., 2009). Etant donné que la transfection de cellules de carcinomes gastriques avec des précurseurs du miR-212 induit une plus forte expression de GADD45α, il semble que le miR-212 intervienne dans le contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire.

Une autre étude est également arrivée à la conclusion que le miR-212 exercerait des fonctions de suppresseur de tumeur, en identifiant cette fois une cible impliquée dans l'apoptose. Il s'agit de la protéine antiapoptotique PED/PEA-15, un membre de la famille des protéines à domaine de mort effecteur (DED, death effector domain) intervenant dans la croissance cellulaire et le métabolisme. Incoronato et son équipe (Incoronato et al., 2010) ont identifié cette cible in vitro dans des cellules cancéreuses du poumon (NSCLC, non-small cell lung cancer) et ont démontré que le miR-212 était moins exprimé dans les cellules provenant de biopsies humaines de cancer du poumon que dans les biopsies provenant d'individus sains. De plus, dans ces cellules, l'expression du miR-212 est inversement corrélée à celle de sa cible PED/PEA-15 mais aussi à la réponse des cellules au traitement au tumor necrosis factorrelated apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Ceci concorde avec l'observation selon laquelle les cellules surexprimant PED/PEA-15 ont un phénotype de résistance au TRAIL. D'autres études ont également corrélé l'expression de la protéine PED/PEA-15 à la résistance aux traitements anti-cancéreux. Stassi et al., 2005) par exemple ont démontré que la surexpression de PED/PEA-15 dans le cadre du cancer du sein induisait une résistance aux agents chimiothérapeutiques. Par ailleurs, Rui et al., (Rui et al., 2010) ont remarqué que l'expression réduite du miR-212 dans les cellules cancéreuses du poumon était corrélée à leur résistance au docetaxel. Bien que lors de cette dernière étude, l'acteur moléculaire de la résistance n'ait pas été identifié, Incoronato et ses collègues proposent que PED/PEA-15 pourrait jouer un rôle dans ce processus. En réprimant PED/PEA-15, le miR-212 agirait donc en tant que suppresseur de tumeur et sa répression serait associée à une résistance aux traitements anti-cancéreux (Incoronato et al., 2010).

Une troisième étude publiée cette année a également suggéré un rôle de la répression du miR-212 dans la résistance à un traitement cancéreux. Hatakeyama et ses collègues ont en effet remarqué que le miR-212 était moins exprimé dans les cellules de carcinomes squameux de la

tête et du cou résistantes au cetuximab³ que dans les cellules sensibles. La répression du miR-212 dans les cellules résistantes induirait une augmentation de l'expression de sa cible, l'HB-EGF (heparin-binding EGF (epidermal growth factor)-like growth factor); or l'expression de cette dernière est corrélée à la résistance au cetuximab (Hatakeyama et al., 2010).

A l'heure actuelle, les mécanismes responsables de la diminution de l'expression du miR-212 dans les cellules cancéreuses humaines ne sont pas encore connus. Néanmoins, le miR-212 est localisé sur le chromosome 17 au niveau de la région p13.3; or, cette région est souvent délétée dans les cellules de cancer du poumon (Konishi et al., 2003) et de cancer gastrique (Yustein et al., 1999).

Wong et ses collègues ont quant à eux remarqué lors d'un screening que le miR-132 était surexprimé dans les cellules de carcinomes squameux de la langue par rapport aux tissus sains (Wong et al., 2008). Néanmoins, ni les causes ni les conséquences de l'induction de ce miRNA dans ce contexte ne sont établies pour le moment. En revanche, il a été démontré que le miR-132 était aussi surexprimé dans les cellules endothéliales mises en présence de milieu conditionné de cellules tumorales. Dans ce contexte, le miR-132 participerait au switch angiogénique en stimulant la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubes via la répression de la protéine p120RasGAP (Anand et al., 2010).

II.2.d. Autres contextes dans lesquels les miR-132 et -212 ont été décrits

En dehors des contextes précédemment décrits, il a été démontré que les miR-132 et -212 étaient fortement induits lors de la stimulation de cellules de la granulosa par la LH (hormone lutéïnisante) et l'hCG (gonadotrophine chorionique humaine) en période péri-ovulatoire chez la souris (Fiedler et al., 2008). La surexpression de ces miRNAs serait aussi liée dans ces cellules à la voie de signalisation dépendante de l'AMP cyclique et à l'activation de CREB. Parallèlement à cette observation, Yuen et son équipe (Yuen et al., 2009) ont démontré que les miR-132 et -212 étaient induits lors de la stimulation de cellules gonadotropes par de la gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Néanmoins, les rôles des miR-132 et -212 dans les cellules ovariennes et gonadotropes ne sont pas encore connus actuellement. Toujours dans un contexte hormonal, il a récemment été démontré que les miR-132 et miR-212 étaient indispensables au développement des glandes mammaires chez la souris. En effet, en régulant l'expression de leur cible MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), les miR-132 et miR-212 contrôlent le dépôt de collagène et donc les interactions entre les cellules épithéliales et le stroma, lesquelles sont requises pour la formation et la croissance des canaux de la glande mammaire lors de la puberté (Ucar et al., 2010). En dehors de l'identification de cette nouvelle cible, il est intéressant de souligner qu'au cours de cette étude, les chercheurs ont identifié un nouveau transcrit encodant les miR-132 et miR-212. En effet, bien qu'il était précédemment admis que les séquences des miR-132 et miR-212 étaient situées au sein de l'intron 1 d'un gène non codant chez la souris, Ucar et ses collègues ont remarqué que les séquences de ces miRNAs étaient localisées dans l'exon 2 d'un variant d'épissage alternatif (figure 1.4). Alors que les deux isoformes sont exprimées dans le cerveau, seul ce nouveau variant serait exprimé dans les glandes mammaires. Ces deux isoformes présentent donc des caractéristiques d'expression tissulaire différentes.

³ Le cetuximab est un traitement à base d'anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR (epidermal growth factor receptor) administré en monothérapie ou en combinaison à de la radio- ou chimio-thérapie aux patients atteints de carcinomes squameux de la tête et du cou.

L'équipe de Tang *et al.* a récemment découvert que le miR-212 était induit par l'exposition à l'éthanol de cellules épithéliales intestinales humaines mais aussi dans les biopsies de colon de patients atteints d'ALD (alcoholic liver disease) (Tang et al., 2008). Dans ces cellules et tissus, le miR-212 inhiberait l'expression de la protéine ZO-1 (zonula occludens 1) et perturberait de cette façon l'intégrité des épithélia.

Il a également été rapporté que le miR-132 était induit lors de la privation en sérum de préadipocytes et d'adipocytes humains différenciés in vitro (Strum et al., 2009). Dans ces cellules, la surexpression du miR-132 conduit à une élévation de la production des chémokines IL-8 (interleukine 8) et MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) ainsi qu'à l'acétylation de la lysine 310 de la sous-unité p65 du facteur de transcription NF-kB (nuclear factor-kappa B). Cet effet du miR-132 sur l'acétylation de p65 serait expliqué par le fait que le miR-132 réprime l'expression de la désacétylase SirT1 dans les pré-adipocytes et adipocytes, permettant de cette façon d'augmenter l'activité de NF-kB et d'activer la production de chémokines. Les protéines Sirtuin sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. En effet, ces histones désacétylases (HDAC) de classe III, qui requièrent la présence du cofacteur NAD (nicotinamide adénosine dinucléotide), ont pour fonction de désacétyler différents substrats, comme les histones mais aussi d'autres protéines telles que les co-activateurs CBP et p300 ainsi que la sous-unité RelA/p65 du facteur de transcription NF-kB. Ceci permet aux protéines SirT1 de réguler certains processus métaboliques, de participer à la résistance aux stress et à la survie des cellules, au vieillissement et à la sénescence cellulaire, aux fonctions endothéliales, aux rythmes circadiens, à l'inflammation et aux fonctions immunes (Chung et al., 2010b). Etant donné que le miR-132 est induit lors de la stimulation au LPS de cellules THP-1, nous nous sommes intéressés, dans le cadre de ce mémoire, à l'expression de cette protéine afin de déterminer si elle était également réprimée par le miR-132 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. En effet, il a été rapporté que l'expression et l'activité de cette protéine était diminuée dans les macrophages de rats et de souris stimulés au LPS (Shen et al., 2009) et qu'il en résultait une augmentation de la capacité de trans-activation du facteur NF-kB et donc de l'expression de gènes pro-inflammatoires. Nous avons donc émis l'hypothèse que la surexpression du miR-132 qui résulte de la stimulation au LPS pourrait réprimer l'expression de SirT1 dans les cellules THP-1. Par ailleurs, étant donné que les deux miRNAs dont nous avons étudié l'expression, les miR-132 et -212, pourraient être sous le contrôle des facteurs de transcription NF-κB et AP-1, dont l'activité est régulée par SirT1 (Yeung et al., 2004, Chung et al., 2010a, Gao and Ye, 2008), cette cible se révélait particulièrement intéressante à étudier étant donné qu'elle pourrait participer, tout comme p300, à des boucles de régulation de l'activité de ces facteurs de transcription.

III. Les voies de signalisation induites par le LPS

Afin de comprendre comment les miR-132 et -212 sont induits par le LPS dans les cellules THP-1, il semble adéquat de revoir brièvement les principales cascades de signalisation cellulaire activées par le LPS. En effet, les analyses bioinformatiques réalisées sur la région promotrice putative des miR-132 et -212 permettent d'identifier de très nombreux facteurs de transcription participant potentiellement à la régulation de l'expression de ces miRNAs. Néanmoins, les candidats proposés par ce type d'approche sont trop nombreux que pour pouvoir être tous testés expérimentalement. Dès lors, afin de sélectionner les candidats les plus pertinents dans l'induction des miR-132 et -212 en réponse au LPS, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation activées par cette molécule.

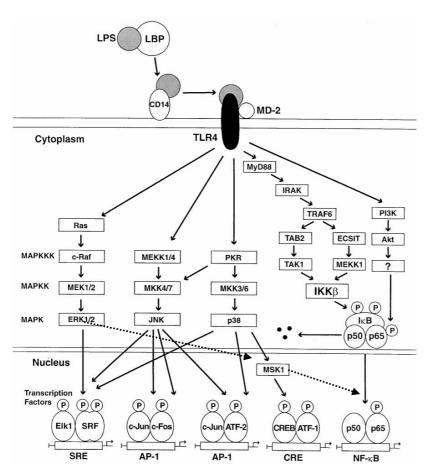


Figure 1.12 : Les voies de signalisation induites par le LPS dans les monocytes. Après avoir lié la protéine LBP, le LPS est amené à la surface des cellules et interagit avec les récepteurs CD14 puis avec les TLR-4 et leur protéine accessoire MD-2. Ceci induit l'activation de la voie des IKK, menant à l'activation du facteur de transcription NF-κB, ainsi qu'à l'activation des voies MAPK ERK1/2, JNK et p38, aboutissant elles-mêmes à l'activation de nombreux facteurs de transcription dont Elk1, SFR, c-Jun, c-Fos, ATF-2 et CREB. Cette figure est issue de la référence suivante (Guha and Mackman 2001) et adaptée d'après (Remenyi, Hunter et al. 2010) et (Vermeulen, Berghe et al. 2009).

III.1. Les PAMPs et TLR

Les cellules immunes, auxquelles appartiennent entre autres les monocytes et macrophages, disposent à leur surface de senseurs appelés TLR leur permettant de déceler la présence de pathogènes et d'initier, suite à leur détection, les réponses immunes innées et adaptatives (Liew et al., 2005). Les TLR, dont il existe dix membres chez l'homme (Doyle and O'Neill, 2006), ont été conservés au cours de l'évolution afin de reconnaître les PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), des motifs « typiques » issus de divers pathogènes tels que les virus, bactéries, champignons ou encore les parasites et traduisant leur présence. Le lipopolysaccharide, composant majeur de la paroi externe des bactéries gram négatives, constitue un exemple de PAMP reconnu à la surface des cellules immunes par les récepteurs TLR-4.

Lorsque les TLR détectent la présence d'un PAMP, ils dimérisent pour former des homodimères (c'est notamment le cas du TLR-4) ou des hétérodimères et rapprochent de cette façon leurs domaines cytoplasmiques TIR (Toll/interleukin-1 receptor) (Liew et al., 2005). Il s'ensuit l'activation de diverses cascades de signalisation cellulaire, menant principalement à l'activation des protéines kinases activées par les stress et du facteur de transcription NF-κB (Liew et al., 2005, Doyle and O'Neill, 2006). Ce dernier induit ensuite la transcription de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α (tumor necrosis factor-α), l'IL-1 et l'IL-2, dont la libération reflète l'état d'activation de la réponse immune innée au sein des cellules (Doyle and O'Neill, 2006).

III.2. L'activation des réponses cellulaires au LPS

III.2.a. L'activation du facteur de transcription NF-κB via les voies dépendantes et indépendantes de MyD88

Lors d'une infection par des bactéries gram-négatives, le LPS contenu dans la paroi de cellesci est complexé par une protéine plasmatique, la LPS-binding protein (LBP) qui, une fois opsonisée, est reconnue à la surface des cellules par le récepteur CD14. Ceci permet au LPS d'être lié par le TLR-4 et sa protéine accessoire MD-2 (Guha and Mackman, 2001), comme l'illustre la figure 1.12. Suite à leur activation, les TLR-4 dimérisent et recrutent la protéine adaptatrice MyD88 au niveau de leurs domaines TIR cytoplasmiques. MyD88 induit alors elle-même, via son domaine de mort (death domain), le recrutement des protéines kinases IRAK-4 et 1 (IL-1 receptor-associated kinases), qui possèdent un domaine identique. Ceci permet aux IRAK-4 d'activer les IRAK-1 par phosphorylation. Ces dernières, une fois phosphorylées, se détachent du complexe récepteur et vont activer les protéines TRAF6. Les complexes IRAK-1-TRAF6 se dirigent ensuite vers la membrane, au niveau de laquelle se situent des complexes formés de protéines TAK1 (TGF-β activated kinase) chacune associée à deux protéines TAB (TAK1-binding protein), TAB1 et TAB2. Des réactions d'ubiquitination de TRAF6 et de son substrat TAK1 ont lieu et sont suivies par la phosphorylation des protéines TAK1 et TAB2. Il s'ensuit la dégradation d'IRAK-1, le détachement du complexe protéique de la membrane ainsi que l'activation de TAK1, qui peut alors phosphoryler ses propres cibles, telles que les kinases IkB (IKK). Ces dernières, en phosphorylant les protéines IkB, induisent leur dégradation et permettent de cette façon la

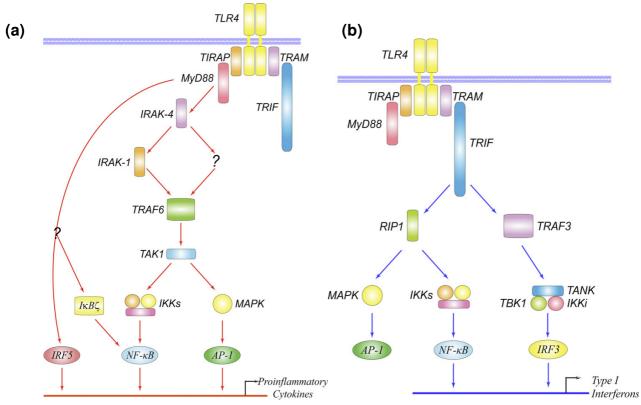


Figure 1.13: Les voies de signalisation activées par le TLR-4 suite à la reconnaissance de LPS. (a) Comme déjà illustré à la figure précédente, la voie des IKK activée via MyD88, les IRAK, TRAF6 et TAK1 peut aboutir à l'activation du facteur de transcription NF-κB tandis que les MAPK activées en aval de TRAF6 mènent entre autres à l'activation du facteur de transcription AP-1. (b) En outre, il existe une voie de signalisation en aval du TLR-4 indépendante de MyD88, impliquant les protéines TRIF, TRAM et TBK1. Cette voie permet notamment l'activation du facteur IRF3 (Lu, Yeh et al. 2008).

translocation du facteur de transcription NF-κB vers le noyau au niveau duquel il peut induire la transcription de ses gènes cibles. Le facteur de transcription NF-κB peut également être activé en aval du TLR-4 par une voie indépendante de MyD88. Cette voie implique le recrutement des protéines adaptatrices TRAM (TRIF-related adapter molecule) au niveau des domaines TIR des TLR-4, puis des protéines TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β). Ces dernières recrutent et activent TRAF6, ce qui mène à l'activation de TAK1 puis de NF-κB d'une façon indépendante d'IRAK-4 et 1, ou à celle de TBK1 (TANK-binding kinase-1) et d'IKK non canoniques aboutissant à l'activation du facteur IRF3 (interferon regulatory factor 3) (figure 1.13) (Doyle and O'Neill, 2006, Lu et al., 2008).

III.2.b. L'activation des MAPK ERK1/2, JNK et p38

En ce qui concerne les MAPK, il a été démontré que la stimulation de monocytes et de macrophages par du LPS induisait l'activation des trois voies MAPK, ERK1/2, JNK et p38, chacune de celles-ci menant à l'activation de plusieurs facteurs de transcription. Ces voies seraient notamment activées en aval des protéines kinases C typiques et atypiques, de certains membres de la famille des tyrosines kinases *src* ainsi que d'autres molécules impliquées dans la signalisation cellulaire.

La voie MEK1/2 – ERK1/2 est activée en aval de Ras et c-Raf, et, comme l'illustre la figure 1.12, conduit entre autres à l'activation par phosphorylation du facteur de transcription Elk-1 (Ets-like transcription factor-1). Celui-ci lie l'ADN au niveau de motifs Ets (E-twenty six) à proximité desquels se trouvent des éléments SRE liés par des dimères de facteurs de transcription SRF (serum response factor). Il en résulte la formation d'un complexe ternaire Ets/SRF/SRF activant la transcription des gènes cibles. La voie des JNK, également connue sous le nom de SAPK1 est activée via plusieurs MAPKKK (telles que MEKK1 et MEKK4) et conduit à l'activation de divers facteurs de transcription tels que Elk-1, ATF-2 et c-Jun, qui contrôlent la transcription de médiateurs inflammatoires. Enfin, la troisième voie MAPK communément appelée p38, est activée en aval de Cdc42, PAK et Rac1 via les MAPKKK PKR, MLK3/SPRK, ASK1 ou TAK1. Une fois activée à son tour, la kinase p38 phosphoryle et active divers facteurs de transcription, dont Elk-1 et ATF-2 (également activés en aval de la voie des JNK), CHOP, MEF2C et Sap1a (Guha and Mackman, 2001).

Outre le fait que chacune des MAPK décrites ci-dessus puisse directement réguler l'activité de facteurs de transcription, les kinases p38 et ERK1/2 activent également d'autres protéines kinases, les MSK (mitogen- and stress-activated protein kinases). L'importance et le rôle de ces protéines dans l'expression des gènes inflammatoires sont à ce jour bien établis ; les MSK1 activées par les MAPK p38 ou ERK1/2 en aval de la voie de signalisation du LPS contrôlent la transcription de gènes pro-inflammatoires en activant par phosphorylation les facteurs de transcription CREB, ATF-1, ainsi que la sous-unité p65 du facteur de transcription NF-κB. En outre, les protéines MSK2 et dans une moindre mesure MSK1 peuvent induire, notamment en réponse au LPS, l'activation de l'expression de certains gènes en phosphorylant le résidu sérine 10 des protéines histones 3 et en relâchant de cette façon la structure de la chromatine (Vermeulen et al., 2009).

III.2.c. Les facteurs de transcription NF-κB, AP-1 et CREB

Le facteur de transcription NF-κB joue un rôle essentiel dans l'inflammation en participant à la régulation de l'expression de la majorité des cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs de l'inflammation. Ce facteur de transcription est formé d'un complexe homo- ou hétérodimérique de protéines de la famille Rel (composée des membres p65 ou RelA, p50, c-Rel, RelB et p52). Ces protéines comportent chacune un domaine « Rel homology » assurant non seulement leur dimérisation – l'hétérodimère p65-p50 représente la forme la plus abondante et la mieux caractérisée de NF-κB – mais aussi leur liaison à l'ADN au niveau des éléments κB (Matt, 2002). Lorsque le facteur de transcription NF-κB est transloqué dans le noyau, il se lie à ces éléments et peut ainsi induire la transcription de ses gènes cibles. Etant donné que ce facteur de transcription est requis pour l'activation de la plupart sinon de tous les gènes induits par le LPS dans les monocytes (Guha and Mackman, 2001), nous avons étudié son rôle putatif dans la transcription des miR-132 et -212.

Outre NF-κB, de nombreux autres facteurs de transcription activés en aval de la voie de signalisation du LPS sont nécessaires à l'induction de l'expression des médiateurs inflammatoires (Guha and Mackman, 2001). Parmi les facteurs de transcription activés en aval des MAPK, ceux appartenant à la famille AP-1 jouent un rôle particulier dans l'inflammation, en régulant, tout comme NF-κB, l'expression de nombreuses cytokines proinflammatoires. Cette famille de facteurs de transcription est composée de dimères de protéines Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) et ATF (ATF2, ATF3 et B-ATF) essentiellement, bien que d'autres protéines puissent également s'associer à c-Fos ou c-Jun, comme des protéines de la famille Maf (c-Maf, MafB, MafF, MafG, MafK) et JDP (Jundimerizing partners). Lorsque les cellules sont exposées à des stimuli pro-inflammatoires, les kinases p38 et JNK entrent dans le noyau et activent par phosphorylation les facteurs de transcription AP-1 liés à l'ADN. Cette phosphorylation induirait une augmentation de l'affinité d'AP-1 pour son co-activateur CBP, permettant une induction de l'activité transcriptionnelle d'AP-1 (Matt, 2002).

Par ailleurs, le facteur de transcription CREB, qui est activé par le LPS via la protéine MSK1 en aval des voies ERK1/2 et p38 (Vermeulen et al., 2009) semble également un candidat opportun dans l'étude de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et -212. Ceci est d'autant plus vrai que son rôle dans l'expression de ces miRNAs a été suggéré à plusieurs reprises dans différents contextes (voir point II.2) et validé dans le contexte neuronal (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005). Dès lors, au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés au rôle que pouvait exercer CREB dans la transcription des miR-132 et -212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS.

Objectifs

Au cours des dernières années, un nombre croissant d'études ont démontré l'importance du rôle régulateur des miRNAs dans de très nombreux processus physiologiques, dont la prolifération, la survie, la différenciation, le développement, le métabolisme et l'inflammation, pour n'en citer que quelques-uns.

Les miR-132 et miR-212 ont jusqu'à présent été essentiellement étudiés dans des contextes neuronaux chez la souris, contextes dans lesquels quelques rôles physiologiques de leur induction ont pu être proposés suite à l'identification de plusieurs cibles. Bien que ceci n'ait pas encore été démontré chez l'homme, ces deux miRNAs sont transcrits de façon polycistronique chez la souris (Fiedler et al., 2008) et leur expression dépend du facteur de transcription CREB (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005). Néanmoins, aucun autre facteur de transcription régulant l'expression de ces miRNAs n'a encore été validé.

Il a été rapporté il y a quatre ans que le miR-132 était également induit lors de la stimulation au LPS de monocytes THP-1 (Taganov et al., 2006); néanmoins, les mécanismes responsables de cette induction ainsi que son rôle physiologique n'ont pas encore été abordés dans ce contexte. Très peu d'éléments sont d'ailleurs connus à propos de ces miRNAs dans le contexte inflammatoire. Il a été démontré que le miR-132, induit lors de la stimulation au LPS de macrophages primaires murins et humains, réprimait l'expression de l'acétyl-cholinestérase et qu'il pourrait de cette façon jouer un rôle dans la résolution de l'inflammation (Shaked et al., 2009). Ce miRNA est également induit lors de l'infection virale de cellules endothéliales lymphatiques, dans lesquelles il réprime l'expression du co-activateur transcriptionnel p300. A un niveau plus physiologique, il a aussi été démontré que ce miRNA était surexprimé dans les monocytes et macrophages de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Pauley et al., 2008). Ces études suggèrent toutes un rôle du miR-132 dans les processus inflammatoires; néanmoins, la question de la régulation transcriptionnelle de ce miRNA n'a pas encore été abordée dans ces contextes.

Au laboratoire, Aurélie Tacheny (thèse en cours, URBC, FUNDP) a mis en évidence que les miR-132 et miR-212 étaient induits par différents stimuli pro-inflammatoires (LPS, IL-1β, TNF-α) dans les monocytes et macrophages de la lignée THP-1. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle ces miRNAs joueraient un rôle important dans les réponses aux stimuli pro-inflammatoires. L'objectif de ce mémoire consiste en l'étude des mécanismes responsables de l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS.

Dans un premier temps, l'objectif était (i) de caractériser les profils d'expression des miR-132 et miR-212 en réponse à une stimulation au LPS de monocytes et de macrophages afin de déterminer si ces miRNAs présentent des profils d'expression similaires et (ii) de déterminer si ces miRNAs sont transcrits de façon polycistronique chez l'homme, comme cela a été démontré chez la souris. Dans un second temps, nous souhaitions déterminer si l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules stimulées au LPS résultait de processus transcriptionnels. Ensuite, dans un troisième temps, nous avons voulu tester le rôle potentiel de facteurs de transcription qui, à *priori*, pourraient participer à la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 dans ce contexte. Dans le but d'étudier plus en détails la région promotrice des miR-132 et miR-212, nous voulions également construire un plasmide rapporteur sous le contrôle d'une région promotrice putative de ces miRNAs. Enfin, dans un quatrième temps, nous désirions étudier l'expression de deux cibles rapportées du miR-132, SirT1 et p300, étant donné que ces cibles pourraient participer à des boucles de rétro-régulation de l'expression de ces miRNAs.

Matériel et méthodes

| Milieux | RPMI base | RPMI 1640 supplémenté en L-glutamine 2 mM | | | |
|---|--|--|--|--|--|
| | | (Invitrogen, Gibco) | | | |
| | | Sodium pyruvate 1 mM (Invitrogen, Gibco) | | | |
| | | HEPES 10 mM (Invitrogen, Gibco) | | | |
| | | Glucose 2,5 g/l | | | |
| | | 2-β-mercaptoéthanol 0,05 mM (Invitrogen, Gibco) | | | |
| | RPMI | RPMI base | | | |
| | complet | HIS (sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur) 10 | | | |
| | | (Invitrogen, Gibco) | | | |
| Boîtes de culture de 25, 50 ou 75 cm ² (T25, T75 et T150, Costar, Corning) | | | | | |
| Compteur de cellu | Compteur de cellules (Countess TM automated cell counter, Invitrogen) | | | | |
| Centrifugeuse (Ce | entrifuge 5702, 1 | Eppendorf) | | | |

Table 2.1 : Matériel requis pour la culture cellulaire.

| Molécules – Société | Fonction | Concentration stock | Concentration | Durée de (pré-) |
|-----------------------|-------------------------------------|---------------------|------------------|----------------------|
| et numéro de | | | finale | incubation |
| référence | | | | |
| PMA (phorbol 12- | Analogue du diacylglycérol. | 0,5 µg/µl dans du | 0,02 μg/ml (32,4 | 24h |
| myristate 13-acétate) | Provoque la différenciation | DMSO | nM) | |
| - Sigma P-8139 | des monocytes en | (diméthylsulfoxyde) | | |
| | macrophages | (ou 810 µM) | | |
| LPS | Composant de la paroi | 2 mg/ml dans de | 1 μg/ml | Variable |
| (lipopolysaccharide) | d' <i>E.coli</i> . Active plusieurs | 1'H ₂ O | | |
| d'Escherichia coli | voies de signalisation, | | | |
| 0111:B4 - Sigma L- | notamment par sa liaison au | | | |
| 2630 | TLR-4 (voir Introduction, | | | |
| | point III) | | | |
| SP 600125 - Tocris | Inhibiteur de JNK | 20 mM dans du | 10 μΜ, 20 μΜ | Pré-incubation 30 |
| Bioscience 1496 | | DMSO | ou 30 μM | min avant la |
| | | | | stimulation au LPS |
| Ro-31-8220 - | Inhibiteur de MSK1 | 50 mM dans du | 5 μΜ | Pré-incubation 1h |
| Calbiochem | | DMSO | | avant la stimulation |
| #557520 | | | | au LPS |
| H-89. 2HCl - | Inhibiteur de PKA | 20 mM dans du | 20 μΜ | Pré-incubation 1h |
| BioMol EI-296 | | DMSO | | avant la stimulation |
| | | | | au LPS |
| Actinomycine D de | Inhibiteur de la transcription | 5 mg/ml dans de | 5μg/ml | Pré-incubation 30 |
| Streptomyces sp | | l'éthanol | | min avant la |
| Sigma A 1410 | | | | stimulation au LPS |

Sigma A 1410 | stimulation au LPS | Table 2.2 : Molécules et inhibiteurs utilisés pour la différenciation et la stimulation des cellules.

I. Culture et traitement des cellules THP-1

I.1. Description de la lignée THP-1

Les cellules de la lignée monocytaire humaine THP-1 ont été isolées par Tsuchiya *et al.* (Tsuchiya et al., 1980) chez un garçon atteint d'une leucémie aigüe monocytaire. Ces cellules présentent des caractéristiques très proches des cellules monocytaires primaires humaines et peuvent être différenciées en cellules macrophagiques suite à une stimulation au PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) (Auwerx, 1991).

I.2. Culture cellulaire

Les cellules THP-1 (American Type Culture Collection, TIB-202TM) sont passées tous les deux à trois jours dans du RPMI complet (voir table 2.1) stérile et préchauffé à 37°C. Lors des passages, la suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 min à 1000 RPM (rotations par minute) et le culot cellulaire est resuspendu dans du RPMI complet à une densité de 2.10⁵ cellules/ml. Ces cellules sont ensemencées dans des nouvelles boîtes de culture (15 ml par T75 ou 30 à 50 ml par T150) et maintenues dans un incubateur à atmosphère humide contenant 5% de CO₂ et thermostatisé à 37°C.

I.3. Stimulation cellulaire

Les molécules utilisées lors de la différenciation et la stimulation des cellules ainsi que leurs concentrations sont indiquées à la table 2.2. La figure 2.1 illustre la chronologie des manipulations lors des stimulations cellulaires.

I.3.a. Différenciation au PMA

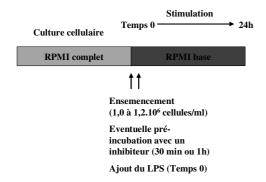
Les monocytes à différencier sont resuspendus à une densité comprise entre 1.10^6 et $1,2.10^6$ cellules/ml (excepté lorsque d'autres densités cellulaires sont spécifiquement indiquées, pour les optimisations de transfections de siRNA et de plasmides) dans du RPMI complet contenant $0,02~\mu$ g/ml de PMA. Après 24h, le milieu de différenciation est décanté et le tapis cellulaire lavé délicatement deux fois au tampon phosphate (PBS, phosphate buffer saline). Les cellules sont ensuite mises au repos dans du milieu complet pendant encore 24h avant leur stimulation au LPS. Les volumes de milieu de culture ou de rinçage sont de 3 ml/T25 et 9 ml/T75 pour les manipulations de différenciation et de stimulation.

I.3.b. Stimulation au LPS

Stimulation des cellules en suspension (monocytes)

Les suspensions de monocytes à stimuler sont centrifugées 5 min à 1000 RPM. Le culot cellulaire est resuspendu à une densité comprise entre 1.10^6 et $1,2.10^6$ cellules/ml dans du

Monocytes



Macrophages

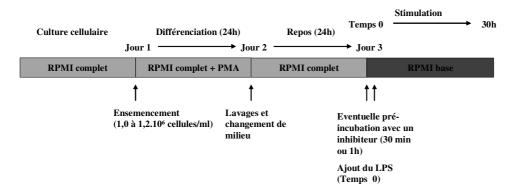


Figure 2.1 : Chronologie des manipulations réalisées lors des stimulations cellulaires (monocytes et macrophages).

| Aganta da transfaction | Lipofectamine TM 2000 Reagent (Invitrogen) |
|---|---|
| Agents de transfection | Lipotectamme 2000 Reagent (mvitrogen) |
| | Oligofectamine TM Reagent (Invitrogen) |
| | HiPerFect® Transfection Reagent (Qiagen) |
| | DharmaFECT (Thermo Scientific Dharmacon®) |
| Milieux | OPTI-MEM® I (Invitrogen, Gibco) |
| | RPMI base (voir table 2.1) |
| | RPMI complet (voir table 2.1) |
| Indicateur de transfection | siGLO® Transfection Indicators (Thermo Scientific |
| | Dharmacon®) |
| siRNA | ON-TARGETplus® SMARTpool human RelA (Thermo |
| | Scientific Dharmacon®) (« sip65 ») |
| | ON-TARGETplus® SMARTpool human CREB1 |
| | (Thermo Scientific Dharmacon®) (« siCREB ») |
| | ON-TARGETplus® Control Pool Non-targeting pool |
| | (Thermo Scientific Dharmacon®) (« siNT ») |
| Plaques de culture 24 puits (Costar, Corning) | |
| T25 (Costar, Corning) | |
| Centrifugeuse (Centrifuge 5702, Eppendorf) | |

Table 2.3 : Matériel utilisé lors des mises au point de transfection de siRNA.

RPMI base (sans sérum) contenant 1 µg/ml de LPS ou dans du RPMI base seul pour les cellules contrôles. Les cellules sont transférées dans des boîtes de culture et placées à l'étuve pour une durée variable (voir Résultats et discussion).

Stimulation des cellules adhérentes (macrophages)

Après les 24h de repos consécutives à l'étape de différenciation au PMA, le milieu des cellules est décanté et remplacé par du RPMI base contenant 1 µg/ml de LPS ou par du RPMI base seul pour les cellules contrôles.

I.3.c. Pré-incubation en présence de différents inhibiteurs

Dans certaines expériences, les cellules ont été incubées (ou non) en présence de différents inhibiteurs (SP 600125, Ro-31-8220, H-89, actinomycine D, voir table 2.2). Dans ce cas, les molécules inhibitrices ont été ajoutées 24h après la mise au repos des macrophages dans le milieu de culture RPMI base 30 min ou 1h avant l'ajout (ou non) de LPS (à une concentration finale de 1 μ g/ml), à l'exception de l'actinomycine D, qui a été ajoutée dans du RPMI base lors de la resuspension de monocytes après une centrifugation de 5 min à 1000 RPM.

I.4. Transfection de siRNA dans les THP-1

I.4.a. Principe

La transfection de siRNA est une technique employée en vue de réprimer de façon spécifique l'expression d'une protéine. Cette technique est basée sur le mécanisme naturel de silençage de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel dépendant des ARN interférants. Elle consiste en l'introduction dans les cellules de siRNA produits artificiellement qui dirigent les complexes RISC cellulaires vers les ARNm des protéines dont on veut spécifiquement réprimer l'expression. Etant donné la complémentarité parfaite existant entre les siRNA et leurs ARNm cibles, les siRNA induisent le clivage de leur cible et répriment de cette façon leur expression.

I.4.b. Optimisations de transfection de siRNA

Les optimisations de transfection de siRNA ont été réalisées en utilisant des indicateurs de transfection fluorescents (siGLO®) ainsi les agents de transfection indiqués à la table 2.3. Les manipulations décrites ci-dessous ont été réalisées en conditions stériles et RNase-free.

Transfection de cellules adhérentes (macrophages)

Au jour 1, un certain nombre de cellules (indiqué à la table 2.4) ont été différenciées au PMA dans un volume de 500 µl dans le puits d'une plaque 24 puits. Au jour 2, ces cellules ont soit été mises au repos jusqu'au jour 3 (cas des transfections simples avec la Lipofectamine 2000, l'Oligofectamine et le DharmaFECT) soit été transfectées directement après le retrait du PMA (cas des transfections doubles et transfection à l'HiPerFect). Les transfections ont été réalisées dans les conditions résumées à la table 2.4, en suivant les protocoles fournis par les

| Agent de transfection | Dilutions testées | [siGLO] finale | Mélange de transfec | ection | Transfection avant ou après | Nombre de transfections | Nombre de | Taux de trans estimé | transfection |
|---|----------------------|-------------------|--------------------------------------|--|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|--|--------------|
| | | | Agent transfectant | siGLO® Transfection Indicators 20 μM | différenciation | | cellules par puits | | |
| Lipofectamine TM 2000 Reagent | 1000X | 30 nM | 0,5 μl + 49,5 μl d'OPTI-MEM® I | 0,75 μl + 49,25 μl d'OPTI-MEM® I | Après | 1 | 100 000 et 200 000 | Faible (< 30%) | |
| (Invitrogen) | 500X | 30 nM et 50 nM | | 0,75 μl + 49,25 μl d'OPTI-MEM® I (30nM) ου 1,25 μl+ 48,75 μl d'OPTI- MEM® I (50nM) | Après | - | 100 000 et 200 000 | ~ 30% | |
| | 400X | 50 nM | 1,25 μl + 48,75 μl d'OPTI-MEM® I | 1,25 µl + 48,75 µl d'OPTI-MEM® I | Avant et après | 1 | 200 000 | ~ 40% différenciation; | après |
| | | | | | | | | indéterminable différenciation | avant |
| | 333X | 50 nM | 1,5 µl + 48,5 µl | $1,25 \mu l + 48,75 \mu l$ | Avant | 1 | 200 000 | Indéterminable | |
| | | | d'OPTI-MEM® I | | Après | 1 ou 2 | 200 000 | - 60% (1 se transfection) - 65% (2 transfections) | seule |
| | 286X | 50 nM | 1,75 μl + 48,25 μl d'OPTI-MEM® I | 1,25 μl + 48,75 μl d'OPTI-MEM® I | Après | 1 ou 2 | 200 000 | ~ 75% (1 se transfection) ~ 90% (2 transfections) | seule |
| Oligofectamine TM Reagent (Invitrogen) | 159X | 50 nM | 3 μl + 12 μl d'OPTI-MEM® I | 1,25 μl + 48,75 μl d'OPTI-MEM® I | Après | 1 | 100 000 et 200 000 | Faible (< 30%) | |
| HiPerFect® Transfection | 26X | 50 nM | 6 μl d'HiPerFect + 0 de RPMI base | 6 μl d'HiPerFect + 0,375 μl de siGLO + 50 μl de RPMI base | Après | 1 | 200 000 | Toxicité trop élevée | 0 |
| Reagent (Qiagen) | 34X | 50 nM | 6 μl d'HiPerFect + 0 de RPMI base | 6 μl d'HiPerFect + 0,5 μl de siGLO + 100 μl de RPMI base | Après | 1 | 20 000 et 200 000 | Toxicité trop élevée | 0 |
| DharmaFECT | 200X | 30 nM | $1 \mu + 49 \mu$ | 25 µl | Après | 1 | 100 000 et | Faible (< 30%) | |
| (Thermo Scientific | | | d'OPTI-MEM® I | d'OPTI-MEM® I | | | 200 000 | | |
| Dharmacon®) | , | | | | ; | | | , | , |

Table 2.4: Agents de transfection, conditions de transfection testées et taux de transfection estimés lors des mises au point de transfection de siRNA en plaque 24 puits.

fabriquants. Le jour suivant la transfection (ou la seconde transfection dans le cas des transfections successives), l'efficacité de transfection a été estimée en calculant le rapport entre le nombre de cellules transfectées, apparaissant vertes au microscope à fluorescence grâce aux siGLO® et le nombre de cellules total, dénombrées au microscope à fond clair. Les résultats (table 2.4) indiquent que le protocole le plus efficace consiste en deux transfections successives de cellules préalablement différenciées en présence de Lipofectamine 2000 diluée 286X. L'efficacité de la Lipofectamine 2000 étant supérieure à celle des autres agents utilisés, seul cet agent de transfection a été testé pour la transfection de monocytes.

Transfection de cellules en suspension (monocytes)

Au jour 1, les cellules ont été ensemencées dans les puits d'une plaque 24 puits à raison de 200 000 cellules/400 µl de RPMI complet/puits. Au jour 2, les cellules ont été transfectées dans les conditions résumées à la table 2.4 (transfection avant différenciation). Les cellules ont ensuite été différenciées par l'ajout de PMA soit 4h après la transfection, soit le lendemain. L'efficacité de la transfection a été évaluée 24h après l'ajout de PMA mais suite à la différenciation des cellules en amas, les taux de transfection n'ont pas pu être calculés.

I.4.c. Transfection de sip65 et siCREB

Afin de réprimer l'expression du facteur de transcription CREB et de la sous-unité p65 (ou RelA) du facteur NF-κB, des siRNA spécifiquement dirigés contre CREB (« siCREB ») et/ou contre p65 (« sip65 ») ont été transfectés dans des macrophages le jour suivant l'addition de PMA ainsi que deux jours plus tard (voir chronologie des manipulations à la figure 2.2). Des siRNA « non-target » (« siNT ») ont été utilisés comme contrôle en appliquant les mêmes conditions de transfection. Lors de ces transfections, les cellules ont été incubées pendant 4h en présence des complexes siRNA (concentrations indiquées dans la partie « Résultats et discussion ») – Lipofectamine 2000 (diluée 286X au final) avant d'être mises au repos dans du RPMI complet pendant 20h. Initialement (lors des mises au point de transfection de sip65 et de siCREB), 400 µl de complexes étaient utilisés pour transfecter 4.10⁶ cellules se trouvant dans 1,6 ml de RPMI complet dans des T25. Cependant, ces conditions ne permettant pas d'obtenir un taux de transfection comparable à celui obtenu lors des optimisations en plaques 24 puits, lors des manipulations suivantes (transfection de siRNA suivie d'une stimulation au LPS des cellules et de l'étude de l'expression des miRNAs) les conditions de transfection ont été ajustées de façon à se rapprocher des proportions (nombre de cellules/volume de transfection) utilisées lors des mises au point, tout en étant acceptables techniquement à plus grande échelle. Dès lors, 600 µl de complexes ont été utilisés pour transfecter 2.10⁶ cellules se trouvant dans 2,4 ml de RPMI complet dans des T25.

II. Extractions protéiques et Western Blots

II.1. Extractions et dosages protéiques

Une fois le temps de stimulation au LPS écoulé, les boîtes de culture sont placées sur glace et les cellules sont rincées 2 fois au PBS froid. Pour cela, les monocytes sont raclés délicatement dans leur milieu (ceci permet de décrocher les monocytes rendus adhérents par la stimulation au LPS) puis centrifugés pendant 5 min à 300 g. Le culot de cellules est rincé 2 fois en

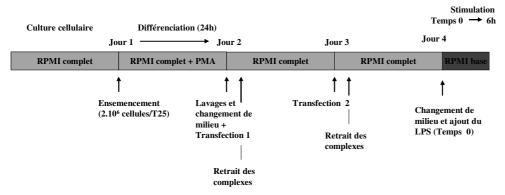


Figure 2.2 : Chronologie des manipulations réalisées lors de la transfection de siRNA suivie de la stimulation au LPS des macrophages.

| Tampon | Composition | | | |
|-------------------|---|--|--|--|
| Tampon 10% Triton | 10% Triton X-100 | | | |
| | 0,16% de PIC (Protease Inhibitor Cocktail tablets, Complete, Roche) | | | |
| | PIB dilué 25X (Phosphatase Inhibitor Buffer, le stock concentré 25 X est | | | |
| | composé de Na ₃ VO ₄ 25 mM, 4-nitrophenylphosphate 250 mM, β- | | | |
| | glycerophosphate 250 mM et de NaF 125 mM) | | | |
| | Tris pH 7,4 20 mM | | | |
| | KCl 150 mM | | | |
| | EDTA 2 mM | | | |
| Tampon DLA | urée 7 M | | | |
| | thiourée 2 M | | | |
| | CHAPS 4% | | | |
| | Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 30 mM | | | |
| | DTT 60 mM | | | |
| | PIC 0,16% (Protease Inhibitor Cocktail tablets, Complete, Roche) | | | |
| | PIB dilué 25X | | | |
| PBS pH 7,4 | NaCl 150 mM | | | |
| | KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM | | | |

Table 2.5 : Composition des tampons de lyse utilisés pour les extractions protéiques totales et nucléaires.

| Gels tris-glycine | Gel de séparation 12% | Pour deux mini-gels de 1,5 mm d'épaisseur : - 7,5 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 ; SDS 0,4% - 12 ml d'acrylamide 30% ; Bis 0,8% (Bio-Rad) - 9 ml d'H ₂ 0 - 30 µl de Temed - 1,5 ml d'ammonium persulfate 1% |
|------------------------------------|--|--|
| | Gel d'empilement 3% | Pour deux mini-gels de 1,5 mm d'épaisseur : - 2,5 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; SDS 0,4% - 1 ml d'acrylamide 30% ; Bis 0,8% (Bio-Rad) - 5,5 ml d'H ₂ 0 - 10 µl de Temed - 1 ml d'ammonium persulfate 1% |
| Tampons | Tampon d'électrophorèse (pH compris entre 8,5 et 8,9) | Pour 11: - 3,028 g de Tris-HCl (= 25 mM) - 14,4 g de glycine (= 192 mM) - 10 ml de SDS 10% (= 1% final) |
| | Tampon de transfert (pH porté à 8,3 avant l'ajout de méthanol) | Pour 11: - 2,43 g de Tris-HCl (= 10 mM) - 10,9 g de glycine (= 145 mM) - 200 ml de méthanol |
| | re : See Blue plus 2 Prestaine | d Standard (Invitrogen) |
| Membrane Immobilon TM (| Millipore) | |
| Méthanol 100% (Acros) | | |
| Papiers Whatman (Merck) | | |

Table 2.6 : Matériel requis pour les électrophorèses en gels tris-glycine et le transfert des protéines sur membranes.

présence d'1 ml de PBS froid avant d'être resuspendu dans du tampon de lyse (composition des tampons de lyse utilisés à la table 2.5). Pour les macrophages, les lavages sont réalisés soit de la même façon que pour les monocytes (lorsque le traitement induit le détachement des cellules (H-89)), soit le tapis cellulaire est rincé une fois au PBS, puis les cellules raclées dans du PBS et centrifugées 5 min à 300 g avant d'être lysées, soit le tapis cellulaire est rincé deux fois au PBS froid puis les cellules raclées directement dans le tampon de lyse.

Les extraits protéiques utilisés pour le premier Western Blot SirT1 (figure 3.20a de la partie Résultats et discussion) ont été obtenus en lysant les macrophages dans 250 µl de tampon de lyse Triton 10%/T25. Les lysats ont été transférés en tubes, agités sur roue pendant 15 min à 4°C, centrifugés pendant 15 min à 13 000 RPM à 4°C et le surnageant contenant les protéines a été récolté. Etant donné que cette extraction ne permettait pas d'obtenir des échantillons suffisamment concentrés, les autres extractions protéiques ont été réalisées en utilisant le tampon de lyse DLA. Selon la densité cellulaire, 50 à 100 µl de ce tampon sont utilisés pour lyser une T25 de cellules. Les lysats obtenus de cette façon sont agités pendant 30 min minimum à 4°C avant que les surnageants contenant les protéines ne puissent être récoltés suite à une centrifugation de 10 min à 13 000 RPM et 4°C.

Les concentrations protéiques des échantillons sont déterminées en utilisant le réactif de Pierce selon les recommandations indiquées par le fabriquant.

II.2. Western Blots

II.2.a. Principe

Le Western Blot est une technique permettant de déterminer de façon semi-quantitative l'abondance d'une protéine d'intérêt dans un échantillon protéique complexe. Cette technique repose sur la séparation électrophorétique en gel d'acrylamide des protéines selon leur poids moléculaire, leur transfert sur une membrane ainsi que le marquage spécifique de la protéine d'intérêt par des anticorps primaires et secondaires. Dans le cas de la révélation en fluorescence infra-rouge (LI-COR), les anticorps secondaires sont couplés à des sondes émettant dans l'infrarouge et l'abondance de la protéine d'intérêt est évaluée en scannant la membrane avec un scanner détectant ces ondes infrarouges. Dans le cas de la révélation en ECL (enhanced chemiluminescence), les anticorps secondaires sont couplés à des enzymes « horseradish peroxidase » (HRP). Ces enzymes émettent de la lumière en catalysant l'oxydation de leur substrat. La chémiluminescence émise par ces enzymes peut être détectée par une caméra suite à l'addition, dans la solution de révélation, de composés chimiques permettant une amplification de la lumière émise.

II.2.b. Méthode

Electrophorèse en gel tris-glycine et transfert sur membrane (table 2.6)

Pour réaliser les Western Blots p65, CREB et phospho-CREB, des quantités identiques de protéines (20 µg pour la révélation de p65 et de CREB lors des manipulation de transfection de siRNA et 30 µg pour la révélation de phospho-CREB et de CREB total lors des manipulations en présence des inhibiteurs H-89 et Ro-31-8220) sont additionnées de tampon

| Tampon de charge | NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen) | | |
|--|--|--|--|
| DTT | | | |
| Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; SDS 0,4% | | | |
| Gel NuPAGE® 3-8% Tris-Acétate (Ir | nvitrogen) | | |
| Tampon de migration | Novex® Tris-Acétate SDS Running Buffer (Invitrogen) | | |
| | NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen) 0,625% au final | | |
| Cuve d'électrophorèse : Novex minige | el-cell (Invitrogen) | | |
| Etalon de poids moléculaire : High M | olecular Weight Protein Standard (Invitrogen) | | |
| Tampon de transfert | NuPAGE® Transfert Buffer (Invitrogen) | | |
| | NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen) 1% | | |
| | Méthanol 10% | | |
| | Pour le Western blot p300 : 0,05% SDS | | |
| Membrane Immobilon TM (Millipore) | ou Hybond TM -P (Amersham, GE Healthcare) (pour p300) | | |
| Méthanol 100% | | | |
| Papier Whatman (Merck) | | | |

Table 2.7 : Matériel requis pour les électrophorèses en gels NuPAGE® et le transfert des protéines sur membranes.

| Révélation LI-COR | Révélation ECL |
|---|--|
| Boîtes LI-COR | Boîtes LI-COR |
| Agitateur (Rocker-Shaker MR-12, Biosan) | Agitateur (Rocker-Shaker MR-12, Biosan) |
| Agent bloquant Odyssey® Blocking Buffer (LI-COR) | ECL Advance TM Blocking Reagent (Amersham, GE |
| | Healthcare) |
| Anticorps (voir table 2.9) | Anticorps (voir table 2.9) |
| PBS (NaCl 150 mM; KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM; pH 7,4) | TBS (Tris 20 mM; NaCl 133 mM; pH 7,6) |
| Tween®-20 (Merck) | Tween®-20 (Merck) |
| Scanner infrarouge Odyssey® Infrared Imaging System | Solution de révélation: Lumigen TM TMA-6 (solutions A |
| (Westburg) | et B mélangées en proportions identiques GE Healthcare) |
| Logiciel Odyssey V3.0 (Westburg) | ImageQuant TM 350 (GE Healthcare) |

Table 2.8 : Matériel requis pour la révélation des Western Blots en LI-COR et en ECL.

| Révélation en fluorescence infra-rouge (LI-COR) | | | | | |
|---|--|-----------------------|--|---------------------|--|
| Protéine | Anticorps primaires | Dilution | Anticorps secondaires | Dilution | |
| p65 | IgG de lapin anti-NF-κB p65 (Santa Cruz SC-372) | 5 000 X | IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926- 32211) | 10 000 X | |
| CREB (1) | IgG de lapin anti-CREB (Cell Signaling Technology # 9197) | 500 X | IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926- 32211) | 8 000 X | |
| CREB (2) | IgG de lapin anti-CREB (Cell Signaling Technology # 4820) | 4 000 X | IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926- 32211) | 10 000 X | |
| Phospho- CREB (Ser133) | IgG de lapin anti-phospho- CREB (Ser133) (Upstate # 06- 519) | 1 000 X ou 2 000 X | IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926- 32211) | 10 000 X | |
| SirT1 | IgG de lapin anti-SirT1 (Cell Signaling Technology #2496S) | 1 500 X | IgG de chèvre anti-IgG de lapin-IR Dye® 800 (LI-COR, LI 926- 32211) | 10 000 X | |
| α-Tubuline | IgG de souris anti-α-tubuline (Sigma T5168) | 10 000 X | IgG de chèvre anti-IgG de souris-IR Dye® 680 (LI-COR LI 926-32220) | 10 000 X | |
| Révélation en ECL | | | | | |
| Protéine étudiée | Anticorps primaires | Facteur de dilution | Anticorps secondaires | Facteur de dilution | |
| p300 | IgG de souris anti-p300 (Novus Biologicals NB100-617) | 10 000 X | IgG de mouton anti-IgG de souris- HRP (Amersham GE Healthcare #NA931V) | 200 000 X | |
| α-Tubuline | IgG de souris anti-α-tubuline (Sigma T5168) | 50 000 X | IgG de mouton anti-IgG de souris- HRP (Amersham GE Healthcare #NA931V) | 100 000 X | |

Table 2.9 : Anticorps utilisés pour la révélation des Western Blots.

de charge 5X et portées à un volume final identique par l'ajout de Tris 0,5 M, pH 6,8. Ces échantillons sont incubés 5 min à 100°C puis centrifugés 5 min à 13 000 RPM avant d'être déposés sur des mini-gels tris-glycine (table 2.6). La migration est effectuée durant 1h à 1h15 à 200 V. Pour réaliser le transfert, des membranes de la taille du gel sont pré-traitées 1 min au méthanol 100% (hydratation des membranes) puis rincées dans du tampon de transfert (table 2.6). Des papiers Whatman épais sont également humidifiés dans ce tampon de transfert. Le montage suivant est réalisé: papier Whatman – membrane – gel – papier Whatman. Cet empilement est déposé sur un blotter et le transfert est effectué pendant 2h15 à environ 60 mA par gel (1 mA par cm² de membrane) ou une nuit à 30 mA. La suite de la révélation est commune aux Western Blots réalisés à partir d'électrophorèses en gels NuPAGE.

Electrophorèse en gel NuPAGE® et transfert sur membrane (table 2.7)

Les protéines SirT1 et p300 étant de haut poids moléculaire (respectivement 120 et 300 kDa), les Western Blots permettant d'évaluer leur abondance ont été réalisés à partir d'électrophorèses en gels précoulés NuPAGE® Tris-Acétate comportant un gradient d'acrylamide de 3 à 8%. Une quantité identique de protéines pour chaque échantillon (entre 15 et 40 µg pour l'étude de l'abondance de SirT1 ; 50 µg pour l'étude de l'abondance de p300) est additionnée de tampon de charge 4X concentré, de DTT 0,05 M final et portée à un volume identique par l'ajout de Tris 0,5 M, pH 6,8. Ces échantillons sont incubés à 70°C pendant 10 min puis centrifugés pendant 5 min à 13 000 RPM. Le gel précoulé est placé dans la cuve, les tampons et le montage sont réalisés en suivant les recommandations et les échantillons sont déposés dans les puits du gel. La migration est effectuée pendant 45 min à 200 V. Le transfert est effectué tel que décrit au point précédent, à l'exception du tampon de transfert dont la composition est indiquée à la table 2.7.

Blocage de la membrane et révélation en fluorescence infra-rouge (LI-COR)

Une fois le transfert terminé, les membranes sont transférées dans des boîtes et incubées en présence d'agent bloquant dilué 2X dans du PBS pendant 1h à température ambiante ou une nuit à 4°C en présence d'une faible agitation (table 2.8). Cette étape permet de limiter la fixation non spécifique ultérieure d'anticorps. Les anticorps primaires dirigés contre les protéines à révéler sont dilués (table 2.9) dans de l'agent bloquant contenant 0,1% de Tween et les membranes sont incubées avec ces anticorps pendant 1h à température ambiante ou une nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées 4 fois 5 min avec du PBS contenant 0,1% de Tween, puis incubées pendant 1h avec les anticorps secondaires, également dilués dans de l'agent bloquant contenant 0,1% de Tween. Les membranes sont à nouveau lavées 4 fois 5 min avec du PBS contenant 0,1% de Tween puis 2 fois avec du PBS sans Tween. Elles sont ensuite séchées à l'obscurité, puis scannées et quantifiées à l'aide du scanner infrarouge et du logiciel Odyssey. Ces membranes sont ensuite conservées à l'abri de la lumière à température ambiante pour une éventuelle nouvelle révélation. Lorsqu'une nouvelle protéine doit être détectée sur une membrane, celle-ci est ré-hydratée 1 min dans du méthanol, rincée au PBS puis bloquée et révélée selon le protocole décrit.

Blocage de la membrane et révélation en ECL (pour l'étude de p300)

Malgré de nombreuses tentatives d'optimisation (types d'extraction protéique ; conditions de transfert et de blocage ; types et dilutions des anticorps), nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence p300 par le système de révélation LI-COR. Le Western-blot présenté à la figure 3.21 a donc été révélé en ECL. Lors de ce type de révélation, les membranes sont, après

| | Tax 64.450 a.5 |
|---|--|
| PBS pH 7,4 | NaCl 150 mM |
| | KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM |
| Tampon HB 1X | Hepes 20 mM |
| | NaF 5 mM |
| | Na ₂ MoO ₄ 1 mM |
| | EDTA 0,1 mM |
| Tampon de lyse NP-40 0,5% pour extraction nucléaire | Hepes 20 mM |
| saline | NaF 5 mM |
| | Na ₂ MoO ₄ 1 mM |
| | EDTA 0,1 mM |
| | NP-40 0,5% |
| Solution de resuspension (RE) | Hepes 20 mM |
| _ | NaF 5 mM |
| | Na ₂ MoO ₄ 1 mM |
| | EDTA 0,1 mM |
| | Glycérol 17,4% |
| Solution saline (SA) | Hepes 20 mM |
| | NaF 5 mM |
| | Na ₂ MoO ₄ 1 mM |
| | EDTA 0,1 mM |
| | Glycérol 17,4% |
| | NaCl 800 mM |
| PIC (Protease Inhibitor Cocktail tablets, Complete, Roche) | 25X concentré |
| PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) 25X concentré | Na ₃ VO ₄ 25 mM |
| _ | 4-nitrophenylphosphate 250 mM |
| | β-glycerophosphate 250 mM |
| | NaF 125 mM |
| Table 2.10 . Calutions utilisées naun l'extraction seline d | |

Table 2.10 : Solutions utilisées pour l'extraction saline de protéines nucléaires.

transfert, bloquées pendant 1h à température ambiante dans du TBS (tris-buffer saline) contenant 0,1% de Tween et 2% de ECL $Advance^{TM}$ Blocking Reagent (table 2.8). Elles sont ensuite incubées pendant une nuit à 4°C en présence des anticorps primaires (dilués dans du TBS + 0,1% Tween + 2% d'agent bloquant), lavées 3 fois 15 min avec du TBS + 0,1% Tween, puis incubées pendant 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires (également dilués dans du TBS + 0,1% Tween + 2% d'agent bloquant) et à nouveau lavées 3 fois 15 min. Ensuite, 500 μ l de solution de révélation sont étalés sur les membranes et après 2 min d'incubation, la chémiluminescence émise par les enzymes couplées aux anticorps secondaires est observée à l'aide d'une caméra (ImageQuantTM 350 (GE Healthcare)).

III. Extractions protéiques nucléaires et tests de liaison à l'ADN de facteurs de transcription

III.1. Extractions protéiques nucléaires

III.1.a. Principe

Le protocole utilisé est modifié d'après le protocole de purification de noyaux décrit par (Dignam et al., 1983) et le protocole d'extraction saline décrit par (Chen et al., 1996). L'extraction nucléaire saline repose sur l'emploi d'un tampon hypotonique induisant le gonflement des cellules et donc la fragilisation de leur membrane externe. Les membranes plasmiques sont ensuite lysées à l'aide d'un détergent doux, tandis que les noyaux sont conservés. Ces derniers sont incubés en présence d'un tampon salin qui déstabilise les interactions ioniques entre les protéines et l'ADN et permet donc leur extraction.

III.1.b. Méthode

Les boîtes de culture sont placées sur glace et les cellules rincées deux fois délicatement au PBS froid (3 ml/lavage), puis incubées pendant 3 min précisément dans 3 ml de tampon HB (hypotonique) (table 2.10). Les boîtes sont décantées et les cellules raclées dans 200 µl de tampon de lyse contenant 0,5% de NP-40. Le lysat est collecté et centrifugé 30 sec à 13 000 RPM. Les surnageants (matériel cytosolique) sont éliminés, tandis que les culots (noyaux) sont resuspendus dans 30 µl de tampon RE additionné de PIC et de PIB. Le volume (RE + culot resuspendu) est évalué et un volume identique de tampon SA additionné de PIC et de PIB est ajouté. Les lysats sont agités sur roue à 4°C pendant 30 min minimum, puis centrifugés 10 min à 13 000 RPM à 4°C. Les surnageants sont récoltés et conservés à -70°C.

III.2. Test de liaison à l'ADN (TransAM)

III.2.a. Principe

Le test de liaison à l'ADN TransAM permet de mesurer la capacité d'un facteur de transcription à se lier sa séquence nucléotidique consensus. Brièvement, des sondes

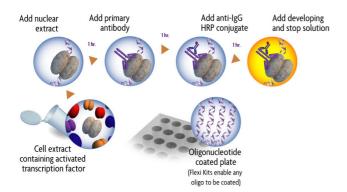


Figure 2.3: Principe du test de liaison à l'ADN basé sur l'ELISA (TransAMTM, Active Motif) (http://www.activemotif.com).

| Plaques 96 puits tapissées d'oligonucléotides contena | Plaques 96 puits tapissées d'oligonucléotides contenant des sites consensus pour le facteur de transcription AP-1 (ces | | | |
|---|--|--|--|--|
| plaques ont été préalablement confectionnées par Auro | élie Tacheny) | | | |
| Tampon de liaison AP-1 | HEPES 2 mM pH 7,9 | | | |
| | EDTA 0,2 mM | | | |
| | NaCl 8 mM | | | |
| | Glycérol 12% | | | |
| | DTT 1 mM | | | |
| | polydIC 0,165 ng/μl | | | |
| | Gloria 1% | | | |
| PBS 50 Tween 0,1% pH 7,4 | NaCl 50 mM | | | |
| | KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM | | | |
| | Tween®-20 0,1% | | | |
| Anticorps primaires et secondaires listés à la table 2.12 et dilués dans du PBS 50 (sans Tween) contenant 1% de BSA | | | | |
| Tétraméthylbenzidine (TMB, Tebu-bio Laboratories # | FTMB100-0100) | | | |
| HCl 1N | | | | |
| Spectrophotomètre xMark TM Microplate Spectrophoto | ometer (BioRad) et logiciel Microplate Manager 6 (MPM6) | | | |

Table 2.11 : Matériel utilisé pour les tests de liaison à l'ADN.

| Membre étudié | Anticorps primaires | Dilution (dans du PBS 50 + 1% BSA) | Anticorps secondaires conjugués couplés à la HRP | Dilution (dans du PBS 50 + 1% BSA) |
|---------------|--|--|--|--|
| c-Jun | IgG de lapin anti-c-Jun (Santa Cruz SC-1694) | 1000 X | IgG de chèvre anti-IgG de lapin-HRP (Santa Cruz SC-2054) | 1000 X |
| Phospho-c-Jun | IgG de souris anti- phosho-c-Jun (Santa Cruz SC-822) | 1000 X | IgG de chèvre anti-IgG de souris-HRP (Santa Cruz SC- 2005) | 1000 X |
| c-Fos | IgG de lapin anti-c-Fos (Santa Cruz SC-7202) | 1000 X | IgG de chèvre anti-IgG de lapin-HRP (Santa Cruz SC-2054) | 1000 X |
| JunD | IgG de lapin anti-JunD (Active Motif #100678) | 1000 X | IgG de chèvre anti-IgG de lapin-HRP (Santa Cruz SC-2054) | 1000 X |

Table 2.12 : Anticorps utilisés pour les tests de liaison à l'ADN des différents membres de la famille AP-1 (ELISA-like).

| miRNeasy® MiniKit (Qiagen) | QIAzol lysis reagent | |
|--|------------------------------------|--|
| | Colonnes de purification de l'ARN | |
| | Solution RWT additionnée d'éthanol | |
| | Solution RPE additionnée d'éthanol | |
| | H ₂ O RNase-free | |
| Tubes d'1,5 ml DNA Lo-Bind® (Eppendorf) | | |
| PBS RNase-free froid initialement stérile pour éviter une contamination par des RNases (Lonza) | | |
| Chloroforme 100% RNase-free | | |
| Ethanol 100% RNase-free | | |
| Centrifugeuse (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) | | |

Table 2.13: Matériel requis pour l'extraction d'ARN avec le miRNeasy® MiniKit (Qiagen).

nucléotidiques comportant des sites consensus pour un facteur de transcription d'intérêt sont immobilisées dans des puits dans lesquels sont déposés des extraits nucléaires. Les facteurs de transcription venant se lier à ces sites consensus sont révélés selon le même principe que l'ELISA, avec des anticorps primaires et secondaires couplés à la peroxydase (voir figure 2.3). Au cours de ce mémoire, ce test a été réalisé afin d'évaluer les effets de l'inhibiteur SP 600125 sur la capacité du facteur de transcription AP-1 à lier sa séquence consensus.

III.2.b. Méthode

Cinq μg de protéines nucléaires sont déposées dans les puits d'une plaque 96 puits tapissés d'oligonucléotides contenant des sites consensus pour le facteur de transcription AP-1 en présence de 30 μ l de tampon de liaison (table 2.11) et incubés pendant 1h à température ambiante sous faible agitation. Les puits sont ensuite lavés 3X avec 200 μ l de PBS 50 + 0,1% Tween puis incubés pendant 1h à température ambiante sans agitation avec les anticorps primaires adéquats (table 2.12) (100 μ l/puits). Après trois nouveaux lavages au PBS 50 + 0,1% Tween, les anticorps secondaires sont ajoutés (100 μ l/puits) et incubés pendant 1h à température ambiante sans agitation. Les puits sont ensuite lavés 4X au PBS 50 + 0,1% Tween, décantés, puis 100 μ l de TMB sont ajoutés et les puits placés à l'obscurité pendant 10 min. La réaction colorimétrique est stoppée par l'ajout de 100 μ l d'HCl 1N et l'activité peroxydase est évaluée par une lecture de l'absorbance à 450 nm ; référence 655 nm.

IV. Analyse de l'expression des miR-132 et miR-212 ainsi que de leur forme primaire

IV.1. Extractions d'ARN

Toutes les manipulations réalisées en vue d'extraire ou à partir d'échantillons d'ARN sont réalisées en conditions « RNase-free ». Selon les applications, trois types d'extraction d'ARN ont été réalisés au cours de ce mémoire.

IV.1.a. Extractions avec le miRNeasy® MiniKit (Qiagen)

Afin d'étudier l'expression des formes matures des miR-132 et miR-212, l'ARN est extrait des cellules THP-1 par l'utilisation du miRNeasy® MiniKit (Qiagen) (voir matériel à la table 2.13). Les cellules sont rincées 1 fois au PBS froid puis lysées dans 700 µl de tampon de lyse QIAzol dans un tube DNA LoBind®. L'ARN est ensuite extrait des lysats en suivant les recommandations d'utilisation du kit miRNeasy, permettant de conserver les petits ARN (un lavage supplémentaire avec la solution RPE est ajouté afin d'améliorer les ratio de l'extraction). La quantité d'ARN récolté est évaluée en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science).

IV.1.b.Extractions avec le TRI Reagent Solution (Ambion)

Le TRI Reagent Solution est utilisé dans les manipulations visant à étudier l'expression de la forme primaire des miR-132 et -212 (le matériel utilisé pour ce type d'extraction est indiqué à

| TRI Reagent Solution (Ambion) |
|--|
| Tubes d'1,5 ml DNA Lo-Bind® (Eppendorf) |
| PBS RNase-free froid initialement stérile pour éviter une contamination par des RNases (Lonza) |
| Chloroforme 100% RNase-free |
| 2-propanol RNase-free |
| Ethanol 75% RNase-free froid |
| H ₂ O RNase-free |
| Centrifugeuse (Centrifuge 5415 R. Eppendorf) |

Table 2.14 : Matériel utilisé pour l'extraction d'ARN avec le TRI Reagent Solution.

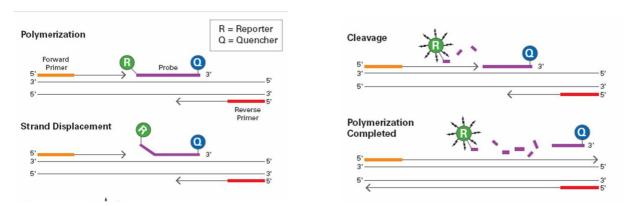


Figure 2.4 : Principe de la méthode Taqman permettant la mesure de l'abondance de transcrits par PCR en temps réel (http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx).

| Matériel nécessaire | | Volume introduit en µl /réaction de 15 µl |
|--|----------------------------------|--|
| TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit | Tampon de réaction 10X concentré | 1,5 |
| (Applied Biosystems) | H ₂ O RNase-free | 4,162 |
| | Inhibiteur de RNases (20 U/µl) | 0,188 |
| | Mélange de dNTP (100 mM) | 0,15 |
| | Reverse transcriptase (50 U/µl) | 1 |
| TaqMan® MicroRNA Assay pour les hsa-miR- | Sondes de rétro-transcription | 3 |
| 132 (#457); hsa-miR-212 (#515); hsa-miR-155 | | |
| (#2623); RNU-44 (#1094) (Applied Biosystems) | | |
| Echantillons d'ARN (miRNeasy® MiniKit) dilués à 20 ng/μl | | 5 |

Table 2.15 : Composition des mélanges de rétro-transcription des formes matures des miRNAs.

| Matériel | Volume |
|---|---------|
| TaqMan® Universal PCR master mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems) | 24 μ1 |
| H ₂ O milliQ | 18,4 μ1 |
| TaqMan® MicroRNA Assay pour les hsa-miR-132 (#457); hsa-miR-212 (#515); hsa-miR-155 | 2,4 μ1 |
| (#2623); RNU-44 (#1094) (Applied Biosystems) – sondes pour la PCR en temps réel | |
| ADNc non dilué (dilution finale : 15X) | 3,2 µl |

Table 2.16 : Composition des mélanges destinés à la mesure de l'expression relative des miRNAs matures par PCR en temps réel.

la table 2.14). Les cellules sont lavées une fois au PBS froid avant d'être lysées dans 300 μ l de TRI Reagent Solution dans un tube DNA LoBind®. Les lysats sont incubés pendant 5 min à température ambiante et la suite de l'extraction est réalisée en suivant le protocole du fabriquant. La quantité d'ARN récolté est évaluée au NanoDrop ND-1000.

IV.1.c. Extractions avec le RNeasy® MiniKit (Qiagen)

Lors des essais de rétro-transcription et d'amplification du pri-miR-132/212 par PCR, des extractions d'ARN de monocytes avec le RNeasy® MiniKit (Qiagen) ont été testées en suivant le protocole fourni par le fabriquant. Ces essais n'ayant pas abouti à des résultats positifs, ce protocole ne sera pas détaillé.

IV.2. Rétro-transcription et quantification de l'expression des miRNAs matures et du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel

IV.2.a. Principe

La PCR en temps réel est une technique permettant de mesurer l'abondance relative de transcrits au sein des cellules. Cette technique repose tout d'abord sur la rétro-transcription des échantillons d'ARN en ADN complémentaire (ADNc) puis sur la quantification de l'expression des ADNc, celle-ci étant proportionnelle à l'abondance des ARN d'intérêt. Afin de quantifier l'expression des ADNc, ceux-ci sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques. Dans le cas de la méthode Taqman (illustrée à la figure 2.4), de petites sondes complémentaires à la séquence de l'ADNc s'hybrident à celui-ci. Ces sondes comportent un fluorochrome et un quencher et n'émettent donc aucun signal fluorescent lorsqu'elles sont intactes. Cependant, lors de l'amplification par PCR des ADNc, ces sondes sont clivées et le fluorochrome est libéré du quencher. L'émission de fluorescence augmente donc à chaque cycle d'amplification PCR. Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur seuil de fluorescence distingable du bruit de fond (Ct; Cycle treshold) est compté. Plus l'ADNc est abondant au début de la réaction, moins de cycles d'amplification sont requis pour atteindre la valeur seuil de fluorescence.

IV.2.b.Etude des formes matures

Rétro-transcription

La rétro-transcription des formes matures des miRNAs est réalisée dans des microtubes en engageant les réactifs et quantités d'ARN indiqués à la table 2.15. La rétro-transcription est réalisée dans un thermo cycler (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems) en suivant un programme composé de 30 min à 16°C, 30 min à 42°C et 5 min à 85°C. Les échantillons sont ensuite refroidis à 4°C avant d'être conservés à -20°C.

PCR en temps réel

L'étude de l'expression relative des miRNAs matures par PCR en temps réel est réalisée en mélangeant les réactifs listés à la table 2.16 puis en répartissant 2 fois 20 µl de ce mélange dans deux puits d'une plaque 96 puits. La réaction est effectuée dans un 7900 HT Fast Real-

| TURBO DNA-free TM Kit (Applied Biosystems) | TURBO DNase (2 U /μl) |
|---|------------------------------------|
| | Tampon TURBO DNase 10X |
| | Réactif d'inactivation de la DNase |
| | H ₂ O nucléase-free |
| Tubes de 0,5 ml RNase-free (Eppendorf) | |
| Etuve à 37°C | |
| Centrifugeuse (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) | |

Table 2.17 : Matériel utilisé pour le traitement à la DNase des échantillons d'ARN.

| Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche | Amorces oligo(dT) ₁₈ |
|---|---|
| Applied Science) | Amorces random hexamer |
| | H ₂ O PCR grade |
| | Tampon de réaction de la Transcriptor Reverse |
| | transcriptase 5X concentré |
| | Inhibiteur de RNase |
| | Mélange de désoxynucléotides (10 mM chacun) |
| | Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µl) |
| Amorces spécifiques (PrimiR2 AS) | 5'-GGG CGA CCA TGG CTG TAG-3' (Eurogentec) |
| DMSO | |
| Bétaïne | |
| Bloc chauffant (DRI-BLOCK® DB-2D, Techne) | |

Table 2.18 : Matériel utilisé pour rétro-transcrire le pri-miR-132/212.

Time PCR System (Applied Biosystems) en suivant un programme composé des phases suivantes : $2 \text{ min à } 50^{\circ}\text{C}$, $10 \text{ min à } 95^{\circ}\text{C}$ puis $40 \text{ cycles de } 15 \text{ sec à } 95^{\circ}\text{C}$ et d'1 min à 60°C . L'expression relative des miRNAs est calculée en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Le ΔCt est calculé en soustrayant la valeur de Ct moyenne du RNU-44 (utilisé comme contrôle endogène) à la valeur de Ct moyenne du miRNA étudié dans une condition particulière. Le $\Delta\Delta\text{Ct}$ est ensuite calculé en soustrayant le ΔCt de la condition par rapport à laquelle on normalise les résultats (généralement le temps 0 h; voir légendes des graphiques) aux ΔCt des autres conditions. L'expression relative est enfin donnée par la formule suivante : $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

IV.2.c. Etude du pri-miR-132/212

Traitement à la DNase des extraits d'ARN

Préalablement à leur rétro-transcription, les échantillons d'ARN destinés à l'amplification PCR du pri-miR-132/212 ainsi qu'à la quantification de son expression par PCR en temps réel sont traités à la DNase (voir table 2.17). Pour cela, les échantillons d'ARN sont portés à une concentration maximale de 500 ng/µl et mélangés avec 0,1 volume de tampon et la DNase (1,5 µl pour 35 µl de réaction). La digestion est effectuée pendant 30 min à 37°C puis est stoppée suite à l'ajout de 0,2 volume de tampon d'inactivation. L'inactivation est réalisée pendant 5 min à température ambiante en vortexant fréquemment les échantillons pour assurer la dispersion du tampon d'inactivation. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 1,5 min à 10 000 g, le surnageant est récolté et l'ARN à nouveau dosé au NanoDrop ND-1000.

Rétro-transcription du pri-miR-132/212

Les essais de rétro-transcription du pri-miR-132/212 ont été réalisés en utilisant le matériel indiqué à la table 2.18 et des extraits d'ARN issus des trois méthodes d'extraction décrites précédemment. Brièvement, environ 2 µg d'ARN sont mélangés avec des amorces (soit random hexamer, soit oligo(dT)₁₈, soit spécifiques), du DMSO (de façon à ce qu'il soit à une concentration finale de 0 à 5% dans les 20 µl de réaction) et de la bétaïne (0 à 0,1 M au final) et portés à un volume de 13 µl (pour une rétro-transcription dans un volume final de 20 µl). Afin de dénaturer les structures secondaires, différentes durées et températures de dénaturation (65°C pendant 10 min; 80°C pendant 1, 5 ou 10 min et 95°C pendant 5 min) ont été testées avant la réaction enzymatique. Après dénaturation, les échantillons sont mis sur glace et un mélange contenant le tampon de l'enzyme (équivalent de 4 µl pour un volume final de réaction de 20 µl), l'inhibiteur de RNase (0,5 µl), des désoxynucléotides (2 µl) ainsi que la transcriptase inverse (0,5 µl) est ajouté. Différentes durées et températures ont été testées lors des mises au point (protocole classique : 30 min à 55°C; protocole pour les séquences riches en GC : 30 min à 65°C ou protocole pour les longs transcrits : 1h à 55°C). Au terme des optimisations, il s'est avéré qu'il était possible de rétro-transcrire le pri-miR-132/212 en employant les conditions suivantes : utilisation d'une amorce spécifique à une concentration finale de 2 µM (pour la démonstration de l'existence d'un pri-miRNA commun aux miR-132 et miR-212) ou d'une amorce poly(dT)₁₈ à une concentration de 2,5 µM (pour la quantification par PCR en temps réel de l'expression du pri-miRNA), DMSO 1%, bétaïne 0,1 M, étape de dénaturation de 10 min à 65°C et élongation 30 min à 65°C.

Amplification par PCR du pri-miR-132/212

| Matériel utilisé pour l'amplification par PCR du pri-miR-132/212 | | |
|--|-----------------------|---|
| Amorces (Eurogentec) | Nom de l'amorce | Séquence |
| | | |
| | PrimiR1 Sens | 5'-TTG GCT CTA GAC TGC TTA CTG - 3' |
| | PrimiR1 Antisens | 5'-CGA CCA TGG CTG TAG ACT GT -3' |
| | PrimiR2 Sens | 5'-CGG CAC CTT GGC TCT AGA CT - 3' |
| | PrimiR2 Antisens | 5'-GGG CGA CCA TGG CTG TAG -3' |
| | PrimiR amont Sens | 5'-CCT CTG GGA CAT CTT TGA CG - 3' |
| | PrimiR amont Antisens | 5'-CAG TAA GCA GTC TAG AGC CAA -3' |
| GoTaq Polymerase (5 U/µl) (Promeg | | |
| Tampon Colorless GoTaq TM Reactio | n Buffer 5X (Promega) | |
| dNTP Master Mix (20 mM au total) | (Eurogentec) | |
| H ₂ O MilliQ | | |
| DMSO | | |
| Bétaïne 98% (Aldrich) | | |
| Tubes PCR | | |
| Peltier Thermal Cycler PTC-225 | | |
| Matériel utilisé pour la visualisation | | |
| Agarose (Ultrapure TM Agarose, Invitrogen) | | 1,6 g |
| Tampon TBE (Tris/borate/EDTA) | | 80 ml |
| Bromure d'éthidium | | 15 μl |
| Tampon de charge (Blue/Orange Loading Dye 6X, Promega) | | 2 μl dans 10 μl de produits d'amplification |
| Etalon BenchTop 100 bp DNA Ladder (Promega) 6 μl/puits | | 6 μl/puits |
| Cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE | | |
| Générateur de courant (migration 45 | min à 110 V) | |

Table 2.19: Matériel utilisé lors des essais d'amplification par PCR du pri-miR-132/212.

| Restriction par SmaI | |
|--|------|
| Produits purifiés résultant de l'amplification du pri-miR-132/212 putatif avec les amorces | 8 µ1 |
| PrimiR2 ou pSKoriTKan linéarisé par EcoRV | |
| H_2O | 9 μl |
| Tampon J 10X (Promega) | 2 μ1 |
| Enzyme SmaI (Promega) | 1 μl |
| Restriction par XbaI | |
| Produits purifiés résultant de l'amplification avec les amorces PrimiR amont | 8 μ1 |
| H_2O | 9 μl |
| Tampon H 10X (Roche) | 2 μ1 |
| Enzyme XbaI (Roche) | 1 μl |
| Restriction par AatII | |
| Produits purifiés résultant de l'amplification avec les amorces PrimiR amont | 8 µ1 |
| H_2O | 9 µl |
| Tampon A 10X (Roche) | 2 μ1 |
| Enzyme AatII (Roche) | 1 μ1 |

Table 2.20 : Composition des mélanges de restriction.

| Matériel | Volume |
|--|--------|
| TaqMan® Universal PCR master mix No AmpErase® UNG (Applied Biosystems) | |
| H ₂ O milliQ | |
| TaqMan® Pri-miRNA Assay pour les hsa-miR-132 (Hs 03303111_pri) et hsa-miR-212 (Hs 03302957_pri) et TaqMan® Gene Expression Assay pour la GAPDH (Hs 99999905 m1)(Applied Biosystems) – sondes pour la PCR en temps réel | |
| ADNc non dilué (dilution finale : 5X) | 9,6 µl |

Table 2.21 : Matériel utilisé pour la mesure de l'expression relative du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel.

Les essais d'amplification par PCR du pri-miR-132/212 ont été réalisés en utilisant les amorces, solutions et enzymes indiquées à la table 2.19. Les produits de rétro-transcription ont été utilisés comme matrices à des dilutions finales de 10X, 20X ou 50X; les amorces ont été utilisées à des concentrations finales de $1~\mu M$, $0.2~ou~0.1~\mu M$; les dNTP ont été utilisés à une concentration finale de $200~\mu M$ et l'enzyme à raison de $0.025~U/\mu l$ de réaction. Différentes concentrations de DMSO et de bétaïne ont également été testées (0 à 10% de DMSO et 0 à 1 M de bétaïne). L'amplification PCR a été réalisée par la succession des programmes suivants : dénaturation initiale de 5 min à $95^{\circ}C$; 35 cycles comportant 30 sec de dénaturation à $95^{\circ}C$, 30 sec d'hybridation des amorces (T°C dépendant de la température de fusion (T°m) des amorces) et 15~a 30 sec d'élongation à $72^{\circ}C$ (équivalent d'une min d'élongation/kb à amplifier) puis élongation finale pendant 10~min à $72^{\circ}C$. Les produits d'amplification ont ensuite été mélangés à du tampon de charge et visualisés sur un gel d'agarose 2% en présence de bromure d'éthidium ($15~\mu l/80~ml$ de gel). La longueur des fragments amplifiés a été estimée grâce à l'étalon.

Purification des produits PCR

Les profils de restriction enzymatique des produits PCR de taille attendue ont été réalisés après purification de ces produits en utilisant le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) selon le protocole du fabriquant. Etant donné la présence de produits aspécifiques lors de l'amplification par PCR réalisée avec les amorces « primiR2 », les produits de taille attendue ont d'abord été purifiés sur gel, puis ré-amplifiés par PCR et repurifiés (sans passage sur gel). Les produits d'amplification résultant de l'utilisation des amorces « primiR amont » ont quant à eux été directement purifiés sans passage sur gel.

Restrictions diagnostiques

Les produits amplifiés par la PCR réalisée avec les amorces « primiR2 » ont été digérés pendant 1/2h à température ambiante par l'enzyme de restriction SmaI (table 2.20). Le contrôle positif de cette digestion enzymatique a été réalisé en digérant du plasmide pSKoriTKan préalablement digéré par EcoRV (cette digestion est décrite par après) et purifié en utilisant le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Les produits amplifiés par la PCR réalisée avec les amorces « pri-miR amont » ont quant à eux été digérés pendant 45 min à 37°C avec les enzymes XbaI ou AatII. Une fois le temps de digestion écoulé, les produits de restriction ont été visualisés sur un gel d'agarose 2% additionné de bromure d'éthidium.

Quantification par PCR en temps réel de l'expression du pri-miR-132/212

Les échantillons d'ARN issus d'une extraction au TRI Reagent Solution, traités à la DNase et rétro-transcrits selon le protocole décrit précédemment sont utilisés afin de quantifier l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel en mélangeant les réactifs listés à la table 2.21 puis en répartissant 2 fois 20 µl de ce mélange dans deux puits d'une plaque 96 puits. La dilution finale de l'ADNc engagé lors de la réaction a été déterminée au cours de mises au point durant lesquelles des facteurs de dilution 5X, 50X et 500X ont été testés. Les PCR en temps réel sont effectuées dans un 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) en suivant un programme composé des phases suivantes : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C puis 40 cycles de 15 sec à 95°C et d'1 min à 60°C. L'expression relative du pri-miR-132/212 est mesurée en normalisant les résultats à l'abondance de la GAPDH (utilisée comme contrôle endogène) et en utilisant la méthode du 2^{-ΔΔCt} (Livak and Schmittgen, 2001).

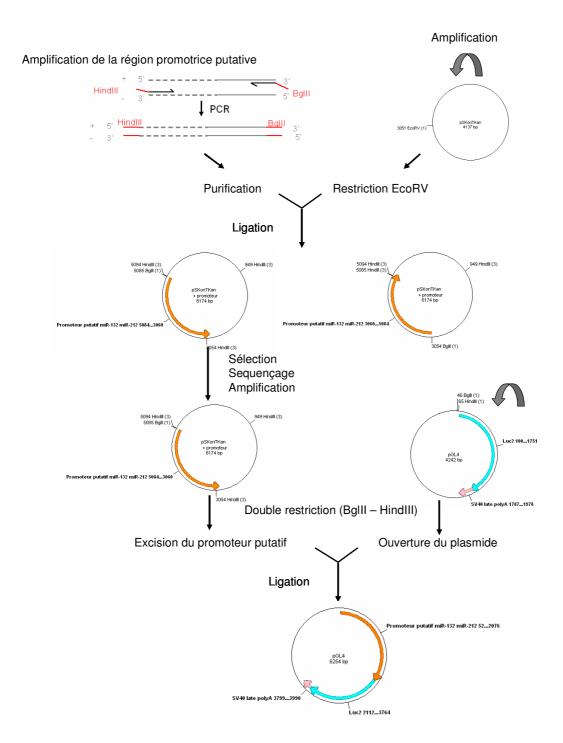


Figure 2.5: Stratégie de clonage d'une région promotrice putative des miR-132 et miR-212 dans le plasmide rapporteur pGL4.10. Tout d'abord, la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 est amplifiée en utilisant des amorces contenant les sites de restriction des enzymes BgIII et HindIII. Ces sites de restrictions permettent un clonage directionnel de la région amplifiée dans le site multiple de clonage situé en amont du gène de la luciférase (luc2) encodé par le plasmide pGL4.10. La région promotrice putative est amplifiée par PCR puis purifiée et clonée dans un plasmide intermédiaire, le pSKOriTKan, préalablement ouvert grâce à une digestion EcoRV (qui génère des extrémités franches). Ces plasmides sont ensuite transformés en bactéries, sélectionnés, amplifiés, et la région promotrice clonée est séquencée. Le plasmide pSKOriTKan + promoteur est ensuite digéré avec les enzymes BgIII et HindIII, qui excisent la région promotrice du plasmide (le clonage dans ce plasmide intermédiaire est nécessaire pour permettre une restriction efficace par ces enzymes, étant donné que les enzymes de restriction ne restreignent pas efficacement les sites situés aux extrémités d'un fragment d'ADN). Le plasmide rapporteur, préalablement amplifié en bactéries, est également restreint par ces deux enzymes. Les produits de restriction sont ensuite ligués ensemble, ce qui permet l'insertion de la région promotrice putative en amont du gène de la luciférase encodé par le plasmide rapporteur. Ce plasmide peut ensuite être transfecté en cellules THP-1.

V. Construction d'un plasmide rapporteur encodant un promoteur putatif des miR-132 et miR-212 et transfection de ce plasmide dans les cellules THP-1

V.1. Principe

Afin d'analyser la régulation transcriptionnelle des miR-132 et -212, nous avons cloné un promoteur putatif de ces deux miRNAs en amont du gène de la luciférase de Firefly (Luc2) encodé par le plasmide rapporteur pGL4.10 Luc2 (Promega). La stratégie de clonage poursuivie est illustrée à la figure 2.5.

V.2. Construction du plasmide rapporteur

V.2.a. Extraction de l'ADN génomique de cellules THP-1 et tentatives d'amplification du promoteur avec la Phusion polymérase

Initialement, l'objectif était d'amplifier le promoteur des miRNAs à partir d'ADN génomique de cellules THP-1 pour ensuite réaliser le clonage. Brièvement, l'ADN génomique a été extrait de 1.10⁶ monocytes en utilisant le kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega) en suivant le protocole du fabriquant. Les tentatives d'amplification de la région promotrice putative ont été réalisées avec la Phusion polymérase (Finnzyme) en présence des différents tampons de l'enzyme, avec (3%) et sans DMSO, en testant deux concentrations d'ADN matrice (125 et 250 ng/50 μl de réaction) et les amorces « promoteur 1 » (les séquences de ces amorces sont indiquées à la table 2.23) à une concentration finale de 0,5 μΜ. Malgré beaucoup d'aspécificité (en dépit des gradients de température testés lors de l'amplification), une bande de taille attendue a été purifiée avec le kit ® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), clonée dans le pSKoriTKan préalablement restreint avec EcoRV puis séquencée. Etant donné que la séquence clonée était différente du promoteur putatif des miR-132 et miR-212, des BAC (bacterial artificial chromosome) comportant un fragment de la région chromosomique 17p13.3 du génome humain ont finalement été utilisés comme matrice pour amplifier la région promotrice des miR-132 et miR-212.

V.2.b. Amplification et extraction des BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

La composition des milieux utilisés pour permettre la croissance des bactéries DH10E transformées par le BAC RP11-357O7 est indiquée à la table 2.22.

Les clones comportant le BAC RP11-357O7 (BACPAC) ont été reçus dans un petit bloc d'agar, ensemencés sur milieu agar solide contenant du chloramphénicol (sélection des bactéries comportant le BAC) et cultivés pendant environ 16h à 37°C. Le lendemain, quelques colonies ont été amplifiées par mini- puis maxi-cultures en présence de chloramphénicol.

Les BAC ont été extraits des maxi-cultures en utilisant le Large Construct Kit (Qiagen) selon les instructions du fabriquant.

| Milieu LB solide (pour 5 boîtes de Pétri) | |
|--|----------|
| Bacto TM Agar (Becton, Dickinson and Company) | 1,5 g |
| Difco TM LB Broth, Lennon (Becton, Dickinson and Company) | 2 g |
| H_2O | 100 ml |
| Chloramphénicol | 20 μg/ml |
| Milieu LB liquide (pour 500 ml) | |
| Difco TM LB Broth, Lennon (Becton, Dickinson and Company) | 10 g |
| H_2O | 500 ml |
| Chloramphénicol | 20 μg/ml |

Table 2.22 : Composition des milieux utilisés pour l'amplification des bactéries DH10E comportant le BAC RP11-35707.

| Composition | du mélange PCR | Concentration |
|---|---|------------------------|
| H_2O | | Variable |
| Tampon Colorless GoTaq TM Reaction Buffer 5X (Promega) | | 1/5 du volume final |
| dNTP Master | Mix (Eurogentec) | 1/100 du volume final |
| Amorces | Promoteur1 Sens: 5'-AAG CTT AGC AGT CTA GAG CCA A-3' | 0,5 μΜ |
| (Eurogentec) | Promoteur1 Antisens : 5'- <u>AGA TCT</u> TCC TGT GCA CTT CAC-3' | 0,5 μΜ |
| BAC RP11-35707 extrait des bactéries DH10E | | 2,5 ng/µl de réaction |
| GoTaq TM DNA | A Polymérase (Promega) | 0,025 U/µl de réaction |

Table 2.23 : Composition du mélange PCR pour l'amplification du promoteur putatif des miR-132 et miR-212 à partir de BAC RP11-35707.

| Produits d'amplification du promoteur purifiés | 8 μ1 |
|--|------|
| H ₂ O | 8 μ1 |
| Tampon A 10X (Roche) | 2 μ1 |
| Enzyme SacI (Roche) | 1 μ1 |
| Enzyme HpaI (Roche) | 1 μ1 |

Table 2.24 : Composition du mélange de restriction du promoteur putatif des miR-132 et miR-212 par les enzymes SacI et HpaI.

| Plasmide pSKoriTKan | 1 μg |
|----------------------|--|
| H ₂ O | Pour porter à un volume final de 20 µl |
| Tampon B 10X (Roche) | 2 μ1 |
| Enzyme EcoRV (Roche) | 1 μl |

Table 2.25 : Composition du mélange de restriction du pSKoriTKan par l'enzyme EcoRV.

| Promoteur putatif des miR-132 et -212 amplifié par PCR puis purifié | 77,5 μl |
|---|---------|
| Tampon HF 5X concentré (Finnzyme) | 20 μ1 |
| Phusion polymérase (Finnzyme) | 0,5 μ1 |
| dNTP Master Mix (Eurogentec) | 2 μ1 |

Table 2.26 : Elimination des nucléotides protrudants du promoteur putatif des miR-132 et miR-212 par traitement à la Phusion polymérase.

| pSKoriTKan restreint par EcoRV et purifié | 100 ng |
|---|--|
| Région promotrice putative amplifiée par la GoTaq | 492 ng (ratio molaire insert/vecteur de 10X) |
| polymérase, purifiée puis traitée à la Phusion polymérase | |
| et à nouveau purifiée | |
| Tampon de la T4 DNA Ligase 10X (Promega) | 1 μ1 |
| H_2O | Pour porter à un volume final de 10 µl |
| T4 DNA Ligase (Promega) | 1,5 U |

Table 2.27 : Composition du mélange de ligation du promoteur putatif dans le pSKoriTKan linéarisé par EcoRV.

V.2.c. Amplification par PCR de la région promotrice putative des miR-132 et - 212

La région promotrice putative des miR-132 et miR-212 a été amplifiée avec succès en réalisant le mélange PCR indiqué à la table 2.23 et en suivant le programme d'amplification suivant (dans un Peltier Thermal Cycler PTC-225): 2 min de dénaturation à 95°C suivies par 5 cycles composés de 30 sec de dénaturation à 95°C; 30 sec d'hybridation des amorces à 46°C et 2 min d'élongation à 72°C puis de 25 autres cycles composés de 30 sec de dénaturation à 95°C; 30 sec d'hybridation des amorces à 60°C et 2 min d'élongation à 72°C. Ces cycles ont été suivis de 10 min d'élongation finale à 72°C avant que les produits ne soient refroidis à 4°C puis visualisés sur un gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium, en présence de l'étalon Benchtop 1kb DNA Ladder (Promega). L'amplification de la région promotrice putative a également été testée en utilisant la Phusion polymérase (Finnzyme), une enzyme exerçant une activité de relecture et possédant donc un taux d'erreur plus bas, mais sans succès.

V.2.d. Purification et restriction diagnostique de la région promotrice putative

Les produits d'amplification ont été purifiés en utilisant le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) et une fraction de ceux-ci a été digérée pendant 1h à 37°C par les enzymes de restriction SacI et HpaI (mélange de restriction à la table 2.24) afin de permettre une première identification de la région promotrice putative. Les produits de restriction ont été visualisés sur un gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium.

V.2.e. Clonage de la région promotrice putative des miR-132/212

Restriction du pSKOriTKan par l'enzyme EcoRV

Le plasmide intermédiaire pSKOriTKan, offert par le Professeur De Bolle (URBM, FUNDP) a été restreint par l'enzyme EcoRV pendant 2h15 à 37°C (voir table 2.25). Etant donné que cette enzyme ne s'inactive pas à la chaleur, les produits de restriction ont été purifiés avec le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) avant le clonage de la région promotrice.

Clonage du promoteur putatif dans le pSKOriTKan

Etant donné que le plasmide restreint par EcoRV possède des extrémités franches alors que les produits amplifiés par la GoTaq polymerase comportent des extrémités protrudantes, le promoteur putatif des miRNAs amplifié par PCR et purifié a été incubé pendant 5 min à 68°C avec de la Phusion polymerase (Finnzyme) (voir table 2.26) qui, grâce à son activité exonucléase 3'→5' a permis le retrait des nucléotides protrudants et donc la génération d'extrémités franches. Suite à cette réaction, les produits PCR ont à nouveau été purifiés avec le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Le pSKOriTKan et la région promotrice putative ont ensuite été ligués ensemble en incubant le mélange indiqué à la table 2.27 pendant 18h à température ambiante, puis ces produits de ligation ont été transformés en bactéries DH10B compétentes.

| Milieu LB solide contenant kanamycine, X-Gal et IPTG (pour 5 boîtes c | le Pétri) | | | | |
|---|-----------|--|--|--|--|
| Bacto TM Agar (Becton, Dickinson and Company) | 1,5 g | | | | |
| Difco TM LB Broth, Lennon (Becton, Dickinson and Company) | 2 g | | | | |
| H_2O | 100 ml | | | | |
| Kanamycine | 50 μg/ml | | | | |
| X-Gal (Promega) | 80 μg/ml | | | | |
| IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (Sigma) | 0,5 mM | | | | |
| Milieu LB liquide supplémenté en kanamycine (pour 500 ml) | | | | | |
| Difco TM LB Broth, Lennon (Becton, Dickinson and Company) | 10 g | | | | |
| H_2O | 500 ml | | | | |
| Kanamycine | 50 μg/ml | | | | |
| | | | | | |

Table 2.28 : Composition des milieux utilisés pour la transformation de bactéries DH10B par le pSKOriTKan + promoteur, la sélection des clones et leur amplification.

| Composition des mélanges | de PCR | Quantité (pour 20 µl de réaction) | |
|--------------------------------------|------------------------------------|---|--|
| H_2O | | 13,4 μl | |
| Tampon Colorless GoTa | q TM Reaction Buffer 5X | 4 μ1 | |
| (Promega) | | | |
| dNTP Master Mix (Eurogent | rec) | 0,2 μl | |
| Amorces | M13 Reverse | 1 μΜ | |
| | Promoteur5 antisens: 5' | 1 μΜ | |
| AGC-GCG-TCA-GTG- | | | |
| | TGT-AG 3' (Eurogentec) | | |
| Mini-prep de pSKOriTKan + | - insert | 2 μ1 | |
| GoTaq TM DNA Polymérase (| (Promega) | 0,025 U/µl de réaction | |
| Programme d'amplification | n PCR | Durée et température | |
| Dénaturation initiale | | 5 min à 94°C | |
| Cycles d'amplification (35 cy | ycles) | 30 sec de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à | |
| | | 51°C et 1 min d'élongation à 72°C | |
| Elongation finale | | 10 min à 72°C | |

Table 2.29 : PCR réalisées afin d'identifier les clones transformés par un pSKOriTKan + promoteur inséré dans l'orientation désirée.

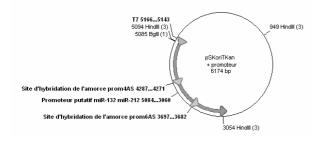


Figure 2.6 : Positionnement des amorces utilisées pour le séquençage du promoteur putatif cloné.

| H_2O | Pour porter à 20 μ1 |
|--|---------------------|
| Tampon B 10X (Promega) | 2 μ1 |
| ADN (soit plasmide pGL4.10 Luc2; soit plasmide | 1 μg |
| pSKOriTKan + promoteur) | |
| Enzyme BglII (Promega) | 1 μ1 |
| Enzyme HindIII (Promega) | 1 μ1 |

Table 2.30 : Composition des mélanges de restriction du pGL4.10 Luc2 ou de différents clones pSKOriTKan + promoteur dans l'orientation désirée par les enzymes BgIII et HindIII.

| pGL4.10 Luc2 restreint par BgIII et HindIII | 100 ng |
|--|---|
| Région promotrice putative excisée du pSKoriTKan par | 750 ng (ratio molaire insert/vecteur de 5X) |
| BglII et HindIII | |
| Tampon de la T4 DNA Ligase 10X (Promega) | 2 μ1 |
| T4 DNA Ligase (Promega) | 3 U |

Table 2.31 : Composition du mélange de ligation du promoteur putatif des miRNAs dans le pGL4.10 Luc2.

V.2.f. Transformation du pSKOriTKan+promoteur en bactéries DH10B

Les bactéries DH10B compétentes ont été dégelées pendant 20 min sur glace, puis incubées pendant encore 20 min sur glace avec les 10 µl de produits de ligation. Un choc thermique de 2 min 30 sec à 42°C a ensuite été réalisé, puis 900 µl de milieu LB sans antibiotique et préchauffé à 37°C ont été ajoutés et les bactéries mises au repos pendant 45 min à 37°C et 250 RPM. Les bactéries transformées ont été étalées sur du milieu LB solide (table 2.28) contenant de la kanamycine (pour sélectionner les bactéries transformées par le pSKOriTKan), du X-Gal et de l'IPTG (en présence de ces molécules, les bactéries transformées par un plasmide sans insert apparaissent bleues, tandis que celles transformées par un plasmide avec insert apparaissent blanches suite à la disruption du gène LacZ encodé par le plasmide) et placées pendant 16h à 37°C.

V.2.g. Amplification des bactéries transformées par le pSKOriTKan+ promoteur, vérification de la présence de l'insert par PCR et extraction du plasmide

Le lendemain de la transformation, des mini-cultures et ensuite des maxi-cultures ont été réalisées à partir des colonies blanches. Les plasmides ont été extraits d'une partie des minicultures en utilisant le kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) selon le protocole fourni par le fabriquant et une PCR a été réalisée afin de déterminer quels clones possédaient l'insert promoteur avec l'orientation désirée. En effet, comme illustré à la figure 2.5, la région promotrice peut se liguer selon deux orientations dans le pSKOriTKan étant donné que les extrémités sont franches. Or, dans un des deux cas (« pSKOriTKan + promoteur » représenté à droite sur la figure 2.5), le site de restrition HindIII ajouté à la région promotrice lors de son amplification se retrouve à quelques nucléotides seulement d'un site HindIII présent dans le plasmide. Ainsi, si la restriction réalisée par la suite dans le but de libérer la région promotrice du pSKOriTKan ne s'effectuait pas correctement, on risquerait de cloner le promoteur bordé d'un fragment du pSKOriTKan dans le plasmide rapporteur. Les clones comportant la bonne orientation (« pSKOriTKan + promoteur » à gauche sur la figure 2.5) ont donc été identifiés à la suite des résultats d'une PCR (voir table 2.29). Les plasmides de cinq clones comportant l'insert dans sa bonne orientation ont été extraits en utilisant le Qiagen Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen) selon le protocole fourni par le fabriquant et séquencés chez Beckman Coulter Genomics en utilisant les amorces standard T7, prom4AS (5' GTC-CAG-GAA-CTG-AGG-AG 3') et prom6AS (5' CAG-AGA-CGA-CAC-GAG-C 3') (Eurogentec) (le positionnement de ces amorces est illustré à la figure 2.6).

V.2.h. Clonage du promoteur putatif des miRNAs dans le pGL4.10 Luc2

Le promoteur putatif des miRNAs a été excisé des plasmides pSKOriTKan suite à une restriction simultanée par les enzymes de restriction BgIII et HindIII. Le plasmide pGL4.10 Luc2 (Promega) a également été restreint avec ces enzymes afin de permettre le clonage du promoteur putatif. Ces restrictions ont été effectuées en incubant les mélanges indiqués à la table 2.30 pendant 1h à 37°C puis 15 min à 65°C afin d'inactiver les enzymes. Les produits de restriction (région promotrice putative des miR-132 et -212 et pGL4.10) ont ensuite été ligués ensemble (voir table 2.31) pendant 4h à température ambiante.

| Composition du mélange Po | CR | Quantité (pour 50 µl de réaction) | |
|--------------------------------------|------------------------------------|---|--|
| H_2O | | 38,25 μ1 | |
| Tampon Colorless GoTac | q TM Reaction Buffer 5X | 10 μ1 | |
| (Promega) | | | |
| Amorces | Promoteur 5 Sens: 5' | 1 μΜ | |
| | CTA-CAC-ACT-GAC- | | |
| | GCG-CT 3' | | |
| | Promoteur 4 Antisens: 5' | 1 μΜ | |
| | GTC-CAG-GAA-CTG- | | |
| | AGG-AG 3' | | |
| GoTaq TM DNA Polymérase (| Promega) | 0,025 U/µl de réaction | |
| Cycles d'amplification PCR | R | Durée et température | |
| Dénaturation initiale | | 5 min à 94°C | |
| Cycles d'amplification (35 cy | ycles) | 30 sec de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à | |
| | | 51°C et 30 sec d'élongation à 72°C | |
| Elongation finale | | 10 min à 72°C | |

Table 2.32 : Composition du mélange PCR utilisé pour réaliser les PCR sur colonies visant à identifier les clones bactériens comportant un plasmide pGL4.10 Luc2 au sein duquel est cloné le promoteur putatif des miRNAs.

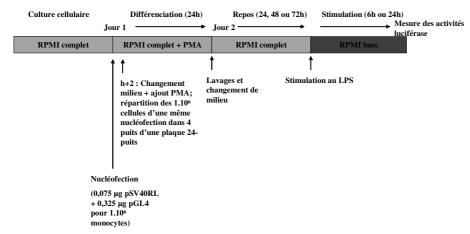


Figure 2.7 : Chronologie des manipulations réalisées depuis la nucléofection de la construction rapportrice jusqu'à la révélation des activités luciférase.

| JetPEI TM Macrophages (Polyplus Tran Attractene Transfection Reagent (Qias DEAE dextran Transfection Kit (Sign Nucleofector Kit V (Amaxa) Milieux OPTI-MEM® I (Invitrogen, Gibco) RPMI base (voir table 2.1) RPMI complet (voir table 2.1) Plasmides pCMV-βGal (Clontech) pEGFP (Clontech ou Amaxa pour les pSV40RL (Promega) | ogen) |
|--|--------------------------|
| DEAE dextran Transfection Kit (Sign Nucleofector Kit V (Amaxa) Milieux OPTI-MEM® I (Invitrogen, Gibco) RPMI base (voir table 2.1) RPMI complet (voir table 2.1) Plasmides pCMV-βGal (Clontech) pEGFP (Clontech ou Amaxa pour les | sfection TM) |
| Nucleofector Kit V (Amaxa) Milieux OPTI-MEM® I (Invitrogen, Gibco) RPMI base (voir table 2.1) RPMI complet (voir table 2.1) Plasmides pCMV-βGal (Clontech) pEGFP (Clontech ou Amaxa pour les | gen) |
| Milieux OPTI-MEM® I (Invitrogen, Gibco) RPMI base (voir table 2.1) RPMI complet (voir table 2.1) Plasmides pCMV-βGal (Clontech) pEGFP (Clontech ou Amaxa pour les | a) |
| RPMI base (voir table 2.1) RPMI complet (voir table 2.1) Plasmides pCMV-βGal (Clontech) pEGFP (Clontech ou Amaxa pour les | |
| RPMI complet (voir table 2.1) Plasmides pCMV-βGal (Clontech) pEGFP (Clontech ou Amaxa pour les | |
| Plasmides pCMV-βGal (Clontech) pEGFP (Clontech ou Amaxa pour les | |
| pEGFP (Clontech ou Amaxa pour les | |
| 1 | |
| pSV40RL (Promega) | nucléofections) |
| | |
| pGL4.10[luc2] avec ou sans promoteu | r clone (Promega) |
| Plaques de culture 24 puits (Costar, Corning) | |
| T25 (Costar, Corning) | |
| Centrifugeuse (Centrifuge 5702, Eppendorf) | |

Table 2.33 : Matériel utilisé lors des mises au point de transfection de plasmide.

| Dual-Luciferase® | Reporter | Assay | Passive Lysis Buffer 5X (à diluer dans de l'H ₂ O) |
|-----------------------|------------|-----------|--|
| System (Promega) | | | Luciferase Assay Substrate resuspendu dans du Luciferase Assay Buffer II |
| | | | Stop&Glo® substrate 50X dilué dans du Stop&Glo® Buffer juste avant la |
| | | | lecture des activités luciférase |
| PBS pH 7,4 | | | NaCl 150 mM |
| | | | KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ 10 mM |
| Luminomètre Bertholo | d FB12 (Be | rthold De | tection Systems) |
| Tubes Röhren (Sarsted | dt) | | |

Table 2.34: Matériel utilisé pour les mesures des activités luciférases de Firefly et de Renilla.

V.2.i. Transformation du pGL4.10 Luc2 + promoteur en bactéries DH10B, amplification des bactéries transformées, vérification de la présence de l'insert par PCR et extraction du plasmide

Les produits de ligation du promoteur putatif des miRNAs dans le pGL4.10 Luc2 ont été transformés en bactéries DH10B compétentes selon le protocole détaillé précédemment, à l'exception des milieux de culture qui ont été complémentés en ampicilline (100 µg/ml) (au lieu de kanamycine, X-Gal et IPTG). Etant donné que le plasmide pGL4.10 ne comporte pas de système de criblage blanc-bleu, des PCR sur colonies ont été réalisées afin de déterminer quels clones comportaient des plasmides contenant la région promotrice. Ces PCR ont été réalisées en prélevant un fragment d'une colonie avec la pointe d'un tips et en le déposant dans le mélange PCR indiqué à la table 2.32. Les clones pour lesquels un produit d'amplification de taille attendue a été observé ont été amplifiés en milieu complémenté en ampicilline. Leurs plasmides ont été extraits avec le Qiagen Plasmid *Plus* Maxi Kit (Qiagen) en suivant le protocole fourni par le fabriquant.

V.3. Transfection du plasmide rapporteur dans les THP-1

V.3.a. Optimisation de transfection plasmidique

Les optimisations de transfection plasmidique ont été réalisées en utilisant les réactifs présentés à la table 2.33 dans les conditions résumées à la table 2.35. Ces protocoles ont été adaptés selon les recommandations fournies par les fabriquants.

Initialement, nous avons transfecté un plasmide pCMV- β Gal (plasmide encodant le gène de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur viral du cytomégalovirus) afin de déterminer le taux de transfection. Cependant, l'analyse de l'activité β -Galactosidase (déterminée par l'utilisation du kit β -Gal Staining Set de Roche, en suivant le protocole fourni par le fabriquant) n'a permis de détecter aucune cellule transfectée parmi les différentes conditions testées. Nous avons donc poursuivi les essais d'optimisation de transfection à l'aide d'un plasmide pEGFP, plus facile à transfecter de par sa plus petite taille. Seule la Lipofectamine 2000 a permis de transfecter ce plasmide. Cependant, les résultats obtenus lors de la transfection de la construction rapportrice et l'analyse de l'activité luciférase ont suggéré que ce taux de transfection était trop faible que pour permettre une analyse reproductible de l'activité du promoteur. Nous avons donc testé un protocole de nucléofection, lequel nous a permis de transfecter un nombre satisfaisant de cellules (voir figure 3.17).

V.3.b. Nucléofection et stimulation des cellules

Les nucléofections de la construction rapportrice sont réalisées dans les conditions résumées à la table 2.36. Brièvement, 1.10^6 monocytes sont resuspendus dans $100~\mu l$ de solution V (Amaxa, Nucleofector Kit V) en présence de 0,4 μg de plasmide. Ces cellules sont placées dans les cuvettes fournies dans le kit et nucléofectées en sélectionnant le programme U-001. Immédiatement après, $500~\mu l$ de RPMI complet sont ajoutés et les cellules sont transférées dans un puits contenant $800~\mu l$ de RPMI complet préchauffé. Deux heures après cette transfection, les cellules sont transférées en tubes, centrifugées $5~\min$ à 0,3 g et resuspendues dans du RPMI complet (avec ou sans PMA). Les cellules issues d'une même nucléofection

| Agent | Mélange de transfection | | Ftat de | Wise an renos anrès | Différenciation | Nombre de cellules |
|---|---|--|-------------------------------|--|--|--|
| transfectant | Mélange 1 (Dilution de l'agent transfectant) | Mélange 2 (ADN) | différenciation lors de la | transfection | avant/après la transfection | transfectées par puits d'une plaque |
| | | | transfection | | | 24 puits |
| Lipofectamine TM 2000 Reagent | 1,5 µl + 48,5 µl d'Opti-MEM | 0,7 μg de pGL4.10 + 0,3 μg de pCMV-βGal dans un Vf de 50 μl | Macrophages | Ajout de 400 µl de RPMI complet après 4h de | Addition du PMA 24h avant | 200 000 dans 400 µl de RPMI complet |
| (Invitrogen) | 1,75 µl + 48,25 µl d'Opti-MEM | d'OptiMEM | | transfection | la transfection | • |
| | 2,0 µl + 48 µl d'Opti-MEM | | | | | |
| | 2,25 µl + 47,25µl d'Opti-MEM | | | | | |
| | 1,6 μl + 48,4 μl d'Opti-MEM | 0,15 µg pSV40RL + 0,65µg | Monocytes | Ajout de 400 µl de RPMI | Addition du PMA 24h anrès | 300 000 et 600 000 |
| | 2,0 µl + 48 µl d'Opti-MEM | d'Opti-MEM | | transfection | la transfection | complet |
| | 2,4 µl + 47,6 µl d'Opti-MEM | | | | | |
| | 1,6 µl + 48,4 µl d'Opti-MEM | 0,075 μg de pSV40RL + 0,325 μg de pEGFP | | | | |
| JetPEI TM Macrophages | 2,6 µl dans 50 µl de solution NaCL 150 mM | 2,5 µg de pEGFP dans 50 µl de solution NaCl | Monocytes | Ajout de 300 µl de RPMI complet + PMA 4h après la | Addition du PMA lors de la | 400 000 dans 200 µl de RPMI complet |
| (Polyplus Transfection TM) | | 1,25 µg de pSV40RL+ 1,25 µg de pEGFP dans 50 µl de solution NaCl | | transfection | mise au repos (4h après la transfection) | |
| Attractene Transfection | 1,0 µl dans le mélange 2 | 0,27 µg de pSV40RL + 0,13 µg pCMV-8Gal dans 60 µl RPMI | Macrophages | Non | Différenciation avant la | 250 000 dans 500 µl de RPMI complet |
| Reagent (Oiagen) | 1,5 µl dans le mélange 2 | | | | transfection | • |
| | 3,0 µl dans le mélange 2 | | | | | |
| | 1,5 µl dans le mélange 2 | 0,4 μg de pSV40RL + 0,2 μg de nCMV-8Gal dans 60 μl RPMI | | | | |
| | 2,25 µl dans le mélange 2 | base | | | | |
| | 4,5 µl dans le mélange 2 | | | | | |
| | 1,5 µl dans le mélange 2 | 0,27 μg de pSV40RL + 0,13 μg pCMV-βGal dans 60 μl RPMI base | Monocytes | Ajout de 500 µl de RPMI complet + PMA après 5h de transfection | Différenciation lors de la mise au repos | 400 000 dans 500 μl de RPMI complet |

| Différenciation 400 000 (la 4h après la mise transfection se fait au repos sur le culot de cellules) | Différenciation 400 000 (la lors de la mise au transfection se fait sur le culot de cellules) | | | Pas de 1.10 ⁶ différenciation cellules/nucléofection | Ajout du PMA Iors du | changement de milieu (2h après | lo miolánfantion) |
|--|---|--------------------------------------|--|---|--|-----------------------------------|-------------------|
| cole mise es es ules | Oui, après 15 min de Différ transfection lors de repos | Oui, après 30 min de transfection | Oui, après 15 min de transfection | S | changement du milieu zh Ajo après la nucléofection lors | cha mil | 1 61 |
| Monocytes | | | | Monocytes | | | |
| V-βGal + 0,28 μl DEAE + 17,2 μl | 5EGFP + 17,2 µl TBS + 0,28 µl | | iFP + 17,2 μl TBS + 0,28 μl DEAE 0,28 μl DEAE | 100 µl de solution V contenant 1.10 ⁶ cellules | | | |
| 0,67 μg pSV40RL + 0,33 μg pCMV-βGal + 0,28 μl DEAE + 17,2 μl TBS | 1,25 μg de pSV40RL+ 1,25 μg de pEGFP + 17,2 μl TBS DEAE | | 0,5 µg de pSV40RL + 2 µg de pEGFP + 17,2 µl TBS 2,5 µg de pEGFP + 17,2 µl TBS + 0,28 µl DEAE | 0,075 μg pSV40RL + 0,325 μg pEGFP (fourni dans le kit) | | | |
| DEAE dextran Transfection Kit (Sigma) | | | | Nucleofection (Amaxa, Nucleofector Kit | v) (programme U-001) | | |

Table 2.35 : Agents de transfection et conditions testées lors des mises au point de transfection de plasmide en plaque 24 puits.

| Agent | Mélange de transfection | nsfection | Etat de | Mise au repos après | Différenciation | Nombre de cellules | Stimulation au LPS |
|---|--|--|---|--|--|--|--|
| transfectant | Mélange 1 (Dilution de l'agent | Mélange 2 | différenciation lors de la transfection | transfection | avant/après la transfection | transfectées par puits d'une plaque 24 puits | |
| Lipofectamine ^T 2000 Reagent (Invitrogen) | 1,6 µl + 48,4 µl d'Opti- MEM | 0,075 µg de pSV40RL + 0,325 µg pGL4.10-promoteur (3 clones testés) | Monocytes | Ajout de 400 µl de RPMI complet 4h après la transfection | Pas de différenciation mais stimulation au LPS 48h après la transfection | 600 000 dans 500 μl de RPMI complet | Stimulation pendant 6h au LPS 48h après 1a transfection |
| | | 0,075 µg de pSV40RL + 0,325 µg pGL4.10-promoteur (3 clones testés) ou pGL4.10 | | Ajout de 400 µl de RPMI complet + PMA 4h après la transfection | Différenciation lors de la mise au repos | | Stimulation pendant 24h au LPS 48h après la transfection |
| Nucléofection (Amaxa, Nucleofector Kit V) (programme U- 001) | 100 µl de solution V contenant 1.10 ⁶ cellules | 0,075 µg pSV40RL +0,325 µg pGL4.10- promoteur ou pGL4.10 sans promoteur | Monocytes | Ajout de 500 µl de RPMI complet directement après la nucléofection puis changement du milieu 2h après la nucléofection | Pas de différenciation | cellules/nucléofection réparties en 2 puits d'une plaque 24 puits (un puits est par la suite stimulé au LPS, l'autre sert de CTL) | Stimulation pendant 6h ou 24h au LPS 24h après la nucléofection |
| | | | | | Ajout de PMA lors du changement de milieu (2h après | | Stimulation pendant 6h et 24h au LPS - 48h après la nucléofection |
| | | | | | la nucléofection) | | Stimulation pendant 24h au LPS - 72h après la nucléofection |

Table 2.36: Agents de transfection et conditions testées lors des essais de transfection de la construction pGL.10-promoteur.

sont ensuite réparties dans 2 ou 4 (selon les manipulations) puits d'une plaque 24 puits. Les cellules différenciées au PMA durant 24h sont ensuite mises au repos pendant 24, 48 ou 72h, avant d'être stimulées au LPS pendant 6h ou 24h (les conditions contrôle et LPS sont testées sur des cellules issues d'une même nucléofection). La chronologie de ces manipulations est illustrée à la figure 2.7. Des essais ont également été réalisés sur des cellules non différenciées, stimulées pendant 6h au LPS 24h après la nucléofection.

V.3.c. Analyse des activités luciférase de Firefly et de Renilla

Principe

Afin de normaliser les activités luciférase mesurées à l'efficacité de la transfection, les cellules ont initialement été co-transfectées avec un second plasmide (le pSV40RL) encodant le gène de la luciférase de Renilla sous le contrôle du promoteur SV40 (Simian virus 40). Théoriquement, l'activité de ce promoteur étant constitutive, l'activité luciférase de Renilla devrait être directement proportionnelle au nombre de cellules transfectées. L'activité de la luciférase de Firefly, qui dépend à la fois de l'activité du promoteur putatif des miRNAs et de l'efficacité de la transfection, a donc été normalisée par rapport à l'activité luciférase de Renilla, elle-même ne dépendant normalement que de l'efficacité de la transfection. Cependant, nous avons remarqué que l'activité luciférase de Renilla variait entre les cellules stimulées ou non au LPS provenant d'une même nucléofection. Or, ces cellules, qui ont été nucléofectées en même temps, sont supposées avoir été transfectées avec une efficacité identique. Lors des manipulations suivantes, l'activité luciférase de Firefly a été normalisée au contenu protéique, déterminé par dosage de Pierce.

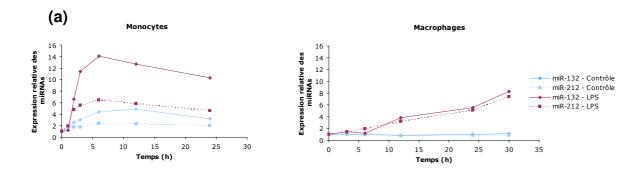
Méthode

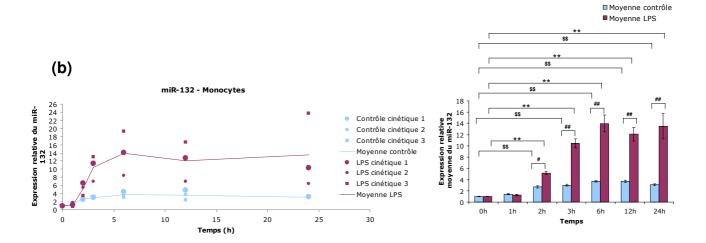
6 et 24h après la stimulation des cellules, les activités luciférase de Firefly et de Renilla sont mesurées (le matériel utilisé afin de réaliser ces mesures est listé à la table 2.34). Les cellules sont lavées deux fois au PBS puis lysées pendant 15 min sous agitation dans du tampon de lyse (100 μl/puits d'une plaque 24 puits). Le lysat est ensuite centrifugé pendant 3 min à 13 000 RPM et le surnageant est récolté. L'activité luciférase de Firefly est lue dans un luminomètre à l'obscurité suite à l'ajout de 20 μl de ce lysat cellulaire à 100 μl de Luciférase Assay Reagent II. Immédiatement après la lecture de l'activité luciférase de Firefly, 100 μl de solution Stop&Glo sont ajoutés et l'activité luciférase de Renilla est lue.

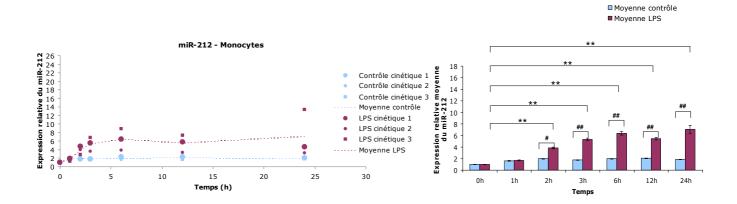
VI. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en réalisant une ANOVA 2 pairée suivie de comparaisons multiples (test de Holm-Sidak) sur base des valeurs de Δ Ct à l'aide du logiciel Sigma Stat 3.1. Les barres d'erreur des histogrammes présentés aux figures 3.1b, 3.1c et 3.5c représentent les coefficients de variation des écart-types calculés à partir des valeurs de Δ Ct. Brièvement, l'écart-type calculé à partir des valeurs de Δ Ct des différents réplicats d'une condition est divisé par le Δ Ct moyen de cette condition et ensuite multiplié par le fold d'expression moyen.

Résultats et discussion







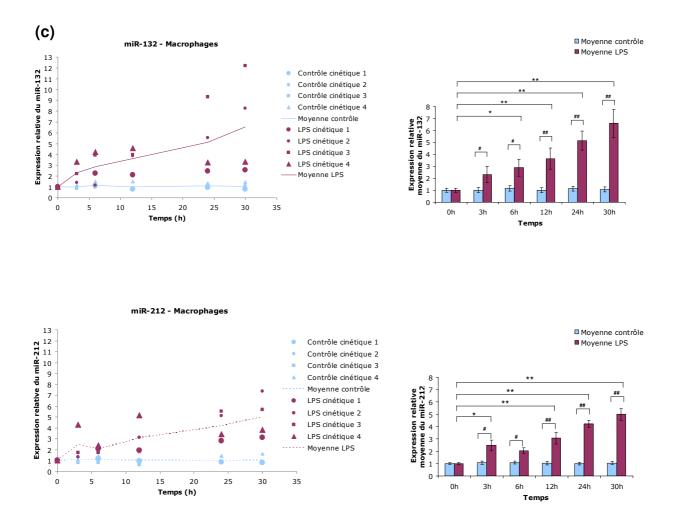


Figure 3.1 : Les miR-132 et miR-212 sont induits dans les monocytes et macrophages THP-1 stimulés au LPS. Les cellules ont été stimulées avec 1 μ g/ml de LPS ou incubées dans du RPMI base (« contrôle ») durant des durées variables. L'abondance des miRNAs (normalisée par celle du RNU-44) est exprimée de façon relative au temps 0. (a) Expression relative des miR-132 et miR-212 au cours d'une même expérience. Ces données représentent la moyenne de deux mesures par PCR en temps réel, réalisées sur une seule série d'échantillons biologiques. (b et c) Expression relative des miR-132 et miR-212 dans les monocytes (b) ou macrophages (c) stimulés au LPS mesurée au cours de trois (b) ou quatre (c) expériences indépendantes. Chaque symbole représente l'évolution de l'expression d'un miRNA au cours d'une expérience, tandis que la courbe représente la moyenne de l'expression relative de chaque miRNA. Les histogrammes représentent la moyenne de l'expression relative du miRNA et les barres d'erreur représentent les coefficients de variation des écart-types calculés à partir des valeurs de Δ Ct (voir Matériel et méthodes, point VI). Les analyses statistiques ont été effectuées en réalisant une ANOVA 2 pairée suivie de comparaisons multiples (test de Holm-Sidak) sur base des valeurs de Δ Ct (voir Matériel et méthodes, point VI). Les comparaisons intra-LPS sont représentées par des étoiles (*, p < 0,05; **, p < 0,01), les comparaisons intra-contrôle sont représentées par des dollars (\$, p < 0,05; \$\$, p < 0,01), tandis que les comparaisons entre les cellules contrôles et stimulées sont représentées par des dièses (#,p < 0,05; ##, p < 0,01).

I. Les miR-132 et miR-212 sont induits lors de la stimulation au LPS des cellules THP-1

Etant donné qu'il a été rapporté que le miR-132 est induit lors de la stimulation au LPS de monocytes THP-1 (Taganov et al., 2006) et que la configuration génomique des miR-132 et miR-212 humains suggère que ces miRNAs pourraient être transcrits de façon polycistronique, nous avons étudié leur expression dans des cellules THP-1 stimulées au LPS. Ces études ont été réalisées sur des cellules laissées indifférenciées (« monocytes ») ou préalablement différenciées (« macrophages ») par un traitement de 24h en présence de 0,02 µg/ml de PMA suivi de 24h de mise au repos (voir Matériel et méthodes, point I.3a et figure 2.1). Nous avons extrait et rétro-transcrit l'ARN de monocytes et macrophages contrôles (cellules placées dans un milieu sans sérum étant donné que la stimulation au LPS se déroule en absence de sérum, voir Matériel et méthodes, point I.3.b) ou stimulés au LPS pendant des durées variables puis avons analysé l'expression des miR-132 et miR-212 par PCR en temps réel. Les résultats ont été normalisés à l'expression des miRNAs dans des cellules n'ayant pas subi de changement de milieu (temps 0).

Les résultats, présentés à la figure 3.1a, confirment que le miR-132 est surexprimé dans les monocytes THP-1 stimulés au LPS et montrent pour la première fois que le miR-212 est également induit dans ces conditions, tant dans les cellules non différenciées que différenciées. De plus, les miR-132 et miR-212 présentent des profils d'expression parallèles. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle ces miRNAs pourraient être transcrits simultanément et ensuite être maturés à partir d'un même précurseur.

Afin de déterminer si l'induction des miR-132 et miR-212 par le LPS était un phénomène robuste, ces mesures ont été réalisées sur 3 (ou 4) cultures indépendantes de monocytes (figure 3.1b) et macrophages (figure 3.1c). Dans les monocytes (figure 3.1b), l'induction de l'expression des miR-132 et miR-212 survient rapidement (l'induction est déjà très significative après 2h de stimulation au LPS par rapport au temps 0), augmente fortement jusqu'à 6h de stimulation, pour ensuite se stabiliser ou très légèrement diminuer lors des plus longs temps de stimulation. Dans les macrophages (figure 3.1c), l'induction des miRNAs est plus lente et augmente graduellement jusqu'à plus de 30h de stimulation. On remarque que, bien que l'expression des miR-132 et miR-212 soit systématiquement induite par le LPS dans les monocytes et macrophages, l'amplitude de leur induction peut varier de façon importante d'une expérience à l'autre (figures 3.1b et 3.1c).

Les différences de cinétiques observées entre les monocytes et macrophages suggèrent que différents modes de régulation pourraient être impliqués dans l'expression des miR-132 et miR-212 selon l'état de différenciation des cellules. Il a d'ailleurs été démontré que les cellules THP-1 différenciées au PMA présentaient une activation plus élevée des JNK en réponse à une stimulation au LPS que les cellules non différenciées. Ceci pourrait résulter de l'expression prédominante de trois isoformes de JNK, JNK2α2 (p54 JNK), JNK1β1 et JNK2α1 (p46 JNK), dans les cellules différenciées. En effet, il a été rapporté que ces trois isoformes liaient c-Jun plus fortement que les autres isoformes de JNK (Dreskin et al., 2001). L'activation différentielle des JNK dans les macrophages pourrait donc avoir des répercussions sur l'expression des gènes qui dépendent des facteurs de transcription activés par ces isoformes de JNK. Les deux autres voies de MAPK, p38 et ERK, seraient également affectées par la différenciation des monocytes en macrophages. En effet, la régulation de la

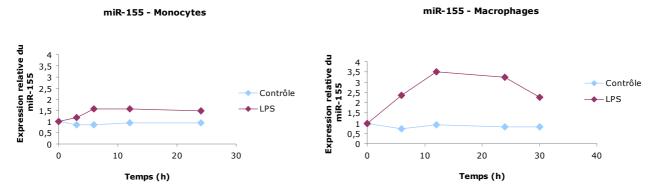


Figure 3.2 : Etude de l'expression du miR-155 dans les monocytes et macrophages stimulés au LPS ou privés en sérum. Des monocytes ou macrophages ont été stimulés avec 1 μg/ml de LPS ou incubés dans du RPMI base (« contrôle ») durant des durées variables. L'abondance du miR-155, normalisée par celle du RNU-44, est exprimée de façon relative au temps 0. Ces données représentent la moyenne de deux mesures réalisées sur une seule série d'extraits biologiques (les mêmes que ceux intitulés « cinétique 1 » aux figures 3.1b et 3.1c).

libération de cytokines en réponse à la stimulation au LPS de cellules humaines primaires dépend majoritairement de la voie p38 dans les monocytes et d'ERK dans les macrophages (différenciés *in vitro* ou prélevés *in vivo*) (Tudhope et al., 2008). Par ailleurs, il a été démontré que l'induction de cytokines observée en réponse à une stimulation au LPS de monocytes primaires de veau était nettement moins élevée que lorsque ces cellules étaient différenciées avant stimulation (Guo et al., 2009). Ces observations montrent qu'en fonction de leur état de différenciation, les cellules ne répondent pas de façon identique à une stimulation au LPS, ce qui pourrait expliquer les différences de cinétique d'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1.

Les résultats présentés à la figure 3.1b indiquent également que le miR-132 est induit dans les monocytes contrôles (c'est-à-dire placés dans un milieu sans sérum) par rapport aux cellules n'ayant pas subi de changement de milieu. Cette induction, bien que moins forte que celle résultant de la stimulation au LPS est cependant très significative dans les cellules privées en sérum pendant 2h ou de plus longues périodes, par rapport aux cellules placées dans du milieu complet. Or, il a été rapporté que le miR-132 était induit dans les pré-adipocytes et adipocytes humains primaires privés en sérum après seulement 1h de privation et que cette induction se prolongeait jusqu'à plus de 24h de privation (Strum et al., 2009). Le miR-132 et dans une moindre mesure le miR-212 (on observe également une légère induction, bien que non significative, de ce miRNA dans les cellules contrôles) pourraient donc également être induits par l'absence de sérum dans les monocytes THP-1.

Afin de nous assurer que l'induction des miR-132 et miR-212 dans les monocytes placés dans un milieu sans sérum est spécifique de ces miRNAs et non une propriété plus générale des miRNAs induits par le LPS, nous avons étudié l'expression du miR-155, un miRNA dont l'induction par le LPS a déjà été rapportée précédemment (Taganov et al., 2006). Comme le montre la figure 3.2, ce miRNA n'est pas induit dans les monocytes (ni dans les macrophages) contrôles. Ceci suggère que l'induction des miR-132 et miR-212 en absence de sérum ne représente pas une caractéristique générale des miRNAs induits par le LPS dans les cellules THP-1. Remarquons que l'induction des miR-132 et miR-212 observée dans les monocytes privés en sérum n'est pas reproduite dans les cellules préalablement différenciées au PMA (figure 3.1c). Ceci pourrait être expliqué, comme suggéré précédemment, par le fait que les cellules présentent selon leur état de différenciation des réponses variables aux stimulations auxquelles elles sont soumises.

Par ailleurs, les miR-132 et miR-212 présentent des profils d'induction assez semblables dans les macrophages stimulés au LPS, tandis que l'amplitude d'induction du miR-132 est nettement plus élevée que celle du miR-212 lorsque les cellules ne sont pas différenciées (figure 3.1a). Ceci suggère que la maturation et/ou la stabilité de l'un ou de l'autre miRNA pourrait être différente selon l'état de différenciation des cellules. Peu de choses sont cependant connues à propos du turn-over des miRNAs, tandis que les facteurs influençant leur maturation sont nombreux et souvent spécifiques de quelques miRNAs, ce qui rend ces hypothèses peu aisées à tester.

Il est généralement admis que la régulation transcriptionnelle serait la principale étape de contrôle de l'expression de la majorité des miRNAs (Fazi and Nervi, 2008, Schanen and Li, 2010). Au cours de ce mémoire, nous avons considéré l'hypothèse que l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS serait dépendante de facteurs de transcription régulés par les conditions pro-inflammatoires, bien qu'on ne puisse exclure, à priori, un effet de la stimulation au LPS sur la maturation des miRNAs. En effet, il a été

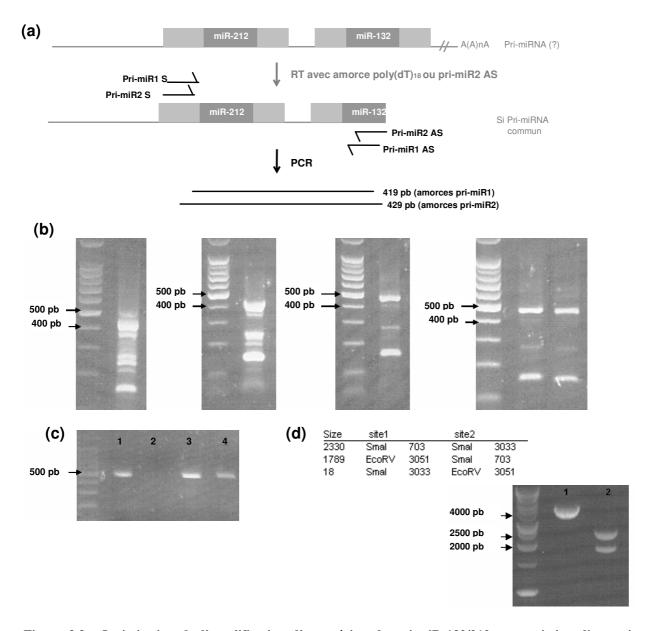


Figure 3.3: Optimisation de l'amplification d'une région du pri-miR-132/212 et restriction diagnostique d'un amplicon de taille attendue. (a) Stratégie initialement suivie afin de déterminer si les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique. Des extraits d'ARN de cellules stimulées au LPS sont rétro-transcrits avec une amorce poly(dT)₁₈ ou avec une amorce spécifique (pri-miR2AS) s'hybridant au niveau de la séquence du miR-132. Le cDNA est ensuite utilisé comme matrice afin d'amplifier une portion du pri-miRNA putatif (deux couples d'amorces différents ont été testés : pri-miR1 et pri-miR2, voir Matériel et méthodes, table 2.19). Des produits de 419 ou 429 pb (suivant le couple d'amorces choisi) sont attendus si les miR-132 et miR-212 sont exprimés à partir d'un seul transcrit primaire. Les boîtes gris foncé représentent les séquences des miRNAs matures, tandis que les boîtes gris clair représentent les régions des pre-miRNAs. (b) Optimisation progressive des conditions de RT (rétro-transcription) et de PCR afin d'amplifier le pri-miR-132/212 putatif. Premier gel - RT: amorces pri-miR2AS; dénaturation 10 min à 65°C; élongation 30 min à 55°C - PCR: amorces pri-miR2S et pri-miR2AS à une concentration de 1 µM; produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/10; température d'hybridation des amorces 50°C. Second gel – RT: amorces pri-miR2AS; dénaturation 5 min à 95°C; élongation 30 min à 65°C – PCR: amorces pri-miR2S et pri-miR2AS à une concentration de 1 μM; produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/50; température d'hybridation des amorces 55°C. Troisième gel – RT: amorces pri-miR2AS; dénaturation 5 min à 95°C; élongation 30 min à 65°C – PCR: amorces pri-miR2S et pri-miR2AS à une concentration de 0,2 μM; produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/50; température d'hybridation des amorces 55°C. Quatrième gel - RT: amorces primiR2AS; dénaturation 5 min à 95°C; élongation 30 min à 65°C - PCR: amorces pri-miR2S et pri-miR2AS à une concentration de 0,1 µM; produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/50; température d'hybridation des amorces 62°C (première piste) ou 66,2°C (seconde piste). (c) Le produit PCR de taille comprise entre 400 et 500 pb obtenu dans la dernière condition a été purifié sur gel, ré-amplifié par PCR en utilisant les mêmes conditions (piste 1 ; la piste 2 représente un contrôle sans ADN matrice), re-purifié (piste 3) et digéré avec l'enzyme de restriction SmaI (piste 4). (d) Contrôle positif de digestion SmaI. Le plasmide pSKoriTKan a été digéré par l'enzyme EcoRV (piste 1), purifié en utilisant la même procédure que pour le produit PCR et ensuite digéré par l'enzyme SmaI (piste 2). Les longueurs des fragments attendus suite à cette double digestion ont été déterminées à l'aide du logiciel ApE.

rapporté que l'induction du miR-155 en réponse à une stimulation au LPS de macrophages murins RAW 264.7 et de macrophages murins primaires dérivés de la moelle osseuse dépendait de la protéine KSRP (KH-type splicing regulatory protein), une protéine liant la boucle terminale des pre-miR-155 et favorisant de cette façon leur maturation (Ruggiero et al., 2009). Cependant, les mêmes auteurs ont remarqué que dans un autre type cellulaire (lymphocytes B humains du centre germinatif), la stimulation au LPS activait la transcription du miR-155 sans en affecter la maturation. Ceci démontre que les mécanismes de contrôle de l'expression des miRNAs dépendent à la fois des stimuli et des types cellulaires étudiés. Dès lors, nous avons voulu nous assurer que les miR-132 et miR-212 sont bien induits suite à un contrôle transcriptionnel dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. Pour cela, nous avons tout d'abord démontré que ces deux miRNAs sont transcrits sous forme d'un seul et même primiRNA chez l'homme, puis avons quantifié l'expression de cette forme primaire par PCR en temps réel dans des monocytes et macrophages THP-1 stimulés au LPS. En outre, nous avons étudié l'expression de cette forme primaire, ainsi que celle des formes matures, dans des cellules pré-incubées avec de l'actinomycine D, une molécule inhibant les processus transcriptionnels.

II. Etude de l'expression du pri-miR-132/212

II.1. Les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique chez l'homme

Comme en témoigne la figure 3.1a, les miR-132 et miR-212 présentent des profils d'induction similaires dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. Il se pourrait donc que ces miRNAs soient maturés à partir d'une même forme primaire, comme cela a été démontré chez la souris (Fiedler et al., 2008). De plus, plusieurs analyses bioinformatiques localisent une même région promotrice putative pour les miR-132 et miR-212 humains, ce qui renforce cette hypothèse (Marson et al., 2008, Wang et al., 2010). Afin de déterminer si les miR-132 et miR-212 sont transcrits simultanément dans les cellules humaines, nous avons recherché la présence d'un pri-miRNA polycistronique dans des monocytes THP-1 stimulés pendant 2h à 3h au LPS. Ce temps de stimulation a été choisi sur base de différentes études rapportant que l'induction de la forme primaire du miR-132 a lieu 2 à 4h avant l'induction de la forme mature (Wibrand et al., 2010, Wayman et al., 2008, Fiedler et al., 2008); or, le pic d'expression des miR-132 et miR-212 est observé après 6h de stimulation au LPS dans les monocytes THP-1.

Les ARN ont été extraits suivant trois protocoles différents avant d'être rétro-transcrits et utilisés comme matrice afin d'amplifier par PCR, avec différents couples d'amorces, la région de 429 ou 419 pb représentée à la figure 3.3a (voir aussi Matériel et méthodes, point IV). Nous avons modifié de nombreux paramètres au niveau des étapes d'extraction d'ARN, de rétro-transcription et d'amplification par PCR afin d'amplifier un fragment d'ADN de taille attendue (figure 3.3b). Ce fragment a été purifié sur gel et soumis à une restriction diagnostique (figure 3.3c) afin de vérifier s'il s'agissait bien du produit attendu. Cependant, il s'est avéré que le produit obtenu était différent de la région du pri-miRNA que nous désirions amplifier (figures 3.3c et d).

Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que les étapes de rétro-transcription et d'amplification PCR pourraient être rendues difficiles suite à la nature de la séquence,

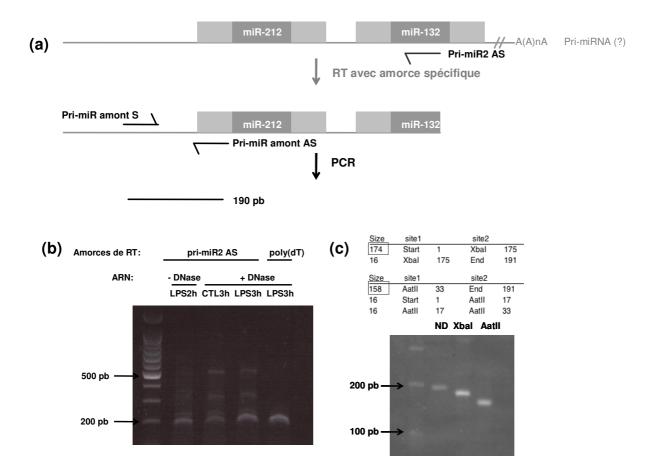


Figure 3.4 : Les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique chez l'homme. (a) Stratégie suivie pour démontrer que les miR-132 et miR-212 sont transcrits de façon polycistronique. Des extraits d'ARN de monocytes THP-1 sont rétro-transcrits avec une amorce spécifique s'hybridant au niveau de la séquence du miR-132 et utilisés comme matrice afin d'amplifier une région du pri-miRNA située en amont du pre-miR-212. Un produit de 190 pb ne peut être observé que si les miR-132 et miR-212 sont transcrits simultanément étant donné l'utilisation d'une amorce spécifique pour la RT. Les boîtes gris foncé représentent les séquences des miRNAs matures, tandis que les boîtes gris clair représentent les régions des pre-miRNAs. (b) Un fragment de taille attendue (190 pb) est obtenu aussi bien à partir d'extraits d'ARN de monocytes stimulés 2h ou 3h au LPS ou non stimulés et lorsqu'ils sont rétro-transcrits avec une amorce spécifique ou une amorce poly(dT). Les conditions de RT et de PCR utilisées sont les suivantes : RT – 1% DMSO, 0,1 M bétaïne, amorces pri-miR2 AS 2 μM ou poly(dT) 2,5 μM, dénaturation 10 min à 65°C et élongation 30 min à 65°C PCR – 1% DMSO, 0,125 M bétaïne, amorces pri-miR amont S et AS 1 μM, produits de RT utilisés à une dilution finale de 1/50. (c) Restriction diagnostique des produits de 190 pb. Après avoir été purifiés, ces produits ont été digérés par les enzymes XbaI ou AatII ou non digérés (ND). Les longueurs des fragments attendus suite à ces digestions ont été déterminées à l'aide du logiciel ApE.

extrêmement riche en GC (79%) et comportant de plus les hairpins des pre-miR-132 et pre-miR-212. Ces structures secondaires pourraient, à cause du contenu élevé en GC, être particulièrement difficiles à dénaturer et dès lors gêner la rétro-transcription et/ou l'hybridation des amorces lors de la réaction PCR. Nous avons donc employé de la bétaïne et du DMSO à différentes concentrations à la fois lors des réactions de rétro-transcription et de PCR, ces additifs étant reconnus pour améliorer le rendement, la spécificité et la reproductibilité des rétro-transcriptions et amplifications des régions riches en GC (Henke et al., 1997, Sahdev et al., 2007). Ces optimisations ne nous ont cependant pas permis d'amplifier la région du pri-miR illustrée à la figure 3.3a (données non montrées).

En émettant l'hypothèse que la réaction PCR pourrait être gênée par la présence des hairpins ou le contenu en GC important situé au niveau des pre-miR-132 et pre-miR-212, nous avons voulu amplifier une autre région du pri-miRNA, située en amont du pre-miR-212 (figure 3.4a). En utilisant comme ADN matrice des extraits d'ARN rétro-transcrits à l'aide d'une amorce spécifique s'hybridant au niveau de la séquence du miR-132, l'amplification d'une telle région n'est possible que si les deux miRNAs sont transcrits simultanément. Or, comme l'illustre la figure 3.4b (piste 1), un produit de taille attendue a été obtenu. Afin de nous assurer que ce fragment ne résultait pas de l'amplification d'ADN génomique contaminant, les extraits d'ARN ont été, préalablement à leur rétro-transcription, traités à la DNase, sans que cela n'affecte le résultat de la PCR (figure 3.4b, pistes 2, 3 et 4). De plus, deux restrictions diagnostiques ont permis de confirmer l'identité de ce fragment (figure 3.4c), nous permettant de démontrer pour la première fois chez l'homme l'existence d'un pri-miRNA commun aux miR-132 et miR-212.

Il est intéressant de remarquer que l'intensité du fragment amplifié à partir d'extraits de cellules stimulées au LPS (figure 3.4b, piste 3) est plus forte que celle du fragment amplifié à partir d'extraits de cellules non stimulées (figure 3.4b, piste 2). Bien qu'il ne s'agisse pas d'une PCR quantitative, ces résultats suggèrent que le pri-miR-132/212 pourrait être plus exprimé dans les cellules stimulées au LPS que dans les cellules contrôles. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle les miR-132 et miR-212 seraient induits par le LPS - au moins en partie - suite à des mécanismes transcriptionnels. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons voulu quantifier l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel. Pour cela, nous nous sommes tout d'abord assurés qu'il était possible de rétro-transcrire ce pri-miR-132/212 à l'aide d'une amorce poly(dT) (figure 3.4b, piste 4). Nous avons ensuite analysé l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel à l'aide d'amorces s'hybridant en dehors des régions des pre-miRNAs (TaqMan® Pri-miRNA Assays, Applied Biosystems).

II.2. Etude de l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel

Comme l'illustre la figure 3.5a, deux types d'amorces sont commercialisés par Applied Biosystems pour l'étude de l'expression du pri-miR-132/212. Néanmoins, ces amorces ne sont pas validées et se trouvent chacune environ 500 pb en amont (miR-212) ou en aval (miR-132) des pre-miRNAs. Ces deux amorces sont donc susceptibles de ne pas être fonctionnelles, l'une pouvant être située en amont du site d'initiation de la transcription, l'autre pouvant se trouver en aval du signal pour la queue polyA. Nous avons donc testé la validité de ces deux amorces dans l'étude de l'expression du pri-miR-132/212. Les figures 3.5b et 3.5c illustrent les résultats de la quantification par PCR en temps réel de l'expression relative du pri-miR-

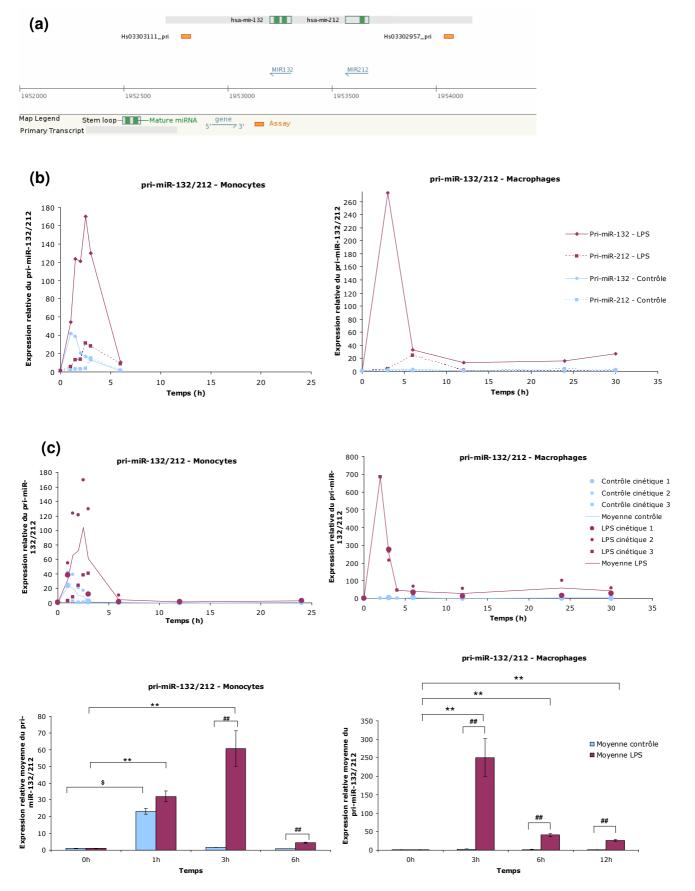


Figure 3.5 : Etude de l'expression du pri-miR-132/212 par PCR en temps réel. (a) Positionnement des sondes et amorces utilisées pour la quantification de l'expression du pri-miR-132/212 (TaqMan® Pri-miRNA Assays, Applied Biosystems). (b et c) Des monocytes ou macrophages ont été stimulés avec l μg/ml de LPS ou incubés dans du RPMI base (« contrôle ») durant des durées variables. L'abondance du pri-miR-132/212, normalisée par celle de la GAPDH est exprimée de façon relative au temps 0. (b) Etude de l'expression du pri-miR-132/212 en utilisant les sondes pri-miR-132 et pri-miR-212. (c) Au dessus : expression relative du pri-miR-132/212 (sonde pri-miR-132) dans les monocytes et macrophages au cours de trois manipulations indépendantes. Chaque symbole représente l'évolution de l'expression du pri-miRNA au cours d'une expérience tandis que la courbe représente la moyenne de l'expression relative du pri-miRNA. En

132/212 dans les monocytes et macrophages THP-1 stimulés pendant des durées variables au LPS. Il est important de noter que l'expression du pri-miRNA en utilisant la sonde pri-miR-212 n'a pas pu être calculée dans tous les réplicats étant donné que le seuil de fluorescence n'était pas toujours atteint après 40 cycles d'amplification. De plus, les profils obtenus suite à l'utilisation de cette sonde sont très variables entre les réplicats (résultats non montrés) et ne semblent pas cohérents par rapport aux profils d'induction des formes matures, contrairement à ceux obtenus lors de l'utilisation de la sonde pri-miR-132. Nous en avons déduit que la sonde pri-miR-212 n'était pas fonctionnelle et avons donc utilisé la sonde pri-miR-132 pour l'étude de l'expression du pri-miR-132/212.

Malgré la variabilité des taux et des cinétiques d'induction observée au sein des différents réplicats (figure 3.5c), dans les monocytes, l'induction du pri-miR-132/212 est déjà très significative après 1h de stimulation au LPS par rapport au temps 0. Cette induction se poursuit jusqu'à 3h de stimulation au LPS pour ensuite rapidement diminuer jusqu'à une expression proche de l'expression basale, après 6h de stimulation. Il est intéressant de noter qu'on observe également une induction significative du pri-miR-132/212 1h après le changement de milieu dans les cellules contrôles. Ceci suggère que l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse à une privation en sérum impliquerait aussi des mécanismes transcriptionnels. Alors que l'expression des miRNAs matures reste assez stable au-delà de 6h de stimulation dans les monocytes (voir figure 3.1), la forme primaire, dont l'induction est très transitoire, est déjà revenue à un niveau quasiment basal après seulement 6h de stimulation. Ces profils d'expression peuvent être expliqués d'une part par une maturation rapide de la forme primaire en formes précurseurs et matures (d'où un retour rapide au niveau d'expression basal) et d'autre part par un temps de demi-vie élevé des miRNAs (Krol et al., 2010) (il est généralement admis que les miRNAs sont des molécules très stables, de temps de demi-vie allant de plusieurs heures à plusieurs jours, ce qui expliquerait la stabilité de leur expression au-delà de 6h de stimulation).

Dans les macrophages, l'induction du pri-miR-132/212 est extrêmement importante et atteint un maximum après 3h de stimulation au LPS. Cette observation conforte les analyses de Fiedler, Wibrand et Wayman chez la souris et le rat, qui avaient observé l'induction du primiR-132/212 en moyenne 3h avant l'induction des formes matures (Fiedler et al., 2008, Wibrand et al., 2010, Wayman et al., 2008). Par ailleurs, ces résultats montrent que les cinétiques d'induction du pri-miR-132/212 sont assez similaires à la fois dans les monocytes et macrophages stimulés au LPS, du moins durant les temps courts de stimulation. Au-delà de 3h de stimulation, l'abondance du pri-miR-132/212 décroît rapidement sans toutefois retourner à un niveau basal comme dans les monocytes et reste plus élevée par rapport au temps 0 (p < 0,01) jusqu'à plus de 30h de stimulation, avec éventuellement, selon les réplicats, un second pic d'induction plus faible 24 à 30h après l'initiation de la stimulation. Ceci pourrait expliquer l'induction prolongée des formes matures dans les macrophages. Etant donné qu'il est généralement admis que les formes primaires des miRNAs disposent d'un temps de demi-vie court (Cullen, 2004), le fait que le pri-miR-132/212 soit continuellement surexprimé dans les macrophages stimulés au LPS pourrait indiquer une transcription active et continue durant une longue période dans ces cellules. On ne peut cependant exclure que le pri-miRNA soit stabilisé dans les macrophages.

Par ailleurs, les taux d'induction de la forme primaire sont largement supérieurs à ceux des formes matures. Ces observations suggèrent que certaines étapes de la maturation des miR-132 et miR-212 pourraient être limitantes. Bien que peu de choses soient encore connues à ce sujet, il est intéressant de noter que l'équipe de Wibrand a mesuré l'expression de ces

dessous : histogrammes représentant la moyenne de l'expression relative du pri-miR-132/212 dans les différents réplicats. Les barres d'erreur représentent les coefficients de variation des écart-types calculés à partir des valeurs de Δ Ct (voir Matériel et méthodes, point VI). Les analyses statistiques ont été effectuées en réalisant une ANOVA 2 pairée suivie de comparaisons multiples (test de Holm-Sidak) sur base des valeurs de Δ Ct (voir Matériel et méthodes, point VI). Les comparaisons intra-LPS sont représentées par des étoiles (*, p < 0,05 ; **, p < 0,01), les comparaisons intra-contrôles sont représentées par des dollars (\$, p < 0,05) et les comparaisons entre les cellules contrôles et stimulées sont représentées par des dièses (#,p < 0,05 ; ##, p < 0,01).

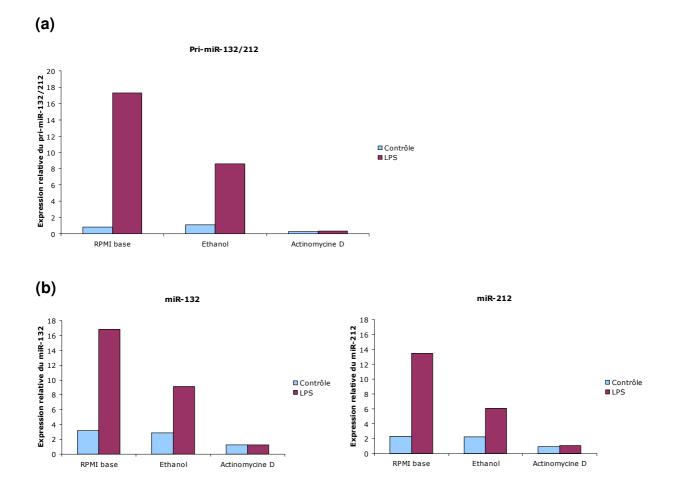


Figure 3.6: L'induction du pri-miR-132/212 et des miR-132 et miR-212 par le LPS est supprimée en présence d'actinomycine D. Des monocytes ont été pré-incubés pendant 30 min avec $5 \mu g/ml$ d'actinomycine D, une concentration correspondante en solvant (éthanol) ou du RPMI base puis stimulés pendant 3h avec $1 \mu g/ml$ de LPS. L'abondance du pri-miR-132/212 (normalisée à celle de la GAPDH) (a) ainsi que celle des formes matures (normalisée par l'abondance du RNU-44) (b) est exprimée de façon relative au temps 0. Ces données représentent la moyenne de deux mesures par PCR en temps réel réalisées à partir d'une série d'échantillons biologiques.

miRNAs matures, mais aussi l'expression de leurs formes précurseurs et primaire, lors de la potentialisation à long terme du dentus gyratus de rats. Ces chercheurs ont remarqué que l'induction des formes primaires et précurseurs avait lieu très rapidement, alors que l'induction de la forme mature n'était détectée que 2h plus tard (Wibrand et al., 2010). Ces résultats suggèrent que les transcrits primaires pourraient être maturés très rapidement, tandis que le transport des précurseurs dans le cytoplasme et/ou la conversion des précurseurs en formes matures serait plus lent(e). Confortant cette hypothèse, il a été démontré par des chercheurs travaillant sur le miR-30a que la surexpression de l'exportine 5 induisait une augmentation de l'expression de la forme mature de ce miRNA ainsi qu'une augmentation de la répression d'une de ses cibles (Yi et al., 2005). Bien que les auteurs n'aient pas identifié d'impact de la surexpression des enzymes Drosha et Dicer, on ne peut exclure que les étapes de maturation dépendantes de ces protéines ne soient limitantes. En effet, Drosha et Dicer requièrent pour leur fonction la présence de plusieurs partenaires protéiques, lesquels pourraient être limitants.

III. Les miR-132 et miR-212 sont transcriptionnellement induits dans les cellules THP-1 stimulées au LPS

Bien que les profils d'induction du pri-miR-132/212 dans les cellules stimulées au LPS suggèrent fortement que l'expression des miR-132 et miR-212 est contrôlée, au moins en partie, au niveau transcriptionnel, nous avons voulu démontrer de façon plus définitive l'implication de la transcription dans l'induction de ces miRNAs. Pour cela, nous avons préincubé des monocytes en présence d'actinomycine D, une molécule inhibant la transcription en s'intercalant dans l'ADN et avons ensuite analysé l'expression des formes matures et primaire des miR-132 et miR-212 après 3h de stimulation au LPS.

L'étude de l'expression du pri-miR-132/212 montre que la pré-incubation avec l'actinomycine D abolit complètement l'induction du pri-miRNA observée dans les cellules non pré-incubées (figure 3.6a), démontrant que l'expression du pri-miR-132/212 est transcriptionnellement induite lors d'une stimulation au LPS. Des profils d'expression tout à fait similaires sont observés pour les formes matures (figure 3.6b). Il est intéressant de remarquer que l'induction des miRNAs dans les cellules contrôles (résultant probablement de la privation en sérum, comme décrit au point I) est également réprimée en présence d'actinomycine D, ce qui renforce l'hypothèse précédemment énoncée selon laquelle les miR-132 et miR-212 seraient aussi induits transcriptionnellement dans les monocytes privés en sérum.

Etant donné que l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS est induite par des mécanismes transcriptionnels, nous nous sommes intéressés aux facteurs de transcription susceptibles de contrôler l'expression de ces miRNAs.

IV. Les rôles d'AP-1, NF-κB et CREB dans l'expression des miR-132 et miR-212

La régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 est encore peu connue actuellement. Deux équipes (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005) ont démontré que le facteur de transcription CREB participait à l'induction du pri-miR-132/212 dans les neurones corticaux

de rats et de souris stimulés par des neurotrophines; cependant, aucun autre facteur de transcription régulant l'expression de ces miRNAs n'a encore été mis en évidence. De plus, la question de la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 n'a pas encore été posée dans des contextes autres que neuronaux. Afin de déterminer quels facteurs de transcription candidats pourraient se révéler intéressants dans le cadre d'une stimulation au LPS de cellules monocytaires, nous avons analysé la séquence d'ADN localisée en amont des gènes encodant les miR-132 et miR-212 humains de façon à localiser des séquences de liaison pour des facteurs de transcription.

IV.1. Analyse bioinformatique de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212

L'analyse bioinformatique réalisée à l'aide du logiciel Transfac (Biobase) et présentée en annexe 1 illustre les sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription détectés dans la région génomique s'étendant de 5000 pb en amont du pre-miR-212 à l'extrémité avale du premiR-132 (longueur totale : 5473 pb). En sélectionnant la matrice « vertébrés non-redondants » et l'option minimisant les faux positifs, 279 sites putatifs sont détectés dans cette séquence. Il est intéressant de noter que ces sites de liaison sont répartis de part et d'autre d'une région de séquences répétées au sein de laquelle aucun site putatif n'était détecté lors des analyses réalisées au début de la recherche. Parmi ces 279 sites putatifs sont inclus 18 sites de liaison putatifs pour le facteur de transcription CREB. Etant donné que certains sites détectés se chevauchent de quelques nucléotides, ces 18 sites se regroupent en réalité en 10 sites distincts les uns des autres. Deux sites AP-1 distincts sont également détectés en utilisant cette matrice. Lorsque l'analyse est effectuée en sélectionnant une matrice spécifique des cellules immunes (option minimisant les faux positifs), 156 sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription sont détectés, dont 28 pour AP-1 se regroupant en 7 sites distincts. En outre, 4 sites putatifs regroupés en deux localisations sont également détectés pour le facteur de transcription NF-kB. Bien que moins de sites aient été identifiés pour ce facteur, son rôle pourrait tout de même être important dans l'expression des miR-132 et miR-212 étant donné qu'il est requis pour l'expression de la plupart, sinon de tous les gènes induits par le LPS dans les monocytes humains (Guha and Mackman, 2001).

Les facteurs de transcription CREB, AP-1 et NF-kB sont connus pour être activés en réponse au LPS (voir Introduction, point III.2.c) et pour induire la transcription de gènes encodant des médiateurs inflammatoires. Aurélie Tacheny (thèse en cours en URBC, FUNDP) a d'ailleurs vérifié que l'activité de liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription était augmentée lors de la stimulation au LPS de cellules THP-1. Nous avons donc entrepris l'étude du rôle potentiel de ces facteurs de transcription dans la régulation de l'expression des miR-132 et miR-212 par le LPS.

IV.2. Inhibition du facteur de transcription AP-1

Afin d'étudier le rôle potentiel d'AP-1 dans la transcription des miR-132 et miR-212, nous avons pré-incubé des macrophages pendant 30 min avec un inhibiteur de JNK, le SP 600125, avant de les stimuler au LPS. Il a été rapporté que cet inhibiteur inhibit les JNK1, JNK2 et JNK3 et que l'incubation de cellules en sa présence résultait en une inhibition concentration-dépendante de la phosphorylation de c-Jun et de l'expression de gènes inflammatoires. En

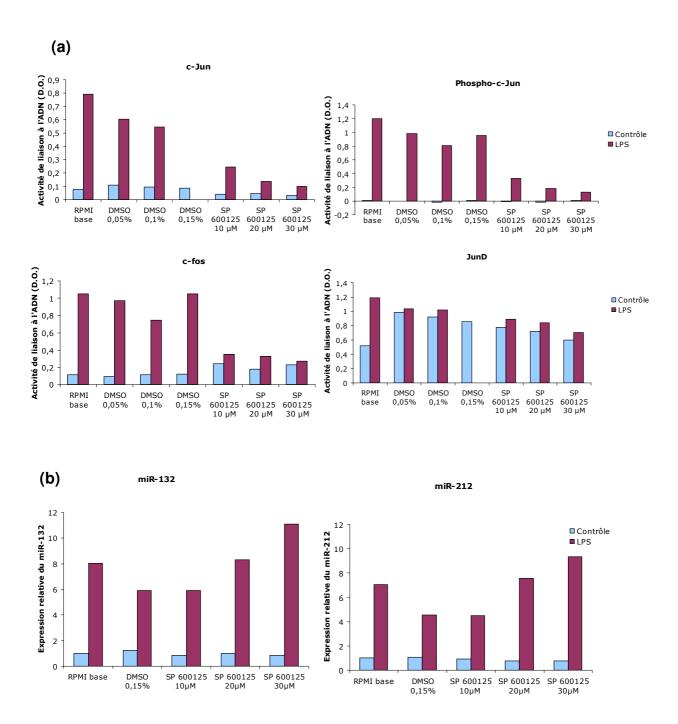


Figure 3.7 : Effets du SP 600125 sur l'activité de liaison à l'ADN de différents membres de la famille AP-1 (a) et sur l'expression des miR-132 et miR-212 induite par le LPS (b). Des macrophages THP-1 ont été pré-incubés pendant 30 min avec l'inhibiteur de JNK SP 600125 ou son solvant (DMSO) aux concentrations indiquées (les concentrations en DMSO correspondent à celles utilisées lors des pré-incubations en présence de SP 600125) puis stimulés avec 1 μg/ml de LPS. (a) Après 45 min de stimulation, les protéines nucléaires ont été extraites et les activités de liaison à l'ADN de c-Jun, phospho-c-Jun, c-Fos et JunD ont été évaluées (les extraits protéiques nucléaires de la condition DMSO 0,15% + stimulation LPS n'étaient pas suffisants que pour permettre l'analyse de la liaison à l'ADN des membres c-Jun et JunD). (b) Après 24h de stimulation, les ARN ont été extraits et utilisés pour quantifier l'abondance des miR-132 et miR-212. Les résultats (normalisés par l'abondance du RNU-44) sont exprimés de façon relative aux cellules contrôles pré-incubées dans du RPMI base. Les données représentent la moyenne de 2 mesures (en TransAM (a) ou PCR en temps réel (b)) réalisées à partir d'une série d'échantillons biologiques.

outre, cet inhibiteur bloque l'induction de l'expression du TNF-α observée *in vivo* en réponse au LPS dans des modèles murins (Bennett et al., 2001).

Nous avons tout d'abord démontré que cet inhibiteur empêchait l'activation d'AP-1 en analysant l'activité de liaison à l'ADN de trois membres de la famille AP-1 (c-Fos, c-Jun et sa forme phosphorylée, et JunD) après 45 min de stimulation au LPS. Les résultats illustrés à la figure 3.7a montrent que le SP 600125 inhibe efficacement l'activité de liaison à l'ADN de c-Fos, c-Jun et phospho-c-Jun, mais pas celle de JunD. Cependant, il est intéressant de noter que parmi les membres testés, JunD est celui dont l'activité de liaison à l'ADN est la moins augmentée suite à la stimulation au LPS. Etant donné que le SP 600125 inhibe efficacement les deux membres de la famille AP-1 qui sont le plus activés par le LPS, nous avons évalué l'effet de cet inhibiteur sur l'expression des miR-132 et miR-212. La figure 3.7b montre que la concentration en DMSO correspondant à la plus forte concentration en SP 600125 utilisée provoque une diminution d'environ 30% de l'induction des miR-132 et miR-212 par le LPS. Cependant, contre toute attente, nous avons remarqué que l'incubation des cellules en présence de SP 600125 provoque une augmentation de l'induction des miR-132 et miR-212 observée en réponse au LPS et ce, d'une façon dépendante de sa concentration.

Initialement, nous avions proposé trois hypothèses pour expliquer ces résultats inattendus (voir document sur l'état d'avancement du mémoire rédigé en juin 2010). Premièrement, nous pensions que la pré-incubation réalisée pourrait ne pas être suffisante pour inhiber AP-1 à long terme (24h). Deuxièmement, nous avions émis l'hypothèse qu'AP-1 pourrait ne pas intervenir de façon directe dans l'expression des miR-132 et miR-212 mais plutôt influencer indirectement leur expression en contrôlant celle d'un répresseur transcriptionnel. Enfin, nous avions suggéré que le SP 600125 pourrait induire des réponses cellulaires aspécifiques conduisant à l'activation de la transcription des miR-132 et miR-212. Il a d'ailleurs été rapporté à plusieurs reprises que cet inhibiteur de JNK exerçait des activités non spécifiques. En effet, le SP 600125 inhibe la phosphorylation stimulée par l'insuline d'un résidu thréonine d'Akt ainsi que celle des résidus tyrosines d'IRS-1 (insulin receptor substrate 1) et du récepteur à l'insuline (Jiang et al., 2003). D'autres auteurs ont rapporté que le SP 600125 inhibait l'activité de 13 autres kinases au moins autant, voire davantage, que l'activité des JNK (Bain et al., 2003). De plus, une analyse transcriptomique récente a mis en évidence que le SP 600125 modulait, outre la voie des JNK, celles de la PI3K (phosphatidylinositol 3kinase) ainsi que la voie des MAPK ERK (Champelovier et al., 2010). Ces résultats montrent que cet inhibiteur de JNK n'agit pas de façon spécifique, contrairement à ce qui avait été rapporté initialement, et qu'il serait opportun de développer d'autres inhibiteurs plus sélectifs afin d'étudier le rôle des JNK dans divers processus cellulaires (Bain et al., 2003).

Par ailleurs, il a également été démontré dans une lignée monocytaire humaine (U937) que lorsqu'on inhibait une voie de MAPK, les deux autres pouvaient s'activer en compensation. Les mécanismes responsables de ce phénomène sont encore inconnus, mais feraient probablement intervenir des boucles de rétro-action positives ou négatives étant donné la rapidité avec laquelle ces mécanismes de compensation sont activés. En effet, Espelin *et al.* ont remarqué que les voies ERK1/2 et p38 s'activaient en réponse à un inhibiteur de JNK (Calbiochem VIII) et qu'inversement, les voies JNK et ERK étaient activées en présence d'un inhibiteur de MAPK p38. Ces observations confirment que les voies de MAPK sont interconnectées et que des réponses cellulaires de compensation peuvent être activées afin de contourner les effets d'un inhibiteur (Espelin et al., 2010). Nous avons donc émis l'hypothèse que le SP 600125 pourrait, en inhibant la voie des JNK, activer indirectement les voies p38 et ERK. Or, le facteur de transcription CREB, dont le rôle dans la transcription des miR-132 et

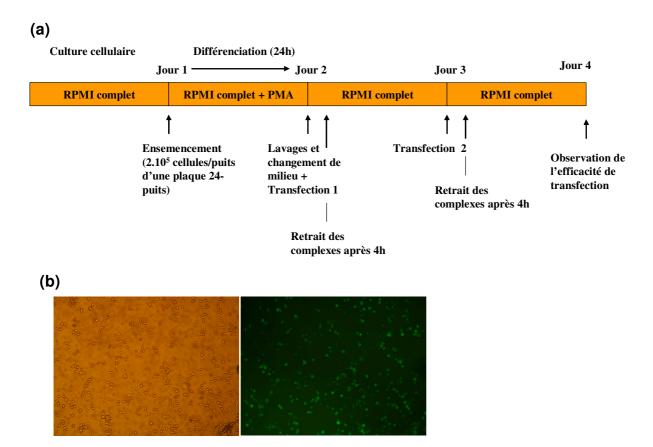


Figure 3.8: Mise au point des conditions de transfection des macrophages THP-1 par des siRNA. Le protocole utilisé est le résultat des mises au point résumées à la table 2.4 (Matériel et méthodes, point I.4.b). (a) Chronologie des manipulations réalisées lors de la transfection de siGLO® dans les macrophages. (b) Visualisation de l'efficacité de transfection suite à une double transfection en présence de Lipofectamine 2000 diluée 286X. L'efficacité de transfection (~90%) a été déterminée en divisant le nombre de cellules transfectées, apparaissant vertes en microscopie à fluorescence (à droite), par le nombre total de cellules observées en microscopie à fond clair (à gauche).

miR-212 a déjà été démontré (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005), est activé en aval de ces voies via la phosphorylation de MSK1 (voir Introduction, point III.2.b et c). Une activation de CREB indirectement provoquée par le SP 600125 pourrait expliquer l'augmentation de l'expression des miR-132 et miR-212 en présence de cet inhibiteur, malgré que celui-ci inhibe efficacement l'activité de liaison à l'ADN de plusieurs membres de la famille AP-1. Renforçant cette hypothèse, il a été démontré que le SP 600125 induisait une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription CREB après seulement 5 min et durant plus de 2h dans une lignée de cellules bêta murines (MIN6), sans que son abondance totale ne soit modifiée (Vaishnav et al., 2003). Les auteurs ont démontré que la phosphorylation de CREB induite par le SP 600125 dépendait en partie de la voie MAPK p38 et de la kinase MSK1. Cependant, la présence d'un inhibiteur de MAPK p38 ne réprimant pas totalement les effets positifs du SP 600125 sur la phosphorylation de CREB, il se pourrait que dans ce cas également l'inhibiteur de JNK active la voie ERK, qui participe aussi à la phosphorylation du facteur CREB. Il serait donc intéressant, afin de soutenir le rôle de CREB dans l'induction des miR-132 et miR-212 dans les macrophages THP-1 pré-incubés avec l'inhibiteur de JNK, d'étudier l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur de transcription en présence de SP 600125.

Etant donné les effets aspécifiques exercés par le SP 600125, nous ne pouvons pas tirer de conclusions quant au rôle éventuel que pourrait jouer AP-1 dans l'expression des miR-132 et miR-212. Il serait donc nécessaire de mettre en place des stratégies plus spécifiques, telles que la transfection de siRNA ou de plasmides encodant des dominants négatifs de membres de la famille AP-1 afin de déterminer si ce facteur de transcription semble requis pour l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées par du LPS. Ce point sera discuté plus en détails dans la partie « Conclusions et perspectives » de ce mémoire.

IV.3. Répression de CREB et p65

Afin d'étudier les rôles putatifs de CREB et NF-κB dans la transcription des miR-132 et miR-212 d'une façon plus spécifique que par l'intermédiaire d'inhibiteurs chimiques, nous avons transfecté des cellules THP-1 avec des siRNA spécifiques de CREB et de p65 (encore appelée RelA), la sous-unité transactivatrice de NF-κB la plus fréquemment activée.

IV.3.a. Optimisations de transfection de siRNA

Les cellules THP-1 étant difficiles à transfecter, la première étape afin de réprimer l'expression de p65 et de CREB par siRNA consistait en l'optimisation des conditions de transfection. Nous avons testé l'efficacité de quatre agents de transfection à différentes concentrations, dans différentes conditions de culture cellulaire (densité des cellules, différenciation avant ou après la transfection) ainsi que des transfections simples ou successives, deux jours de suite. Les taux de transfection approximatifs obtenus dans ces différentes conditions sont résumés à la table 2.4 (Matériel et méthodes, point I.4.b). Parmi les conditions testées, les meilleurs taux de transfection ont été obtenus suite à deux transfections successives en présence de Lipofectamine 2000 diluée 286X (figure 3.8).

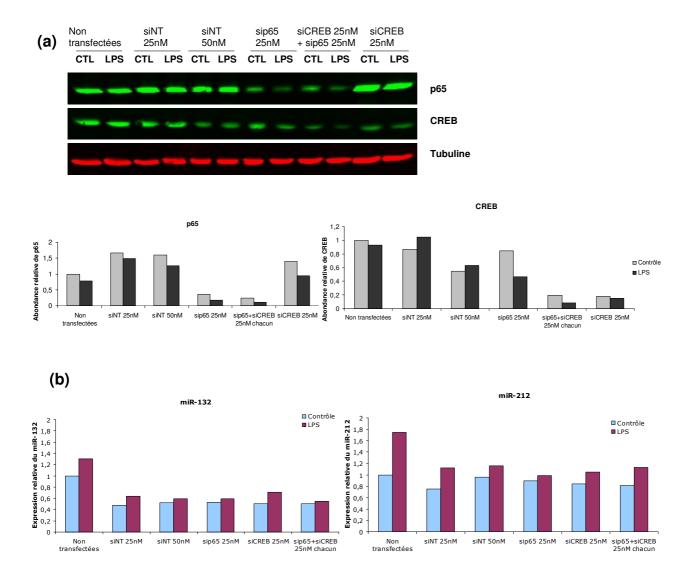


Figure 3.9 : Effets de la transfection de siRNA spécifiquement dirigés contre p65 et CREB dans des macrophages THP-1 sur l'abondance de ces protéines (a) et sur l'expression des miR-132 et miR-212 induite par le LPS (b). Des macrophages THP-1 ont été transfectés deux jours successifs avec des siRNA non target (« siNT »), spécifiquement dirigés contre p65 (« sip65 ») et/ou contre CREB (« siCREB ») aux concentrations indiquées. Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 6h au LPS avant que les protéines totales et les ARN ne soient extraits. (a) Détermination de l'abondance des protéines p65 et CREB par Western Blot. Les graphes présentent la quantification des abondances de p65 et CREB normalisées à celle de l'α-tubuline (utilisée comme contrôle de charge) et exprimées de façon relative aux cellules non transfectées contrôles. (b) L'abondance des miR-132 et miR-212, normalisée par celle du RNU-44 est également exprimée de façon relative aux cellules non transfectées et non stimulées au LPS. Ces résultats représentent la moyenne de deux mesures en PCR en temps réel réalisées à partir d'une série d'extraits biologiques.

IV.3.b.Transfection de siRNA contre CREB et p65

Afin de diminuer l'abondance de CREB et de p65, nous avons transfecté des macrophages THP-1 deux jours de suite avec des siRNA spécifiquement dirigés contre CREB (« siCREB ») et/ou contre p65 (« sip65 ») à une concentration de 25 nM et avons ensuite stimulé ces cellules au LPS (voir figure 2.2 dans le Matériel et méthodes). Comme l'illustre la figure 3.9a, la transfection de sip65 25 nM engendre une diminution de l'abondance de p65 de 78 à 88 % (cellules contrôles et stimulées au LPS, respectivement) par rapport aux cellules transfectées par une concentration identique en siRNA « non-target » (« siNT »). Il est assez surprenant d'observer que la transfection de ces sip65 est également associée, pour une raison inconnue, à une diminution de l'abondance de CREB dans les cellules stimulées au LPS. Il serait intéressant de reproduire cette manipulation afin de déterminer si ce phénomène se vérifie. La transfection de siCREB 25 nM induit quant à elle une diminution de 79 à 85% de l'abondance de CREB par rapport aux cellules transfectées par une quantité identique de siNT. Afin de tester l'influence de la répression simultanée de CREB et p65, nous avons également transfecté des cellules avec des sip65 et siCREB, chacun présents à une concentration de 25 nM. La figure 3.9a montre que cette double transfection permet de diminuer les abondances de p65 et CREB d'une façon similaire aux simples transfections. Il est à noter cependant que la transfection de siNT à une concentration de 50 nM induit ellemême une légère diminution de l'abondance de CREB.

Après avoir démontré que la transfection de siRNA spécifiques permet de réprimer efficacement l'expression de CREB et p65, nous avons étudié l'effet de ces répressions sur l'expression des miRNAs. La figure 3.9b montre que la transfection de sip65 et siCREB réprime l'expression du miR-132 d'environ 50% à la fois dans les cellules contrôles et stimulées au LPS, ainsi que l'induction du miR-212 en réponse au LPS, mais montre également que la transfection de siNT exerce un effet similaire. Il semble donc que le processus de transfection lui-même réprime l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. Il est à noter toutefois qu'au cours de cette manipulation, l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules stimulées au LPS et non transfectées est assez faible, ce qui rend peu aisée l'analyse de l'effet des répressions de p65 et CREB sur l'induction de ces miRNAs. Cette manipulation a été reproduite en transfectant des concentrations identiques en sip65 et siCREB, ainsi qu'en incubant des cellules avec de la Lipofectamine seule (en concentration identique aux transfections de siRNA), de façon à déterminer si la répression de l'induction des miR-132 et miR-212 est liée à la présence de siNT ou à l'agent transfectant. Comme attendu, la présence de Lipofectamine seule n'affecte pas l'abondance des protéines p65 et CREB (figure 3.10a), tandis que la transfection de siRNA spécifiques permet d'obtenir des taux d'extinction relativement similaires à ceux obtenus lors de la manipulation précédente. En revanche, l'incubation des cellules avec cet agent de transfection seul réprime l'induction des miR-132 et miR-212 observée en réponse au LPS (figure 3.10b) autant que la répression de p65 et CREB, empêchant de mettre en évidence un rôle potentiel de ces facteurs de transcription dans l'expression des miR-132 et miR-212. Clairement, le processus de double transfection par la Lipofectamine semble modifier la biologie des cellules, rendant toute interprétation de ces résultats hasardeuse.

Il serait peut-être nécessaire, afin d'identifier un rôle putatif de ces facteurs de transcription dans l'induction des miR-132 et miR-212, de réprimer plus efficacement encore leur expression. En effet, il se pourrait que la transfection de siRNA permette de diminuer de façon assez importante l'abondance totale de p65 et CREB, sans affecter fortement l'activité globale de ces facteurs de transcription. Il pourrait donc être intéressant d'étudier l'effet de la

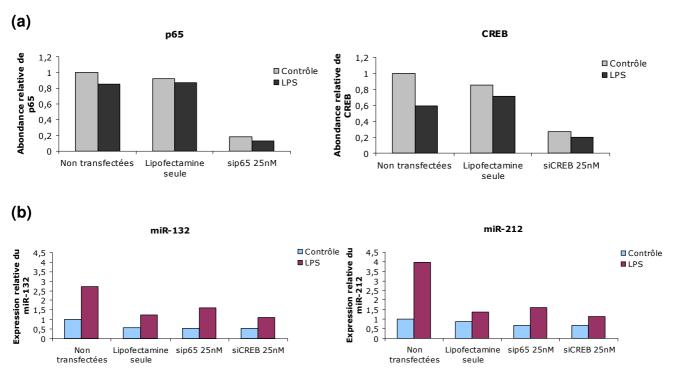


Figure 3.10 : Effets de la lipofectamine et de la transfection de sip65 et siCREB dans des macrophages THP-1 sur l'abondance de p65 et CREB (a) et sur l'expression relative des miR-132 et miR-212 induite par le LPS (b). Des macrophages THP-1 ont été transfectés deux jours successifs avec des siRNA aux concentrations indiquées puis stimulés pendant 6h au LPS avant que les protéines totales et les ARN ne soient extraits. (a) Détermination de l'abondance des protéines p65 et CREB par Western Blot. Les graphes présentent la quantification de l'abondance de p65 et CREB normalisée à celle de l'α-tubuline (utilisée comme contrôle de charge) et exprimée de façon relative aux cellules non transfectées et non stimulées au LPS. (b) L'abondance des miR-132 et miR-212, normalisée à celle du RNU-44 est également exprimée de façon relative aux cellules non transfectées et non stimulées au LPS. Ces résultats représentent la moyenne de deux mesures en PCR en temps réel réalisées à partir d'une série d'extraits biologiques.

répression de ces facteurs sur leur abondance nucléaire, leurs modifications post-traductionnelles ainsi que leur activité de liaison à l'ADN.

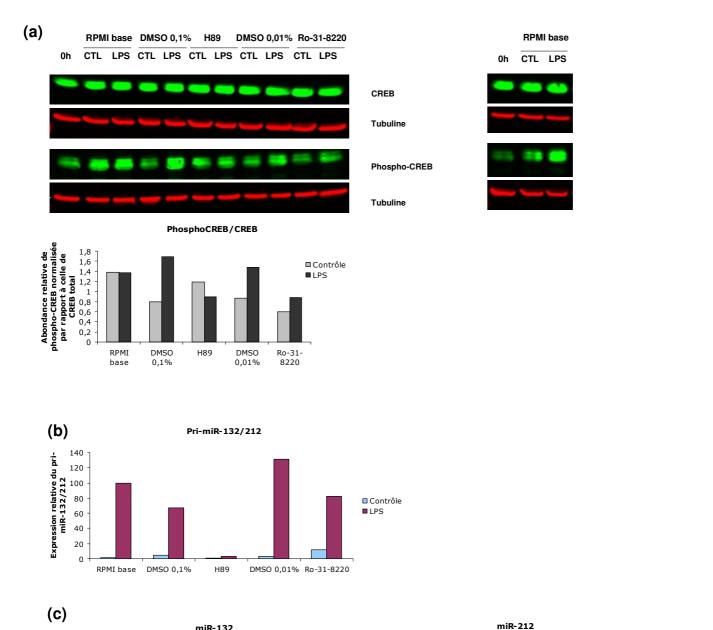
De façon assez surprenante, et comme remarqué lors de la manipulation précédente, la Lipofectamine réprime l'expression basale du miR-132 d'environ 50%, alors qu'elle affecte peu celle du miR-212 (figures 3.9b et 3.10b). En revanche, la présence de cet agent de transfection est corrélée à une forte répression de l'induction du miR-212 en réponse au LPS. Ces résultats nous laissent spéculer que la transfection pourrait affecter la maturation et/ou la stabilité de ces deux miRNAs de façons différentes.

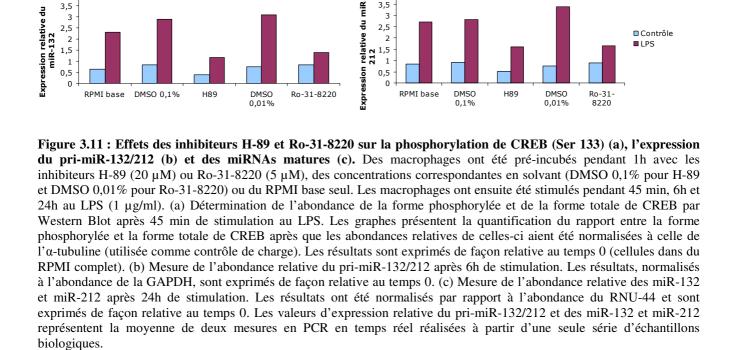
Bien que la répression de CREB ne semble pas réprimer davantage l'expression des miR-132 et miR-212 que l'exposition des cellules à l'agent transfectant seul, nous avons voulu poursuivre nos recherches à propos de ce facteur de transcription. En effet, l'utilisation de SP 600125 induit une augmentation de l'expression de ces miRNAs; or, bien que les effets du SP 600125 soient non spécifiques, il a été rapporté que cet inhibiteur pourrait être utilisé en tant qu'activateur de CREB (Vaishnav et al., 2003). Nous avons donc voulu déterminer si, de façon inverse, l'incubation de cellules en présence d'inhibiteurs de CREB réprimait l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. Bien que nous soyons conscients des difficultés d'interprétations des résultats liées à la non-spécificité des inhibiteurs chimiques, nous avons tout de même choisi de les utiliser dans le but de pouvoir au moins écarter, dans le cas où ces inhibiteurs auraient un effet sur l'activation de CREB mais pas sur l'expression des miR-132 et miR-212, l'hypothèse selon laquelle ce facteur jouerait un rôle majeur dans leur induction en réponse au LPS.

IV.4. Inhibition du facteur de transcription CREB

Afin d'inhiber le facteur de transcription CREB, nous avons pré-incubé des macrophages avec les inhibiteurs H-89 et Ro-31-8220. Le H-89 est un inhibiteur de PKA (proteine kinase A) qui inhibe avec une efficacité comparable trois autres kinases : S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1), ROCK-II (Rho-associated kinase II) et MSK1 (Davies et al., 2000). Le Ro-31-8220, initialement présenté comme un inhibiteur de PKC (proteine kinase C) inhibe aussi avec une grande efficacité les kinases S6K1, RSK (ribosomal s6 kinase) et MSK1 (Davies et al., 2000). Or, comme cela a été décrit dans l'introduction (points III.2.b et III.2.c), MSK1 phosphoryle CREB en réponse au LPS. Bien que ces deux inhibiteurs inhibent d'autres cibles que MSK1, plusieurs auteurs les ont néanmoins utilisés de façon à réprimer la phosphorylation de CREB. L'équipe de Caivano a notamment démontré que l'incubation de macrophages RAW264 avec du Ro-31-8220 (5 μ M) ou du H-89 (25 μ M) empêchait complètement la phosphorylation de CREB sur son résidu sérine 133 observée en réponse au LPS (Caivano and Cohen, 2000). Nous avons donc employé ces deux inhibiteurs de façon à déterminer si CREB semblait intervenir dans la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS.

Nous avons tout d'abord évalué l'effet de chacun de ces inhibiteurs sur la phosphorylation de CREB après 45 min de stimulation au LPS. Comme l'illustre la figure 3.11a, l'abondance totale de CREB n'est pas modifiée suite à ces traitements, alors que la phosphorylation de CREB est augmentée suite à la stimulation au LPS des cellules non pré-incubées avec les inhibiteurs (pour une raison non connue, cet effet n'est pas visible sur le Western Blot présenté à gauche sur la figure 3.11a dans les cellules pré-incubées dans du RPMI base seul mais a néanmoins été observé dans un réplicat (présenté à droite)). En revanche, l'incubation





Ro-31-8220

3,5

RPMI base

■ Contrôle

■ LPS

miR-132

3,5

1,5 0,5 0

RPMI base

DMSO 0,1%

3 2,5 2

Expression relative du

miR-132

des cellules avec ces inhibiteurs réprime partiellement (Ro-31-8220) voire totalement (H-89) l'augmentation de la phosphorylation de CREB résultant de la stimulation au LPS (par comparaison avec les cellules pré-incubées dans du DMSO en concentrations correspondantes aux pré-incubations avec les inhibiteurs).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets de ces inhibiteurs sur l'expression de la forme primaire des miR-132 et miR-212 (figure 3.11b). Le H-89 inhibe fortement l'induction du pri-miR-132/212 observée lors de la stimulation des cellules au LPS. En effet, l'incubation des cellules avec du H-89 permet de réprimer presque totalement l'induction du pri-miR-132/212 en réponse au LPS. De plus, le H-89 semble aussi réprimer l'expression du pri-miR-132/212 dans les cellules contrôles. Ceci suggère que le H-89 inhiberait non seulement un facteur impliqué dans l'induction du pri-miR-132/212 en réponse au LPS, mais jouant également un rôle dans sa transcription basale. L'inhibiteur Ro-31-8220 semble également réprimer l'induction du pri-miR-132/212 en réponse au LPS. L'effet de cet inhibiteur sur l'expression du pri-miR-132/212 est cependant nettement moins marqué que celui du H-89.

En ce qui concerne l'expression des formes matures (figure 3.11c), le H-89 réprime partiellement l'induction en réponse au LPS des miR-132 et miR-212 ainsi que l'expression de ces miRNAs en condition contrôle. Le Ro-31-8220 semble également réprimer l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS ; toutefois, il ne semble pas avoir d'effet sur l'expression des miRNAs en condition contrôle.

Il faut signaler que les données présentées à la figure 3.11 ne sont encore qu'indicatives et que ces résultats demandent à être reproduits. Un réplicat de cette manipulation a été réalisé durant ce mémoire mais est peu interprétable étant donné la très faible induction des miRNAs matures dans les cellules stimulées au LPS lors de cette expérience. Toutefois, l'analyse de l'expression du pri-miRNA au cours de ce réplicat a montré une tendance similaire à celle décrite précédemment pour le H-89 ainsi qu'un effet plus marqué du Ro-31-8220 par rapport à la manipulation précédente (cette analyse a été possible étant donné l'amplitude importante de l'induction de la forme primaire qui, bien que réduite de près de trois fois par rapport à la manipulation précédente, était induite d'environ 30 fois dans les cellules stimulées au LPS et pré-incubées dans du RPMI base).

Bien que préliminaires, les résultats présentés à la figure 3.11 suggèrent que les deux inhibiteurs de MSK1 testés répriment l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. De plus, le H-89 semble également inhiber l'expression de ces miRNAs dans les cellules non stimulées. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle le facteur de transcription CREB, activé en aval de la kinase MSK1, serait impliqué dans la surexpression des miR-132 et miR-212 lors d'une stimulation au LPS des cellules THP-1 et peut-être également dans leur transcription en condition basale. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Remenyi et al. (Remenyi et al., 2010) dans le contexte neuronal chez la souris et confortent les hypothèses avancées par d'autres équipes concernant le rôle de CREB dans la transcription des miR-132 et miR-212 dans d'autres contextes (Strum et al., 2009, Lagos et al., 2010, Hollander et al., 2010). Toutefois, il est important de garder à l'esprit que les deux inhibiteurs utilisés inhibent des protéines autres que la kinase MSK1. Le H-89 par exemple, a été initialement développé en tant qu'inhibiteur de la PKA. Or, il a été rapporté que la stimulation au LPS de monocytes THP-1 activait la voie de la PKA et résultait en une augmentation de la phosphorylation de CREB (Bshesh et al., 2002). Bien que cette observation nécessiterait d'être validée dans des cellules différenciées, on ne peut exclure qu'une partie des effets du H-89 sur l'expression du pri-miR-132/212 ne soit dépendante de l'inhibition de cette protéine. L'effet potentiel de

CREB sur l'expression des miR-132 et miR-212 dans les cellules stimulées au LPS pourrait donc résulter de l'activation de ce facteur en aval de MSK1 mais aussi de la PKA. En outre, en inhibant l'activité d'autres protéines kinases que les MSK1, les inhibiteurs H-89 et Ro-31-8220 sont susceptibles de moduler l'activité d'autres facteurs de transcription potentiellement impliqués dans l'expression des miR-132 et miR-212 (la PKA par exemple, qui est inhibée par le H-89 peut phoshoryler, outre CREB, le facteur NF-кВ (Matt, 2002)). En outre, la kinase MSK1 elle-même agit sur d'autres cibles que CREB. En effet, les facteurs de transcription ATF-1, STAT-3, Etv1 (Ets transcript variant 1) ainsi que la sous-unité p65 du facteur de transcription NF-κB peuvent être phosphorylés par MSK1 (Vermeulen et al., 2009). Or, en ce qui concerne p65, il a été rapporté que la phosphorylation par MSK1 de son résidu sérine 276 était essentielle pour son association avec ses partenaires protéiques nucléaires, l'activité d'histone acétyl-transférase qui leur est associée et donc la transcription des gènes cibles de NF-κB. De plus, des chercheurs ont montré que le traitement de fibroblastes avec l'inhibiteur H-89 réprimait la transactivation (mais pas l'activité de liaison à l'ADN) de p65 en réponse à une stimulation au TNF-α (Vermeulen et al., 2003). Par ailleurs, il a aussi été démontré que MSK1 jouait un rôle dans le remodelage de la chromatine en réponse à l'activation des MAPK. En effet, MSK1 est capable de phosphoryler la protéine HMGN1 (high-mobility group nucleosome binding domain 1; également connue sous le nom de HMG-14), de déstabiliser de cette façon son interaction avec les nucléosomes et d'ainsi avoir accès à l'histone H3, qu'elle phosphoryle également (Dunn et al., 2005). La phosphorylation de cette histone jouerait un rôle dans le remodelage des promoteurs au niveau desquels MSK1 est recruté (notamment par l'intermédiaire de facteurs de transcription comme NF-kB ou Elk-1) (Drobic et al., 2010). Il se pourrait donc que la répression de l'induction du pri-miR-132/212 en réponse au LPS dans les cellules incubées avec les inhibiteurs de MSK1 soit en partie dépendante, outre la répression de la phosphorylation de CREB, de ce phénomène. Il a d'ailleurs a été démontré que l'incubation de cellules avec l'inhibiteur H-89 bloquait la phosphorylation de l'histone H3 en aval des MAPK (Soloaga et al., 2003).

L'inhibition de facteurs de transcription constitue une première approche dans l'étude des mécanismes transcriptionnels responsables de l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. Une approche complémentaire consiste à cloner une région promotrice putative de ces miRNAs dans un plasmide rapporteur. Cette approche, généralement utilisée dans le but de localiser les régions promotrices minimales et principales d'un gène d'intérêt, permet aussi de valider les sites de liaison fonctionnels des facteurs de transcription régulant son expression. En outre, la transfection d'une construction rapportrice pourrait engendrer moins d'altérations des réponses cellulaires que la transfection de siRNA, étant donné qu'elle nécessite une efficacité de transfection moindre.

V. Construction d'un plasmide rapporteur luciférase contenant une région promotrice putative des miR-132 et miR-212

Dans le but de déterminer la région promotrice principale des miR-132 et miR-212 et de valider le rôle putatif de certains facteurs de transcription dans la régulation de l'expression de ces miRNAs par le LPS, nous avons cloné une région promotrice putative des miR-132 et miR-212 en amont du gène de la luciférase encodé par le plasmide pGL4.10 [luc2] (Promega).

 ${\tt CATCAGGGCGACTGGAAGTGGCTGGACAGCGCCTCCGGGGGGTCCAAAGAAGTAACCATGGGGCCCTAGAATCCCCCTGTACGCCGT}$ TTTGAAGAATCCCGCGTGGACTTCTTCTCCAACCCACCCGCCGAAGGAAACAACAGGGGCGCCTGCGGCTGGGACCCCGCAAGGTCC GGAGCTGCCGGTCTCTAGGGAAGGCGGACCCCGACATCTCGCCCGAGGGACGTGCTGCGGCCTGAGGTGGAAGTTACGGAGTGTTGAGACCCCATCTCTTTTATCTTTTTCTCTTTTTGATAGAGTCAGATCCCCCACCCCCGACTTCCAAAGAGCCCCTCCGCCCCATGTATCTTGT CATTGCTTCTGTAAGGGAGGGTCTCACAGCCCTGCCCCAGCCCAGGCCCCTAACCCCATCCTCAAGCCCTCATTGCTTCTGTAAGGGAG $\tt CTCCTCAAGCCCTCATTGCTTCTGTAAGGGAGGGTCTCACAGCCCTGCCCCAGCCCCAGGCCCTAACCCCATCCTCAAGCCCTCATTGC$ A CAGCCCTCCCCATCCTGGTCCAGCTCCTCGTACACACACTCCTCTCATTTAGACCCTTCCTCCATCTCGATGGAGCCAGGCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCAGGCCAGGCAGGCCAGGCAGGCAGGCAGGCAGGCAGAGCAG ${\tt CTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGTCCGAAGGTGGGTCCTGGATGCCAGGCTCTGG}$ GCTCCCCTACTCTTCTCCCGGCCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCCACGGAGTCCAGCTTCCTCTC TGAGGAGGGGAAGGGCTGCCACGTGAAGACCCCCAGGAGCCGCGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGG TGAGCCGCCGCACGAGTACTACGCGCGCCTATAAAAGCCGCCGCCGGCCAGGCTGCGGGAGGCGACCGGGCAGTGGCGAGAGCCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGGCGCCCGATGGACAC▶▶GCAGCTACTTCGGAGGAGCAT TGCTGGCGCCCCAGGAGACGCCCCCTCstartCTCTCCCTCCCTG<u>>></u>CGGCGCGGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGC ${\tt TGAGCGGGGGTGCAGGCGAGAGACGGCCCACCCCCGCTTCC} \overline{\tt CCG}GCCCTCCTGGGACCCCCGCCCGCATGG \underline{\blacktriangleleft} CGTC$ GGGCGCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGCGCCCACGGCTTCCCGCCTCTGCGAGCGGAGCTGTCCTCTs GCGTCTGGCGGCCAGCCTGAGGCCG

Figure 3.12: Localisation des régions promotrices putatives des miR-132 et miR-212 prédites dans différentes publications et de la région promotrice putative clonée au cours de cette étude. La séquence illustrée sur cette figure est extraite du contig « NT_010718.16l : 1556376-1562048 Homo Sapiens chromosome 17 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly » (disponible sur le site web du NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Elle s'étend de 5000 pb en amont du pre-miR-212 à 200 pb en aval du pre-miR-132. Les séquences correspondant aux miRNAs matures sont surlignées en gris foncé (miR-212 en amont ; miR-132 en aval) et celles correspondant aux pre-miRNAs en gris clair. La région promotrice putative prédite par (Zhou, Ruan et al. 2007) est comprise entre les flèches rouges, celle identifiée par (Marson, Levine et al. 2008) entre les flèches oranges et l'extrémité amont de celle définie par (Wang, Wang et al. 2010) est indiquée en bleu (l'extrémité avale du promoteur identifié au cours de cette étude est située 770 nucléotides en aval du pre-miR-132 et n'est donc pas illustrée sur cette figure). Ces derniers auteurs ont également identifié deux sites putatifs d'initiation de la transcription (indiqués en bleu); le plus en amont représente celui du miR-212 et celui en aval celui du miR-132. Le site putatif d'initiation de la transcription identifié à l'aide du logiciel CoreBoost_HM est indiqué en vert (Wang, Xuan et al. 2009). La région promotrice putative clonée au cours de cette étude est illustrée en gras.

Zone de répétitions

V.1. Analyse de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212 et sélection d'une région promotrice putative

Afin de sélectionner une région promotrice putative des miR-132 et miR-212, nous avons d'une part analysé une région d'un peu moins de 5500 pb avec le logiciel Transfac (Biobase) (point IV.1), qui permet de prédire des sites de liaison consensus pour des facteurs de transcription, et avons d'autre part analysé les prédictions bioinformatiques d'identification des régions promotrices de miRNAs réalisées par différents auteurs (voir Introduction, point I.3.a).

La figure 3.12 illustre les différentes prédictions bioinformatiques de localisation de la région promotrice des miR-132 et miR-212 ainsi que la région promotrice putative que nous avons choisi de cloner dans le plasmide rapporteur. La région encadrée par les flèches oranges représente la région promotrice putative identifiée pour les miR-132 et miR-212 humains par l'équipe de Marson et al. (Marson et al., 2008). Cette équipe s'est basée sur la présence de modifications des protéines histones (triméthylation sur le résidu lysine 4 de l'histone 3), la proximité entre ces marques des histones et l'extrémité d'un transcrit couvrant la région des miRNAs d'intérêt ainsi que sur la conservation du motif de modification des histones chez l'homme et la souris. La région promotrice identifiée par cette équipe, d'une longueur de 2265 pb, s'étend de 1675 pb en amont du pre-miR-212 à 117 pb en aval du pre-miR-132. L'équipe de Zhou et al. (Zhou et al., 2007) a quant à elle identifié une région promotrice principale putative (encadrée par des flèches rouges) pour le miR-212. Cette région promotrice principale, identifiée à l'aide de l'algorithme CoVote, s'étend de 541 à 286 pb en amont du pre-miR-212. Wang et ses collègues se sont quant à eux basés entre autres sur des immunoprécipitations de chromatine liée à l'ARN polymérase II afin d'identifier les promoteurs de certains miRNAs, dont celui des miR-132 et miR-212 (l'extrémité amont du promoteur identifié par cette étude est représenté par des flèches bleues ; il se prolonge jusqu'à 770 nucléotides en aval du pre-miR-132) (Wang et al., 2010).

Nous avons décidé de cloner dans un plasmide rapporteur la région promotrice putative représentée en gras sur la figure 3.12. Cette région s'étend depuis l'extrémité avale de la zone de répétitions décrite précédemment (point IV.1) jusqu'au pre-miR-212. Cette région a été choisie de façon à d'une part englober l'extrémité amont des différents promoteurs putatifs prédits au cours des études bioinformatiques présentées à la figure 3.12 et à d'autre part inclure l'extrémité amont du pre-miR-212 (étant donné que les limites du pri-miR-132/212 ne sont pas encore déterminées).

V.2. Construction du plasmide rapporteur

La stratégie de construction du plasmide rapporteur encodant un promoteur putatif des miR-132 et miR-212 en amont du gène de la luciférase est illustrée dans la partie « Matériel et méthodes », à la figure 2.5. Cette stratégie consiste tout d'abord en l'amplification de la région promotrice putative à l'aide d'amorces comportant des sites de restriction (BgIII et HindIII) compatibles avec ceux présents dans le site multiple de clonage du plasmide rapporteur (pGL4.10 [luc2]). Ces sites de restriction sont utilisés de façon à permettre un clonage directionnel de la région promotrice putative dans le plasmide rapporteur. Cependant, la région promotrice putative amplifiée par PCR n'est pas directement clonée dans ce plasmide, car les enzymes de restriction ne restreignent pas efficacement les sites localisés près d'une extrémité de fragment d'ADN. La région promotrice putative est donc d'abord

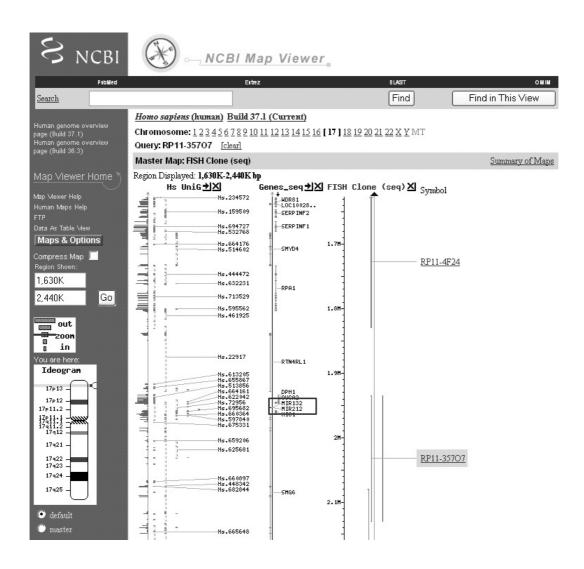


Figure 3.13 : Localisation de la région génomique du chromosome 17 humain clonée dans le BAC RP11-35707. La région du chromosome 17 humain encodée par le BAC RP11-35707 recouvre les régions des miR-132 et miR-212 (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/).

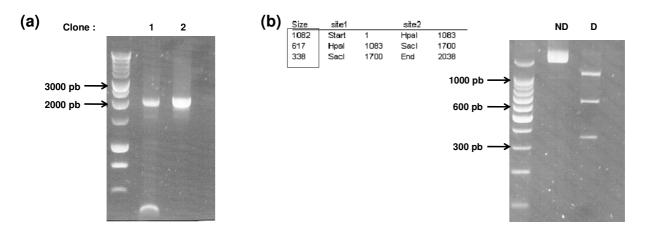


Figure 3.14: Amplification par PCR de la région promotrice putative des gènes encodant les miR-132 et miR-212 (a) et restriction diagnostique par les enzymes SacI et HpaI (b) (voir Matériel et méthodes, points V.2.b, V.2.c et V.2.d). (a) Amplification de la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 à partir du BAC RP11-35707 purifié à partir de deux clones bactériens. Etant donné que l'amplification de la région promotrice putative à partir du clone 2 était plus efficace et spécifique, ce clone a été utilisé pour la construction du plasmide rapporteur. (b) Profil de restriction du produit de taille attendue par les enzymes de restriction SacI et HpaI. Les longueurs des fragments attendus suite à cette double digestion ont été déterminées à l'aide du logiciel ApE. La piste ND (non digéré) représente le produit d'amplification de la région promotrice putative obtenu à partir du clone 2, tandis que la piste D (digéré) représente les fragments générés suite à la double restriction de ce produit par les enzymes SacI et HpaI.

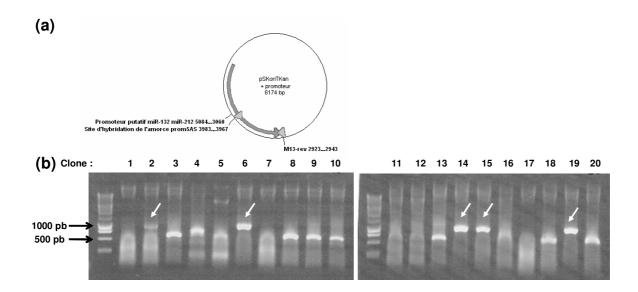


Figure 3.15: Identification des plasmides pSKOriTKan comprenant la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 dans l'orientation désirée (plasmide « pSKOriTKan + promoteur » représenté à gauche sur la figure 2.5 du Matériel et méthodes). Les plasmides issus de 20 clones transformés par un plasmide avec insert (apparaissant blancs sur un milieu contenant du X-Gal et de l'IPTG) ont été extraits et utilisés comme matrice pour la réalisation de PCR. (a) Représentation des sites d'hybridation des amorces utilisées pour cette PCR. (b) Résultats des PCR. Des produits d'une taille de 1059 pb sont attendus pour les clones comportant la région promotrice putative insérée selon l'orientation désirée.

insérée dans un plasmide intermédiaire (pSKoriTKan), séquencée, puis restreinte à l'aide des deux enzymes de restriction et clonée dans le plasmide rapporteur.

Nous avons tout d'abord essayé d'amplifier la région promotrice putative de 2025 pb à partir d'ADN génomique de cellules THP-1, avec une polymérase exerçant une activité de relecture, afin de réduire l'occurrence des mutations introduites par l'enzyme lors de l'amplification. Cependant, malgré de multiples tentatives d'optimisation (concernant la quantité d'ADN génomique matrice et les températures d'hybridation des amorces), nous ne sommes pas parvenus à amplifier de façon spécifique la région promotrice putative désirée. En effet, nous avons purifié sur gel un fragment de taille attendue (2037 pb, dont les 2025 pb de la région promotrice putative et deux fois 6 pb représentant les sites de restriction BgIII et HindIII), l'avons ligué dans le plasmide intermédiaire pSKoriTKan et l'avons ensuite séquencé. Toutefois, cette séquence s'est avérée être différente de la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 (données non montrées).

Partant de l'hypothèse que l'amplification de la région promotrice putative pourrait être rendue difficile par la complexité de l'ADN génomique utilisé comme matrice (la taille du génome humain est approximativement de 3 milliards de paires de bases), nous avons décidé d'utiliser comme matrice le chromosome artificiel bactérien (BAC) RP11-357O7⁴, qui comporte un fragment du chromosome 17 humain couvrant la région des miR-132 et miR-212 (figure 3.13). Bien que la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 n'ait pas pu être amplifiée non plus par une polymérase possédant une activité de relecture (Phusion polymerase, Finnzyme) en utilisant cette matrice (et ce, malgré plusieurs tentatives d'optimisation et l'utilisation d'un tampon adapté aux séquences riches en GC), nous sommes parvenus à amplifier une région de taille attendue (2037 pb) en utilisant une polymérase classique (GoTaq DNA polymerase, Promega) (figure 3.14a). Une double restriction de cet amplicon nous a permis de confirmer qu'il s'agissait bien de la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 (figure 3.14b).

La région promotrice putative a ensuite été liguée dans le plasmide intermédiaire pSKoriTKan préalablement ouvert suite à une restriction par EcoRV (Matériel et méthodes, point V.2.e) et les produits de ligation ont été transformés en bactéries compétentes. Malgré que le plasmide pSKoriTKan dispose d'un système de criblage blanc/bleu permettant l'identification des clones transformés par un plasmide comportant un insert, des PCR ont été réalisées afin de valider la présence de la région promotrice putative (Matériel et méthodes, point V.2.g). La figure 3.15 illustre les résultats de ces PCR. Les cinq clones pour lesquels un produit de taille attendue a été obtenu ont été sélectionnés (clones 2, 6, 14, 15 et 19) et séquencés. Les résultats du séquençage des clones 2, 6 et 14 ainsi que l'alignement de ces séquences par rapport à la séquence de référence (reflNT 010718.16l) sont présentés en annexe 2 (le séquençage n'a pas pu être effectué pour les clones 15 et 19 malgré plusieurs tentatives, sans doute suite à la complexité de la séquence et ce, malgré le choix d'un protocole de séquençage adapté aux séquences difficiles). Chacun des clones séquencés comporte plusieurs mutations (4 à 6 selon les clones) dans la séquence du promoteur putatif des miR-132 et miR-212. Ces mutations étant situées au niveau de sites différents dans les trois clones séquencés, nous avons tout de

т

⁴ La librairie de BAC RP11 a été élaborée par l'équipe d'Osoegawa *et al.* au Roswell Park Cancer Institute à partir de l'ADN d'un homme sélectionné au hasard parmi 10 volontaires dont l'identité est inconnue suite à une procédure réalisée en double-aveugle (OSOEGAWA, K., MAMMOSER, A. G., WU, C., FRENGEN, E., ZENG, C., CATANESE, J. J. & DE JONG, P. J. 2001. A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome Res*, 11, 483-96.).

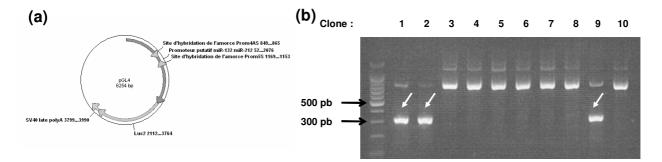


Figure 3.16: Identification par PCR sur colonies des clones transformés par un plasmide pGL4.10[luc2] contenant la région promotrice putative des miR-132 et miR-212. (a) Représentation des sites d'hybridation des amorces utilisées pour cette PCR. (b) Résultats des PCR. Des produits de 321 pb sont attendus pour les clones comportant la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 (les autres produits résultent d'amplifications aspécifiques). Dix PCR sur colonies ont été effectuées par mélange de ligation du plasmide rapporteur et de la région promotrice putative. La figure cidessus représente donc les résultats de PCR sur colonies, réalisées à partir des clones bactériens transformés par les mélanges de ligation obtenus suite à l'excision de la région promotrice putative du pSKoriTKan d'un seul des trois clones sélectionnés précédemment (clones 2, 6 et 14 de la figure précédente) et sa ligation dans le plasmide pGL4.10. En tout, 30 PCR sur colonies ont donc été effectuées afin de sélectionner une construction contenant la région promotrice putative des 3 clones séquencés.

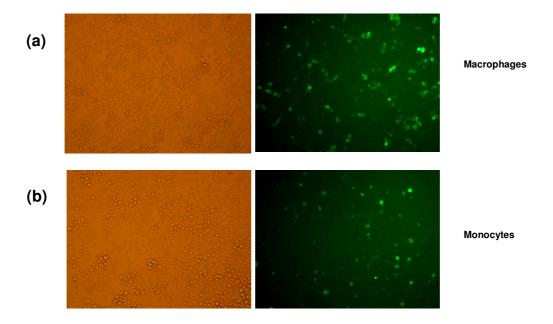


Figure 3.17 : Evaluation de l'efficacité de la nucléofection de plasmides dans des cellules THP-1. Deux nucléofections de 1.10⁶ cellules ont été effectuées en présence de 0,075 μg de plasmide pSV40RL et de 0,325 μg de plasmide pEGFP. Deux heures après la nucléofection, le milieu des cellules a été remplacé et les cellules issues d'une des deux nucléofections ont été différenciées par l'ajout de PMA (a) ou laissées sans traitement (b). L'efficacité de transfection a été évaluée 24h après la nucléofection suite à une observation des cellules nucléofectées en microscopie à fond clair et en microscopie à fluorescence.

même poursuivi les constructions à partir de ces trois clones, avec l'intention d'évaluer leur inductibilité par le LPS.

Les régions promotrices putatives ont été excisées du pSKOriTKan à l'aide des enzymes BglII et HindIII et clonées dans le plasmide rapporteur pGL4.10 [luc2], lui-même préalablement restreint avec les mêmes enzymes. Les mélanges de ligation ont ensuite été transformés en bactéries compétentes. Le plasmide rapporteur ne disposant pas d'un système de criblage permettant la sélection des plasmides ayant intégré un insert, des PCR sur colonies (10 par mélange de ligation provenant d'un clone pSKoriTKan + région promotrice putative) ont été effectuées afin de sélectionner les clones transformés par le plasmide rapporteur contenant la région promotrice putative des miRNAs (figure 3.16). Les clones comportant la région promotrice putative insérée en amont du gène rapporteur ont ensuite été amplifiés et les plasmides extraits.

V.3. Transfection du plasmide rapporteur dans les cellules THP-1

V.3.a. Optimisation de la transfection plasmidique

Afin d'optimiser les conditions de transfection de plasmides dans les cellules THP-1, nous avons testé l'efficacité de 4 agents de transfection (Lipofectamine 2000, JetPEI Macrophages, Attractène, DEAE Dextran) (données non montrées). Seule la Lipofectamine 2000 nous a permis, dans certaines conditions, de transfecter un plasmide encodant la GFP. Les premiers essais de transfection de la construction contenant le promoteur putatif des miR-132 et miR-212 en amont du gène de la luciférase de Firefly ont donc été réalisés avec de la Lipofectamine 2000. Afin de pouvoir normaliser l'activité luciférase de Firefly, contrôlée par le promoteur putatif des miRNAs, au taux de transfection, nous avons co-transfecté un plasmide pSV40RL (encodant la luciférase de rénilla) (voir Matériel et méthodes, point V.3.c). Cependant, une variabilité très importante de l'activité luciférase de Firefly et de rénilla était observée entre les doubles, nous empêchant de mettre en évidence des différences d'activité du promoteur cloné résultant de la stimulation au LPS. Cette variabilité était probablement due à une très faible efficacité de transfection de la construction qui pourrait être lié au fait que la construction (6,25 kb) est plus grande que le plasmide pEGFP initialement utilisé pour évaluer l'efficacité de la transfection (4,7 kb). Nous avons donc opté pour une autre méthode de transfection, la nucléofection. Cette méthode nous a permis de transfecter un nombre satisfaisant de cellules (figure 3.17).

V.3.b. Nucléofection du plasmide rapporteur contenant la région promotrice putative des miR-132 et miR-212

Nous avons nucléofecté la construction rapportrice ainsi que le plasmide de normalisation dans des monocytes THP-1, les avons différenciés, mis au repos pendant 24h puis stimulés au LPS pendant 6h et 24h. Les résultats des mesures de l'activité luciférase de Firefly et de rénilla (ainsi que la représentation schématique de l'expérience) sont présentés à la figure 3.18a. Avant toute chose, il est important de remarquer que l'activité luciférase de rénilla démontre une forte variabilité entre des cellules qui, à priori, ont été transfectées avec une même efficacité. En effet, les cellules issues d'une seule nucléofection ont été réparties dans 4 puits pour l'étude des conditions contrôles et LPS après 6h ou 24h de stimulation. Si le

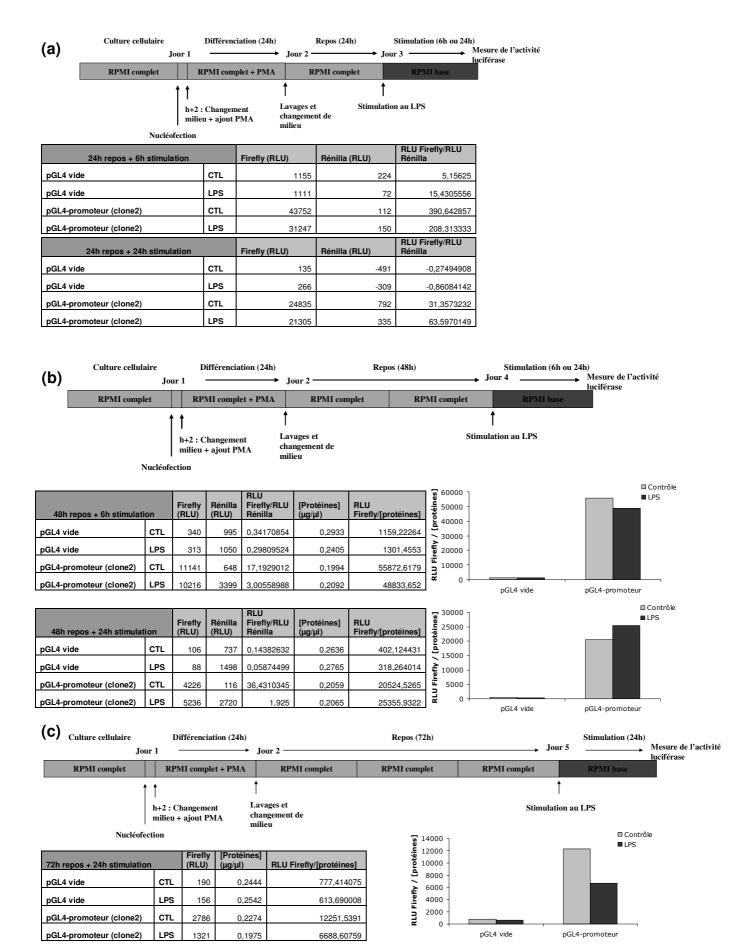


Figure 3.18 : Effet du LPS sur le plasmide rapporteur contenant le promoteur putatif des miR-132 et miR-212. Les mesures de l'activité luciférase de Firefly – sous le contrôle du promoteur putatif des miR-132 et -212 – et de rénilla – sous le contrôle du promoteur SV40 – ont été réalisées après 6h et 24h de stimulation au LPS dans des macrophages préalablement mis au repos pendant 24h (a), 48h (b) ou 72h (c). Les concentrations protéiques ont été déterminées par dosage de Pierce.

promoteur SV40 qui contrôle l'activité luciférase de rénilla était effectivement un promoteur constitutif dans les conditions étudiées, les activités luciférase de rénilla auraient dû être proches pour toutes les cellules transfectées par le pGL4-promoteur 1 (et pour toutes celles transfectées par le pGL4 « vide », c'est-à-dire ne contenant pas de promoteur pour contrôler l'expression de la luciférase de Firefly) de la figure 3.18a. Ce plasmide ne semble donc pas adapté pour la normalisation des résultats par rapport à l'efficacité de la transfection.

En analysant les valeurs non normalisées de l'activité luciférase de Firefly, on remarque que celles-ci sont supérieures dans les cellules transfectées par le plasmide encodant le promoteur putatif des miR-132 et miR-212 que dans les cellules transfectées par le plasmide rapporteur vide. Ceci suggère que le promoteur putatif cloné dans le plasmide rapporteur est actif. Toutefois, contrairement aux résultats attendus, l'activité de ce promoteur n'est pas supérieure dans les cellules stimulées au LPS par rapport aux cellules contrôles. En effet, les valeurs de l'activité luciférase de Firefly sont supérieures dans les cellules contrôles transfectées par la construction encodant le promoteur putatif par rapport aux cellules stimulées au LPS. Des résultats similaires ont été obtenus pour les deux autres clones séquencés (résultats non montrés). En émettant l'hypothèse que le processus de nucléofection pourrait activer des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle transcriptionnel des miR-132 et miR-212, nous avons décidé de répéter cette manipulation en laissant les cellules pendant 48h ou 72h au repos avant de les stimuler (figure 3.18b et c). En outre, étant donné que les mesures de l'activité luciférase de rénilla ne semblent pas adaptées à la normalisation de l'activité luciférase de Firefly (il a d'ailleurs été rapporté que les promoteurs viraux SV40 et CMV pouvaient être induits lors de la stimulation au LPS de macrophages transfectés de façon stable ou transitoire par des plasmides exprimant des gènes rapporteurs sous leur contrôle (Sweet and Hume, 1996)), nous avons utilisé les cellules provenant d'une même nucléofection pour tester les conditions LPS et contrôle après 6h et 24h de stimulation et avons dosé les contenus protéiques de façon à normaliser les résultats par la quantité de protéines. Les résultats présentés à la figure 3.18b montrent qu'après 6h de stimulation, l'activité du promoteur putatif est toujours plus élevée dans les cellules contrôles que dans les cellules stimulées au LPS. La tendance semble s'inverser après 24h de stimulation, cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits dans les cellules mises au repos pendant 72h.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'absence d'inductibilité du promoteur cloné par le LPS, notamment le clonage d'une région trop restreinte ou ne comportant pas les sites de liaison essentiels à l'induction de l'activité du promoteur des miRNAs ; le rôle potentiel de modifications de la structure de la chromatine dans l'expression des miR-132 et miR-212 ; ou encore l'influence de perturbations des voies de signalisation causées par les stress dus à la transfection du plasmide rapporteur. Chacune de ces hypothèses est discutée dans les paragraphes suivants.

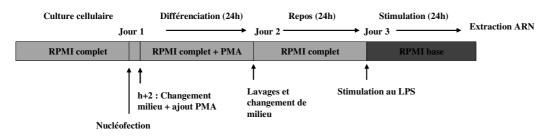
Premièrement, il est possible que le ou les site(s) essentiel(s) à l'induction de l'expression des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS soi(en)t situé(s) en amont ou en aval de la région promotrice putative clonée. Dans ce cas, la région clonée pourrait être suffisante pour permettre une activité transcriptionnelle basale, mais serait dépourvue des éléments nécessaires à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle en réponse au LPS. Lorsque la région située en amont des miR-132 et miR-212 est analysée à l'aide du logiciel Transfac en utilisant une matrice spécifique des cellules immunes, deux sites PU.1 (ce facteur de transcription appartient à la famille Ets) sont identifiés, dont l'un d'eux est situé en amont de la région clonée (voir annexe 1). Or, il a été rapporté que les sites de liaison de ce facteur de transcription étaient les sites les plus enrichis dans les éléments enhancer induits par le LPS

dans des macrophages murins, ce qui suggère que PU.1 pourrait marquer les éléments enhancer induits par le LPS (Ghisletti et al., 2010). D'autre part, de nombreux sites de liaison putatifs pour différents facteurs de transcription (dont CREB, NF-κB et AP-1) sont situés en amont et en aval de la région clonée (voir annexe 1). L'équipe de Remenyi a mis en évidence il y a quelques mois que trois sites de liaison pour CREB, conservés chez l'homme et la souris, étaient importants pour la transcription des miR-132 et miR-212 dans les neurones corticaux murins stimulés par des neurotrophines (Remenyi et al., 2010). Or, l'un de ces trois sites est situé entre les pre-miR-212 et pre-miR-132 et n'a pas été cloné dans la construction rapportrice élaborée au cours de ce mémoire (voir illustration en annexe 3). Malgré que ces auteurs n'aient pas réalisé de délétion de ce dernier site en particulier, il se pourrait que celuici, bien que situé en aval du site d'initiation de la transcription, soit d'une importance prépondérante dans l'expression des miR-132 et miR-212. La liaison de CREB à ce site (ainsi qu'aux deux autres mentionnés précédemment) a d'ailleurs été confirmée par empreinte de digestion à la DNase I dans des neurones corticaux de rats (Vo et al., 2005). Par ailleurs, toute une série de sites de liaison putatifs pour différents facteurs de transcription (Sp1 (specificity protein 1), Kid3, ETF (EGFR-specific transcription factor), CREB, REST (RE1 silencing transcription factor)) situés entre les pre-miR-132 et pre-miR-212 présentent un ordre conservé chez l'homme et la souris. Ceci suggère que ces sites pourraient également jouer un rôle dans le contrôle transcriptionnel des miR-132 et miR-212.

Deuxièmement, dans une même optique mais en suivant un raisonnement inverse, il se pourrait que des sites de répression de la transcription, importants pour ne garantir qu'une faible expression en condition contrôle, n'aient pas été clonés. Il est à ce sujet particulièrement intéressant de signaler qu'un site de liaison pour le répresseur transcriptionnel REST est présent entre les séquences des pre-miR-212 et pre-miR-132 et extrêmement bien conservé chez l'homme et la souris (voir illustration en annexe 3). Ce répresseur transcriptionnel, qui réprime l'expression des gènes neuronaux dans les cellules non-neuronales, interagit avec des co-répresseurs recrutant eux-mêmes des histones désacétylases responsables de la répression de l'expression des gènes cibles. Or, il a été démontré par des analyses d'occupation de la chromatine à grande échelle (SACO) que des répresseurs REST occupaient le site de liaison situé en amont du pre-miR-132 dans des cellules non-neuronales murines (Conaco et al., 2006). Il se pourrait donc, bien que ceci nécessiterait de confirmer la présence de REST sur son site de liaison dans les cellules THP-1, que ce répresseur soit impliqué dans la faible expression des miR-132 et miR-212 en condition basale.

Troisièmement, l'état de condensation de la chromatine pourrait exercer un rôle majeur dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. En effet, la chromatine agit en tant que répresseur transcriptionnel en bloquant l'accès des différents composants de la machinerie transcriptionnelle au promoteur. Dans certaines conditions, des facteurs de transcription et les co-activateurs qui leur sont associés induisent des modifications de la structure de la chromatine permettant l'accessibilité des régions promotrices et des sites d'initiation de la transcription (Skoog et al., 2006). L'ADN plasmidique étant dépourvu d'histones, l'environnement et l'accessibilité du promoteur cloné et du promoteur endogène sont totalement différents. Il se pourrait donc que la stimulation au LPS induise l'expression des miR-132 et miR-212 principalement en modifiant l'état de condensation de la chromatine; ceci pourrait expliquer qu'on ne perçoive pas de différences en analysant l'expression d'un promoteur putatif cloné dans un plasmide.





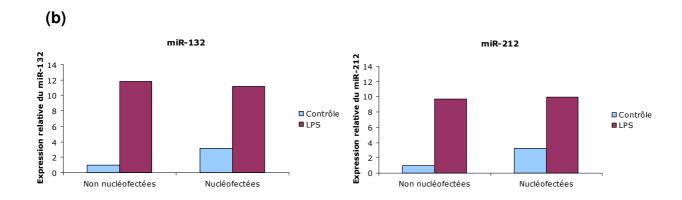


Figure 3.19 : Les miR-132 et miR-212 sont induits dans les macrophages THP-1 nucléofectés et stimulés au LPS. (a) Illustration de la chronologie de la manipulation. Deux heures après leur nucléofection, les monocytes ont été changés de milieu et différenciés par l'ajout de PMA. 24h après l'ajout de PMA, les macrophages ont été mis au repos pendant 24h, avant d'être stimulés avec 1 μg/ml de LPS ou incubés dans du RPMI base (« contrôle ») pendant encore 24h. (b) L'abondance des miRNAs (normalisée par celle du RNU-44) est exprimée de façon relative aux cellules non nucléofectées contrôles. Ces données représentent la moyenne de deux mesures par PCR en temps réel réalisées sur une seule série d'échantillons biologiques.

Quatrièmement, il se pourrait que les stress induits par la nucléofection activent des facteurs de transcription régulant l'expression des miR-132 et miR-212, ou inversement, que les stress causés répriment les voies de signalisation induites par le LPS et menant à l'induction de ces miRNAs. Afin de déterminer si les stress induits par la nucléofection pouvaient être responsables d'une activité élevée du promoteur putatif dans les cellules contrôles ou d'une perturbation de la réponse cellulaire au LPS, nous avons quantifié par PCR en temps réel l'expression des miR-132 et miR-212 dans des cellules nucléofectées puis stimulées au LPS. Comme l'illustre la figure 3.19, l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS est maintenue après que les cellules aient été nucléofectées. Néanmoins, ces miRNAs sont également surexprimés dans les cellules contrôles nucléofectées par rapport aux cellules non nucléofectées, ce qui suggère que le processus de transfection pourrait activer des facteurs de transcription jouant un rôle dans leur expression. On pourrait donc émettre l'hypothèse que l'absence de différence d'activité luciférase entre les cellules contrôles et stimulées au LPS transfectées par la construction rapportrice soit liée (i) à l'activation de facteurs de transcription régulant l'expression des miR-132 et miR-212, suite aux stress engendrés par la nucléofection et (ii) à l'absence d'une conformation nucléosomale de la région promotrice putative clonée dans le plasmide rapporteur, qui pourrait dans le contexte endogène réprimer la transcription de ces miRNAs en absence de stimulation.

VI. Etude de l'expression de deux cibles du miR-132 : SirT1 et p300

Si le contrôle transcriptionnel des miR-132 et miR-212 reste encore peu connu (en dehors de cette étude, ce sujet n'a été approché que par deux équipes et uniquement dans le contexte neuronal (Remenyi et al., 2010, Vo et al., 2005)), en revanche, plusieurs cibles de ces miRNAs ont été identifiées (voir Introduction, point II et tables 1.2 et 1.3) et proposent un aperçu des réponses biologiques dans lesquelles ces miRNAs pourraient être impliqués. Au cours de ce mémoire, nous avons considéré deux cibles du miR-132, SirT1 et p300, comme étant susceptibles de réguler la réponse des monocytes et macrophages au LPS. En effet, l'activité de ces protéines étant étroitement liée à celle de facteurs de transcription régulant l'expression de gènes pro-inflammatoires, SirT1 et p300 constituent deux cibles intéressantes à étudier dans le contexte d'une stimulation au LPS de cellules monocytaires.

VI.1. Etude de l'abondance de SirT1

D'une part, il a été rapporté que le miR-132 réprimait l'expression de SirT1 dans les préadipocytes humains et qu'une diminution de l'expression de cette protéine était corrélée à l'activation du facteur de transcription NF-κB et la transcription de gènes pro-inflammatoires. Ceci suggère l'existence d'un lien entre l'expression du miR-132, celle de la protéine SirT1 et l'inflammation (Strum et al., 2009). D'autre part, il a été rapporté par une autre équipe qu'à la fois l'abondance de l'ARNm, l'abondance protéique ainsi que l'activité de SirT1 étaient réprimées dans des macrophages de rats et de souris stimulés pendant 24h avec du LPS (100 ng/μl). De plus, les auteurs ont montré que ces observations étaient corrélées à une diminution de l'acétylation de p65 et de l'activité transcriptionnelle de NF-κB. Cependant, ils n'ont pas mis en évidence les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces observations (Shen et al., 2009). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'induction du miR-132 pourrait contribuer à la répression de SirT1 observée dans les macrophages stimulés au LPS.

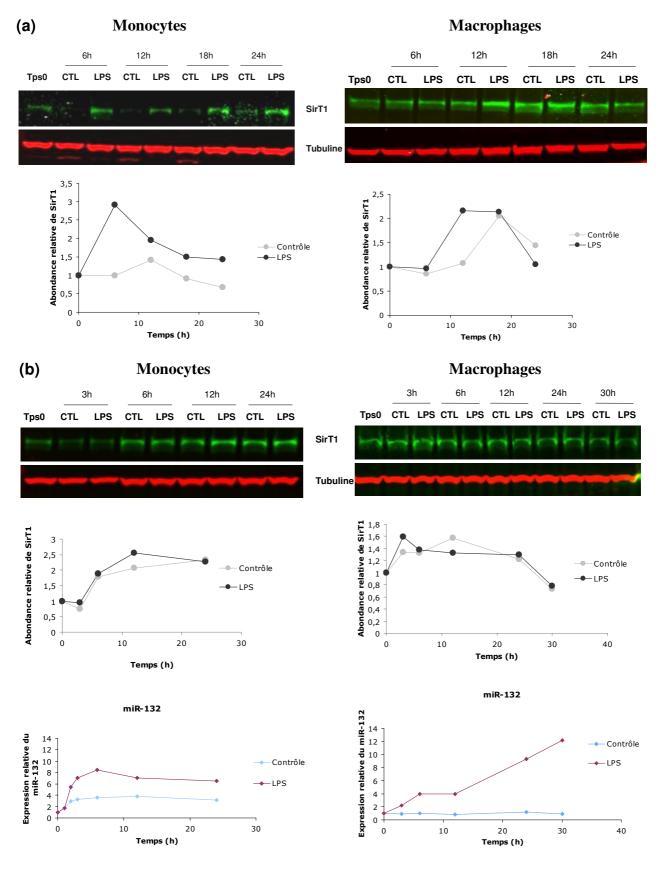


Figure 3.20 : Abondance de la protéine SirT1 dans les monocytes et macrophages stimulés au LPS. Des monocytes et macrophages ont été stimulés avec 1 μ g/ml de LPS ou incubés dans du milieu base durant les temps indiqués avant que les protéines ne soient extraites et l'abondance de SirT1 déterminée par Western Blot (15 μ g de protéines ont été engagées lors de la manipulation (a) en monocytes et 40 μ g lors de la manipulation (a) en macrophages, et 25 μ g lors de la manipulation (b)). Les graphes situés en dessous des Western Blots représentent la quantification de l'abondance relative de SirT1 normalisée à celle de l' α -tubuline (utilisée comme contrôle de charge) et exprimée par rapport au temps 0 (cellules dans du milieu complet). Les graphes intitulés « miR-132 » représentent l'expression de ce miRNA dans des boîtes sœurs de celles utilisées pour les extractions protéiques. Les figures (a) et (b) représentent deux manipulations indépendantes.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord voulu examiner le profil d'expression de SirT1 en réponse au LPS, de façon à déterminer s'il était susceptible d'être contrôlé par le miR-132. Le cas échéant, nous envisagions d'ensuite interférer avec l'abondance du miR-132 pour déterminer si cela affectait l'expression de SirT1. Etant donné que le miR-132 est induit dans les cellules stimulées au LPS, nous nous attendions, dans le cas où cette hypothèse serait correcte, à observer une diminution de l'abondance protéique de SirT1 dans ces cellules par rapport aux cellules non stimulées. Cependant, la figure 3.20a montre que l'abondance de SirT1 est dans la plupart des cas supérieure dans les cellules stimulées au LPS que dans les cellules contrôles. A partir des résultats obtenus lors de ces premières manipulations, nous avions émis l'hypothèse (voir document sur l'état d'avancement du mémoire présenté en juin 2010) que le contexte pro-inflammatoire pourrait induire rapidement l'expression de SirT1, qui serait ensuite réprimée par l'induction du miR-132. Cette hypothèse permettait d'expliquer le profil de décroissance de l'abondance de SirT1 dans les monocytes ainsi que le fait que l'abondance de SirT1 soit plus faible dans les macrophages stimulés au LPS que dans les macrophages contrôles après 24h de stimulation. Nous avons donc voulu reproduire ces résultats en veillant à établir en parallèle, dans des boîtes de culture sœurs, le profil d'expression du miR-132 en réponse au LPS (figure 3.20b). Néanmoins, nous avons observé au cours de ce réplicat des profils d'abondance de SirT1 très similaires dans les cellules contrôles et stimulées au LPS, caractérisés par une augmentation de l'abondance de SirT1 à la fois dans les cellules contrôles et stimulées par rapport au temps 0. Ceci suggère que la privation en sérum pourrait être responsable de l'augmentation de l'abondance relative de SirT1. Plusieurs données de la littérature supportent cette hypothèse; il a en effet été démontré que la privation en sérum de cellules de rats et de plusieurs lignées cellulaires humaines induisait une augmentation de l'expression de l'ARNm et de l'abondance protéique de SirT1 (Shang et al., 2009, Nemoto et al., 2004). Il est toutefois important de noter que la mise en évidence de SirT1 en tant que cible du miR-132 a été réalisée dans des pré-adipocytes et adipocytes humains privés en sérum, dans lesquels les auteurs ont observé une diminution de l'abondance de SirT1 liée à la surexpression du miR-132 dans ces conditions (Strum et al., 2009).

La figure 3.20b montre que l'abondance de SirT1, même lors des plus longs temps de stimulation, n'est pas diminuée dans les cellules stimulées au LPS par rapport aux cellules contrôles et ce, malgré l'induction importante du miR-132 dans des cellules stimulées en parallèle. Il ne semble donc pas que le miR-132 réprime l'expression de SirT1 dans les monocytes et macrophages THP-1 stimulés au LPS. Cette observation implique qu'un même miRNA pourrait réprimer l'expression d'une cible dans certains types cellulaires en particulier, et pas dans d'autres, malgré qu'ils expriment la protéine cible. L'équipe de Wibrand a d'ailleurs rapporté qu'aucune modification de l'abondance des protéines MeCP2 et p250 GAP (deux cibles rapportées du miR-132) n'était observée durant la potentialisation à long terme du dentus gyratus, alors même que le miR-132 est induit de façon significative dans ces conditions (voir Introduction, point II.2.b) (Wibrand et al., 2010). L'impact de l'expression des miRNAs sur le protéome dépendrait donc des types cellulaires et des conditions de stimulation.

VI.2. Etude de l'abondance de p300

Il a été démontré dans des cellules endothéliales lymphatiques primaires humaines que le miR-132 (dont l'expression est induite suite à l'infection de ces cellules par le virus KSHV) réprimait l'expression de p300 et que la répression de p300 (par transfection de siRNA)

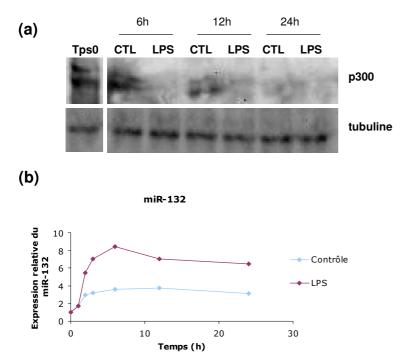


Figure 3.21 : Abondance de la protéine p300 dans les monocytes stimulés au LPS. (a) Des monocytes ont été stimulés avec $1 \mu g/ml$ de LPS ou incubés dans du milieu base durant les temps indiqués avant que les protéines ne soient extraites et l'abondance de p300 déterminée par Western Blot. En raison d'une tâche sur la membrane, les pistes correspondant aux conditions 3h contrôle et 3h LPS ont été découpées. (b) L'abondance du miR-132 (normalisée par celle du RNU-44) est exprimée de façon relative au temps 0. Ces données représentent la moyenne de deux mesures par PCR en temps réel, réalisées sur une seule série d'échantillons biologiques provenant de boîtes de culture sœurs de celles utilisées pour les extractions protéiques.

induisait une diminution de l'expression du miR-132. Ces observations suggèrent l'existence d'une boucle de rétro-action entre le miR-132 et le co-activateur transcriptionnel p300, qui pourrait expliquer la nature transitoire de l'induction du miR-132 dans les LEC infectées par le KSHV (Lagos et al., 2010). Etant donné que la cinétique d'induction du miR-132 dans cette étude est similaire à celle observée dans les monocytes THP-1 stimulés au LPS (on observe dans les deux cas un pic d'induction du miR-132 après 6h de stimulation, suivi d'une très légère diminution de son abondance lors des temps plus longs), nous avons émis l'hypothèse qu'une telle boucle de régulation pourrait expliquer le profil d'expression du miR-132 dans les cellules THP-1. Cette cible est d'autant plus intéressante à étudier dans le contexte proinflammatoire de stimulation au LPS des cellules THP-1 qu'elle interagit avec de nombreuses sous-unités de facteurs de transcription orchestrant les réponses inflammatoires (dont NF-κB, AP-1 et CREB) (Vo and Goodman, 2001).

Afin de déterminer si le miR-132 réprime l'expression de p300 dans les cellules THP-1, nous avons étudié son abondance dans des cellules stimulées ou non au LPS. La figure 3.21 illustre les résultats obtenus à partir d'extraits protéiques totaux de monocytes. Bien que la détection par Western Blot de p300 soit de mauvaise qualité (plusieurs optimisations relatives au type d'extraction protéique, aux conditions de transfert et de marquage ne nous ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats) et qu'il serait nécessaire d'améliorer la détection de cette protéine, il est possible de deviner une abondance réduite de p300 dans les cellules stimulées au LPS par rapport aux cellules contrôles. De plus, l'abondance de p300 semble également réduite dans les cellules privées en sérum par rapport aux cellules placées dans du milieu complet. Ces observations, qui nécessitent d'être confirmées dans d'autres réplicats, nous laissent spéculer que le miR-132 pourrait réprimer le co-activateur transcriptionnel p300 dans les monocytes THP-1 stimulés au LPS et dans une moindre mesure, dans les monocytes privés en sérum. Si la corrélation inverse entre l'abondance du miR-132 et celle de p300 était confirmée, il serait intéressant de modifier l'abondance du miR-132 (par transfection d' « anti-miR » ou de « mimics ») et d'analyser les effets de ces modifications sur l'abondance de p300 (ainsi que sur l'activité d'un rapporteur luciférase couplé à la 3'UTR de cette protéine) de façon à valider cette hypothèse.

Conclusions et perspectives

Au cours de ce mémoire, nous avons démontré que les miR-132 et miR-212 étaient tous deux induits lors de la stimulation au LPS de monocytes et de macrophages de la lignée humaine THP-1 ainsi que, dans une moindre mesure, lors de la privation en sérum de monocytes. L'étude des cinétiques d'induction des miR-132 et miR-212 dans les monocytes et macrophages nous a amené à émettre l'hypothèse que ces deux miRNAs pourraient être transcrits de façon polycistronique. En effet, les courbes d'expression de ces deux miRNAs présentent des profils très similaires. Après avoir démontré pour la première fois l'existence d'une forme primaire commune aux miR-132 et miR-212 humains, nous avons caractérisé son expression dans les cellules stimulées au LPS. Ces études ont montré que l'induction du primiR-132/212 en réponse au LPS est maximale après 3h de stimulation dans les monocytes et macrophages et diminue ensuite fortement après 6h de stimulation. Cependant, alors que l'expression du pri-miR-132/212 retourne à un niveau quasiment basal au-delà de 6h de stimulation dans les monocytes, elle reste relativement élevée dans les macrophages jusqu'à plus de 30h de stimulation. Ceci pourrait expliquer l'induction continue des formes matures au-delà de 30h de stimulation dans ces cellules.

L'étude de l'expression du pri-miR-132/212 en présence d'un inhibiteur de la transcription nous a permis de démontrer que des mécanismes transcriptionnels étaient responsables de l'induction de l'expression des miR-132 et miR-212 en réponse à une stimulation au LPS des cellules THP-1. Afin d'identifier des facteurs de transcription responsables de cette réponse, nous avons réalisé une étude bioinformatique de la région génomique située à proximité des miR-132 et miR-212. Cette analyse nous a permis d'identifier des sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription connus pour être impliqués dans la transcription de gènes en réponse à des stimuli pro-inflammatoires, comme AP-1, NF-kB et CREB. Etant donné qu'Aurélie Tacheny (thèse en cours en URBC, FUNDP) a montré que l'activité de liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription était augmentée dans les cellules THP-1 stimulées au LPS, nous avons voulu tester le rôle potentiel de ces trois candidats dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS.

Afin d'étudier le rôle d'AP-1 dans la transcription des miRNAs, nous avons utilisé un inhibiteur de JNK, le SP 600125. Cependant, les effets aspécifiques de cet inhibiteur et plus particulièrement son effet possible sur la phosphorylation de CREB ne nous permettent pas de tirer de conclusions quant à l'éventuelle importance d'AP-1 dans l'expression des miR-132 et miR-212. L'utilisation de siRNA est généralement indiquée pour réprimer de façon plus spécifique l'expression d'une cible particulière et pourrait donc se révéler plus judicieuse que l'utilisation d'un inhibiteur chimique. Cependant, étant donné que la famille AP-1 comporte de nombreux membres, cette approche nécessiterait probablement la transfection simultanée de multiples siRNA contre différents membres pour être efficace. Une telle approche a notamment été suivie par l'équipe de Ma, qui a co-transfecté des siRNA contre c-Fos et c-Jun dans des cellules THP-1 de façon à mettre en évidence le rôle d'AP-1 dans la transcription du gène de l'IL-12p40 en réponse au LPS (Ma et al., 2004). Nakayama et son équipe ont également, bien que dans un autre contexte réalisé des doubles répressions de membres de la famille AP-1 (Nakayama et al., 2008). Une alternative à la transfection de siRNA consisterait en la transfection de plasmides encodant des dominants négatifs d'AP-1. Des auteurs ont notamment rapporté l'utilisation de dominants négatifs de c-Jun (Tam-67, qui ne comporte pas le domaine majeur de transactivation de c-Jun) et de c-Fos (A-Fos, dont le site de liaison à l'ADN a été modifié de façon à se complexer de façon stable avec c-Jun et à en empêcher la liaison à l'ADN) dans le but de démontrer l'importance d'AP-1 dans la transcription de gènes d'intérêt (Irarrazabal et al., 2008, Olive et al., 1997). Etant donné que la nucléofection des cellules THP-1 ne semble pas affecter l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS

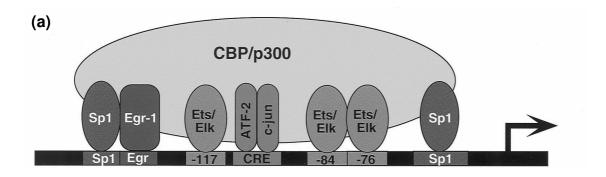
(contrairement à l'utilisation de Lipofectamine 2000), il serait intéressant de tester l'une de ces approches (siRNA ou dominants négatifs) en nucléofectant les cellules afin de vérifier si AP-1 semble réguler l'expression des miR-132 et miR-212.

Dans le but d'étudier les rôles potentiels de NF-κB et CREB dans l'induction des miR-132 et miR-212, nous avons transfecté des macrophages THP-1 avec des siRNA spécifiques de p65 et de CREB à l'aide de Lipofectamine 2000. Cependant, l'analyse de l'expression de ces miRNAs nous a montré que l'incubation des cellules en présence de cet agent de transfection seul perturbait leur expression. Il serait donc intéressant de reproduire ces manipulations en nucléofectant les cellules, étant donné que les résultats présentés à la figure 3.19 montrent que cette technique de transfection ne semble pas altérer l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. En outre, il serait judicieux, en plus de confirmer l'efficacité de la répression en analysant l'abondance totale de ces facteurs de transcription, d'étudier l'effet de ces répressions sur l'abondance des formes modifiées (phosphorylées/acétylées) et nucléaires de ces facteurs de transcription, sur leur activité de liaison à l'ADN ou encore sur leur capacité à transactiver un plasmide rapporteur. Bien que ces études ne reflètent pas toutes directement l'activité du facteur de transcription étudié, elles nous permettraient tout de même de mieux approcher l'effet de la transfection de siRNA sur l'activité du facteur de transcription ciblé que l'étude de sa forme totale.

Au cours des manipulations réalisées en présence d'inhibiteurs de MSK1, nous avons mis en évidence que le H-89 permettait de réprimer complètement la phosphorylation de CREB résultant de la stimulation au LPS des cellules THP-1 et inhibait fortement la transcription du pri-miR-132/212 dans ces cellules. Bien que les effets du Ro-31-8220 soient moins marqués et que cette manipulation nécessite d'être reproduite, ces résultats suggèrent que CREB, dont le rôle dans la transcription des miR-132 et miR-212 a été démontré dans le contexte neuronal chez la souris et le rat (Vo et al., 2005, Remenyi et al., 2010), serait également impliqué dans le contrôle de l'expression des miR-132 et miR-212 humains en réponse au LPS. Il est néanmoins important de garder à l'esprit d'une part que les inhibiteurs utilisés ne sont pas spécifiques de la kinase MSK1 et d'autre part que cette kinase active d'autres facteurs que CREB (dont p65) et qu'elle joue également un rôle dans le remodelage de la chromatine.

Au cours de ce mémoire, nous avons développé une seconde approche afin d'étudier les acteurs participant à la régulation de l'expression des miR-132 et miR-212. Nous avons construit un plasmide rapporteur contenant une région promotrice putative des miR-132 et miR-212. Cependant, la transfection de cette construction dans les cellules THP-1 ne nous a pas permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité du promoteur putatif cloné dans les cellules stimulées au LPS par rapport aux cellules contrôles. Bien que plusieurs hypothèses puissent expliquer l'absence d'induction de l'activité du gène rapporteur dans les cellules stimulées au LPS (voir Résultats et discussion, point V.3.b), il serait intéressant de cloner dans le plasmide rapporteur une région élargie du promoteur putatif choisi au cours de cette étude, englobant la région située entre les pre-miR-212 et pre-miR-132. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, toute une série de sites de liaison putatifs pour différents régulateurs transcriptionnels (Sp1, Kid3, ETF, CREB, REST) situés entre les premiR-132 et pre-miR-212 présentent un ordre conservé chez l'homme et la souris. L'équipe de Remenyi, qui a étudié le rôle de CREB dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse aux neurotrophines dans des neurones corticaux murins, a mis en évidence l'importance de trois sites CREB dans l'expression de ces miRNAs, dont l'un d'eux est situé entre les premiR-132 et pre-miR-212 (Remenyi et al., 2010). Bien que le rôle de ce site en particulier n'ait pas été démontré (les chercheurs ont uniquement démontré qu'il n'y avait plus d'induction des miR-132 et miR-212 en réponse aux neurotrophines lorsque les trois sites étaient mutés), il se pourrait qu'il soit important dans l'expression des miR-132 et miR-212 étant donné qu'il est lié par CREB dans les neurones corticaux de rats (Vo et al., 2005).

Par ailleurs, nous avons remarqué qu'un site de liaison putatif pour le répresseur REST était totalement conservé chez l'homme et la souris et situé entre les pre-miR-132 et pre-miR-212 (voir Annexe 3). Or, ce site, long de 19 pb, représente le plus long site conservé entre les premiR-132 et pre-miR-212 humains et murins, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle important. Le répresseur transcriptionnel REST réprime l'expression de gènes neuronaux dans les cellules non-neuronales par différents mécanismes. Il peut bloquer l'assemblage des facteurs de transcription au niveau du promoteur principal ou interagir avec des corépresseurs recrutant des histones désacétylases modifiant la structure de la chromatine au niveau de ses gènes cibles (Plaisance et al., 2005, Wu and Xie, 2006). Lors de la différenciation des cellules neuronales, ce répresseur est ubiquitinylé par l'E3 ubiquitine ligase $SCF^{\beta TRCP}$ et dégradé par protéolyse, ce qui permet l'expression de ses gènes cibles (Westbrook et al., 2008). Outre le fait qu'un site putatif de liaison pour REST soit conservé chez l'homme et la souris (nous n'avons comparé que ces deux organismes au cours de ce mémoire; cependant, des analyses bioinformatiques focalisées sur les sites de liaison du répresseur REST ont mis en évidence que ce site (situé à proximité du miR-132), était également conservé chez le rat et le chien (Wu and Xie, 2006)), d'autres arguments sont en faveur d'un rôle potentiel de ce répresseur transcriptionnel dans le contrôle de l'expression des miR-132 et miR-212. En effet, le site de liaison pour ce répresseur transcriptionnel a été expérimentalement validé dans des cellules non-neuronales murines (Conaco et al., 2006) et de nombreuses études concernant les miR-132 et miR-212 relèvent d'un contexte neuronal (voir Introduction, point II.2.b). Il pourrait donc se révéler utile de cloner dans une construction rapportrice le site de liaison pour ce répresseur transcriptionnel, afin de déterminer s'il est important pour ne garantir qu'une expression basale des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 non stimulées. Etant donné que REST réprime l'expression de ses gènes cibles notamment en modifiant la structure de la chromatine, l'utilisation d'un plasmide rapporteur classique transfecté de façon transitoire dans les cellules semble peu adaptée. En effet, l'utilisation d'un tel plasmide ne permettrait pas de mettre en évidence les effets de REST s'ils sont dépendants de modifications des histones. En revanche, il existe des plasmides épisomaux réplicatifs qui adoptent une structure nucléosomale se rapprochant de la structure de la chromatine in vivo. Ce type de plasmide a notamment été utilisé par des chercheurs ayant démontré que REST réprimait une de ses cibles en induisant la désacétylation des histones associées à sa séquence promotrice (Pinnoji et al., 2007). Une seconde démarche afin d'étudier le rôle potentiel de REST dans l'expression des miR-132 et miR-212 humains consisterait en la vérification de sa capacité à lier le site situé entre les premiR-132 et pre-miR-212 par immunoprécipitation de chromatine dans les cellules THP-1 stimulées ou non au LPS. Si la présence de ce répresseur était confirmée, on pourrait alors émettre l'hypothèse que REST soit impliqué dans la faible expression des miR-132 et miR-212 en condition basale. De nombreuses études portant sur le rôle répresseur de REST font appel à la transfection de plasmides exprimant REST ou des dominants négatifs de ce répresseur (Pinnoji et al., 2007, Plaisance et al., 2005, Lietz et al., 2003, Ogawa et al., 2002, Garcia-Sanchez et al., 2003). Il pourrait donc être intéressant d'appliquer cette troisième démarche dans les cellules THP-1 et d'analyser les effets de ces transfections soit sur l'expression des miR-132 et miR-212 endogènes, soit sur l'activité d'un plasmide rapporteur dans lequel serait clonée une version élargie de la région promotrice putative étudiée au cours de ce mémoire. Une autre approche couramment utilisée afin de mettre en évidence le rôle de REST dans la répression d'un gène cible potentiel consiste à traiter les cellules avec de la



| (b) | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|-------|--------|----------------------|--------------------------|
| matrix | position | core | matrix | sequence (always the | factor name |
| identifier | (strand) | score | score | (+)-strand is shown) | |
| HCCD1 OC | 4000 (.) | 1 000 | 1 000 | | CD1 |
| <u>V\$SP1_Q6</u> V\$SP1_04_01 | 4809 (+) 4809 (+) | 1.000 | 1.000 | ggggGCGGggcc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_Q4_U1 V\$SP1_Q2_01 | , | 1.000 | 1.000 | ggggGCGGggcc | SP1 SP1 |
| | , | | | gggGGCGGgg | |
| <u>V\$SP1_01</u> | 4811 (+) | 1.000 | 0.971 | ggGGCGGggc | SP1 |
| V\$SP1_Q6_01 | 4811 (+) | 1.000 | 1.000 | ggGGCGGggc | SP1 |
| V\$SP1_02 | 4811 (+) | 1.000 | 0.995 | gGGGCGgggcc | SP1 |
| V\$SP1_Q6 | 4832 (-) | 1.000 | 0.998 | cgccCCGCCcca | SP1 |
| V\$SP1_Q4_01 | 4832 (-) | 1.000 | 0.997 | cgccCCGCCcca | SP1 |
| <u>V\$SP1_02</u> | 4832 (-) | 1.000 | 0.999 | cgcccCGCCCc | SP1 |
| <u>V\$SP1_01</u> | 4833 (-) | 1.000 | 0.971 | gccCCGCCcc | SP1 |
| <u>V\$</u> SP1_Q6_01 | 4833 (-) | 1.000 | 1.000 | gccCCGCCcc | SP1 |
| <u>V\$SP1_Q2_01</u> | 4834 (+) | 1.000 | 1.000 | ccCCGCCccc | SP1 |
| <u>V\$<mark>EGR_</mark>Q6</u> | 4835 (-) | 1.000 | 0.995 | cccgCCCCac | Egr |
| V\$KROX_Q6 | 4835 (+) | 1.000 | 0.985 | cccgCCCCacgcc | KROX |
| <u>V\$EGR3_01</u> | 4838 (-) | 1.000 | 0.872 | gcccCCACGccc | Egr-3 |
| <u>V\$EGR2_01</u> | 4838 (-) | 1.000 | 0.867 | gccCCCACgccc | Egr-2 |
| <u>V\$CETS1P54_03</u> | 4849 (+) | 1.000 | 0.983 | cccgcCGGAAgtgccc | c-Ets-1 p54 |
| <u>V\$<mark>CETS1P54</mark>_01</u> | 4852 (+) | 1.000 | 0.995 | gCCGGAagtg | c-Ets-1(p54) |
| <u>V\$LEF1_Q2</u> | 4877 (-) | 1.000 | 1.000 | CTTTGa | LEF1 |
| V\$CREEP1CJUN_01 | 4880 (+) | 1.000 | 1.000 | tGACGTca | ATF2: <mark>c-Jun</mark> |
| V\$CREEP1CJUN_01 | 4880 (-) | 1.000 | 1.000 | tgACGTCa | ATF2: <mark>c-Jun</mark> |
| V\$CREBP1CJUN_01 | 4896 (+) | 1.000 | 1.000 | tGACGTca | ATF2:c-Jun |
| V\$CREBP1CJUN_01 | 4896 (-) | 1.000 | 1.000 | tgACGTCa | ATF2:c-Jun |
| V\$SP1_Q4_01 | 4928 (+) | 1.000 | 0.970 | gccgGGCGGggca | SP1 |
| V\$SP1_Q6_01 | 4930 (+) | 1.000 | 0.977 | egGGCGGgge | SP1 |

| AGCGGAGCTGTCCTCT | CAGGACCG <mark>GGGGGGCC</mark> T Sp1 | сссадатсс <mark>сдс<mark>сс</mark> Sp1</mark> | <mark>CGCCCCAC</mark> GCC <mark>C</mark> Egr | c-Ets-1 | CTCTGGGACATCT |
|----------------------------|---|--|---|-------------------|---------------------------|
| TTGACGTCACGGCCCTCATF2-cJun | C <mark>TGACGTCA</mark> GGGGCCGCGTGCCT ATF2-cJun | GGTCGCGAGCGCCC | GGGCGGGGCAGGG Sp1 | GCGGGAGACGCAGGGG | AGGCGGAGCAGCAG |
| startAGCCCCCAGCCGG | GGGCAGCCGGGGCGAC <mark>CGGGGC</mark> | ACCCCGCCCGGACA | GCGCGCCGGCACC | CTTGGCTCTAGACTGCT | TACTGCCCGGGCCGC |
| CCTCAGTAACAGTCTCC | CAGTCACGGCCACCGACGCCTGG | CCCCGCCCCAGGAC | CGCGGCCCCGGC | CGCCGCCGCCGCCCC | GGGGACCCCCAGTCC |
| CCGTCCCTCAGGGCCC | CGCCCCGGCCCGCTGCCTGCG | CCG <mark>CCGCTGTCC GC</mark> RES T | | CGCAGGCGCCGCCATCG | GGCCGCCCGTCCG |
| GGTCCCTAGGGGCTGC | CGAGGGGCGGTGGCCCACGCGCC | GCTCCTCAGCCCCCG | CCGCCCCGCCCG | | ACGTCAGCCCGCCC F2-cJun |

TGGTCGCCCGCAGCACGCCCACGCGC

Figure 4.1 : Modèle préposé de formation d'un complexe enhancer. (a) Modélisation du complexe enhancer assurant l'induction de l'expression du TNF-α dans les macrophages murins et humains stimulés au LPS (Tsai, Falvo et al. 2000). (b) Détection et localisation de sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription identiques dans la région promotrice putative des miR-132 et miR-212. Cette figure illustre une partie des sites de liaison putatifs identifiés lors de l'analyse bioinformatique de la région génomique encodant les miR-132 et miR-212 à l'aide du logiciel Transfac (matrice cellules immunes ; option minimisant les faux positifs ; les résultats complets de cette analyse sont présentés en annexe 1) ainsi que leur emplacement sur la séquence génomique encodant les pre-miR-212 (séquence surlignée en gris foncé du dessus - amont) et pre-miR-132 (séquence surlignée en gris foncé en dessous - aval). Le sigle « start » en bleu indique un site d'initiation de la transcription identifié par l'équipe de Wang (Wang, Wang et al. 2010) tandis que la flèche orange indique l'extrémité avale de la région promotrice putative clonée dans un plasmide rapporteur au cours de ce mémoire. Les sites de liaison putatifs pour ATF2-cJun correspondent aux sites CRE conservés chez l'homme et la souris. Le site de liaison putatif pour REST, également conservé chez l'homme et la souris, est aussi indiqué.

trichostatine A, un inhibiteur d'histones désacétylases de type I et II. Dans ce cas également l'effet de cet inhibiteur pourrait être analysé soit sur l'expression des miRNAs, soit sur l'activité d'une région promotrice clonée dans un vecteur épisomal, comme cela a été rapporté par l'équipe de Pinnoji (Pinnoji et al., 2007).

Outre les facteurs de transcription AP-1, NF-κB et CREB sur lesquels nous nous sommes concentrés au cours de ce mémoire, d'autres facteurs de transcription pourraient participer à l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. Nous discuterons au cours des trois paragraphes suivants le rôle de certains facteurs de transcription candidats qu'il pourrait être intéressant d'investiguer au cours de futures recherches.

De nombreux sites de liaisons putatifs pour le facteur de transcription ETF sont détectés dans la région génomique située à proximité des miR-132 et miR-212. Lors de l'analyse bioinformatique réalisée à l'aide du logiciel Transfac décrite précédemment (Résultats et discussion, point IV.1) et dont les résultats sont présentés en annexe 1 (analyse réalisée avec la matrice « vertébrés minimisant les faux positifs »), 15 sites putatifs pour ETF ont été identifiés, dont 6 sont intégrés dans la construction réalisée au cours de ce mémoire, 4 se trouvent en amont de la région clonée et 5 en aval, entre les pre-miR-132 et pre-miR-212. Ce facteur de transcription pourrait être important dans l'expression des miR-132 et miR-212 dans la mesure où il est connu pour activer des promoteurs riches en GC (Kageyama et al., 1989). Or, les miR-132 et miR-212 se trouvent sous le contrôle de ce type de promoteur.

Le rôle putatif du facteur de transcription Sp1 dans la transcription des miR-132 et miR-212 pourrait également être étudié. En effet, les résultats des analyses bioinformatiques illustrés en annexe 1 montrent la présence de nombreux sites putatifs pour le facteur de transcription Sp1 (7 lorsque la matrice « vertébrés non redondants » est sélectionnée et 46 sur les 156 sites identifiés lorsqu'on sélectionne la matrice « cellules immunes »). Or, il a été démontré que Sp1 jouait un rôle clé dans la transcription des gènes cibles de REST dans les cellules dans lesquelles REST est absent (Plaisance et al., 2005). Par ailleurs, bien que la présence de nombreux sites de liaison pour Sp1 constitue une caractéristique générale des promoteurs riches en GC, il a été rapporté dans une étude de protéomique quantitative que l'abondance nucléaire de Sp1 était augmentée de 1,5 fois dans des macrophages murins stimulés au LPS (Du et al., 2010). De plus, Sp1 participe à l'induction du gène encodant le TNF-α en réponse au LPS (Tsai et al., 2000). En effet, des chercheurs ont mis en évidence qu'un complexe enhancer composé des facteurs Sp1, Egr-1 (early growth response factor-1), Ets/Elk, ATF2-c-Jun et CBP/p300 (ce complexe enhancer est représenté à la figure 4.1a ci-contre) contrôlait l'induction du TNF-α en réponse à une stimulation au LPS de macrophages murins et humains. Sp1 est généralement considéré comme un facteur de transcription constitutif; cependant, ces chercheurs ont mis en évidence que la transcription du gène encodant le TNFα lors d'une stimulation au LPS impliquait une liaison inductible du facteur de transcription Sp1 au promoteur de ce gène. Selon les auteurs, cette liaison inductible pourrait être permise suite à des modifications post-traductionnelles de Sp1 ou suite à des modifications de l'accessibilité de ces sites résultant d'un remodelage de la chromatine.

Par ailleurs, il est particulièrement intéressant de remarquer que les sites de liaison des facteurs contribuant à la formation de l'élément enhancer décrit ci-dessus sont également présents, bien que dans une configuration légèrement différente, en amont du pre-miR-212 et d'un des sites putatifs d'initiation de la transcription identifié au cours d'une analyse bioinformatique (figure 4.1b). Les différents facteurs de transcription formant ce complexe enhancer semblent donc être des candidats assez pertinents à étudier dans le cadre de

l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS. Il a d'ailleurs été démontré que la stimulation au LPS de monocytes THP-1 (ainsi que de monocytes primaires) induisait une augmentation de l'expression de Egr-1, lequel induirait ensuite l'expression du TNF-α et du TF (tissue factor) (Guha et al., 2001, Groupp and Donovan-Peluso, 1996). L'induction de ce facteur de transcription dans les cellules stimulées au LPS dépend de l'activation du facteur Elk-1, qui est phosphorylé en aval de la voie MEK-ERK1/2 après seulement 15 min de stimulation. Il est intéressant de noter que l'abondance protéique du facteur Egr-1 est maximale après 2h de stimulation au LPS, diminue après 4h de stimulation pour ensuite retourner à un niveau basal lors des plus long temps de stimulation (Guha et al., 2001). La cinétique d'expression de ce facteur de transcription est donc compatible avec un rôle putatif de celui-ci dans l'induction du pri-miR-132/212. Par ailleurs, au cours de leur étude dans des neurones corticaux murins, l'équipe de Remenyi a mis en évidence qu'un inhibiteur de MEK inhibait complètement l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse aux neurotrophines, alors qu'une induction résiduelle de ces miRNAs était observée dans des cellules dépourvues de MSK1/2 (Remenyi et al., 2010). Ceci suggère que les kinases ERK1/2 réguleraient l'expression des miR-132 et miR-212 via un mécanisme indépendant de l'activation de MSK1/2 et de la phosphorylation de CREB. Si l'incubation de cellules THP-1 avec un inhibiteur de MEK inhibait également l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS, on pourrait spéculer que l'expression de ces miRNAs soit en partie dépendante de l'induction du facteur Egr-1 dans les cellules stimulées au LPS. D'autre part, les protéines de la famille Ets (dont font partie entre autres Ets-1, Ets-2, Elk et PU.1) sont connues pour réguler l'expression des gènes inflammatoires (Chung et al., 2005, Sweet and Hume, 1996). L'étude de leur rôle potentiel (plus particulièrement celui de Ets-1 étant donné la présence d'un site de liaison putatif en amont du pre-miR-212) dans l'induction des miR-132 et miR-212 en réponse au LPS pourrait donc être justifiée. Par ailleurs, il est assez surprenant de remarquer que les deux sites de liaison pour les dimères ATF2-c-Jun situés en amont du premiR-212 et illustrés à la figure 4.1b correspondent aux deux des trois sites CRE identifiés par l'équipe de Remenyi (voir l'alignement des séquences humaines et murines en annexe 3) et particulièrement importants pour l'expression des miR-132 et miR-212 murins (Remenyi et al., 2010). Au vu (i) des similitudes de la région enhancer du TNF-α et de la séquence située en amont du pre-miR-212 et (ii) des données de la littérature concernant les facteurs formant ce complexe enhancer, il serait intéressant de vérifier s'ils lient leurs sites putatifs prédits dans la région promotrice des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. En outre, étant donné que la région enhancer précédemment décrite suffit à l'induction maximale de l'expression du TNF-α en réponse au LPS, il serait intéressant de vérifier si la région similaire détectée dans le promoteur putatif des miR-132 et miR-212 suffit également à leur expression. Au vu du rôle potentiel que pourrait jouer REST dans le maintien d'une transcription basale et au vu des interactions existant entre REST, Sp1 et le remodelage de la chromatine, il serait opportun de tester cette hypothèse en analysant l'activité d'une région promotrice putative des miR-132 et miR-212 incluant le site putatif de ce répresseur et clonée dans un plasmide réplicatif épisomal.

Les nombreuses hypothèses décrites au cours de ce mémoire à propos du rôle putatif de certains facteurs de transcription dans l'expression des miR-132 et miR-212 ont été élaborées à partir des résultats d'analyses bioinformatiques. En effet, ces analyses représentent à l'heure actuelle la première approche permettant de déterminer quels régulateurs transcriptionnels pourraient jouer un rôle dans le contrôle de l'expression de gènes dont la séquence régulatrice n'est pas encore décrite. Cependant, ces approches présentent le désavantage d'une part de générer un nombre très important de candidats (en annexe n'ont été présentés que les résultats des analyses bioinformatiques réalisées à l'aide du logiciel Transfac en sélectionnant l'option

minimisant les faux positifs; lorsque l'option minimisant les faux négatifs est privilégiée, plusieurs milliers de sites de liaison putatifs pour des facteurs de transcription sont identifiés) et d'autre part de ne pas tenir compte du contexte cellulaire dans lequel le gène d'intérêt est analysé. La combinaison des résultats fournis par ce type d'approche avec la connaissance du contexte biologique dans lequel le gène d'intérêt est exprimé constitue un des moyens de sélectionner des candidats à priori plus susceptibles que d'autres de jouer un rôle dans son expression. Des validations expérimentales sont ensuite nécessaires afin de confirmer les rôles de ces régulateurs transcriptionnels dans le contexte étudié. Au cours de ce mémoire, nous avons testé le rôle des facteurs de transcription AP-1, NF-κB et CREB via l'utilisation d'inhibiteurs chimiques et de siRNA. Ces études se sont révélées peu concluantes étant donné les limitations de ces techniques (les inhibiteurs chimiques sont rarement spécifiques, tandis que la transfection de siRNA exige un taux de transfection élevé pouvant perturber les réponses cellulaires). Comme suggéré précédemment, une approche alternative consisterait en la transfection de dominants négatifs de ces facteurs de transcription (ainsi que d'autres facteurs candidats). La réalisation d'une construction rapportrice encodant une région promotrice putative ou des versions tronquées ou mutées de celle-ci est une démarche couramment utilisée afin de valider la fonction de certains facteurs de transcription dans l'expression de gènes d'intérêt, que nous aimerions poursuivre dans le cadre de futures recherches.

Dans un contexte plus général que celui de l'étude réalisée au cours de ce mémoire, d'autres approches ont également été développées dans le but de confirmer la capacité de facteurs de transcription à lier une séquence d'ADN d'intérêt. L'EMSA (electrophoretic mobility shift assay, ou retard sur gel) par exemple consiste à faire migrer en conditions non dénaturantes des sondes d'ADN marquées, préalablement incubées ou non en présence d'extraits protéiques et à ensuite comparer les profils de migration. Cette technique permet, via la visualisation d'un « retard de migration sur le gel » de mettre en évidence la liaison de protéines à une séquence oligonucléotidique d'intérêt. L'identité de ces protéines peut être révélée en incubant les sondes d'ADN en présence à la fois d'extraits protéiques et d'anticorps reconnaissant un facteur de transcription candidat (« supershift ») (Laniel et al., 2001). L'empreinte aux nucléases est une seconde technique permettant l'identification de sites liés par des protéines au niveau d'une séquence oligonucléotidique d'intérêt. Cette technique, basée sur la protection de l'ADN conférée par un facteur de transcription lorsqu'il se lie à celui-ci, présente l'avantage de localiser assez précisément le site lié par un facteur de transcription (Galas and Schmitz, 1978). Au laboratoire est développée une technique d'identification sans à priori des facteurs de transcription liés à une séquence oligonucléotidique d'intérêt. Cette technique, qui combine les méthodes de chromatographie d'affinité et de spectrométrie de masse, pourrait être utilisée au cours de futures recherches dans le but de valider la liaison de facteurs de transcription à une portion de la région promotrice des miR-132 et miR-212. Toutefois, cette technique, tout comme les deux précédentes, repose sur l'utilisation de sondes nucléotidiques et ne permet donc de mettre en évidence que des interactions ADN/protéines se déroulant in vitro. A l'inverse, l'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) assure l'identification de séquences liées par des facteurs de transcription in vivo et tient donc compte à la fois des conditions cellulaires expérimentales et de l'environnement chromatinien des séquences liées. Cette technique est cependant parfois difficile à mettre en place et ne peut raisonnablement être développée que pour un nombre restreint de candidats.

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié l'abondance de deux cibles décrites du miR-132, SirT1 et p300, dans les cellules THP-1 stimulées au LPS. Ces études s'inscrivent dans le

contexte général du contrôle transcriptionnel des miR-132 et miR-212 étant donné que SirT1 et p300 interagissent avec différents facteurs de transcription « clés » des réponses inflammatoires et pourraient donc jouer un rôle dans l'expression de ces miRNAs. Les résultats des études concernant SirT1 suggèrent que le miR-132 ne réprimerait pas cette protéine dans les cellules THP-1. Il semble donc, comme cela a déjà été suggéré, qu'un miRNA puisse exercer des effets différents sur le protéome selon les types cellulaires et le contexte étudié. L'étude de l'abondance de p300 dans des monocytes stimulés au LPS nécessite d'être reproduite et améliorée au niveau de la détection ; cependant, nos premiers résultats pourraient être en accord avec un effet répressif du miR-132 sur l'abondance de cette protéine. Si la corrélation inverse entre l'abondance du miR-132 et celle de p300 était confirmée, nous pourrions tenter de valider cette hypothèse en modifiant l'abondance du miR-132 (par transfection d' « anti-miR » ou de « mimics ») et en analysant les effets de ces modifications sur l'abondance de p300 ainsi que sur l'activité d'un rapporteur luciférase couplé à la 3'UTR de cette protéine.

En conclusion, une des perspectives immédiates de ce mémoire pourrait consister en le clonage d'une nouvelle région promotrice putative des miR-132 et miR-212, incluant la région située entre les pre-miR-212 et pre-miR-132, dans un vecteur réplicatif épisomal adoptant une configuration nucléosomale proche de la structure chromatinienne endogène. La présence d'une telle conformation pourrait en effet être importante à la fois pour le maintien d'une transcription basale en absence de stimulation ainsi que pour l'induction de l'activité du promoteur en condition de stimulation. Si cette construction, une fois transfectée dans les cellules THP-1, était associée à une augmentation de l'activité du promoteur putatif cloné dans les cellules stimulées au LPS, il serait alors possible de tester le rôle potentiel de plusieurs facteurs de transcription (CREB, AP-1, NF-kB, Sp1, Egr et Ets, ainsi que le répresseur REST), par différentes approches. Tout d'abord, il serait intéressant de réaliser des versions tronquées de ce promoteur, de façon à localiser la région minimale permettant de conserver l'induction en réponse au LPS. Ensuite, le rôle putatif de plusieurs facteurs de transcription pourrait être évalué en nucléofectant des siRNA ou des plasmides encodant des dominants négatifs spécifiques de ces facteurs. Les effets de ces nucléofections pourraient être analysés aussi bien sur l'expression des miRNAs endogènes (dans des cellules non transfectées par la construction rapportrice) que sur l'activité du promoteur cloné dans un plasmide rapporteur. Inversement, le rôle de certains acteurs (comme REST) pourrait être testé en transfectant des plasmides permettant leur surexpression. Dans un second temps, le rôle de facteurs de transcription candidats pourrait être validé en réalisant des mutations ponctuelles dans les sites qu'ils sont susceptibles de lier et en observant si une diminution de l'activité du promoteur est associée à ces mutations. Enfin, des immunoprécipitations de chromatine pourraient être réalisées de façon à confirmer la liaison physique de facteurs de transcription d'intérêt à la séquence promotrice endogène.

Avant de conclure, il semble important de souligner qu'au cours de ce mémoire, nous avons étudié l'expression des miR-132 et miR-212 ainsi que celle de leur forme primaire dans des monocytes de la lignée cellulaire THP-1 ainsi que dans des macrophages différenciés *in vitro*. Bien que ce modèle fournisse une série d'avantages techniques (disponibilité d'un grand nombre de cellules étant donné leur capacité de multiplication *in vitro*, ...), il s'avère que l'expression de certains gènes est différente dans les cellules issues de lignées par comparaison avec des cellules primaires (Kohro et al., 2004). Néanmoins, il a été mis en évidence que la stimulation au LPS de macrophages humains primaires (durant 24h avec une concentration identique en LPS que celle utilisée au cours de ce mémoire) induisait une augmentation de l'expression du miR-132 de cinq fois par rapport aux cellules contrôles

(Shaked et al., 2009), ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle l'expression des miR-132 et miR-212 serait très semblable dans les cellules THP-1 et les cellules primaires. Par ailleurs, Aurélie Tacheny (thèse en cours en URBC, FUNDP) a mis en évidence que la stimulation de cellules THP-1 par de l'IL-1β ainsi que par du TNF-α induisait également l'expression des miR-132 et miR-212. De plus, il a été observé au laboratoire que le miR-132 était induit dans des macrophages primaires humains infectés par le parasite Leishmania major (communication personnelle de Cindy Gustin - recherches réalisées dans le cadre du projet SysCo (Systematic Functional Analysis of Intracellular Parasitism as a Model of Genomes Conflict), URBC, FUNDP). Ceci démontre que l'expression des miR-132 et miR-212 est induite dans les macrophages non seulement par le LPS mais aussi, de façon plus générale, par le contexte pro-inflammatoire. Il est intéressant de noter que cette observation ne se limite pas in vitro et qu'elle semble avoir une relevance physiologique. En effet, l'équipe de Pauley a mis en évidence que le miR-132 est aussi surexprimé dans les monocytes et macrophages de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Pauley et al., 2008) (Introduction, point II.2.a). Il semble donc qu'un contexte pro-inflammatoire induise l'expression du miR-132 dans les monocytes et macrophages à la fois in vitro et in vivo. Une fois que les mécanismes transcriptionnels contrôlant l'induction des miR-132 et miR-212 dans les cellules THP-1 seront mieux connus, il serait donc intéressant de déterminer s'ils sont conservés dans des cellules primaires. De futures recherches seront également nécessaires afin de comprendre le rôle physiologique de l'induction de ces miRNAs dans le contexte inflammatoire.

Bibliographie

- ALVAREZ-SAAVEDRA, M., ANTOUN, G., YANAGIYA, A., OLIVA-HERNANDEZ, R., CORNEJO-PALMA, D., PEREZ-IRATXETA, C., SONENBERG, N. & CHENG, H. Y. 2010. miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum Mol Genet*.
- ANAND, S., MAJETI, B. K., ACEVEDO, L. M., MURPHY, E. A., MUKTHAVARAM, R., SCHEPPKE, L., HUANG, M., SHIELDS, D. J., LINDQUIST, J. N., LAPINSKI, P. E., KING, P. D., WEIS, S. M. & CHERESH, D. A. 2010. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat Med*, 16, 909-14.
- AUWERX, J. 1991. The human leukemia cell line, THP-1: a multifacetted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 47, 22-31.
- BAIN, J., MCLAUCHLAN, H., ELLIOTT, M. & COHEN, P. 2003. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J*, 371, 199-204.
- BARROSO-DELJESUS, A., ROMERO-LOPEZ, C., LUCENA-AGUILAR, G., MELEN, G. J., SANCHEZ, L., LIGERO, G., BERZAL-HERRANZ, A. & MENENDEZ, P. 2008. Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol*, 28, 6609-19.
- BARSKI, A., CUDDAPAH, S., CUI, K., ROH, T. Y., SCHONES, D. E., WANG, Z., WEI, G., CHEPELEV, I. & ZHAO, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129, 823-37.
- BASKERVILLE, S. & BARTEL, D. P. 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11, 241-7.
- BENNETT, B. L., SASAKI, D. T., MURRAY, B. W., O'LEARY, E. C., SAKATA, S. T., XU, W., LEISTEN, J. C., MOTIWALA, A., PIERCE, S., SATOH, Y., BHAGWAT, S. S., MANNING, A. M. & ANDERSON, D. W. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13681-6.
- BI, Y., LIU, G. & YANG, R. 2009. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *J Cell Physiol*, 218, 467-72.
- BREVING, K. & ESQUELA-KERSCHER, A. 2009. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol*.
- BSHESH, K., ZHAO, B., SPIGHT, D., BIAGGIONI, I., FEOKISTOV, I., DENENBERG, A., WONG, H. R. & SHANLEY, T. P. 2002. The A2A receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in THP-1 cells. *J Leukoc Biol*, 72, 1027-36.
- CAIVANO, M. & COHEN, P. 2000. Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. *J Immunol*, 164, 3018-25.
- CHAMPELOVIER, P., EL ATIFI-BOREL, M., ISSARTEL, J. P., BOUTONNAT, J., BERGER, F. & SEIGNEURIN, D. 2010. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase by SP600125: a cDNA microarray analysis. *Cancer Genomics Proteomics*, 7, 87-92.
- CHEN, Y., TAKESHITA, A., OZAKI, K., KITANO, S. & HANAZAWA, S. 1996. Transcriptional regulation by transforming growth factor beta of the expression of retinoic acid and retinoid X receptor genes in osteoblastic cells is mediated through AP-1. *J Biol Chem*, 271, 31602-6.
- CHENG, H. Y., PAPP, J. W., VARLAMOVA, O., DZIEMA, H., RUSSELL, B., CURFMAN, J. P., NAKAZAWA, T., SHIMIZU, K., OKAMURA, H., IMPEY, S. & OBRIETAN, K. 2007. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron*, 54, 813-29.

- CHUNG, S., YAO, H., CAITO, S., HWANG, J. W., ARUNACHALAM, G. & RAHMAN, I. 2010a. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*, 501, 79-90.
- CHUNG, S., YAO, H., CAITO, S., HWANG, J. W., ARUNACHALAM, G. & RAHMAN, I. 2010b. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*.
- CHUNG, S. W., CHEN, Y. H. & PERRELLA, M. A. 2005. Role of Ets-2 in the regulation of heme oxygenase-1 by endotoxin. *J Biol Chem*, 280, 4578-84.
- CONACO, C., OTTO, S., HAN, J. J. & MANDEL, G. 2006. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2422-7.
- CORCORAN, D. L., PANDIT, K. V., GORDON, B., BHATTACHARJEE, A., KAMINSKI, N. & BENOS, P. V. 2009. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One*, 4, e5279.
- CULLEN, B. R. 2004. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*, 16, 861-5.
- DAVIES, S. P., REDDY, H., CAIVANO, M. & COHEN, P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, 351, 95-105.
- DIGNAM, J. D., LEBOVITZ, R. M. & ROEDER, R. G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 11, 1475-89.
- DING, X. C., WEILER, J. & GROSSHANS, H. 2009. Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. *Trends Biotechnol*, 27, 27-36.
- DOYLE, S. L. & O'NEILL, L. A. 2006. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol*, 72, 1102-13.
- DRESKIN, S. C., THOMAS, G. W., DALE, S. N. & HEASLEY, L. E. 2001. Isoforms of Jun kinase are differentially expressed and activated in human monocyte/macrophage (THP-1) cells. *J Immunol*, 166, 5646-53.
- DROBIC, B., PEREZ-CADAHIA, B., YU, J., KUNG, S. K. & DAVIE, J. R. 2010. Promoter chromatin remodeling of immediate-early genes is mediated through H3 phosphorylation at either serine 28 or 10 by the MSK1 multi-protein complex. *Nucleic Acids Res*, 38, 3196-208.
- DU, R., LONG, J., YAO, J., DONG, Y., YANG, X., TANG, S., ZUO, S., HE, Y. & CHEN, X. 2010. Subcellular quantitative proteomics reveals multiple pathway cross-talk that coordinates specific signaling and transcriptional regulation for the early host response to LPS. *J Proteome Res.* 9, 1805-21.
- DUNN, K. L., ESPINO, P. S., DROBIC, B., HE, S. & DAVIE, J. R. 2005. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol*, 83, 1-14.
- ELTON, T. S., KUHN, D. E., MALANA, G. E., MARTIN, M. M., NUOVO, G. J., PLEISTER, A. P. & FELDMAN, D. S. MiR-132 Regulates Angiotensin II Type 1 Receptor Expression Through a Protein Coding Region Binding Site. 2010. *Circulation*,118:S_513
- ESPELIN, C. W., GOLDSIPE, A., SORGER, P. K., LAUFFENBURGER, D. A., DE GRAAF, D. & HENDRIKS, B. S. 2010. Elevated GM-CSF and IL-1beta levels compromise the ability of p38 MAPK inhibitors to modulate TNFalpha levels in the human monocytic/macrophage U937 cell line. *Mol Biosyst*, 6, 1956-72.
- FABIAN, M. R., SONENBERG, N. & FILIPOWICZ, W. 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, 79, 351-79.

- FAZI, F. & NERVI, C. 2008. MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc Res*, 79, 553-61.
- FIEDLER, S. D., CARLETTI, M. Z., HONG, X. & CHRISTENSON, L. K. 2008. Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol Reprod*, 79, 1030-7.
- FUJITA, S., ITO, T., MIZUTANI, T., MINOGUCHI, S., YAMAMICHI, N., SAKURAI, K. & IBA, H. 2008. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol*, 378, 492-504.
- GALAS, D. J. & SCHMITZ, A. 1978. DNAse footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res*, 5, 3157-70.
- GAO, Z. & YE, J. 2008. Inhibition of transcriptional activity of c-JUN by SIRT1. *Biochem Biophys Res Commun*, 376, 793-6.
- GARCIA-SANCHEZ, R., AYALA-LUJAN, J., HERNANDEZ-PEREZ, A., MENDOZA-FIGUEROA, T. & TAPIA-RAMIREZ, J. 2003. Identification of repressor element 1 in cytochrome P450 genes and their negative regulation by RE1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor. *Biochim Biophys Acta*, 1620, 39-46.
- GHISLETTI, S., BAROZZI, I., MIETTON, F., POLLETTI, S., DE SANTA, F., VENTURINI, E., GREGORY, L., LONIE, L., CHEW, A., WEI, C. L., RAGOUSSIS, J. & NATOLI, G. 2010. Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages. *Immunity*, 32, 317-28.
- GROUPP, E. R. & DONOVAN-PELUSO, M. 1996. Lipopolysaccharide induction of THP-1 cells activates binding of c-Jun, Ets, and Egr-1 to the tissue factor promoter. *J Biol Chem*, 271, 12423-30.
- GUHA, M. & MACKMAN, N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13, 85-94.
- GUHA, M., O'CONNELL, M. A., PAWLINSKI, R., HOLLIS, A., MCGOVERN, P., YAN, S. F., STERN, D. & MACKMAN, N. 2001. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*, 98, 1429-39.
- GUO, Y., ZHAO, G., TANAKA, S. & YAMAGUCHI, T. 2009. Differential responses between monocytes and monocyte-derived macrophages for lipopolysaccharide stimulation of calves. *Cell Mol Immunol*, 6, 223-9.
- HATAKEYAMA, H., CHENG, H., WIRTH, P., COUNSELL, A., MARCROM, S. R., WOOD, C. B., POHLMANN, P. R., GILBERT, J., MURPHY, B., YARBROUGH, W. G., WHEELER, D. L., HARARI, P. M., GUO, Y., SHYR, Y., SLEBOS, R. J. & CHUNG, C. H. 2010. Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 5, e12702.
- HENKE, W., HERDEL, K., JUNG, K., SCHNORR, D. & LOENING, S. A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 25, 3957-8.
- HOLLANDER, J. A., IM, H. I., AMELIO, A. L., KOCERHA, J., BALI, P., LU, Q., WILLOUGHBY, D., WAHLESTEDT, C., CONKRIGHT, M. D. & KENNY, P. J. 2010. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*, 466, 197-202.
- HUANG, V., QIN, Y., WANG, J., WANG, X., PLACE, R. F., LIN, G., LUE, T. F. & LI, L. C. 2010. RNAa is conserved in mammalian cells. *PLoS One*, 5, e8848.
- INCORONATO, M., GAROFALO, M., URSO, L., ROMANO, G., QUINTAVALLE, C., ZANCA, C., IABONI, M., NUOVO, G., CROCE, C. M. & CONDORELLI, G. 2010.

- miR-212 increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in non-small cell lung cancer by targeting the antiapoptotic protein PED. *Cancer Res*, 70, 3638-46.
- IRARRAZABAL, C. E., WILLIAMS, C. K., ELY, M. A., BIRRER, M. J., GARCIA-PEREZ, A., BURG, M. B. & FERRARIS, J. D. 2008. Activator protein-1 contributes to high NaCl-induced increase in tonicity-responsive enhancer/osmotic response element-binding protein transactivating activity. *J Biol Chem*, 283, 2554-63.
- JIANG, G., DALLAS-YANG, Q., LIU, F., MOLLER, D. E. & ZHANG, B. B. 2003. Salicylic acid reverses phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA)- and tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced insulin receptor substrate 1 (IRS1) serine 307 phosphorylation and insulin resistance in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells. *J Biol Chem*, 278, 180-6.
- KAGEYAMA, R., MERLINO, G. T. & PASTAN, I. 1989. Nuclear factor ETF specifically stimulates transcription from promoters without a TATA box. *J Biol Chem*, 264, 15508-14.
- KAI, Z. S. & PASQUINELLI, A. E. 2010. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 5-10.
- KIM, V. N., HAN, J. & SIOMI, M. C. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 126-39.
- KLEIN, M. E., LIOY, D. T., MA, L., IMPEY, S., MANDEL, G. & GOODMAN, R. H. 2007. Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci*, 10, 1513-4.
- KOHRO, T., TANAKA, T., MURAKAMI, T., WADA, Y., ABURATANI, H., HAMAKUBO, T. & KODAMA, T. 2004. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb*, 11, 88-97.
- KONISHI, H., SUGIYAMA, M., MIZUNO, K., SAITO, H., YATABE, Y., TAKAHASHI, T. & OSADA, H. 2003. Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at distal 17p13.3 in human lung cancer. *Oncogene*, 22, 1892-905.
- KROL, J., LOEDIGE, I. & FILIPOWICZ, W. 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*, 11, 597-610.
- LAGOS, D., POLLARA, G., HENDERSON, S., GRATRIX, F., FABANI, M., MILNE, R. S., GOTCH, F. & BOSHOFF, C. 2010. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol*, 12, 513-9.
- LANIEL, M. A., BELIVEAU, A. & GUERIN, S. L. 2001. Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions. *Methods Mol Biol*, 148, 13-30.
- 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*, 75, 843-54.
- LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K. H., LEE, S., BAEK, S. H. & KIM, V. N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23, 4051-60.
- LIETZ, M., HOHL, M. & THIEL, G. 2003. RE-1 silencing transcription factor (REST) regulates human synaptophysin gene transcription through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Eur J Biochem*, 270, 2-9.
- LIEW, F. Y., XU, D., BRINT, E. K. & O'NEILL, L. A. 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, 5, 446-58.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LU, Y. C., YEH, W. C. & OHASHI, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145-51.

- MA, W., GEE, K., LIM, W., CHAMBERS, K., ANGEL, J. B., KOZLOWSKI, M. & KUMAR, A. 2004. Dexamethasone inhibits IL-12p40 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells by down-regulating the activity of c-Jun N-terminal kinase, the activation protein-1, and NF-kappa B transcription factors. *J Immunol*, 172, 318-30.
- MAGILL, S. T., CAMBRONNE, X. A., LUIKART, B. W., LIOY, D. T., LEIGHTON, B. H., WESTBROOK, G. L., MANDEL, G. & GOODMAN, R. H. 2010. microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 20382-7.
- MARSON, A., LEVINE, S. S., COLE, M. F., FRAMPTON, G. M., BRAMBRINK, T., JOHNSTONE, S., GUENTHER, M. G., JOHNSTON, W. K., WERNIG, M., NEWMAN, J., CALABRESE, J. M., DENNIS, L. M., VOLKERT, T. L., GUPTA, S., LOVE, J., HANNETT, N., SHARP, P. A., BARTEL, D. P., JAENISCH, R. & YOUNG, R. A. 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134, 521-33.
- MATT, T. 2002. Transcriptional control of the inflammatory response: a role for the CREB-binding protein (CBP). *Acta Med Austriaca*, 29, 77-9.
- MONTEYS, A. M., SPENGLER, R. M., WAN, J., TECEDOR, L., LENNOX, K. A., XING, Y. & DAVIDSON, B. L. 2010. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, 16, 495-505.
- MURATA, K., YOSHITOMI, H., TANIDA, S., ISHIKAWA, M., NISHITANI, K., ITO, H. & NAKAMURA, T. 2010. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 12, R86.
- NAHID, M. A., PAULEY, K. M., SATOH, M. & CHAN, E. K. 2009. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem*, 284, 34590-9.
- NAKAYAMA, T., HIESHIMA, K., ARAO, T., JIN, Z., NAGAKUBO, D., SHIRAKAWA, A. K., YAMADA, Y., FUJII, M., OISO, N., KAWADA, A., NISHIO, K. & YOSHIE, O. 2008. Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. *Oncogene*, 27, 3221-32.
- NEMOTO, S., FERGUSSON, M. M. & FINKEL, T. 2004. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science*, 306, 2105-8.
- NUDELMAN, A. S., DIROCCO, D. P., LAMBERT, T. J., GARELICK, M. G., LE, J., NATHANSON, N. M. & STORM, D. R. 2010. Neuronal activity rapidly induces transcription of the CREB-regulated microRNA-132, in vivo. *Hippocampus*, 20, 492-8.
- O'CONNELL, R. M., RAO, D. S., CHAUDHURI, A. A. & BALTIMORE, D. 2010. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 10, 111-22.
- O'NEILL, L. A. 2009. Boosting the brain's ability to block inflammation via microRNA-132. *Immunity*, 31, 854-5.
- OGAWA, E., SAITO, Y., KUWAHARA, K., HARADA, M., MIYAMOTO, Y., HAMANAKA, I., KAJIYAMA, N., TAKAHASHI, N., IZUMI, T., KAWAKAMI, R., KISHIMOTO, I., NARUSE, Y., MORI, N. & NAKAO, K. 2002. Fibronectin signaling stimulates BNP gene transcription by inhibiting neuron-restrictive silencer element-dependent repression. *Cardiovasc Res*, 53, 451-9.
- OLENA, A. F. & PATTON, J. G. 2010. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*, 222, 540-5.

- OLIVE, M., KRYLOV, D., ECHLIN, D. R., GARDNER, K., TAPAROWSKY, E. & VINSON, C. 1997. A dominant negative to activation protein-1 (AP1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis. *J Biol Chem*, 272, 18586-94.
- OSOEGAWA, K., MAMMOSER, A. G., WU, C., FRENGEN, E., ZENG, C., CATANESE, J. J. & DE JONG, P. J. 2001. A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome Res*, 11, 483-96.
- OZSOLAK, F., POLING, L. L., WANG, Z., LIU, H., LIU, X. S., ROEDER, R. G., ZHANG, X., SONG, J. S. & FISHER, D. E. 2008. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*, 22, 3172-83.
- PAULEY, K. M., SATOH, M., CHAN, A. L., BUBB, M. R., REEVES, W. H. & CHAN, E. K. 2008. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*, 10, R101.
- PAULEY, K. M., SATOH, M., PAULEY, B. A., DOMINGUEZ-GUTIERREZ, P. R., WALLET, S. M., HOLLIDAY, L. S., CHA, S., REEVES, W. H. & CHAN, E. K. 2010. Formation of GW/P bodies as marker for microRNA-mediated regulation of innate immune signaling in THP-1 cells. *Immunol Cell Biol*, 88, 205-12.
- PINNOJI, R. C., BEDADALA, G. R., GEORGE, B., HOLLAND, T. C., HILL, J. M. & HSIA, S. C. 2007. Repressor element-1 silencing transcription factor/neuronal restrictive silencer factor (REST/NRSF) can regulate HSV-1 immediate-early transcription via histone modification. *Virol J*, 4, 56.
- PLACE, R. F., LI, L. C., POOKOT, D., NOONAN, E. J. & DAHIYA, R. 2008. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1608-13.
- PLAISANCE, V., NIEDERHAUSER, G., AZZOUZ, F., LENAIN, V., HAEFLIGER, J. A., WAEBER, G. & ABDERRAHMANI, A. 2005. The repressor element silencing transcription factor (REST)-mediated transcriptional repression requires the inhibition of Sp1. *J Biol Chem*, 280, 401-7.
- RAMACHANDRAN, K., GOPISETTY, G., GORDIAN, E., NAVARRO, L., HADER, C., REIS, I. M., SCHULZ, W. A. & SINGAL, R. 2009. Methylation-mediated repression of GADD45alpha in prostate cancer and its role as a potential therapeutic target. *Cancer Res*, 69, 1527-35.
- REMENYI, J., HUNTER, C. J., COLE, C., ANDO, H., IMPEY, S., MONK, C. E., MARTIN, K. J., BARTON, G. J., HUTVAGNER, G. & ARTHUR, J. S. 2010. Regulation of the miR-212/132 locus by MSK and CREB in response to neurotrophins. *Biochem J*.
- RUGGIERO, T., TRABUCCHI, M., DE SANTA, F., ZUPO, S., HARFE, B. D., MCMANUS, M. T., ROSENFELD, M. G., BRIATA, P. & GHERZI, R. 2009. LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages. *FASEB J*, 23, 2898-908.
- RUI, W., BING, F., HAI-ZHU, S., WEI, D. & LONG-BANG, C. 2010. Identification of microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma cells (SPC-A1). *J Cell Mol Med*, 14, 206-14.
- SAHDEV, S., SAINI, S., TIWARI, P., SAXENA, S. & SINGH SAINI, K. 2007. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Mol Cell Probes*, 21, 303-7.
- SAINI, H. K., GRIFFITHS-JONES, S. & ENRIGHT, A. J. 2007. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17719-24.
- SCHANEN, B. C. & LI, X. 2010. Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics*.

- SHAKED, I., MEERSON, A., WOLF, Y., AVNI, R., GREENBERG, D., GILBOA-GEFFEN, A. & SOREQ, H. 2009. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*, 31, 965-73.
- SHANG, L., ZHOU, H., XIA, Y., WANG, H., GAO, G., CHEN, B., LIU, Q., SHAO, C. & GONG, Y. 2009. Serum withdrawal up-regulates human SIRT1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Cell Mol Med*, 13, 4176-84.
- SHEEDY, F. J. & O'NEILL, L. A. 2008. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis*, 67 Suppl 3, iii50-5.
- SHEN, Z., AJMO, J. M., ROGERS, C. Q., LIANG, X., LE, L., MURR, M. M., PENG, Y. & YOU, M. 2009. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G1047-53.
- SKOOG, T., HAMSTEN, A. & ERIKSSON, P. 2006. Allele-specific chromatin remodeling of the tumor necrosis factor-alpha promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, 351, 777-83.
- SOLOAGA, A., THOMSON, S., WIGGIN, G. R., RAMPERSAUD, N., DYSON, M. H., HAZZALIN, C. A., MAHADEVAN, L. C. & ARTHUR, J. S. 2003. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J*, 22, 2788-97.
- STASSI, G., GAROFALO, M., ZERILLI, M., RICCI-VITIANI, L., ZANCA, C., TODARO, M., ARAGONA, F., LIMITE, G., PETRELLA, G. & CONDORELLI, G. 2005. PED mediates AKT-dependent chemoresistance in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 65, 6668-75.
- STRUM, J. C., JOHNSON, J. H., WARD, J., XIE, H., FEILD, J., HESTER, A., ALFORD, A. & WATERS, K. M. 2009. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Mol Endocrinol*, 23, 1876-84.
- SWEET, M. J. & HUME, D. A. 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol*, 60, 8-26.
- TAGANOV, K. D., BOLDIN, M. P., CHANG, K. J. & BALTIMORE, D. 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12481-6.
- TANG, Y., BANAN, A., FORSYTH, C. B., FIELDS, J. Z., LAU, C. K., ZHANG, L. J. & KESHAVARZIAN, A. 2008. Effect of alcohol on miR-212 expression in intestinal epithelial cells and its potential role in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*, 32, 355-64.
- THOMSON, J. M., NEWMAN, M., PARKER, J. S., MORIN-KENSICKI, E. M., WRIGHT, T. & HAMMOND, S. M. 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*, 20, 2202-7.
- TSAI, E. Y., FALVO, J. V., TSYTSYKOVA, A. V., BARCZAK, A. K., REIMOLD, A. M., GLIMCHER, L. H., FENTON, M. J., GORDON, D. C., DUNN, I. F. & GOLDFELD, A. E. 2000. A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol*, 20, 6084-94.
- TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, Y., KONNO, T. & TADA, K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 26, 171-6.
- TUDHOPE, S. J., FINNEY-HAYWARD, T. K., NICHOLSON, A. G., MAYER, R. J., BARNETTE, M. S., BARNES, P. J. & DONNELLY, L. E. 2008. Different mitogenactivated protein kinase-dependent cytokine responses in cells of the monocyte lineage. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 306-12.

- TURNER, M. J. & SLACK, F. J. 2009. Transcriptional control of microRNA expression in C. elegans: promoting better understanding. *RNA Biol*, 6, 49-53.
- UCAR, A., VAFAIZADEH, V., JARRY, H., FIEDLER, J., KLEMMT, P. A., THUM, T., GRONER, B. & CHOWDHURY, K. 2010. miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development. *Nat Genet*, 42, 1101-8.
- VAISHNAV, D., JAMBAL, P., REUSCH, J. E. & PUGAZHENTHI, S. 2003. SP600125, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase, activates CREB by a p38 MAPK-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 307, 855-60.
- VASUDEVAN, S., TONG, Y. & STEITZ, J. A. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318, 1931-4.
- VERDEL, A., VAVASSEUR, A., LE GORREC, M. & TOUAT-TODESCHINI, L. 2009. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int J Dev Biol*, 53, 245-57.
- VERMEULEN, L., BERGHE, W. V., BECK, I. M., DE BOSSCHER, K. & HAEGEMAN, G. 2009. The versatile role of MSKs in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, 34, 311-8.
- VERMEULEN, L., DE WILDE, G., VAN DAMME, P., VANDEN BERGHE, W. & HAEGEMAN, G. 2003. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J*, 22, 1313-24.
- VO, N. & GOODMAN, R. H. 2001. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*, 276, 13505-8.
- VO, N., KLEIN, M. E., VARLAMOVA, O., KELLER, D. M., YAMAMOTO, T., GOODMAN, R. H. & IMPEY, S. 2005. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16426-31.
- WADA, R., AKIYAMA, Y., HASHIMOTO, Y., FUKAMACHI, H. & YUASA, Y. 2009. miR-212 is downregulated and suppresses methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancer. *Int J Cancer*.
- WANG, G., WANG, Y., TENG, M., ZHANG, D., LI, L. & LIU, Y. 2010. Signal transducers and activators of transcription-1 (STAT1) regulates microRNA transcription in interferon gamma-stimulated HeLa cells. *PLoS One*, 5, e11794.
- WANG, X., XUAN, Z., ZHAO, X., LI, Y. & ZHANG, M. Q. 2009. High-resolution human core-promoter prediction with CoreBoost_HM. *Genome Res*, 19, 266-75.
- WAYMAN, G. A., DAVARE, M., ANDO, H., FORTIN, D., VARLAMOVA, O., CHENG, H. Y., MARKS, D., OBRIETAN, K., SODERLING, T. R., GOODMAN, R. H. & IMPEY, S. 2008. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9093-8.
- WESTBROOK, T. F., HU, G., ANG, X. L., MULLIGAN, P., PAVLOVA, N. N., LIANG, A., LENG, Y., MAEHR, R., SHI, Y., HARPER, J. W. & ELLEDGE, S. J. 2008. SCFbeta-TRCP controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation. *Nature*, 452, 370-4.
- WIBRAND, K., PANJA, D., TIRON, A., OFTE, M. L., SKAFTNESMO, K. O., LEE, C. S., PENA, J. T., TUSCHL, T. & BRAMHAM, C. R. 2010. Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo. *Eur J Neurosci*, 31, 636-45.
- WONG, T. S., LIU, X. B., WONG, B. Y., NG, R. W., YUEN, A. P. & WEI, W. I. 2008. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*, 14, 2588-92.

- WU, J. & XIE, X. 2006. Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biol*, 7, R85.
- YEUNG, F., HOBERG, J. E., RAMSEY, C. S., KELLER, M. D., JONES, D. R., FRYE, R. A. & MAYO, M. W. 2004. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*, 23, 2369-80.
- YI, R., DOEHLE, B. P., QIN, Y., MACARA, I. G. & CULLEN, B. R. 2005. Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA*, 11, 220-6.
- YUEN, T., RUF, F., CHU, T. & SEALFON, S. C. 2009. Microtranscriptome regulation by gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Endocrinol*, 302, 12-7.
- YUSTEIN, A. S., HARPER, J. C., PETRONI, G. R., CUMMINGS, O. W., MOSKALUK, C. A. & POWELL, S. M. 1999. Allelotype of gastric adenocarcinoma. *Cancer Res*, 59, 1437-41.
- ZHAO, S. & LIU, M. F. 2009. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Sci China C Life Sci*, 52, 1111-6.
- ZHOU, X., RUAN, J., WANG, G. & ZHANG, W. 2007. Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol*, 3, e37.

Annexe 1 : Analyse des sites putatifs de liaison de facteurs de transcription dans la séquence génomique humaine comprise entre les 5000 pb en amont du pre-miR-212 et l'extrémité avale pre-miR-132 (longueur totale : 5473 pb).

La séquence analysée provient du contig « NT_010718.16l : 1556576-1562048 Homo Sapiens chromosome 17 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly » (disponible sur le site web du NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Elle a été analysée à l'aide du logiciel Transfac (Biobase) avec la matrice « vertébrés non redondant minimisant les faux positifs » (a) et la matrice « cellules immunes minimisant les faux positifs » (b).

Les sites identifiés au sein de la région promotrice putative clonée au cours de cette étude sont indiqués en gras.

(a) <u>Matrice « vertébrés_non_redondant_minimisant_les_faux_positifs » (279_sites_putatifs_identifiés):</u>

| matrix | position | core | matrix | <pre>sequence (always the (+)-strand is shown)</pre> | VDR Rid3 p53 AP-2alpha AP-2alpha Rid3 LRF ETF AP-2 Rid3 ZF5 ZF5 ZF5 Tal-lbeta:E47 AP-2 MAZ CKROX Pax-4 Rid3 Rid3 Rid3 Rid3 Rid3 Rid3 Rid3 Rid3 |
|-----------------------------|----------|-------|--------|--|--|
| identifier | (strand) | score | score | (+)-strand is shown) | |
| | 05 () | | | | |
| V\$VDR_Q3 | 9 / (-) | 0.956 | 0.929 | tgtcccgggtCCCCC | VDR |
| V\$K1D3_01 | 139 (+) | 1.000 | 0.000 | CCACC | K103 |
| V\$P33_UZ V\$AD2ALDUA 01 | 148 (-) | 1 000 | 0.988 | GGGGGGGGG | <u>pos</u> |
| VÇAPZALFIA_UI | 161 (+) | 1 000 | 1 000 | geeeeggge | AP 2alpha |
| V\$KID3 01 | 196 (-) | 1 000 | 1 000 | CGTGG | Kid3 |
| V\$LRF 02 | 221 (+) | 1.000 | 0.995 | caaaCCCCC | LRF |
| V\$ETF 06 | 283 (-) | 1.000 | 1.000 | CCGCCac | ETF |
| V\$AP2 06 | 322 (-) | 1.000 | 0.975 | ggccgGCGGcg | AP-2 |
| V\$KID3_01 | 351 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACC | Kid3 |
| V\$ZF5_B | 357 (+) | 1.000 | 0.941 | cgcgggCGCGCag | ZF5 |
| V\$ZF5_B | 414 (+) | 0.919 | 0.859 | tggaggCGCACag | ZF5 |
| V\$TAL1BETAE47_01 | 419 (+) | 1.000 | 0.938 | gcgcaCAGATgctgag | Tal-1beta:E47 |
| <u>V\$AP2_Q6_01</u> | 433 (-) | 0.986 | 0.982 | aGCCCGcggggag | <u>AP-2</u> |
| <u>V\$MAZ_Q6</u> | 440 (+) | 1.000 | 1.000 | gGGGAGgg | MAZ |
| V\$CKROX_Q2 | 440 (-) | 1.000 | 1.000 | gggGAGGGg | CKROX |
| V\$PAX4_03 | 445 (+) | 1.000 | 0.976 | ggggccCACCCt | Pax-4 |
| V\$KID3_01 | 450 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACC | K1d3 |
| V\$KID3_01 | 4/5 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACC | K103 |
| V\$KID3_UI | 485 (+) | 1 000 | 0.000 | CCACC | AbB.Ampt |
| VŞAHKARNI_UI VŞSTAT O6 | 516 (-) | 1 000 | 0.903 | tccCAGAAaccct | STAT |
| V\$97F11 01 | 516 (-) | 1 000 | 0.333 | tocoagaaaCCCTGg | 97F1=1 |
| V\$ZF5 B | 540 (-) | 0 919 | 0.017 | ctGAGCGctccca | ZE5 |
| V\$PAX4 03 | 614 (-) | 1.000 | 0.979 | cGGGTGatagaa | Pax-4 |
| V\$VDR Q3 | 615 (+) | 1.000 | 0.925 | GGGTGqtqqqqaqa | VDR |
| V\$KID3_01 | 616 (-) | 1.000 | 1.000 | GGTGG | Kid3 |
| V\$KID3_01 | 619 (-) | 1.000 | 1.000 | GGTGG | Kid3 |
| V\$PAX6_Q2 | 656 (+) | 1.000 | 0.837 | ctctccTGGAActc | Pax-6 |
| <u>V\$P300_01</u> | 661 (-) | 1.000 | 0.978 | ctggaACTCCccgt | <u>p300</u> |
| V\$TAX CREE 02 | 702 (+) | 0.800 | 0.778 | tGGACGcactcccca | Tax/CREE |
| <u>V\$P300_01</u> | 704 (-) | 1.000 | 0.991 | gacgcACTCCccaa | <u>p300</u> |
| V\$SPZ1_01 | 716 (-) | 0.989 | 0.966 | aacacacCCACCctc | Spz1 |
| V\$PAX4_U3 | 718 (+) | 1.000 | 0.988 | cacaccuaucut | Pax-4 |
| V\$MINI19_B | 722 (+) | 1 000 | 1 000 | acccaccctCAC1Caggcgca | Muscle initiator sequences-19 |
| V\$KIDS_UI | 727 (+) | 0.000 | 0.000 | CCACC | CEN THE |
| V\$GEN_INIS_B | 727 (+) | 0.909 | 0.550 | coagaget at CCACC | CD2 /I DD=1c/I CE |
| V\$CARD B | 833 (=) | 1 000 | 0.334 | accontrologo | CARP |
| V\$KTD3 01 | 877 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACG | Kid3 |
| V\$PPARA 01 | 893 (+) | 0.899 | 0.753 | gggaacctgggCAGAGgtgt | PPARalpha: RXRalpha |
| V\$PPAR_DR1_Q2 | 900 (-) | 0.851 | 0.859 | tgggcagAGGTGt | PPAR direct repeat 1 |
| V\$TBX5_01 | 905 (+) | 1.000 | 0.993 | agaGGTGTtacc | TBX5 |
| V\$ZF5_B | 921 (-) | 0.888 | 0.856 | caGCCCGccctga | ZF5 |
| <u>V\$KID3_01</u> | 957 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACG | <u>Kid3</u> |
| <u>V\$CP2_02</u> | 978 (+) | 0.968 | 0.888 | ACTGGaagtggctgg | CP2/LBP-1c/LSF |
| V\$GABP_B | 978 (+) | 1.000 | 0.923 | actGGAAGtggc | GABP |
| V\$TEL2_Q6 | 979 (-) | 1.000 | 0.890 | ctgGAAGTgg | <u>Tel-2</u> |
| V\$AP2_Q6 | 997 (-) | 0.952 | 0.938 | cgcctCCGGGgg | AP-2 |
| V\$VMIB_02 | 1050 (-) | 1.000 | 1 000 | gccgiittg | <u>V-MVD</u> |
| V\$KID3_01 V\$CD71_01 | 1009 (-) | 0.000 | 0.000 | ct again acconceana | KIG3 Cng1 |
| V\$5PZ1_U1 V\$DAV4_03 | 1081 (-) | 1 000 | 0.975 | CCCCaacCACCCgc | Spz1 |
| V\$KID3 01 | 1088 (+) | 1 000 | 1 000 | CCACC | Kid3 |
| V\$AP2 Q6 01 | 1115 (-) | 1.000 | 0.984 | cGCCTGcqqctqq | AP-2 |
| V\$DEC_Q1 | 1147 (+) | 1.000 | 1.000 | cccCACGTgaagg | DEC |
| V\$KID3_01 | 1149 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACG | Kid3 |
| V\$TAX CREE _01 | 1169 (+) | 1.000 | 0.892 | tgtgggTGACGtctc | Tax/CREE |
| V\$CREE_02 | 1171 (+) | 1.000 | 0.997 | tgggTGACGtct | CREE |
| V\$CREE_Q4_01 | 1172 (+) | 1.000 | 0.973 | gggTGACGtct | CREE |
| <u>V\$STAT_Q6</u> | 1179 (+) | 1.000 | 0.999 | gtctcTTCTGgga | STAT |
| V\$PAX5_02 | 1204 (-) | 0.819 | 0.747 | cgcactgtcgCGCCGctgctcgcagtac | <u>Pax-5</u> |
| V\$CETS1P54_03 | 1232 (+) | 1.000 | 0.979 | tactcUGGAAgtggcc | C-Ets-1 p54 |
| V9CE151P54_UZ | 1233 (+) | 1.000 | 0.985 | actouggaAgtgg | С-вся-1 (р54) |

| V\$GABP_B | 1235 (+) | 1.000 | 0.955 | tccGGAAGtggc | GABP |
|---|--|--|---|---|----------------------------------|
| V\$TEL2_Q6 V\$PAX5_02 | 1236 (-) | 0.000 | 0.906 | ccgGAAGTgg | Te1-2 Pay-5 |
| V\$ETF O6 | 1258 (-) | 1.000 | 1.000 | CCGCCqc | ETF |
| V\$KID3_01 | 1301 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACG | Kid3 |
| V\$DR3_Q4 | 1318 (+) | 1.000 | 0.868 | cccgcacctccTGACCcccgc | VDR, CAR, PXR |
| V\$SP1_Q2_01 V\$KID3_01 | 1333 (+) | 1.000 | 1 000 | CCTCC | SP1 Wid3 |
| V\$WT1 06 | 1355 (-) | 0.998 | 0.999 | acaGGGGGa | WT1 |
| V\$WT1_Q6 | 1357 (-) | 0.998 | 0.999 | gggGGGGGg | WT1 |
| <u>V\$WT1_Q6</u> | 1358 (-) | 0.998 | 0.999 | gggGGGGg | WT1 |
| <u>V\$WT1_Q6</u> | 1359 (-) | 0.998 | 0.999 | gggGGGGg | WT1 |
| V\$WII_Q6 V\$WT1_06 | 1360 (-) | 0.998 | 0.999 | gggGGGGG | WII WT1 |
| V\$WT1 06 | 1362 (-) | 0.998 | 0.999 | gggGGGGG | WT1 |
| V\$ETF_Q6 | 1383 (-) | 1.000 | 1.000 | CCGCCgc | ETF |
| <u>V\$KID3_01</u> | 1412 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACC | <u>Kid3</u> |
| V\$TAX CREE_02 | 1434 (-) | 0.800 | 0.802 | ggggcgctgCGTTAc | Tax/CREE |
| V\$RFX1_02 V\$RFX1_02 | 1442 (+) | 0 992 | 0.986 | gcgttaccatggcaaccg | RFX1 |
| V\$ZF5_B | 1462 (+) | 0.919 | 0.865 | gaggtgCGCCCag | ZF5 |
| V\$ZF5_B | 1505 (+) | 1.000 | 0.862 | agcaacCGCGCtc | ZF5 |
| V\$DR1_Q3 | 1532 (-) | 0.909 | 0.908 | tgtcCTCTGgccc | PPAR, HNF-4, COUP, RAR |
| V\$PPAR_DRI_QZ | 1532 (+) | 0.876 | 0.910 | tGTCCTctggccc | PPAR direct repeat 1 |
| V\$AP1 02 01 | 1565 (-) | 1.000 | 0.803 | ccactaAGTCA | AP-1 |
| V\$MAF_Q6_01 | 1567 (+) | 1.000 | 0.983 | ggctgAGTCAc | MAF |
| V\$LRF_Q2 | 1607 (+) | 1.000 | 0.989 | geggCCCCC | LRF |
| V\$ZF5_B | 1632 (-) | 0.919 | 0.854 | tcGGGCGccccc | ZF5 |
| V\$AP2 06 | 1637 (+) | 0 992 | 0.992 | dacacccc | AP=2 |
| V\$ETF_Q6 | 1726 (-) | 1.000 | 1.000 | CCGCCgc | ETF |
| V\$P300_01 | 1766 (-) | 1.000 | 0.980 | tacccACTCCctct | p300 |
| V\$GEN_INI3_B | 1800 (+) | 0.986 | 0.987 | tccGGAAGtgg agcccgacgCGCACcaagcctcctgg CCGCCGc CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | GEN_INI |
| VŞVMYB_UZ VSEBF 06 | 1859 (+) | 1 000 | 0.931 | gaanaugga tototagggaa | v-myn EBF |
| V\$AP2 06 | 1887 (-) | 0.953 | 0.941 | cgccGAGGGac | AP-2 |
| V\$ZF5_B | 1892 (+) | 0.922 | 0.886 | gagggaCGTGCtg | ZF5 |
| V\$HIF1_Q3 | 1893 (+) | 1.000 | 0.957 | agggACGTGctgcg | HIF1 |
| A\$KID3 01 | 1909 (+) | 1.000 | 1 000 | CCTCC CCTCC | Pax-6 |
| V\$KID3_01 | 1940 (-) | 1.000 | 1.000 | GGTGG | Kid3 |
| V\$HAND1E47_01 | 2084 (-) | 1.000 | 0.944 | aaatCCAGActatgca | Hand1:E47 |
| <u>V\$DR3_Q4</u> | 2098 (+) | 1.000 | 0.839 | cagggcctctcTGACCccatc | VDR, CAR, PXR |
| V\$PAX4 03 | 2100 (-) | 1.000 | 0.910 | atccccACCCc | Pax-4 |
| V\$SP3_Q3 | 2154 (-) | 0.925 | 0.897 | cCCCACcccgact | Sp3 |
| V\$CACD_01 | 2156 (+) | 0.960 | 0.973 | ccaCCCCC | CACD |
| V\$KID3_01 V\$Pay5_02 | 2156 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACC | Kid3 |
| V\$CETS1P54 03 | 2272 (-) | 0.988 | 0.744 | cccacATCCGctccc | c-Ets-1 p54 |
| V\$FXR_Q3 | 2288 (+) | 0.767 | 0.827 | caagttaacTTACT | FXR/RXR-alpha |
| V\$GEN_INI3_B | 2324 (+) | 0.988 | 0.989 | cctCATTG | GEN_INI |
| V\$GEN_INI3_B | 2394 (+) | 0.988 | 0.989 | CCTCATTG | GEN_INI |
| V\$GEN INI3 B | 2534 (+) | 0.988 | 0.989 | cctCATTG | GEN INI |
| V\$GEN_INI3_B | 2604 (+) | 0.988 | 0.989 | cctCATTG | GEN_INI |
| V\$GEN_INI3_B | 2674 (+) | 0.988 | 0.989 | cctCATTG | GEN_INI |
| V\$GEN_INI3_B V\$GEN_TNI3_B | 2744 (+) | 0.988 | 0.989 | CCTCATIG | GEN_INI |
| V\$GEN_INI3_B | 2884 (+) | 0.988 | 0.989 | cctCATTG | GEN_INI |
| V\$GEN_INI3_B | 2954 (+) | 0.988 | 0.989 | cctCATTG | GEN_INI |
| V\$PAX4_03 | 3004 (-) | 1.000 | 0.959 | aGGGTGaggacc | Pax-4 |
| V\$GABP B | 3063 (-) | 1.000 | 0.936 | cactCTTCCaac | GABP |
| V\$CKROX_Q2 | 3089 (+) | 1.000 | 1.000 | gCCCTCccc | CKROX |
| V\$MAZ_Q6 | 3090 (-) | 1.000 | 1.000 | ccCTCCCc | MAZ |
| V\$CP2_02 | 3154 (-) | 0.941 | 0.916 | ctcgatggagCCAGG cCAGGGgaactgccc | CP2/LBP-1c/LSF SZF1-1 |
| <u>V\$SZF11_01</u> V\$MYB_Q3 | 3232 (., | | 0.010 | gAACTGccca | MYB |
| V\$SZF11_01 | 3283 (-) | 1.000 | 0.887 | ctcctcatcCCCTGg | SZF1-1 |
| V\$LRF_Q2 | | | | GGGGGccc | LRF |
| <u>V\$PAX8_01</u> V\$PAX3_B | 3327 (-) 3340 (-) | | | | Pax-8 Pax-3 |
| V\$XVENT1_01 | | | | ccaCAAATggtcc | Xvent-1 |
| V\$KID3_01 | 3390 (-) | | | | Kid3 |
| V\$PAX5_02 V\$PAX3 B | 3402 (+) 3410 (-) | | | | Pax-5 Pax-3 |
| V\$KID3_01 | 3418 (-) | | | | Kid3 |
| V\$PAX4_03 | 3464 (+) | 1.000 | 0.964 | tcctctCACCCc | Pax-4 |
| V\$TAXCREE_02 | | | | cTGGCGcgttccccc | Tax/CREE |
| <u>V\$ZF5_B</u> V\$RFX1_02 | | | | tgGCGCGttcccc gcGTTCCcccagctccct | ZF5 RFX1 |
| V\$VMYB_02 | | | | cCCGTTgct | v-Myb |
| V\$PPARG_02 | | | | ggttgGCCCAccttccccaactt | PPARgamma: RXRalpha, PPARgamma |
| <u>V\$VDR_Q3</u> V\$KID3_01 | 3541 (-) 3545 (+) | | 0.933 | tggcccacctTCCCC CCACC | VDR Kid3 |
| V\$CP2_02 | 3545 (+) 3587 (+) | | | | CP2/LBP-1c/LSF |
| V\$KID3_01 | 3591 (-) | 1.000 | 1.000 | GGTGG | Kid3 |
| V\$LRF_Q2 | 3720 (+) | 1.000 | 0.989 | caggCCCCC | LRF |
| <u>V\$KID3_01</u> V\$PAX4_03 | 3727 (+) 3749 (+) | | | CCACG cctgccCACCCt | Kid3 Pax-4 |
| V\$PAX4_03 V\$KID3_01 | 3749 (+) 3754 (+) | | | CCACC | Kid3 |
| V\$PAX4_03 | | | 0.964 | aGGGTGgcgaca | Pax-4 |
| | 3771 (-) | | | GGTGG | Kid3 |
| V\$KID3_01 | 3773 (-) | | | | |
| V\$RFX1_02 | 3773 (-) 3801 (+) | 0.982 | 0.934 | gtgtgacggcaGAAACgt | RFX1 |
| | 3773 (-) | 0.982 0.993 | 0.934 0.994 | gtgtgacggcaGAAACgt AACTGagg | |
| V\$RFX1_02 V\$GEN_INI3_B V\$KID3_01 V\$PAX3_B | 3773 (-) 3801 (+) 3829 (-) 3852 (+) 3887 (-) | 0.982 0.993 1.000 1.000 | 0.934 0.994 1.000 0.854 | gtgtgacggcaGAAACgt AACTGagg CCACG aaggagagCGTGAataagctc | RFX1 GEN_INI Kid3 Pax-3 |
| V\$RFX1_02 V\$GEN_INI3_B V\$KID3_01 V\$PAX3_B V\$ETF_Q6 | 3773 (-) 3801 (+) 3829 (-) 3852 (+) 3887 (-) 3915 (-) | 0.982 0.993 1.000 1.000 | 0.934 0.994 1.000 0.854 1.000 | gtgtgacggcaGAAACgt AACTGagg CCACG aaggaggCGTGAataagctc CCGCCgc | RFX1 GEM_INI Kid3 Pax-3 ETF |
| V\$RFX1_02 V\$GEN_INI3_B V\$KID3_01 V\$PAX3_B | 3773 (-) 3801 (+) 3829 (-) 3852 (+) 3887 (-) | 0.982 0.993 1.000 1.000 1.000 | 0.934 0.994 1.000 0.854 1.000 | gtgtgacggcaGAAACgt AACTGagg CCACG aaggaggCGTGAataagctc CCGCCgc ccggcccCAGGCc | RFX1 GEN_INI Kid3 Pax-3 |
| V\$RFX1 02 V\$GEN INI3 B V\$KID3 01 V\$PAX3 B V\$ETF Q6 V\$AP2 Q6 01 | 3773 (-) 3801 (+) 3829 (-) 3852 (+) 3887 (-) 3915 (-) 3941 (+) | 0.982 0.993 1.000 1.000 1.000 0.817 | 0.934 0.994 1.000 0.854 1.000 0.996 0.845 | gtgtgacggcaGAAACgt AACTGagg CCACG aaggaggCGTGAataagctc CCGCCgc ccggcccCAGGCc | RFX1 GEN_INI Kid3 Pax-3 ETF AP-2 |

| V\$ETF_Q6 | 4011 | | | | CCGCCgc | ETF |
|---|--|---|--|---|--|---|
| V\$ETF_Q6 | 4014 | | | | CCGCCgc | ETF |
| V\$KROX_Q6 V\$PAX4 03 | 4024 | | | 0.959 0.989 | - 5 - 5 | RROX Pax-4 |
| V\$SPZ1_01 | 4054 4056 | | | | ggtcccCACCCc tccccacCCCCCgcc | Spz1 |
| V\$SP3_Q3 | 4058 | | | 0.897 | | Sp3 |
| V\$CACD_01 | 4059 | | | | ccaCCCCC | CACD |
| <u>V\$KID3_01</u> | 4059 | | | 1.000 | | Kid3 |
| V\$MEF2_03 | 4070 | | | 0.967 | | MEF-2 |
| V\$RSRFC4_Q2 V\$CDXA_02 | 4074 4078 | | | 0.949 1.000 | | RSRFC4 CdxA |
| V\$ GREE 02 | 4112 | | | 0.984 | | GRIPE |
| V\$CREE_Q4_01 | 4113 | | | 0.983 | | CREB |
| V\$ATF6_01 | 4116 | | | 0.917 | TGACGtcg | ATF6 |
| V\$ZF5_B | 4125 | | | 0.846 | | ZF5 |
| <u>V\$ETF_Q6</u> V\$ZF5_B | 4165 4181 | | | | CCGCCgc acGCGCGcctata | ETF ZF5 |
| V\$ETF_Q6 | 4198 | | | 1.000 | | ETF |
| V\$PAX5_02 | 4244 | | | 0.744 | | Pax-5 |
| | 4252 | | 0.818 | 0.844 | caggtaagCGGGAcggaccag | Pax-3 |
| <u>V\$SPZ1_01</u> | 4327 | | | 0.971 | ggcGGCGGgtggggc | Spz1 |
| <u>V\$ETF_Q6</u> V\$PAX4_03 | 4328 | | | 1.000 0.984 | gcGGCGG | ETF |
| | 4332 4334 | | | 1.000 | cGGGTGgggcgg GGTGG | Pax-4 Kid3 |
| V\$PAX4_03 | 4351 | | | 0.999 | gGGGTGgggatg | Pax-4 |
| V\$KID3_01 | 4353 | | | 1.000 | | Kid3 |
| V\$KROX_Q6 | 4357 | | | 0.952 | gggatGGGGGgga | KROX |
| V\$DR3_Q4 | 4370 | | | 0.848 | | VDR, CAR, PXR |
| <u>V\$HIC1_02</u> V\$PPARA_02 | 4371 4372 | | | 0.987 0.841 | | <u>HIC1</u> PPARalpha:RXRalpha |
| V\$LRF_Q2 | 4373 | | | 0.989 | | LRF |
| V\$VDR_Q3 | 4374 | | | 0.915 | | VDR |
| V\$ZF5_B | 4423 | (+) | | 0.874 | | ZF5 |
| V\$LMO2COM_01 | 4433 | | | 0.999 | | Lmo2 complex |
| <u>V\$AP2_Q6_01</u> V\$WT1_Q6 | 4505 4505 | | | 0.988 0.999 | | AP-2 WT1 |
| V\$AP2_Q6 | 4506 | | | 0.932 | | AP-2 |
| | 4549 | | | | AAGTGagg | GEN_INI |
| | 4581 | | | 0.959 | | KROX |
| V\$FXR_Q3 | 4611 | | | 0.852 | | FXR/RXR-alpha |
| V\$MAF_Q6_01 | 4612 | | | 0.983 | | MAF |
| | 4613 4663 | | | 0.991 0.769 | | <mark>AP-1</mark> Tax/ <mark>GRBE</mark> |
| V\$PAX4_03 | 4665 | | | 0.997 | | Pax-4 |
| V\$CACD_01 | 4670 | | | 0.973 | | CACD |
| V\$KID3_01 | 4670 | | | 1.000 | | Kid3 |
| V\$SP1_Q2_01 | 4700 | | | 0.993 | | SP1 |
| <u>V\$STAT1_01</u> V\$PAX5_02 | 4722 4733 | | | 0.848 0.773 | | STAT1 Pax-5 |
| V\$CP2 02 | 4735 | | | 0.903 | | CP2/LBP-1c/LSF |
| V\$KID3_01 | 4764 | | | 1.000 | | Kid3 |
| V\$SP1_Q2_01 | 4810 | | | 1.000 | gggGGCGGgg | SP1 |
| V\$SP1_Q2_01 | 4834 | | | 1.000 | ccCCGCCcc | SPI |
| | | | | | | |
| | 4835 | | 1.000 | | cccgCCCCacgcc | KROX |
| V\$CACD_01 | 4842 | (+) | 0.983 | 0.988 | ccaCGCCC | CACD |
| | | (+) (+) | 0.983 1.000 | | CCACGCCC | |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CETS1P54_03 V\$GABP_B | 4842 4842 4849 4852 | (+) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 | ccaCGCCC CCACG cccgcCGGAAgtgccc gccGGAAGtgcc | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP |
| V\$CACD_01 V\$RID3_01 V\$CETS1P54_03 V\$GABP_B V\$TEL2_Q6 | 4842 4842 4849 4852 4853 | (+) (+) (+) (+) (-) | 0.983 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 | ccaCGCCC CCACG cccgcCGGAAgtgccc gccGGAAGtgcc ccgGAAGtgc | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Te1-2 |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET51P54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_06 V\$LRF_02 | 4842 4842 4849 4852 4853 4858 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgcCGGAAgtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCCC | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Te1-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 0.986 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG CCCGGAAGtgcc gccGGAAGtgc ccgGAAGtgc ccgGACCCC cttTGACCGCca | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |
| V\$CACD_01 V\$KID3_01 V\$CET\$IP54_03 V\$CABP_B V\$TEL2_Q6 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 V\$LRF_Q2 | 4842 4849 4852 4853 4858 4877 | (+) (+) (+) (+) (-) (+) (+) | 0.983 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.988 1.000 0.983 0.987 0.894 0.989 | ccaCGCCC CCACG CCACG cccgCGGAAGtgccc gccGGAAGtgc ccgGAAGTgc agtgCCCC cttTGACGtca ctttgacgTCACGgccctctg tgaCGTCAcgg | CACD Kid3 c-Ets-1 p54 GABP Tel-2 LRF |

| V\$PAX3 B | 5389 (-) | 0.815 | 0.835 | agggcaacCGTGGctttcgat | Pax-3 |
|-------------------|----------|-------|-------|-----------------------|-------------|
| V\$KID3 01 | 5397 (-) | 1.000 | 1.000 | CGTGG | |
| | () | | | | <u>Kid3</u> |
| <u>V\$SOX9_B1</u> | 5404 (-) | 1.000 | 0.958 | ttcgATTGTtactg | SOX9 |
| <u>V\$RFX1_02</u> | 5409 (+) | 0.982 | 0.961 | ttgttactgtgGGAACtg | RFX1 |
| V\$RFX1_02 | 5409 (-) | 0.992 | 0.933 | ttGTTACtgtgggaactg | RFX1 |
| V\$RBPJK_Q4 | 5416 (-) | 1.000 | 0.988 | tgtGGGAA | RBP-Jkappa |
| V\$ZF5_B | 5458 (-) | 0.922 | 0.931 | caGCACGcccacg | ZF5 |
| V\$EGR1_01 | 5462 (-) | 1.000 | 0.920 | acgCCCACgcgc | Egr-1 |
| V\$KID3_01 | 5466 (+) | 1.000 | 1.000 | CCACG | Kid3 |

(b) Matrice « cellules immunes minimisant les faux positifs » (156 sites putatifs identifiés) :

| (b) <u>Manice « centules</u> | IIIIIIIIIIII | CS 1111 | 111111118 | ant ies iaux positiis » (| 130 sites putatiis i |
|----------------------------------|--|---------|----------------|---|------------------------------------|
| matrix | nosition | goro | matriv | sequence (always the | factor name |
| identifier | • | | | (+)-strand is shown) | raccor name |
| | , , | | | ,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,, | |
| | | | | | |
| <u>V\$VDR_Q3</u> | 97 (-) | | | tgtcccgggtCCCCC | VDR |
| V\$GATA_Q6 | 304 (-) | | | cTTATCt | GATA |
| V\$TAL1BETAE47_01 | 419 (+) | | | gcgcaCAGATgctgag | Tal-1beta:E47 |
| V\$TAL1ALPHAE47_01 | 419 (+) | | | gcgcaCAGATgctgag | Tal-1alpha:E47 |
| V\$STAT_Q6 | 516 (-) | | | tccCAGAAaccct | STAT LEF1 |
| <u>V\$LEF1_Q2</u> V\$NFAT1_Q6 | 533 (-) 585 (+) | | 1.000 | | NFAT1 |
| V\$VDR Q3 | 615 (+) | | | | VDR |
| V\$MZF1_Q5 | 710 (-) | | | cTCCCCa | MZF1 |
| | 1098 (-) | | | gaaggaAACAAcag | FOXO4 |
| | | | | tGACGTct | ATF2:c-Jun |
| V\$STAT_Q6 | 1179 (+) | 1.000 | 0.999 | gtctcTTCTGgga | STAT |
| V\$CETS1P54_03 | 1232 (+) | 1.000 | 0.979 | tactcCGGAAgtggcc actcCGGAAgtgg | c-Ets-1 p54 |
| V\$CETS1P54_02 | 1233 (+) | 1.000 | 0.985 | actcCGGAAgtgg | c-Ets-1(p54) |
| V\$CETS1P54_01 | 1235 (+) | 1.000 | | tCCGGAagtg | c-Ets-1(p54) |
| <u>V\$DR3_Q4</u> | 1318 (+) | 1.000 | | cccgcacctccTGACCcccgc | VDR, CAR, PXR |
| <u>V\$SP1_Q6</u> | 1331 (-) | 1.000 | | acccCCGCCcaca | SP1 |
| V\$SP1_Q4_01 | 1331 (-) | 1.000 | | acccCCGCCcaca | SP1 |
| V\$SP1_Q6_01 | 1332 (-) | 1.000 | | cccCCGCca | SP1 |
| V\$SP1_Q2_01 | 1333 (+) | 1.000 | | ccCGCCcac | SP1 |
| V\$EGR2_01 V\$MAZR_01 | 1333 (-) | 1 000 | | ccgCCCACacac qqqqqGGGGGtcc | Egr-2 MAZR |
| V\$NFKAPPAB50_01 | 1366 (+) | 0.856 | | GGGGGtccc | |
| V\$NFKAPPAB50_01 | 1366 (-) | 1 000 | | gggggTCCCC | NF-kappaB (p50) NF-kappaB (p50) |
| V\$AP1_Q2_01 | 1175 (+) 1179 (+) 1232 (+) 1233 (+) 1235 (+) 1338 (+) 1331 (-) 1332 (-) 1332 (-) 1335 (-) 1361 (+) 1366 (+) 1366 (-) 1567 (+) 1567 (-) | 1.000 | | ccggctgAGTCA | AP-1 |
| V\$AP1_01 | 1567 (+) | 1.000 | | ggctgAGTCAccg | AP-1 |
| V\$AP1_01 | 1567 (-) | 0.968 | | ggcTGAGTcaccg | AP-1 |
| V\$MAF_Q6_01 | 1567 (+) | 1.000 | | ggctgAGTCAc | MAF |
| V\$ <mark>AP1</mark> FJ_Q2 | 1568 (-) | 1.000 | 0.993 | gctgaGTCACc | AP-1 |
| V\$ <mark>AP1_Q</mark> 2 | 1568 (-) | 1.000 | 0.984 | gctgAGTCAcc | AP-1 |
| <u>V\$<mark>AP1</mark>_Q6</u> | 1567 (+) 1568 (-) 1568 (-) 1568 (-) | 1.000 | 0.999 | gctgAGTCAcc gctgAGTCAcc gctgAGTCAcc | AP-1 |
| <u>V\$AP1_Q4</u> | 1568 (-) | 1.000 | 0.996 | gctgAGTCAcc | <u>AP-1</u> |
| | 1569 (+) | | | ctgAGTCAc | AP-1 |
| | 1569 (-) | | | cTGAGTcac | AP-1 |
| V\$AP1_Q6_01 | 1569 (-) | 1.000 | | ctgAGTCAc | AP-1 |
| V\$MZF1_02 | 1569 (-) 1579 (+) 1787 (-) 1825 (-) | 1.000 | | gggcgAGGGCag | MZF1 |
| V\$MZF1_Q5 V\$PU1_Q4 | 1925 (-) | 1 000 | | cTCCCCa | MZF1 PU.1 |
| V\$NFAT1_Q6 | 1831 (+) | 1 000 | | caaagAGGAAaacggaggc GGAAAa | NFAT1 |
| | 1859 (-) | | | tctctAGGGAa | EBF |
| | 1977 (-) | | 1.000 | | LEF1 |
| | | | | agcAGGAAggcatt | c-Ets-2 |
| V\$ETS1_B | 2009 (+) | 1.000 | | gcAGGAAggcatttg | c-Ets-1 |
| V\$ETS2_Q6 | 2010 (-) | 1.000 | 1.000 | caGGAAG | ETS2 |
| V\$HAND1E47_01 | 2084 (-) | 1.000 | 0.944 | aaatCCAGActatgca | Hand1:E47 |
| <u>V\$DR3_Q4</u> | 2098 (+) | 1.000 | 0.839 | cagggcctctcTGACCccatc | VDR, CAR, PXR |
| <u>V\$VDR_Q3</u> | 2100 (-) | 1.000 | 0.910 | | <u>VDR</u> |
| <u>V\$GATA3_02</u> | 2121 (-) | 1.000 | | ttTTATCttt | GATA-3 |
| V\$CETS1P54_03 | 2272 (-) | 0.988 | | cccacATCCGctccc | c-Ets-1 p54 |
| V\$MZF1_Q5 V\$CETS1P54_03 | 2008 (+) 2009 (+) 2010 (-) 2084 (-) 2098 (+) 2100 (-) 2121 (-) 2272 (-) 2283 (-) 3063 (-) 3063 (-) 3532 (+) 3541 (-) 3719 (-) | 1.000 | 1.000 | cTCCCCa | MZF1 c-Ets-1 p54 |
| V\$MZF1_Q5 | 3063 (-) | 1 000 | 0.956 1.000 | ccgctcTTCCGgccat cTCCCCa | MZF1 |
| V\$MZF1_Q5 | 3532 (-) | 1 000 | 1.000 | tGGGGAg | MZF1 |
| V\$VDR_Q3 | 3532 (+) | 0 953 | 0.933 | tggccacctTCCCC | VDR |
| V\$OLF1_01 | 3719 (-) | 0.961 | 0.919 | ccaggccccaCGGGAgtccag | 01f-1 |
| V\$PU1_Q6 | 3741 (-) | | 1.000 | | PU.1 |
| V\$CREBP1CJUN_01 | 3719 (-) 3741 (-) 3813 (-) 3816 (+) | | 0.891 | aaACGTCa | ATF2 : c-Jun |
| V\$STAT3_01 | 3816 (+) | 0.675 | 0.807 | cgtcaGGTCCaggaactgagg | STAT3 |
| V\$MZF1_02 | 3832 (+) | 1.000 | 0.985 | tgaggAGGGGgaa | MZF1 |
| <u>V\$STAT1_01</u> | 3953 (+) | | 0.845 | ccgcggttcCGGAAagttaac | STAT1 |
| <u>V\$STAT1_01</u> | 3953 (-) | | 0.878 | | STAT1 |
| <u>V\$SP1_01</u> | 4008 (-) | | 0.975 | | SP1 |
| V\$KROX_Q6 | 4024 (+) | | 0.959 | | KROX |
| V\$TATA_01 | 4077 (+) | | 0.977 | | TATA |
| V\$NFAT1_Q6 | 4091 (-) | | 1.000 | | NFAT1 |
| V\$TATA_01 | 4189 (+) | | 0.998 | ctATAAAagccgccg | TATA KROX |
| <u>V\$KROX_Q6</u> V\$DR3_Q4 | 4357 (-) 4370 (-) | | 0.952 | 333 | VDR, CAR, PXR |
| V\$DR3_ <u>04</u> V\$PPARA_02 | 4370 (-) | | 0.848 | | PPARalpha:RXRalpha |
| V\$VDR_Q3 | 4374 (+) | | 0.915 | | VDR |
| V\$LMO2COM_01 | 4433 (-) | | 0.999 | | Imo2 complex |
| V\$E12_Q6 | 4433 (-) | | | cagcACCTGcc | E12 |
| V\$E2A_Q6 | 4436 (+) | | | CACCTgcc | E2A |
| V\$MAZR_01 | 4502 (-) | | | agaCCCCccccg | MAZR |
| V\$STAT3_03 | 4539 (+) | 0.990 | 0.932 | tctcccAGGAAagtga | STAT3 |
| V\$KROX_Q6 | 4581 (+) | | 0.959 | | KROX |
| V\$AP1_01 | 4610 (+) | | 0.970 | | AP-1 |
| V\$AP1_01 | 4610 (-) | | 0.974 | | <u>AP-1</u> |
| V\$AP1FJ_Q2 | 4611 (+) | | 0.993 | | AP-1 |
| V\$AP1_02 | 4611 (+) | | 0.984 | ggTGACTcagc | <u>AP-1</u> AP-1 |
| <u>V\$AP1_Q6</u> V\$AP1_Q4 | 4611 (+) 4611 (+) | | | ggTGACTcagc ggTGACTcagc | AP-1 |
| · 1 | (1) | | 0.000 | | |

| V\$AP1 C | 4612 | (+) | 0.989 | 0.991 | gtgACTCAg | AP-1 |
|---|--|--|---|--|--|---|
| V\$AP1_C | 4612 | | | 0.982 | gTGACTcag | AP-1 |
| V\$AP1_Q6_01 | 4612 | | | | gTGACTcag | AP-1 |
| V\$MAF_Q6_01 | 4612 | | | | gTGACTcagcc | MAF |
| V\$AP1 Q2 01 | 4613 | | | | TGACTcagcctc | AP-1 |
| V\$EGR2_01 | 4666 | | | | acgCCCACcccc | Egr-2 |
| V\$SP1_Q6 | 4698 | | 1.000 | 0.975 | acccCCGCCccgc | SP1 |
| V\$SP1_Q4_01 | 4698 | | | | acccCCGCCccgc | SP1 |
| V\$SP1_Q6_01 | 4699 | (-) | 1.000 | 0.992 | cccCCGCCcc | SP1 |
| V\$SP1_Q2_01 | 4700 | (+) | 1 000 | 0 993 | ccCCGCCca | SP1 |
| V\$STAT1_01 | 4722 | (-) | 1.000 | 0.848 | cgccctTCCCGgcaggtccc | STAT1 |
| V\$STAT3_03 | 4723 | (-) | 1.000 | 0.970 | gccccTTCCCggcagg | STAT3 |
| V\$SP1_Q6 | 4809 | (+) | 1.000 | 1.000 | ggggGCGGggcc | SP1 |
| V\$SP1_Q4_01 | 4809 | (+) | 1.000 | 0.999 | ggggGGCGGggcc | SP1 |
| V\$SP1_Q2_01 | 4810 | (-) | 1.000 | 1.000 | gggGCGGgg | SP1 |
| V\$SP1_01 | 4811 | (+) | 1.000 | 0.971 | ggGGCGGggc | SP1 |
| V\$SP1_Q6_01 | 4811 | (+) | 1.000 | 1.000 | ggGGCGGggc | SP1 |
| V\$SP1_02 | 4811 | (+) | 1.000 | 0.995 | gGGCGgggcc | SP1 |
| V\$SP1_Q6 | 4832 | (-) | 1.000 | 0.998 | cgccCCGCCcca | SP1 |
| V\$SP1_Q4_01 | 4832 | (-) | 1.000 | 0.997 | cgccCCGCCcca | SP1 |
| V\$SP1_02 | 4832 | (-) | 1.000 | 0.999 | cgcccCGCCCc | SP1 |
| V\$SP1_01 | 4833 | (-) | 1.000 | 0.971 | gccCCGCCcc | SP1 |
| V\$SP1_Q6_01 | 4833 | (-) | 1.000 | 1.000 | geeCCGCCee | SP1 |
| V\$SP1_Q2_01 | 4834 | (+) | 1.000 | 1.000 | ccCCGCCcc | SP1 |
| V\$EGR_Q6 | 4835 | (-) | 1.000 | 0.995 | cccgCCCCCac | Egr |
| V\$KROX_Q6 | 4835 | (+) | 1.000 | 0.985 | cccgCCCCCacgcc | KROX |
| V\$EGR3_01 | 4838 | (-) | 1.000 | 0.872 | gcccCCACGccc | Egr-3 |
| V\$EGR2_01 | 4838 | (-) | 1.000 | 0.867 | gccCCCACgccc | Egr-2 |
| V\$CETS1P54_03 | 4849 | (+) | 1.000 | 0.983 | cccgcCGGAAgtgccc gCCGGAagtg | c-Ets-1 p54 |
| V\$CETS1P54_01 | 4852 | (+) | 1.000 | 0.995 | gCCGGAagtg | c-Ets-1 (p54) |
| V\$LEF1_Q2 | 4877 | (-) | 1.000 | 1.000 | CTTTGa | LEF1 |
| V\$CREBP1CJUN_01 | 4880 | (+) | 1.000 | 1.000 | tGACGTca | ATF2: c-Jun |
| V\$CREBP1 <mark>CJUN_</mark> 01 | 4880 | (-) | 1.000 | 1.000 | tgACGTCa | ATF2: c-Jun |
| V\$CREBP1 <mark>CJUN_</mark> 01 | 4896 | (+) | 1.000 | 1.000 | tGACGTca | ATF2 : <mark>c-Jun</mark> |
| V\$CREBP1 <mark>CJUN_</mark> 01 | 4896 | (-) | 1.000 | 1.000 | tgACGTCa | ATF2: c-Jun |
| V\$SP1_Q4_01 | 4928 | (+) | 1.000 | 0.970 | gccgGGCGGggca | SP1 |
| V\$SP1_Q6_01 | 4930 | (+) | 1.000 | 0.977 | cgGGCGGggc | SP1 |
| V\$DR3_Q4 | 1990 | , , | | 0 000 | | |
| | 4000 | (-) | 0.907 | 0.830 | agccgGGCAgccggggcgac | VDR, CAR, PXR |
| V\$SP1_01 | 5007 | (-) (-) | 1.000 | 0.830 | agccgGGCAgccggggcgac accCCGCCcg | VDR, CAR, PXR SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_Q6 | 5007 5102 | (-) (-) | 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 | agccgGGCAgccggggcgac accCCGCCcg ggccCCGCCccag | |
| \frac{\fir}{\fir}}}}}}}}}{\frac{\fir}}}}}}}}{\frac{\frac{\frac{\frac{\frac{\frac{\frac{\frac{\f{\frac{\frac} | 5007 5102 5102 | (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 | 0.980 0.986 0.987 | agccgGGGCAgccggggcgac accCGCCcg ggccCGCCccag qqccCGCCccaq | SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_Q6 V\$SP1_Q4_01 V\$SP1_02 | 5007 5102 5102 5102 | (-) (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 | agccGGGCAgccggggcgac accCCGCCcg ggccCCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCCc | SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 | (-) (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 | agccgGGCCAgccggggcgac accCCGCCccag ggccCCGCCccag ggccCGCCCccag ggccCGCCCc | <u>SP1</u> <u>SP1</u> <u>SP1</u> |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 | (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 | agccgGGGCAgccggggcgac accCGCCCca ggccCCGCCccag ggccCGCCCcc gccCCGCCcc gccCCGCCcc | SP1 SP1 SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_04 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 | agccgGGCAgccgggggac accCGCCccg ggccCGCCccag ggccCGCCccag gccCGCCcc gccCGCCcc | SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.917 | agccgGGCAgccggggcgac accCGCCcca ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc ccCCGCCcca | SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.917 0.910 | agccgGGCAgccggggcgac accCCGCCcag ggccCCGCCccag ggccCCGCCccag ggccCCGCCcc gccCCGCCcc gccCCGCCcca GGGGAcccc | SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_04 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.917 0.910 0.999 | agccgGGCCagcagggggac accCGCCcag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gccCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCCcc gcGGAcccc gggaCCCCC | SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_001 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.917 0.910 0.999 | agccgGGCAgccgggggac accCGCCccg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc ccCGCCcca GGGGAcccc ggggaCCCCC ggccCGCCccc | SP1 SP3 SP3 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_04 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 5172 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.917 0.910 0.999 0.999 | agccgGGCCAgccggggggac accCGCCCcag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcca ggggacCCCC ggccCGCCcca ggggacCCCC ggccCGCCccc ggccCGCCccc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 5172 5172 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.917 0.910 0.999 0.999 0.999 | agccgGGCAgccggggcgac accCCGCCcg ggccCCGCCccag ggccCCGCCccag gccCCGCCcc gccCGCCcca GGGAcccc GGGGAcccc ggccCGCCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCCC | SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02 | 5007 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 5172 5173 5173 | (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (-) (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.917 0.910 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 | agccgGGCAgccgggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_04 01 V\$SP1_04 01 V\$SP1_02 01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 5172 5173 5173 5174 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (-) (-) (-) (-) (-) (+) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.917 0.910 0.999 0.995 0.995 0.975 | agccGGGCAgccgggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc ccCGCCcca GGGGAccacc gggaCCCCC ggccCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCccc ggccCGCCccc ggccCGCCccc ggccCGCCccc ggccCGCCccc gccCGCCcc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_04 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 5172 5173 5173 5174 5175 | (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.917 0.910 0.999 0.995 0.971 1.000 0.993 | agccgGGCAgccggggcgac accCCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5172 5172 5173 5173 5174 5175 5230 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (-) (-) (-) (-) (+) (+) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.997 1.000 0.990 0.910 0.999 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1. | agccgGGCAgccgggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gcCGCCcc gggaCCCC ggcCCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_04 01 V\$SP1_04 01 V\$SP1_02 01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_02 01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 5172 5173 5173 5174 5175 5230 5252 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (+) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.910 0.999 0.999 0.999 0.999 0.997 1.000 1.000 0.930 0. | agccgGGCCagcaggggac accCGCCcag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc ccCGCCcca GGGCAcccc ggggaCCCCC ggccCGCCcca ggccCGCCcca ggccCGCCcca ggccCGCCcca ggccCGCCccca ggccCGCCccca gccCGCCccc gccCGCCccc gccCGCCccc gccCGCCcc ccCGCCccc ccCGCCccc ccCGCCccc ccCGCCCcc cccCGCCCcc cccCGCCCcc cccCGCCCC | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_04 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 5172 5173 5174 5175 5230 5252 5309 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (-) (-) (-) (-) (+) (+) (+) (+) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.910 0.999 0.995 0.971 1.000 0.993 0.971 1.000 0.963 0.872 0.977 | agccgGGCAgccgggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gccCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCC | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_06 | 5007 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5172 5173 5173 5174 5175 5230 5252 5309 5309 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 1.000 1.000 0.963 0.963 0.972 0.982 0.980 | agccGGGCAgccgggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gcCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCCcc cccGCCccc cccGCCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_04 V\$SP1_04_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 | 5007 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5173 5173 5174 5175 5230 5252 5309 5309 5310 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.990 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 0.995 0.971 0.995 0.977 | agccgGGCAgccgggcgac accCGCCcg ggccCGCCcag ggccCGCCcag ggccCGCCcag ggccCGCCcc gccCGCCcc ccCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCccc ggccCGCCccc ggccCGCCccc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc ccCGCCcc ccCGCCcc ccCGCCcc ccCGCCcc ccCGCCcc ccCGCCcc ccCGCCCc gccCGCCCGC gccCGCCCCGC gccCGCCCC | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 | 5007 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5172 5173 5174 5175 5230 5252 5309 5310 5312 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.917 0.919 0.999 0.999 0.997 1.000 1. | agccGGGCAgccgggcgac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc | SP1 SROX |
| V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06 V\$SP1_02_01 V\$SSP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 | 5007 5102 5102 5103 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5173 5174 5175 5230 5252 5309 5310 5316 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.990 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 1.000 1.000 0.963 0.872 0.892 0.977 0.970 0.977 0.948 | agccGGGCAgccagggcgac accCGGCCcag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gcCGCCcc ggcCGCCcc ggcCGCCCcc ggcCGCCCCc ggcCGCCCcc ggcCGCCCc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 | 5007 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 5173 5174 5175 5230 5252 5309 5310 5312 5316 5334 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.856 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 1.000 0.990 1.000 1.000 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 0.963 0.872 0.977 0.982 0.977 0.982 0.977 | agccgGGCCAgccgggcgac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc GCCCcca GGGGAcccc ggccCGCCcca GGGCCCcca GGCCCCCcca GGCCCCCCcca GGCCCCCCCcca GGCCCCCCCcca GGCCCCCCCCC GGCCCCCCCCCC | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$S | 5007 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5146 5172 5172 5172 5173 5174 5175 5230 5252 5309 5309 5310 5312 5316 5334 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.917 0.919 0.999 0.999 1.000 1. | agccgGGGCAgccgggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gccCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCCGCCcc gccCGCCCcc gccCCGCCcc gccCCGCCcc gccCCGCCcc gccCCGCCcc gccCCGCCcc gccCCGCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCccc gcCCCCCCCC | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_ | 5007 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5172 5173 5173 5230 5252 5309 5310 5312 5316 5334 5334 5341 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.997 0.917 0.919 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 1.000 0.963 0.872 0.872 0.980 0.977 0.980 0.977 0.980 0.977 0.948 1.000 1.000 0.967 | agccgGGCCAgccgggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCCc gccCCCCCCCc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06_01 | 5007 5102 5102 5102 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5172 5173 5174 5175 5230 5252 5309 5310 5312 5334 5334 5334 5334 5369 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.986 0.995 0.971 1.000 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 0.963 0.872 0.977 0.980 0.997 0.994 0.997 0.994 0.997 | agccgGGCCAgcagggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCccc gcCCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCcc gccCCCCCCCC | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06 | 5007 5102 5102 5103 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5173 5173 5173 5230 5252 5316 5312 5316 5334 5341 5334 5346 5334 5346 5346 5346 5346 5334 5346 5346 5346 5346 5334 5346 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.917 0.919 0.999 0.999 0.997 1.000 1.000 1.000 1.000 0.977 0.980 0.977 0.980 0.977 0.980 0.974 0.948 1.000 0.967 0.967 0.998 0.997 | agccGGGCAgccgggcgac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc ggcCCGCCcc gcCCGCCcc gcCCCCCCC gcCCCCCC gcCCCCCC gcCCCCCCC gcCCCCCCC gcCCCCCCC gcCCCCCCC gcCCCCCCC gcCCCCCCC gcCCCCCCC gcCCCCCCC gcCCCCCCC gcCCCCCCCC | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 V\$SP1_01 V\$SP1_06 | 5007 5102 5102 5103 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5173 5173 5173 5230 5309 5310 5316 5334 5341 5369 5369 5369 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.999 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 1.000 0.963 0.872 0.980 0.977 0.980 0.977 0.980 0.977 0.998 0.998 0.997 0.998 | agccGGGCCAgccagggcgac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCCGCCcc gccCCGCCCcc gccCCGCCCc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06_01 | 5007 5102 5102 5103 5104 5146 5172 5173 5173 5173 5173 5173 5230 5309 5309 5316 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.986 0.995 0.971 1.000 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 0.963 0.872 0.977 0.980 0.997 0.940 0.940 0.940 0.940 0.940 0.940 0.997 0.998 0.997 | agccgGGCCAgccagggcgac accCCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gcCCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc ggcCCGCCcca ggccCGCCccag ggccCGCCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_06_01 | 5007 5102 5102 5103 5103 5103 5104 5172 5172 5173 5173 5173 5230 5252 5316 5312 5316 5334 5341 5349 5369 5369 5369 5369 5369 5370 5370 5370 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.917 0.919 0.999 0.999 0.997 1.000 1.000 1.000 1.000 0.963 0.872 0.872 0.872 0.980 0.977 0.980 0.977 0.948 1.000 0.967 0.997 0.999 0.999 0.995 | agccGGGCAgccgggcgac accCGCCcg ggccCGCCcag ggccCGCCcag ggccCGCCcag ggccCGCCca gccCGCCca gccCGCCca GGGAcccc GGGAcccc ggccCGCCca GGGCCca GGCCCCca GGCCCCC GgcCCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCcc ggccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02 V\$SP1_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06 V\$SP1_06_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02_01 | 5007 5102 5102 5103 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5173 5173 5173 5174 5175 5230 5309 5310 5316 5334 5341 5369 5370 5369 5370 5370 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.999 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 0.963 0.872 0.872 0.980 0.977 0.980 0.977 0.980 0.977 0.998 0.997 0.999 0.995 1.000 | agccgGGCCAgccgggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gcCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCCCCCC | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 | 5007 5102 5103 5103 5104 5146 5172 5173 5173 5173 5173 5230 5312 5316 5334 5334 5334 5334 5334 5334 5336 5369 5369 5369 5370 5370 5370 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.986 0.995 0.971 1.000 0.917 0.910 0.995 0.971 1.000 1.000 0.963 0.872 0.977 0.980 0.995 0.977 0.940 0.948 1.000 1.000 0.968 0.997 0.998 0.997 | agccgGGCCAgcagggggac accCCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gccCGCCcc gcCCGCccc gcCCGCCcc gcCCGCCcc gcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gcCCGCCCcc gcCCCCCCcc gcCCCCCCc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_04 V\$SP1_04_01 V\$SP1_04_01 V\$SP1_02 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 | 5007 5102 5102 5103 5103 5103 5104 5172 5172 5173 5173 5173 5173 5230 5252 5316 5334 5341 5334 5349 5369 5369 5369 5370 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.999 0.999 0.999 0.999 1.000 1.000 1.000 0.977 0.980 0.977 0.980 0.977 0.980 0.977 0.980 0.997 0.999 0.995 0.997 1.000 0.997 0.999 0.995 0.997 0.990 0.997 0.999 0.997 0.999 0.995 0.997 0.990 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.971 1.000 1.000 0.908 0.908 0.908 0.908 0.908 0.909 0.909 0.909 0.909 0.909 0.909 0.9000 0.900 0.900 0.900 0.900 0.900 0.900 0.900 0.900 0.90000 0.9000 0.9000 0.9000 0.9000 0.9000 0.9000 0.9000 0. | agccgGGCCAgccgggcgac accCCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gccCGCCcca GGGAcccc GGGAcccc ggccCGCCcca GgcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc ggccCGCCcc ggcCCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCcc gcCCCCCcc | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_02 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_06 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_06_01 V\$SP1_02_01 V\$SP1_02_01 V\$SP3_01 | 5007 5102 5102 5103 5103 5103 5104 5146 5172 5172 5173 5173 5173 5174 5175 5230 5309 5310 5316 5334 5341 5369 5370 5369 5370 5370 5371 5372 5462 5462 5462 5463 5472 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.986 0.986 0.987 0.995 0.971 1.000 0.999 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 0.963 0.872 0.997 0.980 0.977 0.980 0.977 0.980 0.977 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.999 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0. | agccgGGCCAgccgggggac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCCGCCcc gccCCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCc gccCCGCCc gccCGCCCc gccCGCCCc gccCGCCCc gccCGCCCc gccCGCCCc gccCCGCCc gccCCGCCc gccCCGCCCc gccCCGCCCc gccCCGCCCc gccCCGCCCc gccCCCCCC | SP1 SP1 |
| V\$SP1_01 V\$SP1_02 V\$SP1_04_01 V\$SP1_06_01 | 5007 5102 5103 5103 5104 5146 5172 5173 5173 5173 5173 5173 5230 5310 | (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) (-) | 1.000 | 0.830 0.980 0.986 0.986 0.995 0.971 1.000 0.999 0.999 0.995 0.971 1.000 1.000 0.963 0.872 0.977 0.980 0.940 1.000 1.000 0.940 0.940 1.000 1.000 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.997 0.998 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9998 0.9997 0.9980 0.9980 0.9880 0.9 | agccgGGCCAgccgggcgac accCGCCcg ggccCGCCccag ggccCGCCccag ggccCGCCcca gccCGCCcca gccCGCCcca GGGAcccc GGGAcccc ggccCGCCcca GgcCCGCCcc gccCGCCcc ggcCCGCCcc gccCGCCcc gccCGCCCcc gccCGCCCc gccCCCCC gcCCCCC gcCCCCCC gcCCCCC gcCCCCCC gcCCCCC gcCCCCCC gcCCCCC gcCCCCC gcCCCCC gcCCCCCC gcCCCCC gcCCCCCC gcCCCCCC gcCCCCCC gcCCCCC gcCCCCCC gcCCCCCC gcCCCCCC gcCCCCCC gcCCCCC gcCCCCC gcCCCCC gcCCCCC gcCCCCCC gcCCCCC gcCCCCCC gcCCCCC | SP1 SP1 |

Annexe 2 : Résultats du séquençage de la région promotrice putative des miR-132 et miR-212 et alignement des séquences clonées à la séquence de référence « ref|NT_010718.16| Homo sapiens chromosome 17 genomic contig, GRCh37 reference primary assembly »

Le brin du dessus représente la séquence clonée dans le pSKoriTKan; le brin du dessous représente la séquence de référence. Les substitutions ou insertions/délétions dans la séquence amplifiée par PCR par rapport à la séquence de référence sont surlignées en gris.

Clone 2

Score = 3707 bits (2007), Expect = 0.0 Identities = 2021/2027 (99%), Gaps = 3/2027 (0%)

| | Query 46 | |
|--|--------------------------------|------|
| TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCCGCTCTTCCGGCCATGCCTTG | 105 | |
| TOOTOTOON CITTON CITTON CONTINUES OF CONCOUNT CONCOUNT CONTINUES OF CONCOUNT CONCOUN | Sbjct 1559024 | 100 |
| TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCCGCTCTTCCGGCCATGCCTTGCACAGCCCTCCCCATCCTGGTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTTAGACCC | 1558965 Query 165 | 106 |
| | Sbjct 1558964 | |
| CACAGCCCTCCCCATCCTGGTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTTAGACCC | 1558905 Query | 166 |
| TTCCTCCATCTCGATGGAGCCAGGCCAGGACCATGCATTTCCCCGCTCCCAACCA | 225 | 100 |
| | Sbjct 1558904 | |
| TTCCTCCATCTCGATGGAGCCAGGCTGGGCCAGGACCATGCATTTCCCCGCTCCCAACCA | 1558845 Query | 226 |
| GGGGAACTGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA | 285 | |
| | Sbjct 1558844 | |
| GGGGAACTGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA | 1558785 Query | 286 |
| CTTCTCCAGGAAACCGTCCTCATCCCCTGGGGGCCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC | 345 | |
| | Sbjct 1558784 | 246 |
| CTTCTCCAGGAAACCGTCCTCCTCATCCCCTGGGGGCCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC | 1558725 Query 405 | 346 |
| TCCTTCACTCTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT | Sbjct 1558724 | |
| TCCTTCACTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT | 1558665 Query | 406 |
| CCGAAGGTGGGTCCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCTC | 465 | 400 |
| | Sbjct 1558664 | |
| CCGAAGGTGGGTCCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCTC | 1558605 Query | 466 |
| CCTTGCTGAGGCTGCCCATTCCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCCAGCTCCCTC | 525 | |
| | Sbjct 1558604 | |
| CCTTGCTGAGGCTGCCCATTCCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCCAGCTCCCTC | 1558545 Query | 526 |
| ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCCACCTTCCCCAACTTCTCT | 585 | |
| | Sbjct 1558544 | |
| ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCCACCTTCCCCAACTTCTCT | 1558485 Query | 586 |
| GCCGTCCCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTGGTACCTGAATCCCCGCTGGGCCTTCCCTCC | 645 | |
| GCCGTCCCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTGGTACCTGAATCCCCGCTGGGCCTTCCCTCC | Sbjct 1558484 1558425 Query | 646 |
| CAGGCCCAGGTTCCTCCGCTAAAGACTCCTGGGCTACTTTTGGGCTCCCCTACTCTTCTTC | 1558425 Query 705 | 040 |
| | Sbjct 1558424 | |
| CAGGCCCAGGTTCCTCCGCTAAAGACTCCTGGGCTACTTTTGGGCTCCCCTACTCTTCTTC | 1558365 Query | 706 |
| TCCCGGCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCACGGGAGTCCAGCTTC | 765 | |
| | Sbjct 1558364 | |
| TCCCGGCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCCACGGGAGTCCAGCTTC | 1558305 Query | 766 |
| CTCTCCTGCCCACCCTGCAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGCGGGGTGT | 825 | |
| | Sbjct 1558304 | |
| CTCTCCTGCCCACCCTGCAGGACGAGGGGGGGGGGGCACACCGCAGTGGCCTTGCGGGGGTGT | 1558245 Query | 826 |
| GACGCAGAAACGTCAGGTCCAGGAACTGAGGAGGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGAC | 885 | |
| | Sbjct 1558244 1558186 Ouerv | 886 |
| CCCCAGGAGCCGCGGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCGCCGCGC | 1558186 Query 945 | 000 |
| | Sbjct 1558185 | |
| CCCCAGGAGCCGCGGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCGCCGCGC | 1558126 Query | 946 |
| CCCTCCGCGCCCCCCGGCCCCAGGCCCGCGGTTCCGGAAAGTTAACCCCTTGTCGG | 1005 | |
| | Sbjct 1558125 | |
| CCCTCCGCGCCCCCCGGCCCCAGGCCCGCGGTTCCGGAAAGTTAACCCCTTGTCGG | 1558066 Query | 1006 |
| CTGGGCAGGGGCGCGCCCCTACCCCGCCGCCGCTCCCCCCCC | 1065 | |
| | Sbjct 1558065 | |
| CTGGGCAGGGGCGCGCTCCCCCTACCCCGCCGCCGCTTCCGCGCCCCCTCCTCCCCTCC | 1558006 Query | 1066 |
| CGGTCGCCTCGGTCCCCACCCCCGCCTCGCCACTATAAATAGCCCCTTTTCCCATTTCC | 1125 Sbjct 1558005 | |
| CGGTCGCCTCGGTCCCCACCCCCGCCTCGCCACTATAAATAGCCCCCTTTTCCCATTTCC | Sbjct 1558005 1557946 Query | 1126 |
| TAAATTCCCCGCTGACGTCGGCAGCGCTCAGTGTAGGAGCCGCGGCGCGCATGAATGA | 1185 | 1120 |
| | Sbjct 1557945 | |
| TAAATTCCCCGCTGACGTCGGCAGCGCTCAGTGTGTAGGAGCCGCGGCCGCATGAATGA | 1557886 Query | 1186 |
| GCCGCCGCACGAGTACTACGCGCGCCTATAAAGGCCGCCGCCGCCCAGGCTGCGGGAG | 1245 | |
| | Sbjct 1557885 | |
| GCCGCCGCACGAGTACTACGCGCGCCTATAAAAGCCGCCGCGCCGGCCAGGCTGCGGGAG | 1557826 Query | 1246 |
| GCGACCGGGCAGTGGCGACGCCGCCAGGTAAGCGGGACCAGCCGCGGAGGGA | 1305 | |
| | | |

| | 1306 |
|--|-------|
| CAGATGTGCGGACACGGACGGAGGACGAGGAGGGGGACGGCAGGCGGC | 1366 |
| CCCCTCCGGGGTGGGGATGGGGGCGACGGGGGCACCGGGGTCCCCTCGCGGCTGCGGA 1425 | |
| | |
| CCCCTCCGGGGTGGGGATGGGGGCGACGGGGGCACCGGGGTCCCCTCGCGGCTGCGGA 1557646 Query | 1426 |
| ACCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCATCTGCCGGCGCCCGATGGACACGCAG 1485 | |
| | 1 400 |
| GCCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGGCGCCCCGATGGACACGCAG 1557586 Query CTACTTCGGAGGACCACGAGGACCCTCGGAGACCCCCCCC | 1486 |
| | |
| CTACTTCGGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCCGGGACCCCCCCC | 1545 |
| GGGCTCCTGCGCCATTCTCCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCCAGGAGACGC 1604 | 1010 |
| | |
| GGGCTCCTGCGCCATTCTCCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCCAGGAGACGC 1557466 Query | 1605 |
| GCCCCTCCTCTCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAG 1664 | |
| | |
| GCCCCCTCCTCCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAG 1557406 Query | 1665 |
| CGGGGGTGCAGGCGAGAGACGGCCCACCCCCGCTTCCCCGGCCCTCCTGGGACCCCC 1724 | |
| | |
| CGGGGGTGCAGGCGAGAGACGGACGCCCACCCCGGCTTCCCCGGCCCTCCTGGGACCCCC 1557346 Query | 1725 |
| GCCCCGCATGGCGTCGGGCGCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGC 1784 | |
| | |
| GCCCCGCATGGCGTCGGGCGCCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGC 1557286 Query | 1785 |
| CCACGGCTTCCCGCCTCTGCGAGCGGAGCTGTCCTCTCAGGACCGGGGGGGG | |
| | 4045 |
| CCACGGCTTCCCGCCTCTGCGAGCGGAGCTGTCCTCTCAGGACCGGGGGGGG | 1845 |
| GCCAGGTCCCGCCCCCCCCCCCCCCGCCGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGA 1904 | |
| | 1005 |
| -ccaggtcccgccccacgccccacgccggaagtgcccctttgggacatctttga 1557167 Query | 1905 |
| CGTCACGGCCTCTGACGTCAGGGGCCGCGTGCCTGGTCGCGAGCGCGGGGCGGGGCAGG 1964 | |
| | 1005 |
| CGTCACGGCCCTCTGACGTCAGGGGCCGCGTGCCTGGTCGCGAGCCGGGCGGG | 1965 |
| GCGGGAGACGCAGGGGGGGGGCAGCAGCAGAGCCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGACCG 2024 | |
| GCGGGAGACGCAGGGGAGCAGCAGCAGAGCCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGACCG 1557047 Ouerv | 2025 |
| GGGCACCCCGCCGGACAGCGCGCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 2071 | 2025 |
| | |
| GGGCACCCCGCCCGGACACCGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 1557000 | |
| | |

Clone 6

Score = 3712 bits (2010), Expect = 0.0 Identities = 2022/2027 (99%), Gaps = 3/2027 (0%)

| | Quer y | 40 | |
|---|----------------|---------------------|-----|
| ${\tt TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCCCCTGCCCCGCTCTTCCGGCCATGCCTTG}$ | 105 | 1550004 | |
| TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCCGCTCTTCCGGCCATGCCTTG | Sbjct 15589 | 1559024 65 Ouerv | 106 |
| ${\tt CACAGCCCTCCCCATCCTGGTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTTAGACCC}$ | 165 | - | |
| | Sbjct | 1558964 | |
| CACAGCCCTCCCCATCCTGGTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTTAGACCC | 15589 | 05 Query | 166 |
| TTCCTCCATCTCGATGGAGCCAGGCCAGGCCATGCATTTCCCCGCTCCCAACCA | 225 | 4550004 | |
| | Sbjct | 1558904 | 226 |
| TTCCTCCATCTCGATGGAGCCAGGCTGGGCCAGGACCATGCATTTCCCCGCTCCCAACCA GGGGAACTGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA | 15588 285 | 45 Query | 226 |
| - | Sbict | 1558844 | |
| GGGGAACTGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA | 15587 | | 286 |
| CTTCTCCAGGAAACCGTCCTCCTCATCCCCTGGGGGCCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC | 345 | <u>2</u> 1 | |
| | Sbjct | 1558784 | |
| $\tt CTTCTCCAGGAAACCGTCCTCCTCATCCCCTGGGGGCCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC$ | 15587 | 25 Query | 346 |
| ${\tt TCCTTCACTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT}$ | 405 | | |
| | Sbjct | 1558724 | |
| TCCTTCACTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT | 15586 | 65 Query | 406 |
| $\tt CCGAAGGTGGGTCCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCTCT$ | 465 | 1550004 | |
| CCGAAGGTGGGTCCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCT | Sbjct 15586 | 1558664 05 Ouerv | 466 |
| CCGAAGGIGGGICCIGGAIGCCAGGCICIGGAGCGIGGCACIGACAGCCIIICCICICIC | 13300 | 02 Oner A | 400 |
| | | | |
| CCTTGCTGAGGCTGCCCATTCCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCCAGCTCCCTC | 525 | | |
| | Sbjct | 1558604 | |
| $\tt CCTTGCTGAGGCTGCCCATTCCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCCAGCTCCCTC$ | 15585 | 45 Query | 526 |
| $\tt ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCCACCTTCCCCAACTTCTCT$ | 585 | | |
| | Sbjct | 1558544 | |
| ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCCACCTTCCCCAACTTCTCT | 15584 | 85 Query | 586 |
| GCCGTCCCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTGGTACCTGAATCCCCGCTGGGCCTTCCCTCC | 645 | 1550404 | |
| GCCGTCCCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTGGTACCTGAATCCCCGCTGGGCCTTCCCTCC | Sbjct 15584 | 1558484 25 Ouerv | 646 |
| CAGGCCCAGGTTCCTCCGCTAAAGACTCCTGGGCTACTTTTGGGCTCCCCTACTCTTCTTC | 705 | 25 Query | 040 |
| | Sbict | 1558424 | |
| CAGGCCCAGGTTCCTCCGCTAAAGACTCCTGGGCTACTTTTGGGCTCCCCTACTCTTCTTC | 15583 | | 706 |
| | | ~ 1 | |

| Teccessocceccacageccecacagecceccacagecceccacageageccacageccacagecceccacagecceccacagecceccacagecceccacacagecceccacacaca | TCCCGGCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCCACGGGAGTCCAGCTTC | 765 | |
|--|--|---------------|------|
| CTCTCCTGCCCACCCTGCAGGACGAGAGGGTTGCGCACACCCCAGTGGCCTTGCCGGGTTGT 1558104 | | Sbjct 1558364 | 766 |
| | | | 766 |
| ### CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | | | |
| CACGGCAGAAACSTCAGGTCCAGGAACTGAGGAGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGACC 1558145 1558244 | | | 826 |
| 1558185 | GACGGCAGAAACGTCAGGTCCAGGAACTGAGGGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGACC | ~ - | |
| CCCAGGAGCCGCGGGGGTCCGGAAGACAGCGTGAATAAGCTGAAGGGCCCCGCCC 945 | | | |
| Spice 1558184 1558184 1558184 1558185 155818 | | | 886 |
| CCCAGEGAGCCCCGGGGCCCCAGGGCCGGGGTCCGGGGTCCGGGAGGGCCCCCTGCCGCCCCCCCC | | | |
| CCTCCGGCCGCCTCCCCGGCCCCAGGCCCGGGTTCCGGAAAGTTAACCCTTGTCGGC | | - | 0.16 |
| | | ~ - | 240 |
| 0.06 | | | |
| | CCTCCGCGCCCCCCCGGCCCCAGGCCCGCGGTTCCGGAAAGTTAACCCCTTGTCGGC | | 1006 |
| TGGGCAGGGGCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | TGGGCAGGGCGCGCCCCTACCCCGCCGCCGCTCCCCCCCC | 1065 | |
| GGTGGCTCGGTCCCCACCCCGCCTGCCACTATAAATAGCCCTTTTCCCATTCCT | | | |
| | | ~ - | 1066 |
| 126 | | | |
| AAATTCCCCGCTGACGCGCGCCGCTCAGTGTGTAGGAGCCGCCGCCCCATGAATGA | | | 1126 |
| | | ~ - | 1120 |
| AAATTCCCGGCTGACGGCGCCTCAGTGTGTAAGGGCCCGCGCGGCGGCGCGCATGAATGA | | | |
| | AAATTCCCCGCTGACGTCGGCAGCGCGTCAGTGTGTAGGAGCCGCGGCCGCATGAATGA | 1557885 Query | 1186 |
| 1246 1257782 1246 1268CCGGCAGGGAGGAGCGCCCCCCGCGGCGGCGGCGGCGGGGGG | CCGCCGCACGAGTACTACGCGCGCCTATAAAAGCCGCCGCCGGCCAGGCTGCGGGAGG | | |
| CGACCGGCAGTGGCGACGCCGCCAGGTAAGCGGGACGACCAGCCGCGGAGGGAC 1315 1557824 1557824 1557824 1557765 1557824 1557824 1557825 1557824 1557765 1557824 1557765 1557824 1557765 1557705 1557645 1557705 15 | | | |
| | | ~ - | 1246 |
| CGACCGGCAGTGGCGACGCCGCCAGGTAAGCGGACGACGACCGCGGAGGAC GAGATGTGCGGACACGGACGGAGGAGGAGGAGGAGGACGACGAGCGGCG | | | |
| AGATGTGCGGACAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGGCAGGCGGGGGG | | | 1306 |
| | | ~ - | 1000 |
| CCCTCCGGGGTGGGATGGGGGCGACGGGGCACCGGGGTCCCTCGCGGCTGCGGAG | | Sbjct 1557764 | |
| | AGATGTGCGGACACGGACGGAGGACGAGGGGGACGGCGGCGGGGGG | ~ - | 1366 |
| 1426 | | | |
| CCGGGGCCAGAGACGAGCCCGCAGCACCTGCCAGCGCCCGATGGACAGCAGC 1485 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557646 1557645 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557644 1557646 166764 16676 | | | 1/26 |
| | | ~ - | 1420 |
| 1486 | | | |
| | CCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGGCGCCCGATGGACACGCAGC | | 1486 |
| TACTTCGGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCCCCCCGGAGACCCCCCCC | TACTTCGGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCCCCCCC | 1544 | |
| GGGCTCCTGCGCCATTCTCCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCCAGGAGACGC | | | |
| | | ~ - | 1545 |
| GGGCTCCTGCGCCATTCTCCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGCCGCCCCAGGAGACGC 1557466 Query 1605 GCCCCCTCTCTCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGCTGCCGGGCCGGTGAG 1664 | | | |
| GCCCCTCCTCCCTCCCTGCGGCGGGTGACTCAGCCTCGCTGCCGGGCCGGCTGAG | | | 1605 |
| | | ~ - | 1000 |
| CGGGGGTGCAGGCGAGAGACGCCCACCCCGCTTCCCCGGCCCTCCTGGGACCCCC 1724 | | | |
| | GCCCCTCCTCCCTCCCTGCGGCGCGGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAG | 1557406 Query | 1665 |
| CGGGGGTGCAGGCGACGCCCACCCCCGCTTCCCCGGCCCTCCTGGGACCCCC GCCCCGATGGCGTCGGGCGCCCCTTCCCGGCAGTCCCGCCGCGCGCG | CGGGGGTGCAGGCGAGACGGCCCACCCCGCTTCCCCGGCCCTCCTGGGACCCCC | | |
| GCCCGCATGGCGTCGGGCGCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGGCGC 1784 | | | 1705 |
| | | ~ - | 1/25 |
| GCCCGCATGGCGTCGGGCGCCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGC CCACGGCTTCCCGCAGCGGAGCTGTCCTCCAGGACCGGGGGCCCCCCCC | | | |
| | GCCCGCATGGCGTCGGGCGCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGC | | 1785 |
| CCACGGCTTCCCGCCTCTGCGAGCGAGCTGTCCTCTCAGGACCGGGGGGGG | CCACGGCTTCCCGCCTCTGCGAGCGGAGCTGTCCTCTCAGGACCGGGGGGGG | 1844 | |
| GCCAGGTCCCGCCCCGCCCCACGCCCGCCGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGA 1904 | | | |
| | | | 1845 |
| -CCAGGTCCCGCCCCGCCCCACGCCCGCCGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGA 1557167 Query 1905 CGTCACGGCCCTCTGACGTCACGGGCCCGCTGCTGGTCGCGAGCGCCGGGCGAGG 1964 | | | |
| CGTCACGGCCCTCTGACGTCAGGGGCCGCGTGCCTGGTCGCGAGCGCCGGGCGGG | | | 1905 |
| | | | 1303 |
| GCGGGAGACGCAGGGGAGGCGGAGCAGAGCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGACCG 2024 | | | |
| | CGTCACGGCCCTCTGACGTCAGGGGCCGCGTGCCTGGTCGCGAGCGCCGGGCGGG | 1557107 Query | 1965 |
| GCGGGAGACGCAGGGGAGGCGGAGCAGAGCCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGACCG 1557047 Query 2025 GGGCACCCCGCCCGGACAGCGCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 2071 | GCGGGAGACGCAGGGGGAGCCGGAGCCGGAGCCGGGGCGACCG | | |
| GGGCACCCCGCCGGACAGCGCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 2071 | | | 2025 |
| | | 100/04/ Query | 2025 |
| 111111111111111111111111111111111111111 | | 16 | |
| 0000110000000001011000000000110011001010 | GGGCACCCGGCCGGACAGCGCGCGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 1557000 | - | |

Clone 14

Score = 3718 bits (2013), Expect = 0.0 Identities = 2022/2026 (99%), Gaps = 1/2026 (0%)

Query 47

| TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCCGCTCTTCCGGCCATGCCTTG | 106 | |
|--|---------------|-----|
| | Sbjct 1559024 | |
| TCCTGTGCACTTCACTCTTCGACCTTTCTCTCCCTGCCCGGCTCTTCCGGCCATGCCTTG | 1558965 Query | 107 |
| ${\tt CACAGCCCTCCCCATCCTGGTCCAGCTCCTCGTCTGAACACACTCCTCTCATTTAGACCC}$ | 166 | |
| | Sbjct 1558964 | |
| CACACCCCTCCCATCCTCGTCCACCTCCTCTCAACACACTCCTCTCATTTAGACCC | 1558905 Onerv | 167 |

| I I CC I CCA I C I CGA I GGAGCCAGGC I GGGCCAGGACCA I GCA I I I CCCCGC I CCCAACCA | 226 | |
|--|--------------------------------|-------|
| | | 227 |
| GGGGAACTGCCCCACAAGTCATGGGCTCTCCCTGCCAATTCTGGTCTCCGGGAACATTAA | 286 | |
| | | 287 |
| CTTCTCCAGGAAACCGTCCTCCTCATCCCCTGGGGGCCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC | 1558785 Query 346 | 207 |
| | | |
| CTTCTCCAGGAAACCGTCCTCCTCATCCCCTGGGGGCCCCTCTTGGCCAAGCTGCTGGTC CCCTTCACTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTACCACAAATGGT | 1558725 Query 406 | 347 |
| | | |
| CCTTCACTCTATTACCCTAACGTGAGCTCTGGGAGCGTCCATCGTGCCACAAATGGT | 1558665 Query | 407 |
| CCGAAGGTGGGTCCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCTC | 466 Sbjct 1558664 | |
| CCGAAGGTGGGTCCTGGATGCCAGGCTCTGGAGCGTGGCACTGACAGCCTTTCCTCTCTC | 1558605 Query | 467 |
| CCTTGCTGAGGCTGCCCATTCCTCTCACCCCTACCTCTGGCGCGTTCCCCCAGCTCCCTC | 526 | |
| | Sbjct 1558604 1558545 Query | 527 |
| ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGGGGTTGGCCCACCTTCCCCAACTTCTCC | 586 | 327 |
| | Sbjct 1558544 | |
| ATAGAGGATCCCGTTGCTCATCATTTCTGGGGAGGTTGGCCCACCTTCCCCAACTTCTCT CCCGTCCCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTGGTACCTGAATCCCCGCTGGGCCTTCCCTCC | 1558485 Query 646 | 587 |
| | | |
| GCCGTCCCTCGGGTCTCCAGCTCCTGGGTGGTACCTGAATCCCCGCTGGGCCTTCCCTCC | 1558425 Query | 647 |
| CAGGCCCAGGTTCCTCCGCTAAAGACTCCTGGGCTACTTTGGGCTCCCCTACTCTTCTTC | 706 Sbjct 1558424 | |
| CAGGCCCAGGTTCCTCCGCTAAAGACTCCTGGGCTACTTTTGGGCTCCCCTACTCTTCTTC | 1558365 Query | 707 |
| CCCGGCCCCGACGCCACAGCCCTCGCTGCGCCCCAGGCCCCACGGGAGTCCAGCTTC | 766 | |
| | Sbjct 1558364 1558305 Query | 767 |
| CTCTCCTGCCCACCCTGCAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGCGGGGTGT | 826 | 707 |
| | | |
| CTCTCCTGCCCACCCTGCAGGACGAGAGGGTGGCGACACCGCAGTGGCCTTGCGGGGTGT BACGGCAGAAACGTCAGGTCCAGGAACTGAGGAGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGACC | 1558245 Query 886 | 827 |
| | | |
| GACGGCAGAAACGTCAGGTCCAGGAACTGAGGAGGGGGAAGGGGCTGCCACGTGAAGACC | 1558185 Query | 887 |
| CCCAGGAGCCGCGGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCGCCGCGCCC | 946 Sbjct 1558184 | |
| CCAGGAGCCGCGGGGCTCCGGAAGGAGAGCGTGAATAAGCTCGAAGGGCCCGCCGCCC | 1558125 Query | 947 |
| CCTCCGCGCCCCCCCGGCCCCAGGCCCGCGGTTCCGGAAAGTTAACCCCTTGTCGGC | 1006 | |
| | Sbjct 1558124 1558065 Query | 1007 |
| GGGCAGGGGCGCGCTCCCCTACCCCGCCGCCGCTTCCGCGCCCCCTCCTCCC | 1066 | |
| | | 1067 |
| GGGCAGGGGCGCGCTCCCCCTACCCCGCCGCCCCTTCCGCGCCCCCTCCCCCCCC | 1558005 Query 1126 | 1067 |
| | | |
| GGTCGCCTCGGTCCCCACCCCCCCGCCTCGCCACTATAAATAGCCCCTTTTCCCATTTCCT AAATTCCCCGCTGACGTCGGCAGCGCGTCAGTGTGTAGGAGCCGCGGCCGCATGAATGA | 1557945 Query 1186 | 1127 |
| | | |
| AAATTCCCCGCTGACGTCGGCAGCGCGTCAGTGTTAGGAGCCGCGGCCGCATGAATGA | 1557885 Query | 1187 |
| CCGCCGCACGAGTACTACGCGCGCCCTATAAAAGCCGCCGCGCGGCCAGGCTGCGGGAGG | 1246 Sbjct 1557884 | |
| CCGCCGCACGAGTACTACGCGCGCCTATAAAAGCCGCCGCCGGCCAGGCTGCGGGAGG | 1557825 Query | 1247 |
| CGACCGGGCAGTGGCGACGCCGCCAGGTAAGCGGGACGGAC | 1306 | |
| | Sbjct 1557824 1557765 Ouerv | 1307 |
| AGATGTGCGGACACGGACGGACGACGAGGAGGACGGCAGGCGGCGG | 1366 | 100, |
| | | 1367 |
| AGATGTGCGGACACGGACGGGAGGACGAGGAGGGGCAGGCGGCGGTGGGGCGGC CCCTCCGGGGTGGGGATGGGGGGGGACGGGGGCACCGGGGTCCCCTCGCGGCTGCGGAG | 1557705 Query 1426 | 1367 |
| | | |
| CCTCCGGGGTGGGGATGGGGGCGGACGGGGCACCGGGGTCCCCTCGCGGCTGCGGAGCCGGGGCCAGACACGAGCCAGCAGCACCCGGCCCGATGGACACGCAGC | 1557645 Query 1486 | 1427 |
| | | |
| CCGGGGCCAGAGACGACACGAGCCCGCGCAGCACCTGCCGGCGCCCGATGGACACGCAGC | 1557585 Query | 1487 |
| TACTTCGGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCCCCCCC | 1546 Sbjct 1557584 | |
| TACTTCGGAGGAGCATCGAGTGGAGGACCGACCTCGGAGACCCCCCCC | 1557525 Query | 1547 |
| GGCTCCTGCGCCATTCTCCCAGGAAAGTGAGGCGAAGGTGCTGGCGCCCCAGGAGACGCG | 1606 | |
| | Sbjct 1557524 1557465 Query | 1607 |
| CCCCTCCTCTCCCTGCGGCGCGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAGC | 1666 | 1007 |
| | | 1667 |
| CCCCTCCTCTCCCTCCCTGCGGCGGGTGACTCAGCCTCGCTGCCCGGGCCGGCTGAGC GGGGGTGCAGGCGAGAGACGGGCCCCCCCCCC | 1557405 Query 1726 | 1667 |
| | Sbjct 1557404 | |
| GGGGGTGCAGGCGAGAGACGGACGCCCACCCCGCTTCCCCGGCCCTCCTGGGACCCCCG | 1557345 Query | 1727 |
| CCCCGCATGGCGTCGGGCGCCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGCC | 1786 Sbjct 1557344 | |
| CCCCGCATGGCGTCGGGCGCCCCTTCCCGGCAGGTCCCGTCCAGCGGGTCCCGCGGCGCCC | 1557285 Query | 1787 |
| CACGGCTTCCCGCCTCTGCGAGCGGAGCTGTCCTCTCAGGACCGGGGGGGG | 1846 Sbjct 1557284 | |
| CACGGCTTCCCGCCTCTGCGAGCGGAGCTGTCCTCTCAGGACCGGGGGGGG | 1557226 Query | 1847 |
| CCAGGTCCCGCCCGCCCCCCCCCCCGCCGGAAGTGCCCCCTCTGGGACATCTTTGAC | 1906 | |
| | Sbjct 1557225 1557166 Query | 1907 |
| | | - 0 / |

| GTCACGGCCCTCTGACGTCAGGGGCCGCTGCCTGGTCGCGAGCGCCGGGCGGG | |
|--|------|
| | |
| GTCACGGCCCTCTGACGTCAGGGGCCGCGTGCCTGGTCGCGAGCGCCGGGCGGG | 1967 |
| CGGGAGACGCAGGGGGAGCAGCAGAGCCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGACCGG 2026 | |
| | |
| CGGGAGACGCAGGGGGAGCAGCAGCAGAGCCCCCAGCCGGGGCAGCCGGGGCGACCGG 1557046 Query | 2027 |
| GGCACCCCGCCCGGACAGCGCCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 2072 | |
| | |
| GGCACCCCGCCCGGACAGCGCCCCGGCACCTTGGCTCTAGACTGCT 1557000 | |

Annexe 3 : Localisation des sites CREB importants pour la régulation transcriptionnelle des miR-132 et miR-212 dans les neurones corticaux murins stimulés par des neurotrophines.

La figure ci-dessous représente l'alignement des séquences humaines et murines encodant les miR-132 et miR-212. Les pre-miR-212 sont indiqués en bleu ciel, les pre-miR-132 en bleu foncé et les sites CREB conservés chez l'homme et la souris et mis en évidence par (Remenyi et al., 2010) sont surlignés en rouge. La flèche rouge située au milieu du pre-miR-212 représente l'extrémité 3' de la région promotrice putative clonée dans la construction rapportrice réalisée au cours de ce mémoire. La région surlignée en gris représente un site de liaison putatif pour le répresseur transcriptionnel REST détecté lors de l'analyse de cette séquence par le logiciel Transfac.

