Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

La régulation transcriptionnelle du développement post-embryonnaire chez le nématode Caenorhabditis elegans

Franche, Jérémy

Award date:
2017

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
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: 02. May. 2026

UNIVERSITÉ DE NAMUR

Faculté des Sciences

LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU DEVELOPPEMENT POST-EMBRYONNAIRE CHEZ LE NEMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Jérémy FRANCHE

Janvier 2017

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - http://www.unamur.be

La régulation transcriptionnelle du développement post-embryonnaire chez le nématode *Caenorhabditis elegans*

Franche Jérémy

Résumé

Le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II est composé de répétitions d'un heptapeptide consensus $Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$. La phosphorylation de ces résidus (notamment les sérines) assure le couplage entre la transcription et de la maturation des ARNm. La phosphorylation de la sérine 2 (S2) est une étape importante associée à l'élongation, à l'épissage et à la terminaison de la transcription. Cependant, des études récentes suggèrent que cette modification n'est pas indispensable pour la survie, en tous cas chez des organismes unicellulaires.

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans* la phosphorylation de la S2 est effectuée par la kinase CDK-12. La perte de fonction de cette kinase entraine chez le ver un arrêt développemental au stade L1. Les embryons se développent correctement, éclosent mais sont incapable d'initier le développement larvaire. Un arrêt en L1 est également observé en condition physiologique : lorsque les embryons éclosent en absence de nourriture, les larves stoppent leur développement au stade L1. Pour étudier le rôle de la phosphorylation de la S2, un mutant conditionnel de *cdk-12* (*cdk-12as*) a été généré en utilisant un allèle « analog-sensitive ». Ce mutant permet de spécifiquement inhiber la kinase CDK-12 simplement par l'ajout d'un inhibiteur synthétique analogue d'ATP, ce qui se traduit par un arrêt développemental au stade L1.

Une expérience d'ARNi à l'échelle du génome a été menée dans des conditions où Cdk-12 est inhibée avec l'objectif d'identifier des suppresseurs de l'arrêt. Sur environ 19000 gènes testés, 126 ont été positifs lors du criblage primaire et 34 ont été confirmés lors d'un second criblage. Trois candidats *rbr-2*, *pgl-1* et *panl-2* ont été sélectionnés pour analyses complémentaires. Un mutant disrupté pour *rbr-2* ne confirme pas la suppression observée en interférence ARN. L'analyse de nos résultats permet de proposer des hypothèses concernant le rôle de la phosphorylation du CTD dans le développement post-embryonnaire chez le nématode.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire
Janvier 2017
Promoteur : D. Hermand

Remerciements

Tout d'abord, je remercie le docteur Damien Hermand pour son accueil dans le laboratoire de GEMO et de m'avoir donné de fantastiques opportunités comme de réaliser certaines expériences à l'ENS de Lyon. Je le remercie pour le temps qu'il a pris pour relire mon mémoire.

Je remercie Valérie Robert pour son accueil à l'ENS de Lyon et de m'avoir aidé à réaliser mon expérience. Je remercie tous les membres de son équipe pour leur accueil chaleureux, et pour leur sympathie à mon égard.

Je remercie mon tuteur Clément Cassart pour le temps qu'il a consacré à mon apprentissage dans le laboratoire et je le remercie pour le temps qu'il a pris pour m'aider à améliorer mon mémoire.

Je remercie tous les membres du laboratoire de GEMO : Olivier Finet, Carlo Yague-Sanz, Valérie Migeot, Julie Candiracci ainsi que mon collègue de master 2 Antoine Martin pour leur aide lorsque j'en avais besoin, leurs conseils ainsi que tous les bons moments passés avec eux.

Je remercie ma maman pour son soutien tout au long de mes études et d'avoir toujours été là pour m'épauler et m'accompagner vers ma réussite.

Je remercie tous les amis que j'ai rencontrés à Namur pour les bons moments passés en leur compagnie dans cette université.

Pour terminer, je remercie les membres de mon jury : Sophie Dogné, Régis Hallez, Benoît Muylkens et Patsy Renard, pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de mon mémoire.

Abréviations utilisées

Abréviations	Signification
ADN	Acides Désoxyribonucléiques
ARN	Acides Ribonucléiques
ARNm	ARNm
ARNdb	ARNdb
ARNi	méthode d'ARN interférence
ARNt	ARN de transfert
snARN	petit ARN nucléaire
snoARN	petit ARN nucléolaire
ARNsi	short interfering ARN
ARN SL	Splice Leader
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CPSF	Facteur Spécifique du Clivage et de la Polyadénylation
CTD	Domaine Carboxy-terminal de la sous-unité AMA-1 de la polymérase II
CDK-12	Cyclin Dependant Kinase 12
cdk-12as	Souche mutante analogue sensitive pour CDK-12
GTF	Facteurs Généraux de la Transcription
NTP	Nucléosides TriPhosphates
pb	paires de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction

PIC	Pre Initiation Complex
Pol II	ARN polymérase II
RdRP	RNA- directed RNA polymérase
RNA-seq	Séquençage d'ARN
SL1	Splice leader 1
SL2	Splice leader 2
S2	Sérine en position 2 du domaine carboxy terminal de la sous-unité *ama-1* de la polymérase II
TEC	Complexe d'Elongation de la Transcription
TSS	Site d'initiation de la transcription (Transcription Start Site)
WT	Wild Type

Citation

« Le microbe n'a pas le temps d'examiner le biologiste » De Jean Ménard

« L'homme, considéré biologiquement, est la plus formidable de toutes les bêtes de proie, et, vraiment, la seule qui dévore systématiquement sa propre espèce. » De William Burroughs

« La physique mathématique et la biologie moléculaire sont la poésie d'aujourd'hui. Ce sont elles qui traduisent et qui façonnent le monde et elles soulèvent chez les jeunes gens l'enthousiasme qui venait hier des poètes. » Stephen Jay Gould

Table des matières

1. Introduction.....9

1.1. La transcription.....9
a) Généralités.....9
b) L'ARN Polymérase II.....9
c) Le cycle de la transcription.....10
d) Le modèle classique des motifs du CTD.....11
e) Le rôle gène-spécifique de la S2P.....11

1.2. *Caenorhabditis elegans*.....13
a) Généralités.....13
b) Cycle de vie.....13
c) Le génome : opérons et trans-splicing.....14
d) ARNi.....15

1.3. *cdk-12* chez *C. elegans*.....17

1.4. Objectifs du mémoire.....19

2. Matériels et méthodes.....20

2.1. Culture de *C. elegans*.....20

2.2. Mise au point du criblage par ARNi.....20

2.3. Criblage par ARN interférence.....22

2.4. Vérification des candidats positifs.....24

2.5. Transformation.....25

2.6. Croisement des souches *cdk-12as* et *rbr-2* (tm1231).....26

2.7. Vérification de la souche *as/as ; rbr-2/rbr-2* par PCR + migration du produit PCR sur gel d'agarose.....27

2.8. Test suppression arrêt en L1 *rbr-2*(tm1231) ; *cdk-12as*.....29

2.9. Croisement des souches *cdk-12as* et *panl-2*.....30

3. Résultats.....31

3.1. Mise au point de l'expérience d'ARNi pour pouvoir cibler l'ensemble des gènes de la souche *cdk-12as*.....31
a) L'inhibition de CDK-12as induit un arrêt en L1.....31
b) La technique d'ARNi exécutée sur *ama-1* est létale pour le vers *C. elegans*.....32

3.2. Le criblage par ARNi de la souche *cdk-12as* de *C. elegans* a permis de trouver 126 candidats positifs.....33

3.3. Candidats positifs : ontologie des gènes.....34
a) Catégories de protéines principalement retrouvées comme candidats positifs après le criblage par ARNi primaire.....34
b) Catégories de protéines principalement retrouvées comme candidats positifs après le second criblage par ARNi.....35
c) Processus biologiques principalement représentés au sein des candidats positifs après le criblage par ARNi primaire.....35
d) Processus biologiques principalement représentés au sein des candidats positifs après le second criblage par ARNi.....35

3.4. Fonctions de 3 candidats positifs à l'ARNi : *panl-2*, *pgl-1*, *rbr-2*.....37
a) *panl-2*
b) *pgl-1*
c) *rbr-2*

3.5. Création d'un double mutant *cdk-12as* ; *rbr-2* (tm1231).....40

3.6. Test du développement du mutant *cdk-12as/rbr-2* (tm1231) sous inhibiteur.....41

3.7. Création du mutant *cdk-12as/panl-2* par croisement de ces deux souches.....42

4. Discussion.....43

4.1. Problèmes directement liés à l'efficacité de la technique d'ARNi menant à une proportion élevée de faux négatifs.....43

4.2. Principaux problèmes techniques rencontrés lors d'une expérience d'ARNi.....44

4.3. 3 candidats positifs choisis pour la suite des expériences : *rbr-2*, *panl-2*, *pgl-1*.....45
a) Deux hypothèses de mécanismes pour le candidat *rbr-2*.....45
b) La nucléase PANL-2 et l'hypothèse de régulation de certains ARNm par CDK-12.....45
c) *pgl-1*.....46

4.4. Critiques de l'approche ARNi et doubles mutants.....47
a) Défauts de l'ARNi.....47
b) Défauts des mutants.....47
c) L'ARNi est fort différente d'une mutation perte de fonction.....47

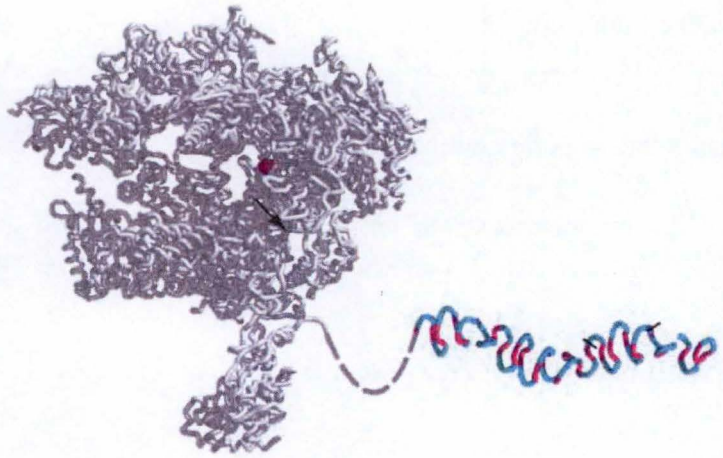
4.5. La souche *cdk-12as/rbr-2* (tm1231) ne permet pas la croissance du ver au delà du stade L1 sous inhibiteur.....48

5. Conclusions et perspectives.....49

5.1. Conclusions.....49

5.2. Perspectives.....50
a) Perspectives en lien avec l'ARNi.....50
b) Perspectives au niveau des souches de *C. elegans*.....50
c) Perspectives d'expériences complémentaires.....51

6. Bibliographie.....52



$[Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7]_n$

Figure 1: La polymérase II, la queue CTD et l'heptapeptide formant la queue CTD. Représentation à gauche de la structure tridimentionelle de la polymérase II. Au centre est représenté schématiquement la queue CTD correspondant aux répétitions de l'heptapeptide et à droite les acides aminés retrouvés dans cet heptapeptide. Le n représente le nombre de répétition qui peut varier de 26 chez la levure à 52 chez l'homme. (Modifié de Meinhardt *et al.* 2004)

1. Introduction

1.1. La transcription

a) Généralités

La régulation de la transcription est un mécanisme fondamental pour contrôler la transcription de l'ADN en ARN messager (ARNm) par l'ARN polymérase II (Pol II) (*1*). Le cycle de transcription peut être diviser en quatre phases : le recrutement de Pol II au promoteur, l'initiation de la transcription, l'élongation et la terminaison de la transcription(*2*). Ces différentes phases sont déterminées et contrôlées par différentes protéines interagissant avec Pol II.

Il est important de garder en mémoire qu'il existe 2 autres polymérases. L'ARN polymérase I transcrit les gènes codant pour les ARNs associés aux sous unités ribosomiques et comprend les 5.8S, 18S et 25S. L'ARN polymérase III transcrit les gènes codant pour les ARN de transfert (ARNt), l'ARN ribosomique 5S et le petit ARN nucléaire U6 (snARN). Ces deux polymérases sont responsables de la synthèse de 90% des transcrits (*3*).

b) L'ARN Polymérase II

La Pol II est un complexe protéique constitué de douze sous-unités. La plus grosse sous-unité, contient un domaine très conservé chez les eucaryotes : la queue CTD (C-terminal domain) (*4*) (Figure 1). Ce domaine agit comme une plateforme de recrutement pour les différents facteurs requis pour la régulation de la chromatine et la maturation des ARNm. Par exemple, il joue un rôle dans la décondensation des régions transcrites de l'ADN en recrutant des enzymes spécifiques modifiant la chromatine et permettant l'accessibilité de l'ADN par la machinerie de transcription(*5*).

La Pol II transcrit les gènes codant pour une protéine ainsi que les snARN, les petits ARN nucléolaires (snoARN), les longs ARN non codant, les microARNs et d'autres types variés de petits ARNs. Cette polymérase est responsable de la synthèse d'environ 10% des ARNs cellulaires(*3*).

c) Le cycle de la transcription

Pré-initiation

Le cycle de la transcription commence par le recrutement de la Pol II au niveau du promoteur et par l'assemblage du complexe de pré-initiation (PIC) incluant les facteurs généraux de la transcription (GTF) IID, IIB, IIE, IIF et IIH avec de nombreux cofacteurs. Les GTFs IIE et IIH permettent la dissociation du double brin d'ADN en deux boucles d'ADN simple brin(*2*), ce qui permet l'accrochage de la polymérase.

Initiation

L'initiation de la transcription commence par l'addition de 2 nucléosides triphosphates (NTP) choisis selon la séquence d'ADN et le premier lien phosphodiester est formé. Avant d'être engagé dans une synthèse productive du transcrit, la Pol II passe par l'étape de clearance du promoteur(*2*).

A cette étape, le complexe de transcription est instable et a tendance à glisser latéralement et relarguer de courts transcripts d'ARN. Le complexe d'élongation de la transcription (TEC) est en cour de formation. Le PIC est partiellement désassemblé et une partie des GTFs restent au niveau du promoteur pour permettre de débuter l'assemblage du prochain complexe d'initiation de la transcription(*2*).

Elongation

A ce stade, le TFIIH joue un rôle important dans la clearance de la PolII du promoteur en prévenant les arrêts prématurés de la PolII lorsqu'elle transcrit l'ARN pré-messager. Ce GTF est retrouvé dans le TEC formé et stabilisé. La PolII est dès lors apte à transcrire le brin d'ADN « template » en ARN pré-messager(*2*).

Terminaison

A cette étape, le facteur spécifique du clivage et de la polyadénylation (CPSF) est recruté et permet de cliver l'ARN pré-messager et de lui ajouter une queue polyA(*2*). CPSF interagit avec un autre complexe, CstF, pour assurer le clivage de l'ARN pré-messager entre les 2 sites de liaisons. CPSF se lie à la séquence AAUAAA et CstF se lie à une région enrichie en U en aval de la séquence AAUAAA(*6, 7*). Il est important de noter que ces séquences sont reconnues sur l'ARN messager en cours de transcription. Cependant, une interaction directe entre CPSF-CstF et la polymérase est aussi importante pour coupler la maturation en 3' et la transcription.

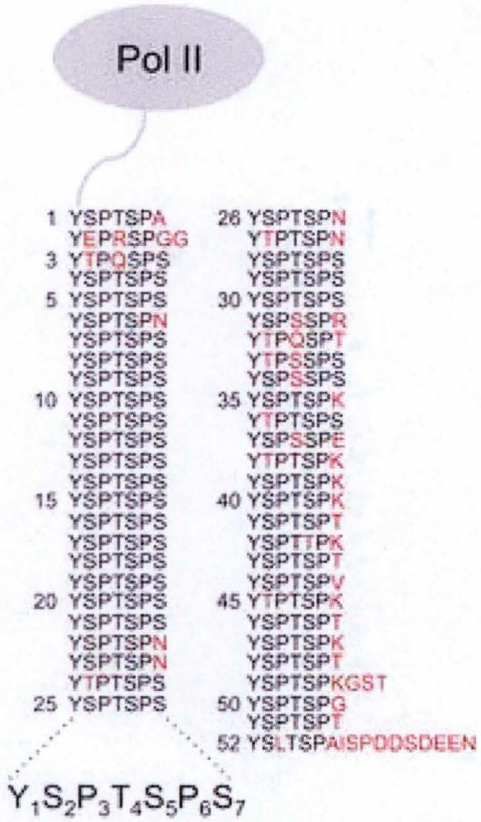


Figure 2 : Répétition de l'heptapeptide formant le CTD chez l'homme. Sur cette figure sont représentés les 52 répétitions de l'heptapeptide formant le CTD chez l'homme. En rouge sont représentés les quelques variants d'acides aminés présents dans certaines répétitions.

Pré-initiation	$[Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7]_n$
Initiation	$[Y_1S_2P_3T_4\mathbf{S_5}P_6\mathbf{S_7}]_n$
Elongation	$[Y_1\mathbf{S_2}P_3T_4\mathbf{S_5}P_6\mathbf{S_7}]_n$

Figure 3 : Modèle phosphorylation des sérines lors du cycle de transcription. Au stade de pré-initiation, l'ARN polymérase II est recrutée sous une forme ou le CTD n'est pas phosphorylé. Au stade d'initiation de la transcription, les S_5 et S_7 sont phosphorylées par CDK-9. Au stade d'élongation, la S_2 est phosphorylée par CDK-12.

d) Le modèle classique des motifs du CTD

La queue CTD consiste en une répétition d'un heptapeptide consensus formé des acides aminés : $Y_1\ S_2\ P_3\ T_4\ S_5\ P_6\ S_7$ (*8*). Cet heptapeptide est répété 42 fois chez *C. elegans*, 26 fois chez la levure de bourgeonnement et 52 fois chez l'être humain (Figure 2). Entre les différentes espèces il peut parfois y avoir des modifications d'acides aminés ponctuelles. Durant la transcription, la queue CTD subit différentes modifications post-traductionnelles incluant notamment des phosphorylations et glycosilations qui permettent le recrutement au moment opportun des acteurs de la transcription(*8, 9*).

La S_5 et la S_7 sont phosphorylées au moment de l'initiation de la transcription par CDK-7, juste en avant du TSS (Transcription Start Site). Ensuite, en cours d'élongation, la Y_1, la S_2, et la T_4 sont à leur tour phosphorylées. La kinase impliquée dans la phosphorylation de la sérine 2 est CDK-12. Après la terminaison de la transcription, les phosphates sont enlevés et la Pol II peut entreprendre un nouveau cycle. Ce modèle est conservé entre tous les eucaryotes analysés à ce jour (figure 3) (*8*). Sur base de l'interaction spécifique entre les sous-unités Pcf11 et CstF50, respectivement associées à CPSF et CstF, avec le CTD phosphorylé sur la sérine 2, il a été proposé que cette modification est primordiale pour assurer le recrutement des ces complexes et le couplage entre clivage / polyadénylation et transcription.

e) Le rôle gène-spécifique de la S2P

Par le passé, il a été postulé que la modification post-traductionnelle de la S2 était une modification essentielle car elle était impliquée dans la maturation en 3' (clivage et polyadénylation) des ARNs messagers, une étape vitale pour la cellule. Mais d'une manière surprenante, différents travaux ont démontré que l'absence de cette modification n'était pas létale chez les levures de fissions et bourgeonnantes et n'affectait que de manière superficielle la croissance végétative. Seule la transcription d'un set de gènes est affectée dans un mutant CTD S2A chez la levure de fission.

Typiquement, chez la levure de fission *Schizosaccharomyces pombe*, deux mutants touchants la S2 du CTD ont été créés: un mutant CTD-S2A dans lequel toutes les sérines en position 2 ont été remplacées par des alanines ; et un mutant *lsk1* dans lequel le gène codant pour CDK-12 (Lsk1 chez *S. pombe*) a été délété. Ces deux mutants se sont avérés viables et ne présentent que des anomalies légères (*10*). Cependant, ces mutants sont incapables d'induire le programme de différentiation sexuelle et sont donc stériles. Chez la levure de bourgeonnement, *Saccharomyces cerevisiae*, pour les 2 mêmes mutants, un mutant viable est obtenu qui a comme unique phénotype une croissance ralentie(*10*).

Chez les organismes multicellulaires où la génération d'un mutant S2A est techniquement très difficile, l'expression de la kinase Cdk-12 a été diminuée par ARN interférence. Chez la Drosophile, le phénotype résultant est une sensibilité accrue aux stress oxydatifs due à une

diminution de l'expression des gènes de réponse aux stress(*10*). Dans des cultures de cellules de mammifères, la diminution de l'expression de cdk12 n'affecte que l'expression des gènes de réponse aux stress(*11*).

Ces données suggèrent que la phosphorylation de la sérine 2, bien qu'ubiquiste, n'est probablement pas essentielle pour la maturation des ARNs messagers en 3', mais joue plutôt un rôle régulateur qui reste à caractériser en détail. Néanmoins, la plupart des études portant sur les eucaryotes supérieures ont recours à l'interférence ARN dont l'efficacité n'est pas toujours complète, empêchant des conclusions limpides.

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un candidat intéressant pour approfondir l'étude du rôle de la phosphorylation de la sérine 2 car c'est un organisme multicellulaire facile à manipuler génétiquement et dont le développement est stéréotypé, ce qui rend l'analyse phénotypique plus aisée.

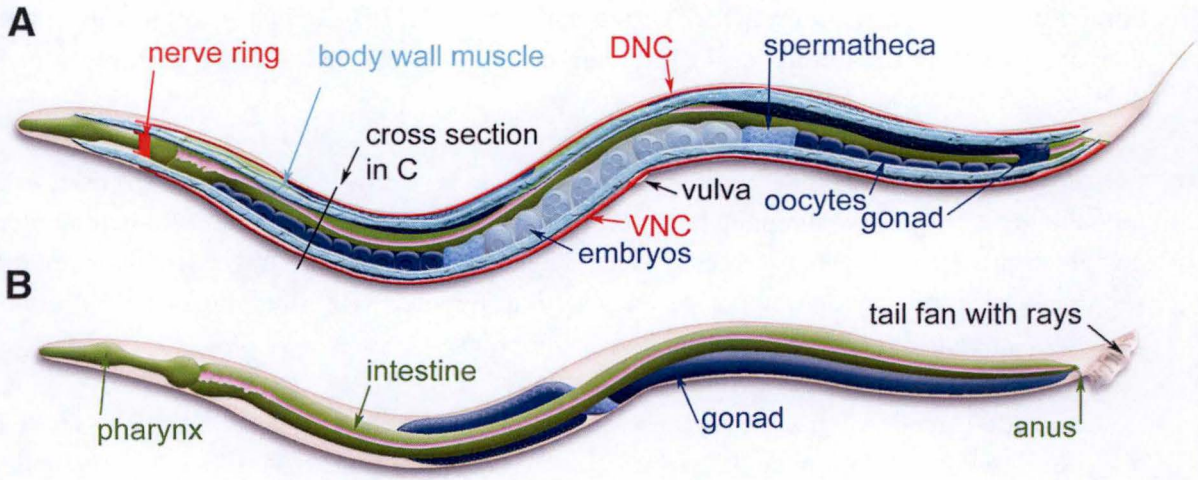
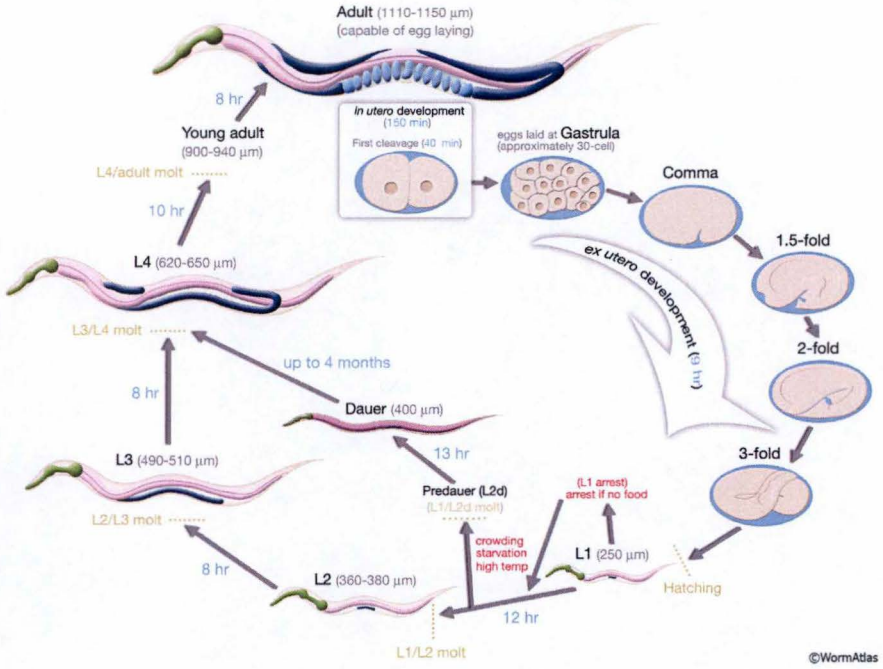


Figure 4 : Différences mâles/hermaphrodites. Cette figure illustre les différences qu'il existe entre un ver mâle et un ver hermaphrodite. Le A est un individu hermaphrodite où, peut être observé, un tractus génital femelle, une queue en pointe ainsi que la présence d'une vulve. La spermathèque est visible à proximité des embryons. En rouge est représenté le système nerveux du ver. La structure musculaire entourant le corps ainsi que des embryons y sont aussi représentés. Le B est un individu mâle ne possédant pas de tractus génital femelle, mais au niveau de la queue un organe utilisé lors de la copulation peut être observé. Le tractus génital mâle est représenté en bleu et le système digestif en vert sur les 2 schémas. (Wormbook)

A



B

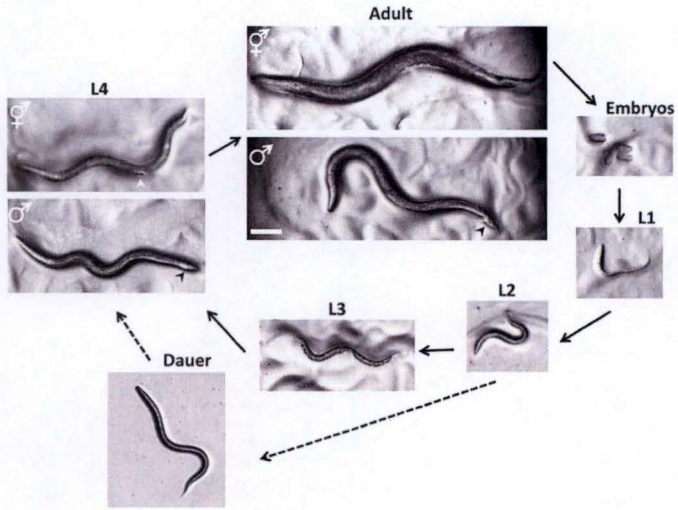


Figure 5: Cycle de vie de *C. elegans*. a) Cette figure illustre le développement de la souche sauvage du ver, du stade embryonnaire au stade adulte à une température de 20°C. En premier, le développement embryonnaire se déroule lors des 12 premières heures. Ensuite, les larves éclosent et les vers grandissent jusqu'au stade L4 (du stade L1 au stade L4), à la fin de chaque stade ils grandissent et muent. 3,5 jours après la ponte, les vers grandissent jusqu'à l'âge adulte et sont à leur tour aptes à pondre des oeufs. En parallèle, si à la fin du stade L1, les larves grandissent dans de mauvaises conditions comme un manque de nourriture, des températures élevées, ils peuvent évoluer vers le stade Dauer en passant par le stade intermédiaire prédauer (L2d). Ils peuvent rester jusqu'à 4 mois en diapause avant de poursuivre leur développement jusqu'au stade L4. b) Sur cette figure peuvent être observés des vers au stade embryon, L1, L2, L3, L4, adultes et Dauer. Pour les vers L4 et adultes, un individu hermaphrodite et un individu mâle sont présentés (WormAtlas).

1.2. *Caenorhabditis elegans*

a) Généralités

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) est une espèce de nématode pseudocoelomate non segmentée appartenant au phylum des nematodes inclus dans le clade des ecdysozoaires. Le genre *Caenorhabditis* est dans la sous-classe des Chromadoria et plus précisément dans l'ordre des Rhabditida(*12*). C'est une espèce non-parasite vivant librement dans des écosystèmes terrestres. Plus de 99% des vers sont hermaphrodites et se reproduisent par auto-fertilisation. Les hermaphrodites sont dotés de 2 chromosomes X. Lors de la méiose des évènements de non-disjonctions accidentels de chromosomes se produisent et sont responsables de l'apparition d'individus ne possédant qu'un seul chromosome X, générant ainsi des mâles. Les mâles sont dépourvus de tractus génital femelle(*13*) (Figure 4).

C. elegans est un organisme modèle important utilisé en biologie dans les champs du développement biologique et en neurobiologie. Il suscite un intérêt important de la communauté scientifique car au moins 38% de ces gènes codant pour une protéine ont un gène orthologue prédit chez l'être humain incluant bon nombre de gènes associés à des maladies humaines(*13*). C'est un système très performant pour les études génétiques et un excellent modèle pour la biologie Eucaryote. Il combine l'avantage qu'il est facile à manipuler génétiquement et il permet l'étude de mécanismes génétiques eucaryotes. De plus, c'est un organisme simple à étudier mais multicellulaire, ce qui permet d'obtenir des informations sur la communication intercellulaire et le développement d'un organisme multicellulaire que d'autres organismes eucaryotes comme la levure ne nous apportent pas.

La maintenance de cet organisme est aisée. Il est maintenu à des températures de routines de 20°C et nourri avec des bactéries *Escherichia coli*. A cette température, son cycle de génération est de 3,5 jours, mais en variant la température, la vitesse de croissance peut être diminuée ou augmentée(*14*).

b) Cycle de vie

Le cycle de vie de *C. elegans* est bien connu et divisé en un stade embryonnaire, 4 stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) et un stade adulte(*13*). En cas de conditions de développement défavorable, comme un choc thermique, une densité de population élevée ou un manque de nourriture le ver peut évoluer vers un stade de dormance, le stade Dauer. Ce stade se met en place après le stade L1, passant par un stade intermédiaire (L2d) pour arriver au stade Dauer et permet au ver d'attendre le retour de conditions favorables, où il pourra reprendre le cycle normal de son développement à partir du stade L4 (Figure 5) (*13, 15*).

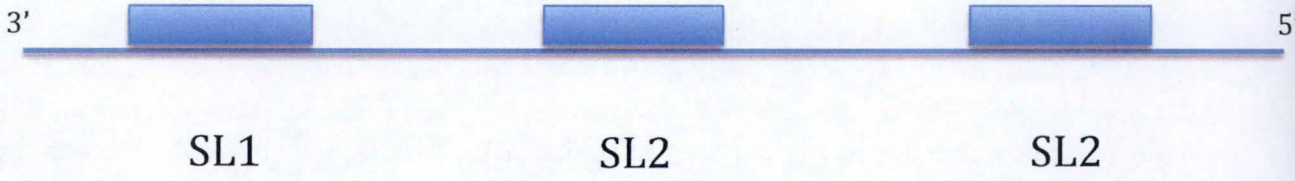


Figure 6 : Les opérons de type SL1 et SL2. Les rectangles bleus représentent des gènes. Sont représentés 3 gènes dans un opéron. Le gène en position 1 est trans-splicé par le mécanisme SL1, et les suivants par le mécanisme SL2.

Si l'embryon éclot en absence de nourriture, un contrôle nutritionnel du développement induira un arrêt développemental au stade L1 nommé « diapause » aussi longtemps que cet état de privation de nourriture perdurera(*16*). En parallèle, ils se dispersent pour rechercher de la nourriture, et, après quelques jours, ils s'agrègent, ce qui les aident à survivre durant une longue période de famine(*17*). Ces vers peuvent survivre ainsi pendant des semaines sous ces conditions en diminuant leur métabolisme et en augmentant l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress(*18*). Une fois la nourriture à nouveau disponible, les larves peuvent reprendre directement leur développement jusqu'au stade adulte(*19, 20*).

Les voies de signalisation de l'insuline et des facteurs de croissance semblable à l'insuline (IGF) permettent une réponse systémique lorsque la nourriture est à nouveau disponible. Quand la nourriture est disponible, les peptides semblables à l'insuline agissent comme une cascade de signalisation qui réprime le facteur de transcription FOXO. L'activité de DAF-16 est limitée à certains tissus comme les neurones et l'intestin, mais malgré tout, affecte le destin de l'organisme entier. La répression de DAF-16 active les voies de TGF-β et des hormones stéroïdiennes qui vont promouvoir le développement des larves durant les premiers stades(*21*). En absence de nourriture, le même processus est inversé avec DAF-16 qui réprime la même voie(*22*).

La réponse transcriptionnelle associée à l'arrêt en L1 et de la reprise de la croissance a été décrite par des études transcriptomiques.

c) Génome

Les opérons

Chez *C. elegans*, environ 15% des 19000 gènes codant pour des protéines se retrouvent dans des opérons contenant entre 2 et 8 gènes sous le contrôle d'un seul promoteur. Il y a de ce fait, environ 1250 opérons chez cet organisme. Dans la plupart des cas, ces gènes sont séparés par une région intercistronique d'environ 100 pb. Une grande différence existant entre ces opérons et les opérons bactériens est que l'ARN pré-messager polycistronique produit par la Pol II est traité co-transcriptionnellement en ARNm monocistronique. De plus les gènes situés en première position d'un opéron subissent un trans-splicing de type SL-1 alors que les suivant subissent un trans-splicing de type SL2 (voir « Le trans-splicing » ci-dessous) (figure 6) (*23*).

L'expression des gènes d'un opéron n'est pas uniforme, malgré qu'ils soient corégulés, mais suit toujours la même distribution. Au plus les gènes sont proches du promoteur, au plus ils sont exprimés, et à l'inverse, au plus ils en sont éloignés, au moins les gènes sont exprimés(*23*).

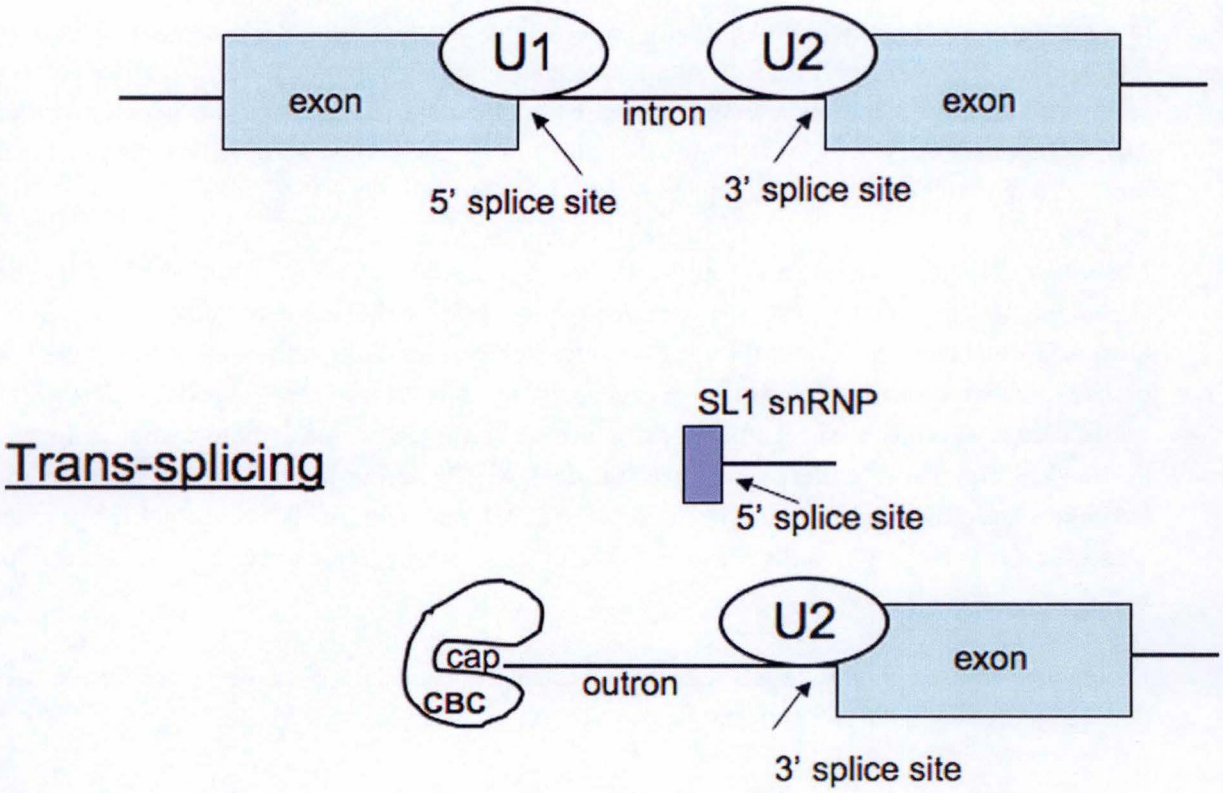


Figure 7 : Comparaison entre le cis- et le trans-splicing. Dans le cis-splicing, les U1 snRNP s'apparient aux bases au site de splicing côté 5' et les U2 snRNP s'apparient aux bases au site de splicing en 3' juste en avant du point de branchement. L'intron est excisé, et les 2 exons sont splicés ensemble. Au niveau du trans-splicing, il n'y a pas de site de splicing en 5' sur l'ARN pré-messager pour la liaison des U1 snRNP. Le site de splicing en 5' est fourni par par SL1 snRNP qui s'apparie à une séquence de l'outron, la région de l'ARN pré-messager entre l'extrémité 5' et le site de trans-splicing. L'exon SL est splicé sur le premier exon sur l'ARN pré-messager. Ce schéma met donc en relief les différences de splicing existant entre le mécanisme classique et le trans-splicing (wormbook).

Chez le nématode, les gènes requis pour la croissance sont préférentiellement retrouvés dans les opérons. Ces gènes codent pour des protéines appartenant à la machinerie basique de l'expression génique et des fonctions mitochondriales. La présence de ces gènes sous le contrôle d'un opéron, permet à l'organisme d'initier rapidement la croissance après des périodes de famine en évitant que l'ARN polymerase II ne devienne limitante. L'avantage évolutif des opérons dans le cas de *C. elegans* est donc que ceux-ci permettent une diminution du nombre de promoteurs. Ceci signifie qu'au moment de la transcription, la compétition pour les ressources transcriptionnelles est moindre, et que l'augmentation de ces ressources permet d'accélérer facilement le retour à la croissance après une période de famine lors de laquelle la machinerie de transcription est présente à un très faible niveau(*24*).

Le trans-splicing

Environ 70% des gènes de *C. elegans* subissent un trans-splicing. Le splicing est un mécanisme post-transcriptionnel qui permet d'assembler différents exons. Dans le cas du cis-splicing, les U1 snRNP s'apparient aux bases au site de splicing du côté 5' et les U2 snRNP s'apparient aux bases au site de splicing en 3' juste en avant du point de branchement. L'intron est excisé, et les 2 exons sont assemblés. Les exons proviennent dans ce cas d'un même transcrit d'ARN pré-messager. Dans le cas du trans-splicing, il n'y a pas de site de splicing en 5' sur l'ARN pré-messager pour la liaison des U1 snRNP. Le site de splicing 5' est fourni par par SL1 snRNP qui s'apparie à une séquence de l'outron, la région de l'ARN pré-messager entre l'extrémité 5' et le site de trans-splicing. L'exon SL est ligué sur le premier exon sur l'ARN pré-messager. Les exons proviennent de 2 transcrits primaires d'ARN pré-messager différents (Figure 7) (*25, 26*).

Il existe deux types d'ARN SL chez *C. elegans*. Le premier est l'ARN SL1 principalement utilisé pour les gènes isolés et les gènes localisés à la première position d'un opéron. Le second est l'ARN SL2 principalement utilisé pour les gènes localisés en positions 2 à 8 dans les opérons. Le trans-splicing stimule la traduction et permet le traitement des opérons en transcrits monocistroniques indépendants, ainsi que la protection en 5' des ARN monocistroniques contre des exonucléases grâce à la coiffe apportée par l'ARN SL(*25, 26*).

d) ARNi

Le ver *C. elegans* emploie naturellement le mécanisme d'ARNi comme mécanisme de défense contre des parasites moléculaires, typiquement les transposons. Ce mécanisme naturel se déroule en plusieurs étapes et repose sur le débitage d'un long ARN double brin en petits ARN double brin nommé siRNA (short interfering ARN) par l'endonucléase DICER. Ensuite un des brins permet de guider la reconnaissance d'un ARNm à dégrader. Une RdRP (RNA-directed RNA polymérase), RRF-1, intervient pour générer des siRNA simples brins secondaires. Ces ARNs se lient à des protéines Argonaute et induisent la dégradation des ARNm ciblés(*18*).

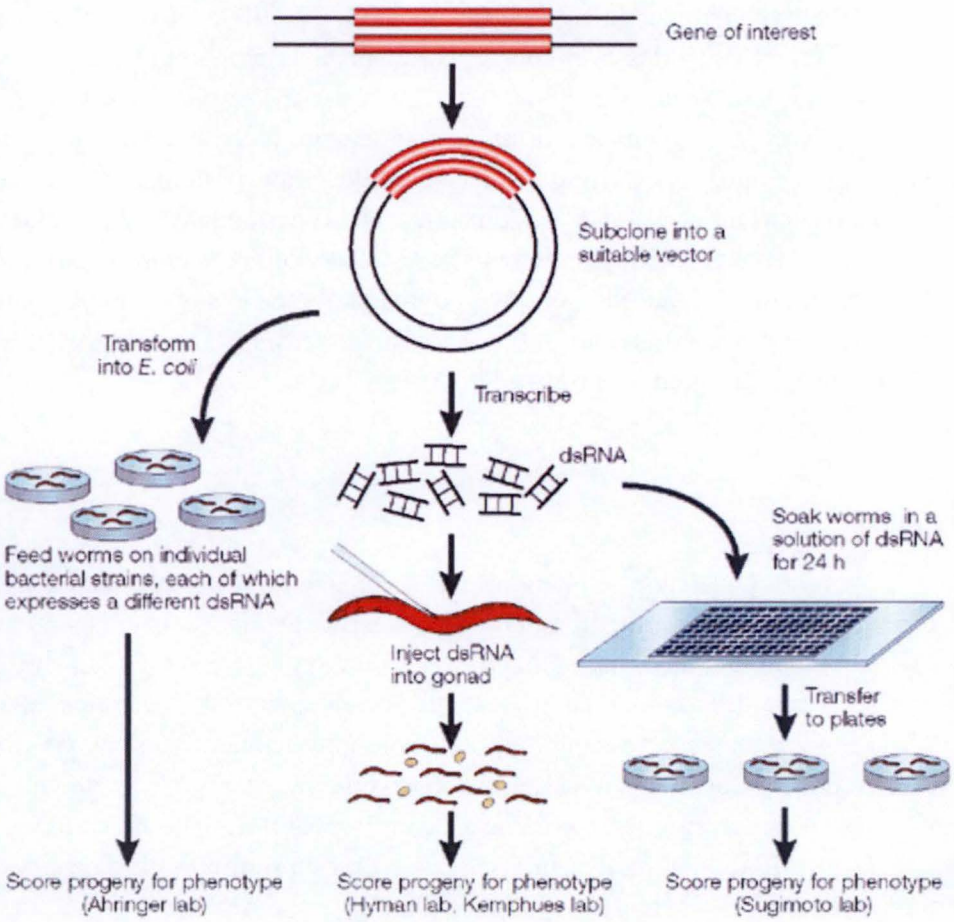


Figure 8 : Méthodes d'ARNi exécutable sur *C. elegans*. Il existe 3 méthodes. La première est de nourrir les vers avec des bactéries exprimant des séquences ARNdb ciblant les ARNm produits par un de leurs gènes après traitement. La seconde est d'injecter directement des ARNdb directement dans les gonades des vers. La troisième est de laisser tremper les vers dans une solution contenant les ARNdb. A la fin, la descendance sera criblée (Monicca *et al.* 2005).

L'interférence est systémique du fait que les ARNs non utilisés pour induire de l'ARNi sont exportés en dehors de la cellule donneuse après avoir subis des modifications par des nucléotidyltransferases comme MUT-2.
Il existe plusieurs hypothèses sur les mécanismes d'exportation. Soit une sécrétion directe des ARNs se déroule, soit sous forme d'ARNs doubles brins, soit après liaison à des protéines. La seconde possibilité est que les ARNs soient exportés dans des vésicules extracellulaires cargos (*27-29*).

Un mécanisme d'importation est utilisé naturellement, mais est exploité dans des expériences pour réaliser de l'ARNi à l'aide d'ARNs exogènes. Le but est que le ver ingère l'ARNdb. Cet ARN se lie dans l'intestin à un récepteur, SID-2, et est importé dans le cytosol au moyen d'une protéine d'import, SID-1. Soit cet ARN va éteindre l'expression d'un gène en permettant la dégradation des ARNm correspondant, après avoir été traité par la machinerie RISC/DICER, soit il sera exporté vers d'autres cellules de l'organisme pour y jouer le même rôle (*27, 28, 30*).

Dans le cadre de ce mémoire, la propriété de l'ARN interférence, de diminuer le niveau d'expression d'un gène cible de manière systémique, a été utilisée pour cibler chacun des gènes du ver, et ce en parallèle à l'inhibition de l'activité de *cdk-12as.* L'objectif est de mettre en évidence des gènes dont l'inactivation contrebalance le phénotype résultant de la perte de l'activité de *cdk-12*. Pour que la technique soit applicable aux 19000 gènes codant pour des protéines présentes chez le nématode, la méthode d'interférence par *feeding* a été utilisée (*30, 31*). Elle consiste à nourrir les vers avec des bactéries exprimant un double brin d'ARN qui ciblera un gène donné. Lors de la digestion, ces ARNs sont dirigés vers la voie d'interférence et les petits siARNs générés sont distribués dans tout l'organisme.

Le *feeding* est la méthode la plus simple et la plus efficace pour réaliser une expérience à grande échelle comme un criblage ARNi sur l'ensemble d'un génome. Néanmoins il existe deux autres manières pour faire rentrer les ARNs doubles brins dans le ver *C. elegans*. L'une d'elle est d'injecter directement les ARNs doubles brins dans les gonades des vers, induisant le phénotype au niveau des descendants. L'autre consiste à immerger les vers dans une solution contenant les ARNs doubles brins qui seront ingérés en même temps que la nourriture (figure 8) (*32*).

L'interférence par ARN a été utilisée dans de nombreuses autres expériences portant sur l'ensemble du génome des souches N2 et *rrf-3* de *C. elegans* et a permis de découvrir la fonction de certains gènes. La souche N2 correspond à la souche sauvage alors que la souche *rrf-3* correspond à une souche hypersensible pour l'effet d'ARNi. Par exemple, pour la souche N2, un phénotype a été observé chez 10% des candidats et pour *rrf-3*, chez 23% des candidats(*33*).

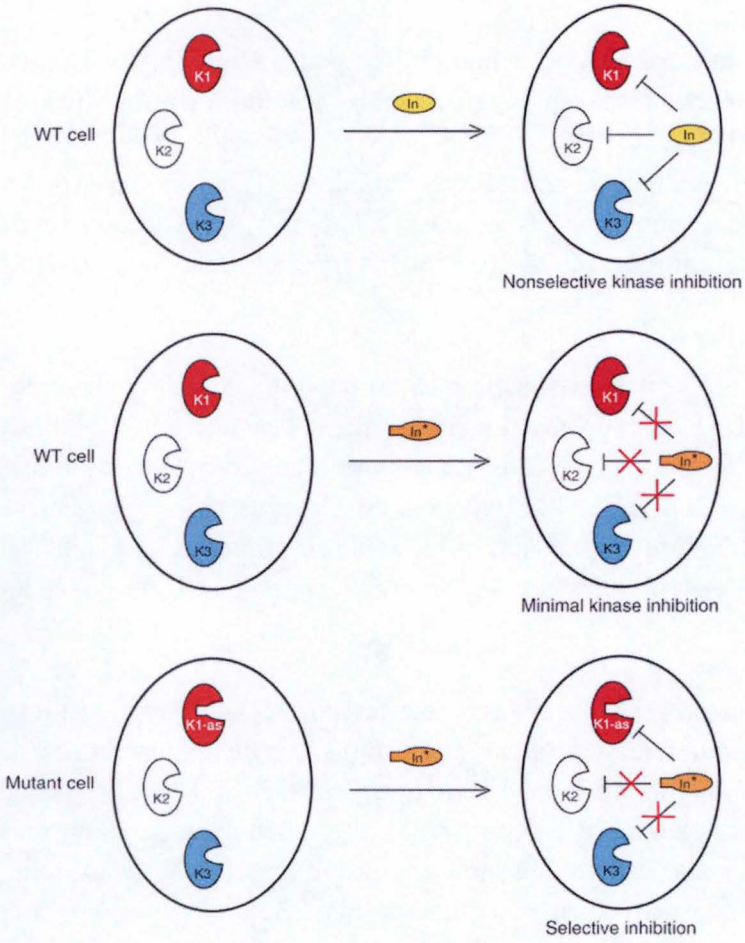


Figure 9 : Stratégie pour sensibiliser une kinase à une petite molécule inhibitrice. Dans la figure A, un petite molécule inhibitrice (In) conventionnelle cible plusieurs kinases différentes. Dans la figure B, une petite molécule non conventionnelle est incapable de cibler des kinases naturelles. Dans la figure C, une mutation agrandissant la poche catalytique de la kinase a été réalisée, permettant à un inhibiteur non conventionnel de cibler spécifiquement la kinase modifiée (Gregan *et al.* 2007).

1.3. *cdk-12* chez *C. elegans*

Le laboratoire porte depuis longtemps un intérêt particulier à la régulation ainsi qu'à la fonction de la phosphorylation de la S2 et a généré les souches mutantes S2A démontrant la capacité des levures à poursuivre une croissance végétative malgré la perte de la phosphorylation de la S2. L'étude de la kinase de la S2, CDK-12 est maintenant poursuivie par le laboratoire sur l'organisme modèle *C. elegans*.

Tout d'abord des ARN doubles brins correspondant à une séquence de *cdk-12* ont été injectés dans des vers adultes dans l'objectif d'induire une interférence ARN diminuant l'expression de *cdk-12*. L'effet de l'ARNi devant prendre un certain temps pour imprégner l'organisme entier et montrer ses effets, la descendance, des adultes traités, a été observée. L'embryogenèse apparaissait normale mais le développement des larves était arrêté au premier stade larvaire (L1) suggérant que l'inhibition de CDK-12 mime un phénotype de diapause observé en condition de carence.

Ces résultats furent confirmés avec un mutant de délétion hétérozygote, dont la descendance homozygote pour la délétion de *cdk-12* affiche également un arrêt développemental au stade L1. Le phénotype d'inactivation de *cdk-12* ne permettant pas le maintien et les analyses d'un mutant de délétion homozygote, une méthode d'inactivation inductible de manière conditionnelle a été développée.

Une méthode d'inhibition conditionnelle de kinase a été introduite par Kevan Shokat chez la levure et consiste à un élargissement de la poche catalytique d'une kinase d'intérêt, pour rendre celle-ci sensible à un analogue plus volumineux de l'ATP. Cet analogue n'est capable que de cibler la kinase qui a été modifiée, et ceci permet d'éviter toutes interactions non spécifiques avec le kinome (figure 9) (*34, 35*). Pratiquement, un résidu conservé possédant une longue chaîne latérale ne participant pas à l'activité catalytique, typiquement une phénylalanine, a été remplacée, par une glycine. La conséquence est l'agrandissement de la poche de fixation de l'ATP de cette kinase. Cette mutation n'affecte pas l'activité de la kinase mais rend sensible la kinase mutée au 3MB-PP1, un analogue plus volumineux de l'ATP. Une fois cet inhibiteur en présence de la kinase, celle-ci voit sa fonction inhibée(*34-36*). La mutation a été introduite dans le génome au locus par la méthode CRISPR/Cas9.

Cette technique permet de combiner une approche génétique avec une approche chimique et ainsi de combiner les avantages fournis par les deux types d'approches. Des concentrations variées d'inhibiteur peuvent être administrées aux vers, ce qui permet de tester des pertes partielles de fonctions ou une inhibition totale et ainsi d'obtenir une plus large gamme de données sur ce mutant. En outre, la présence de cette mutation ne perturbe par la localisation ainsi que les interactions de cette protéine avec d'autres protéines contrairement à un mutant de délétion homozygote(*36*).

Des travaux réalisés sur ce mutant en amont de ce travail ont confirmé que CDK-12 était bien la kinase de la S2 chez *C. elegans*. Par exemple, le niveau de phosphorylation de la S2 est fortement réduit en immunofluorescence après l'inactivation de la kinase. De plus, les mutants homozygotes de génotype *cdk-12as* arrêtent leur développement au stade L1 en présence de l'inhibiteur, confirmant le phénotype observé à la fois avec le mutant de délétion et l'inactivation par interférence. Par contre, une fois l'inhibiteur éliminé par lavage, les vers poursuivent leur développement en présence de nourriture. Ceci montre qu'inhiber l'activité de CDK-12 ne résulte pas en une complète désorganisation de la transcription, mais mène à un arrêt développemental spécifique et réversible semblable à l'arrêt développemental observé sous famine. Des analyses transcriptomiques par RNA-seq réalisées dans le laboratoire ont révélé que la perte de l'activité de la kinase diminuait le niveau d'ARNm codant pour des gènes impliqués dans le développement et la croissance. La majorité de ces gènes sont localisés en opérons et sont situés en position deux ou plus de ceux-ci.
Ces travaux récents du laboratoire confirment les données obtenues en levure, à savoir que la perte de la phosphorylation de la S2 n'affecte pas de manière globale la transcription mais touche un set de gènes spécifique, ce qui mène à un phénotype déterminé.

La perte de fonction de la kinase CDK-12 n'est pas la seule à mener à un arrêt en L1. Environ 45 autres mutants peuvent mener à ce phénotype ou à un phénotype équivalent lors d'étude par interférence à large échelle. Par exemple, la perte de fonction d'AMA-1, la plus grande sous unité de la PolII, mène à une létalité embryonnaire ou à une létalité au stade L1(*37*).
Un mutant perte de fonction pour *elo-5* (fatty acid Elongation), un gène codant pour une élongase, pour acides gras polyinsaturés, entraine des modifications du comportement du ver, une croissance plus lente ou un arrêt développemental au stade L1(*38*).
Un mutant pour *let-23* (LEThal), une tyrosine kinase transmembranaire, mène à une létalité au stade embryonnaire, des arrêts en L1, ou encore à des problèmes chez les hermaphrodites pour pondre(*39*).
La perte de fonction de la protéine INX-6, une protéine transmembranaire, mène à un arrêt développemental en L1, la starvation ainsi qu'à des problèmes de contraction au niveau des muscles du pharynx(*40*).
Certains mutants de *gpb-1* (G Protein Beta subunit), codant pour la sous-unité béta d'une protéine G hétérotrimérique, mènent à des phénotypes comme une létalité embryonnaire importante, des arrêts en L1 et la stérilité des vers(*41*).

Ces exemples suggèrent que l'arrêt en diapause repose sur un réseau biologique complexe qui doit coordonner la détection du niveau de nutriments dans l'environnement à une réponse transcriptionnelle adéquate pour soit poursuivre le développement post-embryonnaire ou bloquer celui-ci pour assurer une réponse de survie jusqu'à ce que les conditions de nutrition s'améliorent. Le phénotype associé à l'inhibition de CDK-12 implique *de facto* cette kinase et la phosphorylation de la serine 2 du CTD dans ce réseau et soulève une série de questions relatives aux mécanismes moléculaires sous-jacents.

1.4. Objectifs du mémoire

Les objectifs principaux de mon mémoire sont de réaliser, dans un premier temps un crible génétique sur l'entièreté du génome de *C. elegans* ayant pour objectif d'identifier des suppresseurs de l'arrêt en L1 résultant de l'inhibition de CDK-12as. Le but est de mieux comprendre le rôle de cette kinase dans le développement précoce du ver. L'idée est de tester lesquels des 19 000 gènes de *C. elegans* permettent, lorsqu'ils sont inactivés par ARNi, de poursuivre le développement larvaire malgré l'inhibition de CDK-12.

Dans un second temps, l'objectif est de sélectionner quelques candidats suppresseurs de l'arrêt en L1 et de les croiser avec des mutants de délétion correspondants à la souche *cdk-12as* pour obtenir des doubles mutants. Le but est de vérifier par une méthode alternative à l'interférence que ces candidats sont bien suppresseurs.

Pour terminer, si les objectifs précédents sont atteints, nous planifions de caractériser les nouvelles souches obtenues pour caractériser au niveau moléculaire le rôle biologique de CDK-12 dans le développement post-embryonnaire.

2. Matériels et méthodes

2.1. Culture de *C. elegans*

Les souches de *C. elegans* sont conservées sur le NGM dans une boîte de pétri et nourries avec la souche *E. coli* OP50, comme décrit dans Stiernagle *et al.* (*14*).

Les souches utilisées sont :

- La souche sauvage N2
- *cdk-12as* : *cdk-12* (knu26(*cdk-12 F397G*))
- *rbr-2* (tm1231)

2.2. Mise au point du criblage par ARNi

A. Inhibition de CDK-12as par l'inhibiteur

- Utiliser un culot de bactéries produit à partir d'un ml de cultures bactériennes et le suspendre dans 1,3 ml de S-Medium
- Ajouter l'inhibiteur (3MB-PP1) à une dilution finale de 1uM dans le S-Medium
- Pour les contrôles, ajouter 1,3ul de DMSO pour obtenir une concentration finale de 1mM de DMSO (solvant dans lequel est dissoute la drogue) dans le S-Medium
- Placer 150ul/ puits d'une plaque 96 puits à fond rond de la solution adéquate (contrôle ou test)
- Ajouter 1 à 2 vers au stade L4 par puits
- Au jour 5 de l'expérience, vérifier que la descendance du test est arrêtée en L1

Refaire ce protocole en faisant varier de 1 à 100uM la concentration de la drogue pour tester différentes concentrations avec le même protocole.

B. Test de l'ARN interférence

Jour 1 vers :

- Obtenir une population synchronisée d'adultes *cdk-12as*
- Bleach des adultes
- 2 embryons/µl dans 4ml de S-Medium
- Incuber Overnight à 20°C

Jour 1 bactéries :

- Répliquer le stock de bactéries *ama-1* à -80°C, dans une plaque 96 puits
- Incuber overnight les bactéries à 37°C dans 500µl de LB + Amp (100µg/ml)

Jour 2 vers :

- Induire les cultures à l'IPTG dans 1ml de LB + IPTG (1mM) + Amp (100µg/ml)
- Incuber 4 heures à 37°C
- Transférer 200µl de culture induite dans une plaque 96 puits à fond rond
- Culoter les bactéries, 2 minutes à 3000 rpm
- Resuspendre dans 150µl de S-Medium + IPTG (1mM) + Amp (50µg/ml)

Jour 2 bactéries :

- Resuspendre à environ 1L1/µl dans 50ml de S-Medium (compter 500µl par plaque)
- Ajouter 5µl de S-Medium avec environ 1L1/µl (environ 5 L1 par puits)
- Incuber 3 jours à 20°C, sous agitation

Jour 5 :

- Observer les phénotypes

<u>Remarque</u> : observer les phénotypes au microscope

- Placer sur une lame une goutte d'agarose à 3%
- Y déposer 12µl de NaN_3 (anesthésiant)
- Y déposer 20µl de vers
- Regarder au microscope

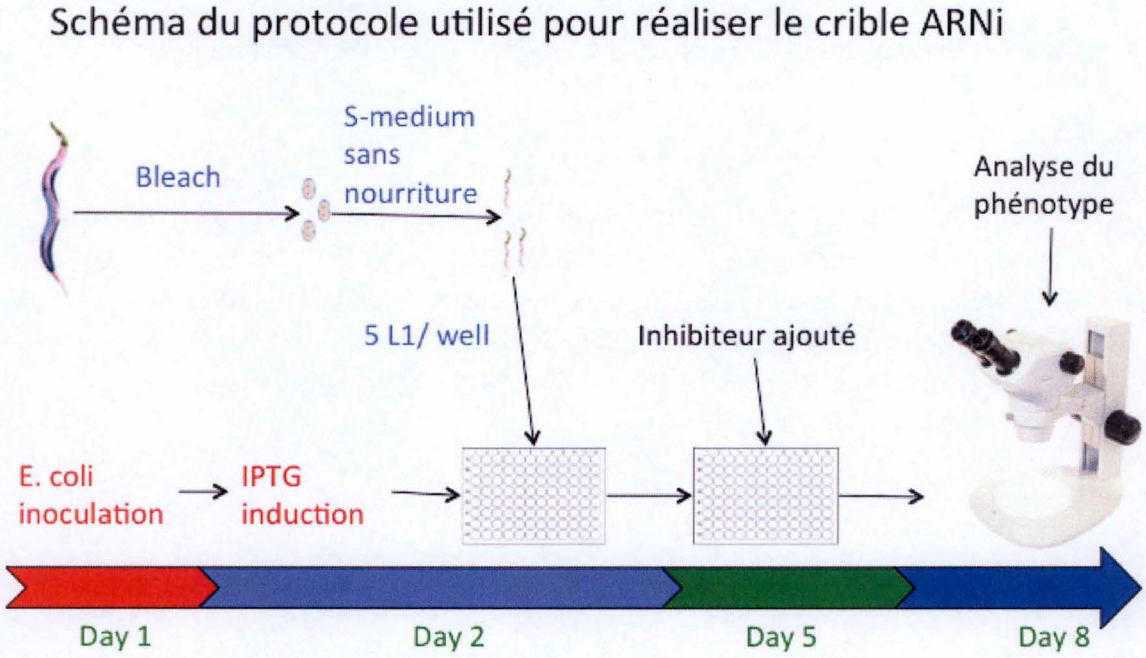


Figure 10 : Schéma du protocole utilisé pour réaliser le crible ARNi. Le premier jour, les vers *cdk-12as* sont synchronisés et des bactéries sont en parallèle transplantées à partir des plaques de la libraire d'ARNi. Le jour 2, les bactéries sont induites à l'IPTG pendant 4 heures et placées dans des plaques 96 puits avec 5 L1 ajoutés par puits. Durant les jours 3 et 4, la génération parentale grandit jusqu'à l'âge adulte. Le jour 5, l'inhibiteur est ajouté et durant le jour 6 et 7, la descendance se développe. Au jour 8, la descendance est observée pour voir si elle s'arrête au stade L1 ou continue à grandir.

2.3. Criblage par ARN interférence

Le protocole de criblage par ARN interférence a été établi à partir du protocole de Saur *et al.* avec quelques modifications(*42*). Le protocole est décrit ci-dessous. Tout d'abord, les vers sont nourris avec des bactéries exprimant l'ARN double brin pour une génération car l'effet de l'ARNi n'est pas immédiat. Les individus criblés sont la descendance produite par cette génération. L'inhibiteur est ajouté sur de jeunes adultes pour induire un arrêt en L1 au niveau de la descendance. L'identification de candidats positifs dépend de la capacité de la génération F1 de poursuivre sa croissance et à atteindre le stade adulte (figure 10) (*42*).

Protocole :

Jour 1 vers :

- Obtenir une population synchronisée d'adultes *cdk-12as* (préparation au minimum 3 jours à l'avance)
- Bleach des adultes pour récolter les embryons (5ml de solution de bleach : 2,5ml de Javel + 560µl de NAOH + 2ml H_2O)
- Resuspendre à 10 embryons/µl, dans 5ml de S-Medium (1 litre de S-basal (5,85g NaCl, 1g KH_2PO_4, 1ml de cholestérol (5mg/ ml dans de l'éthanol), 10ml à 1M de citrate de potassium à pH 6, 10ml de la solution avec des éléments traces, 3ml à 1 M de $CaCL_2$ et 3ml de 1 M de $MgSO_4$) (compter environ 500 vers par plaque)
- Incuber overnight à 20°C

Jour 1 bactéries :

- Préparer 4 plaques 96 puits (pour une plaque 384 puits de stock) : 1ml de LB + Amp (100µg/ml) dans chaque puits
- Répliquer le stock à -80°C dans des plaques 96 puits
- Tremper le réplicateur une fois dans de l'eau de javel et tamponner sur papier
- Tremper 3X le réplicateur dans de l'eau et tamponner sur papier
- Tremper 1X le réplicateur dans de l'alcool et flamber
- Incuber overnight à 37°C dans 500µl de LB + Amp. (100µg/ml)

Jour 2 bactéries :

- Induire les cultures à l'IPTG en ajoutant 0,5ml de LB + IPTG (2mM) + Amp (100µg/ml)
- Incuber 4 heures à 37°C
- Transférer 200µl de culture induite dans des plaques 96 puits à fond rond
- Culoter mes bactéries 2 minutes à 3000 rpm
- Vider le surnageant

- Resuspendre dans 150ul de S-Medium + IPTG (1mM) + Amp (50µl/ml)

Jour 2 vers :

- Resuspendre environ 1L1/µl dans 50 ml de S-Medium (compter 500µl par plaque)
- Ajouter 5µl de S-Medium + 1L1/µl (environ 5 L1 par puits)
- Incuber 3 jours à 20°C sous agitation

Jour 5 :

- Préparer l'inhibiteur 3MB-PP1 : (2,95mg/ml de DMSO) -> distribué en alicot de 50µl
  - Stock à 10mM dans 100% de DMSO
  - Diluer 10 X dans du DMSO (1mM, 100% de DMSO)
  - Diluer 33,3 X dans du S-Medium (100µM, 10% de DMSO)
- Ajouter 5µl de 3MB-PP1 à 100µM (1µM final, 0,1% de DMSO final) dans chaque puits
- Incuber 3 jours à 20°C

Jour 8 :

- Observer le phénotype de la F1

2.4. Vérification des candidats positifs

Avant de continuer, il est important de vérifier que les candidats positifs contiennent bien l'ARNi indiqué dans la banque ARNi. Il est important de séquencer les plasmides pour confirmer l'identité du gène ciblé par l'ARNi.

Clones testés : - *panl-2*
- *spch-2*
- *Y18H1A_68.f*
- *Y65B4A_174.a*
- *rbr-2*
- *ptr-14*
- *aqp-3*
- *pgl-1*

- Emploi d'un kit pour extraire les plasmides : GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-PLN350-AKT)

- Envoi d'un échantillon comprenant :

- 15µl d'ADN à une concentration comprise entre 50 et 100ng/µl
- 2µl de primer à une concentration de 10uM

- Placer le tout dans un tube à séquençage et envoyer à séquencer chez eurofins genomics

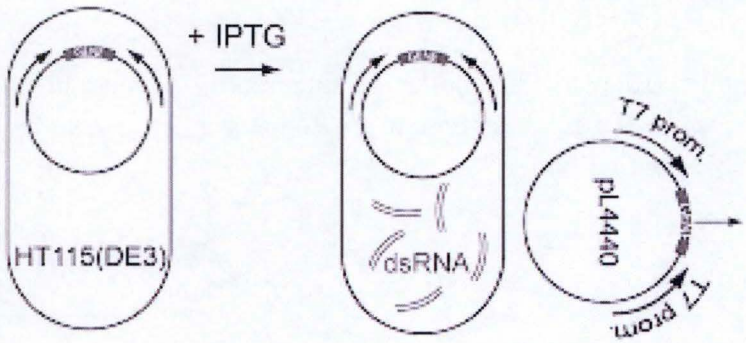


Figure 11 : Transformation bactéries pour l'expression des ARNdb.
Une séquence d'ADN d'intérêt est placée dans le plasmide 4440 sous le contrôle de 2 promoteurs forts, les promoteurs T7, inductibles à l'IPTG. Les plasmides sont introduits dans des bactéries compétentes, les HT115. Après, ces bactéries sont induites à l'IPTG, ce qui permet l'expression des ARNdb.

2.5. Transformation :

- Décongeler un culot de bactéries HT115 sur glace (bactéries compétentes pour l'incorporation d'un plasmide). Culot de 50 à 100µl.
- Ajouter 2µl (max 10% du volume) de l'ADN plasmidique extrait à l'aide du kit
- Laisser incuber 15 à 30 minutes sur glace
- Allumer le bain marie à 42°C
- Après le temps d'incubation, choc thermique pendant 30 secondes à 42°C
- Replacer directement sur glace
- Ajouter 1ml de LB
- Incuber à 37°C entre 30 min et 1 heure
- Etaler 100µl sur une boite LB + ampicilline pour sélectionner les bactéries résistantes à l'ampicilline, possédant le plasmide
- Incuber à 37°C overnight (figure 11)

2.6. Croisement des souches *cdk-12as* et *rbr-2* (tm1231)

A. Obtenir des mâles *cdk-12as*

- Repiquer 15 L4/jeunes adultes *cdk-12as* sur une boite NGM+OP50
- Incuber 4 heures à 34°C
- Remettre les vers à 20°C
- Après 2 jours, mâles dans la descendance (ces mâles sont homozygote *cdk-12as*)

B. Croisement : *cdk-12as X rbr-2(tm1231)*

- Repiquer 10 mâles et 5 L4 hermaphrodites candidats positifs par boite NGM + OP50. Faire au moins 2 boites.
- Incuber 24 heures à 20°C
- Lorsque les hermaphrodites candidats positifs sont adultes (œufs présents sur la boite), les isoler individuellement sur des boites NGM+OP50. 1 ver par boite.
- Incuber à 20°C
- Observer la descendance et sélectionner les boites avec des hermaphrodites correspondant à des candidats positifs fécondés. S'il y a eu fécondation, il doit y avoir environ 50% de mâles dans la descendance.
- Repiquer 6 L4 hermaphrodites de la F1 (descendant d'un hermaphrodite candidat positif fécondé) individuellement sur des boites NGM + OP50.
- Incuber à 20°C

C. Cribler la F2 par single worm PCR pour isoler un double homozygote (*cdk-12as* ; gène du candidat positif) :

- Repiquer individuellement 40 vers de la F2 sur boite NGM + OP50
- Incuber 1-2 jours à 20°C
- Lorsque les vers ont pondu, faire des singles worm PCR sur les parents (F2) :
  - Lyse des vers
  - PCR *cdk-12as*
  - PCR du gène du candidat positif

2.7. Vérification de la souche as/as ; *rbr-2/rbr-2* par PCR + migration du produit PCR sur gel d'agarose

- Préparer 200 ul de la solution de lyse : 10µl de protéinase K + 190µl de SWLB (single worm lysis buffer)
- Répartir 4µl de la solution de lyse par puits : 40 puits (1 par hermaphrodite de la F2)
- Ajouter un ver *C. elegans* par puits
- Placer les 40 tubes dans la machine PCR biorad à 65°C pendant une heure pour permettre la dégradation des vers *C. elegans* par la protéinase K
- Puis pendant 15 minutes à 95°C pour dénaturer la protéinase K

Composition solution de lyse (SWLB) :

- Tris HCl pH 8 : 10mM
- KCl : 50mM
- $MgCl_2$: 2,5mM
- Tween 20 : 0,45%
- Gélatine : 0,01%

+ protéinase K (20mg/ml) diluée 20X

Préparation du mix PCR :

- Buffer 5X : 4µl
- dNTP 20mM : 0,2µl
- P1 10uM : 1µl
- P2 10uM : 1µl (amorces forward et reverse)
- Taq : 0,16µl
- H_2O : 12,64µl

+ 1µl du produit de lyse
= 20µl de mix PCR par puits

Réalisation de la PCR pour *cdk-12as* :

- Tm : 57°C
- Temps d'élongation : 1 minute
- 35 cycles

- 3 minutes à 94°C : activer la Taq polymérase
- 30 secondes à 94°C : déshybrider les brins d'ADN
- 30 secondes à 57°C : hybridation des amorces

- 1 minute à 72°C : élongation

Réalisation de la PCR pour *rbr-2* :

Idem sauf pour : l'élongation = 1 minutes et 20 secondes

Restriction du produit PCR avec l'enzyme de restriction Sal I :

- Produit de restriction : - Produit PCR : 10µl
  - Buffer : 2µl
  - Sal I : 0,5µl
  - H_2O : 17,5µl
- Distribution de 30µl/puits : 40 puits
- Placer 1 heure à 37°C pour laisser agir Sal I

Migration sur gel d'agarose du produit PCR :

- Couler 100ml de gel d'agarose + ajouter 5µl de bromure d'éthylium
- Le laisser se solidifier pendant 20 minutes
- Placer 7,5µl de marqueur gene ruler dans le premier puits
- Placer 25µl du mix PCR par puits avec l'enzyme de restriction
- Laisser migrer 20 minutes sous un courant de 140 mVolt

2.8. Test suppression arrêt en L1 *rbr-2*(tm1231) ; *cdk-12as*

Préparer culture des souches :

- *rbr-2*(tm1231) ; *cdk-12as*
- *rbr-2*(tm1231)
- *cdk-12as*

J-0

- Bleach des adultes pour récupérer les embryons
- Resuspendre les embryons dans du S-medium, à 2 emb/µl
- Prévoir 10ml par condition
- Incuber O/N à 20°C

J-1

- Préparer 2 concentrations de l'inhibiteur 3MB-PP1 à 1 mM et 10 mM dans du DMSO
- Décongeler un culot de OP50 et le resuspendre dans du S-Medium
- Pour chaque condition, ajouter 5ml de bactéries OP50 concentrées (volume final = 15ml)
- Pour conditions 1uM, ajouter 15µl de 3MB-PP1 1mM
- Pour conditions 10uM, ajouter 15µl de 3MB-PP1 10mM
- Incuber à 20°C

J-2 à 4

- Observer la croissance

2.9. Croisement des souches *cdk-12as* et *panl-2*

A. Obtenir des mâles (voir 2.6.)

B. Croisement : *cdk-12as* X *panl-2*

- Repiquer 10 mâles *cdk-2as* et 5 L4 hermaphrodites *panl-2* par boîte NGM + OP50. Faire au moins 3 boites
- Incuber 24h à 20°C

- Lorsque les hermaphrodites *panl-2* sont adultes (des œufs doivent être présents sur la boite), les isoler individuellement sur des boites NGM+OP50. 1 ver par boite.

- Incuber à 20°C

- Observer la descendance et sélectionner les boites avec hermaphrodites *panl-2* fécondés. S'il y a eu fécondation, on doit trouver environ 50% de mâles dans la descendance.
- Repiquer 6 L4 hermaphrodites de la F1 (descendant d'un hermaphrodite *panl-2* fécondé) individuellement sur des boites NGM + OP50
- Incuber à 20°C

C. Cribler la F2 par single worm PCR pour isoler un homozygote pour soit *cdk-12as* soit *panl-2* et *hétérozygote* soit pour *cdk-12as*, soit pour *panl-2*

- Repiquer individuellement 100 vers de la F2 sur boite NGM + OP50
- Incuber 1 à 2 jours à 20°C
- Lorsque les vers ont pondus faire des singles worms PCR sur les parents (F2) :
  - Lyse des vers
  - PCR *cdk-12as*
  - PCR *panl-2* (tm1231)

D. Cribler la F3 par single worm PCR pour isoler un double homozygote *cdk-12as* ; *panl-2*

- Repiquer individuellement 8 vers de la F3 ayant le génotype souhaité sur boite NGM + OP50
- Incuber 1 à 2 jours à 20°C
- Lorsque les vers ont pondu, faire des singles worms PCR sur les parents (F3) :
  - Lyse des vers
  - PCR *cdk-12as*
  - PCR *panl-2*

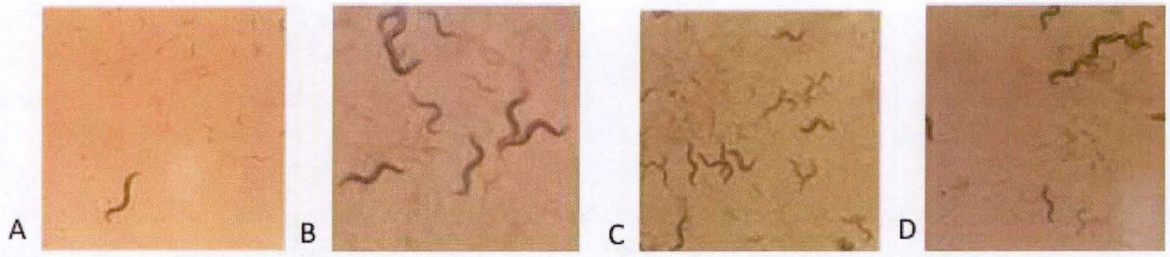


Figure 12 : Arrêt en L1 lorsque la souche *cdk-12as* est sous inhibiteur. (A) La descendance est arrêtée en L1 lorsque la souche *cdk-12as* est sous inhibiteur. Un adulte est visible dans le dessous de la figure. Les autres vers sont la descendance arrêtée au stade L1. (B) La descendance des vers sauvages se poursuit au delà du stade L1. Tous les stades de développement normal du ver sont visibles. (C) La descendance des vers *cdk-12as* se développe normalement au delà du stade L1 lorsqu'ils ne sont pas soumis à l'inhibiteur. (D) La descendance de vers sauvages non soumis à l'inhibiteur se développe normalement (C. Cassart).

3. Résultats

Un criblage par ARNi a été réalisé sur *C. elegans* en nourrissant les vers avec des bactéries exprimant un ARN double brin ciblant un gène spécifique. Cette méthode permet de réaliser des cribles à grande échelle sur un génome entier de manière efficace et rapide. Ces bactéries proviennent d'une banque de 50 plaques 384 puits permettant de couvrir l'entièreté du génome, chaque clone exprimant un ARN double brin correspondant à un gène. La méthode employée est expliquée dans le protocole (voir ci-dessus) et a été effectuées pour chaque plaque. Ce criblage a été réalisé en deux séries de 3 semaines à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon dans le laboratoire de Francesca Palladino, collaborateur sur ce projet (*43*).

3.1. Mise au point de l'expérience d'ARNi permettant de cibler l'ensemble des gènes de la souche *cdk-12as*

Des mises au point ont été réalisées avant de commencer l'expérience de criblage par ARNi. Celles-ci visaient à déterminer à quelles concentrations l'inhibiteur présente une efficacité optimale, et à tester l'ARNi en condition de culture liquide pour voir si les résultats attendus étaient obtenus pour un gène essentiel. Ces deux mises au point ont permis de valider la méthode de criblage.

a) L'inhibition de CDK-12as induit un arrêt en L1

La capacité de l'inhibiteur d'entrainer un arrêt au stade L1 spécifiquement chez la souche *cdk-12as* a été testée. Des vers au stade L4 ont été incubés en présence de concentrations croissantes en inhibiteur, de 1µM à 100µM. La souche sauvage ainsi que la souche *cdk-12as* ont été traitées avec cet inhibiteur ou du DMSO, le solvant utilisé avec la drogue. En traitant la souche sauvage avec la drogue, il est possible de vérifier que celle-ci n'induit pas d'effets aspécifiques. En traitant les deux souches avec le solvant il est possible de s'assurer qu'il n'y a pas d'impact du DMSO sur les résultats.

Pratiquement, des parents L4 ont été traités avec l'inhibiteur au jour 1 et la descendance est observée au jour 3, 4 et 5. Les différentes conditions ont été analysées et aucun effet non spécifique lié à la drogue ou au solvant n'est apparu. La souche sauvage se développe normalement malgré la présence de l'inhibiteur ou du solvant, à une vitesse normale et aucun phénotype n'est à observer. La souche *cdk-12as* se développe normalement en présence du solvant démontrant qu'il ne perturbe pas son développement et aucun phénotype n'apparaît. Par contre, cette expérience a confirmé que la présence de l'inhibiteur affecte de manière spécifique la souche *cdk-12as*. La descendance de ces vers est arrêtée au stade L1 lorsqu'ils sont soumis à l'inhibiteur (Figure 12).

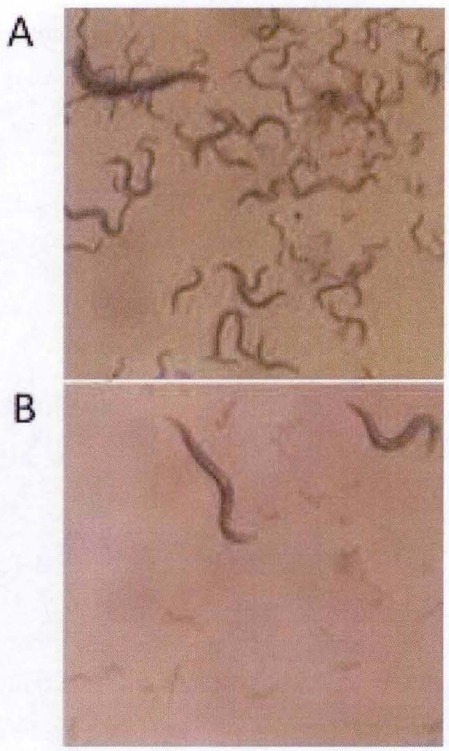


Figure 13 : Image représentative de vers nourris avec des bactéries HT115 avec le plasmide L4440 vide (a) ou exprimant le siARN ciblant *ama-1* (b). a) Les vers sauvages se développent normalement en présence de ces bactéries. Aucun phénotype particulier n'est visible. b) Les vers adultes représentent la génération parentale. La descendance ne se développe pas au delà du stade L1 lorsque *ama-1* est moins exprimé.

b) La technique d'ARNi exécutée sur *ama-1* est létale pour le ver *C. elegans*

Après avoir testé l'inhibiteur, il était intéressant de vérifier que l'ARNi était une approche efficace pour réaliser ce criblage ARNi. Le gène *ama-1*, qui code pour la plus large sous-unité de la Pol II, a été ciblé. Le phénotype attendu lors d'un criblage par ARNi ciblant ce gène est principalement la létalité embryonnaire. C'est un phénotype fort facilement visualisable. Des vers de souche sauvage ont été nourris avec des bactéries exprimant des doubles brins d'ARN ciblant *ama-1*, ce qui a conduit à une létalité de pénétrance totale comme attendu(*44*). Un contrôle avait été fait en parallèle pour démontrer que l'effet était bien lié au gène cloné dans le plasmide. Ce contrôle consistait à nourrir les vers avec des bactéries contenant le plasmide (L4440) vide. Aucun phénotype n'a été observé sur le contrôle confirmant que l'effet était bien à attribuer à l'ARNi. Ceci confirme que l'ARNi est une méthode valable pour réaliser le crible sur le génome entier de *C. elegans* (Figure 13 a et b).

Chromosomes	Nombre de candidats
I	51
II	23
III	21
IV	27
V	3
X	1

Tableau 1 : Nombre de candidats sur chaque chromosome du ver *C. elegans*. Ce tableau illustre le nombre de candidats par chromosome. En moyenne, 25 candidats positifs sont retrouvés par chromosome. Il y a peu de candidats sur les chromosomes V et X.

Positifs 0 fois	Positifs 1 fois	Positifs 2 fois	Positifs 3 fois
Y23H5A.2	C48E7.5 (*cof-2*)	F47G6.1 (*dyb-1*)	F32A7.5 (*maph-1.1*)
T05E8.2	K04F10.4 (*bli-4*)	C48E7.6	Y54E10B_154.c (*Dnj-28*/Y71F9AL.10/*nduf-5*, Y54E10BL.5)
F57B10.5	K06A5.1	C48E7.7	absent
C48B6.3	T10E9.6	C10G11.9 (*spch-2*)	
H37N21.1	T10E9.8	T28F4.6	
F52A8.6	F48A9.2	T05F1.4	
F13G3 .10	F22D6.9	Y105E8C.s (*unc-95*)	
T28F4.2	F22D6.12 (*gly-19*)	F39B2.10	
M04C9.5	F52A8.5	Y54E5B.2	
C36F7.3a	C15A11.5 (*col-7*)	ZK270.2 (*frm-1*)	
K07A1.7	W06D4.5 (*snx-3*)	Y18H1A_68.f (Y18H1A.1/T25D1.3)	
F10G8.8	M04C9.4	Y65B4A_174.a (Y65B4A.1/Y65B4A.8)	
M01E5.2	C17E4.10	C01B12.8	
Y63D3A.6a	F30A10.5 (*stl-1*)	F13H8.7 (*upb-1*)	
C32B5.12	C04F12.3 (*ikb-1*)	R09D1 .1	
C33F10.7	K02A11.3	R09D1.2 (*chil-16*)	
C27A2.4	Y67A6A.2 (*nhr-62*)	F31E3.4 (*panl-2*)	
F09C12.6	Y105E8C.f (*exc-4*)		
H41C03.1	Y65B4A_174.b (*lin-65*/Y65B4A.1/*lpd-6*)		
ZK84.4	Y65B4A_175.a (*eme-1*)		
T02C12.2	D1069.3		
C03C10.4	W07E6.3		
H38K22.4	F46F5.16		
R07E5.1	F26G1.3		
F54D8.2	K10B2.1 (*lin-23*)		
F25B5.5	R09D1.11 (*chil-23*)		
R01H2.1	AH6.14 (*sra-9*)		
R05D3.10	ZK1307.7		
F59B2.2	F43C1.1		
F59B2.5	ZK328.6		
ZK1098.2	B0280.6		
F58A4.5	ZK370.9		
Y47D3A.f			
F01G4.6	*trap-4*	ZK381.4 (*pgl-1*)	H04M03
T05E11.3	C01F6.8 (*cln-1*)	C06G3.5	Y73B6A.a
C08F8.1	W01B6.6	C01F6.9	R13H7.2
M7.5	C04G6.3 (*pld-1*)	F44D12.10	Y69E1A.7 (*aqp-3*)
F13E9.5	F36H1.1 (*fkb-1*)	C04G2.2	
ZK593.4	F36H1.3	C04G6.5	
ZK795.3	C49C3.10	F01D4.5	

Tableau 2: Liste des gènes confirmés au second criblage par ARNi selon le nombre de confirmation du triplicat. La première colonne comprend les gènes qui n'ont pas été confirmés. La seconde, les gènes confirmés une fois, la troisième les gènes confirmés 2 fois et la quatrième, les gènes confirmés 3 fois.

3.2. Le criblage par ARNi de la souche *cdk-12as* de *C. elegans* a permis d'identifier 126 candidats suppresseurs

Comme décrit dans le matériel et méthode, le crible a consisté à traiter par ARNi des vers de la génération parentale de génotype *cdk-12as*. Lorsque la descendance (F1) a atteint le stade adulte, l'inhibiteur a été ajouté. Trois jours plus tard, la descendance de la F1 est criblée, l'objectif étant de trouver des vers se développant normalement malgré la présence de l'inhibiteur.

Le criblage de la descendance a permis de classer les individus en deux catégories :

- les candidats dits « négatifs » : la descendance F1 reste arrêtée en L1. Ceci indiquera que le gène ciblé, par ARNi, ne permet pas le rétablissement du développement normal après inhibition de CDK-12as.
- Les candidats dits « positifs » : la descendance F1 montre un développement post-L1. Ceci indiquera que le gène ciblé, par ARNi, permet le rétablissement du développement normal malgré l'inhibition de CDK-12as.

Un premier criblage a été réalisé afin de tester une fois le knockdown de chaque gène par ARNi. Celui-ci a permis d'identifier 126 candidats positifs supprimant l'arrêt en L1 qui résulte de l'inhibition de CDK-12as. Ces gènes sont distribués sur l'ensemble des chromosomes de *C. elegans*, bien qu'il y en ait moins sur les chromosomes V et X. Le nombre de candidats positifs par chromosome est récapitulé dans le (Tableau 1). Il ne semble pas y avoir de corrélation entre le nombre de candidats positifs sur un chromosome et sa taille.

Afin de confirmer les résultats obtenus dans le crible primaire, un second crible a été réalisé sur les 126 candidats positifs. Le même protocole fut appliqué et chaque candidat a été testé trois fois. A l'issue de ce deuxième crible, les candidats ont été classés en fonction du nombre de réplicas positifs, comme suit (Tableau 2):

- Zéro fois positif
- Une fois positif
- Deux fois positifs
- Trois fois positifs

Les réplicas positifs au moins deux fois sur trois seront considérés comme candidats confirmés. Sur les 126 candidats retestés, 34 furent confirmés.

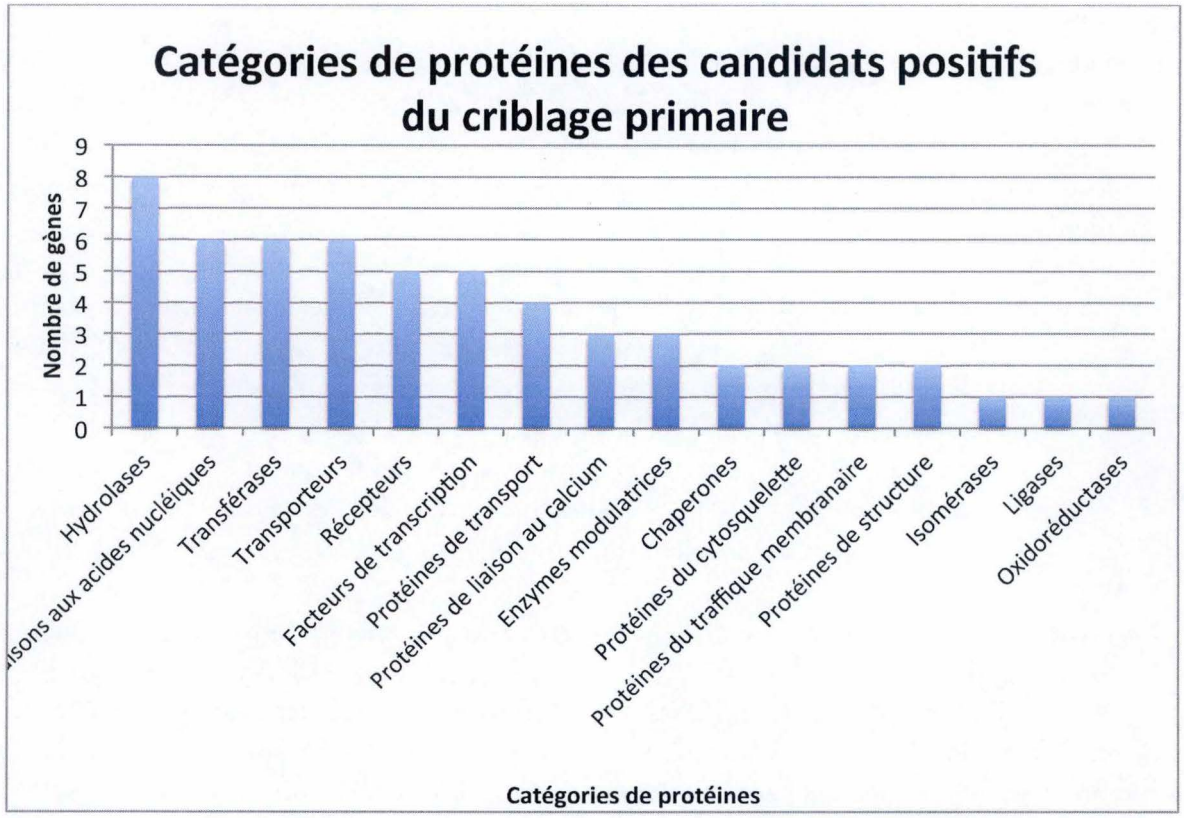


Figure 14 : Catégories de protéines des candidats positifs du criblage primaire. Dans se tableau sont retrouvés les 57 gènes positifs au criblage primaire pour lesquels la fonction de la protéine pour laquelle ils codent est connue. Ils sont répartis en 16 catégories pour lesquels le nombre de gènes est représenté dans cet histogramme.

3.3. Candidats positifs : ontologie des gènes

L'ontologie génique est un outil bioinformatique permettant de mettre en évidence l'enrichissement de certaines catégories fonctionnelles au sein de grands ensembles de gènes Tout d'abord un premier test a été réalisé sur les 126 candidats positifs pour déterminer les catégories de protéines retrouvées. La même opération a été réalisée sur les 34 candidats positifs confirmés au moins deux fois lors du deuxième criblage, effectué en triplicata.

a) Catégories de protéines principalement retrouvées comme candidats positifs après le criblage par ARNi primaire

Au départ, 126 candidats positifs ont été trouvés. Après transformation de leur identifiant de la banque ARNi en identifiant wormbase (le consortium de référence dans la communauté), il ne reste que 98 candidats. Cette différence reflète la difficulté intrinsèque de la biologie des systèmes à adopter une nomenclature universelle, mais aussi l'amélioration continue des analyses bioinformatiques du génome du nématode, y compris la localisation précise des phases ouvertes de lecture. Il faut rappeler que le génome de *C. elegans* a une taille de 100 millions de paires de bases et contient environ 19000 phases ouvertes de lectures dispersées en exons et contenues pour 15% d'entre elles en opéron. Etablir une liste des gènes à cibler dans une banque d'ARNi est donc loin d'être trivial, d'autant plus que la banque a été réalisée il y a plus de dix ans.

Les candidats retenus ont été classés selon la fonction de la protéine pour laquelle ils codent et seuls 57 des 98 candidats ont leur fonction répertoriée ou connue. Ils sont classés en 16 sous-groupes. Le sous-groupe principal est celui des hydrolases contenant principalement des hydrolases et des phosphatases. 8 protéines différentes sont retrouvées dans ce sous-groupe. Ensuite 3 sous-groupes contenant 6 candidats positifs ont été retrouvés. Le premier comprend les protéines de liaison aux acides nucléiques, le second comprend les transférases et le troisième des transporteurs (Figure 14).

Par rapport à la fonction des protéines du troisième groupe, l'hypothèse la plus vraisemblable serait un effet au niveau de l'inhibiteur et non un mécanisme permettant de poursuivre le développement post-embryonnaire.

Il est à ce stade intéressant de comparer les résultats obtenus dans ce criblage primaire avec les catégories de protéines confirmées au moins 2 fois sur trois au second criblage.

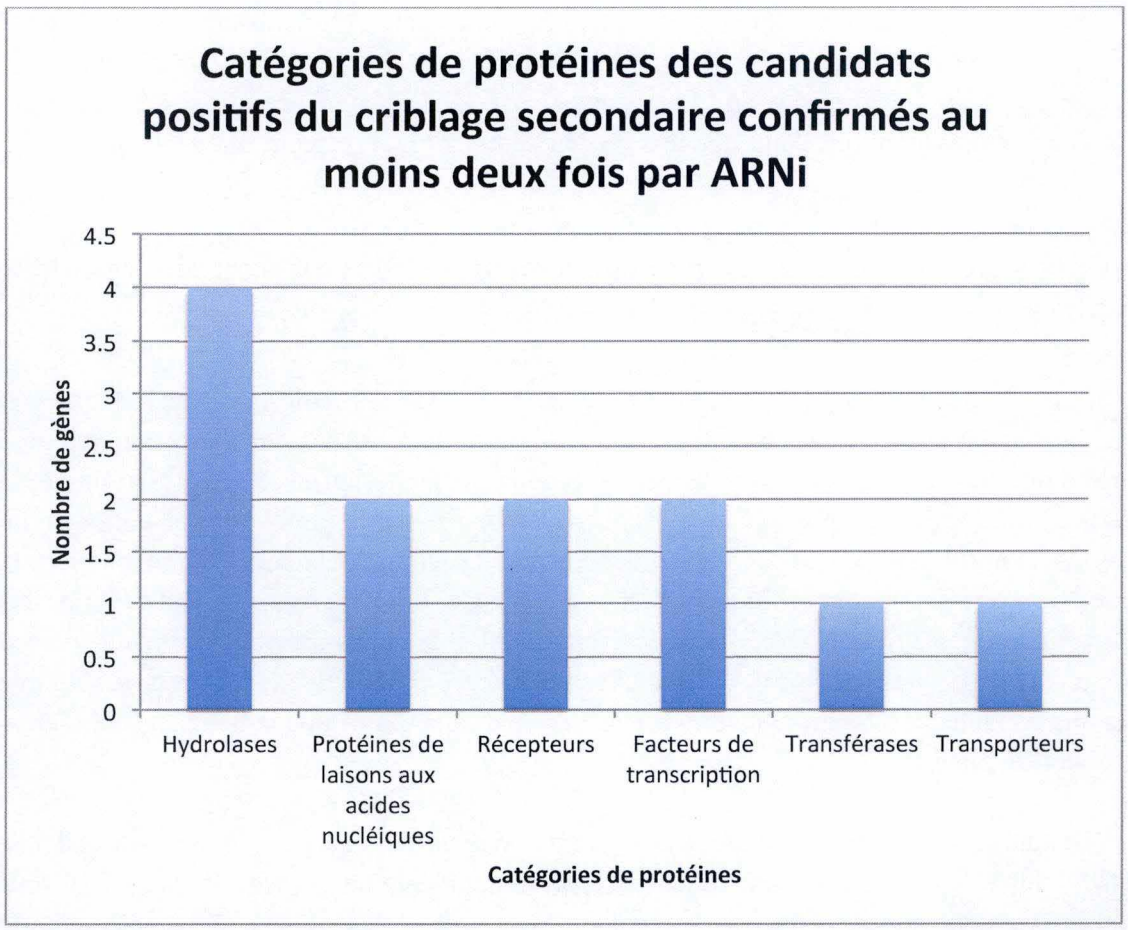


Figure 15 : Catégories de protéines des candidats positifs du criblage secondaire confirmés au moins deux fois par ARNi. 12 des 34 protéines pour lesquels ont connait la fonction sont représentées dans ce graphique. 4 d'entre-elles sont placées dans la catégorie des hydrolases. Les autres sont placées dans la catégorie des protéines de liaisons aux acides nucléiques, des récepteurs, des facteurs de transcription, des transférases ou des transporteurs.

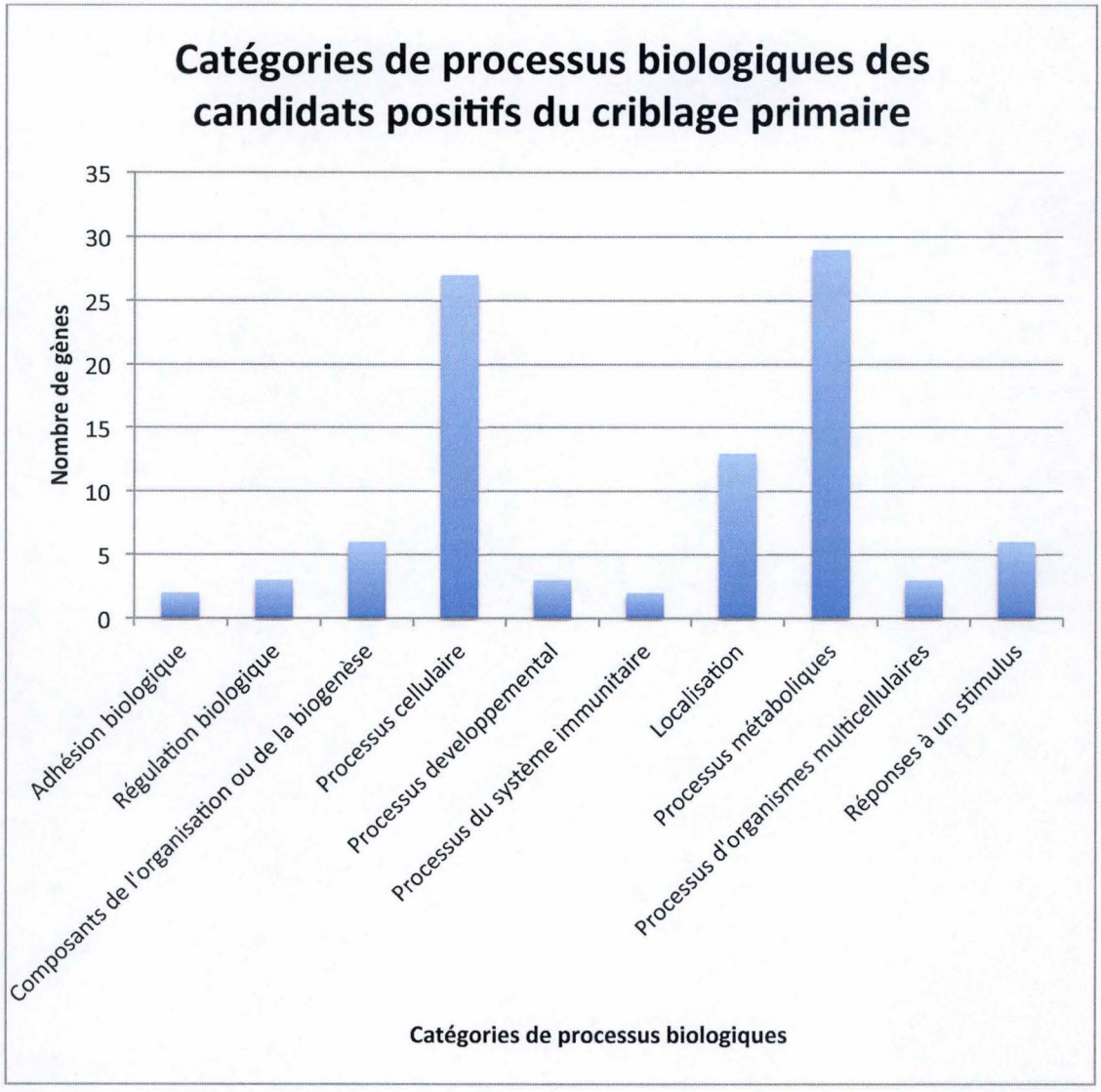


Figure 16 : Catégories de processus biologiques des candidats positifs du criblage primaire. 88 des 126 sont répertoriés dans un processus biologique. Ils sont représentés dans 10 catégories de processus biologique ci-dessus. 27 sont dans la catégorie des processus cellulaires et 29 dans la catégorie des processus métaboliques.

b) Catégories de protéines principalement retrouvées comme candidats positifs après le second criblage par ARNi

34 candidats positifs ont au moins été confirmés 2 fois lors du second criblage. Pour 26 d'entre eux, un identifiant wormbase a été trouvé et pour 12 d'entre eux, la fonction est connue. Ils ont été rangés dans 6 catégories de protéines. La principale est celle des hydrolases et contient 4 protéines. Les autres ne contiennent qu'une ou deux protéines. Ces catégories comprennent les protéines de liaison aux acides nucléiques, les récepteurs, les facteurs de transcription, les transférases et les transporteurs (Figure 15).

Il est important de garder en mémoire qu'une fonction n'est connue que pour 1/3 des candidats positifs. Ces catégories ont pour utilité de montrer une tendance au vu du nombre de gènes dont la fonction n'est pas encore connue.

c) Processus biologiques principalement représentés au sein des candidats positifs après le criblage par ARNi primaire

Par après, l'étude du criblage s'est poursuivie en s'intéressant aux processus biologiques dans lesquels interviennent les gènes et pour lesquels des données plus complètes sont disponibles. En effet, pour les 98 gènes ayant un identifiant wormbase, pour 94 d'entre eux le processus biologique dans lequel ils interviennent est connu. Les candidats positifs ont été classés dans 10 catégories différentes.

La principale correspond aux processus métaboliques et contient 29 gènes. Il est à noter que cette catégorie comprend de nombreux gènes et est fort représentée au niveau du génome. De plus l'arrêt en L1 est en condition physiologique dû à un manque de nourriture. Certains processus métaboliques sont perturbés dans ce cas et il est logique que certains gènes jouant un rôle dans ces processus pourraient permettre de contourner l'arrêt en L1(*45*) (Figure 16).

2 autres catégories sont particulièrement bien représentées. Ce sont celles des processus cellulaires, comprenant 27 candidats, et celles des protéines de localisation comprenant 13 candidats. Il est intéressant de voir quelles catégories de processus biologiques ont été retrouvées dans le second criblage.

d) Processus biologiques principalement représentés au sein des candidats positifs après le second criblage par ARNi

Pour les 26 gènes possédant un identifiant wormbase, 24 d'entre eux ont pu être classés dans une catégorie de processus biologique. La catégorie la plus importante comprend les processus métaboliques pour lesquels 9 candidats ont été confirmés. Pour la catégorie des

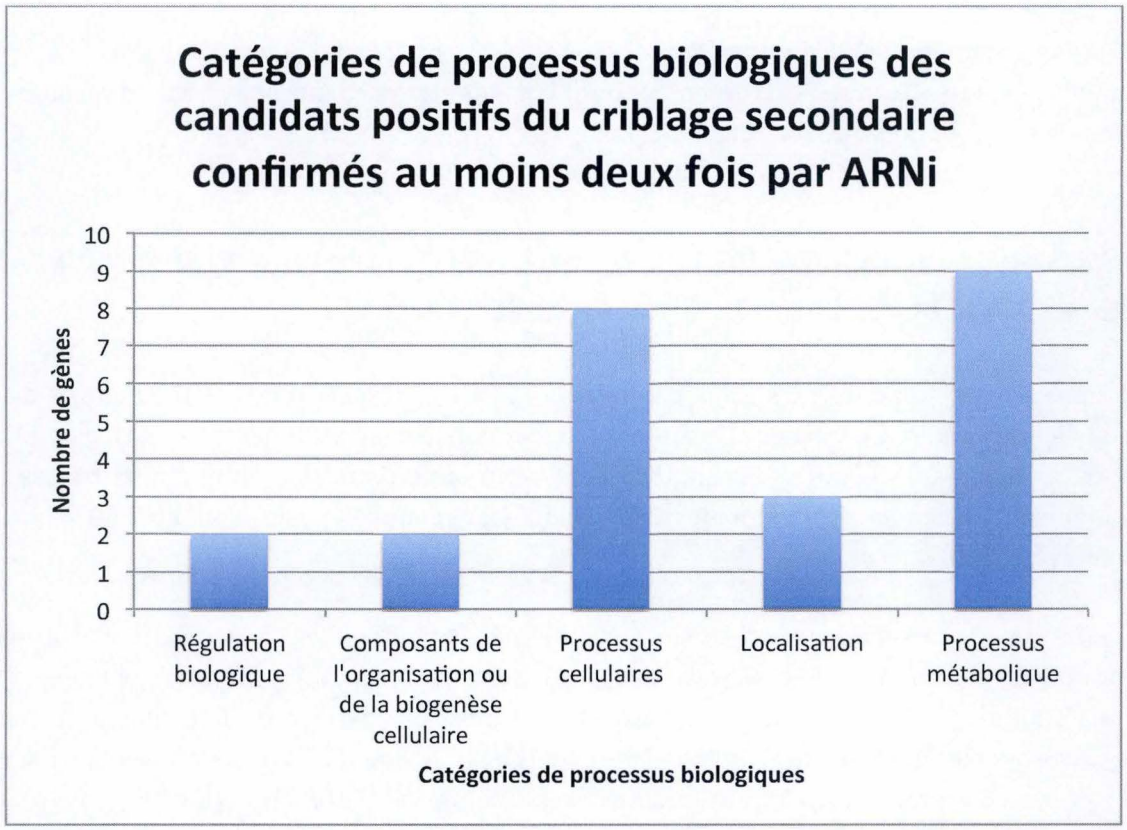


Figure 17 : Catégories de processus biologiques des candidats positifs du criblage secondaire confirmés au moins deux fois par ARNi selon le nombre de gènes. Les catégories les plus représentées sont celles des processus métaboliques et des processus cellulaire. Les processus de localisation, de régulation biologique et les composants de l'organisation ou de la biogenèse cellulaire y sont représentés en moins grande quantité.

processus cellulaires, 8 candidats ont été confirmés. 3 autres catégories sont représentées. Ce sont les catégories de la régulation biologique, des composants cellulaires de l'organisation ou de la biogenèse et de la localisation. Les processus cellulaires et métaboliques sont donc fortement représentés (Figure 17).

3.4. Fonctions de 3 candidats positifs à l'ARNi : *panl-2*, *pgl-1*, *rbr-2*

Parmi les candidats confirmés, 3 candidats furent sélectionnés et étudiés plus en détail pour les raisons suivantes : ces gènes sont bien caractérisés et des hypothèses peuvent être émises pour expliquer la suppression, et très pratiquement, des mutants de disruption sont disponibles, ce qui devrait permettre d'analyser la suppression en détail en croisant ces mutants avec la souche *cdk-12as*. Trois candidats sont décrits brièvement ci-dessous.

A) *panl-2*

panl-2 (F31E3.4) est un gène exprimé au niveau du pharynx, de l'intestin et du système neveux. C'est un orthologue chez l'être humain de PAN2 (PolyA riboNucLease subunit). La protéine produite à partir de ce gène a une activité de liaison aux acides nucléiques et est une sous-unité catalytique du complexe PAN2-PAN3 qui agit comme une ribonucléase appartenant au complexe de déadénylation Pan, spécialisé dans l'initiation de la déadénylation des ARNm(*46*).

Chez *C. elegans* la perte de l'expression de *panl-2* a pour conséquence une diminution significative de la taille de la descendance à 25°C comparée, à des individus sauvages soumis aux mêmes conditions(*46*).

Les déadénylases permettent d'enlever la queue poly A des ARNm, ce qui permet la dégradation des ARNm. C'est un moyen de réguler globalement l'expression génique à un niveau posttranscriptionnel. Beaucoup de déadénylases sont nécessaires à la fertilité des individus hermaphrodites dans toutes les conditions physiologiques mais certaines déadénylases sont uniquement requises en cas de stress thermique. C'est le cas de *panl-2*(*46*).

B) *pgl-1*

pgl-1 (P-GranuLes abnormality) est un gène qui code pour une protéine de liaison à l'ARN. Il est exprimé spécifiquement au niveau de la lignée germinale à tous les stades du développement du ver(*47*). La perte de l'expression de ce gène mène à la perte de la fertilité des vers à des températures élevées et à des granules germinaux défectueux(*48*).

Les granules germinaux ou P-granules sont des organelles cytoplasmiques facilement reconnaissables lorsqu'ils sont observés par microscopie électronique car ils sont denses en électrons. Ceux-ci portent les instructions pour la formation d'une lignée germinale fonctionnelle. Ils sont localisés au niveau de la membrane externe du noyau, une localisation péri-nucléaire qui permet à la plupart des ARNm transcrits dans les cellules germinales de transiter par ceux-ci(*49*).

Les P-granules ont un rôle de gardien. Au sein de ceux-ci sont retrouvés des protéines de la famille Argonaute qui jouent différents rôles comme protéger les ARNm de la lignée germinale du silençage et des protéines permettant de silencer les éléments transposables ainsi que des gènes étrangers (*50*). Des protéines de la famille Vasa qui associée avec WAGO-1 sont nécessaires à l'amplification des siARNs y sont retrouvés (*49*).

Chez le mutant *pgl-1*, la stérilité des vers est observée uniquement lorsque la température de culture est élevée, indiquant que le développement de la lignée germinale est sensible à la température lorsque l'expression de ce gène est perdue ou diminuée. Deux hypothèses peuvent expliquer cette sensibilité aux températures élevées. La première est que la fonction de cette protéine peut être assurée par d'autres protéines ayant une fonction redondante. A faible température, même s'il y a moins de protéines assurant la fonction de *pgl-1*, le ver est capable de se développer car sa croissance est plus lente qu'à température élevée. Au delà d'un certain seuil de température, sa croissance devient trop rapide et les protéines redondantes pour leurs fonctions sont insuffisantes pour pallier l'absence de *pgl-1*(*48*). La seconde hypothèse est que PGL-1 jouerait un rôle de chaperonne moléculaire pour des protéines et des ARNm dont la conformation est stable à faible température mais qui sont inactivées à haute température en l'absence de PGL-1(*48*).

PGL-1 n'est pas requise pour l'établissement de la lignée germinale et la formation des P-granules mais est nécessaire au développement postembryonnaire de la lignée germinale. La stérilité du vers résulte d'une prolifération de la lignée germinale réduite et d'une gamétogenèse défectueuse. Quel que soit la température, toute une série de dysfonctionnements peuvent être observés au niveau de la lignée germinale(*48*).

C) ***rbr-2***

rbr-2 est une déméthylase agissant en enlevant les groupements méthyles au niveau de l'histone H3 sur la lysine 4 (H3K4). C'est l'enzyme SET-2 qui assure la diméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 (H3K4me2). Un troisième méthyle est ajouté par le complexe tritorax ASH-2. La triméthylation de cet histone est généralement associée à l'activation de la transcription. RBR-2 fonctionne comme déméthylase spécifique du troisième groupement méthyle(*51*).

La perte de l'expression des méthyles transférases comme SET-2 et le complexe tritorax ASH-2, par ARNi, aura pour conséquence une augmentation de la longévité des vers(*51*). A l'inverse la perte de l'expression de *rbr-2* a pour conséquence une diminution de la longévité du ver. Ceci laisse penser que la durée de vie des tissus du soma est régulée en partie par ces complexes agissant sur le niveau de méthylation de l'histone H3(*52*).

Les cellules de la lignée germinale sont plus fortement impactées en cas de délétion de *rbr-2*. L'augmentation des marques de triméthylation sur H3K4 sera plus forte au niveau de ces

cellules-là. Au niveau phénotypique il y a des défauts de formation de la vulve chez les hermaphrodites(*53*). De plus, il est important de citer que les rôles de ce gène sont très étendus. Par exemple, un défaut de triméthylation de H3K4 est associé à des troubles neurobiologiques dus à une mauvaise guidance des axones provoqué par un défaut d'expression d'un régulateur de l'actine(*54*).

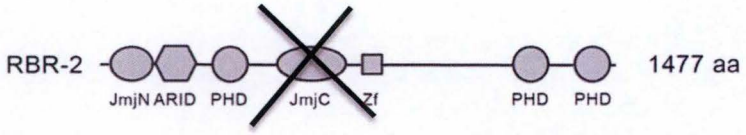


Figure 18 : La protéine RBR-2 sauvage et ses différents domaines. 7 domaines de la protéine sont représentés dont le domaine JmjC, le domaine catalytique de la protéine. Ce domaine est délété chez le mutant tm1231. Cette délétion est de 216 aa (Mariani *et al.* 2016).

cdk-12as ; rbr-2	*cdk-12as ; wt*	wt;wt	wt ;*rbr-2*	
cdk-12as/*cdk-12as* ; *rbr-2*/*rbr-2*	*cdk-12as*/*cdk-12as* ; *rbr-2*/wt	*cdk-12as*/wt ; *rbr-2*/wt	*cdk-12as*/wt ; *rbr-2*/*rbr-2*	*cdk-12as ;rbr-2*
cdk-12as/*cdk-12as* ; *rbr-2*/wt	*cdk-12as*/*cdk-12as* ; wt/wt	*cdk-12as*/wt ; wt/wt	*cdk-12as*/wt ; *rbr-2*/wt	*cdk-12as* ;wt
cdk-12as/wt ; *rbr-2*/wt	*cdk-12as*/wt ; wt/wt	wt/wt ; wt/wt	wt/wt ; *rbr-2*/wt	wt ;wt
cdk-12as/wt ; *rbr-2*/rbr-2	*cdk-12as*/wt ; *rbr-2*/wt	wt/wt ; *rbr-2*/wt	wt/wt ; *rbr-2*/*rbr-2*	wt ;*rbr2*

Figure 19 : Carré de Punnett de la distribution allélique retrouvée en F2. Les différents génotypes dans la génération F2 obtenus après autofécondation des individus doubles mutants hétérozygotes sont représentés dans la figure ci-dessus.

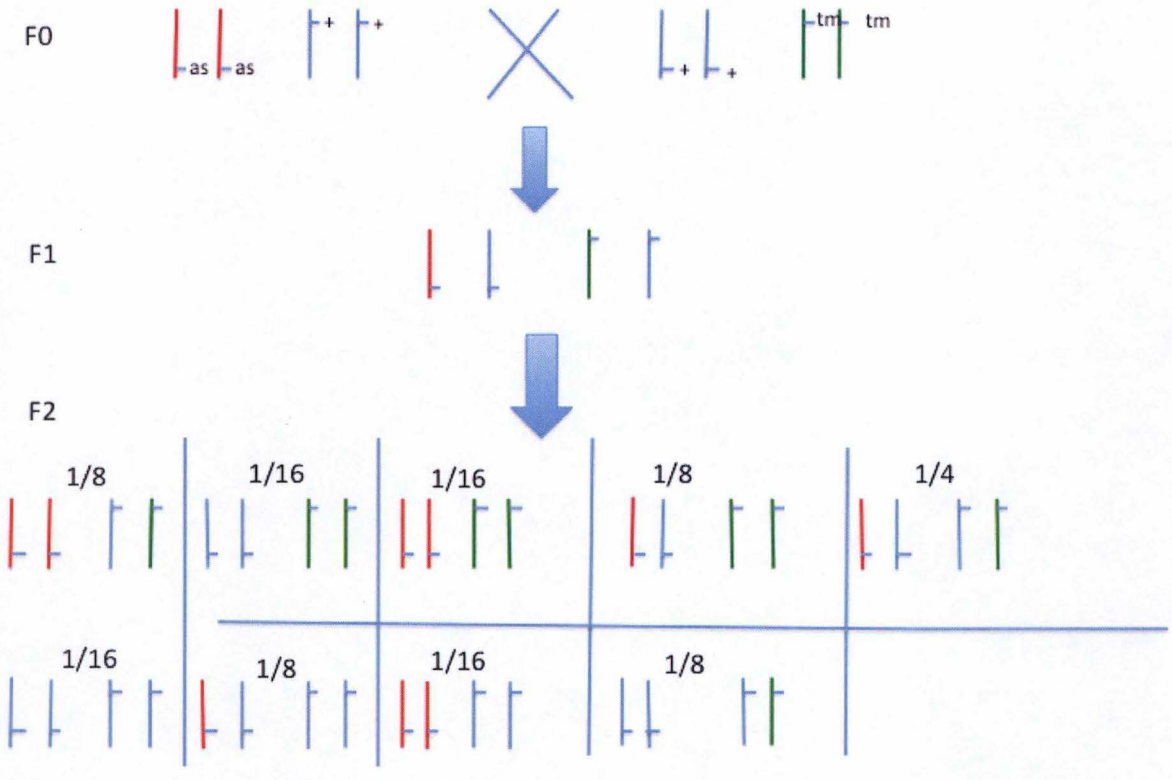


Figure 20 : Schéma du croisement entre *cdk-12as* et *rbr-2*. Les barres rouges représentent le chromosome porteur de *cdk-12as* et les barres vertes le chromosome porteur de *rbr-2*. Les barres bleues correspondent à des chromosomes WT. Les petites barres bleues horizontales, correspondent soit à *cdk-12as* soit à *rbr-2*. En F0 nous avons le croisement entre le mutant *cdk-12as* homozygote et le mutant *rbr-2* homozygote, ce qui mène à une descendance de doubles mutants hétérozygotes *cdk-12as*/wt ; *rbr-2*/wt. La génération F1 s'autoféconde et produit 9 combinaisons possibles représentées ci-dessus. 1/16 sont doubles mutants homozygotes *cdk-12as*/*cdk-12as* ; *rbr-2*/*rbr-2*.

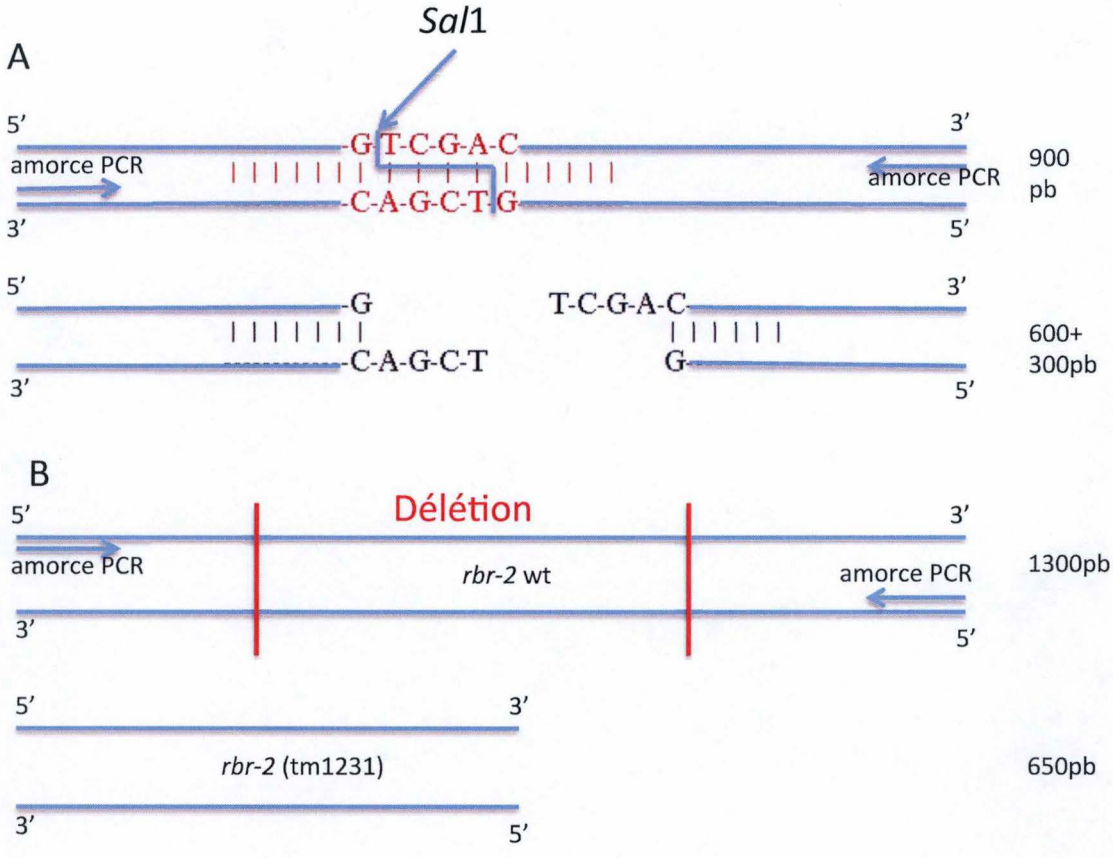


Figure 21 : Explication PCR de *cdk-12as* et *rbr-2* (tm1231). a) Un site de restriction *Sal*1 a été placé dans le mutant *cdk-12as* lors de sa création. Des amorces permettent une amplification par PCR d'une région de 900pb au niveau de *cdk-12* comprenant chez *cdk-12as* le site de restriction. L'enzyme de restriction *Sal*1 permet de couper l'ADN en brins de 300 et de 600pb. Après migration sur un gel d'agarose, il est possible de discriminer une souche wt et mutante facilement. b) Après une amplification par PCR de la région de la délétion du site catalytique de *rbr-2*, chez le mutant tm1231, la longueur du transcrit est de 650 pb. Si la même région est amplifiée chez une souche wt, la longueur de la région amplifiée est de 1300pb. Après migration sur un gel d'agarose, il est possible de discriminer facilement les deux souches.

Génotype	Bandes
rbr-2/rbr-2	650pb
rbr-2/wt	1300 + 650pb
wt/wt	1300pb
cdk-12as/cdk-12as	600 + 300pb
cdk-12as/wt	900 + 600 + 300pb
wt/wt	900pb

Tableau 4 : Bandes obtenues après une PCR suivant le génotype. Dans ce tableau sont représentés les bandes retrouvées après une PCR pour les mutants *rbr-2* et *cdk-12as* homozygotes et hétérozygotes par rapport à un génotype sauvage.

Profil PCR		Nombre de candidats
rbr-2	**0**	12
	1	9
	2	7
	3	9
cdk-12as	**0**	4
	1	13
	2	13
	3	7

Tableau 5 : Le nombre de candidats obtenus suivant le génotype visualisé par PCR pour *rbr-2* et *cdk-12as*. Le numéro 0 indique qu'aucune bande n'a été visualisée. Le numéro 1 indique que c'est un homozygote mutant. Le numéro 2 indique que c'est un hétérozygote mutant. Le numéro 3 indique que c'est une souche sauvage. Dans les 9 candidats homozygotes mutants pour *rbr-2*, 5 l'étaient aussi pour *cdk-12as*.

3.5. Création d'un double mutant *cdk-12as* ; *rbr-2(tm1231)*

Pour croiser deux souches de vers, il faut impérativement obtenir des mâles à croiser avec des hermaphrodites. Pour obtenir ces mâles il faut favoriser les événements de non-disjonction du chromosome X en soumettant les vers, par exemple, à un choc thermique. Ce stress permet d'augmenter la proportion de mâles dans une population et d'avoir des individus en suffisance pour réaliser des croisements avec d'autres souches.

Dans un second temps, des croisements sont réalisés. Ceux-ci répondent aux lois Mendéliennes. Dans ce cas-ci, le mutant *cdk-12as* (as) a été croisé avec un mutant possédant une délétion du site catalytique de *rbr-2* (tm1231) (Figure18). En croisant ces deux souches homozygotes mutantes, 100% d'individus étant as/+ (III) ; tm/+ (IV) sont obtenus, conformément à la première loi de Mendel d'uniformité de la F1. A ce stade, les doubles mutants hétérozygotes obtenus pour les 2 mutations forment une population contenant 50% de mâles et 50% d'hermaphrodites(*55*).

Ensuite, les individus hermaphrodites de la génération F1 sont isolés et s'autofécondent, permettant d'obtenir 9 génotypes différents indiqués dans le (Figure 19). En effet, conformément à la seconde loi de Mendel, il y a disjonction des allèles, c'est à dire brassage. Les deux gènes d'intérêts étant localisés sur des chromosomes différents, la troisième loi de Mendel, la ségrégation aléatoire est d'application. Seul le génotype de double homozygote as/as ; tm/tm est intéressant dans le cadre de notre travail (Figure 20). Il existe plusieurs moyens pour tracer le génotype souhaité: PCR avec ou sans séquençage, observation du phénotype. Dans ce cas-ci, la souche a été vérifiée en testant par PCR les 2 mutations.

Dans cette expérience plusieurs profils PCR ont été observés et ceux-ci ont permis de sélectionner les descendances utilisées pour les croisements. Pour *cdk-12as*, 2 bandes sont retrouvées, une de 300pb et une de 600pb car un site de restriction a été placé dans ce mutant en réalisant une mutation silencieuse. Ceci permet de discriminer un individu sauvage d'un mutant en réalisant une PCR après restriction du produit de PCR par *Sal*1. Pour le mutant tm1231, une délétion a été réalisée. Le fragment amplifié n'est pas de 1300pb comme chez la souche sauvage mais de 650pb (Tableau 3) (Figure 21).

40 candidats ont été testés par PCR. Le résultat est indiqué dans le (Tableau 4). La ségrégation mendélienne prédisant une distribution 9-3-3-1 est respectée pour les deux caractères en tenant compte des pistes sur lesquelles aucune bande n'était visible. 5 doubles mutants homozygotes ont été retrouvés sur 37 individus testés. Le résultat est proche de la Loi mendélienne qui en prédisait 1/16, et donc entre 2 et 3. L'un d'eux fut sélectionné et sa descendance vérifiée.

Le croisement a été réalisé avec succès. Un double mutant homozygote pour *cdk-12as* et *rbr-2* (tm1231) a bien été obtenu. Ce mutant se développe normalement et des expériences peuvent être réalisées.

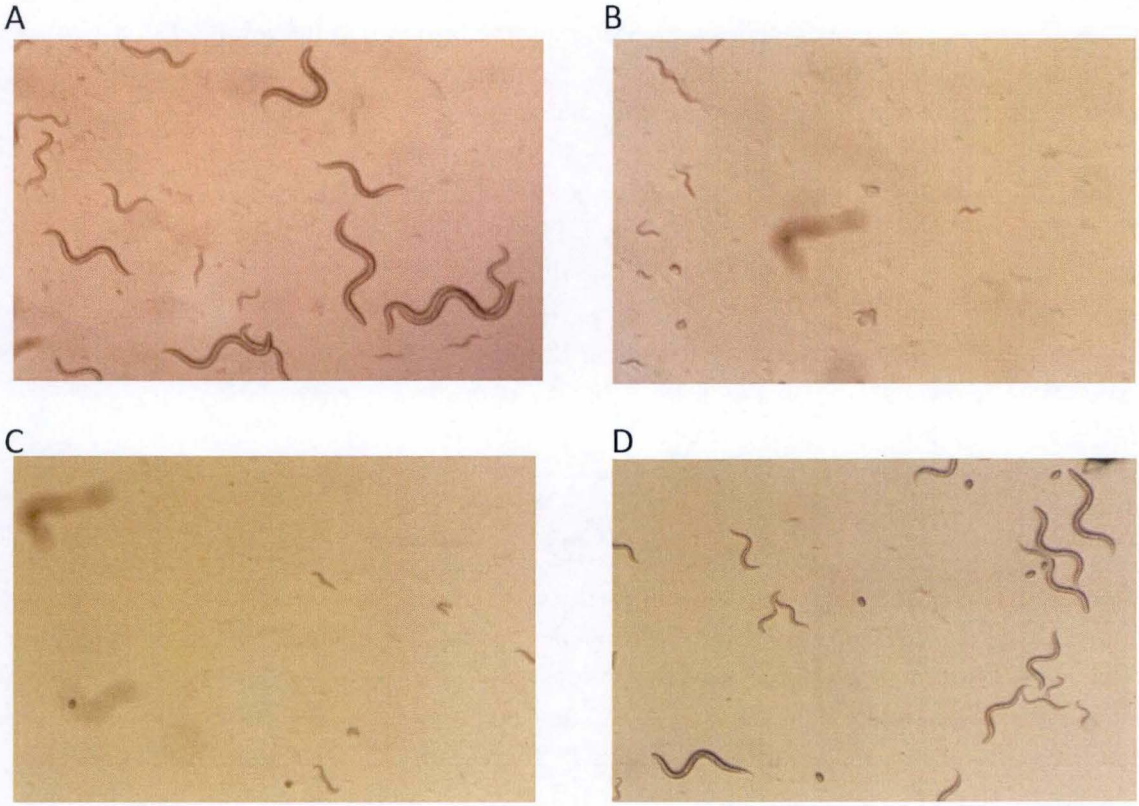


Figure 22 : Criblage de la descendance des souches *cdk-12as*/*rbr-2* (tm1231), *rbr-2*, *cdk-12as* sous 1µM d'inhibiteur. a) Pour la souche *rbr-2*, des vers à tous les stades sont visibles. La descendance se développe au delà du stade L1. b) Pour la souche *cdk-12as*, les vers adultes correspondent à la génération parentale soumise à l'inhibiteur et les vers en L1 à la descendance arrêtée en L1. c) Pour la souche *cdk-12as*/*rbr-2* (tm1231), les vers adultes correspondent à la génération parentale soumise à l'inhibiteur et les vers en L1 à la descendance arrêtée en L1. d) Des vers à tous les stades sont visibles. Il s'agit de la souche *cdk-12as* non soumise à l'inhibiteur.

3.6. Test du développement du mutant *cdk-12as/rbr-2* (tm1231) sous inhibiteur

L'objectif de cette expérience est de tester si cette souche de ver est apte à se développer après le stade L1 lorsque CDK-12as est inhibée. Si elle se développe, cela signifiera que la perte de la fonction de *rbr-2* permet de compenser l'inhibition de CDK-12as.

L'expérience a été réalisée sur le double mutant *rbr-2* (tm1231) ; *cdk-12as*, sur la souche *cdk-12as* et sur *rbr-2*. Ils sont tous les trois nourris avec des bactéries OP50 et soumis à des concentrations d'inhibiteur de 1 µM ou 10 µM.

Durant les jours 2 à 4 du protocole, des observations ont été réalisées pour voir si le double mutant *rbr-2* (tm1231)/*cdk-12as* était apte à poursuivre sa croissance au delà du stade L1 après avoir été soumis à l'inhibiteur.

Ces observations étaient comparées à deux contrôles. *cdk-12as* sous inhibiteur pour contrôler que cette souche s'arrêtait bien au stade L1 comme attendu et *rbr-2* (tm1231) pour vérifier que cette souche poursuivait sa croissance au delà du stade L1 et que la drogue n'avait pas d'effets non spécifiques (Figure 22).

La souche *cdk-12as* fut arrêtée au stade L1 du jour 2 au jour 4 du protocole démontrant l'efficacité de l'inhibiteur. La souche *rbr-2* (tm1231) a atteint le stade L3 au jour 2, l'âge adulte au jour 3 et avait une descendance au jour 4 démontrant que la drogue n'interférait pas avec la croissance de cette souche.

Le mutant *cdk-12as* ; *rbr-2* (tm1231) n'est pas apte à grandir au delà du stade L1 du jour 2 au jour 4 du protocole. Le mutant de délétion tm1231 pour *rbr-2* n'est pas capable de restaurer la croissance du ver au-delà du stade L1 lorsque la kinase CDK-12as est inhibée. Les vers se sont arrêtés au stade L1, et aucun autre phénotype n'a été observé. Il n'y a donc pas de suppression.

Au jour 7 du protocole, l'ensemble des vers avaient repris leur croissance ce qui s'explique par le fait que l'inhibiteur se dégrade au cours du temps et qu'une fois dégradé, les kinases peuvent à nouveau phosphoryler les S2 de la CTD si les vers sont en présence de nourriture.

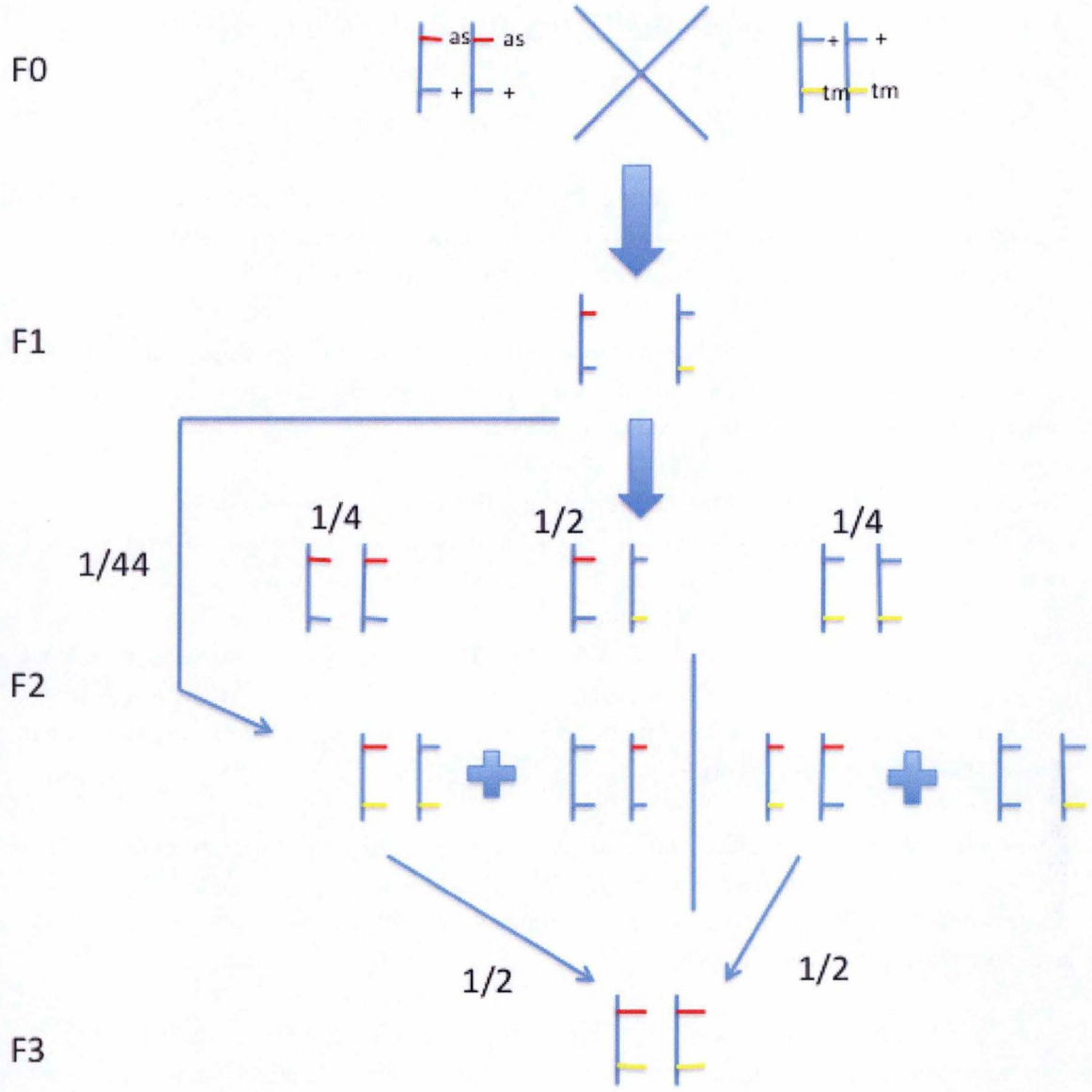


Figure 23 : Croisement des mutants *cdk-12as* et *panl-2* dont la mutation est située sur le même chromosome. Les barres bleues verticales correspondent aux chromosomes. Les barres rouges horizontales correspondent à *cdk-12as* (as), les barres jaunes à *panl-2* (tm) et les bleues aux gènes sauvages. Les 2 mutants homozygotes de la génération F0 sont croisés entre eux. Des individus doubles mutants hétérozygotes sont obtenus. En les croisant, en suivant la loi Mendélienne, le résultat sera des vers de phénotypes tm/tm ; wt/wt ou tm/wt ; as/wt ou wt/wt ; as/as. La ségrégation des allèles n'est pas indépendante. Il faut donc se baser sur les recombinaisons homologues survenant lors de la méiose. Celles-ci sont directement proportionnelles aux nombres de cM séparant les 2 gènes. Ici, il y aura recombinaison homologue entre ces deux gènes, chez un individu sur 44. Sera obtenu: un individu double mutant homozygote pour une des mutations et hétérozygote pour l'autre ainsi qu'un individu simple mutant hétérozygote. L'idée est de prendre un individu double mutant, de le laisser s'autoféconder et un individu sur 2 sera un double mutant homozygote pour les 2 mutations tm/tm ; as/as.

3.7. Création du mutant *cdk-12as/panl-2* par croisement de ces deux souches

Contrairement au cas précédent, les gènes *cdk-12* et *panl-2* sont localisés sur le même chromosome. La stratégie à employer devient un peu plus complexe. Dans un premier temps, un mâle d'une souche est croisé avec un hermaphrodite de l'autre souche pour obtenir un individu double mutant hétérozygote. Cet individu porte, sur chaque chromosome de la paire chromosomique concernée, une des deux mutations accompagnées de l'allèle sauvage pour l'autre gène. Lors de la ségrégation aléatoire, les parents ne pourront transmettre que deux allèles mutés sur 4 ainsi que deux allèles sauvages, ce qui donnera soit des homozygotes mutants pour une des deux mutations et sauvage pour l'autre, soit des individus doubles mutants hétérozygotes(*56*).

La solution est donc de se baser sur un autre paramètre que la ségrégation aléatoire comme les crossing-over. La fréquence de ceux-ci est proportionnelle à la distance qui les sépare sur un chromosome. Cette fréquence est mesurée en cM, et 1cM correspond à 1% de chance qu'il y ait recombinaison entre les deux allèles. A partir de cette fréquence, un petit pourcentage de vers ayant un de ces 4 phénotypes est obtenu : tm/tm ; as/wt + wt/wt ; as/wt ou tm/wt ; as/as + tm/wt ; as/as.

A partir des 4 phénotypes obtenus, des vers sont isolés et pondent pour produire une troisième génération. Les parents sont vérifiés par PCR pour ne sélectionner que les descendances des vers homozygotes mutants pour une des mutations et hétérozygotes pour l'autre. Les autres, ayant perdu totalement une des mutations sont inutiles(*56*).

Pour terminer, la descendance des vers homozygotes mutants pour une des mutations et hétérozygote pour l'autre sera vérifiée car la moitié de ceux-ci aura le phénotype attendu : tm/tm ; as/as. L'autre moitié sera soit wt/wt ; as/as ou tm/tm ; wt/wt suivant le génotype du parent sélectionné (figure 23).

A ce stade, ce mutant est toujours en cours de synthèse. Des problèmes dans la génération de mâles *cdk-12as* sont survenus ainsi qu'une contamination des boites ayant retardée la production de mâles. Ce candidat n'a dès lors pas encore été testé.

4. Discussion

4.1. Problèmes directement liés à l'efficacité de la technique d'ARNi menant à une proportion élevée de faux négatifs

Le criblage par ARNi du génome de *C. elegans* a l'avantage de permettre le criblage à grande échelle mais présente une série d'inconvénients. Le problème principal avec le criblage ARNi est la proportion de faux négatifs. Ceux-ci sont la résultante de différentes causes.

Premièrement, la sensibilité des ARNm à l'ARN interférence est variable dû à des caractéristiques spécifiques aux différents tissus de l'organisme. Par exemple, le système nerveux y est particulièrement résistant(*57*). Cette résistance serait due à une présence limitée de certains composants impliqués dans le mécanisme d'ARNi ou la présence de facteurs déstabilisants les ARNdb(*58*).

Un autre problème est la demi-vie particulièrement longue de certaines protéines. Même si la majorité des ARNm sont dégradés et que l'expression de la protéine est fortement réduite, la présence des protéines produites avant le début de l'expérience par ARNi peut rendre impossible de voir un quelconque phénotype au vu que la protéine est toujours présente(*57*).

La pénétrance et l'expressivité du phénotype sont parfois variables, ce qui peut générer une gamme de phénotypes différents pour un même gène ciblé. Celui-ci peut être un candidat positif dans un criblage par ARNi et dans le suivant un candidat négatif. Ceci est par exemple dû à une quantité variable d'ARN doubles brins absorbés par les vers d'une fois à l'autre ou bien, les bactéries peuvent avoir moins exprimés le double brin d'une manipulation à une autre.

Il est important de garder en mémoire que l'ARNi a une efficacité réduite. Cette technique ne permet pas la dégradation de l'ensemble des ARNm codant pour une protéine, la protéine est toujours faiblement exprimée. Ceci peut être considéré comme un avantage car l'expression de gènes essentiels ne peut pas être complètement éteinte pour que le ver puisse survivre. En réduisant l'expression de ces gènes il est possible d'avoir des informations qu'une mutation perte de fonction n'aurait pas fourni.

4.2. Principaux problèmes techniques rencontrés lors d'une expérience d'ARNi

Des problèmes techniques sont aussi à déplorer bien qu'ils aient été résolus. Ils sont décrits brièvement ci-dessous :

- Il est important de maintenir un degré d'humidité suffisant dans l'incubateur pour prévenir l'évaporation du milieu des puits. La solution trouvée fut la construction d'une boite fermée dans laquelle il y avait du papier humidifié en dessous de la plaque 96 puits. De plus, du S-Medium était rajouté les $5^{èmes}$ jours du protocole.

- Le nombre de vers inoculés par puits est en théorie de 5. Mais dans la pratique, le nombre de vers était compris dans la plupart des cas entre 2 et 8 vers par puits. Les conséquences sont que s'il y a trop peu de vers, il reste beaucoup de bactéries rendant difficile l'observation de la descendance, et s'il y a trop de vers, la génération parentale mange toutes les bactéries, ce qui a pour conséquence que la descendance est arrêtée au stade L1 à cause de l'absence de nourriture.

- Dans la majorité des cas, la descendance est arrêtée au stade L1 à cause de l'inhibiteur. Néanmoins, dans de nombreux puits des vers qui avaient été arrêtés en L1 avaient tendance à voir leur développement redémarrer avant la fin du protocole. La stabilité de la drogue est à remettre en cause. Néanmoins ce problème a surtout été observé lors de la première partie du criblage primaire, et ne fut pratiquement pas observé lors de la seconde partie du criblage primaire.

- Il est à noter, qu'il est difficile de maintenir une banque ARNi au cours du temps et des expériences. Certains clones se perdent et parfois des contaminations peuvent être observées. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de purifier les plasmides des candidats positifs, de les séquencer pour contrôler qu'il n'y a pas de contamination entre les puits et de retransformer des bactéries avec ceux-ci pour obtenir un nouvel aliquot de bactéries sans contamination possible.

- Il est intéressant de citer que dans certains cas, seulement un seul des vers inoculés arrivait à se développer au delà du stade L1. Ceci peut être expliqué par les différences de pénétrance de l'ARNi entre des individus différents. Le seul moyen de valider des candidats suppresseurs reste de les retester avec une autre méthode.

4.3. 3 candidats positifs choisis pour la suite des expériences : *rbr-2, panl-2, pgl-1*

Ces 3 candidats ont été confirmés à plusieurs reprises lors du criblage par ARNi primaire et secondaire. Ils ont été choisis de manière subjective en tenant compte de leur fonction, s'il existait un mutant disponible et déjà caractérisé.

a) Deux hypothèses de mécanismes pour le candidat *rbr-2*

rbr-2 est impliqué dans la déméthylation de H3K4. La triméthylation de cette lysine sur cet histone est généralement une marque activatrice de la transcription.

Une hypothèse serait que la diminution de l'expression de ce gène impliqué dans la déméthylation de H3K4 mènerait à une augmentation de cette triméthylation au niveau du génome. L'inhibition de l'activité kinase de *cdk-12* dans le mutant *cdk-12as* en présence d'inhibiteur, mène à une réduction de l'expression d'un set de gènes. L'idée serait qu'il existerait un effet indirect où l'augmentation de marques activatrices de la transcription aurait un effet compensatoire par rapport à la diminution de l'expression des gènes liés à la croissance du vers. C'est notre hypothèse de travail actuel pour expliquer la suppression.

b) La nucléase PANL-2 et l'hypothèse de régulation de certains ARNm par CDK-12

Pour *panl-2* l'hypothèse est directement en lien avec le fait qu'il code pour une nucléase. L'idée est qu'elle participe à la dégradation des ARNm en enlevant la queue polyA. Chez le mutant *cdk-12as,* au niveau moléculaire, une diminution de l'expression d'un ensemble de gènes, en lien avec la croissance notamment, situé dans des opérons en position 2 à 8, est observé. La première hypothèse est qu'il y avait un effet transcriptionnel. Dès lors, des expériences de ChIP ont été réalisées dans le laboratoire (Clément Cassart, données non présentées) et elles ont révélé que la diminution du niveau d'expression de ces gènes n'était pas liée avec une diminution de l'occupation de ces gènes par la Pol II excluant un effet transcriptionnel.

Une autre possibilité serait que CDK-12 serait nécessaire pour le trans-splicing par le SL2, un processus qui permet la protection des ARNm et l'ajout de la queue polyA en parallèle. Un scénario possible serait que l'inactivation de CDK-12as ne bloquerait pas la transcription le long de l'opéron mais les ARNm générés aux positions 2 et ultérieures ne seraient pas ou moins bien protégés de la dégradation, ce qui résulterait en une dégradation rapide de ces transcrits d'ARNm. L'augmentation de dégradation induite par un trans-splicing SL-2 est

inefficace quand CDK-12 est inhibée et pourrait donc être contrebalancée par une diminution de la dégradation liée à la déadénylation en 3'.

Le crible ARNi a démontré que la diminution de l'expression de nucléases comme *panl-2* ou K02A11.3 a permis de supprimer le phénotype de la perte de fonction de la kinase CDK-12as. Ceci a eu pour conséquence la décision de poursuivre l'expérience avec un double mutant *panl-2/cdk-12as*.

c) ***pgl-1*** :

pgl-1 a été choisi car cette souche est disponible au labo et qu'elle a été un candidat positif au criblage par ARNi. A ce stade aucune hypothèse précise n'est à postuler. En cas de confirmation de ce candidat, des expériences diverses pourront être réalisées pour apporter une hypothèse de mécanisme. Le lien devrait être indirect.

4.4. Critiques de l'approche ARNi et doubles mutants

a) Défauts de l'ARNi

L'ARNi ne permet qu'une diminution de l'expression, donc le gène ciblé est toujours présent. De plus, la pénétrance des ARNi est variable et varie même d'un tissu à un autre. L'ARNi ne correspond pas à une perte totale de fonctions dans la plupart des cas(*57*).

b) Défauts des mutants

Les mutants, comme celui de *rbr-2*, (tm1231), correspondent à la perte de domaines de la protéine. Le mutant tm1231 ne perd que le domaine jmjC, qui correspond au domaine catalytique, les autres domaines sont conservés. Cette protéine est sans domaine catalytique dans le ver car la délétion n'a pas décalé la phase de lecture. Ce mutant est celui qui a été utilisé pour construire le double mutant. Une telle protéine garde ses capacités à interagir avec d'autres protéines et ne correspond pas à une délétion totale du gène menant à la perte de l'entièreté des fonctions de la protéine(*53*). Si notre hypothèse, que la suppression passe par une augmentation de la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4, cette augmentation devrait toujours être évidente dans le mutant puisque celui-ci génère une protéine dont le site catalytique est absent. Les données obtenues avec le mutant ne soutiennent donc pas notre hypothèse. Toutefois, en l'absence de données fonctionnelles, ces interprétations demeurent spéculatives.

c) L'ARNi est fort différente d'une mutation perte de fonction

A ce stade il est logique de remarquer que l'approche ARNi est fort différente de la seconde approche et peut mener à un résultat différent de celui obtenu par ARNi. Il est possible que d'autres domaines de la protéine puissent avoir des rôles à jouer. Il est a noté que des différences phénotypiques sont observables entre différents mutants de *rbr-2*. Par exemple le mutant tm1231 aura une longévité moindre par rapport à une souche sauvage alors que le mutant ok2544, qui correspond à une délétion plus large sans décalage du cadre de lecture, vivra plus longtemps.

4.5. La souche *cdk-12as/rbr-2* (tm1231) ne permet pas la croissance du ver au delà du stade L1 sous inhibiteur

Suite au criblage par ARNi, il était ressorti que le knockdown du gène codant pour la déméthylase RBR-2 permettait de restaurer la croissance des vers après inhibition de CDK-12as. Un mutant *cdk-12as ; rbr-2(tm1231)* a été créé afin de vérifier si la perte de fonction totale de RBR-2 pouvait supprimer l'arrêt en L1 imposé par l'inhibition de CDK-12as. La mutation tm1231 consiste en une délétion en phase du domaine catalytique de la protéine.
Cette souche s'est avérée inapte à proliférer lorsqu'elle est placée sous inhibiteur malgré la seconde mutation. La perte de fonction de *rbr-2* ne permet pas de restaurer la croissance des vers. Une partie des raisons sont liées aux différences qu'il existe entre l'approche ARNi et les délétions, qui ont été détaillées ci-dessus.

Une autre possibilité serait qu'une diminution de l'expression de ce gène permet aux vers de poursuivre leur croissance, mais que la perte totale de sa fonction nuit au développement des vers et les empêchent de se développer au delà du stade L1.

A ce stade il est important de retenir que l'expérience n'a pas confirmé les résultats obtenus par ARNi, mais qu'un autre mutant plus large ou une autre méthode pourrait toujours confirmer le résultat obtenu par ARNi. L'idée est soit de vouloir continuer à investiguer sur ce candidat ou de poursuivre les recherches sur d'autres candidats. La seconde option a été choisie.

5. Conclusions et perspectives

5.1. Conclusions

Tout d'abord, une expérience d'ARNi a été mise au point et réalisée sur le génome entier de *C. elegans*. Cette expérience a permis de générer une quantité importante de donnée et de réduire de plus de 99,5% les candidats possibles pour restaurer le phénotype sauvage lorsque notre mutant est sous inhibiteur.

Ces candidats obtenus ont été retestés plusieurs fois, ce qui a permis de sélectionner les candidats pour lesquels l'expérience était la plus reproductible, augmentant les chances de confirmer le résultat obtenu par ARNi avec une autre méthode.

La méthode choisie fut de mettre en présence de la mutation *cdk-12as*, une mutation pour un des candidats positifs. La souche *cdk-12as* a été croisée avec succès avec la souche *rbr-2* pour laquelle des mâles avaient été obtenus. Le double mutant obtenu, homozygote pour les 2 mutations, a ensuite été testé. Le résultat fut négatif.

L'expérience a été planifiée pour deux autres candidats mais malheureusement, il a été très difficile d'obtenir des mâles de la souche *cdk-12as* en suffisance. Ces expériences devront être réalisées pour pouvoir confirmer ou non ces candidats positifs. Il reste par après beaucoup d'autres candidats à tester.

Une conclusion qui peut être tirée est qu'il existe de nombreuses relations directes ou indirectes entre *cdk-12as* et d'autres gènes au vu que le criblage par ARNi a permis de détecter de nombreux positifs mais il faut les tester avec une autre méthode pour confirmer les résultats obtenus.

5.2. Perspectives

A ce stade, plusieurs perspectives peuvent être proposées quant à la suite des expériences qui ont déjà été réalisées.

a) Perspectives en lien avec l'ARNi

Une perspective intéressante serait de faire un second criblage par ARNi avec *a priori* pour cibler une série de gènes que nous suspectons d'avoir un lien avec l'arrêt en L1. Le criblage présenté dans ce travail a été fait en aveugle et à grande échelle, sans répétition complète. Retester des gènes intéressants permettrait d'élargir le nombre de candidats positifs. Par exemple, les gènes en lien avec le métabolisme sont intéressants puisque l'arrêt en L1 (diapause) résulte d'un arrêt métabolique lorsque les conditions environnementales sont défavorables (*22*).

b) Perspectives au niveau des souches de *C. elegans*

Une perspective intéressante serait de construire une souche double mutante avec un mutant de délétion pour *cdk-12*. Car dans notre mutant, la protéine et ses interactions avec le protéome ont été maintenues, seul le site catalytique est inhibé. Le mutant de délétion est différent du mutant *cdk-12as*. Ceci permettrait en plus d'être affranchi de l'inhibiteur. Il faudrait dans ce cas réaliser une analyse génétique fine pour observer si on peut obtenir des doubles mutants viables.

Une expérience qui pourrait être faite serait de créer une souche double mutante *cdk-12as* et *rbr-2* employant une autre mutation que celle du mutant tm1231. Les phénotypes pouvant être opposés comme dans le cas de la longévité des vers, où pour tm1231, une réduction de la longévité est observée, alors que pour d'autres mutants, les vers vivent plus vieux. Il serait dès lors possible de confirmer le gène candidat *rbr-2*, bien que le résultat ait été négatif pour le mutant tm1231.

Une autre perspective serait de terminer les expériences qui ont déjà été réalisées. En effet, les doubles mutants homozygotes comprenant *cdk-12as* ; *panl-2* et *cdk-12as* ; *pgl-1* n'ont pas pu être obtenus dans les temps à cause de problèmes pour la génération de mâle. L'idée serait de terminer les croisements pour obtenir les souches désirées et ensuite de les tester. Il sera peut être possible de confirmer que ces candidats sont bel et bien des résultats positifs par cette seconde méthode.

c) Perspectives d'expériences complémentaires

Après le criblage ARNi, 3 gènes ont été choisis car une hypothèse quant à leur mode d'action sur la suppression de l'arrêt en L1 pouvait être postulée. Les autres candidats ont été laissés sur le côté pour cause de manque de moyens humains. Néanmoins, il pourrait être intéressant d'étudier de plus près leurs relations avec *cdk-12* et l'arrêt en L1.

Certains gènes sont probablement moins intéressants comme le transporteur *aqp-3*, dont l'hypothèse principale serait un problème lié au transport de la drogue. Le ver serait donc apte à poursuivre sa croissance car l'activité de phosphorylation de la S2 serait suffisante. Pour tous les autres, étudier de plus près leur lien avec la suppression de l'arrêt en L1 serait intéressant.

Il est important de rappeler qu'un criblage ARNi entraine une diminution de l'expression et non une perte totale de fonction. Il serait intéressant de réaliser une expérience où l'inhibition des gènes est totale, par exemple par mutagenèse dirigée contre chacun des gènes pour découvrir quels sont les candidats qui permettent de contourner l'arrêt en L1. Dans ce cas-ci, il serait possible de découvrir des candidats pour lesquels une expression faible est suffisante pour maintenir la fonction lorsqu'un ARNi est réalisé, mais pour lesquels lorsqu'il y a une perte de fonction totale, les candidats sont aptes à dépasser le stade L1 sous inhibiteur. Cette approche est donc complémentaire à l'approche par ARNi. De plus cette expérience permettrait de confirmer par une seconde méthode l'entièreté des candidats positifs découverts par ARNi.

Une autre idée serait de s'intéresser aux autres mutants pour lesquels il y a un arrêt en L1 ou un phénotype proche de celui observé. L'idée serait de voir s'il n'y a pas de lien au niveau des voies moléculaires.

La difficulté à ce stade dans n'importe quel domaine de recherche est de choisir quel chemin prendre car les possibilités d'avancées dans la problématique sont infinies. Ici toutes les pistes évoquées sont intéressantes à explorer mais il faut garder à l'esprit qu'il est impossible de réaliser l'entièreté de ces perspectives.

6. Bibliographie

1. E. A. Bowman, W. G. Kelly, RNA polymerase II transcription elongation and Pol II CTD Ser2 phosphorylation: A tail of two kinases. *Nucleus* **5**, 224 (May-Jun, 2014).
2. R. B. Robert J. Sims III, 2 and Danny Reinberg, Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes and Development*, (2004).
3. R. Srivastava, S. H. Ahn, Modifications of RNA polymerase II CTD: Connections to the histone code and cellular function. *Biotechnology Advances* **33**, 856 (2015).
4. T. K. Anton Meinhart, Sabine Hoeppner, Sonja Baumli, and Patrick Cramer, A structural perspective of CTD function. *Genes and Development*, (2005).
5. P. Materne *et al.*, Promoter nucleosome dynamics regulated by signalling through the CTD code. *eLife* **4**, e09008 (2015).
6. J. H. Graber, J. Salisbury, L. N. Hutchins, T. Blumenthal, C. elegans sequences that control trans-splicing and operon pre-mRNA processing. *RNA* **13**, 1409 (2007).
7. I. P. Donald Evans, Margaret MacMorris, Devin Leake, Carol J. Wilusz, and Thomas Blumenthal, A complex containing CstF-64 and the SL2 snRNP connects mRNA 3 end formation and trans-splicing in C. elegans operons. *Genes and Development*, 2562 (2001).
8. C. A. Bosken *et al.*, The structure and substrate specificity of human Cdk12/Cyclin K. *Nature communications* **5**, 3505 (2014).
9. J. Drogat, D. Hermand, Gene-specific requirement of RNA polymerase II CTD phosphorylation. *Molecular microbiology* **84**, 995 (Jun, 2012).
10. C. Cassart, J. Drogat, V. Migeot, D. Hermand, Distinct requirement of RNA polymerase II CTD phosphorylations in budding and fission yeast. *Transcription* **3**, 231 (Sep-Oct, 2012).
11. D. Blazek *et al.*, The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes & development* **25**, 2158 (Oct 15, 2011).
12. P. De Ley, A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1 (2006).
13. A. K. Corsi, B. Wightman, M. Chalfie, A Transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1 (2015).
14. T. Stiernagle, Maintenance of C. elegans. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1 (2006).
15. P. J. Hu, Dauer. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, (2007).
16. A. Reina, A. B. Subramaniam, A. Laromaine, A. D. Samuel, G. M. Whitesides, Shifts in the distribution of mass densities is a signature of caloric restriction in Caenorhabditis elegans. *PloS one* **8**, e69651 (2013).
17. A. B. Artyukhin, J. J. Yim, M. Cheong Cheong, L. Avery, Starvation-induced collective behavior in C. elegans. *Scientific reports* **5**, 10647 (2015).
18. I. Lee, A. Hendrix, J. Kim, J. Yoshimoto, Y. J. You, Metabolic rate regulates L1 longevity in C. elegans. *PloS one* **7**, e44720 (2012).
19. L. R. Baugh, J. Demodena, P. W. Sternberg, RNA Pol II accumulates at promoters of growth genes during developmental arrest. *Science* **324**, 92 (Apr 3, 2009).
20. C. S. Maxwell *et al.*, Pol II docking and pausing at growth and stress genes in C. elegans. *Cell reports* **6**, 455 (Feb 13, 2014).
21. Y. Chen, L. R. Baugh, Ins-4 and daf-28 function redundantly to regulate C. elegans L1 arrest. *Developmental biology* **394**, 314 (Oct 15, 2014).

22. R. E. Kaplan *et al.*, dbl-1/TGF-beta and daf-12/NHR Signaling Mediate Cell-Nonautonomous Effects of daf-16/FOXO on Starvation-Induced Developmental Arrest. *PLoS genetics* **11**, e1005731 (Dec, 2015).
23. T. Blumenthal, P. Davis, A. Garrido-Lecca, Operon and non-operon gene clusters in the C. elegans genome. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1 (2015).
24. A. Zaslaver, L. R. Baugh, P. W. Sternberg, Metazoan operons accelerate recovery from growth-arrested states. *Cell* **145**, 981 (Jun 10, 2011).
25. Q. Lei *et al.*, Evolutionary Insights into RNA trans-Splicing in Vertebrates. *Genome biology and evolution* **8**, 562 (2016).
26. T. Blumenthal, Trans-splicing and operons in C. elegans. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1 (2012).
27. A. M. Jose, Movement of regulatory RNA between animal cells. *Genesis* **53**, 395 (Jul, 2015).
28. C. E. Rocheleau, RNA interference: Systemic RNAi SIDes with endosomes. *Current biology : CB* **22**, R873 (Oct 23, 2012).
29. A. M. Jose, C. P. Hunter, Transport of sequence-specific RNA interference information between cells. *Annual review of genetics* **41**, 305 (2007).
30. W. Qu *et al.*, Reliability analysis of the Ahringer Caenorhabditis elegans RNAi feeding library: a guide for genome-wide screens. *BMC genomics* **12**, 170 (2011).
31. R. S. Kamath, M. Martinez-Campos, P. Zipperlen, A. G. Fraser, J. Ahringer, Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Genome biology* **2**, RESEARCH0002 (2001).
32. F. J. S. Monica C. Vella, C. elegans microRNAs. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, (2005).
33. F. Simmer *et al.*, Genome-wide RNAi of C. elegans using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS biology* **1**, E12 (Oct, 2003).
34. A. C. Bishop, O. Buzko, K. M. Shokat, Magic bullets for protein kinases. *Trends in cell biology* **11**, 167 (Apr, 2001).
35. J. S. Kim *et al.*, A chemical-genetic strategy reveals distinct temporal requirements for SAD-1 kinase in neuronal polarization and synapse formation. *Neural development* **3**, 23 (2008).
36. P. J. Alaimo, M. A. Shogren-Knaak, K. M. Shokat, Chemical genetic approaches for the elucidation of signaling pathways. *Current opinion in chemical biology* **5**, 360 (Aug, 2001).
37. D. L. R. Elizabeth Anne Bowman, and William Kelly, Amino Acid Substitutions in the Caenorhabditis elegans RNA Polymerase II Large Subunit AMA-1/ RPB-1 that Result in a-Amanitin Resistance and/or Reduced Function. *Genes/ Genomes/ Genetics* **1**, (2011).
38. W. S. Paul *et al.*, Monomethyl Branched-Chain Fatty Acids Play an Essential Role in Caenorhabditis elegans Development. *PLoS biology* **2**, e257 (2004).
39. D. A. Daniel M. Freed, w & Mark A. Lemmon, Ligand regulation of a constitutively dimeric EGF receptor. *Nature communications*, (2015).
40. A. Oshima, T. Matsuzawa, K. Murata, K. Tani, Y. Fujiyoshi, Hexadecameric structure of an invertebrate gap junction channel. *Journal of molecular biology* **428**, 1227 (2016).
41. K. Thyagarajan, K. Afshar, P. Gonczy, Polarity mediates asymmetric trafficking of the G heterotrimeric G-protein subunit GPB-1 in C. elegans embryos. *Development* **138**, 2773 (2011).

42. T. Saur *et al.*, A genome-wide RNAi screen in Caenorhabditis elegans identifies the nicotinic acetylcholine receptor subunit ACR-7 as an antipsychotic drug target. *PLoS genetics* **9**, e1003313 (2013).
43. J. Ahringer, Reverse genetics. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, (2006).
44. J. A. Powell-Coffman, J. Knight, W. B. Wood, Onset of C. elegans gastrulation is blocked by inhibition of embryonic transcription with an RNA polymerase antisense RNA. *Developmental biology* **178**, 472 (Sep 15, 1996).
45. K. Ashrafi *et al.*, dbl-1/TGF-Î² and daf-12/NHR Signaling Mediate Cell-Nonautonomous Effects of daf-16/FOXO on Starvation-Induced Developmental Arrest. *PLoS genetics* **11**, e1005731 (2015).
46. M. Nousch, N. Techritz, D. Hampel, S. Millonigg, C. R. Eckmann, The Ccr4-Not deadenylase complex constitutes the main poly(A) removal activity in C. elegans. *Journal of cell science* **126**, 4274 (Sep 15, 2013).
47. M. S. Sengupta, P. R. Boag, Germ granules and the control of mRNA translation. *IUBMB Life* **64**, 586 (2012).
48. I. Kawasaki *et al.*, PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in C. elegans. *Cell* **94**, 635 (Sep 4, 1998).
49. J. T. Wang, G. Seydoux, P granules. *Current biology : CB* **24**, R637 (Jul 21, 2014).
50. E. Voronina, G. Seydoux, P. Sassone-Corsi, I. Nagamori, RNA Granules in Germ Cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, a002774 (2011).
51. S. Wang, K. Fisher, G. B. Poulin, Lineage specific trimethylation of H3 on lysine 4 during C. elegans early embryogenesis. *Developmental biology* **355**, 227 (2011).
52. N. Terzi, L. S. Churchman, L. Vasiljeva, J. Weissman, S. Buratowski, H3K4 Trimethylation by Set1 Promotes Efficient Termination by the Nrd1-Nab3-Sen1 Pathway. *Molecular and cellular biology* **31**, 3569 (2011).
53. E. L. Greer *et al.*, Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in C. elegans. *Nature* **466**, 383 (2010).
54. L. Mariani, Y. C. Lussi, J. Vandamme, A. Riveiro, A. E. Salcini, The H3K4me3/2 histone demethylase RBR-2 controls axon guidance by repressing the actin-remodeling gene wsp-1. *Development* **143**, 851 (2016).
55. J. Hodgkin, Male Phenotypes and Mating Efficiency in CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics* **103**, 43 (Jan, 1983).
56. D. Fay, Genetic mapping and manipulation: Chapter 7-Making compound mutants. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1 (2006).
57. R. S. Kamath, J. Ahringer, Genome-wide RNAi screening in Caenorhabditis elegans. *Methods* **30**, 313 (Aug, 2003).
58. D. L. C. Lisa Timmonsa, Andrew Firea, Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans. *Gene* **Volume 263**, (2001).