



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 10916

**To cite this version :**

Cely, Isabelle. *Rôle des microARN lors des infections par les virus animaux et humains*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 97 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# RÔLE DES MICROARN LORS DES INFECTIONS PAR LES VIRUS ANIMAUX ET HUMAINS

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**CELY Isabelle**

Née, le 2 décembre 1987 à LA GARENNE-COLOMBES (92)

---

**Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Christophe PASQUIER**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Stéphane BERTAGNOLI**

**Mme Christelle CAMUS**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt  
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1°  
CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2°  
CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT  
AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

**MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS**

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*  
M. **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

# REMERCIEMENTS

---

## **A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier**

Professeur à l'Université Toulouse III Paul Sabatier

Praticien hospitalier

*Microbiologie*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider notre jury de thèse,  
Hommages respectueux.

## **A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie infectieuse*

Qui m'a confié ce sujet et guidée dans l'élaboration de ce manuscrit,  
Sincères remerciements.

## **A Madame le Docteur Christelle Camus**

Maître de Conférences en Biologie et Génétique Moléculaires

Qui nous a fait l'honneur de prendre part à notre jury,  
Sincère reconnaissance.



# TABLE DES MATIÈRES

---

---

INTRODUCTION.....	9
-------------------	---

## PARTIE 1 : RÔLES ET BIOSYNTHÈSE DES MICROARN

1. Rôles des microARN.....	11
1.1. Découverte des microARN.....	11
1.2. MicroARN chez les métazoaires.....	12
1.3. MicroARN chez les plantes.....	12
1.4. MicroARN et physiologie.....	12
1.4.1. MicroARN et cellules souches.....	12
1.4.2. MicroARN et cellules germinales.....	12
1.4.3. MicroARN et cycle cellulaire.....	13
1.4.4. MicroARN, hématopoïèse et immunité.....	13
1.4.5. MicroARN et tissu nerveux.....	13
1.4.6. MicroARN et muscles.....	13
1.5. MicroARN et pathologie.....	13
1.5.1. MicroARN et cancers.....	14
1.5.2. MicroARN et maladies cardiovasculaires.....	15
1.5.3. MicroARN et maladies du système nerveux central.....	15
1.5.4. MicroARN et maladies génétiques.....	16
1.5.5. MicroARN et maladies infectieuses.....	16
2. Identification et nomenclature des microARN.....	17
2.1. Méthodes d'identification des microARN et de leurs cibles.....	17
2.2. Nomenclature des microARN.....	18
3. Gènes à l'origine des microARN.....	20
3.1. MicroARN exoniques.....	20
3.2. MicroARN introniques.....	20
3.2.1. Introns de régions non codantes.....	20
3.2.2. Introns de régions codantes.....	20
3.2.3. Mirtrons, courts introns de régions codantes.....	21
3.3. MicroARN mixtes.....	21
3.4. Groupe de gènes ( <i>cluster</i> ).....	21
4. Transcription des microARN.....	22
4.1. Action de l'ARN polymérase.....	22
4.2. Structure des transcrits primaires.....	23
4.3. Cas particulier des mirtrons.....	23
5. Maturation des microARN.....	24
5.1. Action de Drosha dans le noyau.....	24
5.1.1. Composition de Drosha.....	24
5.1.2. Sélection du site de clivage.....	25



5.1.3. Cas des microARN introniques.....	25
5.1.4. Résultat du clivage.....	26
5.2. Transport par exportin-5.....	26
5.2.1. Modalités de l'export.....	27
5.2.2 Exportin-5 et stabilité du pré-microARN.....	27
5.3. Action de Dicer dans le cytoplasme.....	27
5.3.1. Composition de Dicer.....	27
5.3.2. Sélection du site de clivage.....	28
5.3.3. Résultat du clivage.....	28
5.4. Sélection du brin guide.....	29
5.4.1. Assemblage du miRISC.....	29
5.4.2. Modalités de sélection.....	29
5.4.3. MiARN mature et devenir du brin passager.....	29
6. Schéma récapitulatif.....	30
7. Alternatives à cette synthèse classique des microARN.....	30
7.1. Voie des mirtrons, indépendante de Drosha.....	30
7.1.1. Mirtrons classiques.....	30
7.1.2. Mirtrons à queue en 5'.....	32
7.1.3. Mirtrons à queue en 3'.....	32
7.1.4. Schéma récapitulatif.....	32
7.2. Voie des miARN dérivés de shARN endogènes.....	33
7.3. Voie indépendante de Dicer.....	33

## PARTIE 2 : MODES D'ACTION ET RÉGULATION DES MICROARN

1. Reconnaissance de l'ARNm cible.....	35
1.1. Composition du miRISC.....	35
1.1.1 Protéines Argonautes.....	35
1.1.2. Protéines GW182.....	37
1.2. Site d'hybridation ( <i>seed</i> ).....	38
1.3. Appariements supplémentaires et compensatoires.....	39
1.4. Importance de l'accessibilité du site.....	40
2. Clivage et dégradation de l'ARNm.....	41
2.1. Conditions nécessaires.....	41
2.2. Clivage de l'ARNm.....	41
3. Blocage de la traduction de l'ARNm.....	42
3.1. Généralités sur la traduction de l'ARNm.....	42
3.2. Déadénylation de l'ARNm.....	43
3.2.1. Généralités sur la dégradation des ARNm.....	43
3.2.2. Mécanisme de la déadénylation médiée par les microARN.....	43
3.3. Inhibition de l'initiation de la traduction.....	44
3.3.1. Inhibition de la reconnaissance de la coiffe.....	44
3.3.2. Inhibition du recrutement de la sous-unité 60S.....	45
3.4. Séquestration de l'ARNm dans des corps cytoplasmiques.....	45
3.5. Inhibition aux étapes post-initiation.....	45
4. Activation de l'ARNm.....	47
4.1. Exemples d'activation.....	47

4.2. Cas particulier de miR-122.....	47
5. Régulation des microARN.....	48
5.1. Régulation de la transcription des gènes à microARN.....	48
5.1.1. Activateurs et répresseurs de transcription des miARN.....	48
5.1.2. Boucles de rétrocontrôle de l'expression des miARN.....	48
5.2. Régulation de la maturation des microARN.....	49
5.2.1. Régulation du clivage par Drosha.....	49
5.2.2. Régulation du clivage par Dicer.....	50
5.2.3. Les miARN isoformes.....	50
5.2.4. Edition de l'ARN.....	50
5.3. Régulation des fonctions des microARN.....	51
5.3.1. Au niveau des protéines Ago.....	51
5.3.2. Au niveau des protéines GW182.....	51
5.3.3. Protéines autres que GW182 et Ago.....	51
5.3.4. Interactions entre miRISC et RNP.....	52
5.3.5. Edition de l'ARN.....	53
5.4. Turn-over des microARN.....	53
5.4.1. Conditions cellulaires affectant la stabilité des miARN.....	54
5.4.2. Enzymes dégradant les miARN.....	54
5.4.3. Fonctions régulatrices des ARN cibles.....	55

## PARTIE 3 : MICROARN ET INFECTION VIRALE

1. Virus et microARN.....	57
1.1. Origine et identification des microARN viraux.....	57
1.2. Nomenclature des microARN viraux.....	59
2. MicroARN viraux.....	59
2.1. Gènes à l'origine des microARN viraux.....	60
2.2. Synthèse des microARN viraux.....	62
2.2.1. Synthèse classique.....	62
2.2.2. Voies alternatives.....	63
2.3. Modes d'action des microARN viraux.....	63
2.4. Fonctions des microARN viraux.....	65
2.4.1. Longévité accrue des cellules infectées.....	65
2.4.2. Echappement à la réponse immunitaire.....	66
2.4.3. Régulation du déclenchement du cycle lytique.....	68
2.4.4. Autres fonctions.....	68
3. Influence des virus sur les microARN cellulaires.....	69
3.1. Perturbation du profil d'expression des microARN cellulaires.....	69
3.2. Interférence avec la maturation des microARN cellulaires.....	70
3.3. Saturation de la machinerie des microARN cellulaires.....	71
3.4. Dégradation des microARN cellulaires.....	71
4. Influence des microARN cellulaires sur les virus.....	71
4.1. Régulation négative.....	71
4.2. Régulation positive.....	72
4.3. Tropicisme tissulaire.....	72
5. MicroARN et herpès virus.....	73

5.1. Cas du virus d'Epstein-Barr.....	73
5.1.1. Généralités sur le virus d'Epstein-Barr.....	73
5.1.2. microARN encodés par le virus d'Epstein-Barr.....	75
5.1.3. Rôles des microARN encodés par le virus d'Epstein-Barr.....	75
5.1.4. Cibles des microARN encodés par le virus d'Epstein-Barr.....	76
5.1.5. Influence du virus sur les microARN cellulaires.....	78
5.2. Cas du virus de la maladie de Marek.....	79
5.2.1. Généralités sur le virus de la maladie de Marek.....	79
5.2.2. microARN encodés par le virus de la maladie de Marek.....	80
5.2.3. Rôles des microARN encodés par le virus de la maladie de Marek.....	81
5.2.4. Cibles des microARN encodés par le virus de la maladie de Marek.....	82
5.2.5. Influence du virus sur les microARN cellulaires.....	83
CONCLUSION.....	85
BIBLIOGRAPHIE.....	87

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## TABLE DES FIGURES

Fig. 1. Localisation génomique de miARN introniques.....	21
Fig. 2. Représentation schématique de la transcription par l'ARN polymérase II.....	22
Fig. 3. Structure de cinq pri-miARN.....	23
Fig. 4. Structure du pri-miARN contenant le mirtron.....	24
Fig. 5. Organisation des composants du Microprocesseur.....	25
Fig. 6. Représentation schématique du clivage par Drosha.....	25
Fig. 7. Un modèle de maturation des microARN introniques.....	26
Fig. 8. Exportin-5.....	26
Fig. 9. Organisation des composants de Dicer.....	28
Fig. 10. Représentation schématique du clivage par Dicer.....	28
Fig. 11. Schéma récapitulatif de la synthèse classique des miARN.....	30
Fig. 12. Principales caractéristiques des mirtrons et pri-miARN.....	31
Fig. 13. Epissage du mirtron par le splicéosome.....	31
Fig. 14. Biogenèse comparée des miARN classiques et des mirtrons.....	32
Fig. 15. Structure d'une protéine Argonaute et interactions avec miARN et ARN-cible.....	36
Fig. 16. Organisation des domaines des protéines GW182.....	37
Fig. 17. Règle de la tête.....	38
Fig. 18. Site 3' supplémentaire.....	39
Fig. 19. Site 3' complémentaire.....	39
Fig. 20. Modèles d'interaction des régions du miARN avec sa cible.....	40
Fig. 21. Dégradation de l'ARNm par son interaction avec le miARN.....	41
Fig. 22. Initiation de la traduction.....	42
Fig. 23. Déadénylation par le miRNP.....	43
Fig. 24. Blocage de l'initiation de la traduction par le miRNP.....	44
Fig. 25. Domaine de liaison d'Ago2 à la coiffe m <sup>7</sup> G.....	44
Fig. 26. Région de GW182 responsable de la localisation dans les P-bodies.....	45
Fig. 27. Blocage de l'élongation par le miRNP.....	46
Fig. 28. Hypothèse d'une protéolyse induite par le miRNP.....	46
Fig. 29. Activateurs et répresseurs transcriptionnels de l'expression des miARN.....	48
Fig. 30. Boucles de rétrocontrôle de l'expression des miARN.....	49
Fig. 31. Régulation croisée de Drosha et DGCR8.....	49
Fig. 32. Interactions entre miRISC et RBP à l'extrémité 3'NC de l'ARNm.....	53
Fig. 33. Enzymes dégradant les miARN.....	54
Fig. 34. Effets des ARN cibles sur les miARN.....	55
Fig. 35. Familles de virus qui produisent des microARN ou des molécules ARN-like.....	57
Fig. 36. Localisation des gènes à miARN dans le génome des herpès virus.....	60
Fig. 37. Biogenèse classique des microARN viraux.....	62
Fig. 38. Modes d'action des miARN lors d'hybridation imparfaite.....	64
Fig. 39. Possibles mécanismes d'action des miARN viraux.....	64
Fig. 40. Inhibition de l'immunité à médiation cellulaire par les miARN viraux.....	67
Fig. 41. Régulation en cis des ARNm par les miARN viraux.....	69
Fig. 42. Déstabilisation des miARN cellulaires par des transcrits viraux.....	70
Fig. 43. Cycle de l'infection primaire par l'EBV.....	74
Fig. 44. Cycle de l'infection latente par l'EBV.....	74

Fig. 45. Localisation des miARN dans le génome de l'EBV.....	75
Fig. 46. Chronologie de la pathogenèse d'une souche oncogénique de GaVH2.....	80
Fig. 47. Localisation des miARN dans le génome du MDV.....	81

## TABLE DES TABLEAUX

Tabl. 1. Exemples de microARN dont l'expression est modifiée lors de cancer.....	14
Tabl. 2. Exemples de microARN et leur cible dans les cancers.....	14
Tabl. 3. Exemples de fonction de microARN lors de cancer.....	15
Tabl. 4. Exemples de grandes mutations dans des maladies héréditaires monogéniques associant des microARN et leur cible.....	16
Tabl. 5. Principales différences entre les miARN et les siARN.....	18
Tabl. 6. Critères pour la nomenclature des miARN animaux.....	19
Tabl. 7. Probabilité calculée pour un génome viral donné de contenir au moins un miARN.....	58
Tabl. 8. MicroARN ou molécules ARN-like produits par les virus.....	60
Tabl. 9. Exemples de localisations génomiques de microARN viraux.....	61
Tabl. 10. Exemples de fonctions de microARN codés par des virus.....	65
Tabl. 11. Exemples de cibles virales des miARN encodés par l'EBV.....	77
Tabl. 12. Exemples de cibles cellulaires des miARN encodés par l'EBV.....	78

# ABRÉVIATIONS

---

**A** – adénosine  
**ADAR** – *adenosine deaminase acting on RNA* ou adénosine désaminase agissant sur l'ARN  
**ADN** – acide désoxyribonucléique  
**ADNc** – ADN complémentaire  
**ADNsb** – ADN simple brin  
**Ago** – Argonaute  
**ARN** – acide ribonucléique  
**ARNdb** – ARN double-brin  
**ARNi** – interférence par ARN  
**ARNm** – ARN messenger  
**ARNnc** – ARN non codant  
**ARN pol II** – ARN polymérase II  
**ARN pol III** – ARN polymérase III  
**ARNt** – ARN de transfert  
**BIC** – *B cell integration cluster*  
**CC** – *splicing commitment complex*  
**DGCR8** – *DiGeorge syndrome critical region 8*  
**DLBCL** – *diffuse large B cell lymphoma* ou lymphome diffus à grandes cellules B  
**dsRBD** – *double-stranded RNA-binding domain* ou domaine de liaison aux ARN double-brin  
**dsRBP** – *double-stranded RNA-binding protein* ou protéine de liaison aux ARN double-brin  
**DUF** – *domain of unknown function* ou domaine de fonction inconnue  
**EBV** – *Epstein-Barr virus* ou virus d'Epstein-Barr  
**FHV** – *flock house virus*  
**FT** – facteur de transcription  
**FXR** – *fragile X related protein*  
**GaHV2** – *Gallid herpesvirus 2*  
**GDP** – guanosine diphosphate  
**GTP** – guanosine triphosphate  
**G** – guanosine  
**HCMV** – *human cytomegalovirus* ou cytomégalovirus humain  
**HCV** – *hepatitis C virus* ou virus de l'hépatite C  
**HIV** – virus de l'immunodéficience humaine  
**HSV** – *herpes simplex virus*  
**HVS** – *Herpesvirus saimiri*  
**I** – inosine  
**IE** – *immediate early* ou précoce immédiat  
**IMP** – *import receptor importin*  
**IRES** – *internal ribosomal entry site*  
**KSHV** – *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* ou herpès virus associé à la maladie de Kaposi  
**L1** – *linker 1*  
**L2** – *linker 2*  
**LAT** – *latency-associated transcript*  
**LB** – lymphome de Burkitt  
**Ldbr** – *lariat debranching enzyme*  
**LMP1** – *latent membrane protein 1*  
**LMP2A** – *latent membrane protein 2A*  
**MCMV** – *murine cytomegalovirus* ou cytomégalovirus de la souris  
**MDV** – *Marek's disease virus* ou virus de la maladie de Marek  
**miARN** – microARN

**Mid** – *middle*  
**miRISC** – *microRNA-induced silencing complex*  
**mre** – *microRNA-response element*  
**NC** – non codante  
**NF- $\kappa$ B** – *nuclear factor-kappa B*  
**nt** – nucléotide  
**oncomiR** – miARN surexprimés lors de tumeur  
**ORF** – *open reading frame* ou cadre ouvert de lecture  
**PABP** – *polyadenylate-binding protein*  
**PACT** – *protein activator of the interferon-induced protein kinase*  
**PAZ** – *piwi-Argonaute-Zwille*  
**pb** – paire de bases  
**PFV** – *primate foamy virus*  
**piRNA** – *Piwi interacting RNA*  
**pré-miARN** – précurseur de microARN  
**pri-miARN** – transcrit primaire de microARN  
**PUMA** – *p53-up-regulated modulator of apoptosis*  
**RBP** – *RNA-binding protein*  
**REV-T** – *reticuloendotheliosis virus strain T* ou virus de la réticuloendothéliose  
**RNP** – ribonucléoprotéique  
**RISC** – *RNA-induced silencing complex*  
**RRM** – *RNA recognition motif*  
**SG** – *stress granule* ou granule de stress  
**shRNA** – *short hairpin RNA* ou ARN à courte épingle  
**siRNA** – *small interfering RNA* ou petits ARN interférents  
**SNC** – système nerveux central  
**SRS** – *supressor of RNA silencing*  
**TAR** – *trans-acting responsive*  
**TNRC** – *trinucleotid repeat-containing*  
**TRBP** – *transactivation response RNA-binding protein*  
**tsmiR** – miARN suppresseur de tumeur  
**TWEAKR** – *tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis receptor*  
**UBA-like domain** – *ubiquitine-associated like domain*  
**UTR** – *untranslated region*

# INTRODUCTION

---

Les microARN (miARN) sont de petits ARN simple-brin d'environ 22 nucléotides, dépourvus de queue poly(A) et de coiffe protectrice en 3' (*cap*). Ils représentent l'une des sous-familles de petits ARN intervenant dans l'interférence ARN (ARNi) ou *RNA silencing*. Il s'agit d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes, impliqué dans nombre de fonctions biologiques allant du développement embryonnaire à la différenciation et prolifération cellulaires, en passant par le métabolisme. On trouve les miARN aussi bien chez les animaux que chez les plantes et, à ce jour, ils représentent la classe la plus abondante de petits ARN décrite chez les mammifères. En tant qu'acteurs de la RNAi, ils jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression du génome, ainsi que dans les métabolismes cellulaires.

On estime qu'il existe plusieurs milliers de gènes codants pour des miARN chez les plantes et les vertébrés, quelques centaines chez les invertébrés, et chaque miARN est potentiellement capable de cibler des sites de centaines d'ARN messagers (ARNm). On pense donc qu'ils régulent une large proportion du transcriptome, si ce n'est la totalité.

Du fait de leur récente découverte et des nombreuses recherches en cours à leur sujet, l'état des connaissances est en perpétuelle mouvance. On sait cependant qu'il existe plusieurs voies pour leur synthèse et qu'ils ont de multiples mécanismes d'action, desquels découlent des conséquences physiologiques mais aussi pathologiques.

Au cours de l'évolution, les virus ont développé des mécanismes très sophistiqués pour exploiter la machinerie cellulaire. Il n'est donc pas étonnant que certains virus produisent eux aussi leurs microARN. De plus, ils peuvent utiliser la voie des miARN cellulaires à leurs propres fins. Ils en tirent notamment trois avantages conséquents : prolongement de la longévité des cellules infectées, échappement au système immunitaire et régulation des phases latente et lytique du cycle viral.

Dans ce mémoire, les microARN des plantes seront abordés mais non détaillés. La biosynthèse des microARN décrite par la suite correspond donc à celle métazoaires. Celle des microARN des plantes en est très semblable mais diffère par certains points.





# RÔLES ET BIOSYNTHÈSE DES MICROARN

---

## 1. Rôles des microARN

### 1.1. Découverte des microARN

Les microARN ont été découverts pour la première fois en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Le cycle de développement de ce ver comprend six stades successifs : l'embryogenèse, quatre stades larvaires (L1 à L4) et le stade adulte. *lin-4* et *lin-14* sont deux *loci* génétiques impliqués dans ce développement. Chez le mutant *lin-4*, la phase larvaire L1 se répète en permanence du fait d'une protéine appelée *lin-14* qui empêche la transition du stade larvaire L1 au stade L2. Une équipe de chercheurs a découvert qu'un fragment d'ADN de ce ver comportait un gène codant pour un petit ARN de 22 nucléotides [Lee *et al.*, 1993]. Celui-ci se fixe par hybridation sur plusieurs sites de la région 3' non codante (*3'UTR, untranslated region*) des ARN messagers codant pour les protéines *lin-14* et *lin-28*. Cette fixation empêche la synthèse desdites protéines, permettant ainsi de restaurer le cycle, et donc le passage du stade L1 au stade L2. A l'époque, aucune homologie de séquence avec le gène *lin-4* n'avait été identifiée dans les bases de données, et cette découverte avait été considérée comme une particularité du développement des nématodes.

Ce n'est qu'au début des années 2000 que les microARN ont été reconnus comme une classe distincte de régulateurs. En effet, un nouveau microARN est identifié chez *C. elegans* : *let-7* [Reinhart *et al.*, 2000]. Celui-ci contrôle le passage entre le stade larvaire L4 et le stade adulte. De façon similaire à *lin-4*, le gène *let-7* code pour un ARN de 21 nucléotides qui se fixe sur la région 3' non codante des ARN messagers codant pour les protéines *lin-41* et *lin-42*, empêchant leur synthèse. Cette fois, des séquences homologues du gène *let-7* sont identifiées chez toutes les espèces d'invertébrés et de vertébrés à symétrie bilatérale examinées. Par la suite, des centaines de microARN ont été trouvés chez les vers, les mouches, les plantes et les vertébrés. Rapidement, de nombreuses découvertes ont permis de comprendre les rôles de ces microARN ainsi que les différentes étapes de leur biosynthèse.

## **1.2. MicroARN chez les métazoaires**

De nombreux miARN sont conservés chez les animaux bilatériens, et d'une manière générale les miARN sont hautement conservés entre les espèces animales. En revanche, il n'y a pas de miARN chez les organismes unicellulaires, bactéries comme levures. Le nombre de miARN semble augmenter avec la complexité des organismes, ce qui est en corrélation avec la portion d'ADN génomique dit "non codant", c'est-à-dire ne codant pas pour des protéines. Il s'agit des introns et des régions intergéniques, qui atteignent plus de 98% du génome chez l'homme. Ce génome non codant est donc conservé mais aussi transcrit, ce qui a ouvert la recherche aux ARN "non codants" dont font partie les miARN et qui ont des rôles régulateurs.

## **1.3. MicroARN chez les plantes**

Aucune famille de miARN n'ayant été trouvée conservée entre le règne animal et le règne végétal, l'hypothèse a été émise que les miARN des plantes et des animaux avaient des origines indépendantes au cours de l'évolution. Chez les plantes, les microARN sont des ARN ubiquitaires. Par ailleurs, les plantes ne possèdent pas l'enzyme Drosha, mais une enzyme d'action similaire à Dicer, nommée DCL1.

Par la suite, ce mémoire ne traitera que des miARN animaux, en particulier des mammifères.

## **1.4. MicroARN et physiologie**

Environ 30% des microARN connus à ce jour ont une spécificité de tissu. Ainsi, on retrouve par exemple miR-122 dans le foie, miR-375 dans le pancréas, miR-142 dans le tissu hématopoïétique ou encore miR-1 dans le muscle.

### **1.4.1. MicroARN et cellules souches**

Quelques microARN sont exprimés spécifiquement dans les cellules souches. Ils joueraient, entre autres, un rôle dans le maintien ou non de la pluripotence, le degré de différenciation et d'auto-renouvellement des cellules, etc. [Suh *et al.*, 2004].

Exemple : miR-296 stimule la différenciation des cellules souches embryonnaires, tandis que miR-22 a l'effet inverse [Houbaviy *et al.*, 2003].

### **1.4.2. MicroARN et cellules germinales**

En 2007, une étude a montré que les ovocytes ne possédant pas la protéine Dicer ne présentaient pas la dégradation des ARNm normalement observée lors de la maturation méiotique [Murchison *et al.*, 2007]. De plus, des sites de fixation de microARN ont été objectivés sur ces ARNm. Certains miARN participeraient donc à la maturation des ovocytes.

### 1.4.3. MicroARN et cycle cellulaire

Les miARN étant des régulateurs de l'expression génique, ils ont aussi un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Ce rôle fut mis en évidence lors de la découverte du premier miARN, lin-4, puis de lin-7, évoqués en *1.1. Découverte des microARN*. Par la suite, de nombreuses études ont démontré l'implication des miARN dans le contrôle du cycle cellulaire [Chivukula et Mendell, 2008], ce qui explique les rôles que peuvent jouer les miARN lors de cancer (voir *1.5.1. MicroARN et cancers*).

### 1.4.4. MicroARN, hématopoïèse et immunité

Concernant l'hématopoïèse et l'immunité, les miARN permettent la régulation du développement des cellules et de leur différenciation, mais aussi de la réponse immunitaire. Ainsi, les miARN peuvent par exemple jouer sur les interactions hôte – agent étranger. Le cas des virus sera abordé dans la troisième partie de ce mémoire.

Dans le tissu immunitaire, les miARN influent notamment sur le développement et la physiologie des lymphocytes B et T, ainsi que sur l'immunité innée et acquise [Xiao et Rajewsky, 2009].

Exemple : miR-181 module le signal des récepteurs des cellules T [Li *et al.*, 2007].

### 1.4.5. MicroARN et tissu nerveux

Dans le cerveau, nombre de miARN sont spécifiquement exprimés en faible quantité et moduleraient l'expression des gènes [Cao *et al.*, 2006].

Exemple : la délétion de miR-9 chez la drosophile entraîne une duplication des neurones sensoriels [Li *et al.*, 2006].

### 1.4.6. MicroARN et muscles

Dans les muscles squelettiques et cardiaques, des facteurs de transcription myogéniques activent des miARN qui modulent l'expression de gènes impliqués dans la croissance, la différenciation et la contractibilité de ces muscles [Williams *et al.*, 2009].

## 1.5. MicroARN et pathologie

L'action pathologique des microARN repose sur plusieurs dysfonctionnements possibles. Par exemple, une perte de fonction de miARN entraîne la libération des cibles initialement réprimées, tandis qu'une surexpression de miARN peut entraîner une répression excessive de certains gènes. Cette altération de la régulation d'expression peut être due à une modification au niveau du gène, du pri-, du pré- ou du miARN mature. Par ailleurs, une mutation sur un gène quelconque pourrait créer un site illégitime de fixation d'un miARN (miARN ectopique) et ainsi entraîner la répression anormale dudit gène.

### 1.5.1 MicroARN et cancers

En oncologie, l'expression de certains miARN permet de distinguer le tissu normal du tissu cancéreux. Biomarqueurs de cellules cancéreuses, ils pourraient également permettre de poser des diagnostics précoces, notamment du fait de leur abondance et de leur stabilité dans les tissus et les fluides biologiques [Cordelier *et al.*, 2013].

Lors de cancer, comme l'on peut le voir dans le tableau 1 ci-dessous, certains miARN sont surexprimés tandis que d'autres sont sous-exprimés.

Tabl. 1. Exemples de microARN dont l'expression est modifiée lors de cancer. Source : Lamoril (2010)

Cancer	MicroARN surexprimés	MicroARN sous-exprimés
Cancer du sein	miR-21 ; miR-155 ; miR-29b-2	miR143 ; miR-145 ; miR-155 ; miR200
Cancer du poumon	miR-21 ; miR-189 ; miR-200b ; miR17-92	Famille let-7 ; miR-126 ; miR30a ; miR-143 ; miR-145 ; miR-188 ; miR-331 ; miR-34s
Cancer du côlon	miR-223 ; miR-21 ; miR-17 ; miR-106m ; miR-34s	miR-143 ; miR-145 ; miR-195 ; miR-130a ; miR-131
Cancer de la prostate	let-7d ; miR-195 ; miR-203 ; miR-125b ; miR-20a ; miR-221 ; miR-222	miR-143 ; miR-145 ; miR-128a ; miR-146a ; miR-126

Par ailleurs, certains miARN agissent comme des pro-oncogènes, tandis que d'autres agissent comme des suppresseurs de tumeur. On distingue donc deux grandes familles de miARN en oncologie : les oncomiR, qui sont surexprimés dans les tumeurs et favorisent la progression cancéreuse, et les tsmiR, miARN suppresseurs de tumeur qui jouent le rôle de régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire [Lee et Dutta, 2009].

Tabl. 2. Exemples de microARN et leur cible dans les cancers. Source : Lamoril (2010)

MicroARN	Gène cible (oncogène ou anti-oncogène)	Cancer associé
let-7	RAS	Poumon
let-7c	C-Myc	Foie
miR-10b	HOXD10	Sein
miR-16 ; miR-15a	Bcl2	Leucémie lymphoïde chronique
miR-27b	CYP181	Sein
miR-125a ; miR-125b	ERBB2 et ERBB3	Sein
miR-125b	Bak-1	Prostate
miR-221 ; miR-222	P27 (Kip)	Prostate
BART 16, 17-5p, 1-5p (codés par le virus EBV)	LMP1 (oncogène du virus EBV)	Nasopharynx

Un seul miARN étant capable de cibler de multiples ARNm, il peut avoir plusieurs fonctions d'un point de vue oncologique : quelques exmples sont présentés dans le tableau 3 ci-après. De plus, certains miARN ont un rôle pro- ou anti-métastatique, ils sont appelés métastamir.

Tabl. 3. **Exemples de fonction de microARN lors de cancer.** Source : Lamoril (2010).

Propriétés des cellules cancéreuses	Fonction des microARN	Exemples de miARN
Résistance aux signaux de régulation cellulaire de croissance	Pro-prolifération	miR-21 ; groupe des miR-17 ; miR-221 ; miR-222
	Anti-prolifération	let-7 ; miR-519 ; miR146a
Echappement à l'apoptose	Pro-apoptose	Groupe miR-354 ; groupe miR-29 ; miR-15 ; miR-16
	Anti-apoptose	Groupe miR-34 ; miR-21
Stimulation de l'angiogenèse	Pro-angiogenèse	Groupe miR-17-92 ; miR-378 ; miR-292
	Anti-angiogenèse	miR-15 ; miR-16 ; miR-20a
Invasion tissulaire et métastases	Pro-métastatique	miR-10b ; miR-21 ; miR-373 ; miR-155
	Anti-métastatique	let-7 ; miR-335 ; miR-206 ; miR-126 ; miR-200
Echappement au système immunitaire	Echappement à l'immunosurveillance	miR-155 ; groupe miR-17-92 ; miR-93 ; miR-373 ; hcmv-miR-UL112
Instabilité génomique	Promotion de l'instabilité génomique	Délétion des zones génomiques contenant des miARN tels que miR-17 ; miR-20a ; miR-15 ; miR-16-1...
Augmentation du pouvoir de réplication	Stimulation de l'immortalisation des cellules	miR-290 ; miR-24 ; miR-34a

L'action pro-oncogène peut résulter d'une diminution de l'expression d'un gène suppresseur de tumeur ou d'une influence sur des gènes de différenciation cellulaire ou de l'apoptose. L'action anti-oncogène peut résulter d'une inhibition des oncogènes ou des gènes régulant la différenciation cellulaire ou l'apoptose. Ainsi, il existe une relation étroite entre les miARN, les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur [Ruan *et al.*, 2009].

### 1.5.2 MicroARN et maladies cardiovasculaires

Les microARN tiennent des rôles majeurs dans le maintien et l'intégrité des fonctions cardiaques. Cela a été démontré au cours d'une étude, lorsque l'activation cœur-spécifique de l'enzyme Dicer chez la souris a entraîné une cardiomyopathie majeure, une insuffisance cardiaque rapide et la mort prématurée après la naissance [Chen *et al.*, 2008]. Par la suite, nombre d'études ont confirmé l'importance des microARN lors de maladie cardiovasculaire, notamment dans la physiopathologie de l'hypertrophie cardiaque [van Rooij *et al.*, 2006].

**Exemple : chez la souris, une mutation de miR-208, microARN spécifique du cœur, entraîne des altérations de la fonction cardiaque et de sa structure [van Rooij *et al.*, 2007].**

### 1.5.3. MicroARN et maladies du système nerveux central

Les microARN semblent plus largement exprimés dans le cerveau que dans les autres organes. De nombreuses expériences, par inactivation de microARN ou de Dicer dans diverses régions du cerveau, ont démontré le rôle des microARN dans le développement et la

maturation des neurones [Hébert *et al.*, 2010]. D'autres études ont également montré l'importance des microARN dans le fonctionnement normal du système nerveux central (SNC) et leur rôle dans les maladies dégénératives du SNC [Hébert et De Strooper, 2009].

**Exemple : une inactivation de Dicer dans le cortex ou l'hippocampe pendant l'embryogénèse précoce entraîne des malformations cérébrales, telle que la microcéphalie, puis la mort peu après la naissance [Davis *et al.*, 2008].**

#### 1.5.4. MicroARN et maladies génétiques

L'altération de microARN peut parfois participer au développement de maladies héréditaires monogéniques. Le tableau 4 ci-dessous présente cinq des ces maladies et les microARN impliqués. Cette altération pourrait provenir de plusieurs types de mutations : des grandes mutations telles que des délétions ou duplications, des variants polymorphiques de segments de génome par délétion ou insertion, des mutations dans la séquence codant pour le miARN, au niveau des cibles des miARN ou encore au niveau des protéines impliquées dans la maturation et la fonction des miARN, etc. On ignore encore à ce jour quelle est la réelle part des miARN dans ces maladies, les conséquences de ces mutations pouvant tout aussi bien être minimales grâce à la redondance dans l'action des miARN.

Tabl. 4. Exemples de grandes mutations dans des maladies héréditaires monogéniques associant des microARN et leur cible. D'après : Lamoril (2010).

Maladie	Mode de transmission (gène responsable)	miARN impliqué (mutation responsable)
Myopathie de Duchenne/Becker	Récessif lié au X (DMD)	miR-548f-5 (délétion totale)
Hémophilie A	Récessif lié au X (facteur 8)	miR-1184 (délétion totale)
Trisomie 21	/	miR-994 ; let-7c ; miR-125b ; miR-155 ; miR-802 (triPLICATION)
Epidermolyse bulleuse	Autosomique récessif (COL17A1)	miR-936 (délétion d'un allèle)
Rein polykystique de type I	Autosomique dominant (PKD1)	miR-1225 (délétion totale)

#### 1.5.5. MicroARN et maladies infectieuses

De nombreux virus expriment des microARN. Ceux-ci peuvent participer à la défense du virus contre le système immunitaire et permettre sa résistance. Ils semblent également participer à la prolifération cellulaire, l'apoptose et les signaux immunitaires lors de tumorigénèse virale. Les virus peuvent aussi utiliser les miARN des cellules hôtes pour augmenter leur propre réplique, ou encore bloquer l'activité des miARN cellulaires.

Toutes ces propriétés seront vues plus en détails dans la partie 3 de ce mémoire.

## 2. Identification et nomenclature des microARN

### 2.1. Méthodes d'identification des microARN et de leurs cibles

L'identification des microARN repose essentiellement sur la prédiction de gènes codant pour ces microARN, à l'aide d'outils informatiques classiques qui se fondent sur la conservation entre espèces et la structure théorique d'un gène à miARN pour déterminer si une séquence donnée peut contenir un microARN. Des critères sont par exemple une longue région d'appariement de bases dans la région tige du précurseur, l'absence de grande boucle asymétrique ou encore une énergie libre minimale.

Plusieurs logiciels permettant cette identification existent (MiRscan, ProMir, miRAlign, miRDeep...). Ils aident à la mise en place et à la validation d'hypothèses expérimentales mais n'ont pas une sensibilité ni une spécificité parfaites, une confirmation expérimentale de l'analyse informatique est donc indispensable.

Une fois identifiés et confirmés, les nouveaux miARN sont soumis à la base de données internationale miRBase afin de leur assigner un nom qui pourra alors être utilisé dans les publications (voir 2.2. *Nomenclature des microARN*).

Par ailleurs, il est également intéressant d'identifier les cibles des miARN. De la même façon que pour les gènes des miARN, les logiciels se fondent sur plusieurs critères : conservation inter-espèce du site cible du miARN, fort appariement au niveau de la région seed du miARN à l'ARNm (le plus souvent dans sa région 3'NC), énergie libre minimum positive lors de l'interaction thermodynamique miARN-ARNm...

Là encore, plusieurs logiciels existent : PicTar, TargetScan, RNA22, mirTif, miRanda... Et de la même façon qu'avec les logiciels permettant l'identification des gènes de miARN, il est important d'utiliser plusieurs de ces logiciels afin de limiter au maximum les faux positifs et les faux négatifs. Il y a tout de même souvent de nombreux faux positifs, et on estime qu'environ un site prédit sur dix est validé lors de l'analyse expérimentale.

Pour prévoir et prouver les fonctions des miARN, la principale approche est de bloquer l'activité du miARN et observer les conséquences. Trois stratégies existent : la délétion du gène à l'origine du miARN (*genetic knockout*), l'utilisation de séquence anti-sens du miARN (*miRNA sponge*) qui va se lier à celui-ci et donc l'empêcher d'agir, ou l'utilisation de nucléotides anti-sens chimiquement modifiés (*antimiR*) qui peuvent se lier au miARN à différents stades de sa maturation ou se lier à son ARNm-cible. Cette dernière stratégie est la plus utilisée [Santoro et Nicoli, 2013]. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients qui ne seront pas développés ici.



## 2.2. Nomenclature des microARN

Les microARN ne sont pas les seuls agents de l'interférence d'ARN, il y a également les courts ARN interférents (siARN, *small interfering RNA*) et les ARN associés aux protéines Piwi (piARN, *piwi interacting RNA*). La principale difficulté est de distinguer les miARN des siARN, qui se ressemblent en plusieurs points : composition biochimique, fonction, etc. Le tableau 5 ci-dessous donne les éléments principaux de distinction.

Tabl. 5. Principales différences entre les miARN et les siARN. D'après Lamoril (2010).

	miARN	siARN
Localisation	Présent dans toutes les régions du génome	Localisé dans les régions répétées du génome
Taille	20-25 pb	
Origine	Toujours endogène	Endogène ou exogène
Transcription	Transcription par une ARN polymérase II ou III	Transcription par une ARN polymérase II
Précurseur	Pri-miARN transformé en pré-miARN par Drosha (RNase III) dans le noyau	Précurseur en épingle à cheveux ou double brin par Drosha
Maturation dans le cytoplasme	Activé par Dicer (RNase III), formation d'un complexe ribonucléoprotéique RISC amenant l'ARN simple brin à sa cible ARNm	
Action	Hybridation imparfaite à la cible, inhibe la traduction, ou dégrade l'ARNm, ou plus rarement active l'ARNm ou régule sa stabilité	Hybridation parfaite à la cible, dégradation de l'ARNm par clivage
Cas particuliers	Les mirtrons ne nécessitant pas Drosha, les miARN dérivés de shARN	
Inter-espèces	Hautement conservé entre les espèces	Peu conservé

En 2003, Ambros *et al.* [Ambros et al., 2003] ont proposé plusieurs critères pour bien distinguer les miARN des siARN ou autres fragments d'ARN.

### Critères d'expression :

- A) détection d'un ARN d'environ 22 nucléotides par hybridation à un échantillon d'ARN fractionné (méthode Northern blot en général)
- B) identification de la séquence de 22 nucléotides dans une banque d'ADN complémentaire (ADNc) issu d'ARN fractionné.

### Critères de biogenèse :

- C) prédiction d'un potentiel précurseur qui contient la séquence du miARN d'environ 22 nucléotides sur un brin de la structure en épingle à cheveux. Cette structure ne doit pas contenir de larges boucles internes ni de hernie, elle est d'environ 60-80 nucléotides chez les animaux et peut aller jusqu'à plusieurs centaines chez les plantes
- D) conservation phylogénétique de la séquence du miARN d'environ 22 nucléotides et de la structure secondaire de son précurseur présumé
- E) détection d'une accumulation de précurseurs dans les organismes dont la fonction de Dicer est réduite

Un critère seul pourrait correspondre aux siARN. Il faut donc que des critères d'expression et de biogenèse soient réunis, idéalement les A, D et E, voire A et D dans les cas où une étude expérimentale pour confirmer le critère E n'aurait pas été effectuée.

Ainsi, un miARN mature est nommé par les lettres « miR » (R en majuscule) suivies d'un chiffre. La nomenclature internationale numérotant les miARN par ordre de découverte, ce chiffre correspond à l'intégration du miARN dans la banque internationale des miARN, la miRBase (<http://www.mirbase.org>). Trois lettres peuvent également précéder le nom, elles permettent d'identifier l'organisme dans lequel a été décrit le miARN, « hsa » par exemple pour les humains. Le précurseur du miARN mature aura une dénomination identique, mais sera noté « mir » (r minuscule). Quant aux gènes, ils ont le même nom que le pré-miARN qu'ils codent mais en italique.

**Exemple : hsa-miR-171 a pour précurseur hsa-mir-171 et pour gène étant *hsa-mir-171***

Par ailleurs, les miARN étant hautement conservés entre les espèces animales, il est d'autant plus intéressant de donner un nom similaire aux orthologues évidents, ou encore aux miARN d'une même espèce ne variant que de quelques nucléotides. Ainsi, la dénomination de ces derniers se fera par simple addition d'une lettre ou d'un chiffre.

**Exemple : miR-13a et miR-13b ne se distinguent que par quelques nucléotides**

Enfin, de la même manière que les protéines, certains miARN sont classés par familles.

**Exemple : la famille let-7 comprend au moins 7 membres distincts**

Le tableau 6 ci-dessous récapitule les critères utilisés pour la nomenclature des miARN animaux et procure des exemples de dénomination.

**Tabl. 6. Critères pour la nomenclature des miARN animaux. D'après Arora (2013).**

Critère	Nomenclature	Exemple
Orthologues presque identiques	Même nombre, quelle que soit l'espèce	miR-1 chez <i>D. melanogaster</i> et <i>C. elegans</i>
Séquences très similaires au sein d'une même espèce	Même nombre avec addition d'une lettre	dme-mir-13a et dme-mir-13b chez <i>D. melanogaster</i>
Séquences extraites de loci discrets ou de précurseurs séparés dans un organisme	Ajout d'un chiffre additionnel en suffixe, précédé d'un « - »	dme-mir-6-1 et dme-mir-6-2 chez <i>D. melanogaster</i>
Séquences provenant des brins opposés d'un même précurseur en épingle	Différenciés par « * » ou écrits avec les suffixes 5p et 3p pour les brins 5' et 3' respectivement	miR-56 et miR-56*
miARN distincts résultant de chevauchement ou traitement séquentiel	Ajout d'un chiffre additionnel en suffixe, précédé d'un « . »	miR-161.1 et miR-161.2

### **3. Gènes à l'origine des microARN**

Chez l'homme, les gènes à l'origine des microARN se trouvent sur tous les chromosomes, à l'exception du chromosome Y. Il a d'abord été pensé que la plupart des miARN se trouvaient dans des régions intergéniques, mais des études ont ensuite montré que la majorité de ces gènes était localisée dans des unités de transcription bien définies. Ils peuvent donc être classés selon leur localisation génomique, et ce peut être un gène unique sur un locus ou un locus contenant un petit groupe de gènes de miARN (*cluster*).

#### **3.1. MicroARN exoniques**

Environ 10% des séquences codant pour des microARN sont des exons de longs transcrits ne codant pas pour des protéines [Rodriguez *et al.*, 2004]. Ces miARN se trouvant sur des séquences d'ADN non transcrit, ils possèdent leurs propres éléments de régulation de la transcription, y compris promoteurs et signaux de terminaison. Dans de très rares cas, les miARN proviennent d'un exon de la région 3'UTR d'ARN codant.

#### **3.2. MicroARN introniques**

Plus de la moitié des microARN connus proviennent d'introns, que ce soit d'unités de transcription non codantes ou d'unités de transcription codant pour des protéines.

##### **3.2.1. Introns de régions non codantes**

En 2004, sur les 117 miARN introniques étudiés par Rodriguez *et al.*, 27 se trouvaient être des introns d'ARN non codant (ARNnc), c'est-à-dire ne codant pas pour une protéine.

##### **3.2.2. Introns de régions codantes**

Au cours de cette même étude en 2004, sur les 117 miARN introniques étudiés par Rodriguez *et al.*, 90 étaient des introns de gènes codants pour des protéines, soit environ 77%.

La figure 1 ci-après illustre la localisation génomique de ces microARN introniques de région codante et représente schématiquement le devenir de chaque composant du transcrit primaire suite à l'épissage : le transcrit mature d'un côté, qui permettra la synthèse protéique, et les introns épissés de l'autre qui, suite à une maturation, aboutiront à la formation d'un ou plusieurs microARN.

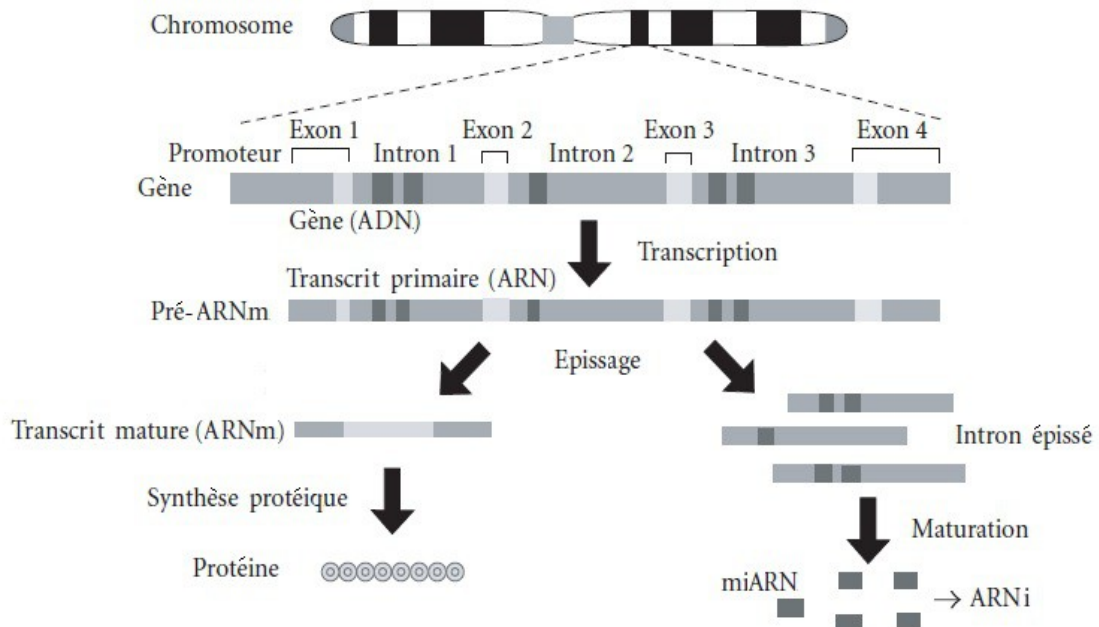


Fig. 1. **Localisation génomique de miARN introniques de région codante.** Suite à la transcription, l'épissage permettra la libération d'un ou des futur(s) pré-miARN et d'un ARNm mature. *D'après Lin (2006).*

### 3.2.3. Mirtrons, courts introns de régions codantes

Certains gènes codant pour des microARN se trouvent être de courts introns, encadrés par des exons, dans des régions codant pour des protéines. On les appelle les mirtrons : miARN dans un intron. La transcription et l'épissage aboutiront à un ARN messager (ARNm), et les extrémités de la structure tige-boucle du pré-miARN correspondront aux bornes d'épissage de l'intron, sans que l'intervention de Drosha ne soit nécessaire.

### 3.3. MicroARN mixtes

Dans 14 cas étudiés par Rodriguez *et al.* en 2004, les miARN étaient présents soit dans un exon, soit dans un intron, selon l'épissage alternatif.

### 3.4. Groupe de gènes (cluster)

Chez les mammifères, environ 30 à 50% des miARN sont regroupés en *cluster*, locus contenant un petit groupe de gènes. Ils sont ainsi transcrits en un seul pri-miARN, transcrit primaire des miARN polycistroniques. Ce pri-miARN est alors à l'origine de plusieurs pré-miARN et donc miARN : il comprend plusieurs structures en tige-boucle qui, une fois clivées, subiront toutes les étapes de la maturation.

## 4. Transcription des microARN

Les miARN proviennent de transcrits primaires (pri-miARN), généralement longs de centaines à milliers de nucléotides, qui subissent une série de d'évènements aboutissant à une molécule finale d'environ 22 nucléotides.

### 4.1. Action de l'ARN polymérase

La grande majorité des miARN introniques de régions codant pour une protéine est co-transcrite avec leur gène hôte par une ARN polymérase II (ARN pol II) : les étapes de cette transcription sont résumées dans la figure 3 ci-dessous. Cependant, certains miARN introniques peuvent être transcrits à partir d'un promoteur indépendant du gène hôte. De fait, en 2010, Monteys *et al.* ont observé que, parmi les miARN introniques connus à ce jour, environ 35% possédaient des éléments régulateurs en amont pouvant s'apparenter à des séquences promotrices. De plus, 30% avaient des facteurs trans-régulateurs d'ARN polymérase. Ainsi, l'expression de ces miARN introniques peut être indépendante de la transcription de la séquence hôte. Certains pourraient d'ailleurs être transcrits à la fois à partir du promoteur du gène hôte et à partir de leur promoteur indépendant.

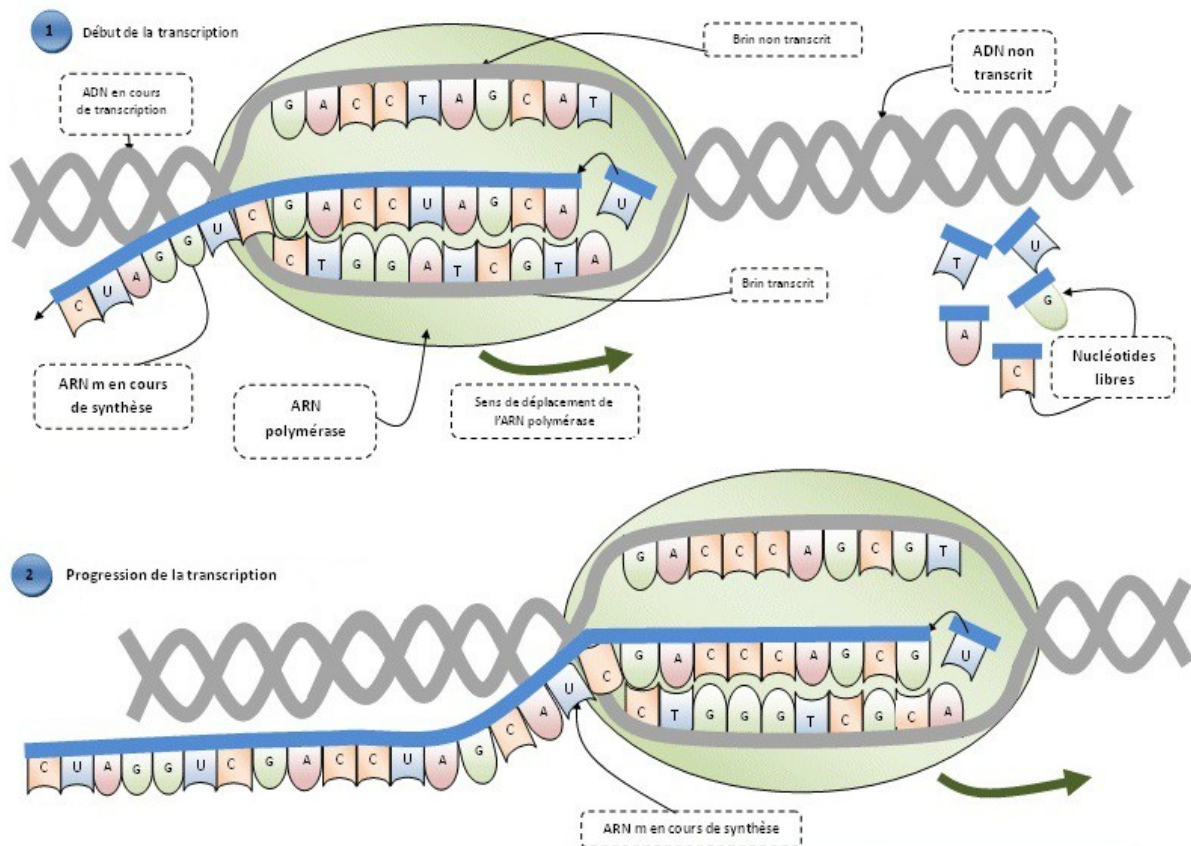


Fig. 2. **Représentation schématique de la transcription par l'ARN polymérase II.** A, adénine. C, cytosine. G, guanine. T, thymine. U, uracile. Ce schéma représente la formation de l'ARN pré-messager, mais le processus est le même pour les pri-miARN, d'autant que nombre de miARN se trouvent dans des introns de régions codant pour des protéines. *D'après <http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt>.*

Il existe également certains miARN qui sont transcrits par l'ARN polymérase III (ARN pol III), qui transcrit la plupart des petits ARN tels que les ARN de transfert. C'est le cas par exemple des miARN provenant de régions de séquences répétées. 5% des miARN introniques exprimeraient des promoteurs dépendants de l'ARN pol III [Monteys *et al.*, 2010].

Un cas particulier est celui de miR-128-2, un microARN fortement exprimé lors de leucémie lymphoblastique. En 2010, l'étude de ce microARN par Monteys *et al.* a montré qu'il était régulé à la fois par des promoteurs de gène intronique via l'ARN polymérase III et par des promoteurs de gène de la séquence hôte via l'ARN polymérase II. Il est donc possible que, à l'avenir, d'autres miARN pouvant être transcrits à la fois par l'ARN polymérase II et l'ARN polymérase III soient découverts.

#### 4.2. Structure des transcrits primaires

La plupart des pri-miARN contiennent au moins une structure secondaire en boucle dite en épingle à cheveux d'environ 80 nucléotides. Par l'action de l'ARN pol II, et les pri-miARN étant majoritairement situés dans des introns de régions codantes, il y a formation d'une coiffe à l'extrémité 5' ainsi que d'une queue poly-adylée à l'extrémité 3' comme sur un ARNm.

Comme schématisé dans la figure 3 ci-dessous, et de par la localisation génomique des miARN, la tige-boucle peut être intronique ou exonique, en région codante pour une protéine ou non. De plus, du fait de l'existence de *cluster*, certains pri-miARN peuvent être à l'origine de plusieurs pré-miARN et donc contenir plusieurs structures secondaires en tige-boucle.

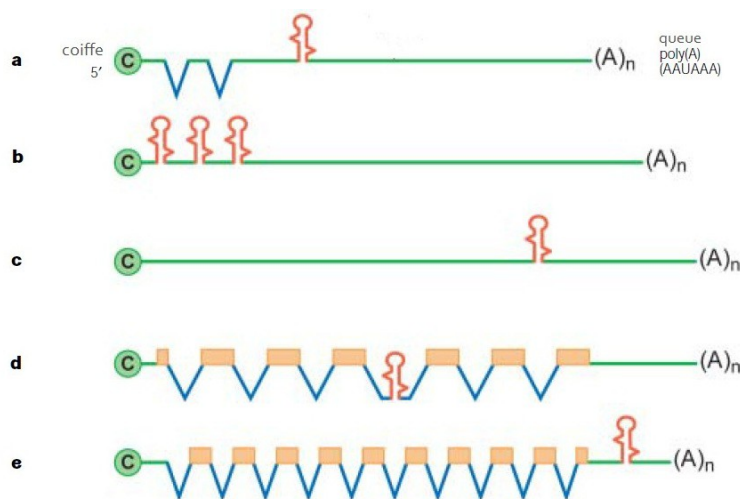


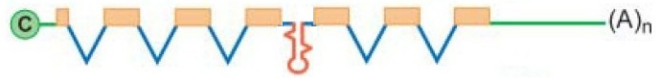
Fig. 3. **Structure de cinq pri-miARN.** **a** | miARN exonique d'un ARN non codant. **b** | cluster de miARN dans une région non codante. **c** | miARN isolé dans une région non codante **d** | miARN intronique d'un ARN codant. **e** | quelques rares miARN proviennent d'un exon de la région 3'UTR d'ARN codant. La tige-boucle du futur pré-miARN est en rouge, les séquences non codantes en vert, les introns en bleu et les exons codants en beige. D'après Cullen (2004).

#### 4.3. Cas particulier des mirtrons

Dans certains cas, il arrive qu'un court intron, entouré d'exons, soit un pré-miARN dans son intégralité. C'est-à-dire qu'il contient seulement la structure en épingle à cheveux du futur

pré-miARN, dont la maturation se déroulera sans que l'intervention de Drosha ne soit nécessaire. Il s'agit des mirtrons, dont une représentation schématique est ci-dessous.

Fig. 4. **Structure du pri-miARN contenant le mirtron.** La tige-boucle du futur pré-miARN est en rouge, les séquences non codantes en vert, les introns en bleu et les exons codants en beige.



Ainsi, la transcription est effectuée par une ARN polymérase II, et c'est au cours de l'épissage de l'ARN précurseur que le mirtron, pouvant s'apparenter à un précurseur de microARN, est relâché. La voie des mirtrons sera détaillée plus loin (6.1. Voie des mirtrons).

## 5. Maturation des microARN

Le passage du transcrit primaire au microARN mature se fait en deux étapes essentielles : un premier clivage par Drosha dans le noyau, puis un second clivage par Dicer dans le cytoplasme après exportation par le facteur exportin-5.

### 5.1. Action de Drosha dans le noyau

Une fois le transcrit primaire synthétisé par l'ARN polymérase II, la ribonucléase de type III Drosha le clive en un précurseur de miARN (pré-miARN), générant ainsi une des extrémités du miARN mature. Ce clivage se fait en association avec le cofacteur appelé Pasha chez les invertébrés, DGCR8 chez l'homme pour *DiGeorge syndrome critical region 8*, et nécessite certaines conditions.

#### 5.1.1. Composition de Drosha

Cette enzyme conservée est une protéine d'environ 160kDa. Elle contient deux domaines ribonucléase III (*RIIIDs*, *RNase III domains*) et un domaine lui permettant de se lier aux ARN double brin (*dsRBD*, *double-stranded RNA-binding domain*). Elle contient également un domaine riche en proline et un domaine riche en arginine et sérine, dont les fonctions sont encore inconnues à ce jour.

Drosha agit en association avec le cofacteur DGCR8/Pasha, formant ainsi un complexe nommé Microprocesseur. DGCR8/Pasha est une protéine d'environ 120kDa qui contient elle aussi deux domaines dsRBD, ainsi qu'un domaine WW d'environ 40 acides aminés qui se fixe sur les séquences riches en proline. Le rôle exact de cette protéine n'est pas encore connu, mais elle semble aider Drosha à la reconnaissance de son substrat et la fixation de l'ARN.



La figure 5 ci-dessous est une représentation schématique de l'organisation des composants de Drosha et de son cofacteur DGCR8.

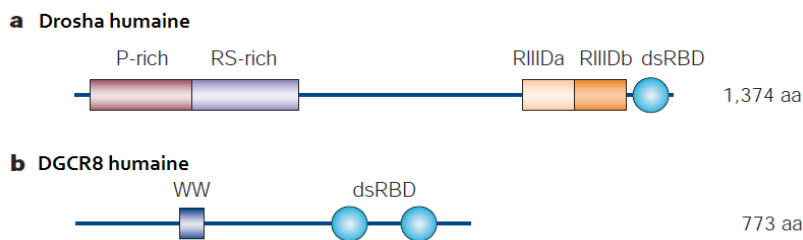


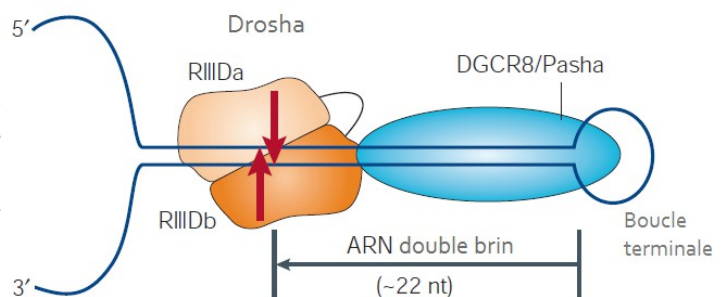
Fig. 5. **Organisation des composants du Microprocesseur.**

P-rich, domaine riche en proline. RS-rich, domaine riche en arginine et sérine. RIIID, domaine ribonucléase III. dsRBD, domaine de liaison aux ARN double brin. aa, acides aminés. D'après Kim (2005).

### 5.1.2. Sélection du site de clivage

Drosha pouvant agir sur des centaines de pri-miARN aux séquences bien différentes, elle semble se fonder sur des caractéristiques structurales communes. De ce fait, c'est la structure secondaire – en épingle à cheveux – du pri-miARN qui est reconnue par le Microprocesseur. Le site de clivage est déterminé par la distance qui le sépare de la jonction tige-boucle : elle doit être d'environ 22 nucléotides, ce qui correspond à peu près à deux tours d'hélice. Il doit également rester un tour d'hélice au-delà du site, avant que les deux brins de la tige ne se séparent. Ces deux critères sont représentés sur la figure 6 ci-dessous. Généralement, une large boucle terminale – plus de 10 nucléotides – semble être nécessaire au bon fonctionnement de Drosha chez l'homme [Zeng et Cullen, 2005]. Cependant, ce critère a été contredit en 2006 [Han *et al.*, 2006].

Fig. 6. **Représentation schématique du clivage par Drosha.** Seuls les domaines RIIID de Drosha sont représentés. Les flèches rouges indiquent le site de clivage du pri-miARN. D'après KIM (2005).



Des variations dans la structure ou la séquence autour du site de clivage peuvent avoir d'importants effets. Ainsi, le changement d'un seul nucléotide peut influencer sur l'incorporation d'un brin ou de l'autre du duplex miARN/miARN\* dans le RISC. De plus, toute hernie ou boucle interne de la tige pourrait désigner avec précision le site choisi par Drosha.

### 5.1.3. Cas des microARN introniques

Dans le cas des miARN introniques, il est souvent supposé que leur maturation débute une fois l'intron épissé. Cependant, le clivage de la tige-boucle du miARN a parfois lieu en premier, suivi ensuite seulement de l'épissage de l'ARNm sectionné [Kim et Kim, 2007] : ce second modèle est schématisé dans la figure 7 ci-derrière.



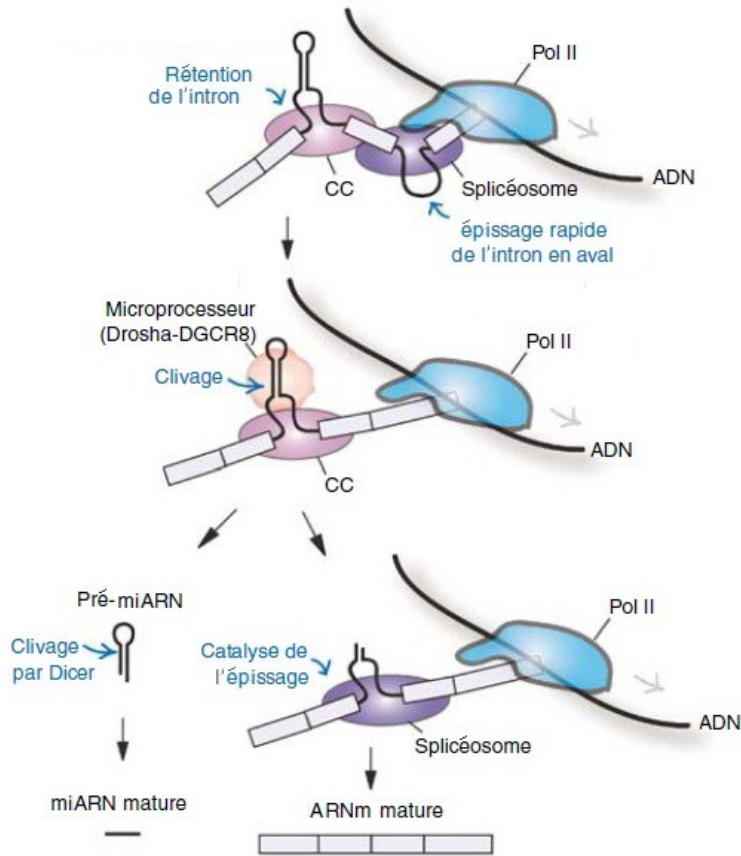


Fig. 7. **Un modèle de maturation des microARN introniques.** Les exons encadrant le miARN sont liés physiquement par un complexe (CC, *splicing commitment complex*). Les introns en aval sont épissés rapidement tandis que l'épissage de l'intron contenant le miARN est retardé par le complexe. Le Microprocesseur permet le clivage et relâchement du pré-miARN. Les sites de clivage en 5' et 3' seraient alors attachés l'un à l'autre de façon relativement stable. L'épissage peut donc se poursuivre et permettre la libération d'un ARNm.  
D'après Kim YK (2007).

#### 5.1.4. Résultat du clivage

A l'issue de ce clivage par Drosha, un précurseur de miARN est libéré. Il fait environ 60 nucléotides et comprend une extension de 2 nucléotides à son extrémité 3' : ce sera l'une des extrémités du miARN mature. Le pré-miARN étant relativement instable, il doit être rapidement transporté hors du noyau pour persister.

Selon la localisation des gènes à l'origine du pri-miARN (région codante ou non codante), les fragments libérés sont soit dégradés, soit utilisés comme ARN messagers.

## 5.2. Transport par exportin-5

La suite de la maturation des miARN ayant lieu dans le cytoplasme, l'exportation est une étape cruciale de leur biosynthèse. Cette exportation du pré-miARN se fait par les pores nucléaires, par le biais d'un récepteur d'export nucléaire, un grand complexe protéique appelé l'exportin-5 [Kim V.N., 2004] représenté ci-dessous par la figure 8.

Fig. 8. **Exportin-5.** Le récepteur d'export nucléaire (NTR) se retrouve chez de nombreux facteurs de transport nucléaire RAN-GTP dépendants.



Source : Kim (2005).

### 5.2.1. Modalités de l'export

Il s'agit d'un mécanisme actif. Pour que le transport puisse se faire, exportin-5 doit se lier au cofacteur RAN [Lund *et al.*, 2004]. Cette protéine est une GTPase qui, une fois dans le cytoplasme, permet la libération du pré-miARN par l'hydrolyse du GTP en GDP.

Certaines caractéristiques structurales sont nécessaires à l'action de l'exportin-5 : une tige d'ARN supérieure à 16 paires de bases et une courte extension de 2 nucléotides à son extrémité 3' [Zeng et Cullen, 2004]. De plus, les miARN se retrouvant en plus de 50.000 copies par cellule, les pré-miARN sont certainement le principal substrat que transporte exportin-5, bien que celle-ci puisse également interagir avec l'adénovirus VA1 et les ARN de transfert (ARNt) lorsque leur facteur d'export premier, exportin-1, est en déplétion ou surchargé [Gwizdek *et al.*, 2004].

### 5.2.2 Exportin-5 et stabilité du pré-microARN

Lorsque des cellules sont privées d'exportin-5, les niveaux de pré-miARN et de miARN matures sont réduits dans le cytoplasme. Cependant les pré-miARN ne s'accumulent pas pour autant dans le noyau. Ainsi, les pré-miARN, relativement instables seuls, seraient stabilisés lors de leur interaction avec exportin-5 [Yi *et al.*, 2003].

## 5.3. Action de Dicer dans le cytoplasme

Une fois le pré-miARN dans le cytoplasme, la ribonucléase de type III Dicer le clive pour aboutir à un duplex miARN-miARN\* d'environ 22 nucléotides de long. De la même manière que pour Drosha, ce clivage se fait en association avec différents cofacteurs et nécessite certaines conditions.

### 5.3.1. Composition de Dicer

Dicer est une protéine très conservée au cours de l'évolution et à travers les espèces. On la retrouve ainsi chez la plupart des organismes eucaryotes, plantes et animaux. Certains organismes possèdent plusieurs homologues de Dicer, pour lesquels les différentes isoformes ont souvent des rôles bien distincts.

D'une masse d'environ 200kDa, Dicer se compose de plusieurs domaines dont l'organisation est schématisée dans la figure 9 ci-après. Comme pour Drosha, on retrouve deux domaines ribonucléase III et un domaine de liaison aux ARN double brin. A l'extrémité N-terminale se trouve un domaine ARN hélicase à boîte DEAD, domaine conservé chez les enzymes qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour catalyser l'ouverture des duplex d'ARN. Viennent ensuite le domaine DUF283 dont le rôle est inconnu (*Domain of Unknown Function 283*) et le domaine PAZ. Ce dernier est un domaine conservé que l'on retrouve aussi chez la famille Argonaute et permet de se lier aux ARN, préférentiellement par leur extrémité 3'.

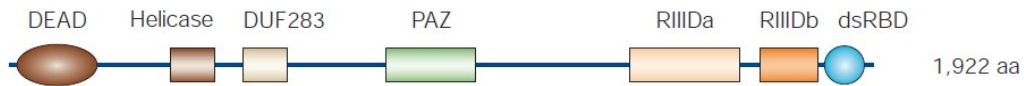


Fig. 9. **Organisation des composants de Dicer.** Les domaines ribonucléase III sont responsables de l'activité endonucléolytique de l'enzyme. DEAD, motif Asp-Glu-Ala-Asp (acide aspartique, acide glutamique ou glutamate, alanine). DUF283, domaine de fonction inconnue. RIIID, domaine ribonucléase III. dsRBD, domaine de liaison aux ARN double brin. aa, acides aminés. *Source : Kim (2005).*

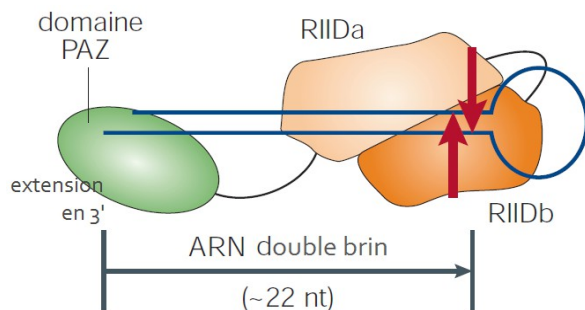
Chez de nombreux organismes, Dicer s'associe avec plusieurs autres protéines, notamment de la famille Argonaute et des protéines permettant de se lier aux ARN double brin, comme TRBP (*transactivation response RNA-binding protein*) et PACT (*protein activator of the interferon-induced protein kinase*) chez l'homme [Kim et al., 2009]. Elles ne semblent pas nécessaires au clivage lui-même mais peuvent influencer sur la stabilité du miARN, ainsi que sur la formation et l'action du complexe effecteur.

Ainsi, Dicer fait partie d'un complexe ribonucléoprotéique nommé RISC (*RNA-induced silencing complex*) qui sera détaillé un peu plus loin.

### 5.3.2. Sélection du site de clivage

Le site de clivage, représenté par des flèches rouges dans la figure 10 ci-dessous, est déterminé par la distance qui le sépare de l'extrémité 3' du pré-miARN : elle doit être d'environ 22 nucléotides, ce qui correspond à peu près à deux tours d'hélice.

Fig. 10. **Représentation schématique du clivage par Dicer.** Le rôle du domaine PAZ serait de s'accrocher à l'extrémité 3' du pré-miARN. Seuls les domaines RIIID et PAZ sont représentés. Les flèches rouges indiquent le site de clivage du pré-miARN. *D'après Kim (2005).*



Par conséquent, Drosha ayant clivé le pri-miARN à deux tours d'hélice de la boucle terminale et Dicer clivant le pré-miARN à deux tours d'hélice de l'extrémité issue du clivage de Drosha, on peut dire que l'action de Drosha prédéfinit les deux extrémités du miARN mature.

### 5.3.3. Résultat du clivage

Le produit du clivage, un duplex de miARN d'environ 22 nucléotides, ne persiste pas longtemps dans la cellule. Généralement, un brin de ce duplex est dégradé tandis que l'autre forme le miARN mature. On appelle miR\* le brin qui sera relâché et dégradé, le duplex est donc nommé miR/miR\*.

## 5.4. Sélection du brin guide

Une fois le pré-miARN clivé pour donner le duplex miR/miR\*, Dicer et TRBP se dissocient du miRISC (*microRNA-induced silencing complex*), et la sélection du brin complémentaire de l'ARNm-cible permet l'activation du complexe.

### 5.4.1. Assemblage du miRISC

RISC est un terme générique pour une famille de complexes ribonucléoprotéiques hétérogènes qui permettent de cibler presque tous les gènes et bloquer leur expression. L'assemblage du RISC est déclenché par l'arrivée dans le cytoplasme d'ARN double brin [Pratt et Macrae, 2009]. Dans le cas des microARN, le terme exact serait miRISC. Le détail de cet assemblage des composants du RISC est encore mal connu à ce jour, mais il serait couplé à l'action de Dicer et la sélection du miARN mature [Fabian et al., 2010].

Le RISC comprend des protéines de la famille Argonaute, dont les rôles et compositions seront détaillés plus loin, et les protéines TRBP et PACT dont les rôles exacts restent encore à déterminer [Kim et al., 2009].

### 5.4.2. Modalités de sélection

En général, c'est le brin correspondant à l'extrémité 5' de la tige-boucle du pré-miARN qui donnera le miARN mature. C'est ce brin anti-sens qui présente une moins bonne stabilité interne par rapport au reste de la séquence du précurseur, et cette propriété thermodynamique semble jouer un rôle crucial pour le dénouement du duplex et la sélection du brin via le RISC [Khvorova et al., 2003]. En effet, pour que le duplex se dénoue et que le RISC retienne et conserve le brin, il faut des éléments déstabilisants que sont les mésappariements, trous et hernies. Or cela se retrouve essentiellement sur le brin 5' du duplex.

Dans le cas particulier des mitrons, la sélection du brin guide montre une large préférence pour le brin 3' qui est majoritairement utilisé comme miARN mature.

### 5.4.3. MiARN mature et devenir du brin passager

A l'issue de cette sélection, le miARN mature se compose de deux parties essentielles : la partie 5' appelée tête (*seed*), des bases 2 à 7 ou 8 et qui s'apparie à la cible, et la partie 3' dont le rôle est fondamental pour la reconnaissance de la cible.

Le brin passager, quant à lui, sera dégradé [Bouasker et Simard, 2012], bien qu'il arrive parfois qu'il soit également utilisé comme brin guide et incorporé à un miRISC.

## 6. Schéma récapitulatif

La figure 11 ci-dessous est un schéma récapitulatif de toutes les étapes de la synthèse classique des microARN animaux décrites jusqu'ici.

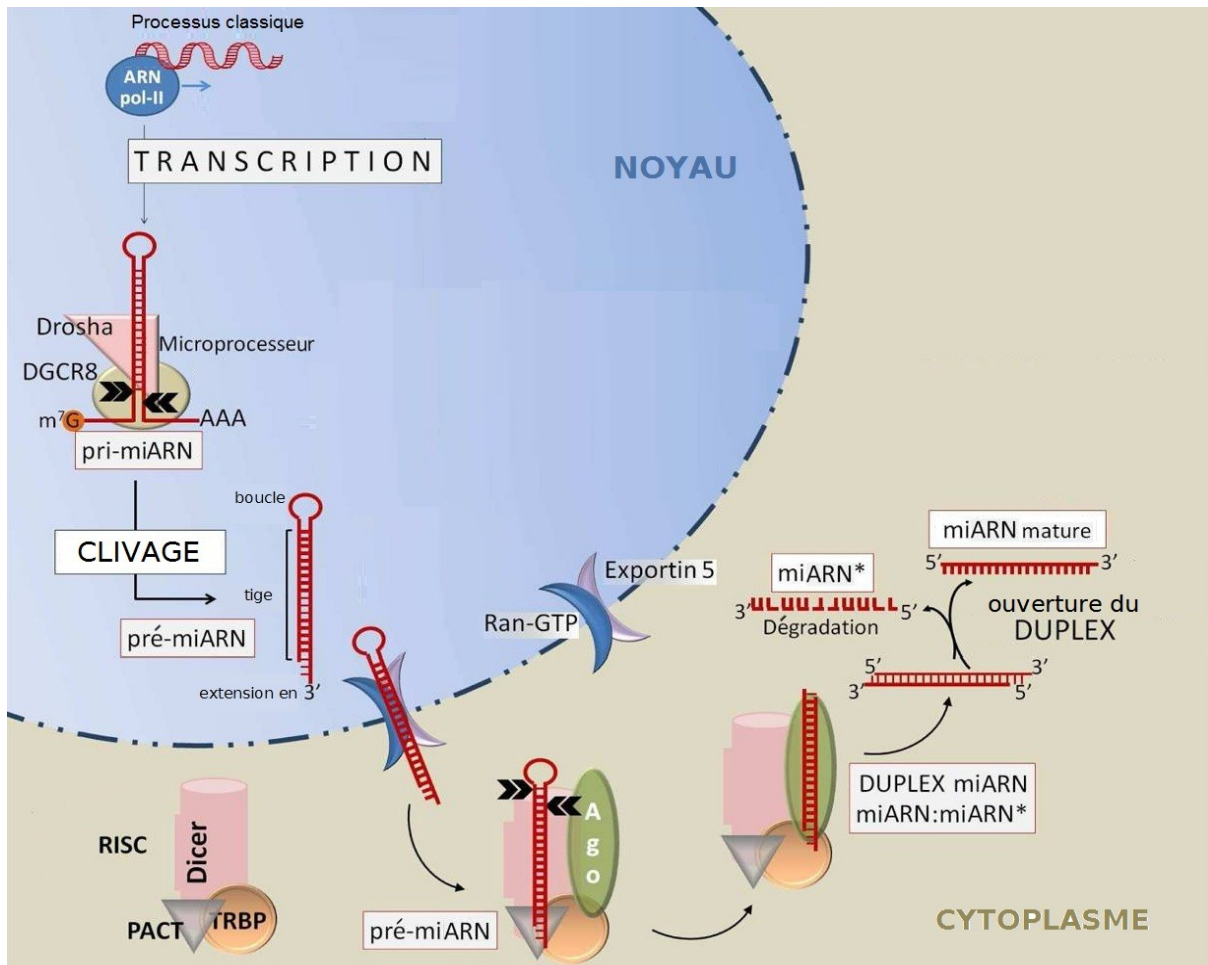


Fig. 11. Schéma récapitulatif de la synthèse classique des miARN. D'après Sotillo (2011).

## 7. Alternatives à cette synthèse classique des microARN

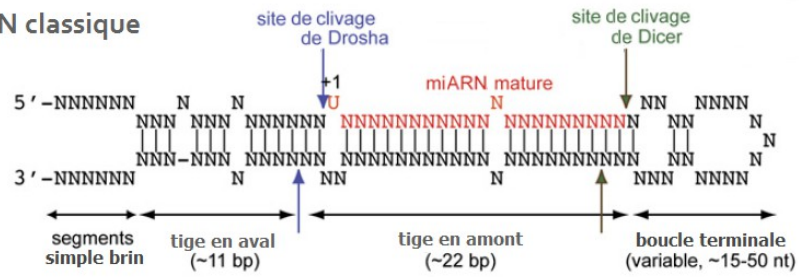
La synthèse décrite jusque-là est celle majoritairement suivie par les microARN, cependant il existe des variations à cette synthèse. Les alternatives présentées ci-dessous ne sont pas exhaustives, et ce d'autant plus que le sujet est encore à l'étude et que de nouvelles exceptions à cette synthèse classique peuvent être découvertes au fil des recherches.

### 7.1. Voie des mirtrons, indépendante de Drosha

#### 7.1.1. Mirtrons classiques

Les caractéristiques des mirtrons, courts introns qui ne contiennent que la séquence en tige-boucle correspondant au pré-miARN, sont résumées dans la figure 12 ci-après.

### a Pri-miARN classique



### b Mirtron classique

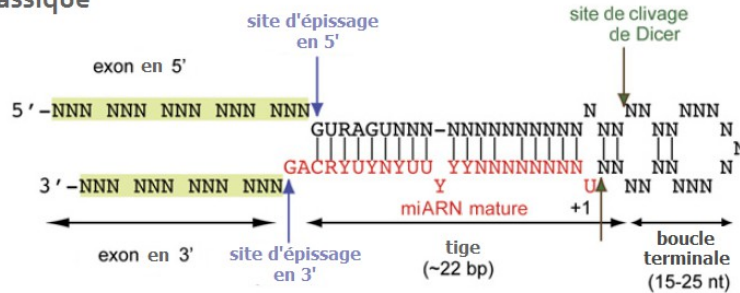


Fig. 12. **Principales caractéristiques des mirtrons et pri-miARN.** **a** | Un pri-miARN classique contient un site de clivage pour Drosha, modulé par la tige en aval, et un site de clivage pour Dicer. Le miARN mature pourrait se trouver sur le brin 5' ou le brin 3', il est ici représenté sur le 5'. **b** | Un mirtron classique ne contient pas de "tige en aval" mais un motif de nucléotides modulant l'épissage. Par la suite, il pourra être clivé par Dicer de la même manière que les pré-miARN classiques. *D'après Okamura (2007).*

La première étape de la maturation des mirtrons est assurée par l'épissage, réalisé par le spliceosome et qui aboutit à la libération d'une structure semblable à un pré-miARN. Cet épissage est schématisé dans la figure 13 ci-dessous. Il s'agit donc d'une voie pour laquelle l'action de Drosha dans le noyau n'est pas nécessaire.

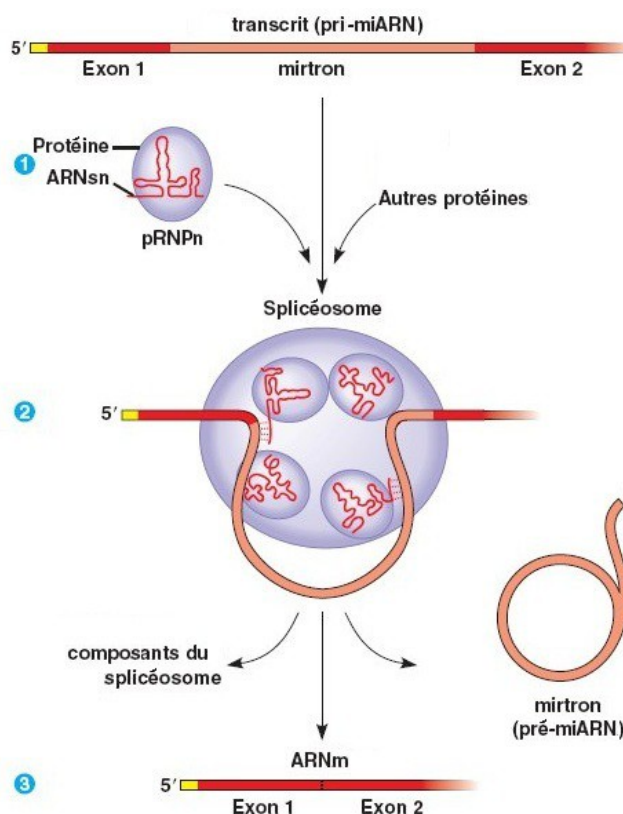


Fig. 13. **Epissage du mirtron par le spliceosome.** Le spliceosome est un complexe formé de petits ARN nucléaires (ARNsn ou snRNA, *small nuclear ARN*), de petites ribonucléoprotéines nucléaires (pRNPn ou snRNP, *small nuclear ribonucleoprotein*) et d'autres protéines. Une fois l'épissage effectué, le mirtron relâché est en forme de lasso. *D'après <http://bio1151.nicerweb.com>.*



Une fois l'épissage effectué, une enzyme permet le débranchement de la forme lasso de l'intron (Ldbr, *lariat debranching enzyme*), autorisant ainsi la formation de la structure tige-boucle du pré-miARN. Par la suite, les mirtrons suivent le même processus de maturation que les autres miARN : exportation dans le cytoplasme puis clivage par Dicer.

### 7.1.2. Mirtrons à queue en 5'

Chez certains mirtrons, la séquence correspondant à la structure en épingle se trouve dans l'une des deux fins de l'intron. Il y a alors une extension non structurée, appelée queue, soit du côté 5' soit du côté 3' de l'épingle. L'épissage génère donc un intermédiaire qui devra subir une étape nucléaire supplémentaire avant de pouvoir être exporté puis clivé par Dicer.

Dans le cas des mirtrons à queue en 5', que l'on retrouve chez de nombreux mammifères, le processus n'a pas été étudié en détail mais l'on suppose que la queue est retirée par une exonucléase [Westholm et Lai, 2011].

### 7.1.3. Mirtrons à queue en 3'

Dans le cas des mirtrons à queue en 3', que l'on a étudiés chez *Drosophila melanogaster* mais pas encore identifiés chez les vertébrés, la queue est retirée par un exosome, un complexe protéique agissant comme une exonucléase 3' → 5' [Westholm et Lai, 2011].

### 7.1.4. Schéma récapitulatif

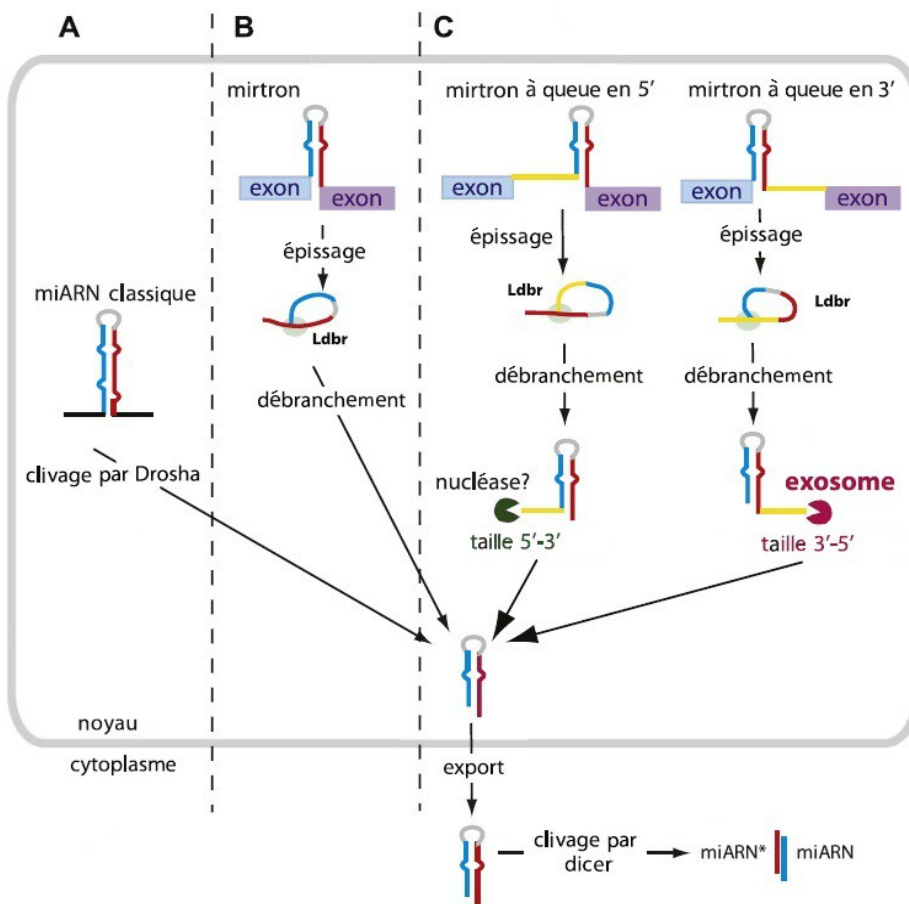


Fig. 14. **Biogenèse comparée des miARN classiques et des mirtrons.** **A** | Voie classique. **B** | Voie des mirtrons classiques. **C** | Voie des mirtrons à queue en 5' et queue en 3'. Toutes les voies se rejoignent pour l'export du pré-miARN en tige-boucle. Ldbr, *lariat debranching enzyme*. D'après Westholm (2011).

## **7.2. Voie des miARN dérivés de shARN endogènes**

Une autre synthèse atypique de miARN est la synthèse d'ARN en courte épingle à cheveux (*shARN*, *short hairpin RNA*). Leur maturation est d'abord effectuée par des nucléases encore non identifiées à ce jour, puis par Dicer en pré-miARN. La suite de la maturation est alors la même que pour le processus classique.

## **7.3. Voie indépendante de Dicer**

Dans le cas particulier de miR-451, un microARN exprimé chez les vertébrés, sa maturation ne dépend pas de Dicer. Le pri-miR-451 clivé par Drosha génère un pré-miARN plus court que les pré-miARN classiques. Sa tige formée d'un duplex d'environ 18 bp est trop courte pour servir de substrat à Dicer. Le pré-miR-451 est donc directement pris en charge par des protéines Ago. S'il s'agit d'Ago1, la maturation ne peut continuer. S'il s'agit d'Ago2, l'épingle est coupée en son brin 3', aboutissant à un produit de 30 nucléotides. Celui-ci doit encore subir la résection d'environ 7 nucléotides en 3' pour aboutir au miR-451 de 23 nucléotides. On ne connaît pas encore la ou les nucléase(s) responsable(s) de cette dernière étape [Yang et Lai, 2011]. Ainsi, cette voie indépendante de Dicer a la particularité de ne pas présenter l'intermédiaire qui est le duplex miARN/miARN\* [Axtell *et al.*, 2011].





# MODES D'ACTION ET RÉGULATION DES MICROARN

---

Un microARN peut avoir plusieurs cibles possibles, et plusieurs miARN peuvent avoir la même cible. Cela s'explique par le fait que l'hybridation miARN/ARN-cible peut se faire de manière imparfaite. Lors d'hybridation incomplète, il y a soit inhibition de la traduction, soit dégradation de l'ARNm, sans que le mécanisme décisionnel entre ces deux options ne soit connu. En revanche, lors d'hybridation parfaite, il y a cassure de l'ARNm le plus souvent, bien que non systématiquement.

## 1. Reconnaissance de l'ARNm cible

Une fois le miARN mature pris en charge par la protéine Argonaute du complexe RISC, celui-ci transporte le miARN jusqu'à sa cible et son mode d'action dépend du degré de complémentarité du miARN avec le transcrite cible, mais aussi d'autres facteurs, comme le type de protéines des complexes Ago ou RISC, la composition des ribonucléoprotéines entrant en jeu, et l'action du promoteur dont dépend le miARN.

### 1.1. Composition du miRISC

L'assemblage du *miRNA-induced silencing complex* (miRISC) est un processus dynamique dont les détails sont encore inconnus à ce jour et qui aurait lieu concomitamment au clivage du pré-miARN par Dicer. On sait toutefois que ce complexe est constitué, entre autres, du miARN mature, d'une protéine de la famille Argonaute et du facteur GW182. Il contient également des protéines qui agissent comme des facteurs de régulation du complexe.

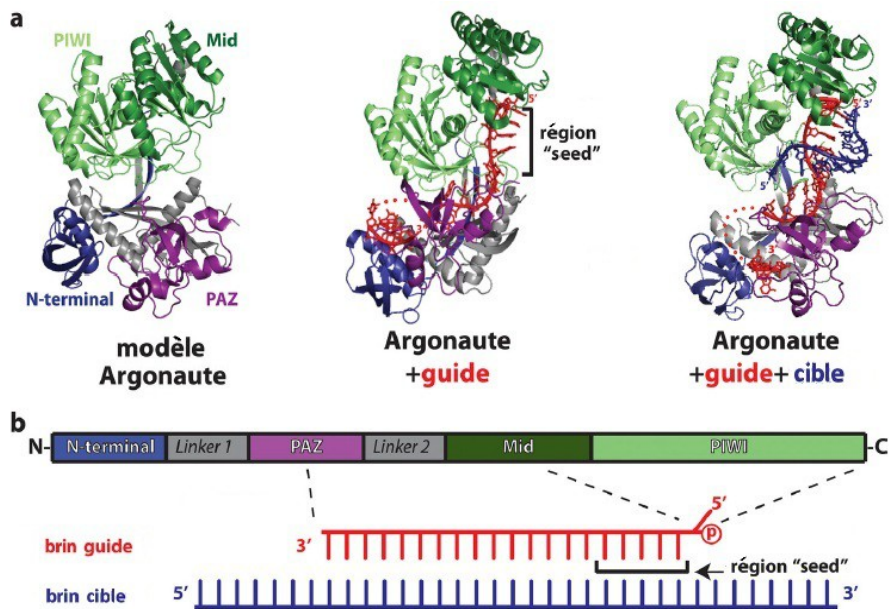
#### 1.1.1. Protéines Argonautes

Au cœur du RISC se trouvent des protéines de la famille Argonaute qui se lient au petit ARN et le positionnent de façon à faciliter la reconnaissance de l'ARN-cible par la suite. Il existe

trois clades de protéines dans la famille des Argonautes : Argonaute et Piwi chez les humains, Wago chez *C. elegans*. Dans le cas des microARN, c'est la clade des Argonautes, aussi appelée Ago, qui entre en jeu. Chez les mammifères, quatre protéines Ago (Ago1 à Ago4) interviennent dans les interactions avec les miARN voire les siARN.

Les protéines Ago sont formées de quatre domaines conservés ayant chacun une fonction bien précise, ainsi que deux régions les reliant nommées *Linker1* (L1) et *Linker2* (L2) : ces domaines et leur interaction avec le miARN et l'ARN-cible sont représentés dans la figure 15 ci-dessous. Le domaine PAZ (*Piwi-Argonaute-Zwille*) – que l'on retrouve également chez Dicer – permet de se lier aux acides nucléiques simple brin : quatre résidus aromatiques sont responsables de l'interaction spécifique avec la courte extension de l'extrémité 3' du miARN. Le domaine central (Mid, *middle*) prend part à la liaison à l'extrémité 5' du brin guide : le phosphate 5' est ancré par une poche d'acides aminés basiques formée par les domaines Mid et PIWI, ce qui l'exclut de l'appariement avec l'ARN-cible. Cette poche hautement conservée se situe à l'interface des deux domaines suscités et est essentielle au bon positionnement du brin guide, notamment de sa région tête (*seed*). Le domaine PIWI forme une structure similaire à la ribonucléase (Rnase) H, permettant la catalyse du clivage de l'ARN-cible. Le domaine N-terminal permet le désenroulement du duplex miARN/miARN\*.

Fig. 15. Structure d'une protéine Argonaute et interactions avec miARN et ARN-cible. **a** | structure d'une Argonaute, ici issue de *Thermus thermophilus*, et son association avec le miARN guide puis l'ARN-cible. **b** | représentation schématique des domaines et régions d'interaction entre la protéine Argonaute, le brin guide du miARN et l'ARN-cible. L'extrémité 5' du brin guide est en contact avec les domaines middle (Mid) et PIWI, l'extrémité 3' se lie aux domaines N-terminal et PAZ.



D'après Pratt (2009).

Bien que les acides aminés du centre catalytique du domaine PIWI sont généralement bien conservés chez les protéines Argonautes, toutes n'ont pas d'activité nucléolytique. Chez l'homme, seule Ago2 présente une activité d'endonucléase. Chez *C. elegans*, Ago1 et Ago2 présentent toutes deux cette activité [Bouasker et Simard, 2012]. Cette activité catalytique nécessite du magnésium, et un motif DDH dans le domaine PIWI des protéines.

### 1.1.2. Protéines GW182

Les protéines de la famille GW182 interagissent directement avec les protéines Argonautes et sont nécessaires aux miARN pour agir. Le nom de GW182 découle du poids moléculaire de ces protéines et de la présence de répétitions de glycine et tryptophane (motifs GW, WG ou GWG). Les foyers contenant ces protéines sont nommés corps GW. Il existe trois paralogues de GW182 chez les vertébrés (*trinucleotid repeat-containing 6A* ou TNRC6A/GW182, TNRC6B et TNRC6C) contre un seul orthologue chez les insectes (GW182).

On distingue deux domaines structuraux dans ces protéines. Le central est semblable à un domaine d'association à l'ubiquitine, on l'appelle le domaine UBA-like (*ubiquitin associated-like domain*). Son rôle n'est pas encore compris : on ne sait pas si ce domaine UBA-like des protéines GW182 se lie à l'ubiquitine, petite protéine servant – entre autres – de marqueur de protéines à éliminer, ou si ses fonctions sont autres. Le second domaine se trouve en région C-terminale et est appelé RRM (*RNA recognition motif*). Il ne semble pas requis pour interagir avec les protéines Argonaute ou les miARN, son rôle exact reste encore à déterminer [Eulalio *et al.*, 2009a]. Ces domaines sont encadrés de régions non structurées qui comprennent deux ou trois blocks distincts de répétitions glycine-tryptophane : les régions de répétitions GW N-terminale (N-GW), du milieu (*middle*, M-GW) et C-terminale (C-GW). Elles comprennent également une région riche en glutamine (*Q-rich*) localisée entre le domaine UBA-like et le RRM. Chez les différents membres de la famille GW182, le nombre de répétitions GW varie dans les régions N-GW, M-GW et C-GW (voir figure 16 ci-dessous). Cependant, la plupart des répétitions GW se trouvent dans la région N-terminale chez toutes les protéines GW182 tandis que, dans les régions du milieu et C-terminale, elles sont rares voire absentes.

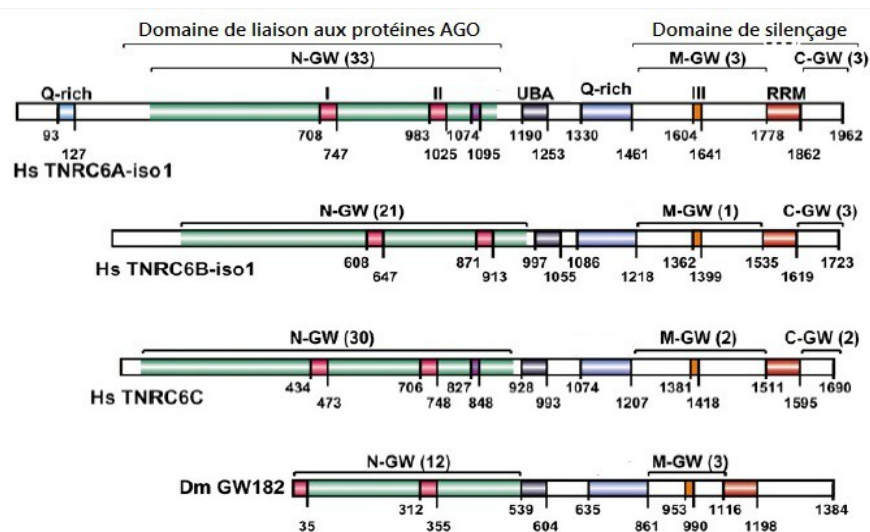


Fig. 16. **Organisation des domaines des protéines GW182.** Les nombres de répétitions des motifs GW sont indiqués entre parenthèses. Les secteurs blancs au sein de la région N-terminale ne contiennent pas de répétitions GW. Les régions I et II dans la N-GW sont deux motifs conservés. Les nombres sous les représentations correspondent aux positions des acides aminés. Hs, *Homo sapiens*. Dm, *Drosophila melanogaster*. D'après Eulalio (2009).

C'est la région N-GW qui interagit avec les protéines Argonautes, tandis que les régions M-GW et C-GW définissent un domaine permettant le silençage génique. La région Q-rich et le domaine de liaison aux protéines Ago permettent l'accumulation des protéines GW182 dans les corps GW, bien que cette condition ne soit pas nécessaire au silençage génique.

## 1.2. Site d'hybridation (*seed*)

Nous avons vu que le miARN mature se compose de deux parties essentielles : la partie 5' appelée tête (*seed*), des bases 2 à 7 et qui est cruciale pour l'appariement avec la cible, et la partie 3' dont le rôle est fondamental pour la reconnaissance de la cible. Cette région 5' est la portion la plus conservée des miARN chez les métazoaires. Une règle a été établie : un appariement de type Watson-Crick aux nucléotides 2 à 7, voire 8, de la partie 5' du miARN, long en moyenne de 6 pb, est indispensable à l'activité du miARN. La figure 17 ci-dessous montre les sites possibles d'appariement que permet cette "règle de la tête".

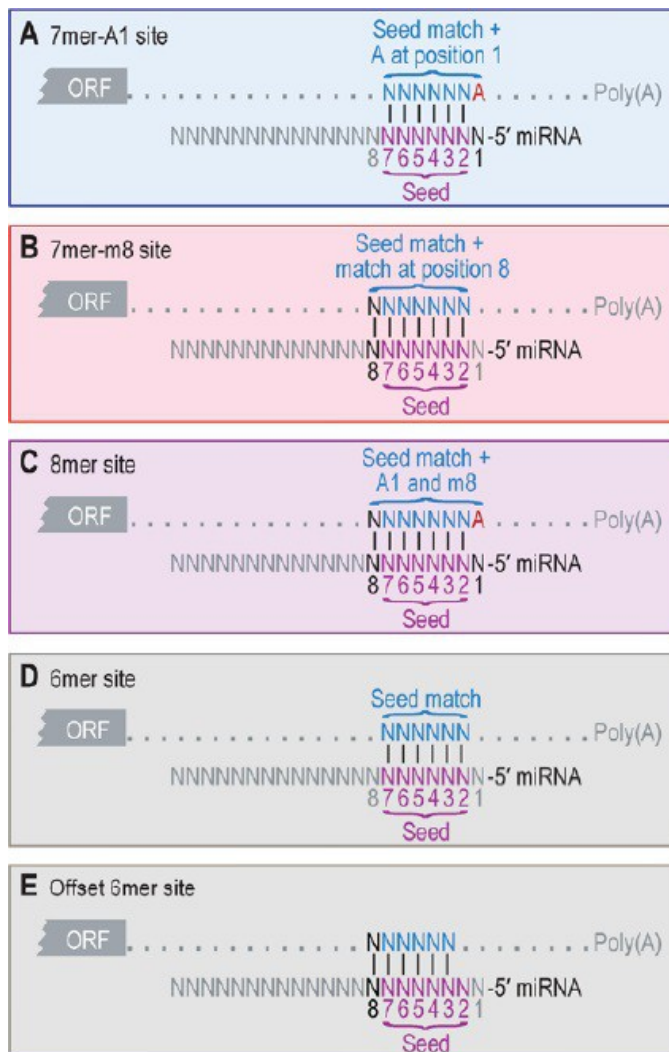


Fig. 17. **Règle de la tête.** A, B et C sont des sites classiques d'appariement, D et E sont des sites d'appariement plus marginaux.

**A** | L'appariement est parfait pour les nucléotides 2 à 7 de la région *seed* et le nucléotide de la cible en face de la position 1 de la région *seed* est une adénine, ce qui augmenterait l'efficacité de l'appariement. **B** | L'appariement est parfait pour les nucléotides 2 à 8 de la région *seed*. **C** | L'appariement est parfait pour les nucléotides 2 à 8 de la région *seed* et le nucléotide de la cible en face de la position 1 de la région *seed* est une adénine. **D** | L'appariement est parfait pour les nucléotides 2 à 7 de la région *seed*. **E** | L'appariement est parfait pour les nucléotides 3 à 8 de la région *seed*, il n'y a pas d'appariement avec le nucléotide en position 2 de la région *seed*.

*Seed*, tête. *Match*, correspondance. ORF, *open reading frame*, cadre ouvert de lecture.

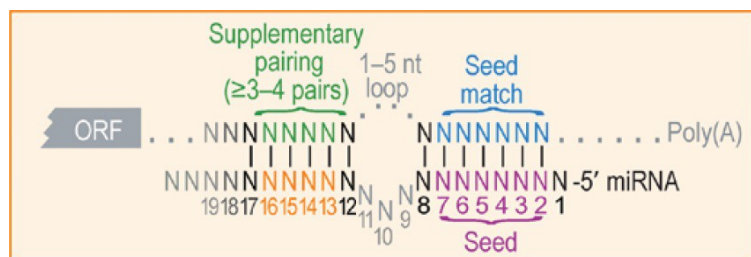
Source : Bartel (2009).

Cette règle de la tête n'est cependant pas absolue, il arrive qu'il y ait des mésappariements au sein de la région de la tête, mais cela diminue grandement l'efficacité de l'interaction.

### 1.3. Appariements supplémentaires et compensatoires

Lors d'hybridation incomplète, ce qui est généralement le cas chez les animaux, le duplex miARN/ARNm présente une ou plusieurs boucles dans sa partie centrale, entre les nucléotides 9 et 12 du miARN. Afin d'améliorer la spécificité et l'affinité de l'appariement, il existe des appariements dans les régions du miARN autres que la tête. Ainsi, on peut trouver des appariements appelés « sites 3' supplémentaires » qui viennent renforcer l'appariement de la tête. Pour être optimal, cet appariement en 3' se centre sur les nucléotides 13-16 du microARN et la région NC de l'ARNm directement opposée à ce segment du miARN (voir figure 18 ci-dessous). Il se fera préférentiellement avec au moins 3-4 appariements de type Watson-Crick sans interruption de type hernie ou mésappariement [Bartel, 2009]. Cependant, ce type d'appariement est atypique et ne semble permettre qu'un léger gain d'efficacité, il n'aurait donc qu'un modeste rôle dans la reconnaissance de l'ARN-cible.

Fig. 18. **Site 3' supplémentaire.** *Supplementary pairing*, appariement supplémentaire. *Seed*, tête. *Loop*, boucle. ORF, *open reading frame*, cadre ouvert de lecture. Source : Bartel (2009).



Un appariement en 3' peut également compenser un mésappariement dans la région de la tête, on parle alors de « site 3' compensatoire », représenté en figure 19 ci-dessous. Cet appariement se centre sur les nucléotides 13-17 du microARN et s'étend au moins sur 9 paires Watson-Crick contiguës, donc bien plus que pour les sites 3' supplémentaires [Bartel, 2009]. Il s'agit aussi d'un appariement atypique qui est rarement conservé entre les espèces.

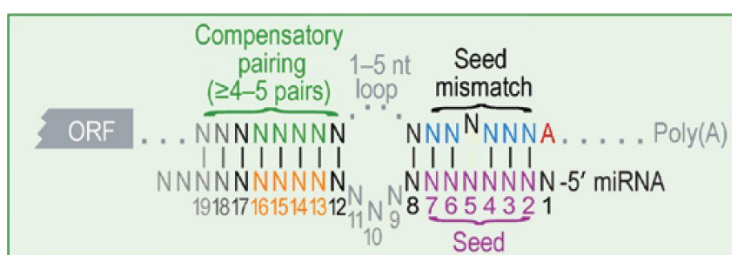


Fig. 19. **Site 3' complémentaire.** *Compensatory pairing*, appariement complémentaire. *Seed*, tête. *Loop*, boucle. ORF, *open reading frame*, cadre ouvert de lecture. Source : Bartel (2009).

Plusieurs conséquences découlent de ces modes d'appariement. Des miARN homologues ou identiques existent en nombreuses copies dans le génome et de nombreux miARN possèdent la même séquence *seed*. Ils ont alors des cibles en commun, il y a donc redondance structurelle et fonctionnelle. De plus, du fait de la relative souplesse des appariements qui sont généralement imparfaits, un seul miARN peut réguler plusieurs cibles et un transcrite peut être régulé par plusieurs miARN. Ainsi, les interactions miARN-ARN cible forment un réseau complexe qui dépend du contexte cellulaire.



## 1.4. Importance de l'accessibilité du site

On a d'abord pensé que, en dehors de quelques exceptions, les sites d'hybridation du miARN sur les ARNm se trouvaient dans leur région 3'NC et étaient généralement présents en plusieurs exemplaires. Cependant, il existe aussi des cibles dans les régions 5'NC et les sections codantes, certaines se trouveraient même au niveau des ORF (*open reading frame*, phase ouverte de lecture) chez l'homme et la drosophile [Schnall-Levin *et al.*, 2010]. Leur découverte étant plus récente, la majorité des sites étudiés jusque-là chez les métazoaires se trouvent en 3'NC des ARNm. Il semblerait pourtant que, chez la drosophile, les cibles se trouveraient autant en région 3'NC que sur les ORF, bien que moins présentes en région 5'NC. Chez l'homme en revanche, les sites seraient effectivement plus présents dans les régions 3'NC que dans les ORF, et rares en région 5'NC [Schnall-Levin *et al.*, 2010]. Une récente étude a montré que, dans le cas de courte région 3'NC, le miARN cible préférentiellement une séquence codant pour une protéine [Reczko *et al.*, 2012]. Par ailleurs, dans une même longue région 3'NC, il existe des préférences de localisation : les sites aux extrémités 3'NC de l'ARNm permettraient une meilleure inhibition par le miARN, et plusieurs sites relativement proches peuvent avoir un effet synergique [Grimson *et al.*, 2007].

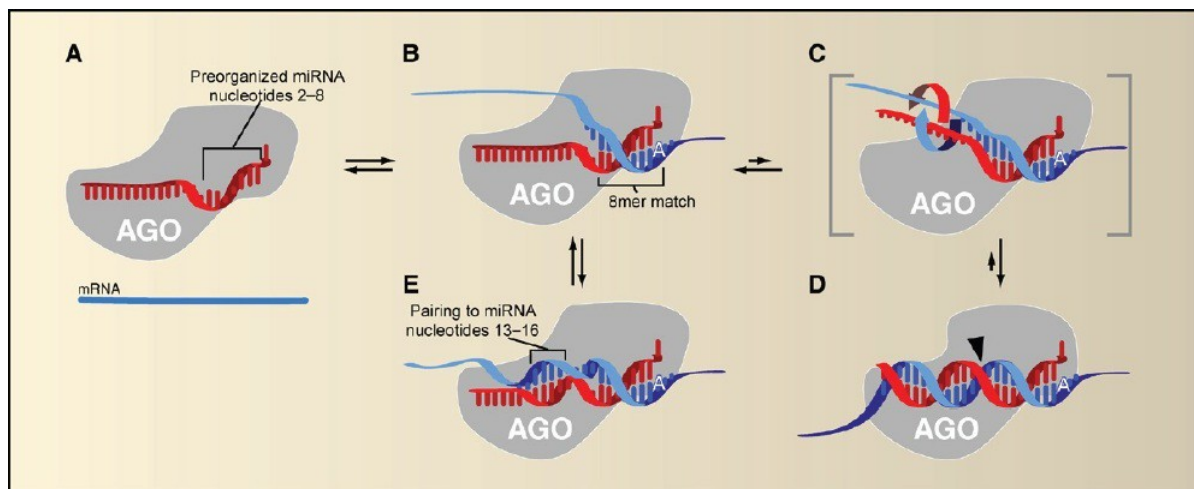


Fig. 20. **Modèles d'interaction des régions du miARN avec sa cible.** **A** | Le microARN, représenté en rouge, est lié à la protéine Argonaute de façon à ce que les nucléotides 2 à 8 (séquence *seed*) soient organisés afin de favoriser l'appariement avec l'ARNm cible, représenté en bleu. **B** | Reconnaissance de 8 nucléotides de l'ARNm par la poche de liaison formée par la séquence *seed*, L'adénosine en position 1 serait reconnu par Ago ou une autre protéine du RISC. **C** | Dans les rares cas où l'appariement est parfait, la protéine perd sa liaison en 3', ce qui permet l'enroulement du miARN et de l'ARNm. **D** | Ago se referme sur le duplex, ce qui met le site actif (pointe noire) en position pour le clivage de l'ARNm. **E** | Plus fréquemment, des appariements supplémentaires en 3' (nucléotides 13 à 16), formant un petit segment en hélice sans perturbation majeure d'Ago ou du miARN. Dans ce cas, le miARN et l'ARNm ne sont pas enroulés l'un autour de l'autre. *Source : Bartel (2009).*

La complémentarité de séquence entre le miARN et l'ARN cible n'est pas le seul critère d'efficacité d'appariement : les structures secondaires, notamment de la cible, contribuent également à la reconnaissance de la cible. En 2007, Kertesz *et al.* ont démontré une forte corrélation entre le degré de répression et la différence entre l'énergie libre gagnée par la

liaison du miARN à sa cible et l'énergie libre perdue par le désappariement des nucléotides du site cible. Cela a confirmé l'impact de l'accessibilité du site sur la force de répression par les miARN. Par ailleurs, de fortes structures secondaires entourant le site cible peuvent restreindre l'accès au miRISC activé et doivent être limitées pour que l'interaction miARN-ARN cible ait lieu. Des mésappariements autour du site cible sont donc nécessaires.

## 2. Clivage et dégradation de l'ARNm

Dans le cas d'un appariement parfait entre miARN et ARNm, l'ARNm-cible est clivé au centre de l'hybridation miARN-ARNm, entre les nucléotides 10 et 11. Chez les mammifères, cette coupure est effectuée par la protéine Argonaute 2. Cependant, si ce mode d'action est le plus commun pour les miARN des plantes, il reste relativement rare pour les miARN animaux pour lesquels l'appariement est généralement imparfait.

### 2.1. Conditions nécessaires

Deux conditions sont essentielles au clivage de l'ARN cible : le miRISC doit comporter une protéine Argonaute dont le centre catalytique est actif – il est alors appelé *slicer* –, et la complémentarité entre le miARN guide et l'ARNm cible doit être quasi parfaite. Cette dernière condition assure que seules les cibles validées soient clivées. Comme dit précédemment, seule Ago2 peut assurer cette activité.

### 2.2. Clivage de l'ARNm

L'activité RNase du domaine PIWI de la protéine Argonaute catalyse le clivage de l'ARN cible, tel que représenté en figure 21 ci-après. Cette activité dépend de cations divalents. Une triade catalytique "DD(D/H)" est essentielle pour l'hydrolyse, dont les première et seconde positions sont un acide aspartique et la troisième position est de l'aspartate ou de l'histidine. Cette triade positionne une molécule d'eau pour l'attaque nucléophile de la liaison phosphodiester de l'ARN cible, qui a toujours lieu entre les bases 10 et 11 du microARN.

A la suite de ce clivage, l'ARN est coupé en deux fragments : l'un possède l'extrémité 5'-phosphate et l'autre l'extrémité 3'-hydroxyl. Ils sont alors dégradés.

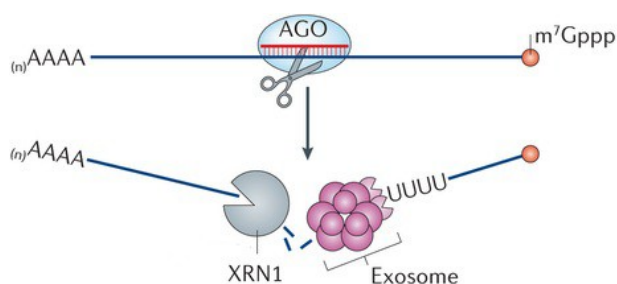


Fig 21 **Dégradation de l'ARNm par son interaction avec le miARN.** L'activité RNase du domaine PIWI d'Ago clive l'ARN cible entre les bases 10 et 11 du microARN. Ensuite, l'exoribonucléase 5'→3' (XRN1) et le complexe exonucléolytique 3'→5' (exosome) dégradent les fragments de l'ARNm clivé. *Source : Diversifying microRNA sequence and function, Ameres S.L. & Zamore P.D. (2013).*



### 3. Blocage de la traduction de l'ARNm

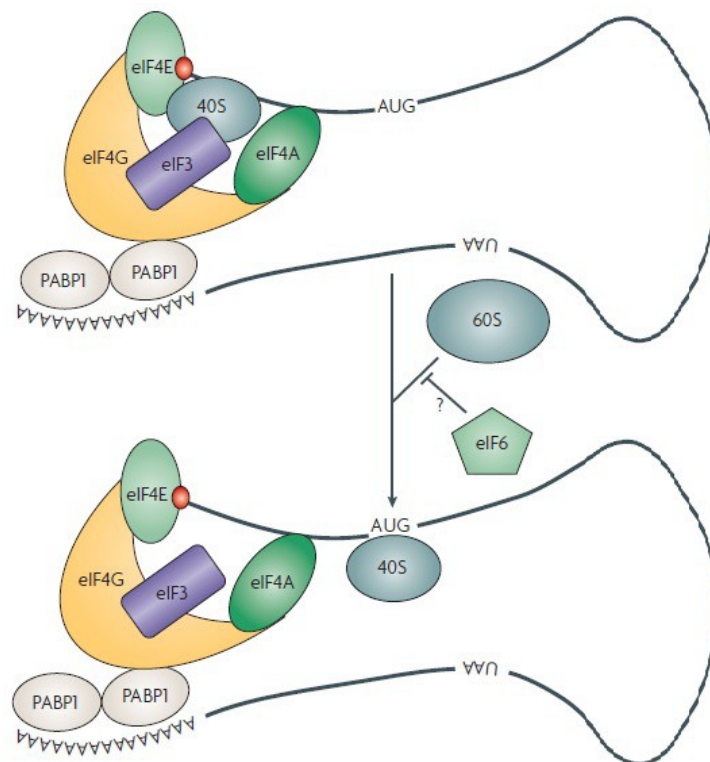
L'inhibition de la traduction de l'ARNm-cible a lieu lors d'appariement imparfait entre le miARN et la-dite cible, ce qui est le cas pour la plupart des miARN animaux. Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer ce blocage traductionnel.

#### 3.1. Généralités sur la traduction de l'ARNm

La traduction de l'ARNm se divise en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation débute avec la reconnaissance de la coiffe  $m^7GpppN$  à l'extrémité 5' de l'ARNm, N se référant à un quelconque nucléotide. Cette reconnaissance se fait par la sous-unité eIF4E du facteur d'initiation de la traduction eIF4F, qui contient également eIF4G, un élément important pour l'assemblage du ribosome. En effet, l'interaction d'eIF4G avec eIF3, un autre facteur d'initiation, facilite le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome [Filipowicz *et al.*, 2008]. eIF4G interagit aussi avec une protéine liant le polyadénylate, PABP1 (*polyadenylate-binding protein 1*). Cette interaction simultanée d'eIF4G avec eIF4E et PABP1 permet le rapprochement des deux extrémités de l'ARNm, ce qui stimule l'initiation de la traduction. Lorsque la sous-unité 60S du ribosome rejoint le codon AUG, en interaction avec eIF6 qui semble réguler la jonction des deux sous-unités du ribosome, l'élongation commence.

Fig. 22. **Initiation de la traduction.** L'initiation débute avec la reconnaissance de la coiffe de 7-méthylguanosine ( $m^7G$ ) en 5' de l'ARNm par la sous-unité eIF4E du facteur d'initiation eIF4F. Celui-ci contient également une ARN hélicase, eIF4A et une protéine permettant l'assemblage du complexe d'initiation, eIF4G. L'interaction d'eIF4G avec un autre facteur d'initiation, eIF3, facilite le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome qui commence alors à chercher le codon d'initiation AUG dans la région 5'NC de l'ARNm. Quand la sous-unité 60S du ribosome rejoint le complexe, l'élongation peut commencer. Quand le ribosome atteint le codon de terminaison (UAA, UAG ou UGA), les sous-unités ribosomales se dissocient de l'ARNm et l'une de l'autre.

Source : Filipowicz (2008).



Pour certains ARNm cellulaires ou viraux, l'initiation de la traduction ne dépend pas de la coiffe  $m^7G$  ni de eIF4E. La sous-unité 40S est alors recrutée par interaction avec un élément présent sur la région 5'NC, un IRES (*internal ribosomal entry site*) [Filipowicz *et al.*, 2008].

## 3.2. Déadénylation de l'ARNm

### 3.2.1. Généralités sur la dégradation des ARNm

La répression de nombre d'ARNm cibles est fréquemment associée à leur déstabilisation. Chez les eucaryotes, la dégradation d'un ARNm peut se faire de deux façons, chacune débutant par un raccourcissement progressif de la queue poly-A. Ainsi l'ARNm peut être dégradé dans le sens 3' → 5', ce qui est catalysé par l'exosome, ou par la suppression de la coiffe suivie d'une dégradation 5' → 3' catalysée par l'exonucléase XRN1.

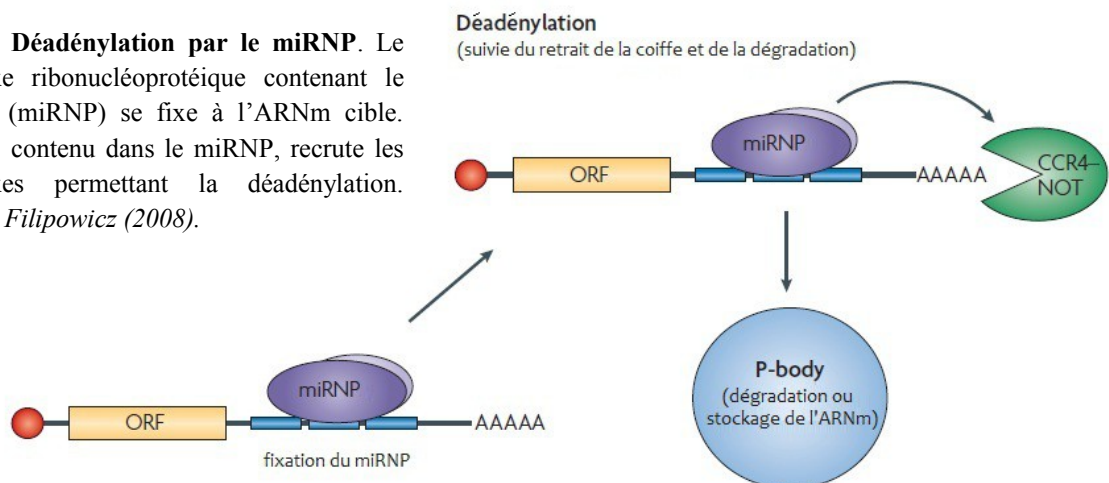
Cette dégradation, ou du moins les dernières étapes, aurait lieu dans les corps P (*P-bodies*, *RNA processing bodies*). Il s'agit de structures cytoplasmiques riches en protéines impliquées dans le catabolisme des ARNm (déadénylation, retrait de la coiffe et dégradation) et le blocage traductionnel. Elles ne contiennent cependant ni ribosomes, ni facteurs d'initiation de la traduction à l'exception d'eIF4E. Chez les métazoaires, les corps P sont enrichis en protéines Argonautes, protéines GW182 et miARN. Ils sont d'ailleurs également appelés corps GW. Les ARNm menés dans ces corps P ou corps GW sont soit dégradés, soit stockés [Filipowicz *et al.*, 2008].

### 3.2.2. Mécanisme de la déadénylation médiée par les microARN

Les répétitions GW en N-terminal de la protéine GW182 interagissent avec le domaine PIWI d'Ago1. GW182 recrute les complexes formés par les déadénylases CAF1:CCR4:NOT1. La déadénylation est ensuite suivie par le retrait de la coiffe par le complexe DCP1:DCP2 (*decapping complex*) et la dégradation par l'exonucléase 5' → 3' XRN1. Ces différentes étapes sont schématisées en figure 23 ci-dessous.

La dégradation de l'ARNm par le miARN est inhibée dans les cellules dépourvues des complexes CAF1, CCR4 et NOT1 ou des complexes DCP1:DCP2 [Behm-Ansmant *et al.*, 2006], des ARNm déadénylés peuvent alors s'accumuler sans être dégradés [Filipowicz *et al.*, 2008]. Pour sa part, GW182 est capable d'agir en l'absence d'Ago1 [Chekulaeva et Filipowicz, 2009].

Fig. 23. **Déadénylation par le miRNP.** Le complexe ribonucléoprotéique contenant le miARN (miRNP) se fixe à l'ARNm cible. GW182, contenu dans le miRNP, recrute les complexes permettant la déadénylation. D'après Filipowicz (2008).



Par ailleurs, la déadénylation provoquée par le miARN est indépendante de la traduction, et la répression de la traduction peut avoir lieu sans qu'il y ait déadénylation puisque des ARNm sans queue poly-A peuvent être réprimés par des miARN.

### 3.3. Inhibition de l'initiation de la traduction

L'inhibition de l'initiation de la traduction des ARNm par les microARN pourrait se faire de deux manières, représentées en figure 24 ci-après : à l'étape de la reconnaissance de la coiffe ou à l'étape de recrutement de la sous-unité 60S du ribosome.

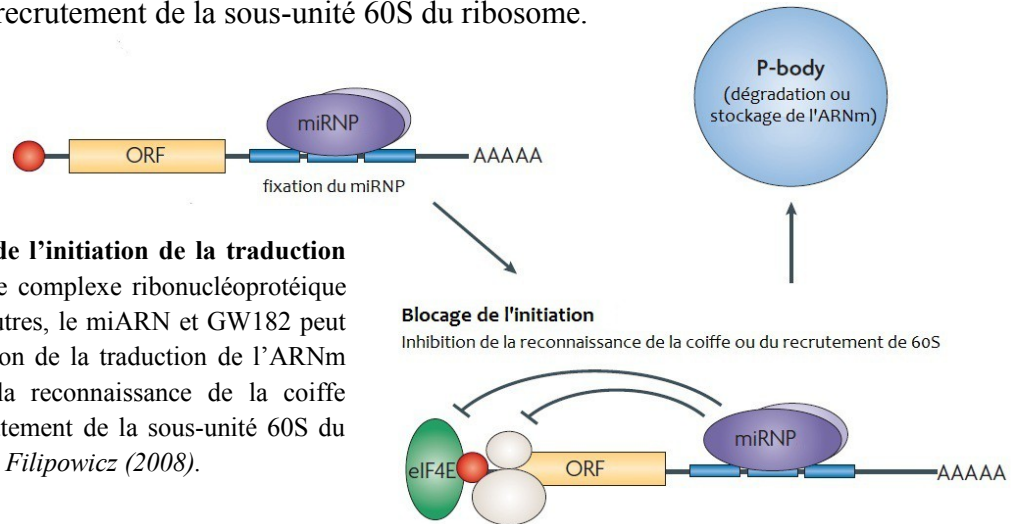


Fig. 24. **Blocage de l'initiation de la traduction par le miRNP.** Le complexe ribonucléoprotéique contenant, entre autres, le miARN et GW182 peut empêcher l'initiation de la traduction de l'ARNm en inhibant soit la reconnaissance de la coiffe m<sup>7</sup>G, soit le recrutement de la sous-unité 60S du ribosome. D'après Filipowicz (2008).

#### 3.3.1. Inhibition de la reconnaissance de la coiffe

Les miARN peuvent bloquer la traduction d'ARNm possédant une coiffe m<sup>7</sup>G, mais pas ceux contenant un IRES ou une coiffe ApppN qui ne peut se lier à l'eIF4E. Cette coiffe m<sup>7</sup>G est donc essentielle à la répression de la traduction par les miARN [Humphreys *et al.*, 2005].

En 2007, Kiriakidou *et al.* ont découvert que le domaine central des protéines Ago contenait une courte séquence homologue à celle de la région d'eIF4E lui permettant de se lier à la coiffe. Cette similarité comprend deux résidus aromatiques essentiels à la liaison à la coiffe chez eIF4E et d'autres protéines se liant à la coiffe : voir figure 25 ci-dessous. Ainsi, Ago2 peut entrer en compétition avec eIF4E pour se lier aux m<sup>7</sup>G et empêcher la traduction de l'ARNm. L'affinité étant apparemment moins importante que pour eIF4E, on comprend l'utilité de la présence des miRNP ou protéines Ago en multiples exemplaires.

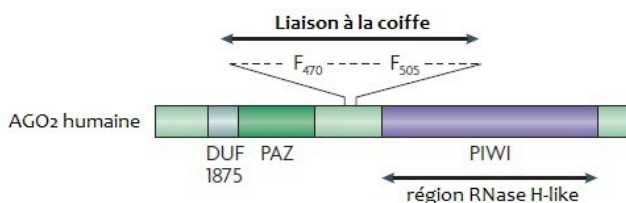


Fig. 25. **Domaine de liaison d'Ago2 à la coiffe m<sup>7</sup>G.** F470 et F505 sont les acides aminés aromatiques (phénylalanines) qui permettent la liaison à la coiffe m<sup>7</sup>G. DUF, *domain of unknown function*. D'après Filipowicz, 2008.

### 3.3.2. Inhibition du recrutement de la sous-unité 60S

Le facteur eIF6 jouerait un rôle crucial dans la biogénèse de la sous-unité ribosomale 60S dans le noyau et son transport dans le cytoplasme. Or, en 2007, Chendrimada *et al.* ont découvert que eIF6 et la sous-unité ribosomale 60S précipitaient au contact du complexe Ago2-Dicer-TRBP. La sous-unité 60S ne pourrait donc pas rejoindre la sous-unité 40S, et l'initiation de la traduction serait empêchée. Mais ce modèle reste encore à prouver.

### 3.4. Séquestration de l'ARNm dans des corps cytoplasmiques

Les miRISC peuvent séquestrer les ARNm dans des corps cytoplasmiques appelés *P-bodies* (*ARN processing bodies*) ou corps GW (*GW-bodies*). C'est une région particulière de la protéine GW182, composant du miRISC ou miRNP, qui est responsable de cette localisation : elle est représentée en figure 26 ci-dessous. Les ARNm sont alors inaccessibles à la machinerie traductionnelle, ils sont stockés ou dégradés.

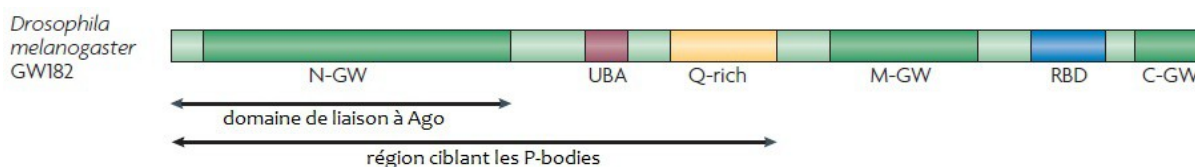


Fig. 26. **Région de GW182 responsable de la localisation dans les P-bodies.** La région s'étendant du domaine N-terminal au domaine riche en glutamine (Q-rich) est responsable de la localisation de GW182 dans les corps GW ou *P-bodies*. UBA, *ubiquitin associated domain*. RBD, *RNA binding domain*. D'après Filipowicz (2008).

Les granules de stress (SG, *stress granule*) sont un autre type d'agrégats cytoplasmiques contenant des ARNm, formés en réponse à une situation de stress ou une répression générale de l'initiation de la traduction. Tout comme les *P-bodies*, les granules de stress pourraient avoir un rôle dans la répression de la traduction par les miARN : les protéines Ago, les miARN et les ARN réprimés peuvent s'y accumuler.

### 3.5. Inhibition aux étapes post-initiation

Il arrive que certains ARNm, malgré une forte réduction de production de leur protéine, soient tout de même associés à des polysomes, c'est-à-dire des ensembles de ribosomes. L'inhibition de la traduction ne se limite donc pas à celle de l'initiation.

En 2006, Peterson *et al.* ont proposé un modèle selon lequel les miARN rendraient le ribosome susceptible de terminer la traduction de façon prématurée (figure 27 ci-après). Cette même année, Maroney *et al.* ont proposé un autre modèle selon lequel les miARN décéléreraient la phase d'élongation de la traduction. Cependant, la façon dont les miARN pourraient moduler l'élongation ou la terminaison de la traduction reste encore à déterminer.

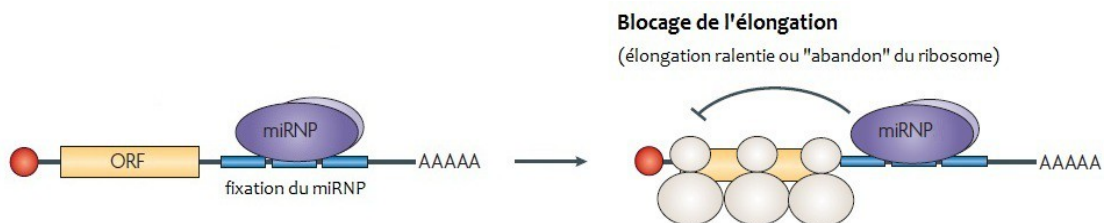


Fig. 27. **Blocage de l'élongation par le miRNP.** D'après Filipowicz (2008).

Par ailleurs, malgré des preuves évidentes de nombre d'études que la répression de la traduction par les miARN peut avoir lieu après l'étape d'initiation, rien ne démontre que les mécanismes d'initiation et post-initiation soient mutuellement exclusifs. Il est possible que l'initiation soit toujours inhibée, mais que lorsque l'élongation l'est également et que les ribosomes se lient à l'ARNm, cela masque le blocage de l'initiation.

Une autre hypothèse, illustrée en figure 28 ci-dessous, est que les protéines sont bien synthétisées depuis l'ARNm, mais que le miRNP recrute des protéases qui les dégradent aussitôt. Cette idée n'est cependant étayée à ce jour que par des données négatives et non des données positives, c'est-à-dire que rien ne prouve qu'elle soit fautive, mais il reste à prouver qu'elle est vraie [Filipowicz *et al.*, 2008].



Fig. 28. **Hypothèse d'une protéolyse induite par le miRNP.** L'hypothèse d'un clivage des polypeptides a été proposée comme mécanisme de répression de la production de protéines par le miARN. Une protéase, ici notée X, serait impliquée mais n'a pas été identifiée. Cette idée reste à prouver. D'après Filipowicz (2008).

## 4. Activation de l'ARNm

Au cours des dernières années, plusieurs études ont montré que, sous certaines conditions, les microARN pouvaient activer leur cible plutôt que la réprimer.

### 4.1. Exemples d'activation

En 2007, Vasudevan *et al.* ont observé que des miARN empêchaient la traduction de leur cible dans les cellules en prolifération, mais la régulaient positivement dans les cellules au repos. Ce revirement de fonction serait dû à l'association d'Ago2 avec d'autres protéines : elle n'est ainsi associée à FXR1 (*Fragile X Related Protein 1*) que dans les miRNP "activant" et non les miRNP "réprimant". Ce mécanisme reste cependant une particularité.

En 2008, Orom *et al.* ont montré que miR-10a se liait à des ARNm contenant une séquence d'oligopyrimidines en région 5'NC, sans respecter les règles classique d'appariement de la tête, et stimulait la traduction de ces ARNm.

### 4.2. Cas particulier de miR-122

miR-122 est un microARN spécifique du foie. En 2008, il a été démontré entre autres par Jopling *et al.* qu'il pouvait stimuler la réplication de l'ARN du virus de l'hépatite C en se liant à un site complémentaire situé à l'extrémité 5'NC de l'ARN dudit virus. miR-122 pourrait même avoir un effet stimulateur sur la traduction de l'ARN [Henke *et al.*, 2008].

De plus, Jopling *et al.* ainsi que Henke *et al.* ont démontré que l'effet de miR-122 était position dépendante. Ainsi, les sites d'hybridation présents en 5'NC de l'ARN du virus ont un effet stimulateur sur l'abondance d'ARN viral, sans conséquence sur la traduction, tandis que les sites d'hybridation en 3'NC agissent comme des répresseurs.



## 5. Régulation des microARN

Les microARN exercent une régulation essentielle au bon fonctionnement des cellules, une altération de leur expression pouvant provoquer de graves maladies. Eux-mêmes sont donc régulés aux multiples étapes de leur biogenèse ainsi que dans leur fonctionnement.

### 5.1. Régulation de la transcription des gènes à microARN

La transcription des gènes à miARN est régulée de la même façon que ceux codant pour des protéines. C'est un contrôle primordial pour la spécificité d'expression des miARN selon les tissus ou les stades de développement. Chacune des ARN polymérases II et III est régulée différemment et reconnaît des éléments promoteurs et terminateur spécifiques, ce qui permet un large éventail d'options de régulation. La présence, entre autres, d'îles CpG et de boîtes TATA montre que les promoteurs de gènes à miARN sont sous le contrôle de facteurs de transcription (FT). Par ailleurs, chaque miARN localisé dans le même *cluster* génomique peut être transcrit et régulé indépendamment.

#### 5.1.1. Activateurs et répresseurs de transcription des miARN

De nombreux FT régulent l'expression des miARN de façon positive ou négative, notamment selon les tissus ou le stade de développement. Par exemple, les répresseurs MYC et MYCN stimulent l'expression de miARN dans des cellules cancéreuses alors qu'ils inhibent l'expression de plusieurs miARN suppresseurs de tumeur. Le facteur p53 quant à lui stimule l'expression de miARN qui favorisent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Enfin, la transcription de plusieurs miARN dépend du statut de méthylation du promoteur de leur gène – lorsque le promoteur est méthylé, le gène est en général réprimé – et ce statut est régulé par les ADN méthyltransférases DNMT1 et DNMT3B. Ces quelques exemples, illustrés en figure 29 ci-dessous, permettent de se rendre compte des innombrables régulations possibles.

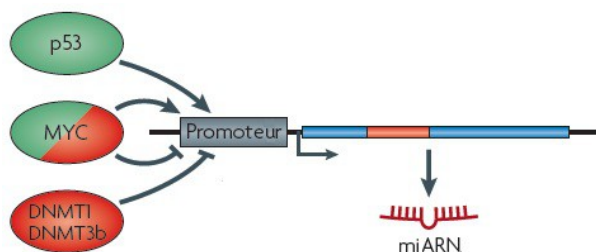


Fig. 29. **Activateurs et répresseurs transcriptionnels de l'expression des miARN.** Les FT agissent sur les gènes à miARN de la même façon que sur les gènes codant pour des protéines. Les activateurs sont représentés en vert et les répresseurs en rouge. Certains FT peuvent agir soit en tant qu'activateur, soit en tant que répresseur selon les miARN qu'ils régulent. *D'après Krol (2010).*

#### 5.1.2. Boucles de rétrocontrôle de l'expression des miARN

Le rétrocontrôle est un mécanisme de régulation particulièrement important. Les miARN sont très impliqués dans ces boucles puisqu'ils peuvent se lier et réprimer des ARNm qui encodent

des facteurs impliqués dans la biogenèse et la fonction de ces mêmes miARN. Il existe ainsi plusieurs exemples de miARN régulant leur propre transcription via des rétrocontrôles unilatéraux, réciproques, voire doubles, avec des FT spécifiques (figure 30). Ainsi, le facteur de transcription PITX3 et miR-133b forment une boucle d'autocontrôle négatif : PITX3 stimule la transcription de miR-133b et celui-ci supprime l'expression de PITX3. Chez *Caenorhabditis elegans*, les miARN lys-6 et miR-273 et les facteurs de transcription DIE-1 et COG-1 interagissent dans une boucle de double rétrocontrôle négatif.

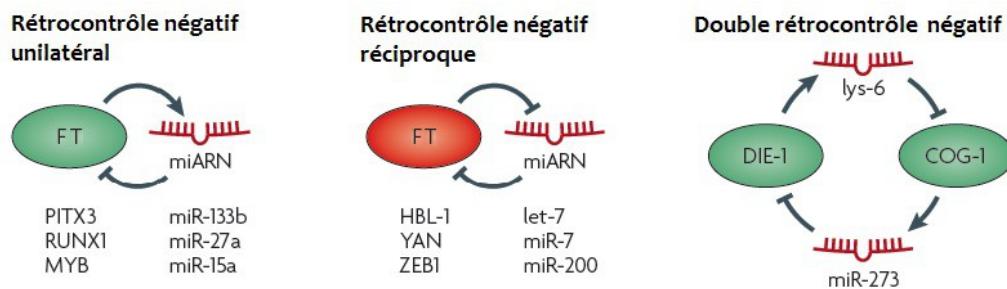


Fig. 30. **Boucles de rétrocontrôle de l'expression des miARN.** Les activateurs sont représentés en vert et les répresseurs en rouge. D'après Krol (2010).

## 5.2. Régulation de la maturation des microARN

La régulation de la maturation des microARN est extrêmement complexe du fait des nombreux facteurs entrant en jeu. Les modes de régulation décrits ici sont donc loin d'être exhaustifs mais s'intéressent aux grandes étapes de la maturation des microARN.

### 5.2.1. Régulation du clivage par Drosha

Drosha fait partie d'un complexe comprenant des protéines se liant aux ARN double-brin (*double-stranded RNA binding protein, dsRBP*) comme DGCR8. Le niveau et l'activité de ces protéines sont soumis à une régulation qui affecte l'accumulation de miARN. Ainsi, DGCR8 a un effet stabilisateur sur Drosha par interaction avec son domaine du milieu, et Drosha contrôle les niveaux de DGCR8 en clivant les structures en épingle présentes dans l'ARNm de DGCR8, ce qui induit sa dégradation [Han *et al.*, 2009].

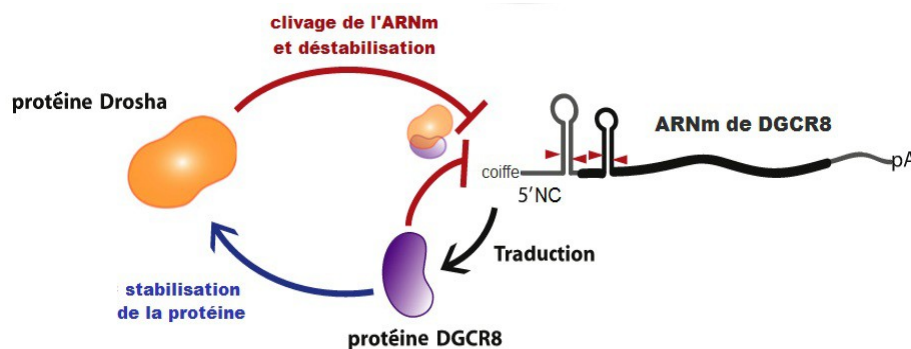


Fig. 31. **Régulation croisée de Drosha et DGCR8.** Drosha clive l'ARNm de DGCR8 et le déstabilise, tandis que DGCR8 régule positivement Drosha par des interactions protéine-protéine. D'après Han (2008).



### 5.2.2. Régulation du clivage par Dicer

Dicer fait également partie d'un complexe comprenant des *dsRBP* comme TRBP (*transactivation-responsive RBP*). De la même manière que pour Drosha et DGCR8, l'accumulation de Dicer dépend de TRBP : une augmentation de TRBP entraîne une déstabilisation de Dicer et un défaut de traitement des pré-miARN [Chendrimada *et al.*, 2005].

De plus, Dicer est une large protéine contenant plusieurs domaines, elle est non seulement impliquée dans le clivage des pré-miARN mais participe également au chargement du miARN dans le miRISC [Carthew et Sontheimer, 2009]. Son domaine hélicase semble avoir une fonction autorégulatrice car il a été démontré que sa suppression stimulait l'activité catalytique de Dicer [Ma *et al.*, 2008].

### 5.2.3. Les miARN isoformes

La position du clivage de Drosha et Dicer détermine la composition nucléotidique des extrémités 5' et 3' du miARN. Le procédé n'est cependant pas uniforme et peut générer des miARN isoformes possédant des extrémités différentes. L'hétérogénéité à l'extrémité 5' en particulier peut avoir d'importantes conséquences sur la fonction du miARN car elle peut toucher la région *seed* et ainsi modifier les cibles du miARN [Krol *et al.*, 2010].

Nous avons vu que la stabilité thermodynamique des extrémités du duplex miARN/miARN\* déterminait quel brin sera pris en charge par le miRISC. L'hétérogénéité induite par ce clivage non uniforme peut affecter la stabilité des extrémités et donc modifier la sélection du brin guide. En général, la plupart des gènes à miARN produisent un miARN dominant. Cependant, le ratio de miARN et miARN\* varie selon les tissus et les étapes de développement, probablement du fait de propriétés spécifiques des pré-miARN et des duplex, mais aussi de facteurs accessoires qui doivent réguler cette sélection.

### 5.2.4. Edition de l'ARN

L'édition est une modification post-transcriptionnelle de la séquence d'un ARN par addition de nucléotide(s), remplacement ou modification d'une base. L'édition *A-to-I* est effectuée par une enzyme appelée adénosine désaminase agissant sur l'ARN (ADAR, *adenosine deaminase acting on RNA*). Cette enzyme peut convertir l'adénosine (A) en inosine (I) chez divers substrats ARN double-brin. L'inosine n'est pas un nucléoside classique, elle sera reconnue comme de la guanosine (G) lors de la traduction.

Plusieurs études ont démontré que les pri-miARN et les pré-miARN pouvaient servir de substrat à ADAR [Kawahara *et al.*, 2008] [Habig *et al.*, 2007]. Selon le site où elle a lieu, l'édition peut compromettre la maturation du microARN, par exemple en empêchant l'action de Drosha ou de Dicer. Le pri- ou pré-miARN est alors rapidement dégradé.

### **5.3. Régulation des fonctions des microARN**

Là encore, la régulation des fonctions des microARN étant extrêmement complexe du fait des nombreux facteurs entrant en jeu, les modes de régulation décrits ici ne sont pas exhaustifs mais permettent d'avoir une vue d'ensemble sur cet important réseau.

#### **5.3.1. Au niveau des protéines Ago**

Chez les mammifères, chaque protéine Ago a son propre potentiel de répression de la synthèse des protéines une fois lié à l'ARNm. Ainsi, des différences d'abondance des protéines Ago pourraient influencer sur la force de répression des miARN dans certaines cellules ou certains tissus [Wu et Belasco, 2008]. En 2007, Diederichs *et al.* ont observé que la surexpression de chaque protéine Ago accroît l'abondance de miARN matures dans certaines cellules. Cela laisse supposer que la concentration cellulaire en Ago est un facteur limitant de la formation du miRISC. Les miARN pouvant différer dans leur capacité à être pris en charge par le miRISC, tout changement de concentration cellulaire en Ago peut avoir des effets non seulement quantitatifs mais aussi qualitatifs sur la gamme de miARN associés aux miRISC.

Plusieurs mécanismes pouvant réguler les niveaux d'Ago2 dans les cellules mammifères ont été décrits, essentiellement des interactions avec d'autres protéines ayant différents effets : stabilisation d'Ago2, polyubiquitination et dégradation par le protéasome, localisation accrue dans les *P-bodies*... [Krol *et al.*, 2010].

#### **5.3.2. Au niveau des protéines GW182**

L'importance des protéines GW182 dans le circuit miARN n'ayant été reconnue que récemment, on ne sait que peu de choses concernant leur régulation. Les niveaux de TNRC6A fluctuent au cours du cycle cellulaire, en corrélation avec le nombre et la taille des *P-bodies* [Yang *et al.*, 2004]. TNRC6A étant une protéine hautement phosphorylée et l'évolution du cycle cellulaire étant associée à des événements de phosphorylation et déphosphorylation, on peut se demander si les modifications de TNRC6A sont liées au cycle cellulaire. Par ailleurs, certaines GW182 contiennent un domaine d'association à l'ubiquitine et TNRC6A semble être sujette à l'ubiquitination [Krol *et al.*, 2010].

#### **5.3.3. Protéines autres que GW182 et Ago**

En plus des composants essentiels du miRISC que sont Ago et GW182, des douzaines d'autres protéines sont impliquées dans la régulation positive ou négative des effets des miARN. Par exemple, plusieurs protéines interagissant avec le miRISC appartiennent à la famille des ARN hélicases à boîte DEAD/H : elles catalysent le dénouement ATP-dépendant des duplex d'ARN ou le remodelage des ARN ou des RNP. Elles sont donc

potentiellement importantes pour l'assemblage du miRISC, son association et sa dissociation des ARNm cibles, ou encore son désassemblage.

Certaines ubiquitine-ligases E3 peuvent également moduler positivement ou négativement les fonctions des miARN de différentes façons. Ainsi, Mei-P26 chez *D. melanogaster* est un régulateur négatif qui diminue la quantité de miARN matures, tandis que TRIM32 chez les mammifères favorise l'activité de certains miARN sans en changer la quantité. Par ailleurs, TRIM32 ne catalyse pas l'ubiquitination d'Ago, son domaine E3 n'est donc pas indispensable pour accroître la répression par les miARN. TRIM71 en revanche atténue la répression par les miARN en promouvant l'ubiquitination d'Ago2 et sa dégradation par le protéasome.

Un dernier exemple de protéine interagissant avec le miRISC et impliquée dans la modulation des fonctions des miARN est celui du cofacteur IMP8 (*import receptor importin 8*). IMP8 se trouve dans le noyau et dans les *P-bodies*, il s'associe avec les quatre protéines Ago indépendamment de l'ARN. Il est nécessaire à Ago2 pour qu'elle se lie de manière efficace à un grand nombre d'ARNm et agit possiblement comme un chaperon facilitant la liaison du miRISC aux ARNm cibles.

#### 5.3.4. Interactions entre miRISC et RBP

Dans un cas un peu particulier de protéines autres que GW182 et Ago, les effets des miARN peuvent aussi être modulés par des RBP (*RNA-binding protein*) se liant aux mêmes ARN. Plusieurs exemples de RBP contrant ou facilitant la répression par les miARN ont été décrits, la figure 32 ci-après en est l'illustration.

Prenons le cas de HuR, une protéine qui passe du noyau au cytoplasme lors de stress. En se liant aux éléments riches en A et U de l'extrémité 3'NC de l'ARNm *CAT-1*, elle brise la répression de cet ARNm par miR-122. L'ARNm est alors relâché des *P-bodies* et recruté par les polysomes pour la traduction. La RBP DND1 empêche également la répression de certains ARNm, mais en se liant à des séquences chevauchant celles nécessaires à la liaison du miARN. DND1 n'étant exprimée que dans les cellules germinales et non les cellules somatiques, cela rend l'expression du miARN spécifique de ces cellules.

Les protéines PUF, quant à elles, sont un exemple de RBP qui collaborent avec les miRISC. Chez *C. elegans*, PUF-9 agit en synergie avec let-7 pour réguler un ARNm cible commun. Par ailleurs, les miARN sont souvent entourés de nombres de PUF.

Enfin, notons qu'une même RBP peut, selon l'ARNm ou le contexte cellulaire, agir soit en activant soit en prévenant la répression par le miRISC. Ainsi, HuR peut également agir en synergie avec let-7 pour réprimer la traduction de l'ARNm MYC.

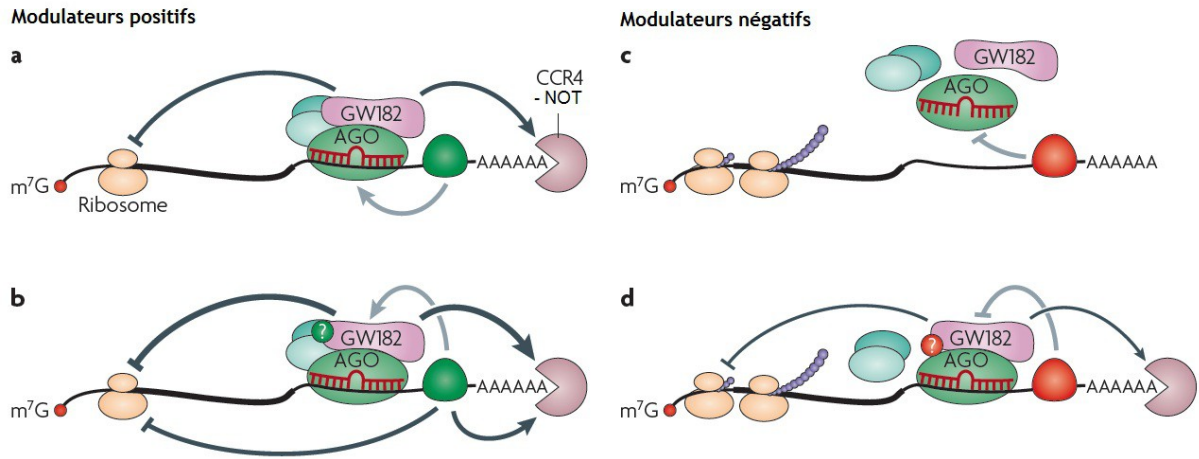


Fig. 32. **Interactions entre miRISC et RBP à l'extrémité 3'NC de l'ARNm.** La liaison des RBP aux ARNm peut faciliter (a et b) ou contrer (c et d) l'activité du miRISC. **a** | Les RBP accroissant la répression par les miARN (vert foncé) pourraient faciliter ou stabiliser la liaison du miRISC, soit en altérant la structure de l'ARNm, soit en interagissant avec les composants du miRISC, soit en interagissant directement avec le duplex miARN/ARNm. **b** | La répression pourrait être accrue par renforcement des interactions entre les composants du miRISC et les effecteurs en aval responsables de la répression de la traduction ou de la déadénylation, ces derniers pouvant être recrutés par des RBP indépendants du miRISC. Il pourrait également y avoir des modifications post-traductionnelles des composants protéiques (🟢). **c** | Les RBP contrant les fonctions du miRISC (rouge foncé) peuvent agir soit en empêchant son assemblage, soit en déplaçant le miRISC de l'ARNm. **d** | D'autres protéines pourraient interférer avec l'interaction entre les composants du miRISC et les effecteurs en aval responsables de la répression de la traduction ou de la déadénylation, ou encore promouvoir des modifications post-traductionnelles des composants du miRISC (🔴). *D'après Krol (2010).*

Le nombre de RBP et miARN différents exprimés chez les métazoaires atteignant plusieurs centaines, les interactions entre eux à l'extrémité 3'NC des ARNm forment un mécanisme de régulation majeur. Les RBP peuvent moduler les effets du miRISC, mais les miRISC peuvent également activer ou réprimer les fonctions des RBP soit en entrant en compétition avec eux sur les sites, soit en bloquant leur activité en se liant à eux.

### 5.3.5. Edition de l'ARN

En plus d'influer sur la maturation des miARN, l'édition peut aussi affecter la spécificité du miARN si le site d'édition se trouve dans la séquence du miARN mature. En effet, l'inosine étant apparentée à la guanosine, elle se paire avec la cytosine, et non l'uracile. L'édition pourrait donc modifier la reconnaissance de la cible, et ce d'autant plus si elle a lieu dans la région de la tête, zone cruciale pour l'appariement du miARN à l'ARN cible.

### 5.4. Turn-over des microARN

Si des miARN matures peuvent persister des heures voire des jours après l'arrêt de leur production, il arrive que la dynamique de leur expression nécessite une régulation négative rapide selon les tissus ou les étapes de développement cellulaire.

#### 5.4.1. Conditions cellulaires affectant la stabilité des miARN

Bien que les miARN soient généralement stables, ils peuvent être sujets à un déclin rapide, altérant les niveaux de miARN et leur activité. Ainsi, le cycle cellulaire peut affecter l'accumulation de certains miARN. C'est le cas, par exemple, de miR-29b qui est transcrit polycistroniquement avec miR-29a et n'en diffère que par un nucléotide en position 10 et les nucléotides de l'extrémité 3' [Hwang *et al.*, 2007]. Tandis que le niveau de miR-29a change peu au cours du cycle cellulaire, miR-29b est abondant dans les cellules mitotiques. Dans les autres cas, il est rapidement dégradé, des uraciles en positions 9-11 étant nécessaires mais non suffisantes pour cette dégradation rapide. De plus, lorsque des cellules complètent leur cycle en moins d'un jour par exemple, le turn-over des miARN doit être relativement rapide.

Les niveaux de certains miARN peuvent également décroître rapidement sous la stimulation de facteurs de croissance [Ruegger et Grosshans, 2012]. On ne sait cependant pas s'ils entraînent la dégradation des miARN ou s'ils altèrent la transcription ou la maturation miARN déjà instables.

Cette dégradation n'affecte que quelques miARN dans les exemples suscités. En revanche, un turn-over rapide des miARN semble être dominant dans les neurones et dépend de l'activité neuronale. Ainsi, dans des cultures de cellules neuronales et le cerveau en post-mortem, la demi-vie de cinq miARN testés par Sethi *et al.* en 2009 n'excède pas 3,5 heures.

Cycle cellulaire, facteurs de croissance et activité neuronale affectent donc physiologiquement la stabilité des miARN. Des éléments agissant en *cis* ont été repérés le long du miARN : la région *seed*, la région centrale et l'extrémité 3'. Ils ne sont pas suffisants mais sont nécessaires aux interactions complexes entre les miARN et les facteurs de leur déclin, sans que l'on sache comment les facteurs agissant en *trans* accèdent à ces séquences.

#### 5.4.2. Enzymes dégradant les miARN

Chacune des extrémités du miARN étant ancrée dans des poches de liaison spécifiques d'Ago, elles doivent être relâchées pour être accessibles aux enzymes pouvant le dégrader. Ces dernières se composent d'exoribonucléases 3' → 5' et 5' → 3' (figure 33).

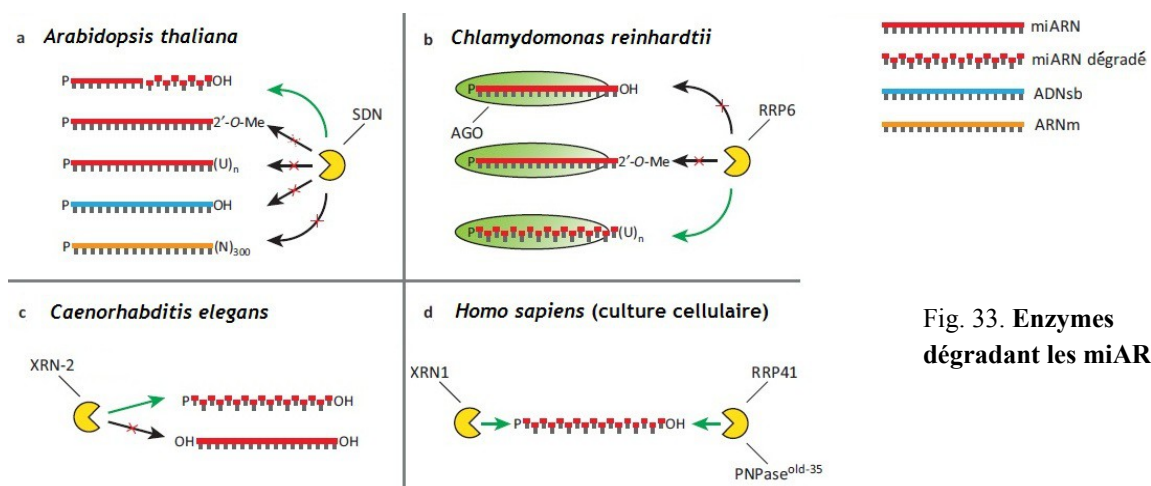


Fig. 33. Enzymes dégradant les miARN.

Fig. 33. **Enzymes dégradant les miARN.** **a** | Chez *A. thaliana*, les SND (*small RNA degrading nucleases*) dégradent les miARN contenant un groupe 3'-OH, libérant un produit de 8-9nt. Un groupe 2'-O-Me retarde la dégradation et une queue uridine rend les miARN insensibles à la dégradation. Les ADN simple brin (*ADNsb*) et les longs ARN ne sont pas ciblés par les SDN. **b** | Chez *C. reinhardtii*, la protéine RRP6 (*ribosomal RNA processing protein 6*) dégrade les miARN à queue uridine chargés dans Ago, mais pas ceux contenant un groupe OH ou 2'-O-Me à l'extrémité 3'. **c** | Chez *C. elegans*, l'exoribonucléase 2 (XRN-2) dégrade les miARN contenant un groupe 5'-monophosphate et non un groupe OH. **d** | Dans les cultures cellulaires humaines, la protéine RRP41 (*ribosomal RNA processing protein 41*) et la polynucléotide phosphorylase (PNPase<sup>old-35</sup>) dégradent certains miARN dans le sens 3' → 5' tandis que XNR-1 agit dans le sens 5' → 3'. Les flèches vertes indiquent quand la dégradation est possible, les flèches noires avec une croix rouge quand elle ne l'est pas. D'après Rüegger (2012).

### 5.4.3. Fonctions régulatrices des ARN cibles

Le degré de complémentarité entre le miARN et sa cible ne détermine pas seulement le mode de silençage de l'ARN, il joue également sur le devenir du miARN. En effet, les ARN cibles peuvent stabiliser ou déstabiliser les miARN (voir figure 34 ci-après). Lors de forte complémentarité, les miARN peuvent être déstabilisés, et leur déclin s'accompagne de l'émergence de "copies" plus longues (*tailed*) ou plus courtes (*trimmed*) des miARN originaux. Quelques mésappariements en 3' n'empêchent pas ce phénomène, contrairement à un appariement en seule région *seed*.

Par ailleurs, il arrive qu'un miARN puisse être déstabilisé par un autre miARN. Il y a formation d'un duplex par un mécanisme qui reste à déterminer (figure 34).

Enfin, certains ARNm cibles peuvent stabiliser les miARN en prévenant leur relâchement par les protéines Ago (figure 34). Cela pourrait entre autre permettre l'évolution des miARN en stabilisant des miARN\* normalement inutilisés et expliquerait pourquoi les ratios miARN/miARN\* peuvent varier dans les tissus ou au cours du développement.

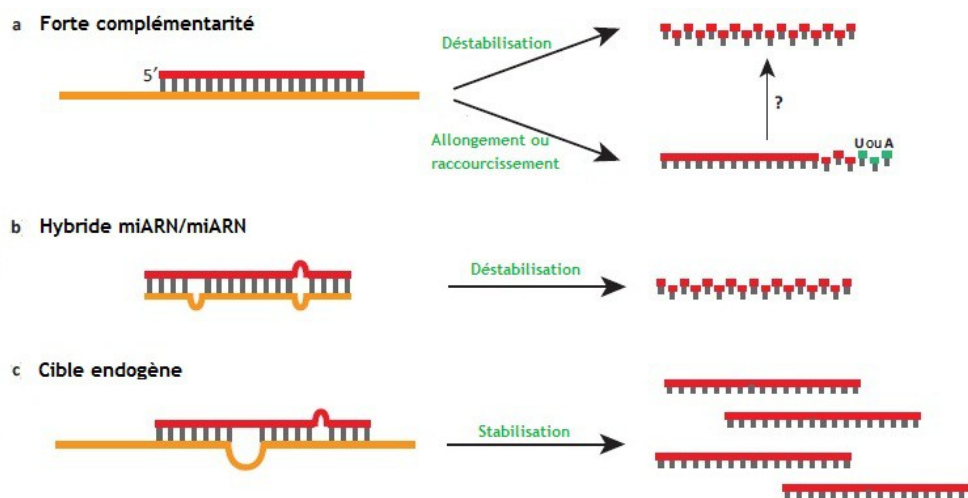


Fig. 34. **Effets des ARN cibles sur les miARN.** **a** | Une forte complémentarité entraîne une déstabilisation ou l'émergence de miARN plus longs (ajout d'uridines et adénosine) ou plus courts. **b** | Un hybride miARN/miARN entraîne la déstabilisation d'un des deux miARN. **c** | Chez *C. elegans*, les cibles artificielles ou endogènes stabilisent les miARN dans un complexe Ago-cible-miARN. D'après Rüegger (2012).



# MICROARN ET INFECTION VIRALE

## 1. Virus et microARN

### 1.1. Origine et identification des microARN viraux

En 2004, des petits ARN viraux ont été découverts dans des cellules infectées par le virus d'Epstein-Barr, un virus à ADN [Pfeffer, 2007]. Leur étude a montré qu'il s'agissait de microARN. Par la suite, des microARN ont été découverts chez d'autres herpes virus, puis d'autres familles de virus. Ainsi, les virus infectant les mammifères ont développé leurs propres miARN afin de moduler l'expression des gènes de l'hôte ou de leur propre génome.

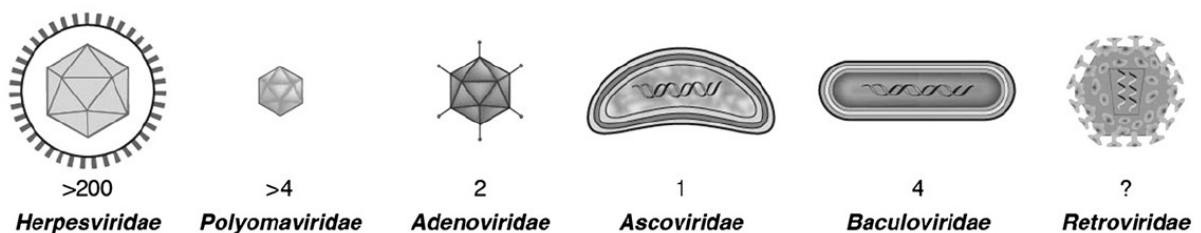


Fig. 35. Familles de virus qui produisent des microARN ou des molécules ARN-like. Le nombre indiqué sous chaque dessin correspond au nombre de pré-miARN produits. *Source : Grundhoff (2011).*

Les microARN présentent de grands avantages pour les virus. Tout d'abord, ils permettent de réprimer l'expression de certains produits cellulaires qui interfèrent avec leur cycle. Ensuite, ils occupent moins de 200nt ou 200pb du génome viral, ce qui est intéressant étant donnée sa taille restreinte. Et enfin, contrairement aux protéines virales, les microRNA ne sont pas reconnus comme des antigènes par l'organisme infecté.

Contrairement aux microARN animaux, les microARN viraux ne présentent pas de conservation avec leur hôte ou avec des virus qui ne sont pas proches dans l'évolution. De ce fait, pour identifier les microARN viraux, Pfeffer *et al.* [2005] ont développé un algorithme permettant de prédire les pré-miARN dans un génome viral et ne reposant pas sur les critères de conservation entre les espèces (tableau 7 ci-dessous). Il détermine ainsi la probabilité qu'un virus a de contenir au moins un précurseur de microARN dans son génome.



Tabl. 7. **Probabilité calculée pour un génome viral donné de contenir au moins un miARN.** Données fondées sur des prédictions bio-informatiques et adaptées de Pfeffer et al. (2005). Source : Pfeffer (2007).

Famille (sous-famille)	Genre	Espèce	Probabilité (%)
<b>Virus à ADN db</b>			
<i>Herpesviridae</i>			
<i>(Alpha-herpesviridae)</i>	Simplexvirus	HHV1	99,9
		HHV2	100
<i>(Beta-herpesvirinae)</i>	Varicellovirus	HHV3	54,7
		HHV5	99,9
	Cytomégalovirus	HHV6	84,2
		HHV7	45,8
<i>(Gamma-herpesvirinae)</i>	Lymphocryptovirus	HHV4/EBV	99,0
		Rhadinovirus	100
		HMV68	99,9
<i>Poxviridae</i>			
<i>(Chordopoxviridae)</i>	Orthopoxvirus	Virus de la vaccine	88,9
		Virus de la variole	92,1
<i>Adenoviridae</i>	Mastadénovirus	HAV A	40,6
		HAV B	46,5
		HAV C	43,7
		HAV D	67,7
		HAV E	36,8
<i>Papillomaviridae</i>	Papillomavirus	HPV18	0,90
<i>Polyomaviridae</i>	Polyomavirus	Virus BK	31,9
<b>Virus à ADN sb</b>			
<i>Parvoviridae</i>			
<i>(Parvovirinae)</i>	Dépendaovirus	AAV2	5,60
<b>Rétrovirus à ADN ou ARN</b>			
<i>Hepadnaviridae</i>	Orthohépadnavirus	HBV	1,40
<i>Retroviridae</i>	Lentivirus	HIV1	2,50
<b>Virus à ARN sb (-)</b>			
<i>Filoviridae</i>	Martburg-like	Virus de Martburg	20,8
		Virus Ebola	18,2
<i>Paramyxoviridae</i>			
<i>(Paramyxovirinae)</i>	Morbillivirus	Virus de la rougeole	26,9
<b>Virus à ARN sb (+)</b>			
<i>Picornaviridae</i>	Entérovirus	Poliovirus	2,00
<i>Flaviviridae</i>	Flavivirus	YFV	24,1
		Hépacivirus	HCV
<i>Togaviridae</i>	Alphavirus	Virus sindbis	7,30

Ces données montrent que les virus à ADN double brin ont la plus grande probabilité d'exprimer au moins un microARN. Une exception est le virus du papillome humain, pour lequel la probabilité nulle calculée a été confirmée par Cai *et al.* en 2006 puisqu'ils ont montré que le HPV31 n'exprimait pas de microARN, que ce soit en phase de latence comme en phase de production virale active. Par ailleurs, les microARN agissant au niveau des ARNm et non des protéines, les effets pertinents pour le virus peuvent apparaître après

plusieurs heures voire jours, le temps que les protéines subissent un déclin normal. Ainsi, les virus pour qui la synthèse de miARN semble la plus intéressante sont les virus à ADN qui établissent des infections latentes ou persistantes [Cullen, 2006].

Les plus faibles probabilités chez les virus à ARN peuvent s'expliquer par le fait que la plupart de ces virus sont restreints au cytoplasme, alors que la maturation des microARN comprend une étape nucléaire essentielle. De plus, le clivage de pri-miARN, et donc du génome viral, par Drosha entraînerait la destruction du virus à ARN. Ces probabilités n'étant cependant pas nulles, outre la possibilité de faux positifs, elles révèlent certainement l'existence de voies alternatives pour la synthèse de certains microARN viraux. Les fortes probabilités calculées pour les Orthopoxvirus, virus à ADN double brin dont le cycle est cytoplasmique, nous confortent également dans cette idée. Shapiro *et al.* [2012] ont d'ailleurs démontré que l'infection par des virus cytoplasmiques entraîne une migration forcée de Drosha dans le cytoplasme au profit du virus, sans effet sur le profil des miARN cellulaires.

On peut se demander si les virus à ARN à cycle nucléaire, tels que les Orthomyxovirus, sont également capables de produire leurs propres miARN. Varble *et al.* [2010] ont montré qu'un virus de l'influenza, auquel ils ont ajouté la séquence du miR-124 cellulaire, produit ce miARN sans que cela soit préjudiciable à sa réplication. Quant aux rétrovirus, une étude récente [Kincaid *et al.*, 2012b] a révélé que le virus de la leucémie bovine encodait un cluster de miARN transcrit par une ARN polymérase III, produisant directement des pré-miARN sans intervention de Drosha et évitant ainsi la destruction du génome viral. Cela reste cependant une exception car aucun miARN ne semble être produit par le virus de l'immunodéficience humaine, ni par le virus T-lymphotropique humain [Lin et Cullen, 2007].

## **1.2. Nomenclature des microARN viraux**

Contrairement aux microARN animaux, il n'y a pas de nomenclature à proprement parler pour les microARN viraux. Cependant, leur dénomination doit toujours inclure le locus dont le miARN est dérivé [Griffiths-Jones *et al.*, 2008]. Par ailleurs, « miR » est généralement précédé de lettres permettant l'identification du virus.

Exemple : ebv-miR-BART1 pour le locus BART du virus Epstein-Barr

## **2. MicroARN viraux**

La plupart des virus à ADN, mais aussi quelques virus à ARN, encodent donc des microARN dont les fonctions semblent particulièrement importantes pour le cycle viral. Il ne paraît pas

étonnant, étant donné qu'ils exploitent plusieurs composants de la machinerie cellulaire pour leur propre cycle, que ces virus emploient eux aussi cette stratégie de silençage post-transcriptionnel en produisant leurs propres miARN. Depuis leur découverte en 2004, de nombreuses études ont été menées afin de connaître la génomique, la biogenèse, les modes d'action et les fonctions de ces microARN viraux.

## 2.1. Gènes à l'origine des microARN viraux

Les gènes à microARN viraux se trouvent sur des unités de transcription simples ou organisées en *cluster*. Ils peuvent être exoniques, introniques ou encore intergéniques ; on en trouve même certains dans les ORF (cadres ouverts de lecture). La localisation des gènes à miARN dans le génome de certains herpes virus est représentée en figure 36 ci-après.

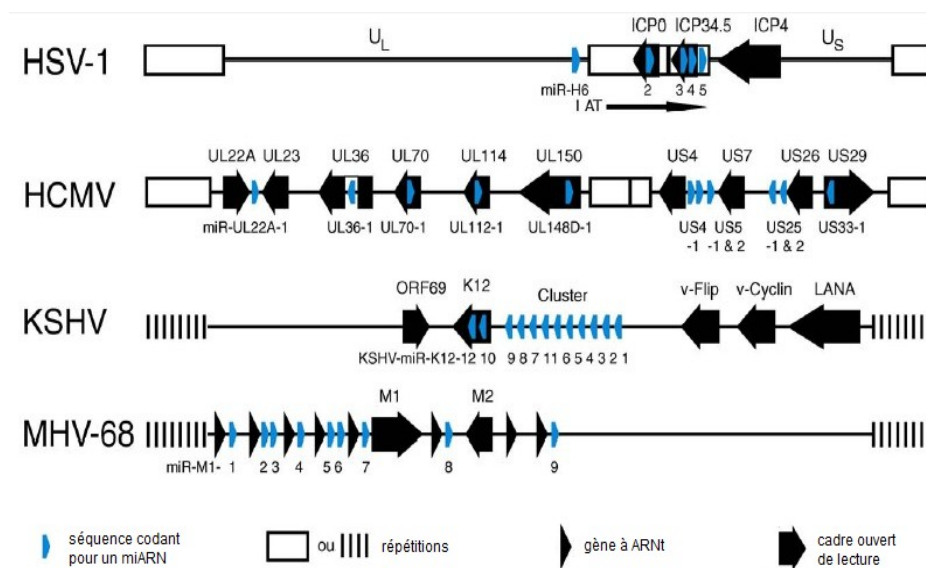


Fig. 36. Localisation des gènes à miARN dans le génome des herpes virus. Les génomes représentés sont ceux d'alpha-herpes virus (HSV-1), bêta-herpes virus (HCMV) et gamma-herpes virus (KSHV, MHV-68). Ils contiennent de nombreux miARN à localisations diverses. *Source : Boss (2009).*

Lorsqu'ils sont organisés en cluster, les pré-miARN peuvent contenir plusieurs miARN. Cela explique qu'il puisse y avoir plus de miARN matures que de pré-miARN, comme on peut le constater d'après les données du tableau 8 ci-dessous.

Tabl. 8. MicroARN ou molécules ARN-like produits par les virus. D'après Grundhoff (2011).

Famille ou sous-famille	Espèces	pré-miARN	miARN matures
<i>Alpha-herpesvirinae</i>	Herpès simplex virus 1	16	25
	Herpès simplex virus 2	18	24
	Herpès B virus	3	3
	Herpès virus de la dinde	17	28
	Virus de la laryngotrachéite infectieuse	7	10
	Herpès virus bovin de type 1	10	12
	Virus de la maladie de Marek sérotype 1	14	26
	Virus de la maladie de Marek sérotype 2	18	36

Famille ou sous-famille	Espèces	pré-miARN	miARN matures
<i>Beta-herpesvirinae</i>	Cytomégalovirus humain	11	17
	Cytomégalovirus de la souris	18	28
<i>Gamma-herpesvirinae</i>	Virus d'Epstein-Barr	25	44
	Rhesus lymphocryptovirus	36	50
	Herpès virus du sarcome de Kaposi	12	25
	Rhesus monkey rhadinovirus	15	25
	Mouse gamma herpesvirus 68	15	28
<i>Polyomaviridae</i>	Virus Simien 40	1	2
	JC polyomavirus	1	2
	BK polyomavirus	1	2
	Mouse polyomavirus	1	2
	Merkel cell polyomavirus	1	2
	SA12	1	2
<i>Ascoviridae</i>	Heliothis virescens ascovirus	1	1
<i>Baculoviridae</i>	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrosis virus	4	4
<i>Adenoviridae</i>	Adénovirus humains sérotypes 2 et 5, autres ?	2*	3

\*Molécules ARN-like.

La localisation génomique des miARN viraux est très importante, et liée à leur fonction dans une certaine mesure. Par exemple, certains miARN d' $\alpha$ -herpès virus (HSV-1, MDV-1 et 2) et de  $\gamma$ -herpès virus (KSHV) sont proches, voire dans, des transcrits associés à la latence.

Tabl. 9. Exemples de localisations génomiques de microARN viraux. D'après Ghosh (2009).

Famille	Espèces	miARN	Localisation génomique	Fonctions
Alpha-herpès virus	Herpès simplex virus 1 (HHV <sub>1</sub> )	hsv1-miR-H1	450pb en amont du TSS de LAT	Maintien de la latence
	Herpès simplex virus 2 (HHV <sub>2</sub> )	hsv2-miR-I	Exon 2 de LAT	Contrôle de la réplication virale
	Virus de la maladie de Marek	mdv1-miR-M (1-13)	Cluster dans les LAT et MEQ	Anti-apoptotique, transformation néoplasique
Bêta-herpès virus	Cytomégalovirus humain	hcvm-miR-US4, hcmv-miR-UL70, hcmv-miR-US33...	Intergéniques et introniques	Inhibiteurs de la réponse immunitaire, réplication virale
	Cytomégalovirus de la souris	mcmv-miR-M23-1, mcmv-miR-m01-3, mcmv-miR-88-1...	Cinq régions génomiques et trois <i>cluster</i>	Infection virale et latence
Gamma-herpès virus	Herpès virus du sarcome de Kaposi	kshv-miR-K12-(1-19), kshv-miR-K12-10...	Région intergénique et gène Kaposin	Prolifération, angiogénèse...
	Virus Epstein-Barr	ebv-miR-BART (1-20), ebv-miR-BHRF1...	Vingt dans les introns de BART, trois dans BHRF1	Tumorigénèse entre autres
	Gamma-herpès virus 68 de la souris	mghv-miR-M1-(1-9)	Intergéniques et <i>cluster</i>	

TSS, *transcription start site*, site d'initiation de la transcription. LAT, *latency-associated transcript*, transcrit associé à la latence. MEQ, *Marek's EcoRI-Q-encoded protein*, protéine bloquant l'apoptose. ORF, *open reading frame*, cadre ouvert de lecture. BART, *BamA rightward transcripts*. BHRF1, *BanH1 rightward open reading frame*, régulateur de l'apoptose. TAR, *trans-acting responsive*.

## 2.2. Synthèse des microARN viraux

La majorité des microARN viraux suivent le même procédé de synthèse que celui des microARN des eucaryotes. Il existe cependant des variations dans ce procédé et des voies alternatives qu'empruntent certains cas particuliers.

### 2.2.1. Synthèse classique

Les gènes sont tout d'abord traduits par une ARN polymérase II le plus souvent, bien qu'il existe des cas de transcription par l'ARN polymérase III, créant ainsi un pri-miARN dont la longueur peut varier de 200nt à plusieurs milliers. L'étape suivante consiste en la reconnaissance et le clivage nucléaire du pri-miARN par la RNase III Drosha, qui agit en association avec la protéine DGCR8 chez les vertébrés. Cela génère un pré-miARN en tige-boucle, qui est transporté dans le cytoplasme via exportin-5 et Ran-GTP. Le pré-miARN est relâché suite à l'hydrolyse du GTP, puis clivé par la RNase III Dicer qui agit de concert avec son cofacteur TRBP. La boucle terminale est supprimée, générant un duplex intermédiaire. Dicer facilite l'assemblage du brin guide dans le complexe RISC composé entre autres de protéines Ago et GW182. Le brin passager est dégradé.

Le traitement des miARN viraux et des miARN cellulaires se ferait donc par le même chemin, schématisé par la figure 37 ci-dessous, grâce à la machinerie cellulaire.

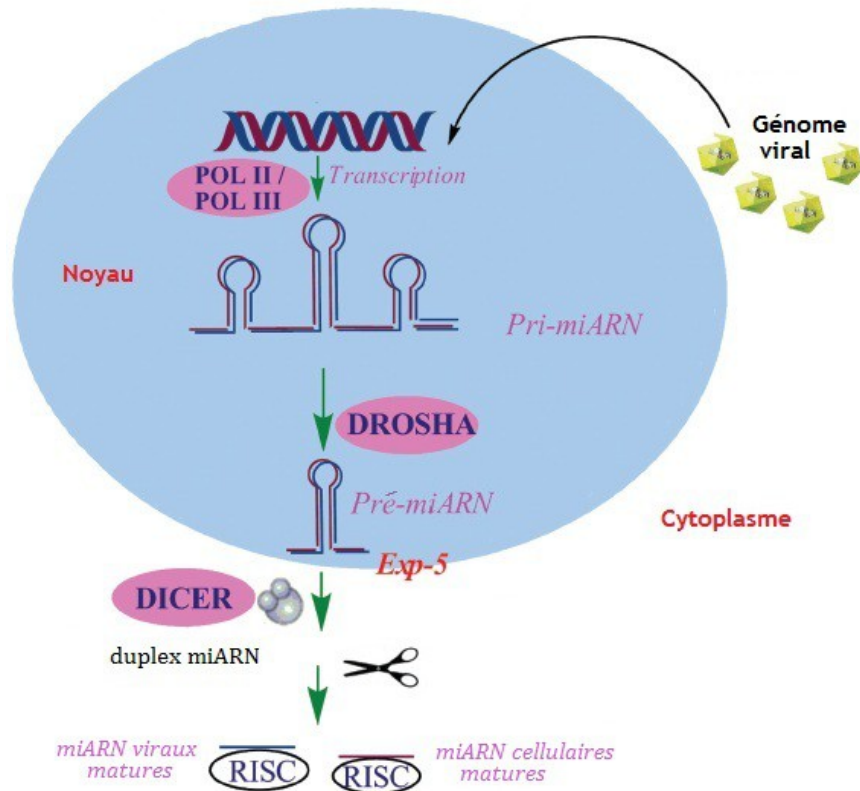


Fig 37. **Biogenèse classique des microARN viraux.** La synthèse et maturation des microARN viraux (violet) suit celle des microARN cellulaires (bleu), les virus exploitant la machinerie cellulaire à leur propre fin. D'après Ghosh (2009).

Dans le cas particulier des gènes à miARN qui se trouvent dans des ORF, il y a une "adaptation" de la maturation. En effet, cette séquence d'ARN étant nécessaire à la synthèse des protéines, l'action de Drosha et la traduction doivent s'exclure mutuellement. C'est ce qui arrive par exemple pour des miARN de l'herpès virus associé à la maladie de Kaposi (KSHV, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*). Ainsi, kshv-miR-K10 et kshv-miR-12 sont modulés de telle sorte qu'un certain pourcentage d'ARNm quitte le noyau avant que le clivage par Drosha n'ait lieu [Cai *et al.*, 2005] et puisse produire des protéines.

### 2.2.2. Voies alternatives

Il existe plusieurs cas pour lesquels le clivage par Drosha n'a pas lieu. Un premier cas est celui des mirtrons viraux, appelé virtrons, pour lesquels l'épissage engendre directement une structure en épingle pouvant s'apparenter au pré-miARN [Shapiro *et al.*, 2010].

Un second cas est lorsque le substrat ne remplit pas les conditions nécessaires à son clivage par Drosha, notamment la présence d'une tige d'environ 3 tours d'hélice ( $\approx 33$ pb). Prenons l'exemple du TAR (*trans-acting responsive*), un ARN localisé à l'extrémité 5' de tous les transcrits du virus de l'immunodéficience humaine 1 (HIV-1). Sa structure est semblable à celle de pré-miARN humain let-7a-3, mais il est trop court pour subir l'action de Drosha [Ouellet *et al.*, 2008]. Ce serait donc un moyen pour les virus à ARN de contourner une étape de la maturation des miARN qui les détruirait.

Un dernier cas est lorsque les miARN sont transcrits par l'ARN polymérase III, comme chez le gamma-herpès virus-68 murin. Il y a alors formation d'un intermédiaire particulier, composé d'une structure en épingle apparentée au pri-miARN et attachée à l'extrémité 3' d'un ARN de transfert (ARNt). La libération du pri-miARN se fait suite à l'action d'une endonucléase appelée tRNase Z [Cullen, 2011], puis la maturation suit un cours classique.

### 2.3. Modes d'action et cibles des microARN viraux

A l'instar des microARN des plantes et de certains microARN animaux, quelques microARN viraux se lient à l'ARNm-cible avec une parfaite complémentarité. Ils entraînent alors un clivage spécifique et irréversible dudit ARNm.

Cependant, la liaison est le plus souvent imparfaite, généralement sur la région 3' non traduite, et aboutit alors à une diminution de la production des protéines codées par l'ARNm. Ce résultat est généralement dû à une inhibition de la traduction par des mécanismes similaires à ceux des miARN animaux : inhibition de l'initiation ou de l'élongation, déadénylation, séquestration dans des corps cytoplasmiques, etc. (figure 38 ci-dessous).

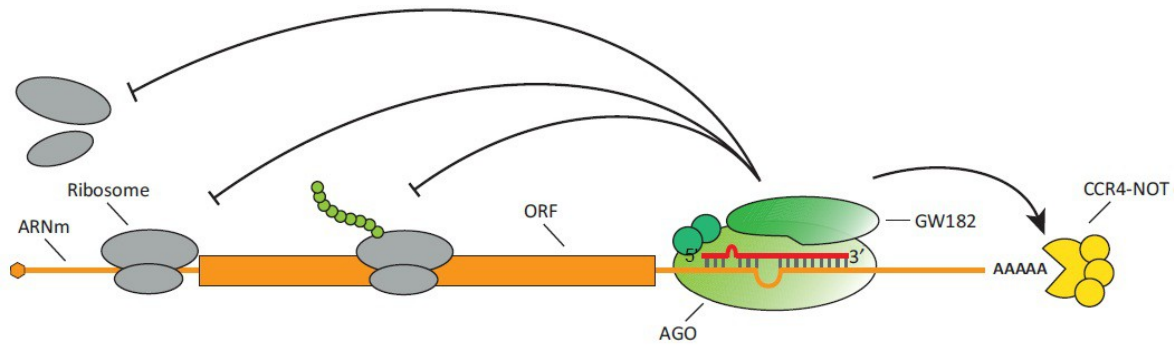


Fig. 38. **Modes d'action des miARN lors d'hybridation imparfaite.** L'ARNm ciblé par le miRISC subit une répression de sa traduction, principalement par inhibition de l'initiation, et/ou une dégradation suite à une déadénylation par le complexe CCR4-NOT et un retrait de la coiffe (non montré). L'élongation peut être ralentie ou inhibée suite à un décrochage prématuré du ribosome. *D'après Rüegger (2012).*

Certains miARN, comme miR-US52-1 du cytomégalo virus humain, ciblent de multiples sites en région 5'NC des ARN [Grey *et al.*, 2010] et non en région 3'NC.

Il paraît évident que la plupart des miARN viraux ciblent des ARNm cellulaires. Cependant, ils peuvent également cibler des ARNm viraux. Chez les virus à ADN double brin, ces ARNm sont transcrits depuis le brin directement opposé au miARN. Etant parfaitement complémentaires, l'action du miRISC résulte en un clivage de l'ARNm. C'est le cas par exemple d'un miARN du virus simien 40 qui s'hybride à un ARNm encodant des antigènes viraux. Il n'a donc pas d'effet sur la réplication du virus mais protège les cellules infectées de la destruction par les lymphocytes cytotoxiques T spécifiques de ces antigènes [Sullivan *et al.*, 2005]. La figure 39 ci-dessous illustre les possibles mécanismes d'action des miARN viraux sur des transcrits viraux mais aussi cellulaires.

Fig. 39. **Possibles mécanismes d'action des miARN viraux.**

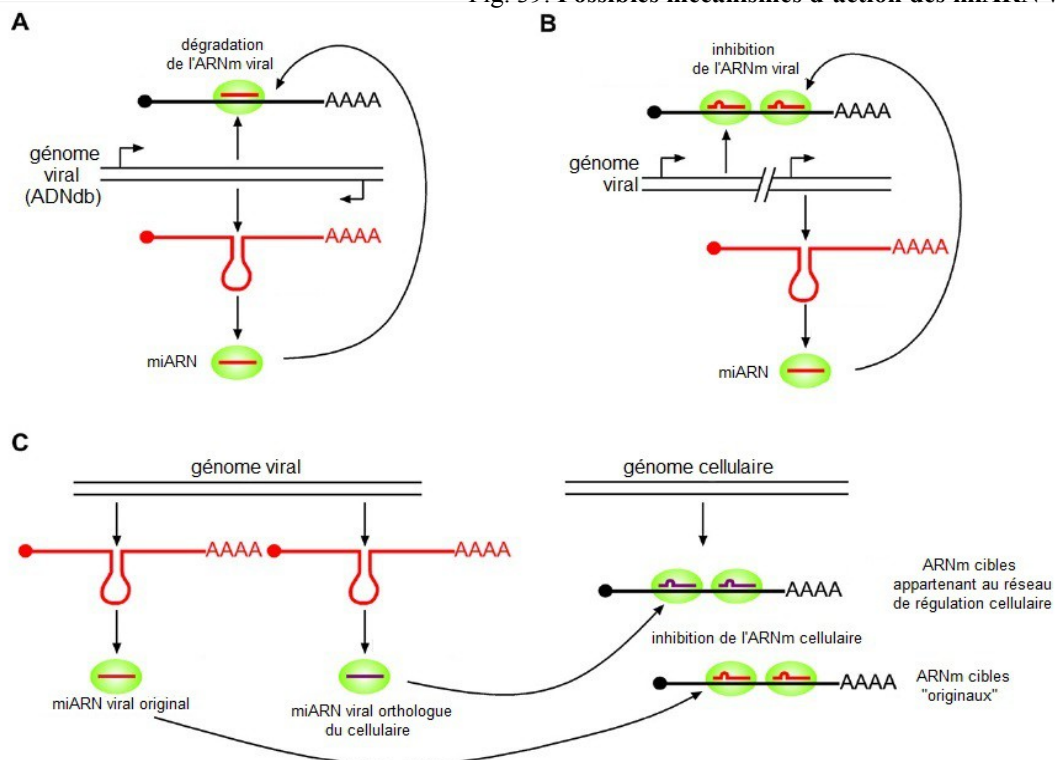


Fig. 39. **Possibles mécanismes d'action des miARN viraux.** **A** | Les miARN de virus à ADNdb peuvent cibler des transcrits viraux issus du brin directement opposé, ce qui entraîne une dégradation par le miRISC car l'hybridation est parfaite. **B** | Les miARN viraux peuvent inhiber la transcription d'ARNm viraux avec hybridation imparfaite. **C** | Les miARN viraux peuvent interagir avec les ARNm de la cellule hôte ou fonctionner comme des orthologues de miARN cellulaires et donc inhiber les ARNm cibles de ces miARN de la cellule hôte. ADNdb, ADN double brin. *D'après Gottwein (2008).*

## 2.4. Fonctions des microARN viraux

Les microARN peuvent être regroupés en deux classes : ceux analogues à des miARN cellulaires, et ceux qui sont spécifiques du virus. Cela leur permet d'assumer diverses fonctions dont certaines sont citées dans le tableau 10 ci-dessous.

Tabl. 10. **Exemples de fonctions de microARN codés par des virus.** *Source : Lamoril (2010)*

MicroARN	Virus	Fonction (exemples)
miR-UL112	Cytomégalovirus	Inhibe la protéine hôte MICB induisant une résistance à l'action des lymphocytes NK
miR-K12-11	Herpès virus du sarcome de Kaposi	Action sur de nombreux ARN impliqués dans l'apoptose et la réponse immunitaire innée
miR-BART2	Virus d'Epstein-Barr	Clivage du transcrit viral BALF5 qui code pour la polymérase virale

Une partie des miARN viraux partage la même région *seed* que des miARN cellulaires, et certains virus régulent négativement des transcrits via la même région-cible que leur miARN cellulaire homologue. Mimer ainsi les miARN cellulaires permet aux ARN viraux de potentiellement réguler des centaines de transcrits-cibles des miARN cellulaires, ce qui permet aux virus d'accéder à de multiples fonctions. Cette coïncidence de région *seed* avec les miARN cellulaires ne concernerait cependant que 15% environ des miARN viraux [Kincaid et Sullivan, 2012b]. D'une manière générale, il n'y a pas conservation des miARN viraux avec leur hôte ou avec des virus qui ne sont pas proches dans l'évolution.

Du fait de la découverte relativement récente de ces miARN, du manque de modèles animaux et de cette absence de conservation entre les miARN viraux humains et les miARN viraux d'animaux non primates, leur fonctionnement n'est pas très bien connu mais il peut se grouper en grandes catégories [Kincaid et Sullivan, 2012b].

### 2.4.1. Longévité accrue des cellules infectées

Prévenir la mort cellulaire est un avantage évident pour les virus dont le cycle comprend des phases lytiques et des phases de latence. Or les miARN cellulaires jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, certains étant même impliqués dans la régulation



de la mort cellulaire [Subramanian et Steer, 2010]. Plusieurs virus produisent donc des miARN qui ciblent des transcrits cellulaires pro-apoptotiques, prévenant ainsi l'apoptose.

Par exemple, dans le cas du KSHV, le miARN miR-K12-10a cible un récepteur nécessaire à l'initiation de l'apoptose, le TWEAKR (*tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis receptor*). L'activation de caspase, une cystéine-endoprotéase qui induit la plupart des évènements protéolytiques de l'apoptose, par le TWEAK et l'expression d'interleukines pro-inflammatoires sont diminuées, le miARN empêche ainsi la mort cellulaire programmée [Abend *et al.*, 2010]. Trois autres miARN de KSHV, miR-K12-1, 3 et 4-3p, ciblent plus précisément la caspase 3, ils agissent donc sur un effecteur de la phase d'exécution de l'apoptose [Suffert *et al.*, 2011].

Par ailleurs, trois herpès virus humains produisent des miARN qui inhibent l'expression du gène cellulaire BclAF1 pro-apoptotique. Ces miARN utilisent différents sites d'hybridation, ce qui indique que BclAF1 doit être important pour le cycle de ces virus et que des miARN viraux peuvent avoir des cibles communes sans que des sites conservés ne soient nécessaires [Kincaid et Sullivan, 2012b]. Etant donnée sa région 3'NC particulièrement longue (> 4Kb), BclAF1 pourrait aussi être un transcrit très sujet à la régulation par les miARN du fait de l'abondance ou de la composition de cette région non traduite.

Nombre de virus connus pour produire des microARN sont associés à de la tumorigenèse, cette dernière étant une malheureuse conséquence du besoin de ces virus d'altérer le cycle cellulaire, prévenir l'apoptose et échapper au système immunitaire pour survivre. Ainsi, le virus 1 de la maladie de Marek (MDV1) et KSHV, tous deux associés à des tumeurs, encodent des miARN analogues au miR-155 cellulaire. Or ce dernier, lorsque son expression est altérée, joue un rôle dans l'oncogénèse. miR-K12-11, l'analogue de miR-155 chez KSHV, partage des cibles qui se chevauchent avec celle du miARN cellulaire [Gottwein *et al.*, 2007].

Un autre exemple est celui de miR-29, un miARN cellulaire qui fonctionne soit comme un oncogène soit comme un suppresseur de tumeur selon le contexte. Plusieurs virus encodent des miARN analogues à ce miARN cellulaire, avec des régions *seed* similaires. Les miARN produits par des virus oncogènes peuvent donc contribuer à la survie des cellules infectées ainsi qu'à la tumorigenèse [Kincaid et Sullivan, 2012b].

#### 2.4.2. Echappement à la réponse immunitaire

En théorie, les miARN viraux peuvent contribuer à l'échappement à la réponse immunitaire de façon indirecte en diminuant le taux de protéines virales et donc l'antigénicité, et de façon directe en supprimant des composants de la réponse immunitaire. Cet échappement est

notamment essentiel aux virus à infection persistante, et il se fait principalement au niveau de la médiation cellulaire qui est primordiale pour l'élimination des cellules infectées.

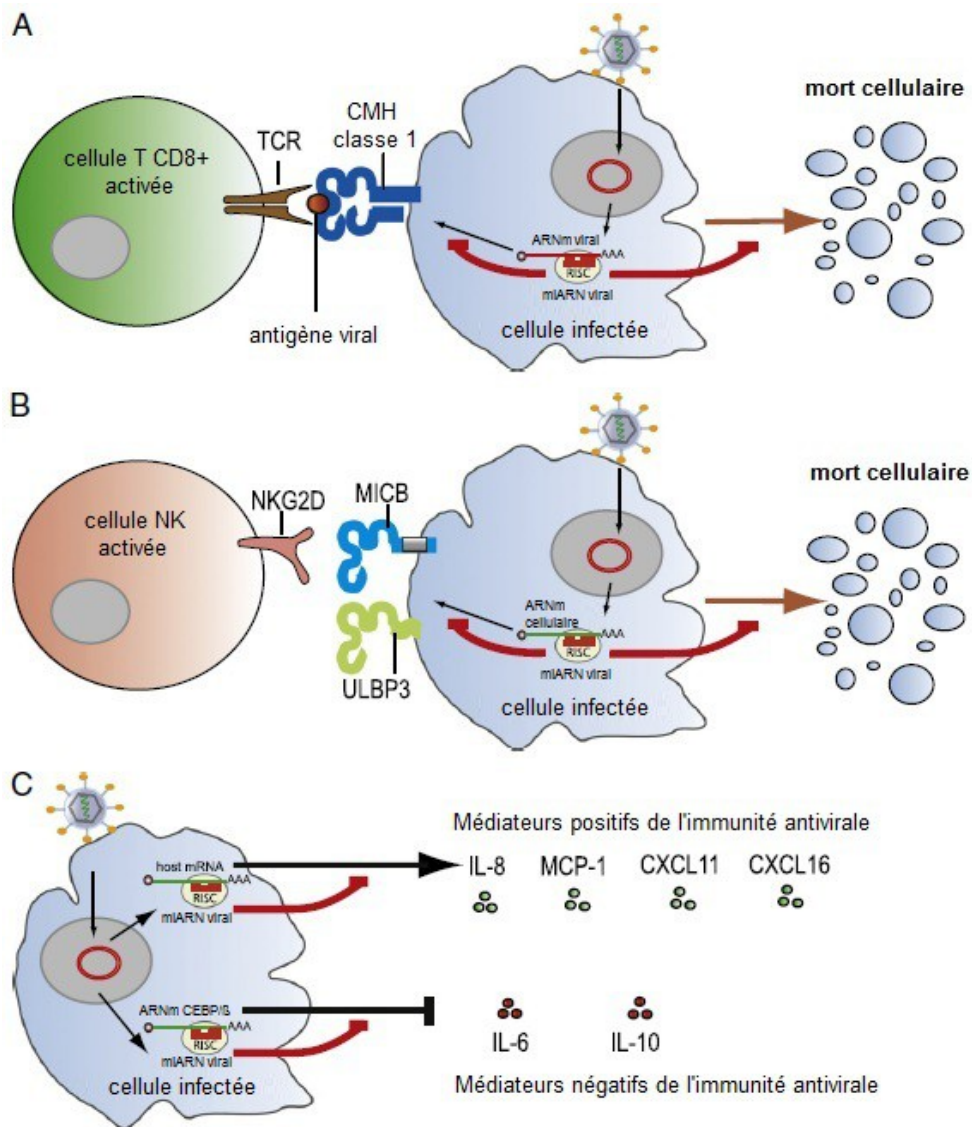


Fig. 40. **Inhibition de l'immunité à médiation cellulaire par les miARN viraux.** Elle se fait notamment en modulant la reconnaissance et l'activité des effecteurs cellulaires. **A** | L'activation des cellules T cytotoxiques est initiée quand le récepteur (TCR) des cellules T-CD8+ reconnaît des peptides viraux antigéniques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1 à la surface des cellules infectées. Les miARN viraux peuvent bloquer cette initiation en inhibant l'expression des peptides viraux avant qu'ils ne soient présentés. **B** | L'action des cellules *natural killer* (NK) sur les cellules infectées est activée lorsqu'un récepteur d'activation (NKG2D) se lie à des ligands (MICB ou ULBP3) exprimés par ces cellules infectées. Les miARN viraux peuvent bloquer cette étape en inhibant l'expression des ligands. **C** | Les miARN viraux peuvent aussi réguler l'activité des leucocytes impliqués dans la réponse immunitaire en inhibant la production des cytokines qui promeuvent l'immunité anti-virale ou en induisant la production de cytokines qui au contraire peuvent inhiber l'immunité anti-virale. *D'après Boss (2011).*

A ce jour, seules des cibles de miARN des herpès virus et polyomavirus ont été décrites. Elles peuvent être cellulaires comme viraux, et concernent essentiellement l'immunité à médiation cellulaire et la latence. Ces deux phénomènes, ainsi que l'apoptose, sont étroitement liés, l'action des miARN peut donc avoir de formidables conséquences sur le devenir du virus.

### 2.4.3. Régulation du déclenchement du cycle lytique

Un mécanisme d'évasion du système immunitaire employé par tous les herpès virus est la latence, durant laquelle seul un faible nombre de gènes, dont les miARN, est exprimé. Le maintien de cette latence nécessite la suppression des composants viraux comme cellulaires qui peuvent déclencher la réactivation du cycle. Un avantage majeur des miARN viraux est que, contrairement aux protéines virales qui peuvent susciter de fortes réponses immunitaires, ils sont non immunogènes car impossibles à distinguer des miARN cellulaires.

Les premières preuves du rôle des miARN viraux dans ce maintien de la latence ont été données par deux études indépendantes en 2007 [Grey *et al.*] et 2008 [Murphy *et al.*]. Elles se sont intéressées à miR-UL112-1, un miARN du cytomégalo virus humain (HCMV), qui a trois cibles validées. Parmi celles-ci se trouve le gène de réponse précoce IE72 qui promeut la réplication lytique, et sa régulation se fait plutôt par inhibition que par dégradation. Par ailleurs, Grey *et al.* [2007] ont également démontré que l'expression rapide de miR-UL112-1 lors de l'infection par HCMV induit une baisse significative des niveaux d'ADN viral. Ce miARN a donc un rôle fonctionnel dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la réplication virale.

Chez KSHV, l'activateur de réplication et de transcription (RTA) est régulé par plusieurs miARN de façon directe et indirecte. Par exemple, miR-K9\* le cible directement avec un appariement 6mer de sa région *seed* tandis que miR-K5 semble réprimer son expression indirectement car la région 3'NC du RTA ne contient pas sa séquence *seed*. De nombreuses études proposent des miARN pouvant cibler le RTA et, à l'exception de miR-K9\* et miR-K7, ils diffèrent d'une étude à l'autre selon les techniques utilisées. Il est cependant évident que la régulation de la réactivation lytique par les miARN est un procédé complexe et que les miARN du KSHV tiennent bien un rôle dans l'entretien de la latence [Boss et Renne, 2011].

Les exemples de miARN impliqués dans la régulation du déclenchement du cycle lytique chez les herpès virus sont bien trop nombreux et compliqués pour être tous décrits ici, mais ceux abordés ci-dessus donnent déjà un premier aperçu des multiples possibilités. D'autres exemples seront présentés dans 5. *MicroARN et herpès virus*.

### 2.4.4. Autres fonctions

Les fonctions des miARN viraux ne se limitent pas à ces seules trois grandes catégories. En plus de cette activité de régulation en *trans*, certains miARN peuvent agir en *cis*. En effet, plusieurs virus encodent des pré-miARN ancrés en *cis* dans des transcrits viraux. C'est le cas du KSHV et de l'EBV chez lesquels cette régulation en *cis* a lieu *via* différents mécanismes.

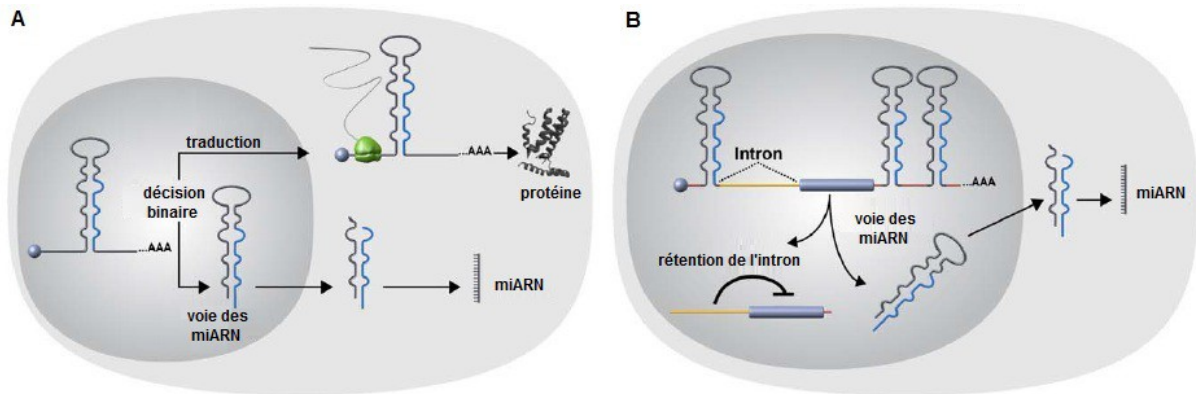


Fig. 41. **Régulation en cis des ARNm par les miARN viraux.** **A** | Exemple du gène Kaposin B (KapB) du KSHV qui fonctionne comme un ARNm encodant une protéine ou un pri-miARN encodant deux miARN. Le clivage du pri-miARN détruisant l'ARNm, ce transcrite servira soit en tant que pri-miARN, soit en tant qu'ARNm, mais jamais les deux à la fois. Durant la réplication du KSHV, le niveau de Drosha diminue, ce qui permet une production plus importante de protéines KapB. **B** | Exemple du gène BHRF1 de l'EBV qui fonctionne comme un ARNm encodant une protéine ou un pri-miARN encodant plusieurs miARN. Pendant la latence, le Microprocesseur se lie au transcrite et l'intron inhibiteur de traduction en 5' est retenu sur les transcrits. Pendant le cycle lytique, une transcription altérée aboutit à un épissage altéré et l'expression de protéines. Il y a donc une faible production de protéines en latence, augmentée lors du cycle lytique. *D'après Kincaid (2012b).*

Toutes les fonctions possibles peuvent donc être imaginées pour les miARN viraux, surtout ceux qui ne sont pas analogues de miARN cellulaires. Les futures recherches sur le sujet permettront sûrement d'agrandir encore la liste déjà bien longue des multiples mécanismes dans lesquels les miARN jouent un rôle.

### 3. Influence des virus sur les microARN cellulaires

L'expression de leurs propres microARN n'est pas la seule façon qu'ont les virus d'interagir avec la machinerie du *RNA silencing*. Ils peuvent également avoir des répercussions sur la machinerie cellulaire des microARN, et ce de plusieurs façons.

#### 3.1. Perturbation du profil d'expression des microARN cellulaires

Le profil d'expression des miARN cellulaires peut être grandement modifié lors d'infection virale, du fait à la fois des défenses antivirales et des facteurs viraux altérant l'environnement cellulaire. Ainsi, l'infection par les virus va induire la production de certains miARN cellulaires plutôt que d'autres. Par exemple, l'EBV induit la production de miR-146a dans les cellules B. Or ce miARN cellulaire a pour cibles plusieurs interférons. Au cours de la latence, l'activation de la production de miR-146a par la LMP1 (*latent membrane protein*) provoque donc une baisse de l'expression de ces interférons [Cameron *et al.*, 2008]. De plus, LMP1 induit également la production de miR-29b, un miARN qui réprime une protéine impliquée

dans la survie et la prolifération cellulaire. En conséquence, l'infection par l'EBV modifie le profil d'expression des miARN cellulaires de telle façon que les défenses anti-virales sont altérées et que la survie des cellules infectées est prolongée.

Par ailleurs, comme nous l'avons déjà évoqué en partie 2, les microARN peuvent être déstabilisés par leur cible, et cela est parfois utilisé par certains virus (figure 42).

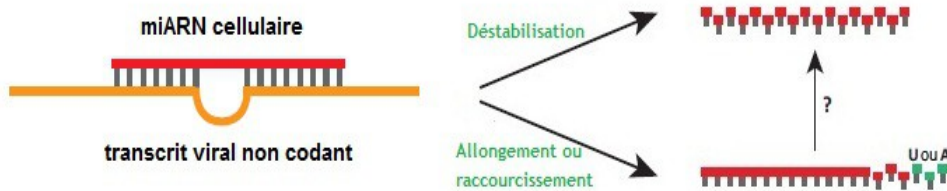


Fig. 42. **Déstabilisation des miARN cellulaires par des transcrits viraux.** Elle s'accompagne de l'émergence de miARN *tailed* ou *trimmed*. D'après Rüegger (2012).

C'est le cas par exemple de l'herpès virus saimiri (HVS) dont l'ARN non codant HSUR se lie avec complémentarité partielle à quatre miARN cellulaires. Parmi ceux-ci, miR-27 est déstabilisé par cette interaction, ce qui provoque une augmentation de sa cible, FOXO1 [Cazalla *et al.*, 2010]. Les autres miARN en revanche semblent insensibles à cette liaison, peut-être du fait d'une complémentarité moins importante. Un second exemple est celui du cytomégalovirus de la souris (MCMV), dont l'ARNm m169 contient également un site de liaison au miR-27 en son extrémité 3'NC et provoque son rapide déclin. Sa dégradation ne semble dépendre que de m169 et elle est précédée du *tailing* et *trimming*. De plus, lorsque le virus n'est plus capable de cibler miR-27, suite à une interruption ou un remplacement du site, il présente une forte atténuation de sa concentration dans différents organes [Marcinowski *et al.*, 2012], ce qui indique que la dégradation de miR-27 est importante pour une réplication efficace du MCMV.

### 3.2. Interférence avec la maturation des microARN cellulaires

Les virus peuvent également interférer avec la maturation des microARN cellulaires, notamment pour altérer les défenses anti-virales. Par exemple, des ARN non codants des adénovirus entrent en compétition avec les pré-miARN cellulaires dans le noyau pour le transport par exportin-5 et inhibent l'activité de Dicer [Andersson *et al.*, 2005]. Le virus de la vaccine empêche également l'expression de Dicer [Grinberg *et al.*, 2012].

L'interférence peut aussi se faire par production de protéines qui agissent comme des SRS (*suppressor of RNA silencing*) en inhibant la RNAi. C'est le cas du *flock house virus* (FHV), un virus d'insecte qui encode une protéine B2 qui se lie aux ARNdb, quelle que soit leur longueur, et empêche ainsi l'action de Dicer [Umbach et Cullen, 2009].

### **3.3. Saturation de la machinerie des microARN cellulaires**

Un autre moyen pour les virus d'interférer avec la machinerie des miARN cellulaires est de la saturer. Ainsi, des petits ARN viraux – ce peut être des miARN mais aussi d'autres petits ARN membres de la RNAi comme des shARN – entrent en compétition pour la maturation et l'export des miARN cellulaires, et l'assemblage des miRISC. Pour ce faire, ils peuvent par exemple sur-exprimer leurs propres miARN : c'est le cas du KSHV et du CMCV. Ils peuvent également sur-exprimer tout autre membre de la RNAi, comme les siARN dont la biogenèse ressemble fortement à celle des miARN et fait intervenir notamment Dicer et le RISC.

### **3.4. Dégradation des microARN cellulaires**

Dans le cas des *Poxviridae*, virus à ADN dont la réplication a lieu dans le cytoplasme, l'action d'une poly(A) polymérase encodée par le virus entraîne la dégradation des miARN cellulaires [Backes *et al.*, 2012]. A elle seule, la sous-unité VP55 de l'enzyme initie la polyadénylation en 3' des miARN cellulaires matures assemblés à Ago1 (ajout de 2 à 7 adénosines) et induit leur destruction. Il est à noter que les siARN, qui possèdent un groupement méthyle 2'OMe à leur extrémité, sont protégés de cette action.

## **4. Influence des microARN cellulaires sur les virus**

Les virus ont donc à leur disposition un grand panel de possibilités pour survivre, mais les cellules infectées ne sont pas en reste puisque leur propres miARN peuvent également agir sur les virus, généralement à leur désavantage mais parfois aussi à leur avantage.

### **4.1. Régulation négative**

Dans la plupart des cas où il y a régulation, les microARN cellulaires modèrent la réplication virale dans les cellules. Ainsi, miR-32, un miARN humain, inhibe la réplication du virus PFV (*primate foamy virus*) dans des cultures de cellules hépatiques en se liant à un site faiblement conservé de l'extrémité 3' de génome viral [Lecellier *et al.*, 2005]. Par ailleurs, plusieurs miARN humains (miR-29, miR-149, miR-378 et miR-324-5p) peuvent avoir pour cible des gènes cruciaux du génome du VIH-1 [Hariharan *et al.*, 2005]. Ces gènes codent pour des composants essentiels à l'infection et la réplication du virus, et leur répression par les microARN cellulaires peut être fatale au virus. Il reste cependant à valider ces cibles par des expérimentations *in vivo*. Enfin, l'action anti-virale des miARN cellulaires peut aussi être indirecte, en réprimant des facteurs cellulaires impliqués dans la réplication et/ou la pathogénicité virales.

Il est à noter que si les miARN cellulaires sont hautement conservés et évoluent lentement, les virus eux évoluent très rapidement et peuvent échapper à cette régulation négative. Prenons par exemple le cas de miR-196 et miR-448, des miARN conservés chez plusieurs espèces qui inhibent la réplication du virus de l'hépatite C (HCV). Leur région *seed* est restée la même au fil du temps, alors que les virions du HCV présentent une grande hétérogénéité de séquence au sein d'un même hôte du fait de l'ARN polymérase encodée par le virus qui n'a pas d'action correctrice. Ainsi, un unique mésappariement, en particulier G:U, dans la région *seed* des miARN réduit fortement la répression : une simple mutation dans les régions cibles du génome du HCV suffit donc à rendre le virus résistant à cette régulation [Mahajan *et al.*, 2008].

#### **4.2. Régulation positive**

Il arrive dans de rares situations que des miARN cellulaires spécifiques facilitent la réplication virale au lieu de la combattre. C'est le cas de miR-122, un miARN cellulaire spécifique du foie jouant un rôle prépondérant dans le contrôle positif de la régulation du virus de l'hépatite C (HCV) en ciblant son extrémité 5'NC [Jopling *et al.*, 2005]. Il a été démontré que l'inhibition de miR-122 réduit significativement la charge virale en HCV *in vivo*, et l'utilisation de cette observation en thérapeutique est actuellement à l'essai clinique chez les humains [Cullen, 2011]. Cependant, miR-122 est hautement exprimé dans les hépatocytes sains et ne semble pas être induit par l'infection au HCV. En revanche, dans le cas de miR-155, l'induction de son expression est critique pour l'établissement de l'infection à l'EBV et provoque des transformations oncogènes qui seront détaillées en 5.1.5.

#### **4.3. Tropisme tissulaire**

Chaque cellule différenciée exprime de multiples miARN en nombreuses copies, et le profil d'expression de ces miARN peut varier du tout au tout selon les différents tissus. Si la régulation des virus par les miARN, quand elle a lieu, est généralement négative, elle est le plus souvent absente. On pourrait donc se demander si les virus sont soumis à une pression de sélection pour éviter toute complémentarité avec des miARN de leur tissu cible. Ils conserveraient par ailleurs les régions de complémentarité avec d'autres miARN cellulaires, exprimés dans d'autres tissus. Si cela est effectivement le cas, alors les virus ont pu être sélectionnés pour éviter l'inhibition des miARN présents dans leur tissu cible tout en restant susceptibles d'être régulés par d'autres miARN lorsqu'ils infectent une cellule cible non physiologique. Ainsi, les miARN cellulaires pourraient avoir un rôle déterminant pour le tropisme tissulaire des virus.

## 5. MicroARN et herpès virus

La famille des herpès virus (*Herpesviridae*) comprend de larges virus enveloppés qui contiennent de l'ADN double-brin allant de 120 à 240 kb. Elle est subdivisée en trois sous-familles (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*) présentes chez les mammifères, les oiseaux, les poissons et les reptiles. Une particularité des herpès virus est leur capacité à établir et maintenir une infection latente tandis que leur génome contenant plus de 100 ORF se circularise et persiste en un épisome nucléaire.

De nombreux miARN sont produits au cours de la latence, phase durant laquelle seuls quelques gènes spécialisés sont exprimés. Ils permettent aux virus de contrôler les fonctions virales et cellulaires afin notamment de minimiser l'exposition de protéines virales au système immunitaire de l'organisme infecté.

Dans ce mémoire, nous allons nous intéresser tout particulièrement aux cas du virus d'Epstein-Barr et du virus de la maladie de Marek. Nous verrons leurs interactions avec les miARN cellulaires et l'utilisation de leurs propres miARN dans l'équilibre complexe entre surveillance immunitaire par les cellules et l'échappement immunitaire des virus.

### 5.1. Cas du virus d'Epstein-Barr

#### 5.1.1. Généralités sur le virus d'Epstein-Barr

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un gamma-herpès virus qui établit une infection latente dans les lymphocytes. Il est exclusivement humain et est transmis par la salive. De là, il passe dans l'épithélium de l'oropharynx, et enfin dans les cellules de la muqueuse buccale où il se réplique et est à nouveau sécrété dans la salive.

Dans la plupart des cas, l'infection par l'EBV est asymptomatique, mais le virus peut parfois induire une mononucléose infectieuse, un lymphome ou encore un carcinome. Sous certaines conditions, comme une immunodépression, le virus peut être réactivé dans les lymphocytes B infectés et induire des maladies lymphoprolifératives. Ainsi, bien que l'infection soit généralement anodine, l'EBV a des propriétés oncogènes. Selon le type de cellule et le contexte immunologique, l'EBV établit différents types de latence. Lors de l'infection primaire (figure 43 ci-dessous), le virus se propage dans les tissus lymphoïdes et entre en latence dite III (expression de protéines) dans les cellules B qu'il fait proliférer. La plupart de celles-ci sont détruites par le système immunitaire mais certaines lui échappent en réduisant l'expression des antigènes. Le virus établit alors un réservoir de génome viral dans les lymphocytes B mémoires où il n'exprime aucune protéine (latence 0) ou seulement LMP2A (*latent membrane protein 2A*, latence I). C'est la situation des porteurs sains.



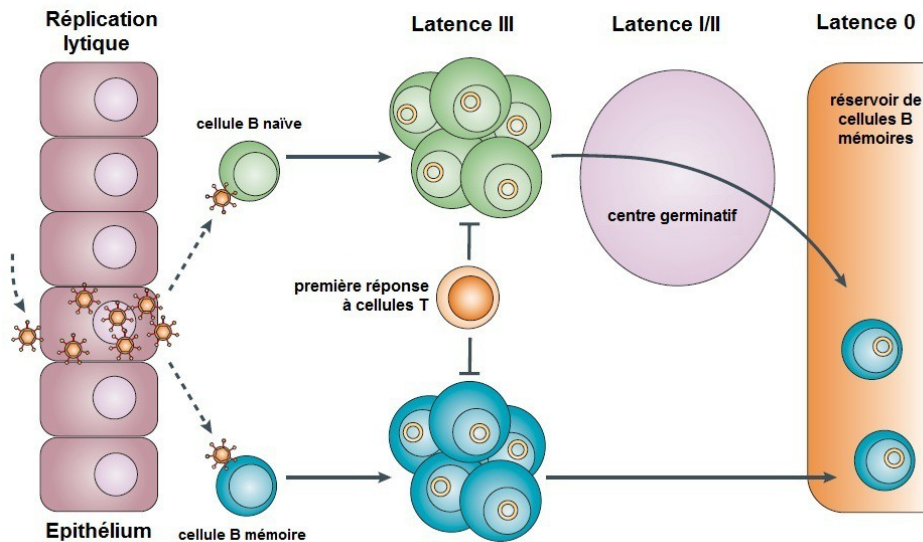
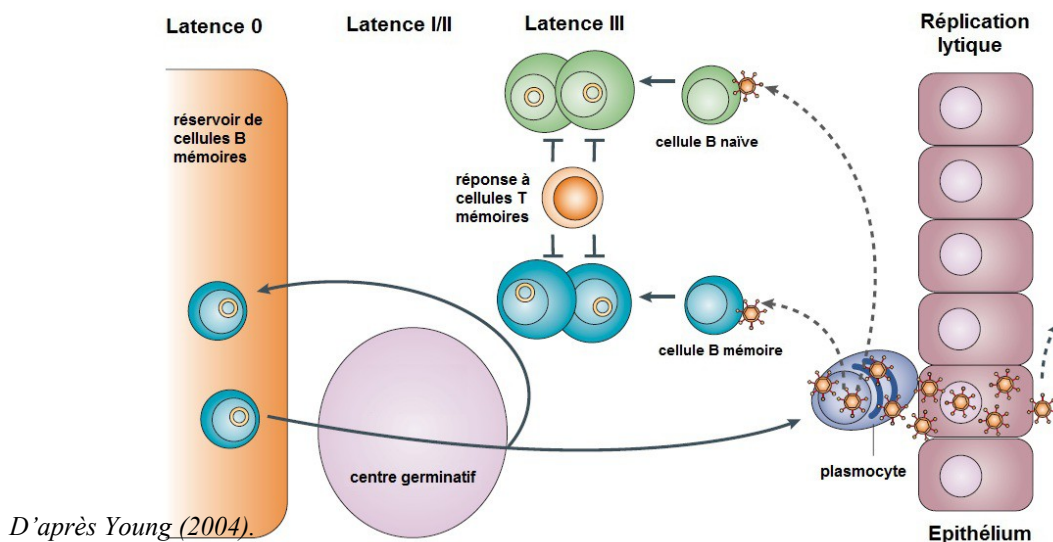


Fig. 43. Cycle de l'infection primaire par l'EBV. D'après Young (2004).

Le mécanisme exact de cette infection primaire n'est pas vraiment connu. On pense que les cellules B naïves seraient les cibles principales de l'EBV *in vivo*. La transformation virale des cellules naïves en cellules mémoires suivrait le cours physiologique, notamment par hypermutation somatique dans les centres germinatifs. Cependant, lors de mononucléose infectieuse, les cellules B infectées ne se trouvent pas dans les centres germinatifs : le virus infecterait les cellules mémoires déjà existantes.

Une fois la réponse immunitaire organisée, les cellules épithéliales infectées et les cellules B en latence III sont éliminées pour la plupart. Le reste des cellules infectées n'exprimant que peu du génome viral persiste tout au long de la vie de l'hôte. Au cours de l'infection persistante (figure 44), le réservoir de cellules B mémoires infectées est sujet à la migration et la différenciation des cellules B mémoires. Parfois, les cellules infectées sont recrutées dans les centres germinatifs, ce qui entraîne l'activation des différentes latences, puis elles peuvent réintégrer le réservoir en tant que cellules mémoires ou bien déclencher la différenciation des plasmocytes et ainsi activer le cycle lytique.

Fig. 44. Cycle de l'infection latente par l'EBV.



D'après Young (2004).

Les virions produits peuvent initier des foyers de réplication dans les cellules épithéliales permissives, permettant une légère excrétion dans l'oropharynx, ainsi que de nouvelles croissances tumorales (latence III) de cellules B naïves ou mémoires. Celles-ci peuvent réapprovisionner le réservoir mais sont souvent détruites par le système immunitaire.

### 5.1.2. microARN encodés par le virus d'Epstein-Barr

Historiquement, les premiers microARN viraux découverts sont ceux de l'herpès virus EBV, en 2004. Depuis, le virus a été extrêmement étudié, et on sait qu'il encode ses propres miARN et module l'expression des miARN cellulaires pour réguler son cycle.

L'essentiel des miARN encodés par l'EBV proviennent de deux *clusters*, représentés schématiquement dans la figure 45 ci-dessous. Trois miARN sont issus de la région ORF de BamHI H (BHRF) : miR-BHRF-1 à 3. Les miARN BART, au nombre de 17, sont dérivés d'un large intron compris dans le transcrite BamHI A (BART) avant épissage : miR-BART-1 à 17. Le reste des miARN se trouve dans la région située à droite du transcrite BART [Lin et Flemington, 2011], en un cluster et un miARN isolé.

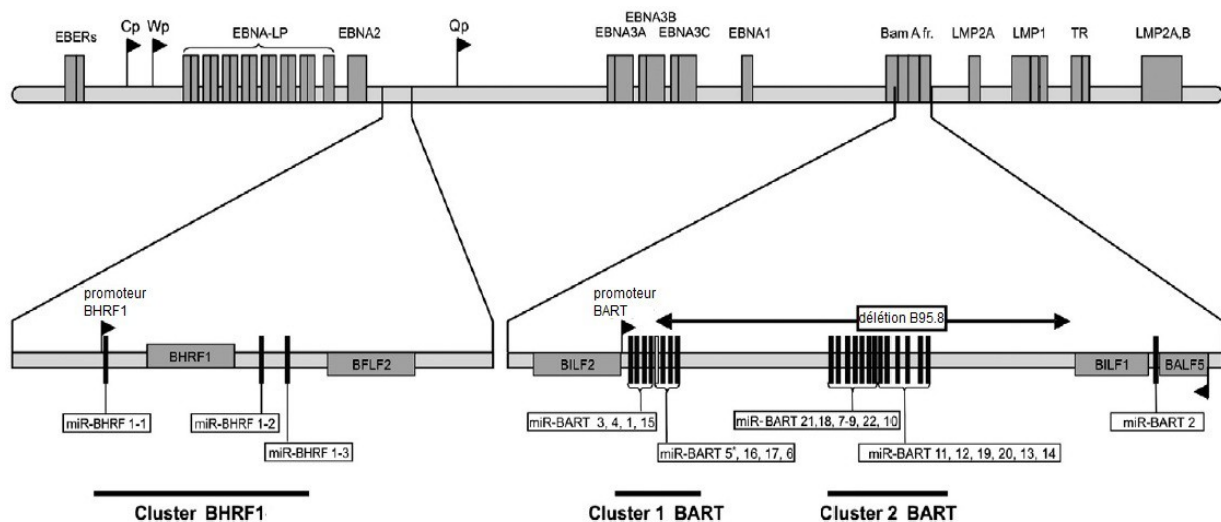


Fig. 45. Localisation des miARN dans le génome de l'EBV. La rangée du dessus représente les gènes exprimés au cours de la latence III. Les agrandissements montrent les détails des trois *clusters*. La délétion B95.8 correspond au fragment de génome qui n'existe pas chez la souche B95.8 de l'EBV. miR-BART-2 se trouve sur le brin anti-sens de l'extrémité 3'NC de BALF5. Source : Barth (2011).

### 5.1.3. Rôles des microARN encodés par le virus d'Epstein-Barr

Les miARN BART jouent un rôle primordial dans le cycle de l'EBV. De plus, nombre de miARN contribuent aux propriétés oncogènes du virus telles que l'induction de la prolifération des cellules épithéliales, la production de signaux de survie pour les cellules infectées et l'échappement au système immunitaire. Comme d'autres membres de la famille des *Herpesviridae*, EBV produit des miARN dont on pense qu'ils répriment certains gènes précoces immédiats (IE, *immediate early*) viraux, limitant ainsi le passage au cycle lytique.

Les miARN viraux sont également impliqués dans la régulation de l'expression de certains gènes de latence, comme par exemple celui de la protéine LMP1 (*latent membrane protein 1*).

**miARN de l'EBV et carcinome.** [Barth *et al.*, 2011] Plusieurs études ont tenté de dresser le profil d'expression des miARN viraux lors de tumeur primaire associée à l'EBV. Dans le cas du carcinome nasopharyngé par exemple, jusqu'à 22% des miARN retrouvés dans le tissu tumoral sont d'origine virale, avec une distribution quasi équivalente des miARN BART issus du cluster 1 et du cluster 2. Les résultats concernant le miARN viral le plus exprimé diffèrent d'une étude à l'autre car il y a une importante variation inter-tumeur de l'expression des miARN de l'EBV. En revanche, aucun miARN issu de BHRF1 n'a été détecté. Concernant le carcinome gastrique, une étude a démontré que l'essentiel des miARN viraux étaient détectables dans le tissu cancéreux, à l'exception encore de ceux du *cluster* BHRF1.

**miARN de l'EBV et lymphome.** [Barth *et al.*, 2011] Il n'y a que peu d'informations concernant l'expression des miARN viraux lors de lymphome associé à l'EBV. Dans environ 15% des cas de lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL, *diffuse large B cell lymphoma*), les cellules tumorales contiennent de l'ADN viral de l'EBV. Le profil des miARN exprimés dans les tissus infectés montre que les miARN viraux représentent approximativement 2% du total des miARN, avec une légère contribution supérieure de ceux issus du cluster 2 BART. Dans le cas du lymphome de Burkitt (LB), les cellules en latence I n'expriment pas BHRF1, alors que les cellules en latence III expriment les miARN du cluster BHRF1. Ainsi, l'expression de BHRF1 serait régulée par des promoteurs de la latence III et induite lors de l'activation du cycle lytique, tandis que les BART sont exprimés dans toutes les formes de latence. On pourrait expliquer cette faible proportion de miARN viraux lors de lymphome, que l'on retrouve aussi chez les lymphomes T/NK nasaux, par une forte expression en phase initiale d'induction de la tumeur qui serait ensuite réduite une fois la tumeur formée.

#### 5.1.4. Cibles des microARN encodés par le virus d'Epstein-Barr

Les cibles des miARN viraux peuvent être des transcrits viraux tout comme des transcrits cellulaires. Du fait de leur nombre conséquent, seuls quelques exemples seront présentés. Là encore, selon le degré de complémentarité entre le miARN et sa cible, le procédé de régulation post-transcriptionnelle sera différent.

**Cibles virales.** L'ebv-miR-BART2 se trouve sur le brin anti-sens de la région 3'NC de BALF5 qui code pour une ADN polymérase virale. La complémentarité étant parfaite, il

permet le clivage de ce site. Lors du cycle lytique, le niveau de miR-BART2 diminue, de même que le clivage de l'extrémité 3'NC de BALF5. Cependant, l'induction forcée de l'expression de miR-BART2 durant la réplication inhibe celle de BALF5 d'environ 40 à 50%, et la quantité de virus excrétée par les cellules infectées est diminuée de 20%. miR-BART2 pourrait donc inhiber la transition de la latence à la réplication [Barth *et al.*, 2008]. Les miARN issus du *cluster 1* BART, quant à eux, ciblent l'extrémité 3'NC de LMP1 et réduisent son expression [Lo *et al.*, 07]. La protéine LMP2 est elle aussi réprimée, par l'ebv-miR-BART22 [Lung *et al.*, 2009]. Les bénéfices de ces régulations négatives peuvent être doubles : cela protégerait les cellules car ces protéines sont toxiques en trop grande concentration, et cela permettrait d'échapper au système immunitaire puisque la protéine ne serait plus exprimée à la surface des cellules infectées. Un dernier exemple sera celui de miR-BART6-5p. Ce miARN viral peut réprimer plusieurs cibles : Dicer, EBNA2 – un oncogène nécessaire à la transition de la latence I/II à la latence III – et les protéines virales Zta et Rta – essentielles pour la réplication lytique – [Iizasa *et al.*, 2010]. Dans les cellules infectées en latence, le pré-miR-BART6-5p subit une édition *A-to-I* qui empêche sa prise en charge par Dicer et donc la production de miARN matures. Par ce biais, le virus peut contrecarrer les actions du miARN.

Tabl. 11. Exemples de cibles virales des miARN encodés par l'EBV. D'après Barth (2011)

MicroARN	Gène cible	Fonction
ebv-miR-BAR2	BALF5	ADN polymérase
ebv-miR-BART6	EBNA2	Transactivation
ebv-miR-BART-cluster 1	LMP1	Oncogène, signalisation cellulaire
ebv-miR-BART22	LMP2A	Signalisation cellulaire

**Cibles cellulaires.** L'extrémité 3'NC de CXCL-11/I-TAC, une cytokine de la famille des chémokine qui peut induire l'apoptose, contient un site cible de miR-BHRF1 [Pfeffer *et al.*, 2004] : ce miARN viral, exprimé lors de la latence II, permet donc une réduction de l'excrétion de cette cytokine et ainsi un évitement de la mort cellulaire programmée. Quant à miR-BART5, il cible un modulateur de l'apoptose, PUMA (*p53-up-regulated modulator of apoptosis*). La surexpression de miR-BART5 réduit donc la sensibilité des cellules aux stimuli apoptotiques, lors de carcinomes nasopharyngé et gastrique [Choy *et al.*, 2008]. Enfin, entre autres exemples, la protéine pro-apoptotique Bim est une cible pour les miR-BART cluster 1 [Marquitz *et al.*, 2011], miR-BART6 cible Dicer [Iizasa *et al.*, 2010], et miR-BART3 cible une protéine responsable du transport intracellulaire, de la régulation de l'immunité innée et de la production de cytokine [Dolken *et al.*, 2010]. Le tableau 12 ci-dessous présente les cibles cellulaires de sept miARN encodés par l'EBV.

Tabl. 12. Exemples de cibles cellulaires des miARN encodés par l'EBV. D'après Barth (2011)

MicroARN	Gène cible	Fonction
ebv-miR-BHRF1-3	CXCL-11/I-TAC	Echappement immunitaire
ebv-miR-BART5	PUMA	Inhibition de l'apoptose
ebv-miR-BART-cluster 1	Bim	Echappement immunitaire
ebv-miR-BART6	Dicer	Réduction des niveaux de miARN
ebv-miR-BART3	IPO7	Transport de protéine intracellulaire
ebv-miR-BART16	TOMM22	Transport de protéine intracellulaire
ebv-miR-BART2-5p	MIC B	Signalisation cellulaire

### 5.1.5. Influence du virus sur les microARN cellulaires

En plus d'utiliser son propre répertoire de miARN, l'EBV peut également réguler les miARN des cellules qu'il infecte. Il influe notamment sur l'expression de miR-155 et miR-146 qu'il induit au cours de la latence III, mais aussi, dans une moindre mesure, sur celle de nombreux autres miARN au cours des latences I et III tels que miR-15a, miR-21, miR-28, miR-34a et les membres du cluster miR-23a.

**miR-155.** Ce miARN cellulaire, encodé dans le gène BIC (*B cell integration cluster*), est impliqué dans les mécanismes immunologiques que sont l'immunité, l'hématopoïèse et l'inflammation. Sa dérégulation peut entraîner le développement de plusieurs affections, dont des cancers, des infections virales et des maladies cardiovasculaires. Il cible notamment plusieurs facteurs de transcription et contribue ainsi à la modulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. On le retrouve particulièrement dans les lymphomes à cellules B dont certains sont infectés de façon latente par l'EBV.

Les gènes de latence III de l'EBV permettent une forte expression de miR-155 par un mécanisme qui reste encore à éclaircir. On sait cependant que la protéine virale LMP1 joue un rôle dans cette régulation positive de la transcription de miR-155 dans les cellules B, par le biais du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) [Gatto *et al.*, 2008]. D'autres gènes de latence de l'EBV apportent probablement leur collaboration afin de maintenir la forte expression de miR-155 observée dans les cellules en latence III, comme c'est le cas de la protéine virale EBNA-2 qui peut aussi induire l'expression de Bic/miR-155 dans les cellules B [Lu *et al.*, 2008]. Ce miARN cellulaire est donc important pour l'oncogénicité de l'EBV.

**miR-146a.** Chez l'homme, deux gènes distincts, situés sur deux chromosomes différents, encodent les miARN miR-146a et miR-146b. Ces deux miARN cellulaires partagent une forte homologie : seuls deux nucléotides diffèrent dans leur séquence, hors de leur région *seed*. Ils ont donc des cibles similaires. L'expression de miR-146 est augmentée dans de nombreuses tumeurs et joue un rôle dans l'immunité innée. De plus, miR-146a régule plusieurs gènes,

directement ou indirectement, notamment un groupe de gènes sensibles aux interférons qu'il inhibe. miR-146 étant induit par des agents qui activent cette réponse interféron, il fait partie d'une boucle de rétrocontrôle négatif qui module l'intensité et la durée de la réponse.

La protéine LMP1 produite par l'EBV induit une expression accrue de miR-146a dans les cellules en latence III, par le biais de deux sites de liaison du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans le promoteur de miR-146a [Cameron *et al.*, 2008]. Compte tenu du rôle de miR-146a dans la réponse interféron, il est probable que l'induction de son expression par l'EBV aide à la mise en place ou la maintenance de la latence du virus en modulant la réponse immunitaire vis-à-vis des cellules infectées [Motsch *et al.*, 2007].

**Autres miARN.** Entre autres miARN cellulaires régulés par l'EBV, on trouve miR-127 qui est induit par l'infection virale, miR-21, -23a, -24, -27a et -34a qui sont plus fortement exprimés, ou encore miR-28 dont l'expression est réduite dans les cellules en latence III par rapport aux cellules en latence I [Lin et Flemington, 2011]. Certains de ces miARN sont des oncomiR : ils sont surexprimés lors de tumeur et favorisent la progression cancéreuse.

## 5.2. Cas du virus de la maladie de Marek

### 5.2.1. Généralités sur le virus de la maladie de Marek

Le virus de la maladie de Marek (MDV) est un alpha-herpès virus oncogénique qui peut provoquer des lymphomes à cellules T mortels chez les volatiles domestiques. Il se divise en deux sérotypes principaux: MDV-1 et MDV-2. Le sérotype 1, seul sérotype pathogène rebaptisé *Gallid herpesvirus 2* (GaHV2), comprend des souches virulentes, tandis que le sérotype 2, actuellement *Gallid herpesvirus 3*, comprend des souches avirulentes.

La contamination se fait par voie respiratoire. Le virus provoque tout d'abord une phase cytolytique entre les 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours post-infection puis instaure la phase de latence dans les deux semaines. Durant cette période, le génome du virus est maintenu dans les cellules hôtes sans production de virions. Parfois, cette phase conduit à la transformation des lymphocytes T et au développement de tumeurs. La réactivation du cycle lytique a lieu entre 14 et 21 jours post-infection chez les volailles sensibles. Elle coïncide avec une immunosuppression définitive et s'accompagne d'une forte multiplication virale dans les kératinocytes des follicules plumeux. L'excrétion maximale de virus dans les squames de l'animal infecté se situe entre 3 et 5 semaines post-infection, elle est suivie par le décès de l'animal. La figure 46 ci-dessous présente toutes les étapes de la pathogenèse d'une souche oncogénique de GaHV2.

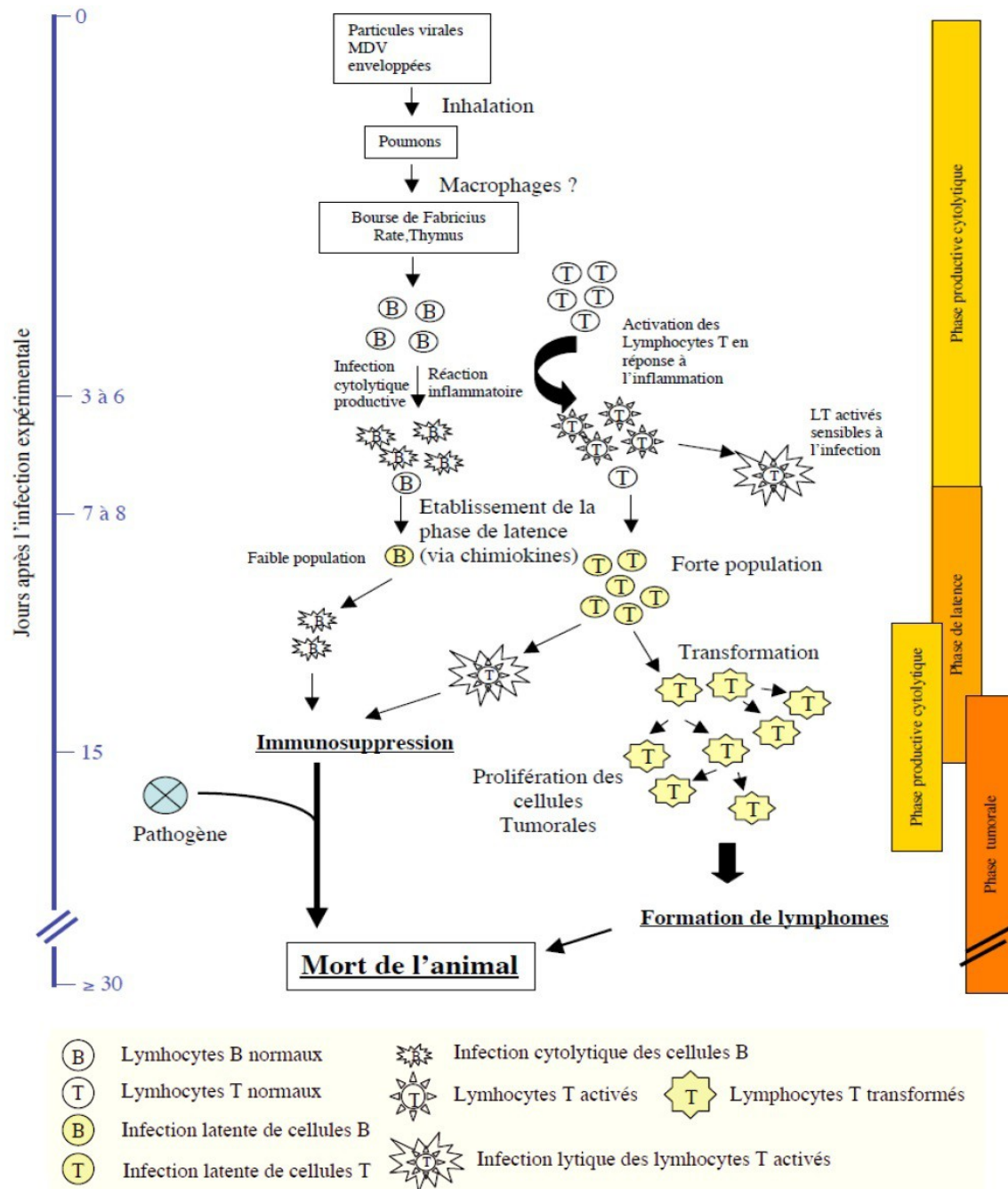


Fig. 46. **Chronologie de la pathogenèse d'une souche oncogénique de GaVH2.** Toutes les étapes, depuis la pénétration du virus par les voies respiratoires jusqu'à la mort de l'animal, sont représentées.

Source : Coupeau (2011).

La pathogénie dépend de nombreux facteurs : la virulence de la souche, la sensibilité, le sexe et l'âge de l'hôte, etc. La présentation de la maladie comprend essentiellement deux formes : la forme lymphomateuse dite aiguë et la forme "classique" neuronale. Lors de la forme aiguë, et selon la souche infectante, le lymphome peut se développer au niveau de nombreux organes tels que l'ovaire, du foie, de la rate, des reins, du cœur ou encore la peau.

### 5.2.2. microARN encodés par le virus de la maladie de Marek

Le génome de GaHV2 est constitué d'un ADN linéaire double brin d'environ 160-180 kpb. Il se compose de deux séquences uniques longue ( $U_L$ ) et courte ( $U_S$ ), chacune encadrée par des



régions répétées inversées identiques, respectivement TR<sub>L</sub> (*terminal repeat long*) et IR<sub>L</sub> (*internal repeat long*), et IR<sub>S</sub> (*internal repeat short*) et TR<sub>S</sub> (*terminal repeat short*).

Les pré-miARN encodés par le MDV, au nombre de 14 et donnant 25 miARN matures, sont organisés en trois *clusters* se trouvant dans les régions répétées inversées (figure 48). Les deux premiers encadrent l'oncogène *meq*. Celui en amont est appelé *cluster* Meq, celui en aval le *cluster* Mid. Le troisième *cluster*, appelé *cluster* LAT, est localisé dans le premier intron du transcrit LAT.

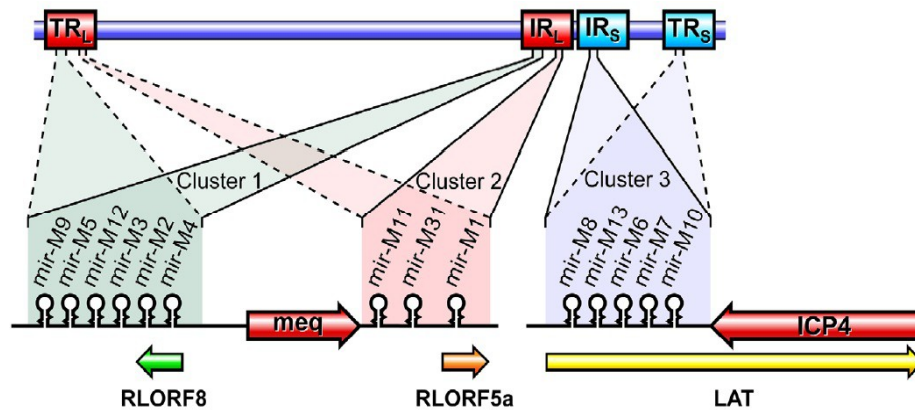


Fig. 47. Localisation des miARN dans le génome du MDV. La position et l'orientation des gènes viraux RLOF8, *meq*, RLOF5a, LAT et ICP4 qui chevauchent les miARN sont indiquées, de même que les copies des miARN aux deux orientations dans les régions IR et TR en lignes pleines et pointillées. TR<sub>L</sub>, *terminal repeat long*. IR<sub>L</sub>, *internal repeat long*. IR<sub>S</sub>, *internal repeat short*. TR<sub>S</sub>, *terminal repeat short*. LAT, *latency-associated transcript*. ORF, *open reading frame*. Meq, Marek's *EcoRI-Q*-encoded protein. Source : Zhao (2011).

### 5.2.3. Rôles des microARN encodés par le virus de la maladie de Marek

Une des fonctions principales des miARN d'herpès virus est le contrôle de la balance cycle lytique - cycle latent en régulant l'expression des gènes viraux comme de gènes cellulaires. La latence de l'infection à MDV est caractérisée par la production de transcrits LAT, une famille d'ARN non codants. L'épissage alternatif des 14 introns de cette région peut donner jusqu'à 22 LAT extrêmement différents [Strassheim *et al.*, 2012]. Le *cluster* LAT (*mdv1-miR-M8* à 10) est inclus dans le premier intron des LAT, il partage ainsi le même site d'initiation de la transcription. Il paraît donc naturel que ces miARN viraux contribuent à l'établissement et au maintien de la latence. D'autant que, tout comme l'EBV, le MDV produit des miARN qui répriment certains gènes précoces immédiats viraux, limitant ainsi le passage au cycle lytique.

Nous avons vu que la production du miR-155 cellulaire aux propriétés pro-oncogéniques était stimulée par l'EBV. C'est également le cas lors d'infection à d'autres virus oncogènes, comme KSHV ou le virus de la réticuloendothéliose (REV-T, *reticuloendotheliosis virus strain T*). Une particularité de GaHV2 est qu'il encode son propre homologue de miR-155, *mdv1-miR-M4*, dont les rôles seront donc, entre autres, de promouvoir la survie cellulaire et éviter l'apoptose. De plus, les miARN du *cluster* 1, notamment *mdv1-miR-M4*, sont essentiels pour l'oncogénicité du virus, mais pas sa réplication [Zhao *et al.*, 2011].



Par ailleurs, chaque miARN ayant un rôle bien défini, il existe une différence d'expression des miARN selon le stade de l'infection. En effet, au cours de la latence, le promoteur *prmiRM9M4* permet la transcription des gènes *meq* et *vIL-8*, résultant en la présence de tout le *cluster 1* dans le premier intron des différents transcrits. Pendant la phase lytique en revanche, il ne permet l'expression que du *cluster 1*, *meq* et *vIL-8* étant transcrits sous le contrôle de leurs propres promoteurs [Coupeau *et al.*, 2012].

#### 5.2.4. Cibles des miARN encodés par le virus de la maladie de Marek

Les cibles des miARN viraux peuvent être d'origine virale ou cellulaire. Une particularité du GaHV2 est que toutes les cibles identifiées de ses microARN sont régulées *via* des sites *mre* (*microRNA-responsive element*) situés dans des régions codantes des transcrits, et non l'extrémité 3'NC comme c'est classiquement le cas.

**Cibles virales.** *mdv1-miR-M7-5p*, le troisième microARN du *cluster LAT* situé à la limite exon1-intron1, a pour cibles *ICP4* et *ICP27*, deux gènes précoces immédiats qui contrôlent la transcription virale. *ICP4* est un trans-activateur essentiel aux gènes viraux précoces et tardifs, tandis que *ICP27* inhibe l'épissage viral et cellulaire. Avec une complémentarité de la région *seed* et de quelques autres nucléotides, *mdv1-miR-M7-5p* induit une baisse de production de ces deux protéines par inhibition de leur traduction [Strassheim *et al.*, 2012]. De plus, lors de la réactivation du virus, l'expression de *mdv1-miR-M7-5p* diminue tandis que celle de *ICP27* augmente. Les miARN produits depuis les transcrits *LAT* influent donc sur la latence.

Dans le cas de *mdv1-miR-M4-5p*, l'orthologue de *miR-155*, les cibles virales sont deux protéines impliquées dans le clivage et l'encapsidation de l'ADN des herpès virus : *UL28* et *UL 32* [Muylkens *et al.*, 2011] [Coupeau, 2011].

**Cibles cellulaires.** En plus de ses cibles virales, *mdv1-miR-M4-5p* régule également plusieurs transcrits cellulaires dans leur région 3'NC. Il s'agit, entre autres, de cinq facteurs de transcription (*HIVEP2*, *RREB1*, *c-Myb*, *PU.1* et *C/EBP*), une protéine membranaire (*GPM6B*), une protéine régulant l'apoptose (*BCL2L13*), une protéine liant le calcium impliquée dans la mort cellulaire (*PDCD6*) et une protéine kinase (*MAP3-K7IP2*) [Muylkens *et al.*, 2011] [Zhao *et al.*, 2009] [Coupeau, 2011]. Ainsi, en tant qu'orthologue de *miR-155*, il partage plusieurs mêmes cibles et joue notamment un rôle crucial dans l'induction des lymphomes en influant sur des mécanismes régulant l'activation et la différenciation des lymphocytes ainsi que la tolérance immunitaire. Sa délétion réduit d'ailleurs de 90% l'incidence de la maladie de Marek chez les animaux infectés par la souche mutante [Zhao *et al.*, 2011].

### 5.2.5. Influence du virus sur les microARN cellulaires

En parallèle d'encoder son propre répertoire de miARN, le GaHV2 peut aussi influencer sur l'expression des miARN des cellules qu'il infecte. Le profil d'expression des miARN cellulaires peut donc s'en retrouver complètement modifié. Lian *et al.* [2012] ont ainsi comparé le transcriptome des miARN exprimés chez des poulets sains et chez des poulets infectés par le MDV. Il en est ressorti que les miARN cellulaires miR-181a, -26a, -221, -222, -199\* et -140\* étaient régulés négativement, tandis que miR-146c était régulé positivement lors de l'infection [Yao *et al.*, 2009] avaient d'ailleurs déjà démontré que, en plus d'une forte expression des miARN viraux, les cellules lymphoblastoïdes tumorales infectées par le GaHV2 présentaient une altération de l'expression de leurs miARN cellulaires. miR-150, -223, -451, -26a et -126 étaient en effet moins exprimés. Quant à miR-155, son expression était également réduite dans ces cellules, contrairement aux cellules T transformées non infectées par le GaHV2 où elle était augmentée.



# CONCLUSION

---

Depuis leur découverte en 1993, les microARN ont révélé leur omniprésence et leur importance encore insoupçonnée au fil des années et des recherches. Membres du *RNA silencing*, ils sont responsables de la régulation post-transcriptionnelle de multiples composants cellulaires. Ils forment ainsi un réseau extrêmement complexe et leur dérégulation peut être à l'origine de multiples affections.

La découverte des microARN produits par des virus à ADN a fait germer l'idée que les virus pouvaient également exploiter le *RNA silencing* pour réguler des gènes viraux mais aussi cellulaires. Bien que tous les herpes virus n'encodent pas de microARN, la majorité des virus encodant des microARN appartiennent à la famille des *Herpesviridae*, or une caractéristique majeure de ces virus est leur capacité à entrer en latence, phase durant laquelle l'expression du génome viral doit être minimale. On comprend alors tout l'intérêt que peut représenter le silençage génique pour ces virus, et ce d'autant plus qu'il peut également concerner les composants cellulaires. Il existe ainsi des interactions complexes entre les cellules infectées en latence ou en phase lytique, les transformations oncogènes et le système immunitaire, dans lesquelles les microARN viraux et cellulaires ont un rôle non négligeable.

Les microARN, qu'ils soient encodés par les cellules ou par des virus, jouent notamment un rôle significatif dans le développement des tumeurs. L'étude de l'expression des microARN pourrait donc permettre de détecter les tumeurs à des stades précoces et de poser des diagnostics précis. De plus, notre connaissance accrue des mécanismes impliqués permet d'envisager des perspectives thérapeutiques. Par exemple, dans le cas de la maladie de Marek, nous avons vu que la délétion de certains microARN aboutit à la perte du caractère oncogénique du virus. Cela a déjà été utilisé par Zhao *et al.* [2011] pour créer une souche vaccinale qui a montré la même efficacité *in vivo* que le vaccin classiquement utilisé. On peut ainsi imaginer que plusieurs stratégies thérapeutiques impliquant les miARN, comme de bloquer l'action de ceux favorisant la progression cancéreuse ou d'induire l'expression de ceux inhibant la prolifération cellulaire, se développeront dans un futur proche.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

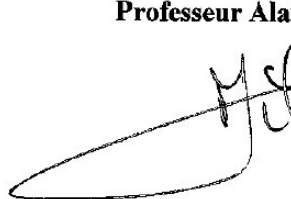

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, **Stéphane BERTAGNOLI**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **CELY Isabelle** intitulée « *Rôle des microARN lors des infections par les virus animaux et humains* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

**Fait à Toulouse, le 18 novembre 2013**  
**Professeur Stéphane BERTAGNOLI**  
**Enseignant chercheur**  
**de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**



**Vu :**  
**Le Directeur de l'Ecole Nationale**  
**Vétérinaire de Toulouse**  
**Professeur Alain MILON**

**Vu :**  
**Le Président du jury :**  
**Professeur Christophe PASQUIER**



**Vu et autorisation de l'impression :**  
**Le Président de l'Université**  
**Paul Sabatier**  
**Professeur Bertrand MONTHUBERT**



**Président de l'Université Paul Sabatier**  
**par délégation**  
**Le vice-Président du CEVU**

  
**Arnaud LE PADELLEC**

**Mlle Isabelle CELY**  
a été admis(e) sur concours en : 2008  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012  
a validé son année d'approfondissement le : 12/07/2013  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

# BIBLIOGRAPHIE

---

- ABEND J.R., ULDRICK T. and ZIEGELBAUER J.M. (2010). Regulation of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis receptor protein (TWEAKR) expression by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA prevents TWEAK-induced apoptosis and inflammatory cytokine expression. *Journal of Virology* **vol. 84 n°23**, 12139-12151.
- AMBROS V., BARTEL B., BARTEL D.P., BURGE C.B., CARRINGTON J.C., CHEN X., DREYFUSS G., EDDY S.R., GRIFFITHS-JONES S., MARSHALL M., MATZKE M., RUVKUN G. and TUSCHL T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA journal* **vol. 9 no. 3**, 277-279.
- ANDERSSON M.G., HAASNOOT P.C.J., XU N., BERENJIAN S., BERKHOUT B. and AKUSJARVI G. (2005). Suppression of RNA interference by Adenovirus virus-associated RNA. *Journal of Virology* **vol. 79 issue 15**, 9556-9565.
- ARORA S., RANA R., CHHABRA A., JAISWAL A. and RANI V. (2013). MiRNA-transcription factor interactions: a combinatorial regulation of gene expression. *Mol Genet Genomics* **288**, 77-87.
- AXTELL M.J., WESTHOLM J.O. and LAI E.C. (2011). Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology* **12**, 221-234.
- BACKES S., SHAPIRO J.S., SABIN L.R., PHAM A.M., REYES I., MOSS B., CHERRY S. and TENOEVER B.R. (2012). Degradation of host microRNAs by Poxvirus poly(A) polymerase reveals terminal RNA methylation as a protective antiviral mechanism. *Cell Host & Microbe* **vol. 12 issue 2**, 200-210.
- BARTEL D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* **116**, 281-297.
- BARTEL D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233.
- BARTH S., PFUHL T., MAMIANI A., EHSES C., ROEMER K., KREMMER E., JAKER C., HOCK J., MEISTER G., and GRASSER F.A. (2008). Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Research* **vol. 36 issue 2**, 666-675.
- BARTH S., MEISTER G. and GRASSER F.A. (2011). EBV-encoded miRNAs. *Biochimica and Biophysica Acta* **1809**, 631-640.
- BEHM-ANSMANT I., REHWINKEL J., DOERKS T., STARK A., BORK P. and IZAURRALDE E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & Development* **20**, 1885-1898.
- BEREZIKOV E., CHUNG W-J., WILLIS J., CUPPEN E. and LAI E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Molecular Cell* **28**, 328336.
- BOSS I.W., PLAISANCE K.B. and RENNE R. (2008). Role of virus-encoded microRNAs in herpesvirus biology. *Trends in microbiology* **vol. 17 issue 2**, 544-553.
- BOSS I.W. and RENNE R. (2010). Viral miRNAs: tools for immune evasion. *Current Opinion in Microbiology* **vol. 13 issue 4**, 540-545.
- BOSS I.W. and RENNE R. (2011). Viral miRNAs and immune evasion. *Biochimica et Biophysica Acta* **vol. 1809 issue 11-12**, 708-714.
- BOUASKER S. and SIMARD M.J. (2012). The slicing activity of miRNA-specific Argonautes is essential for the miRNA pathway in *C. elegans*. *Nucleic Acids Research* **vol. 40 n°20**, 10452-10462.

- BOYD S.D. (2008). Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Laboratory Investigation* **88**, 569-578.
- BURNSIDE J., BERNBERG E., ANDERSON A., LU C., MEYERS B.C., GREEN P.J., JAIN N., ISAACS G. and MORGAN R.W. (2006). Marek's disease virus encodes microRNAs that map to *meq* and the latency-associated transcript. *Journal of Virology* **vol. 80 n°17**, 8778-8786.
- CAI X., HAGEDORN C.H. and CULLEN B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **vol. 10**, 1957-1966.
- CAI X., LU S., ZHANG Z., GONZALES C.M., DAMANIA B. and CULLEN B.R. (2005). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 102 issue 15**, 5570-5575.
- CAI X., LI G., LAIMINS L.A. and CULLEN B.R. (2006). Human papillomavirus genotype 31 does not express detectable microRNA levels during latent or productive virus replication. *Journal of Virology* **vol. 80 issue 21**, 10890-10893.
- CAMERON J.E., YIN Q., FEWELL C., LACEY M., MCBRIDE J., WANG X., LIN Z., SCHAEFER B.C. and FLEMINGTON E.K. (2008). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular microRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *Journal of Virology* **vol. 82 issue 4**, 1946-1958.
- CAO X., YEO G., MUOTRI A.R., KUWABARA T. and GAGE F.H. (2006). Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience* **vol. 29**, 77-103.
- CARTHEW R.W. and SONTHEIMER E.J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655.
- CASTANATTO D. and ROSSI J.J. (2009). The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* **vol. 457 issue 7228**, 426-433.
- CAZALLA D., YARIO T. and STEITZ J.A. (2010). Down-regulation of a host microRNA by a *Herpesvirus saimiri* noncoding RNA. *Science* **vol. 328 issue 5985**, 1563-1566.
- CHEKULAEVA M. and FILIPOWICZ W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 452-460.
- CHEN J-F., MURCHISON E.P., TANG R., CALLIS T.E., TATSUGUCHI M., GENG Z., ROJAS M., HAMMOND S.M., SCHNEIDER M.D., SELZMAN C.H., MEISSNER G., PATTERSON C., HANNON G.J. and WANG D-Z. (2008). Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 105 no. 6**, 2111-2116.
- CHENDRIMADA T.P., GREGORY R.I., KUMARASWAMY E., NORMAN J., COOCH N., NISHIKURA K. and SHIEKHATTAR R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **vol. 436 issue 7051**, 740-744.
- CHIVUKULA R.R. and MENDELL J.T. (2008). Circular reasoning: microRNAs and cell-cycle control. *Trends in Biochemical Sciences* **vol. 33 n°10**, 474-481.
- CHOY E.Y., SIU K.L., KOK K.H., LUNG R.W., TSANG C.M., TO K.F., KWONG D.L., TSAO S.W. and JIN D.Y. (2008). An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote cell survival. *The Journal of Experimental Medicine* **vol. 205 issue 11**, 2551-2560.
- CHU C-Y. and RANA T.M. (2007). Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of Cellular Physiology* **vol. 213 issue 2**, 412-419.

CORDELIER P., VIGNOLLE VIDONI A., BUSCAIL L., LULKA H., CAZALS C., BOURNET B., HANOUN N., TORRISANI J., DIAB T. et DAGNON L. (2013). Les microARNs bouleversent l'oncologie ? *Magazine scientifique Paul Sabatier* n°30, 11.

COUPEAU D. (2011). *Etude transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de la région IR<sub>L</sub>/TR<sub>L</sub> du virus de la maladie de Marek*. Thèse de doctorat en sciences de la vie et virologie, Université François Rabelais (Tours), 282p.

COUPEAU D., DAMBRINE G. and RASSCHAERT D. (2012). Kinetic expression analysis of the cluster mdv1-mir-M9-M4, genes *meq* and *vIL-8* differs between the lytic and latent phases of Marek's disease virus infection. *Journal of General Virology* **93**, 1519-1529.

CULLEN B.R. (2004). Transcription and processing of human microRNA precursors. *Molecular Cell* **vol. 16**, 861-865.

CULLEN B. R. (2006). Viruses and microRNAs. *Nature Genetics Supplement* **vol. 38**, S25-S30.

CULLEN B.R. (2011). Viruses and microRNAs: RISCy interactions with serious consequences. *Genes & Development* **vol. 25 issue 18**, 1881-1894.

CULLEN B.R. (2012). MicroRNA expression by an oncogenic retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 109 issue 8**, 2695-2696.

DAVIS T.H., CUELLAR T.L., KOCH S.M., BARKER A.J., HARFE B.D., McMANUS M.T. and ULLIAN E.M. (2008). Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *The Journal of Neuroscience* **vol. 28 issue 17**, 4322-4330.

DIEDERICH S. and HABER D.A. (2007). Dual role for Argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* **vol. 131 issue 6**, 1097-1108.

DING X.C., WEILER J. and GROSSHANS H. (2008). Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. *Trends in Biotechnology* **vol. 27 n°1**, 27-36.

DOLKEN L., MALTERER G., ERHARD F., KOTHE S., FRIEDEL C.C., SUFFERT G., MARCINOWSKI L., MOTSCH N., BARTH S., BEITZINGER M., LIEBER D., BAILER S.M., HOFFMANN R., RUZSICS Z., KREMMER E., PFEFFER S., ZIMMER R., KOSZINOWSKI U.H., GRASSER F., MEISTER G. and HASS J. (2010). Systematic analysis of viral and cellular microRNA targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by RISC immunoprecipitation assay. *Cell Host Microbe* **vol. 7 issue 4**, 324-334.

ERNOULT-LANGE M., BENARD M., KRESS M. and WEIL D. (2012). P-bodies and mitochondria: wih place in RNA interference? *Biochimie* **94**, 1572-1577.

EULALIO A., HUNTZINGER E., NISHIHARA T., REHWINKEL J., FAUSER M. and IZAURRALDE E. (2009a). Deadenylation is a widespread effect on miRNA. *RNA* **vol. 15 n°1**, 21-32.

EULALIO A., TRITSCHLER F. and IZAURRALDE E. (2009b). The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, **vol. 15 n°8**, 1433-1442.

FABIAN M.C., SONENBERG N. and FILIPOWICZ W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry* **79**, 351-379.

FEEDERLE R., HAAR J., BERNHARDT K., LINNSTAEDT S.D., BANNERT H., LIPS H., CULLEN B.R. and DELECLUSE H-J. (2011). The members of an Epstein-Barr virus microRNA cluster cooperate to transform B lymphocytes. *Journal of Virology* **vol. 85 n°19**, 9801-9810.

FILIPOWICZ W., BHATTACHARYYA S.N. and SONENBERG N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* **vol. 9**, 102-114.



- FORTE E. and LUFTIG M.A. (2011). The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes and Infection* **13**, 1156-1167.
- GATTO G., ROSSI A., ROSSI D., KROENING S., BONATTI S. and MALLARDO M. (2008). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 *trans*-activates miR-155 transcription through the NF- $\kappa$ B pathway. *Nucleic Acids Research* **vol. 36 issue 20**, 6608-6619.
- GHOSH Z., MALLICK B. and CHAKRABARTI J. (2009). Cellular versus viral microRNAs in host-virus interaction. *Nucleic Acids Research* **vol. 37 n°4**, 1035-1048.
- GIORGI C., COGONI C. and CATALANOTTO C. (2012). From transcription to translation: new insights in the structure and function of Argonaute protein. *BioMol Concepts* **vol. 3**, 545-559.
- GOTTWEIN E. MUKHERJEE N., SACHSE C., FRENZEL C., MAJOROS W.H., CHI J-T.A., BRAICH R., MANOHARAN M., SOUTSCHEK J., OHLER U. and CULLEN B.R. (2007). A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* **vol. 450 n°7172**, 1096-1099.
- GOTTWEIN E. and CULLEN B.R. (2008). Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host & Microbe* **vol. 3 issue 6**, 375-387.
- GREGORY R.I., CHENDRIMADA T.P., COOCH N. and SHIEKHATTAR R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **123**, 631-640.
- GREY F., MEYERS H., WHITE E.A., SPECTOR D.H. and NELSON J. (2007). A human cytomegalovirus-encoded miRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathogens*, **vol. 3 issue 11**, e163.
- GREY F., TIRABASSI R., MEYERS H., WU G., MCWEENEY S., HOOK L., NELSON J.A. (2010). A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. *PLoS Pathogens* **vol. 6 issue 6**, e1000967.
- GRIFFITHS-JONES S., SAINI H.K., VAN DONGEN S. and ENRIGHT A. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research* **vol. 36**, D154-D158.
- GRIMSON A., FARH K.K-H., JOHNSTON W., GARRETT-ENGELE P., LIM L.P. and BARTEL D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell* **27**, 91-105.
- GRINBERG M., GILAD S., MEIRI E., LEVY A., ISAKOV O., RONEN R., SHOMRON N., BENTWICH Z. and SHEMER-AVNI Y. (2012). Vaccinia virus infection suppresses the cell microRNA machinery. *Archives of Virology* **vol. 157 issue 9**, 1719-1727.
- GRUNDHOFF A., SULLIVAN C.S. (2011). Virus-encoded microRNAs. *Virology* **411**, 325-343.
- GWIZDEK C., OSSAREH-NAZARI B., BROWNAWELL A.M., EVERS S., MACARA I.G. and DARGEMONT C. (2004). Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *The Journal of Biological Chemistry* **vol. 279 no. 2**, 884-891.
- HABIG J.W., DALE T. and BASS B.L. (2007). miRNA editing – we should have inosine this coming. *Molecular Cell* **vol. 25 issue 6**, 792-793.
- HAN J., LEE Y., YEOM K-H., NAM J-W., HEO I., RHEE J-K., SOHN S.Y., CHO Y., ZHANG B-T. And KIM V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **vol. 125 issue 5**, 887-901.
- HAN J., PEDERSEN J.S., KWON C., BELAIR C.D., KIM Y-K., YEOM K-H., YANG W-Y., HAUSSIER D., BLELLOCH R. and KIM V.N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* **vol. 136 issue 1**, 75-84.

- HARIHARAN M., SCARIA V., PILLAI B. and BRAHMACHARI S.K. (2005). Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **vol. 337 issue 4**, 1214-1218.
- HARTMANN C., CORRE-MENGUY F., BOUALEM A., JOVANIC M., LELANDAIS-BRIERE C. (2004). Les microARN, une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique. *Médecine/Sciences* **n°10 vol. 20**, 894-898.
- HEBERT S.S. and DE STROOPER B. (2009). Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences* **vol. 34 issue 4**, 199-206.
- HEBERT S.S., PAPADOPOULOU A.S., SMITH P., GALAS M-C., PLANEL E., SILAHTAROGLU A.N., SERGEANT N., BUEE L. and DE STROOPER B. (2010). Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics* **vol. 19 no. 20**, 3959-3969.
- HENKE J.I., GOERGEN D., ZHENG J., SONG Y., SCHUTTLER C.G., FEHR C., JUNEMANN and NIEPMANN M. (2008). MicroRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO Journal* **vol. 27 issue 24**, 3300-3310.
- HOUBAVIY H.B., MURRAY M.F. And SHARP P.A. (2003). Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Developmental Cell* **vol. 5 issue 2**, 351-358.
- HUMPHREYS D.T., WESTMAN B.J., MARTIN D.I.K. and PREISS T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 102 n°47**, 16961-16966.
- HWANGG H-W., WENTZEL E.A. And MENDELL J.T. (2007). A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* **315**, 5808.
- IIZASA H., WULFF B-E., ALLA N.R., MARAGKAKIS M., MEGRAW M., HATZIGEORGIOU A., IWAKIRI D., TAKADA K., WIEDMER A., SHOWE L., LIEBERMAN P. and NISHIKURA K. (2010). Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency. *The Journal of Biological Chemistry* **vol. 285 issue 43**, 33358-33370.
- JOPLING C.L., MINKYUNG Y., LANCASTER A.M., LEMON S.M. and SARNOW P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* **309**, 1577-1581.
- JOPLING C.L., SCHUTZ S. and SARNOW P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host & Microbe* **vol. 4 issue 1**, 77-85.
- KAWAHARA Y., MEGRAW M., KREIDER E., IIZASA H., VALENTE L., HATZIGEORGIOU A.G. and NISHIKURA K. (2008). Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Research* **vol. 36 n°16**, 5270-5280.
- KERTESZ M., IOVINO N., UNNERSTALL U., GAUL U. and SEGAL E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature Genetics* **vol. 39 no. 10**, 1278-1284.
- KHVOROVA A., REYNOLDS A., JAYASENA S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216.
- KIM D.N. and LEE S.K. (2012). Biogenesis of Epstein-Barr virus microRNAs. *Molecular and Cellular Biochemistry* **vol. 365 issue 1-2**, 203-210.
- KIM V.N.(2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends in Cell Biology* **vol. 14 no. 4**, 156-160.
- KIM V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* **6**, 376-385.

- KIM V.N., HAN J. and SIOMI M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology*, **vol. 10**, 126-139.
- KIM Y.-K. and KIM V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO Journal* **vol. 26 no. 3**, 775-783.
- KINCAID R.P., BURKE J.M. and SULLIVAN C.S. (2012a). RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 109 no. 8**, 3077-3082.
- KINCAID R.P., and SULLIVAN C.S. (2012b). Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future. *PLOS pathogens*, **vol. 8 issue 12**, 1-11.
- KIRIAKIDOU M., TAN G.S., LAMPRIKAKI S., DE PLANELL-SAGUER M., NELSON P.T. and MOURELATOS Z. (2007). An mRNA m<sup>7</sup>G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* **129**, 1141-1151.
- KROL J., LOEDIGE I. and FILIPOWICZ W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, **vol. 11**, 597-610.
- KULKARNI M., OZGUR S. Ad STOECKLIN G. (2010). On track with P-bodies. *Biochemical Society Transactions* **vol. 38 part 1**, 242-252.
- LAMORIL J., AMEZIANE N., DEYBACH J.-C., BOUIZEGARENE P. et BOGARD M. (2010). Le monde complexe et mouvant des ARN, première partie. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* **25**, 4-25.
- LAMORIL J., BOUIZEGARENE P. et BOGARD M. (2010). Le monde complexe et mouvant des ARN, seconde partie : les microARNs. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* **25**, 219-240.
- LECELLIER C.-H., DUNOYER P., ARAR K., LEHMMANN-CHE J., EYQUEM S., HIMBER C., SAIB A. and VOINNET O. (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* **vol. 308 issue 5721**, 557-560.
- LEE R.C., FEINBAUM R.L. and AMBROS V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **vol. 75 issue 3**, 843-854.
- LEE Y., AHN C., HAN J., CHOI H., KIM J., YIM J., LEE J., PROVOST P., RADMARK O., KIM S. and KIM V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415-419.
- LEE Y., KIM M., HAN J., YEOM K.-H., LEE S., BAEK S.H. and KIM V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* **23**, 4051-4060.
- LEE Y.S. and DUTTA A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **vol. 4**, 199-227.
- LI Q.J., CHAU J., EBERT P.J., SYLVESTER G., MIN H., LIU G., BRAICH R., MANOHARAN M., SOUTSCHEK J., SKARE P., KLEIN L.O., DAVIS M.M. And CHEN C.Z. (2007). miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* **vol. 129 issue 1**, 147-161.
- LI Y., WANG F., LEE J.-A. And GAO F.-B. (2006). MicroRNA-9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Genes & Development* **vol. 20 issue 20**, 2793-2805.
- LIAN L., QU L., CHEN Y., LAMONT S.J. and YANG N. (2012). A systematic analysis of miRNA transcriptome in Marek's disease virus-induced lymphoma reveals novel and differentially expressed miRNAs. *PLoS Pathogens* **vol. 7 issue 11**, e51003.
- LIN J. and CULLEN B.R. (2007). Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *Journal of Virology* **vol. 81 no. 22**, 12218-12226.

- LIN S-L., MILLER J.D. and YING S-Y. (2006). Intronic microRNA (miRNA). *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **vol. 2006**, 1-13.
- LIN Z. and FLEMINGTON E.K. (2011). miRNAs in the pathogenesis of oncogenic human viruses. *Cancer Letters* **vol. 305 issue 2**, 186-199.
- LO A.K.F., TO K.F., LO K.W., LUNG R.W.M., HUI J.W.Y., LIAO G. and HAYWARD S.D. (2007). Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 104 issue 41**, 16164-16169.
- LU F., WEIDMER A., CG L., VOLINIA S., CROCE C.M. and LIEBERMAN P.M. (2008). Epstein-Barr virus-induced miR-155 attenuates NF- $\kappa$ B signaling and stabilizes latent virus persistence. *Journal of Virology* **vol. 82 issue 21**, 10436-10443.
- LUND E., GUTTINGER S., CALADO A., DAHLBERG J.E. and KUTAY U. (2004). Nucleat export of microRNA precursors. *Science* **vol. 303 no. 5654**, 95-98.
- LUNG R.W-M., TONG J.H-M., SUNG Y-M., LEUNG P-S., NG D.C-H., CHAU S-L., CHAN A.W-H., NG E.K-O., LO K-W. and TO K-F. (2009). Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded miRNA miR-BART22. *Neoplasia* **vol. 11 n°11**, 1174-1184.
- MA E. MACRAE I.J., KIRSCH J.F. and DOUDNA J.A. (2008). Auto-inhibition of human Dicer by its internal helicase domain. *Journal of Molecular Biology* **vol. 380 issue 1**, 237-243.
- MAHAJAN V.S., DRAKE A. and CHEN J. (2008). Virus-specific host-miRNAs: antiviral defenses or promoters of persistent infection? *Trends in Immunology* **vol. 30 issue 1**, 1-7.
- MARCINOWSKI L., TANGUY M., KRMPOTIC A., RADLE B., LISNIC V.J., TUDDENHAM L., CHANEWOON-MING B., RUZSICS Z., ERHARD F., BENKARTEK C., BABIC M., ZIMMER R., TRGOVCICH J., KOSZINOWSKI U.H., JONJIC S., PFEFFER S. and DOLKEN L. (2012). Degradation of cellular miR-27 by a novel, highly abundant viral transcript is important for efficient virus replication in vivo. *PLoS Pathogens* **vol. 8 issue 2**, e1002510.
- MARONEY P.A., YU Y., FISHER J. and NILSEN T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **vol. 13 n°12**, 1102-1107.
- MARQUITZ A.R., MATHUR A., NAM C.S. and RAAB-TRAUB N. (2011). The Epstein-Barr virus BART microRNAs target the pro-apoptotic protein Bim. *Virology* **vol. 412 issue 2**, 392-400.
- MAS MONTEYS A., SPENGLER R.M., WAN J., TECEDOR L., LENNOX K.A., XING Y. and DAVIDSON B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* **vol. 16 n°3**, 495-505.
- MORGAN R., ANDERSON A., BERNBERG E., KAMBOJ S., HUANG E., LAGASSE G., ISAACS G., PARCELLS M., MEYERS B.C., GREEN P.J. and BURNSIDE J. (2008). Sequence conservation and differential expression of Marek's disease virus microRNAs. *Journal of Virology* **vol. 82 issue 24**, 12213-12220.
- MOTSCH N., PFUHL T., MRAZEK J., BARTH S. and GRASSER F.A. (2007). Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA biology* **vol. 4 issue 3**, 131-137.
- MURCHISON E.P., STEIN P., XUAN Z., PAN H., ZHANG M.Q., SCHULTZ R.M. and HANNON G.J. (2007). Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes & Development* **vol. 21 issue 6**, 682-693.
- MURPHY E., VANICEK J., ROBINS H., SHENK T. and LEVINE A.J. (2008). Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-encoded microRNAs: implications for latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 105 issue 14**, 5453-5458.

- MUYLKENS B., COUPEAU D., DAMBRINE G., TRAPP S. and RASSCHAERT D. (2010). Marek's disease virus-encoded microRNA designated mdv1-pre-miR-M4 targets both cellular and viral genes. *Archives of Virology* **vol. 155 issue 11**, 1823-1837.
- OKAMURA K., HAGEN J.W., DUAN H., TYLER D.M. and LAI E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**, 89-100.
- OKAMURA K., CHUNG W.-J. and LAI E.C. (2008). The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs. *Cell Cycle* **vol. 7 issue 18**, 2840-2845.
- OROM U.A., NIELSEN F.C. and LUND A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell* **vol. 30 issue 4**, 460-471.
- OUELLET D.L., PLANTE I., LANDRY P., BARAT C., JANELLE M.E., FLAMAND L., TREMBLAY M.J. and PROVOST P. (2008). Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic Acids Research* **vol. 36 issue 7**, 2353-2365.
- PETERSEN C.P., BORDELEAU M.-E., PELLETIER J. and SHARP P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell* **21**, 533-542.
- PFEFFER S., ZAVOLAN M., GRASSER F.A., CHIEN M., RUSSO J.J., JU J., JOHN B., ENRIGHT A.J., MARKS D., SANDER C. and TUSCHL T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **vol. 304 n°5671**, 734-736.
- PFEFFER S., SEWER A., LAGOS-QUINTANA M., SHERIDAN R., SANDER C., GRASSER F.A., VAN DYK L.F., HO C.K., SHUMAN S., CHIEN M., RUSSO J.J., JU J., RANDALL G., LINDENBACH B.D., RICE C.M., SIMON V., HO D.D., ZAVOLAN M. and TUSCHL T. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature Methods* **vol. 2 issue 4**, 269-276.
- PFEFFER S. (2007). MicroARN et infections virales. *Virologie* **vol. 11 n°3**, 207-216.
- PRATT A.J. and MACRAE I. (2009). The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *The Journal of Biological Chemistry* **vol. 284 no. 27**, 17897-17901.
- RECZKO M., MARGAKAKIS M., ALEXIOU P., GROSSE I. and HATZIGEORGIOU A.G. (2012). Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* **vol. 28 n°6**, 771-776.
- REINHART B.J., SLACK F.J., BASSON M., PASQUINELLI A.E., BETTINGER J.C., ROUGVIE A.E., HORVITZ H.R. and RUVKUN G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **vol. 403 issue 6772**, 901-906.
- RILEY K.J., RABINOWITZ G.S., YARIO T.A., LUNA J.M., DARNELL R.B. and STEITZ J.A. (2012). EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency. *The EMBO Journal* **31**, 2207-2221.
- RODRIGUEZ A., GRIFFITH-JONES S., ASHURST J.L. and BRADLEY A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research* **14**, 1902-1910.
- RUAN K., FANG X. and OUYANG G. (2009). MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Letters* **vol. 285 issue 2**, 116-126.
- RUEGGER S. and GROSSHANS H. (2012). MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends in Biochemical Sciences* **vol. 37 n°10**.
- SANTORO M.M. and NICOLI S. (2013). MiRNAs in endothelial cell signaling: the endomiRNAs. *Experimental cell research* **319**, 1324-1330.

- SAXENA S., JONSSON Z.O., DUTTA A. (2003). Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* **vol. 278 no. 45**, 44312-44319.
- SCHNALL-LEVIN M., ZHAO Y., PERRIMON N. and BERGER B. (2010). Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, August 20, 2010.
- SETO E., MOOSMANN A., GROMMINGER S., WALZ N., GRUNDHOFF A. And HAMMERSCHMIDT W. (2010). Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells. *PLoS Pathogens* **vol. 6 issue 8**, e1001063.
- SHAPIRO J.S., VARBLE A., PHAM A.M. and TENOEVEER B.R. (2010). Noncanonical cytoplasmic processing of viral microRNAs. *RNA* **vol. 16 issue 11**, 2068-2074.
- SHAPIRO J.S., LANGLOIS R.A., PHAM A.M. and TENOEVEER B.R. (2012). Evidence for a cytoplasmic microprocessor of pri-miRNAs. *RNA* **vol. 18 issue 7**, 1338-1346.
- SHRUTI K., SHREY K. and VIBHA R. (2011). Micro RNAs: tiny sequences with enormous potential. *Biochemical and Biophysical Research communications* **407**, 445-449.
- SIOMI H. and SIOMI M.C. (2010). Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular Cell* **38**, 323-332.
- SKALSKY R.L. and CULLEN B.R. (2010). Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annual Review of Microbiology* **vol. 64**, 123-141.
- STRASSHEIM S., STIK G., RASSCHAERT D. and LAURENT S. (2012). mdv1-miR-M7-5p; located in the newly identified first intron of the latency-associated transcript of Marek's disease virus, targets the immediate-early genes ICP4 and ICP27. *Journal of General Virology* **93**, 1731-1742.
- SU N., WANG Y., QIAN M. and DENG M. (2010). Combinatorial regulation of transcription factors and microRNAs. *BMC Systems Biology* **4**, 150-158.
- SUBRAMANIAN S. and STEER C.J. (2010). MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* **vol. 223 issue 2**, 289-298.
- SUFFERT G., MALTERER G., HAUSSER J., VIILAINEN J., FENDER A., CONTRANT M., IVACEVIC T., BENES V., GROS F., VOINNET O., ZAVOLAN M., OJALA P.M., HAAS J.G. and PFEFFER S. (2011). Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis. *PLoS Pathogens* **vol.7 n°12**, e1002405.
- SUH M-R., LEE Y., KIM J.Y., KIM S-K., MOON S-H., LEE J.Y., CHA K-Y., CHUNG H.M., YOON H.S., MOON S.Y., KIM V.N. and KIM K-S. (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental Biology* **vol. 270 issue 2**, 488-498.
- SULLIVAN C.S., GRUNDHOFF A.T., TEVETHIA S., PIPAS J.M. And GANEM D. (2005). SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* **vol. 435 issue 7042**, 682-686.
- TIAN F., LUO J., ZHANG H., CHANG S. and SONG J. (2011). MiRNA expression signatures induced by Marek's disease virus infection in chickens. *Genomics* **99**, 152-159.
- UMBACH J.L. and CULLEN B.R. (2009). The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes & Development* **vol. 23 issue 10**, 1151-1164.
- VAN ROOIJ E., SUTHERLAND L.B., LIU N., WILLIAMS A.H. MCANALLY J., GERARD R.D., RICHARDSON J.A. and OLSON E.N. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can

- evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 103 issue 48**, 18255-18260.
- VAN ROOIJ E., SUTHERLAND L.B., QI X., RICHARDSON J.A., HILL J. and OLSON E.N. (2007). Control of stress-dependent cardiac-growth and gene expression by a microRNA. *Science* **vol. 316 issue 5824**, 575-579.
- VARBLE A., CHUA M.A., PEREZ J.T., MANICASSAMY B., GARCIA-SASTRE A. and TENOEVEER B.R. (2010). Engineered RNA viral synthesis of microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 107 no. 25**, 11519-11524.
- VASUDEVAN S. and STEITZ J. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* **vol. 128 issue 6**, 1105-1118.
- WANG Z., YAO H., LIN S., ZHU X., SHEN Z., LU G., SANG POON W., XIE D., LIN M.C. and KUNG H. (2013). Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs. *Cancer letters* **331**, 1-10.
- WESTHOLM J.O. and LAI E.C. (2011). Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* **93**, 1897-1904.
- WILLIAMS A.H., LIU N., van ROOIJ E. and OLSON E.N. (2009). MicroRNA control of muscle development and disease. *Current Opinion in Cell Biology* **vol. 21 issue 3**, 461-469.
- WINTER J., JUNG S., KELLER S., GREGORY R. I. and DIEDERICH S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* **vol. 11 n°3**, 228-234.
- WU L., FAN J. and BELASCO J.G. (2008). Importance of translation and nonnucleolytic Ago proteins for on-target RNA interference. *Current Biology* **vol. 18 issue 17**, 1327-1332.
- XIAO C. and RAJEWSKY K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell* **vol. 136 issue 1**, 26-36.
- XU H., YAO Y., ZHAO Y., SMITH L.P., BAIGENT S.J. and NAIR V. (2008). Analysis of the expression profiles of Marek's disease virus-encoded microRNAs by real-time quantitative PCR. *Journal of Virology Methods* **149**, 201-208.
- YANG Jr-S. and LAI E.C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular Cell* **43**, 892-903.
- YANG Z., JAKYMIW A., WOOD M.R., EYSTATHIOY T., RUBIN R.L., FRITZLER M.J. and CHAN E.K. (2004). GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during cell cycle and cell proliferation. *Journal of Cell Science* **vol. 117 n°23**, 5567-5578.
- YAO Y., ZHAO Y., XU H., SMITH L.P., LAWRIE C.H., SEWER A., ZAVOLAN M. and NAIR V. (2007). Marek's disease virus type 2 (MDV-2)-encoded microRNAs show no sequence conservation with those encoded by MDV-1. *Journal of Virology* **vol. 81 n°13**, 7164-7170.
- YAO Y., ZHAO Y., SMITH L.P., LAWRIE C.H., SAUNDERS N.J., WATSON M. and NAIR V. (2009). Differential expression of microRNAs in Marek's disease virus-transformed T-lymphoma cell-lines. *Journal of General Virology* **90**, 1551-1559.
- YI R., QIN Y., MACARA I.G. And CULLEN B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and chort hairpin RNAs. *Genes & Development* **vol. 17 issue 24**, 3011-3016.
- YOUNG L.S. and RICKINSON A.B. (2008). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer* **vol. 4 issue 10**, 757-768.
- ZENG Y. and CULLEN B.R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **vol. 100 no. 17**, 9779-9784.

ZENG Y. and CULLEN B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin-5. *Nucleic Acids Research* **vol. 32 no. 16**, 4776-4785.

ZENG Y., YI R., CULLEN B.R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO Journal* **24**, 138-148.

ZHAO Y., YAO Y., XU H., LAMBETH L., SMITH L.P., KGOSANA L., WANG X. and NAIR V. (2009). A functional microRNA-155 ortholog encoded by the oncogenic Marek's disease virus. *Journal of Virology* **vol. 83 issue 1**, 489-492.

ZHAO Y., XU H., YAO Y., SMITH L.P., KGOSANA L., GREEN J., PETHERBRIDGE L., BAIGENT S.J. and NAIR V. (2011). Critical role of the virus-encoded miRNA-155 ortholog in the induction of Marek's disease lymphomas. *PLoS Pathogens* **vol. 7 issue 2**, e1001305.







Nom : CELY

Prénom : Isabelle

Titre : Rôle des microARN lors des infections par les virus animaux et humains.

Résumé. Les microARN sont de petits ARN simple brin d'environ 22 nucléotides, dépourvus de queue poly(A) et de coiffe en 3', qui interviennent dans l'interférence ARN, un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes. Ils jouent un rôle majeur dans nombre de fonctions biologiques et forment un réseau sophistiqué dont la dérégulation peut entraîner de multiples affections. Certains virus produisent leurs propres microARN et interagissent avec les microARN cellulaires, régulant ainsi des gènes viraux mais aussi cellulaires, avec trois avantages conséquents : prolongement de la longévité des cellules infectées, échappement au système immunitaire et régulation des phases latente et lytique du cycle viral. Bien que tous les herpès virus n'encodent pas de microARN, la majorité des virus en encodant appartiennent à cette famille, dont une caractéristique majeure est la latence, durant laquelle l'expression du génome viral doit être minimale. Il existe ainsi des interactions complexes entre les cellules infectées, le système immunitaire, mais aussi les transformations oncogènes, dans lesquelles les microARN viraux et cellulaires ont un rôle non négligeable.

Mots-clefs. Virus, microARN viraux, microARN cellulaires.

Summary. MicroRNAs are approximately 22-nt-long noncoding RNAs, with no polyA tail and no cap in 3', which take part in RNA interference, a posttranscriptional regulation mechanism in gene expression. They play a major role in a number of biological functions and form a sophisticated network, the deregulation of which can be at the origin of multiple affections. Some viruses produce their own microRNAs and interact with cellular microRNAs, thus regulating viral but also cellular genes, with three substantial plusses: increased longevity of the infected cells, escape from the immune system and regulation of the latent and lytic phases of the viral cycle. Although all herpes viruses do not encode microRNAs, the majority of viruses encoding them belong to this family, a major characteristic of which is the latency during which the expression of the viral genome must be minimal. Thus, there are complex interactions among infected cells, within the immune system and among oncogenic transformations in which viral and cellular microRNAs play a significant role.

Key words. Virus, viral miRNA, cellular miRNA.