



HAL
open science

Etude de la régulation de l'expression des microARN de l'herpesvirus associé au sarcome de Kaposi

Maud Contrant

► **To cite this version:**

Maud Contrant. Etude de la régulation de l'expression des microARN de l'herpesvirus associé au sarcome de Kaposi. Cancer. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT: 2014STRAJ046 . tel-01240699

HAL Id: tel-01240699

<https://theses.hal.science/tel-01240699>

Submitted on 9 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE 414

IBMC - Unité ARN – UPR 9002

THÈSE présentée par :

Maud CONTRANT

soutenue le : **26 septembre 2014**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaire et cellulaire de la Biologie

**Etude de la régulation de l'expression
des microARN de l'herpesvirus associé
au sarcome de Kaposi**

THÈSE dirigée par :

Mr PFEFFER Sébastien

DR, IBMC - Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BENNASSER Yamina

Mr SARGUEIL Bruno

CR, Institut de Génétique humaine de Montpellier

DR, LCRB - Université Paris Descartes

EXAMINATRICE

Mme ROMBY Pascale

DR, IBMC - Université de Strasbourg

Cette thèse a été financée par la Ligue contre le Cancer. Je les remercie de m'avoir attribué une bourse pour ce travail. La thèse a été réalisée au sein du laboratoire « ARN non codants et infections virales » de l'Université de Strasbourg. Ce dernier est membre de l'UPR 9002 de l'institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg, dirigée par Eric Westhof, que je remercie pour son accueil.

Je tiens à remercier particulièrement Sébastien Pfeffer et Aurélie Fender pour avoir dirigé ce travail de thèse.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
INTRODUCTION	5
A. LES MICROARN, DES ACTEURS ESSENTIELS DE LA RELATION HOTE-VIRUS (ARTICLE DE REVUE)	8
B. L'HERPESVIRUS ASSOCIE AU SARCOME DE KAPOSI (KSHV)	9
I. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES	9
1. CLASSIFICATION	9
2. STRUCTURE VIRALE ET GENOMIQUE	9
3. SOUCHES VIRALES ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE	9
4. PREVALENCE DU KSHV	10
5. VOIES DE TRANSMISSION DU KSHV	11
II. MALADIES ASSOCIEES AU KSHV	11
1. LE SARCOME DE KAPOSI	11
a. Définition et découverte	11
b. Manifestations cliniques	11
c. Pathogénie	14
d. Prévalence et distribution géographique du SK	14
e. Traitements médicaux	15
2. LE LYMPHOME PRIMITIF DES SEREUSES	15
3. LA MALADIE MULTICENTRIQUE DE CASTELMAN	16
III. CYCLE VIRAL ET EXPRESSION DES GENES	16
1. CYCLE VIRAL	16
2. ALTERNANCE DES PHASES LYTIQUES ET LATENTES	17
IV. MODELES D'ETUDE DU KSHV ET DE SA PATHOGENESE	19
1. CULTURE CELLULAIRE	19
2. VIRUS RECOMBINANTS	20
3. MODELES ANIMAUX	20
V. LES MIARN DU KSHV	21
1. DECOUVERTE ET ORGANISATION GENOMIQUE	21
2. EXPRESSION	22
3. HOMOLOGUES DES MIARN DU KSHV	23
4. POLYMORPHISME ET ISOMIR	23
5. ROLE DES MIARN DU KSHV	24
C. LES MICROARN	26
I. GENERALITE SUR LES MIARN	26
1. PREDICTION DE TIGE-BOUCLE CONTENANT DES MIARN	26
2. DENOMINATION DES MIARN	26
3. BIOGENESE DES MIARN	26
II. FORMATION ET EVOLUTION DES MIARN	27
1. EXPRESSION DES MIARN	27
a. Différents modes d'expression	27

b.	Modèles d'expression des miARN introniques	28
2.	MIARN EN CLUSTER	29
a.	Formation des cluster	29
b.	Conservation et évolution des clusters de miARN	29
3.	EVOLUTION DES MIARN	29
a.	Regroupement en famille	29
b.	Emergence de nouveaux miARN	30
c.	Expression des nouveaux miARN	30
III.	REGULATION DES MIARN	31
1.	REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE	32
2.	MICROPROCESSEUR	33
3.	EXPORT	33
4.	DICER	33
5.	ACTIVITE	34
D.	LE MICROPROCESSEUR	36
I.	COMPOSITION ET ROLES DANS LA BIOGENESE DES MIARN	36
1.	GENERALITE	36
2.	CO-FACTEURS	36
II.	FONCTIONS ALTERNATIVES	37
1.	FONCTIONS ALTERNATIVES DE DROSHA	37
2.	FONCTIONS ALTERNATIVES DE DGCR8	37
3.	REGULATION DES TRANSPOSONS ET RETROTRANSPOSONS PAR LE MICROPROCESSEUR	38
III.	STRUCTURE DU MICROPROCESSEUR	38
1.	COMPOSITION ET STRUCTURE DE DROSHA	38
2.	COMPOSITION ET STRUCTURE DE DGCR8	38
IV.	RECONNAISSANCE ET CLIVAGE DU PRI-MIARN	39
	OBJECTIFS DE LA THESE	41
	RESULTATS	45
A.	ROLE DE DROSHA DANS L'EXPRESSION DES MIARN DU KSHV	46
I.	PRINCIPE DE L'EXPERIENCE	46
II.	RESULTATS	46
1.	KNOCK-DOWN DE DROSHA	46
2.	EXPRESSION DES MIARN DU KSHV APRES KNOCK-DOWN DE DROSHA	47
III.	MATERIEL ET METHODES	47
1.	LIGNEE CELLULAIRE	47
2.	KNOCK-DOWN DE DROSHA PAR SIARN	48
B.	ROLE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE ET DE LA POSITION DANS LE TRANSCRIT PRIMAIRE DES TIGES-BOUCLES CODANT LES MIARN INTRONIQUEES DANS LA VARIATION D'EXPRESSION DES MIARN DU KSHV	49
I.	PRINCIPE DE L'EXPERIENCE	49
1.	MODIFICATION DE L'ARN	49
2.	RETRO-TRANSCRIPTION PAR EXTENSION D'AMORCE COUPLEE A DES FLUOROCHROMES	50
3.	TRAITEMENT DES DONNEES	50
4.	UTILISATION DU SHAPE	51
II.	RESULTATS : IMPORTANCE OF THE RNA SECONDARY STRUCTURE FOR THE RELATIVE ACCUMULATION OF CLUSTERED VIRAL MICRORNAS	51

<u>C. DETERMINATION DE L'EFFICACITE DE CLIVAGE PAR DROSHA DU TRANSCRIT PRIMAIRE INTRONIQUE DES MIARN DU KSHV</u>	52
I. OBJECTIFS	52
II. EXPERIENCES	53
1. TEST DE MATURATION <i>IN VITRO</i> DU TRANSCRIT INTRONIQUE AVEC UN EXTRAIT CELLULAIRE TOTAL	53
a. Principe de l'expérience	53
b. Résultats	53
2. TESTS DE MATURATION <i>IN VITRO</i> DU TRANSCRIT INTRONIQUE DU KSHV AVEC DROSHA ET DGCR8 PURIFIEES	56
a. Principe et optimisations	56
b. Résultats	57
III. CONCLUSIONS	58
IV. MATERIEL ET METHODES	59
1. LIGNEE CELLULAIRE	59
2. TESTS DE MATURATION <i>IN VITRO</i>	59
a. Production des ARN par transcription <i>in vitro</i>	59
b. Préparation de Drosha/DGCR8 recombinates	59
c. Test de maturation <i>in vitro</i>	59
<u>D. IDENTIFICATION DE PROTEINES ACCESSOIRES IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DES MIARN INTRONIQUES DU KSHV</u>	61
I. OBJECTIFS	62
II. EXPERIENCES DE CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	62
1. PRINCIPE DE L'EXPERIENCE	62
2. RESULTATS	63
a. Vérifications de la purification par les billes couplées à l'ARN sur gel de polyacrylamide et coloration au nitrate d'argent	63
b. Qualité et abondance des protéines	64
c. Identification des protéines par spectrométrie de masse	65
III. MATERIEL ET METHODES	68
1. CULTURE CELLULAIRE	68
a. Lignées cellulaires	68
b. Préparation de l'extrait cellulaire	68
2. PREPARATION DES ARN ET DES BILLES D'AGAROSE	68
a. Production des ARN	68
b. Préparation des billes d'agarose et liaison à l'ARN	69
c. Gel au nitrate d'argent	69
3. SPECTROMETRIE DE MASSE	70
<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	72
<u>A. ROLE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE ET DE LA POSITION DES TIGES-BOUCLES CODANT LES MIARN DU KSHV</u>	74
I. CONCLUSIONS	74
II. PERSPECTIVES DES EXPERIENCES	75
<u>B. VARIATIONS D'EFFICACITE DU CLIVAGE DU PRI-MIARN INTRONIQUE DU KSHV PAR DROSHA</u>	76
I. CONCLUSIONS	76
II. PERSPECTIVES	77

C. IDENTIFICATIONS DE PROTEINES MODULANT LA MATURATION DES MIARN INTRONQUES DU KSHV	78
I. CONCLUSIONS	79
II. PERSPECTIVES	80
D. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES	81
BIBLIOGRAPHIE	85

INTRODUCTION

Les microARN (miARN) sont des petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides régulant l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle. Leur action est déterminante d'une part dans la régulation de nombreux processus physiologiques comme la différenciation cellulaire ou le développement embryonnaire et d'autre part dans des processus pathologiques tels que le cancer puisqu'ils agissent sur la prolifération cellulaire. Un miARN peut cibler plus d'une centaine d'ARN messagers (ARNm) complémentaires avec lesquels il forme un réseau sophistiqué de régulation. Une dérégulation de l'expression d'un miARN va impacter directement sur le taux des cibles, ainsi un miARN non fonctionnel ou non produit va entraîner une surexpression aberrante des cibles ou inversement une surexpression du miARN va amener à une répression excessive de la cible. Ces dysfonctionnements sont directement liés à certaines pathologies cancéreuses.

Les miARN sont retrouvés chez quasiment tous les organismes eucaryotes à quelques exceptions près (voir sur le site www.mirbase.org). Ils représentent la classe de petits ARN non codants la mieux étudiée chez les mammifères. Il existe également des miARN spécifiques des virus (v-miARN). La majorité des virus exprimant des miARN sont les virus à ADN et spécifiquement les herpèsvirus. La coévolution entre virus et cellule hôte a permis aux virus de contrôler les processus cellulaires à leur avantage, en partie grâce à l'action des miARN viraux mais aussi cellulaires. Cette stratégie permet aux virus de moduler la prolifération virale, l'échappement au système immunitaire et l'alternance des phases de latence (expression minimale du génome viral) et lytique (réplication virale).

Ce mémoire se focalise sur la régulation des miARN viraux dans le cas précis de l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV). Premièrement un article de revue, publié dans le journal *Virologie*, va introduire la relation entre virus et miARN et exposer leurs différents modes d'action sur les cibles cellulaires mais aussi virales. Cette revue permet de comprendre en quoi une régulation fine et précise de l'expression des miARN est importante. Je continuerai en présentant le virus KSHV en détail, à savoir sa pathogénèse, son cycle viral et la localisation génomique, l'expression et les rôles de ses miARN. En effet, le KSHV code pour plusieurs miARN regroupés en un cluster unique. J'introduirai ensuite les généralités, les voies d'expression et les mécanismes d'évolution des miARN chez les mammifères. La biosynthèse des miARN nécessite d'être hautement régulée, dans cette partie de l'introduction je m'attarderai également, à montrer les différentes étapes de cette

régulation et enfin la dernière partie se focalisera sur le microprocesseur, le complexe enzymatique initiant la maturation des miARN.

A. Les microARN, des acteurs essentiels de la relation hôte-virus (article de revue)

Les microARN, des acteurs essentiels de la relation hôte-virus

Maud Contrant, Aurélie Fender et Sébastien Pfeffer

Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, Institut de biologie moléculaire
et cellulaire du CNRS, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg cedex

spfeffer@unistra.fr

Résumé. Les microARN sont des petits ARN régulateurs retrouvés dans presque tous les eucaryotes. Ils participent à la régulation de processus fondamentaux tels que la différenciation tissulaire ou le contrôle du cycle cellulaire. De façon intéressante, certains virus renferment leurs propres gènes de miARN. Ces derniers peuvent agir en cis et cibler le génome viral, ou en trans et affecter l'expression des ARNm de l'hôte. Ainsi, les miARN, qu'ils soient cellulaires ou viraux, se retrouvent au cœur des interactions hôte-virus. Dans cette revue, nous présentons tout d'abord les virus exprimant des miARN ainsi que leur mode d'expression. Puis, nous décrivons les rôles des miARN cellulaires et viraux au cours de l'infection virale. Ce domaine d'investigation représente un nouveau pan de la recherche en virologie, qui promet des découvertes très riches et des perspectives en matière de thérapie.

Mots clés : microARN, régulation de gènes, interactions hôte-pathogène

Abstract. MicroRNAs are small regulators, found in almost all eukaryotes. They are involved in key cellular process such as tissue differentiation or cell cycle regulation. Interestingly, some viruses encode their own set of miRNA genes. Viral miRNAs can act in cis by targeting the viral genome or in trans by affecting the expression of host mRNAs. Thus, be they viral or cellular, miRNAs are at the heart of host-pathogen interactions. In this review, we first present the viruses that encode miRNAs and how these are expressed in the host cells. Second, we describe the biological roles of viral and cellular miRNAs during infection by several representative examples. This domain of investigation has seen tremendous interest in the past few years, and might lead to the development of new therapeutics in a near future.

Key words: microRNA, gene regulation, host-pathogen interactions

Introduction

Le flux de l'information génétique est le dogme fondateur de la biologie moléculaire où l'ADN et l'ARN occupent une place centrale. Depuis une dizaine d'années, on a assisté à l'émergence d'une nouvelle classe d'ARN non codants impliquée dans un processus régulateur fondamental du génome : l'extinction de l'expression de gènes effectuée par l'ARN ou « RNA silencing ». Il s'agit d'un phénomène universel, retrouvé dans tous les règnes du vivant. Il possède un rôle dans le développement, la réponse au stress, la signalisation hormonale, la défense antivirale, etc. Les premières observations du RNA silencing remontent au début des années 90 avec les travaux menés sur des pétunias par l'équipe du Dr Richard Jorgensen [1]. Peu de temps après, en 1993, l'effet régulateur de petits ARN non-codants fut caractérisé pour la première fois chez le nématode *C. elegans*. En effet, un petit ARN provenant du gène *lin-4* régule négativement le taux de protéines LIN-14 en se fixant de façon complémentaire à son ARN messenger (ARNm) [2]. Quelques années plus tard, on découvre un autre petit ARN chez *C. elegans*, *Let-7*, qui régule l'expression du gène *lin-41* [3]. Mais la mise en évidence d'une nouvelle classe de petits ARN, baptisés microARN (miARN), n'apparaît qu'après la réalisation que *Let-7* a été conservé au cours de l'évolution [4] : en 2001, trois papiers publiés dans le journal *Science* décrivent l'existence d'une centaine de miARN chez l'homme, la drosophile et le nématode [5–7]. Enfin, A. Fire et C. Mello ont obtenu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006 pour leur découverte du mécanisme d'ARN interférence (ARNi) chez *C. elegans* [8].

Chez les eucaryotes, trois grandes catégories de petits ARN régulateurs ont été caractérisées à ce jour : les petits ARN interférants (« small interfering RNA ») ou siARN, les piARN (« piwi-interacting RNA ») dont nous ne parlerons pas ici, et les miARN. Ces petits ARN se distinguent par leurs origines, leurs structures, leurs partenaires protéiques et leurs rôles biologiques. Ainsi, les siARN et les miARN sont caractérisés par leur précurseur ARN double brin (db) et leur association avec des protéines membres de la famille Argonaute (Ago).

De manière canonique, chez les animaux, les miARN subissent deux étapes de maturation successives dans le noyau puis le cytoplasme à partir d'un transcrit primaire (pri-miARN) synthétisé par l'ARN polymérase II. La première étape de maturation est effectuée par une RNase III, Droscha, associée à son co-facteur DGCR8 (« DiGeorge critical syndrome region gene 8 ») pour générer le précurseur miARN (pré-miARN) d'environ 60-70 nucléotides, replié en tige-boucle. Après exportation dans le cytoplasme par l'exportine 5/RanGTPase, le pré-miARN subit une seconde étape de maturation par Dicer (également une RNase III) associé à son cofacteur TRBP (« TAR RNA binding protein »). Il existe des voies alternatives

de biogenèse des miARN cellulaires, indépendantes de Drosha ou Dicer. On peut citer les mirtrons, qui sont des miARN introniques dont la forme pré-miARN est excisée directement par épissage, et donc indépendamment de Drosha. Que ce soit de manière Drosha-dépendante ou indépendante, un des deux brins du duplex généré, le brin guide, est incorporé dans le complexe effecteur RISC (« RNA-induced silencing complex ») contenant invariablement une protéine de la famille Argonaute (Ago). Ce complexe, guidé par la séquence du miARN, et plus spécifiquement par sa partie 5' aussi appelée « seed » (graine), va réprimer spécifiquement l'expression du ou des ARNm cible(s). Un miARN peut réguler des centaines de cibles différentes, et des ARNm peuvent être ciblés par l'action concertée de plusieurs miARN de séquences différentes. La base de données miRBase (www.mirbase.org) [9] recense actuellement plus de 24000 séquences de miARN réparties dans 206 espèces. Pour plus de détails sur la biogenèse et les mécanismes d'action des miARN, voir la revue [10].

Récemment, il a été mis en évidence que certains virus infectant les mammifères codaient leurs propres miARN. Ainsi, les premiers miARN d'origine virale ont été identifiés chez le virus d'Epstein-Barr (EBV) en 2004 [11]. Il existe une relation étroite entre les virus et leurs hôtes puisque l'expression des miARN viraux dépend entièrement de la machinerie cellulaire de l'hôte. Dans cette revue, nous allons nous intéresser aux caractéristiques et propriétés des miARN viraux et montrer que ceux-ci peuvent favoriser la persistance de l'infection, la régulation de la réponse immunitaire innée, ou encore les pathologies associées à l'infection. Nous verrons également comment les virus interagissent avec les miARN d'origine cellulaire, et ce à la fois de façon positive ou négative pour le déroulement de l'infection.

Les miARN viraux

De nombreux gènes ou fonctions cellulaires sont retrouvés en commun entre les virus et leurs cellules hôtes, et la découverte des premiers miARN codés par le virus EBV [11] vient à nouveau illustrer ce phénomène de co-évolution. Ceci est finalement loin d'être étonnant puisque les miARN sont au cœur de la régulation de processus cellulaires clés et constituent donc des outils formidables pour les virus. Grâce à l'avènement du séquençage à haut-débit de banques de petits ARN, on recense à ce jour près de 493 miARN provenant de virus variés infectant des animaux, des invertébrés aux vertébrés.

• *Les microARN codés par des virus à ADN*

La majorité des miARN d'origine virale caractérisée à ce jour a été découverte chez des virus à ADN (voir Tableau 1). Ceci découle probablement de l'accessibilité du génome à la machinerie de biogenèse des miARN qui commence dans le noyau. Le nombre de miARN varie beaucoup d'un virus à l'autre, allant de 1 pour les polyomavirus à 36 pour le lymphocryptovirus du singe rhésus (rLCV). Si certains virus évolutivement proches comme EBV et rLCV ou les herpèsvirus simplex 1 et 2 (HSV-1 et -2) possèdent des miARN homologues [12–14], les séquences des miARN viraux sont généralement peu conservées, reflétant des histoires évolutives différentes et en relation avec la spécificité du virus pour l'hôte. D'ailleurs, ceci se matérialise par l'existence de miARN viraux partageant des séquences similaires à certains miARN cellulaires/de leur hôte. Par exemple miR-K11 de l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV) et miR-M4 du virus de la maladie de Marek (MDV-1) possèdent la même région « seed » et régulent les mêmes ARNm cibles que le miARN cellulaire miR-155 [15,16]. Les gènes de miARN peuvent être répartis dans tout le génome comme chez les cytomégalovirus, ou regroupés dans des zones particulières comme la région associée à la latence (KSHV), dans des régions répétées internes (HSV-1 et -2) ou terminales (le roséolovirus HHV-6), ou encore au niveau de l'origine de réplication lytique (HSV-1). La localisation génomique des miARN de certains herpèsvirus humains est schématisée Figure 1.

La famille des Herpesviridae compte le plus grand nombre de virus codant des miARN, avec en moyenne le plus grand nombre de miARN par génome. Cette famille regroupe plus de 100 virus connus, infectant les animaux ou les êtres humains (HHV-1 à -8). Bien que la plupart du temps bénignes, les infections causées par les HHV chez des patients immunodéprimés peuvent causer des affections graves telles que cancers, atteintes neurologiques, etc. Les herpèsvirus possèdent de grands génomes à ADN db linéaire (de 120 à 240 kb) qui codent

100 à 200 gènes et qui se maintiennent sous forme d'épisomes dans le noyau de l'hôte lors de la phase de latence. Ils sont répartis en trois sous-familles, α -, β - et γ -herpesvirinae. À ce jour, 6 HHV sur 8 expriment des miARN, à savoir au moins un représentant de chaque sous-famille. Parmi les α -herpèsvirus, HSV-1 et -2 (respectivement responsables de l'herpès buccal et génital) expriment des miARN pendant la phase de latence. La famille des β -herpèsvirus comprend les cytomégalovirus (CMV) et les roséolovirus HHV-6 et HHV-7. Le cytomégalovirus humain (HCMV, pouvant être associé à des syndromes mononucléosiques ou des pneumopathies) et le roséolovirus HHV-6B (responsable de la roséole infantile) expriment des miARN en phase lytique, lors de la production virale, à l'inverse de HSV-1 et -2. Enfin, les γ -herpèsvirus KSHV (agent étiologique du sarcome de Kaposi, aussi associé à des lymphomes agressifs de type B) et EBV (responsable de la mononucléose infectieuse et associé à des cancers lymphoprolifératifs) codent de multiples miARN regroupés en cluster (Figure 1). À ce jour, aucun miARN n'a été identifié chez le roséolovirus HHV-7, qui est un proche relatif de HHV-6, et le virus de la varicelle (VZV ou HHV-3, membre des α -herpèsvirus) [17]. Dans ce dernier cas, la recherche de miARN a été réalisée à partir de cellules des ganglions trigéminaux infectés de façon latente. Il reste possible que VZV exprime des miARN dans d'autres types cellulaires et à d'autres stades infectieux.

Des miARN ont également été retrouvés chez des herpèsvirus infectant d'autres primates (RhCMV, rLCV, RRV, HVS), des rongeurs (MCMV, MHV68) ou des oiseaux (MDV-1 et -2) (voir Tableau 1). Les herpèsvirus infectant les oiseaux semblent constituer des réservoirs importants de gènes de miARN. Ces virus sont particulièrement étudiés car ils représentent des menaces sanitaires et économiques dans les élevages de poulets, tels que MDV-1 associé à la maladie de Marek et le virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV).

Les gènes de miARN ne sont pas cantonnés aux génomes d'herpèsvirus mais ont aussi été identifiés, bien que dans une moindre mesure, dans les génomes de virus de la famille des Adenoviridae et des Polyomaviridae (virus simien 40, et virus humains BK et JC). Les virus BK et JC sont largement répandus dans la population humaine. Ils existent sous forme latente dans les cellules rénales, les lymphocytes et les monocytes. Ce sont des pathogènes opportunistes, souvent asymptomatiques mais pouvant causer des pathologies importantes en cas d'immunodépression. Par rapport aux herpèsvirus, le génome des polyomavirus est simple, composé d'ADN db circulaire d'environ 5 kb, codant 5-9 protéines et comprenant 3 régions : une région régulatrice contenant l'origine de réplication et des promoteurs pour la transcription précoce et tardive ; la région dite précoce qui code 2 à 4 antigènes tumoraux (antigènes petit et grand T) ; et la région dite tardive qui code les protéines structurales. C'est

au niveau de l'antigène grand T que l'on retrouve, codé sur le brin antisens, un pré-miARN. Ce dernier donne lieu à deux miARN fonctionnels, tous deux responsables de la répression de l'expression du grand antigène T [18,19].

Les adénovirus possèdent des génomes d'ADN db linéaire (35 à 36 kb), les deux brins d'ADN présentant à leurs extrémités des séquences répétées inversées qui permettent aux molécules linéaires de se circulariser. L'adénovirus humain de type 2 (associé à des affections respiratoires) code un long ARN VAI, très abondant dans les cellules infectées. Cet ARN est très structuré et interagit avec la machinerie de biogenèse des miARN et les miARN produits sont incorporés dans le complexe effecteur RISC [20]. Cependant, au vu de la faible abondance des miARN viraux produits comparée à la surreprésentation du précurseur VAI, il semblerait que la fonction principale de cet ARN soit de saturer la machinerie cellulaire, comme la voie d'exportation des miARN via l'exportine 5 ou leur maturation cytoplasmique par Dicer [21].

À ce jour, l'existence de miARN de virus de la famille des Papillomaviridae reste ambiguë. Alors qu'une étude reposant sur le séquençage de petits ARN provenant de cellules infectées par le papillomavirus HPV-31, en phase de latence et lytique, n'a pu mettre en évidence de miARN [22], plusieurs gènes de miARN ont été prédits dans les génomes de 8 autres HPV [23]. Toutefois, la réalité de ceux-ci et leur lien direct avec la voie de biogenèse des miARN restent à prouver.

Enfin, des miARN ont été retrouvés chez des virus infectant des invertébrés : des poissons (Iridovirus) et des insectes (Ascovirus, Baculovirus et Nudivirus) [24–27].

• *Les microARN codés par des virus à ARN*

L'existence de miARN codés par des virus à ARN a été longtemps controversée. En effet, l'excision en cis de miARN à partir de l'ARN génomique, antigénomique, sous-génomique ou des ARNm, serait délétère pour le virus et ne constituerait pas un avantage sélectif. Le rétrovirus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) a été un des premiers virus à ARN pour lequel des miARN ont été identifiés dans des cellules infectées (voir pour revue [28]). Toutefois leur validité reste encore le sujet de vifs débats dus à la faible abondance de ces miARN, à leur non conservation entre les différentes souches virales, au manque de caractérisation biologique de leur fonction et à la discordance entre les résultats de différents laboratoires [29,30]. Par ailleurs, les tentatives d'identification de miARN par séquençage classique ou à haut-débit à partir d'ARN extraits de cellules infectées par des virus à ARN simple brin (sb) de polarité positive (+) (virus de l'hépatite C et de la fièvre jaune, de la

famille des Flaviviridae) ou de polarité négative (-) (virus influenza A, de la famille des Orthomyxoviridae) ont échoué [30,31]. Récemment, deux groupes indépendants ont pu montrer la faisabilité biologique de l'expression de miARN par des virus à ARN. L'insertion d'une tige-boucle d'un précurseur de miARN dans les génomes du virus Sindbis (SINV, virus à ARN sb (+) de la famille des Togaviridae) ou du virus influenza A suffit à l'accumulation des miARN correspondants [32,33]. De façon intéressante, ceci se fait sans affecter la réplication virale, et potentiellement dans le cytoplasme dans le cas de SINV, qui est un virus dont le cycle est restreint à ce compartiment. S'en est suivie la découverte de miARN viraux naturellement produits dans des cellules d'insectes infectées par le virus du Nil occidental (WNV, virus à ARN sb (+) de la famille des Flaviviridae) [34] et dans des cellules de bœuf infectées par le virus de la leucémie bovine (BLV, de la famille des Retroviridae) [35]. De façon originale, le virus BLV exprime 5 pré-miARN à partir d'un ARN sous-génomique transcrit par l'ARN polymérase III, contrecarrant ainsi la déstabilisation de l'ARN génomique qui est un transcrit pol II. Les détails de la maturation subséquente de ces pré-miARN ne sont pas connus. Les auteurs ont pu prédire bioinformatiquement des structures en tige-boucle de pré-miARN à partir de transcrits pol III d'autres rétrovirus, comme les spumavirus, mais l'existence de ceux-ci reste à confirmer.

• *Expression des miARN viraux*

La biogenèse des miARN viraux emprunte la machinerie de l'hôte, en suivant la voie canonique pour la majorité d'entre eux. Il n'y a pour l'instant pas d'évidence de facteurs spécifiques viraux impliqués.

Cependant, certains miARN viraux empruntent des voies alternatives de biogenèse (Figure 2). Par exemple, les miARN du rétrovirus BLV sont produits par l'ARN polymérase III et sont maturés, indépendamment de Drosha, par une enzyme dont l'identité reste à découvrir [35]. Les miARN de l'herpèsvirus murin 68 (MHV68) font partie d'un bicistron généré par l'ARN pol III, en aval d'une structure de type ARNt [30,36]. L'extrémité 5' des pré-miARN est libérée après clivage par la tRNase Z, tandis que l'extrémité 3' pourrait être générée par clivage ou par terminaison alternative. De façon similaire, les miARN de l'herpèsvirus saimiri (HVS) sont transcrits sous forme fusionnée, en 3' de la séquence d'ARN HSURs (« HVS Sm class U RNA »). Leur maturation est également indépendante de Drosha, puisque leur extrémité 5' est générée par le complexe Intégrateur de l'hôte [37]. Enfin, il a été montré qu'un virus à ARN sb (+) restreint au cytoplasme, SINV, pouvait exprimer des miARN à partir d'un précurseur inséré dans son ARN génomique. Ceci soulève la question d'une

localisation des partenaires nucléaires de la biogenèse des miARN dans le cytoplasme. Si une fraction de Drosha a pu être observée dans ce compartiment, son co-facteur DGCR8, essentiel pour la reconnaissance de l'ARN, en est absent. Ceci suggère l'existence d'un nouveau co-facteur cytoplasmique dont l'identité est encore inconnue.

Le profil d'expression spatio-temporelle des miARN viraux a été étudié dans différents modèles : cellules en culture, tissus de patients ou modèles animaux. Le tropisme d'expression des miARN viraux est généralement celui des cellules infectées par le virus. Toutefois, les miARN d'EBV peuvent être transmis aux cellules environnantes non infectées, via des vésicules. De façon intéressante, les miARN transmis restent pleinement fonctionnels dans les cellules receveuses [38]. Les miARN peuvent être détectés dans les lésions associées à la pathologie du virus, comme par exemple les miARN du KSHV dans le sarcome de Kaposi, [39]. Dans le cas d'EBV et KSHV, les miARN peuvent aussi être incorporés dans les particules virales [40,41]. Ils auraient dans ce cas un rôle dans la phase très précoce de l'infection. En ce qui concerne la cinétique d'expression des miARN viraux, plusieurs études *in vivo* montrent que le taux d'expression des miARN de MCMV, RCMV et MDV-1 varie entre les tissus infectés et au cours de l'infection [42–44]. Ainsi, les miARN pourraient servir de biomarqueurs des maladies associées aux virus et plus finement des différents stades de ces maladies.

Rôle des miARN cellulaires et viraux lors de l'infection virale

De façon générale, il existe une convergence fonctionnelle des miARN cellulaires ou viraux vers la régulation de grandes voies de signalisation mettant en jeu la prolifération et la survie du virus. Les interactions entre miARN, virus et hôtes sont très diversifiées et des exemples représentatifs de cette richesse sont discutés dans les parties qui suivent (voir également Figure 3). Les miARN viraux peuvent cibler des ARNm viraux mais aussi cellulaires. De plus, les miARN cellulaires peuvent avoir un rôle bénéfique pour les virus, ou inversement participer au système de défense de l'hôte en ciblant des ARNm viraux.

• Régulation de la réplication virale

Les miARN cellulaires peuvent être impliqués dans la défense anti-virale. Par exemple, il a été montré que le miARN cellulaire humain miR-32 limite la réplication du rétrovirus de primate Foamy de type 1 (PFV-1) dans les cellules humaines en culture [45]. Ceci se fait par le ciblage spécifique des ARNm exprimés par le virus. Ce dernier code un suppresseur de « silencing » : le transactivateur de transcription Tas qui réprime l'expression de miR-32.

Ceci a pour effet de contrecarrer la défense de l'hôte. De la même manière, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) est régulé négativement par l'action de deux miARN cellulaires, miR-24 et miR-93 [46].

De façon intéressante, des miARN cellulaires peuvent avoir un rôle bénéfique pour certains virus. Le plus connu des exemples est celui du virus de l'hépatite C (HCV). Le site primaire de réplication de ce virus est le foie, et la maladie peut évoluer en hépatite chronique, responsable de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire (cancer primitif du foie). Le tropisme cellulaire de ce virus est dû d'une part aux récepteurs d'entrée présents à la surface des hépatocytes et d'autre part au rôle du métabolisme des lipides dans ces cellules. De plus, les hépatocytes possèdent des protéines qui sont associées aux VLDL (lipoprotéines de très faible densité) et qui sont impliquées dans l'assemblage final de la particule virale. Une autre particularité des hépatocytes est l'accumulation abondante de miR-122 (environ 70% de la population totale des miARN du foie). De manière inattendue, ce miARN favorise la traduction et la réplication du virus en s'appariant à deux sites de séquences complémentaires en 5'UTR de l'ARN génomique virale [47]. Cette dépendance du virus HCV au miR-122 a d'ailleurs été exploitée pour développer une nouvelle stratégie thérapeutique contre ce virus en bloquant le miARN à l'aide d'oligonucléotides antisens [48]. Cet exemple illustre la co-évolution des virus avec leur environnement cellulaire. Plus récemment, dans le cas virus Hendra, il a été montré qu'un miARN cellulaire (miR-146a) favorise de façon indirecte la réplication virale [49]. Le virus Hendra est membre de la famille des Paramyxoviridae. Il peut infecter plusieurs espèces différentes dont l'humain et le cheval ; il provoque des symptômes respiratoires et des encéphalites chez le premier, ainsi que des œdèmes pulmonaires chez le second. Le taux de miR-146a est élevé dans le sang de chevaux infectés et augmente significativement suite à l'infection de cellules humaines en culture. MiR-146a favoriserait la production virale en activant, de façon indirecte par la régulation négative d'un facteur d'ubiquitination (RNF11), l'expression du facteur de transcription NF- κ B. Ce facteur peut être associé à la régulation de l'apoptose des cellules infectées, de façon positive ou négative en fonction des virus. Par exemple, NF- κ B augmente de façon directe la réplication du virus du VIH-I en reconnaissant un promoteur viral [50]. Dans le cas du virus Hendra, le rôle positif de l'activité NF- κ B n'est pas encore compris et est en cours d'investigation.

• Rôle dans l'alternance entre phases lytique et latente

Nous abordons ici un point crucial au maintien du virus qui est l'alternance entre phases lytique et de latence. La phase de latence permet aux virus d'échapper au système immunitaire et donc d'induire la persistance virale tandis que la phase lytique correspond à la période de réplication et de dissémination des particules virales.

Les herpèsvirus sont bien connus pour leur capacité à alterner entre ces deux phases et certains d'entre eux utilisent leurs propres miARN pour contrôler le maintien de la latence et/ou l'induction de la phase lytique.

HSV-2 établit sa latence dans le système nerveux périphérique et principalement dans les ganglions de la racine dorsale. La protéine tardive ICP34.5 est un facteur de neurovirulence nécessaire pour la réplication qui s'exprime à partir d'un transcrite antisens à un miARN, miR-I, situé sur le transcrite LAT. De part leur complémentarité de séquence, miR-I cible ICP34.5 et atténue son effet cytotoxique sur les neurones. Il permet également d'étendre la latence en diminuant la réplication virale. Ainsi, miR-I régule l'issue d'une infection virale dans le système nerveux périphérique en fonctionnant comme un alternateur moléculaire de l'expression de ICP34.5 [51]. L'un des miARN du virus EBV, miR-BART-2, favorise le maintien de la phase de latence en ciblant l'ARNm de l'ADN polymérase virale BALF5 [52]. Le miARN possède ici un rôle de veille afin d'empêcher toute expression de l'ADN polymérase virale à un moment inadéquat pour la réplication du virus. L'entrée dans la phase lytique du virus KSHV est également hautement contrôlée. Le transactivateur RTA induit à lui seul la phase lytique en activant la transcription de gènes précoces essentiels pour la formation du complexe de réplication du virus. Pendant la phase de latence, l'expression de RTA est réprimée en tandem au niveau transcriptionnel par la protéine LANA et au niveau post-transcriptionnel par les miARN viraux miR-K7-5p et miR-K9-5p [53,54]. Si l'action répressive de LANA est plus importante, celle des miARN constitue un verrou moléculaire supplémentaire qui prévient toutes réactivations lytiques inappropriées. Cet exemple illustre à la fois la coopération qu'il peut y avoir entre plusieurs miARN, et entre des miARN et une protéine pour la régulation d'une même cible.

• *Rôle dans l'immuno-évasion et la survie cellulaire*

Qu'elle soit programmée comme l'apoptose ou induite par le système immunitaire, la mort cellulaire est un moyen d'élimination des virus. De façon intéressante, plusieurs virus expriment des miARN impliqués dans la survie cellulaire et l'immuno-évasion. Par exemple, trois miARN de KSHV répriment l'expression de CASP3, une caspase effectrice essentielle pour l'induction de la mort cellulaire programmée [55]. Plus récemment, il a été montré que

le taux de protéine CASP3 diminuait lors de l'infection par EBV et que ceci était dû à l'action de miARN issus du transcrite BART [56]. Ainsi, l'inhibition de l'apoptose de leurs cellules hôtes assure la persistance de KSHV et EBV. Ceci favoriseraient une progression à long terme des maladies associées, et notamment de cancers, probable conséquence de la répression du système de contrôle des cellules tumorales. Il est à noter que les miARN de KSHV et d'EBV ne présentent pas d'homologie de séquences, illustrant la convergence fonctionnelle des miARN viraux vers la répression d'une même voie cellulaire.

Déjouer le système immunitaire en inhibant la réponse cellulaire telle que celle effectuée par les cellules « natural killer » (NK) ou les lymphocytes T cytotoxiques, est également une stratégie de choix pour la survie des cellules infectées et donc celle du virus. Cette action peut être menée de front par les miARN viraux et les protéines virales comme par exemple chez le cytomégalovirus humain (HCMV). Ainsi, le miARN viral miR-UL112 régule l'expression d'un important médiateur de l'immunité cellulaire, le ligand MICB des cellules NK. Ce ligand est induit en condition de stress, et via les cellules NK, conduit à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. De façon intéressante, le miARN viral agit en synergie avec un miARN cellulaire, miR-376 pour inhiber l'expression de MICB. De plus, HCMV code une protéine UL16 qui séquestre MICB et empêche son exposition à la surface des cellules [57]. À nouveau, nous avons un exemple de coopération entre une protéine et des miARN (viral et cellulaire). En associant les deux, la régulation est plus difficile à déjouer car elle fait appel à deux systèmes très différents. L'ARNm de MICB est une cible récurrente des miARN viraux puisqu'il est également régulé par des miARN de KSHV et d'EBV [58].

Une autre façon de réguler le système immunitaire engage la voie interféron (IFN). Cette dernière est impliquée dans la défense antivirale des cellules suite à l'intrusion d'un virus. Lors de l'infection par EBV, miR-BHRF1-3, situé sur le transcrite primaire BHRF1, cible l'ARNm de CXCL-11, une chimiokine attirant les lymphocytes T induits par les IFN. Ceci a pour conséquence d'inhiber la réponse IFN et pourrait favoriser le développement de cancers comme les lymphomes primaires [59]. Un autre exemple d'immuno-modulation est l'effet du miARN cellulaire miR-132 lors de l'infection par KSHV sur l'immunité innée. Par un schéma complexe de régulation impliquant le facteur de transcription CREB, l'expression du miARN cellulaire miR-132 est augmentée au cours de l'infection. Ceci a pour effet direct la répression de l'expression du co-activateur de transcription des IFN p300 par miR-132, et par conséquent l'inhibition de la réponse antivirale IFN et l'augmentation de la réplication virale [60]. MiR-132 aurait une fonction similaire lors de l'infection de monocytes par HSV-1 ou HCMV. De façon intéressante, une protéine virale de KSHV, vIRF1 inhibe également

l'activité de p300. Nous avons ici un exemple de coopération entre une protéine virale et un miARN cellulaire dont l'expression est induite par le virus.

• ***Implication des miARN dans les cancers liés aux virus***

Environ 15% des cancers sont imputables aux virus et leurs propriétés oncogéniques peuvent être liées à l'expression de miARN. Nous avons décrit précédemment des exemples de miARN exprimés par KSHV et EBV qui en inhibant l'apoptose, pourraient favoriser la formation de cancers. L'infection virale peut aussi induire une dérégulation des miARN cellulaires et favoriser ainsi un environnement tumoral.

Dans un modèle murin de carcinome hépatocellulaire (HCC), l'antigène principal du virus de l'hépatite B (HBV), nommé HBx, réprime l'expression de miR-148a et promeut ainsi cancer et métastase [61]. Le détail du mécanisme en jeu est complexe et implique différents facteurs. De façon simplifiée, HBx séquestre et inactive le facteur de transcription p53 (suppresseur de tumeurs). Ceci a pour conséquence la répression de l'expression de miR-148a et parallèlement la dérégulation de HPIP (« hematopoietic PBX1 interacting protein »). HPIP favorise à son tour l'expression de mTOR, connu pour induire le développement de tumeurs et l'invasion par les métastases. Une diminution de l'expression de miR-148a est retrouvée dans des cancers gastrique, colorectal et pancréatique, montrant bien l'importance d'une bonne expression de ce miARN.

Un autre exemple de miARN cellulaire favorisant l'oncogenèse lors d'une infection virale est miR-155. Son précurseur est l'ARN non codant BIC. Une activation de la transcription de ce dernier est corrélée avec une accélération du développement de lymphomes et de leucémies. De plus, ce miRNA est surexprimé dans plusieurs types de cancers. Les propriétés oncogènes de ce miARN, défini comme oncomiR, semblent être exploitées par les virus tels que EBV, KSHV ou MDV-1 qui peuvent être associés à des cancers. L'expression de miR-155 est induite par EBV et est nécessaire pour la survie du virus. KSHV et MDV-1 codent chacun un analogue fonctionnel de miR-155 (respectivement miR-K11 et miR-M4). Il a été montré *in vivo*, que la surexpression de miR-K11 dans un modèle de souris humanisées induit une hyperprolifération des cellules B [62] et que miR-M4 lors de l'infection par MDV-1 induit la lymphomagenèse chez le poulet [63].

Conclusion et perspectives

Nous avons volontairement axé cette revue sur le rôle d'une classe de petits ARN, à savoir les miARN, dans les infections virales chez les mammifères. Il faut cependant garder à l'esprit que chez d'autres organismes, comme les plantes et les insectes, il existe un autre niveau d'interaction entre la machinerie de l'interférence par l'ARN et les virus. Dans ce cas, cette machinerie joue un rôle antiviral direct et Dicer peut dégrader les intermédiaires de réplication ou le génome viral en siARN [64]. Jusqu'à très récemment, on pensait que ce phénomène n'était pas conservé chez les mammifères, mais deux papiers viennent de montrer qu'il semble que dans des cellules souches non différenciées de souris, ainsi que dans des souriceaux nouveau-nés, il était possible de détecter un rôle antiviral de l'interférence par l'ARN [65,66]. Les tenants et les aboutissants de cette découverte pourraient faire l'objet d'une revue à part entière, et ne seront donc pas discutés ici.

La découverte des miARN d'origine virale remonte à un peu moins d'une dizaine d'années, mais les progrès réalisés dans le domaine ont été très rapides. Depuis la réalisation que ces petits ARN non codants pouvaient jouer un rôle clé dans la régulation de gènes viraux, on connaît maintenant de nombreuses cibles cellulaires ainsi que les principales voies de signalisation contrôlées par les miARN viraux. Les avancées technologiques telles que le séquençage à haut-débit pour analyser des banques de petits ARN ou des ARN retrouvés après l'immunoprécipitation couplée au pontage moléculaire des ARN à des protéines comme Argonaute, ont fortement contribué à accroître nos connaissances de ces nouveaux acteurs des interactions entre les virus et leurs hôtes [67]. Nous sommes bien sûr encore loin d'avoir une vision globale de leur réelle importance et des applications qui pourront découler de leur étude, mais il est indéniable que l'on ne peut ignorer ce nouveau pan de recherche en virologie. Nous devrions voir apparaître dans la littérature à moyen terme des publications décrivant le rôle spécifique de miARN viraux dans un contexte physiologique d'infection. Pour l'heure, de telles données n'ont pu être obtenues que pour des miARN individuels et uniquement pour deux virus, le cytomégalovirus murin, et le virus de la maladie de Marek. On peut se poser la question de savoir si pour un virus donné, tous les miARN jouent un rôle essentiel, ou si certains sont encore en cours d'évolution et n'ont pas encore de fonction clairement établie.

Identifier les cibles des miARN viraux est certes essentiel, mais on peut aussi se poser la question plus fondamentale de savoir ce qui contrôle leur expression et en quoi ils diffèrent ou non des miARN de l'hôte. Par là même, il sera donc important de mieux définir les réseaux de régulation impliquant à la fois les miARN viraux et cellulaires, mais également les longs

ARN non codants, qui n'ont été que très peu étudiés chez les virus. On connaît au moins deux exemples de transcrits viraux impliqués dans la régulation de l'accumulation de miARN cellulaires, ce qui crée un niveau de complexité supplémentaire. Enfin, la découverte récente d'ARN circulaires dans des cellules humaines indique qu'il reste encore des formes insoupçonnées d'ARN régulateurs à découvrir [68].

Remerciements

Nous remercions Béatrice Chane-Woon-Ming pour la lecture critique du manuscrit. Notre laboratoire est subventionné par le Conseil Européen de la Recherche (ERC ncRNAVIR StG-260767), l'Agence Nationale de la Recherche (labex NetRNA (ANR-10-LABX-36) et ANR-08-MIEN-005 DICERPATHO), l'INCa (PLBIO-2009-173), le CNRS et l'Université de Strasbourg. Aurélie Fender bénéficie d'une bourse de réintégration Marie Curie (MIREG-PERG07-GA-2010-268301) et Maud Contrant d'un contrat doctoral de La Ligue Nationale contre le Cancer.

Références

1. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990 ; 2 : 279–289.
2. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993 ; 75 : 843–854.
3. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000 ; 403 : 901–6..
4. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, *et al.* Conservation of the sequence of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000 ; 408 : 86–89.
5. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001 ; 294 : 853–8.
6. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, *et al.* An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001 ; 294 : 858–62.
7. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001 ; 294 : 862–4.
8. Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 ; 391 : 806–811.
9. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011 ; 39 : D152–157.
10. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009 ; 136 : 215–33.
11. Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, *et al.* Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 2004 ; 304 : 734–6.
12. Cai X, Schäfer A, Lu S, *et al.* Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog.* 2006 ; 2 : e23.
13. Jurak I, Kramer MF, Mellor JC, *et al.* Numerous conserved and divergent microRNAs expressed by herpes simplex viruses 1 and 2. *J. Virol.* 2010 ; 84 : 4659–4672.
14. Walz N, Christalla T, Tessmer U, *et al.* A global analysis of evolutionary conservation among known and predicted gammaherpesvirus microRNAs. *J. Virol.* 2010 ; 84 : 716–728.
15. Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, *et al.* A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 2007 ; 450 : 1096–1099.
16. Morgan R, Anderson A, Bernberg E, *et al.* Sequence conservation and differential expression of Marek's disease virus microRNAs. *J. Virol.* 2008 ; 82 : 12213–12220.
17. Umbach JL, Nagel MA, Cohrs RJ, *et al.* Analysis of human alphaherpesvirus

- microRNA expression in latently infected human trigeminal ganglia. *J. Virol.* 2009 ; 83 : 10677–10683.
18. Seo GJ, Fink LHL, O'Hara B, *et al.* Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *J. Virol.* 2008 ; 82 : 9823–9828.
 19. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, *et al.* SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 2005 ; 435 : 682–6.
 20. Aparicio O, Razquin N, Zaratiegui M, *et al.* Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. *J. Virol.* 2006 ; 80 : 1376–1384.
 21. Lu S, Cullen BR. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J. Virol.* 2004 ; 78 : 12868–12876.
 22. Cai X, Li G, Laimins LA, *et al.* Human papillomavirus genotype 31 does not express detectable microRNA levels during latent or productive virus replication. *J Virol* 2006 ; 80 : 10890–3.
 23. Gu W, An J, Ye P, *et al.* Prediction of conserved microRNAs from skin and mucosal human papillomaviruses. *Arch. Virol.* 2011 ; 156 : 1161–1171.
 24. Hussain M, Taft RJ, Asgari S. An insect virus-encoded microRNA regulates viral replication. *J. Virol.* 2008 ; 82 : 9164–9170.
 25. Singh J, Singh CP, Bhavani A, *et al.* Discovering microRNAs from Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus. *Virology* 2010 ; 407 : 120–128.
 26. Wu Y-L, Wu CP, Liu CYY, *et al.* A non-coding RNA of insect HzNV-1 virus establishes latent viral infection through microRNA. *Sci Rep* 2011 ; 1 : 60.
 27. Yan Y, Cui H, Jiang S, *et al.* Identification of a Novel Marine Fish Virus, Singapore Grouper Iridovirus-Encoded MicroRNAs Expressed in Grouper Cells by Solexa Sequencing. *PLoS ONE* 2011 ; 6 : e19148.
 28. Houzet L, Jeang K-T. MicroRNAs and human retroviruses. *Biochim. Biophys. Acta* 2011 ; 1809 : 686–693.
 29. Lin J, Cullen BR. Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *J Virol* 2007 ; 81 : 12218–26.
 30. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, *et al.* Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* 2005 ; 2 : 269–276.
 31. Umbach JL, Yen H-L, Poon LLM, *et al.* Influenza A virus expresses high levels of an unusual class of small viral leader RNAs in infected cells. *MBio* 2010 ; 1 : e00204–10.
 32. Shapiro JS, Varble A, Pham AM, *et al.* Noncanonical cytoplasmic processing of viral microRNAs. *RNA* 2010 ; 16 : 2068–74.
 33. Varble A, Chua MA, Perez JT, *et al.* Engineered RNA viral synthesis of microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 ; 107 : 11519–11524.
 34. Hussain M, Torres S, Schnettler E, *et al.* West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res.* 2012 ; 40 : 2210–2223.
 35. Kincaid RP, Burke JM, Sullivan CS. RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012 ; 109 : 3077–3082.
 36. Bogerd HP, Karnowski HW, Cai X, *et al.* A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral MicroRNAs. *Mol. Cell* 2010 ; 37 : 135–142.
 37. Cazalla D, Xie M, Steitz JA. A primate herpesvirus uses the integrator complex to generate viral microRNAs. *Mol. Cell* 2011 ; 43 : 982–992.
 38. Pegtel DM, Garde MDB van de, Middeldorp JM. Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion. *Biochim.*

Biophys. Acta 2011 ; 1809 : 715–721.

39. Hansen A, Henderson S, Lagos D, *et al.* KSHV-encoded miRNAs target MAF to induce endothelial cell reprogramming. *Genes Dev.* 2010 ; 24 : 195–205.
40. Jochum S, Ruiss R, Moosmann A, *et al.* RNAs in Epstein-Barr virions control early steps of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012 ; 109 : E1396–1404.
41. Lin X, Li X, Liang D, *et al.* miRNAs and usRNAs Discovered in Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Virions. *J. Virol.* 2012 ; 86 : 12717–30.
42. Dölken L, Krmptotic A, Kothe S, *et al.* Cytomegalovirus microRNAs Facilitate Persistent Virus Infection in Salivary Glands. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1001150.
43. Luo J, Sun A-J, Teng M, *et al.* Expression profiles of microRNAs encoded by the oncogenic Marek's disease virus reveal two distinct expression patterns in vivo during different phases of disease. *J. Gen. Virol.* 2011 ; 92 : 608–620.
44. Meyer C, Grey F, Kreklywich CN, *et al.* Cytomegalovirus microRNA expression is tissue specific and is associated with persistence. *J. Virol.* 2011 ; 85 : 378–389.
45. Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, *et al.* A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 2005 ; 308 : 557–60.
46. Otsuka M, Jing Q, Georgel P, *et al.* Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* 2007 ; 27 : 123–134.
47. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, *et al.* Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005 ; 309 : 1577–81.
48. Janssen HLA, Reesink HW, Lawitz EJ, *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 2013 ; 368 : 1685–1694.
49. Stewart CR, Marsh GA, Jenkins KA, *et al.* Promotion of Hendra virus replication by microRNA 146a. *J. Virol.* 2013 ; 87 : 3782–3791.
50. Griffin GE, Leung K, Folks TM, *et al.* Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B. *Nature* 1989 ; 339 : 70–73.
51. Tang S, Bertke AS, Patel A, *et al.* An acutely and latently expressed herpes simplex virus 2 viral microRNA inhibits expression of ICP34.5, a viral neurovirulence factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 ; 105 : 10931–6.
52. Barth S, Pfuhl T, Mamiani A, *et al.* Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* 2008 ; 36 : 666–675.
53. Bellare P, Ganem D. Regulation of KSHV lytic switch protein expression by a virus-encoded microRNA: an evolutionary adaptation that fine-tunes lytic reactivation. *Cell Host Microbe* 2009 ; 6 : 570–575.
54. Lin X, Liang D, He Z, *et al.* miR-K12-7-5p encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stabilizes the latent state by targeting viral ORF50/RTA. *PLoS ONE* 2011 ; 6 : e16224.
55. Suffert G, Malterer G, Hausser J, *et al.* Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis. *PLoS Pathog.* 2011 ; 7 : e1002405.
56. Vereide DT, Seto E, Chiu Y-F, *et al.* Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. *Oncogene* 2013 ; 10.1038/onc.2013.71.
57. Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmermann A, *et al.* Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 2007 ; 317 : 376–81.
58. Nachmani D, Stern-Ginossar N, Sarid R, *et al.* Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell Host Microbe* 2009 ; 5 : 376–385.
59. Xia T, O'Hara A, Araujo I, *et al.* EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3. *Cancer Res.* 2008 ; 68 : 1436–1442.

60. Lagos D, Pollara G, Henderson S, *et al.* miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol* 2010 ; 12 : 513–9.
61. Xu X, Fan Z, Kang L, *et al.* Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 2013 ; 123 : 630–645.
62. Boss IW, Nadeau PE, Abbott JR, *et al.* A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded ortholog of microRNA miR-155 induces human splenic B-cell expansion in NOD/LtSz-scid IL2R γ null mice. *J. Virol.* 2011 ; 85 : 9877–9886.
63. Zhao Y, Xu H, Yao Y, *et al.* Critical role of the virus-encoded microRNA-155 ortholog in the induction of Marek's disease lymphomas. *PLoS Pathog.* 2011 ; 7 : e1001305.
64. Ding SW, Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 2007 ; 130 : 413–26.
65. Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, *et al.* Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science* 2013 ; 342 : 235–238.
66. Li Y, Lu J, Han Y, *et al.* RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science* 2013 ; 342 : 231–234.
67. Gottwein E, Corcoran DL, Mukherjee N, *et al.* Viral microRNA targetome of KSHV-infected primary effusion lymphoma cell lines. *Cell Host Microbe* 2011 ; 10 : 515–526.
68. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 2013 ; 495 : 333–338.
69. Hancock MH, Tirabassi RS, Nelson JA. Rhesus cytomegalovirus encodes seventeen microRNAs that are differentially expressed in vitro and in vivo. *Virology* 2012 ; 425 : 133–142.
70. Sullivan CS, Sung CK, Pack CD, *et al.* Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology* 2009 ; 387 : 157–167.

Tableaux et légendes des figures

Tableau 1. Exemples de virus exprimant des miARN.

Famille	Genre	Espèce		Hôte	Nb. de miARN
Virus à ADN db					
Herpesviridae					
α	Simplexvirus	Herpèsvirus simplex	HSV-1	Humain	26 (17)
			HSV-2		24 (18)
	Mardivirus	Virus de la maladie de Marek	MDV-1	Poulet	26 (14)
			MDV-2		36 (18)
β	Cytomégalovirus	Cytomégalovirus humain	HCMV	Humain	22 (12)
		Cytomégalovirus du singe rhésus ^a	RhCMV	Singe	17 (17)
	Roséolovirus	Cytomégalovirus murin	MCMV	Souris	29 (18)
		Herpèsvirus humain 6	HHV-6B	Humain	5 (4)
γ	Lymphocryptovirus	Virus d'Epstein-Barr	EBV	Humain	44 (25)
		Lymphocryptovirus du singe rhésus	rLCV	Singe	68 (36)
	Rhadinovirus	Herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi	KSHV	Humain	25 (12)
		Rhadinovirus du singe rhésus	RRV	Singe	25 (15)
		Herpèsvirus saimiri	HVS	Singe	6 (3)
		Herpèsvirus murin 68	MHV68	Souris	28 (15)
Polyomaviridae	Polyomavirus	Virus BK	BKV	Humain	2 (1)
		Virus JC	JCV	Humain	2 (1)
		Virus des cellules de Merkel	MCPyV	Humain	2 (1)
		Virus simien 40	SV40	Singe	2 (1)
		Polyomavirus murin ^b	muPyV	Souris	2 (1)
Adenoviridae	Mastadénovirus	Adénovirus humain de type 2 ^c	HAdV-2	Humain	3 (2 ^c)
Virus à ARN sb					
Retroviridae	Deltarétrovirus	Virus de la leucémie bovine	BLV	Bovin	7 (5)
Flaviviridae	Flavivirus	Virus du Nil occidental ^d	WNZ	Insecte	1 (1)

La liste des virus codant des miARN est non exhaustive. Par exemple, il existe à ce jour plus de 20 herpèsvirus pour lesquels l'existence de miARN exprimés dans des cellules infectées a été documentée.

Entre parenthèses : nombre de précurseurs miARN (pré-miARN).

Adapté de miRBase (www.mirbase.org). Autres références : ^a [69], ^b [70], ^c [20], ^d [34].

^e ARN VAI structuré en pré-miARN-like.

Figure 1. Localisation génomique des miARN viraux de certains herpèsvirus humains.

Presque tous les herpèsvirus humains codent des gènes de miARN, à l'exception de VZV et HHV-7. Pour simplifier, seulement le génome de HSV-1 est représenté, celui de HSV-2 étant très similaire. Les génomes ne sont pas à l'échelle et seulement les phases ouvertes de lecture (ORF, en gris) proches ou incluant des gènes de miARN (en vert) sont représentées. Les génomes de HHV-6B, EBV et KSHV sont composés d'une région unique centrale contenant toutes les ORF et flanquée à ses extrémités par des régions répétées terminales (TR ou DR, représentées par des rectangles blancs ou une succession de barres noires). La région codante de HSV-1 et HCMV est scindée en deux régions US et UL (« unique small » et « unique long ») par des régions répétées internes IR (rectangles blancs). Abréviations : TR, IR et DR signifient respectivement répétitions terminales, internes et directes. ; L signifie « long » et S « small » ; ori représente l'origine de réplication lytique ; LAT est le transcrit associé à la latence ; α , β et γ correspondent aux 3 sous-familles des herpèsvirus.

Figure 2. Exemples de voies alternatives de biogenèse des miARN viraux.

Voir le texte pour les détails. L'astérisque au niveau de SINV signifie que le virus a été modifié génétiquement par l'introduction d'un précurseur de miARN.

Figure 3. Exemples de rôles des miARN lors de l'interaction hôte-virus.

Les interactions entre miARN, virus et hôtes sont très complexes. Différents cas de figure sont illustrés ici et décrits en détail dans le texte. Les noms des miARN sont indiqués en gras et le nom des virus entre parenthèses. Les facteurs viraux sont sur fond rouge et ceux de la cellule sur fond vert. Voir le texte pour les détails.

Figure 1. Localisation génomique des miARN viraux de certains herpesvirus humains

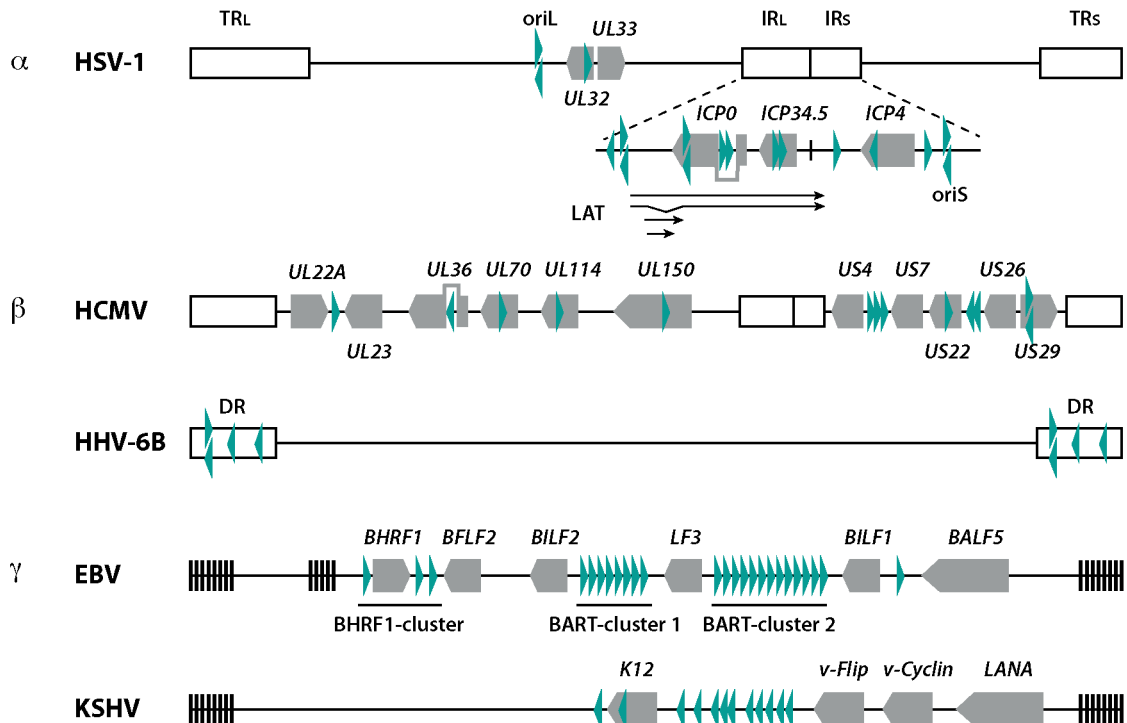


Figure 2. Exemples de voies alternatives de biogenèse des miARN viraux

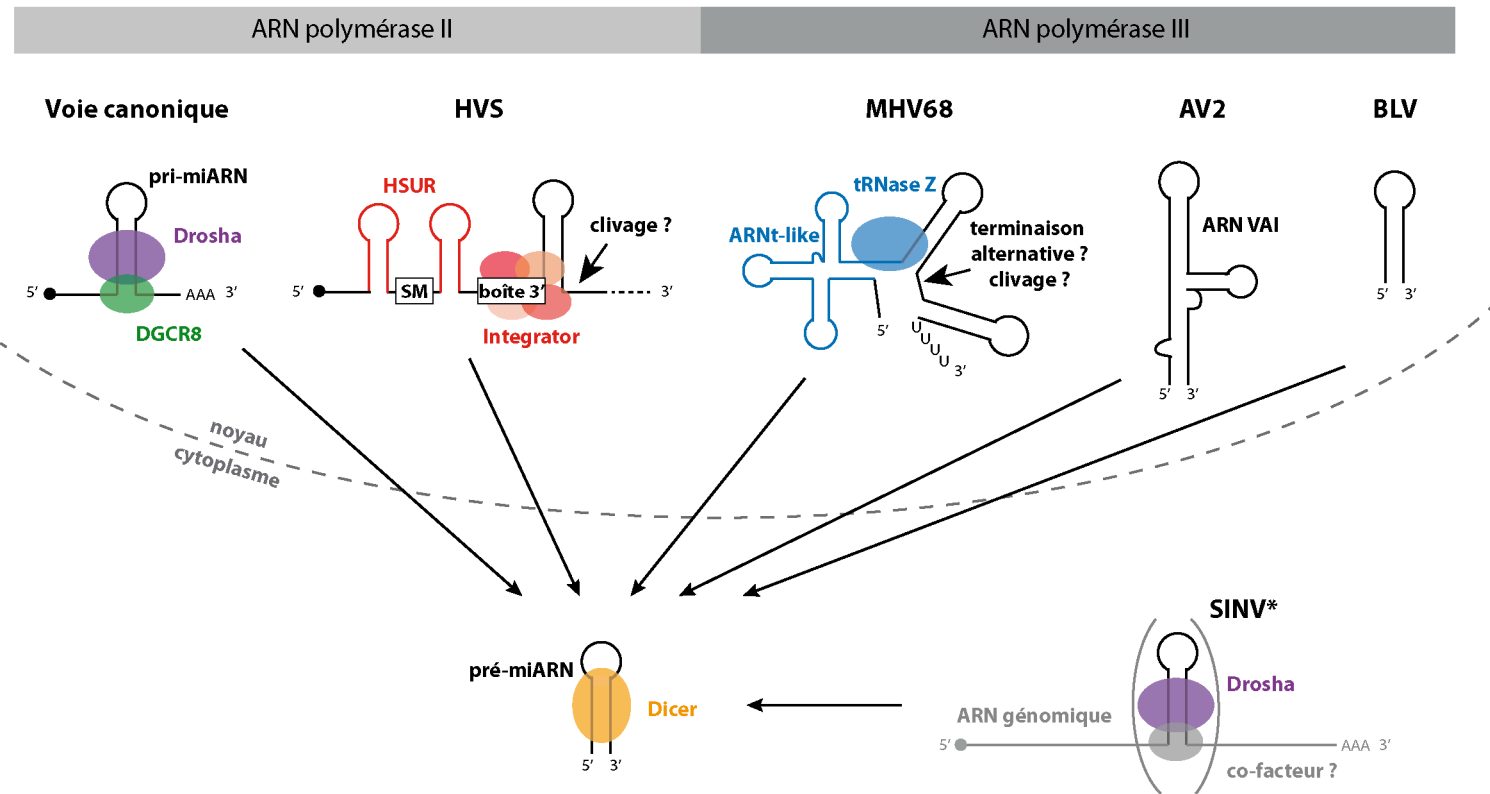
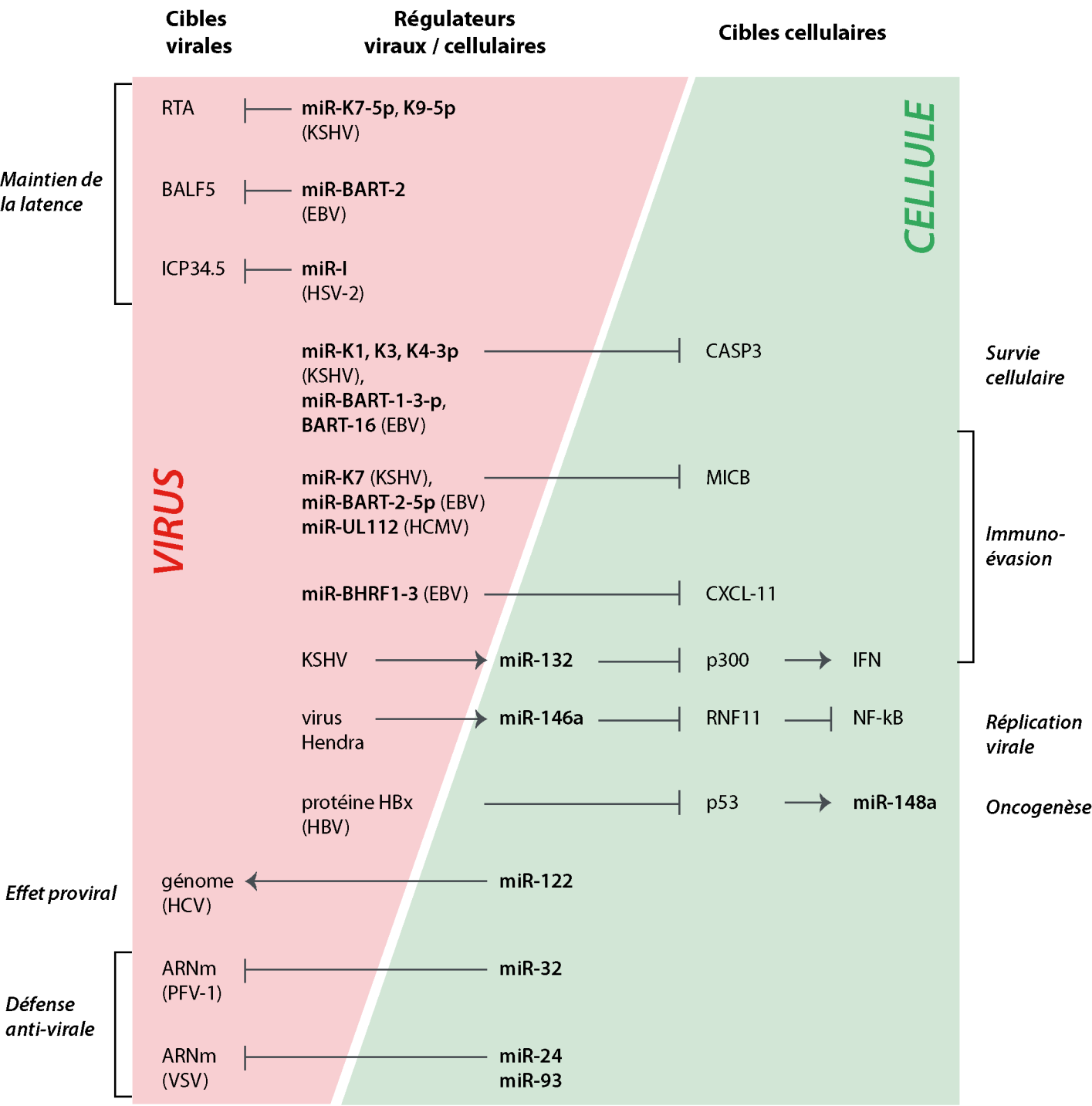


Figure 3. Exemples de rôles des miARN lors de l'interaction hôte-virus



B. L'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV)

I. Principales caractéristiques

1. Classification

Le KSHV ou HHV-8 (human herpesvirus 8) appartient à la famille des *Herpesviridae*, à la sous-famille des *gammaherpesvirinae* et au genre des *rhadinovirus*. Il représente le seul *rhadinovirus* humain identifié à ce jour. Il fait partie des membres des herpèsvirus lymphotropes dont le prototype est le virus d'Epstein-Barr (EBV). Ses cibles primaires sont les cellules B et les cellules endothéliales. Cependant, on retrouve le virus dans les monocytes, les organes lymphoïdes, la moelle osseuse et les cellules épithéliales (Ganem, 2007). Pour plus de détails sur les herpèsvirus se reporter à la revue.

2. Structure virale et génomique

Le KSHV possède un génome ADN double brin enveloppé d'environ 165 kb. Sa particule virale mesure entre 100 et 150 nm de diamètre, elle est de type icosaédrique T16 avec 20 faces triangulaires et plus spécifiquement 150 hexons et 16 pentons. La capside est enveloppée par la membrane cellulaire de l'hôte. Le génome est composé d'une séquence codante unique d'environ 140 kb flanquée de 30 à 45 répétitions terminales (TR) riche en GC et longue de 801 nucléotides placées en tandem. On dénombre au minimum 87 ORF (open reading frame) dont la dénomination repose sur l'homologie de séquence avec l'herpèsvirus saimiri. Les gènes retrouvés uniquement chez le KSHV (20 au total) sont désignés par le préfixe K (de K1 à K15) et 14 gènes avec le préfixe (v-) sont homologues à l'hôte. Le génome viral est présent sous forme linéaire dans le virion et se circularise pour former un épisode une fois dans le noyau cellulaire. (Chang et al., 1994; Neipel et al., 1997; Russo et al., 1996) (Ganem, 2007).

3. Souches virales et répartition géographique

Le génome viral du KSHV est entièrement séquencé (Neipel et al., 1997; Russo et al., 1996) et de nombreuses études montrent une hétérogénéité de séquences entre les différentes populations. On peut noter que la variabilité des séquences nucléotidiques totale du KSHV est de 1.5 à 2 %. Le génome du KSHV est donc très conservé entre les différents sous-types. Les études phylogénétiques sont basées sur les segments des ORF K1 et K15 situés à l'extrémité du génome. L'ORF K1 est la plus hétérogène avec 44 % de différence entre les souches. Il

existe 7 sous-types majeurs et au moins 24 sous-groupes associés. L'ORF K15 possède deux allèles divergents nommés P (pour Prédominant) et M (pour Mineur) qui correspondent à leur prévalence dans les isolats examinés. L'homologie de séquence entre les deux allèles n'est que de 33 % (Ganem, 2007). Aujourd'hui la nomenclature des isolats est toujours en évolution mais les auteurs s'accordent sur le fait qu'ils ont une répartition géographique propre. Les isolats A et C prédominent en Europe, aux Etats-Unis et en Asie du nord, les isolats B en Afrique sub-saharienne et D en Asie du sud, en Australie et dans les îles pacifiques, enfin les isolats E et F sont respectivement présents dans les populations anciennes de type Amérindiennes et en Ouganda (Biggar et al., 2000; Jalilvand et al., 2012; Kasolo et al., 1998; Mancuso et al., 2008; Tornesello et al., 2010; Whitby et al., 2004; Zong et al., 2007, 1999).

4. Prévalence du KSHV

Il existe aussi une dispersion géographique dans la répartition de la prévalence des anticorps anti-HHV-8 qui augmente avec l'âge. Par exemple dans le nord de l'Europe et en Amérique, le taux d'infection est inférieur à 5 %, excepté en Sicile où il est élevé (35 %). Il est en revanche très élevé dans certains pays d'Afrique tel que le Botswana (87 %) (Figure 1) (Mesri et al., 2010).

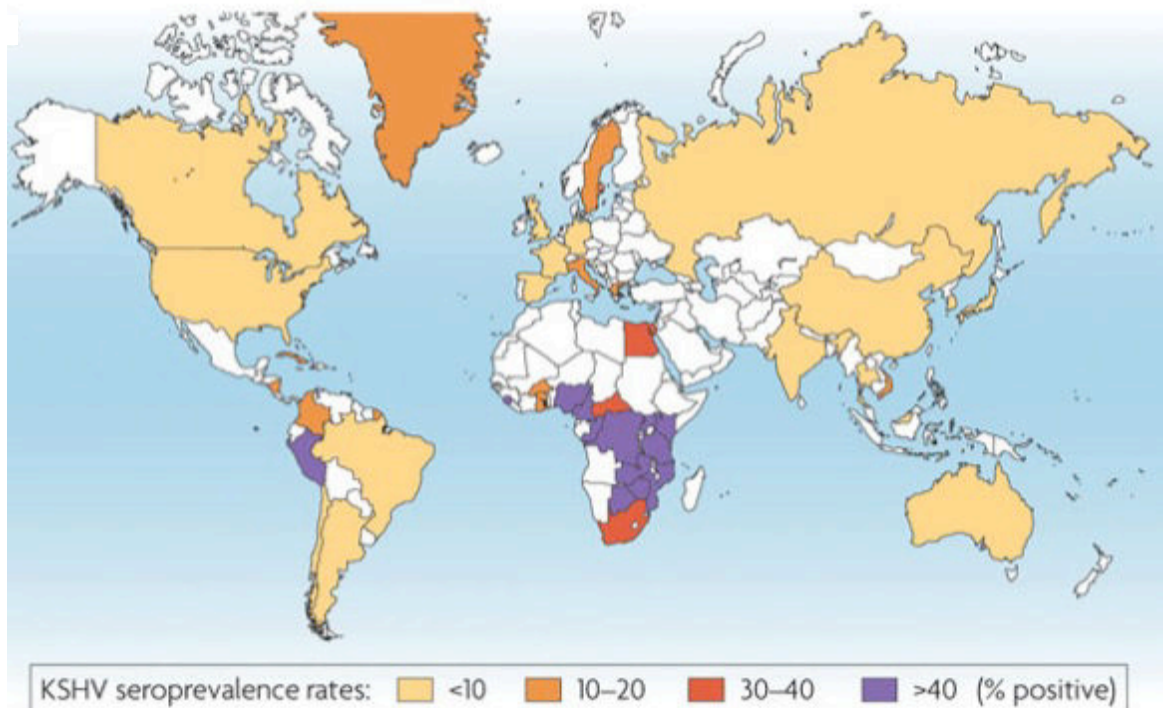


Figure 1 : répartition géographique du taux de séroprévalence du KSHV. Les valeurs sont issues des donneurs de sang dans la population générale, les sujets infectés par le VIH étant exclus. La séroprévalence du KSHV en Europe du nord, en Asie et aux Etats-Unis est inférieure à 10 %, en Afrique sub-saharienne elle est de plus de 50 % et dans les régions méditerranéennes elle est intermédiaire, entre 10 et 30 % (Mesri et al., 2010).

5. Voies de transmission du KSHV

La transmission du KSHV par transfusion de sang ou transplantation d'organes a été documentée mais la voie la plus probable de contamination entre la mère et l'enfant et les personnes infectées par le VIH est la salive. Des ADN viraux ont été tout de même détectés dans les fluides séminaux mais à très faible nombre de copies comparé à la quantité détectée dans la salive, rendant ainsi la transmission sexuelle incertaine (Mesri et al., 2010)(Ganem, 2007).

II. Maladies associées au KSHV

Le KSHV est l'agent étiologique du sarcome de Kaposi (SK) mais il peut être également associé à des lymphomes de type B comme les lymphomes primitifs des séreuses (PEL) ou la maladie de Castelman (MCD).

1. Le sarcome de Kaposi

a. Définition et découverte

Le sarcome de Kaposi (SK) est une tumeur hautement vascularisée, multifocale qui affecte principalement la peau et qui peut se propager aux nodules lymphatiques et aux viscères. La maladie est progressive, elle passe d'un stade indolent avec des manifestations dermatologiques à un stade fulminant avec une atteinte des organes viscéraux (Antman and Chang, 2000). La description de la maladie a été faite par Moritz Kaposi, dermatologue hongrois, qui décrit ce sarcome dans trois cas fatals en 1872 (Kaposi, 1872). En 1950, une origine virale est suspectée car le SK apparaît suite à des événements complexes et multifactoriels (OETTLE, 1962; THUIS, 1957). En 1970, le rôle spécifique d'un herpesvirus est proposé lors de l'observation de particules virales de type herpes dans les tissus de lignées cellulaires en culture (Giraldo et al., 1972). Enfin en 1994, Yuang Chang et Patrick Moore identifient dans des biopsies de patients atteint de SK un nouvel herpesvirus humain, le huitième à être décrit, par la technique d'amplification génique différentielle (RDA) et détecte le virus dans 90 % des lésions du SK (Chang et al., 1994).

b. Manifestations cliniques

Les lésions du SK contiennent trois types cellulaires dont les proportions varient en fonction du stade de la maladie : des cellules endothéliales, des cellules nommées « spindle

cells » en référence à leur forme en fuseau dérivant de cellules endothéliales lymphatiques et des cellules inflammatoires infiltrées.

➤ Symptômes

La première manifestation clinique de la maladie est l'apparition de lésions en forme de patches sur le derme. Les cellules inflammatoires prédominent à ce stade (lymphocytes de type B, T et monocytes) et on observe une abondante néovascularité. L'angiogenèse est profonde et les lésions sont rouge vif. Quelques cellules en fuseaux sont également présentes. Les lésions évoluent en plaques semblables à des œdèmes rouge foncé/violacé. Les nodules, masses visibles dominées par les spindle-cells, reflètent l'évolution finale des lésions. Lors de cette étape, on assiste à une extravasation des globules rouges, ce qui donne la couleur bleu/violacé aux lésions. La prolifération des spindle-cells amène à la formation des nodules et ce sont les cellules majoritaires dans les derniers stades de la maladie. La figure 2 illustre un exemple de profil pathologique des spindle-cells (Boshoff and Chang, 2001; Boshoff et al., 1997; Duprez et al., 2007).

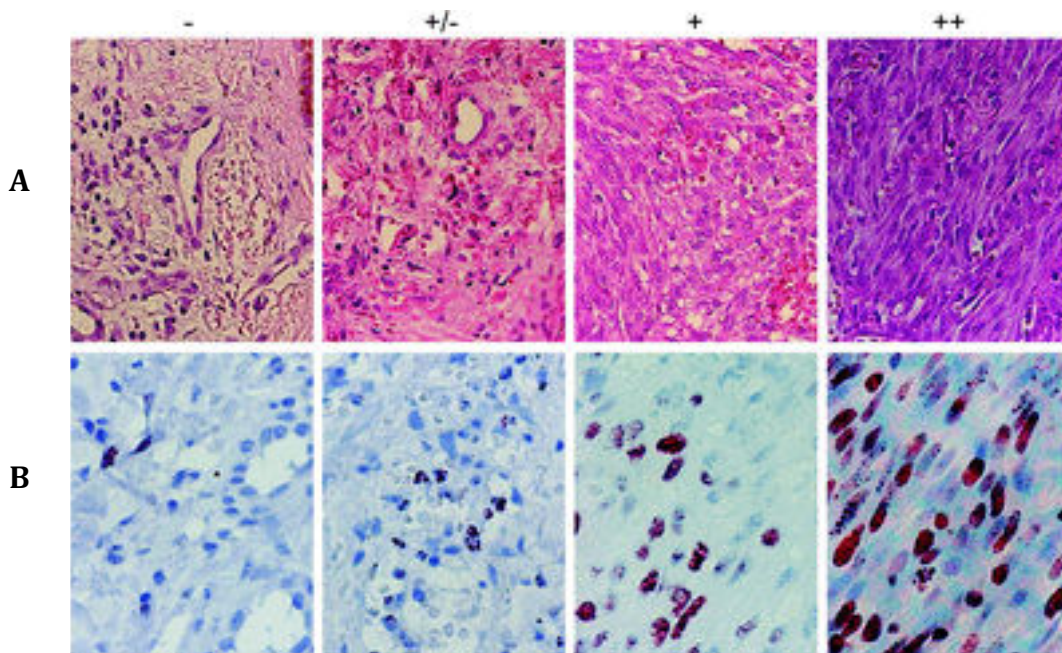


Figure 2 : profil histologique de biopsies de patients atteints du SK. Le niveau d'infiltration par les spindle-cells est désigné par (-) = pas de spindle-cells, (+/-) = rare spindle-cells, (+) = spindle-cells typiques, (++) = infiltration massives par des spindle-cells. Plus la maladie progresse, plus les lésions contiennent des spindle-cells. A) coloration à l'hématoxylinéosine (HE), B) incubation avec un anticorps anti LANA (protéine virale) (Duprez et al, 2007).

➤ Formes cliniques

On distingue 4 formes cliniques de la maladie associées aux symptômes (voir figure 3):

- La forme classique est présente sur la peau et plus spécialement les jambes. Cette forme est plus présente chez les hommes méditerranéens de plus de 50 ans. La progression de la maladie est lente et suit généralement une évolution bénigne (Franceschi and Serraino, 1995).
- La forme endémique, décrite en 1914, apparaît de façon prédominante chez les jeunes hommes d'origine africaine. Les symptômes sont semblables à ceux de la forme classique avec des plaques ou des nodules sur les jambes et les pieds. Le développement dans les viscères reste rare (Wabinga et al., 1993). Il existe aussi un variant lymphadénopathique qui touche les enfants âgés de moins de 3 ans (Ziegler and Katongole-Mbidde, 1996).
- La forme iatrogénique, décrite en 1970, est associée aux traitements immunosuppresseurs, aux transplantations d'organes et aux patients immunodéprimés. Les atteintes cutanées sont disséminées et les atteintes viscérales nombreuses (Regamey et al., 1998).
- La forme épidémique, décrite en 1981, associée au VIH (virus de l'immunodéficience humaine) est plus agressive et l'on retrouve des nodules dispersés sur la surface du corps de façon symétrique ainsi que des complications pulmonaires (Martin et al., 1993).

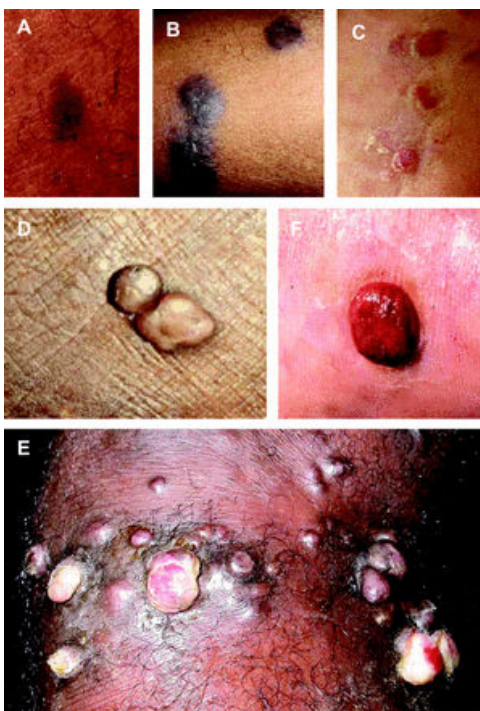


Figure 3 : aspect clinique de différentes lésions du SK. A) Lésions précoces sur la jambe, B) plaque sur la jambe, C) plaque sur le talon, D) nodule sur le pied, E) nodule sur le genou, F) nodule angiomeux sur le pied. Dans les lésions précoces et les plaques, le titre viral de l'HHV-8 et l'infiltration par les spindle-cells est bas, en contraste à ce qui est observé dans les nodules et les nodules angiomeux (Duprez et al, 2007).

c. Pathogénie

D'un point de vue pathogénique, le SK se caractérise donc par une prolifération cellulaire, spécifique des spindle-cells, un infiltrat inflammatoire et une angiogenèse. La progression de la maladie nécessite une action simultanée de ces trois conditions contrairement aux cancers classiques. Les spindle-cells produisent des facteurs pro-inflammatoires et pro-angiogéniques qui recrutent les cellules inflammatoires et les éléments néovasculaires. La néovascularisation dans le SK apparaît avant l'établissement de la masse tumorale contrastant avec les cancers classiques où l'angiogenèse s'y développe seulement après la prolifération cellulaire. De plus, le SK possède une origine multiclonale en comparaison aux cancers classiques d'origine monoclonale. Cependant quelques cas monoclonaux ont été confirmés, ce qui suggère aussi un rôle de l'HHV-8 dans l'expansion monoclonale des spindle-cells (Cai et al., 2010).

d. Prévalence et distribution géographique du SK

Le KSHV est considéré comme nécessaire mais non suffisant pour le développement du SK. En effet, 1 à 5 % de la population des Etats-Unis est infectée par le KSHV mais très peu vont développer un SK (1/100 000). De même, dans les zones endémiques (pourtour méditerranéen), seul 1 patient sur 10 000 va développer un SK. De plus, le tableau clinique diffère entre les patients. Certains développent des infections chroniques dont une faible partie progresse jusqu'au stade du cancer ce qui suggère l'implication de co-facteurs tels que la génétique où l'environnement extérieur.

La prévalence du SK est par contre plus élevée (de 500 à 20 000 fois) chez les patients post-transplantés ou chez les patients VIH au stade SIDA, que dans la population générale. En effet, 50 % des patients co-infectés par le VIH et le KSHV développent un SK s'ils ne sont pas traités. En revanche on observe un déclin du SK associé au VIH chez les patients sous traitements HAART (traitement antirétroviral hautement actif). Ainsi, le VIH semble être un des co-facteurs principaux de développement du SK. Enfin, le stade immunitaire du patient atteint du VIH joue un rôle important dans la progression du SK. En effet, une atteinte du système immunitaire entraîne une charge virale plus importante suivie d'un développement favorable du SK. Plus généralement, la séroprévalence du KSHV est élevée (30 à 60 %) dans les formes épidémiques et iatrogéniques où le SK est fréquent. Inversement, la séroprévalence est faible (2 à 4 %) dans les groupes où le SK est faible. De plus la prévalence du KSHV suit la distribution géographique du SK classique. 15 à 60 % dans les régions méditerranéennes et

en Afrique et 1 à 5 % aux Etats-Unis et en Europe (Figure 4) (Mesri et al., 2010; Ruocco et al., 2013).

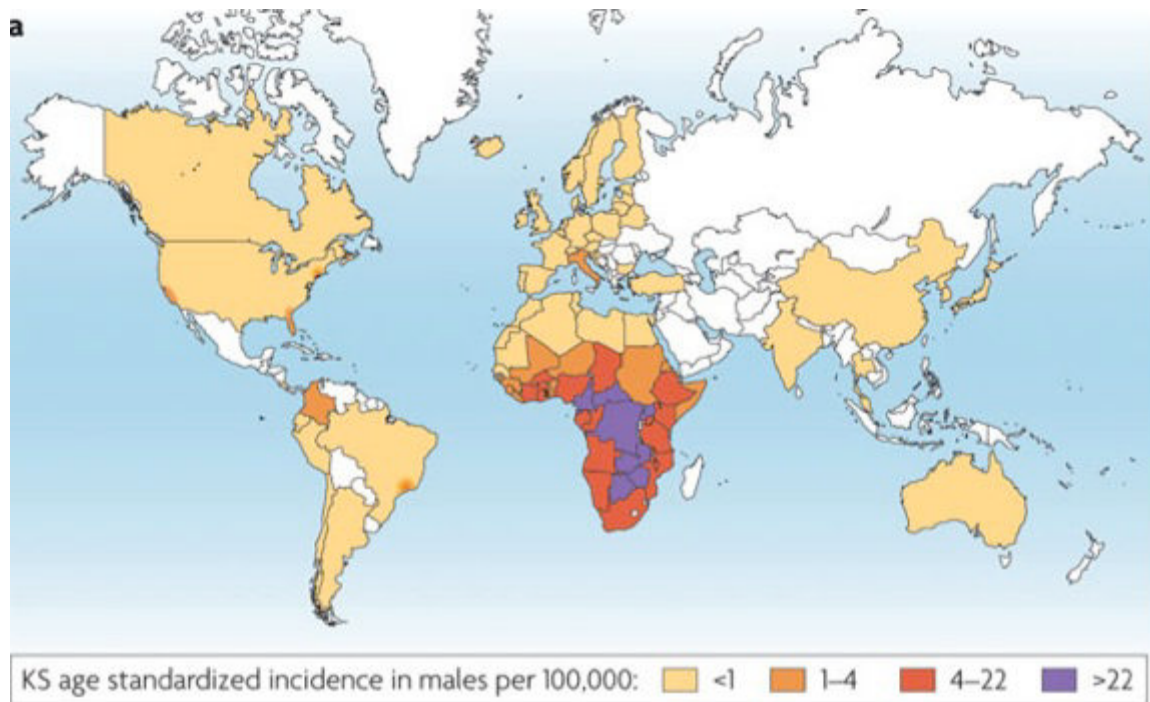


Figure 4 : répartition géographique du taux d'incidence standard du KS chez les hommes. Données pour 100 000 personnes obtenues par l'agence internationale de recherche sur le cancer (Mesri et al., 2010).

e. Traitements médicaux

Il existe différentes stratégies médicales efficaces pour le traitement du SK. Tout d'abord un traitement local dans le cas du SK classique par cryothérapie ou un acte chirurgical. Dans le cas de lésions plus étendues, l'utilisation de drogue est préconisée tel que le ganciclovir ou si le patient est VIH positif, le foscarnet en association avec un traitement HAART. Une thérapie systémique avec des agents cytostatiques pour la forme endémique, une thérapie ciblée anti-angiogénique ou inhibant le signal des cytokines est réalisée. On peut également utiliser des IFN alpha et dans le cas d'une rechute le paclitaxel est utilisé (Dittmer et al., 2012; Ruocco et al., 2013).

2. Le lymphome primitif des séreuses

Le lymphome primitif des séreuses ou lymphome des cavités appartient au groupe des lymphomes non hodgkiniens de haut grade. Il se caractérise par une effusion de liquide lymphatique dans la plèvre, le péritoine ou le péricarde, sans masse tumorale solide associée. Les cellules malignes du PEL (Lymphome d'Effusion Primaire) sont clonales à en juger par

les études de réarrangement du gène des immunoglobulines et sont définies comme étant à un stade post-germinatif, pré-plasmocytaire de la différenciation lymphocytaire B (Gaidano et al., 1999; Jenner et al., 2003). 30 à 70 % des patients avec un PEL ont également un SK et un diagnostic antérieur de SK est un facteur de risque pour le PEL (Eltom et al., 2002). Le KSHV est toujours présent dans les cellules malignes de PEL. On y retrouve son génome en de multiples copies, de l'ordre de 20 à 200 par cellules. Le profil d'expression du KSHV dans les cellules de PEL est proche de celui du SK, les gènes principalement exprimés étant ceux de la latence (Jenner et al., 2001). 50 % des cas sont co-infectés avec EBV (Dittmer and Damania, 2013).

3. La maladie multicentrique de Castelman

La maladie multicentrique de Castelman (MCD) est un désordre lymphoprolifératif rare de type polyclonal. Les symptômes sont associés à une dérégulation inflammatoire que l'on attribue à la réactivation lytique du KSHV. La production de v-IL6 (interleukine 6 virale) et d'IL6 humaines en association à la production d'IL-10 (interleukine 10) favorise l'expansion des centres germinatifs associés à une prolifération des cellules B et des vaisseaux. Le génome du KSHV est détectable dans la majorité des cas VIH-positifs associés au MCD et approximativement 50% des cas VIH-négatif, mais contrairement aux PEL, on ne détecte pas la présence du génome EBV.

Un syndrome des cytokines inflammatoire (KICS) associé au KSHV, avec une virémie élevée et un KS, est observé chez des patients atteints du VIH mais sans évidence pathologique pour un MCD. On observe un syndrome inflammatoire ressemblant au MCD avec un profil des cytokines particulier et une augmentation de l'IL6 virale et humaine (Dittmer and Damania, 2013).

III. Cycle viral et expression des gènes

1. Cycle viral

Lors d'une infection, l'enveloppe virale va tout d'abord interagir avec les héparanes sulfates afin de concentrer le virus à la surface cellulaire pour une interaction plus spécifique des glycoprotéines avec les autres récepteurs comme les intégrines ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha \text{VB}5$, $\alpha \text{VB} 3$) ou les récepteurs CD98, xCT et DC-SIGN. La fixation aux récepteurs est suivie de l'intégration de la capsid virale dans le cytoplasme par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane

plasmique ou la membrane endosomale. La capside virale est transportée par les microtubules et l'actine jusqu'au noyau où l'ADN est délivré (pour revue voir Chandran, 2010). Des protéines très précoces comme les transactivateurs de la réplication et de la transcription (RTA) et des ARN sont déjà synthétisés et encapsidés et vont permettre d'initier le cycle viral (Bechtel et al., 2005a, 2005b; Zhu et al., 2005). En effet, la protéine RTA va induire la réplication du virus et en même temps la synthèse des gènes précoces impliqués dans la modulation des fonctions cellulaires et du métabolisme des acides nucléiques. S'ensuit la synthèse des gènes tardifs qui incluent les protéines structurales pour l'encapsidation et le relargage des nouveaux virions. RTA va également permettre la synthèse de la protéine LANA en se liant à son promoteur et donc induire la phase latente (Lan et al., 2005)(Ganem, 2007). Voir figure 5.

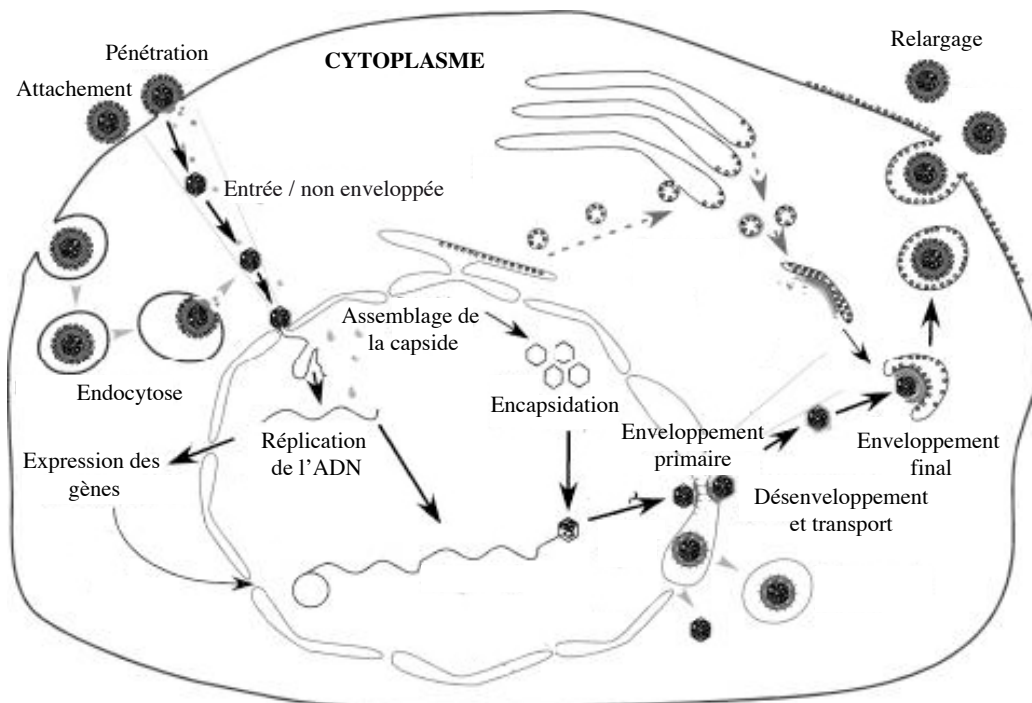


Figure 5 : cycle viral. Après l'attachement, le virus rentre dans la cellule par fusion directe avec la membrane cellulaire ou par endocytose. La nucléocapside est relarguée dans la cytoplasme et migre jusque dans le noyau où la réplication virale se produit. Les gènes sont exprimés par ordre : très précoce, précoce et tardif. Le nouveau brin d'ADN synthétisé est encapsidé puis transporté dans des vésicules pour finalement être enveloppé. Le virion mature est ensuite relargué en dehors de la cellule.

2. Alternance des phases lytiques et latentes

Comme tous les herpèsvirus, le KSHV peut alterner entre une phase lytique synonyme de réplication virale et une phase de latence sans production virale durant laquelle l'ADN génomique est sous forme d'épisome en faible copie. Il s'agit de la voie par défaut, avec peu d'effets cytotoxiques puisque peu de gènes viraux sont exprimés. La phase de latence

s'installe entre 24 et 48 heures après la primo-infection et l'expression de LANA bloque ensuite l'expression des gènes lytiques. Il existe une régulation fine des deux programmes d'expression du virus par RTA et LANA et le taux d'expression de ces deux protéines dirigent la phase d'expression du virus (Ganem 2007).

- La phase lytique : il s'agit de la première phase après une infection par le KSHV. De nombreuses protéines sont synthétisées séquentiellement, en accord avec les étapes d'expression du virus (gènes très précoces, précoces et tardifs) (Sun et al., 1999). La phase lytique permet le maintien de l'infection et le remplacement du génome viral (Staskus et al., 1997). Même en phase de latence, quelques cellules infectées sont toujours en phase lytique (1 à 5 %) et sécrètent des facteurs pro-inflammatoires et angiogéniques qui peuvent influencer l'inflammation et les composants vasculaires comme par exemple v-IL6 (Aoki et al., 1999; Nicholas et al., 1997) ou v-GPCR (G protein-coupled receptor virale) (Arvanitakis et al., 1997; Bais et al., 1998). Parmi les gènes très précoces, l'ARN PAN est le plus exprimé (80 %). il s'agit d'un long ARN non codant polyadénylé (Ganem, 2007).
- La phase de latence : Elle permet l'expression des quelques protéines latentes : LANA, v-cycline (cycline virale), v-FLIP (Fas-associated death domain-like interleukin-1 beta-converting enzyme-inhibitory protein virale) et les Kaposines A, B et C. La latence induit la prolifération des cellules B et les gènes latents participent individuellement à ce mécanisme. La protéine LANA permet le maintien de l'épisode viral en s'attachant aux extrémités des chromosomes et aux extrémités des séquences répétées du génome viral. Elle peut lier les histones de type H2A et H2B (Ballestas et al., 1999). Cette protéine permet aussi l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs comme p53 (Friborg et al., 1999) et pRb (protéine du rétinoblastome) (Radkov et al., 2000) et favorise donc l'inhibition de l'apoptose et la prolifération cellulaire. Indirectement LANA permet la surexpression de proto-oncogènes comme c-myc, c-jun et la cycline D. v-cycline est un gène viral homologue à la cycline D qui régule le cycle cellulaire (Chang et al., 1996; Muralidhar et al., 2000). v-FLIP inhibe l'action des caspases médiées par Fas. Il a également été démontré que v-FLIP induit l'expression de NFkB permettant l'expression d'un large panel de gènes anti-apoptotiques et pro-inflammatoires (Bagnéris et al., 2008; Liu et al., 2002). Les Kaposines se différencient par leur extrémité terminale. Le rôle transformant de la Kaposine A est controversé (Muralidhar et al., 2000) mais il a été démontré que la

Kaposine B stabilisait les ARN contenant des ARE et jouait donc un rôle dans la production de cytokines (McCormick and Ganem, 2005).

Les phases lytique et latente participent chacune au développement du SK et des PEL par le maintien de l'infection virale, la prolifération et la survie cellulaire, et l'échappement au système immunitaire.

IV. Modèles d'étude du KSHV et de sa pathogénèse

1. Culture cellulaire

La première lignée cellulaire obtenue pour l'étude du KSHV provient de PEL d'un patient atteint du SIDA (Cesarman et al., 1995; Gaidano et al., 1999). Aujourd'hui de nombreuses lignées cellulaires dérivées de PEL sont disponibles et peuvent être EBV-positives ou négatives puisque EBV peut co-infecter les cellules issues de PEL. Ces lignées cellulaires sont couramment utilisées et constituent le modèle de référence pour l'étude du KSHV (Arvanitakis et al., 1997; Boshoff et al., 1998; Renne et al., 1996; Said et al., 1996). De façon intéressante, les cellules B humaines qui représentent pourtant le site primaire d'infection, sont réfractaires à l'infection par le KSHV *in vitro*. Les lignées humaines issues de fibroblastes, et de cellules épithéliales peuvent être infectées *in vitro* mais ne présentent pas de changements phénotypiques ou d'infection latente contrairement aux cellules endothéliales qui peuvent être infectées de façon *in vitro* mais montrent des changements morphologiques comme une élongation, et un réarrangement du cytosquelette rappelant la morphologie des spindle-cells (Pour plus de détails voir la revue de Ganem 2007).

Il n'existe pas de lignées cellulaires issues de SK, le génome viral ne s'intègre pas et est perdu après quelques passages des cellules. Par contre, il existe des lignées de cellules endothéliales qui supportent une infection latente par KSHV ; il s'agit de cellules TIVE-LTC (telomerase-immortalized HUVECs) (An et al., 2006). L'infection par KSHV de cellules en culture mène principalement à la latence avec quelques rares cellules infectées de façon lytique (1 à 5 %). Ainsi pour la production de virus, il est nécessaire d'induire la réactivation lytique. En effet, le titre viral obtenu dans le surnageant en condition normale de culture est très bas. La réactivation est réalisée grâce à du sodium butyrate, du 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA ou PMA) ou encore du phorbol ester. Après le traitement, 15 % à 30 % des cellules entrent en phase lytique et il y a donc réplique virale et à terme production de particules virales (Gradoville et al., 2000; Renne et al., 1996; Sarid et al., 1998).

2. Virus recombinants

Le génome viral recombinant est rapidement perdu ce qui reflète une infectivité inefficace et une dispersion faible du virion. Cependant, pour faciliter l'analyse de la réplication virale et obtenir des mutants de séquence du KSHV qui permettent d'étudier l'action spécifique des gènes viraux, un virus recombinant a été synthétisé (rKSHV.219) en utilisant la recombinaison homologue directement par transfection de cellules PEL. Ce virus exprime un marqueur de sélection et une cassette GFP (green fluorescent protein) (Vieira et al., 2001). Ce virus a ensuite été inséré dans des bacmides : BAC 36 (Zhou et al., 2002) et plus récemment BAC 16 (Brulois et al., 2012). BAC 36 possède une duplication du génome de 9kb situé au niveau des régions répétées terminales (TR), c'est pourquoi Brulois et al. ont synthétisé un nouveau virus recombinant (BAC 16) avec une variation de séquences minimales.

3. Modèles animaux

Ce n'est que très récemment que des modèles animaux ont permis l'étude physiologique du KSHV. Deux modèles de souris à partir de lignées cellulaires endothéliales ont été générés, la première par infection des cellules TIVE-LTC et la deuxième par transfection du BAC 36 (KSHV bacterial artificial chromosome) dans des cellules endothéliales de moelle osseuse (mECK36). Ce dernier système est très intéressant car il produit des lésions typiques du SK ayant une forte vascularité et avec la présence de spindle-cells (An et al., 2006; Mesri et al., 2010; Mutlu et al., 2007).

D'autres études montrent l'infection directe ou par intraveineuse de souris humanisée immunodéficiente avec du virus purifié. Ces modèles mènent à une infection des cellules B mimant le tropisme naturel du KSHV avec une courte phase lytique suivie de la mise en place de la phase de latence à long terme. Cependant ces modèles n'ont pas permis de générer des SK ou des tumeurs (Dittmer et al., 1999; Parsons et al., 2006). Enfin, l'infection de précurseurs de cellules mésenchymateuses métanéphriques embryonnaires de rat transformées de façon primaire par KSHV résulte en un tableau pathologique qui ressemble aux tumeurs du SK (Jones et al., 2012).

De très bons modèles viraux alternatifs pour l'étude des gammaherpesvirus et donc du KSHV est le MHV68 (murine gammaherpesvirus isolate 68) ou MuHV-4 (murid herpesvirus type 4) qui infectent les rongeurs. Ces modèles ont permis de découvrir ou d'avancer les connaissances sur l'infection par les gammaherpesvirus par des expériences d'infection. Des

lignées cellulaires sont disponibles (BALB/c, 129, and C57BL/6) et l'infection de souris par voie intranasale permet une production de virus efficace (Hughes et al., 2010).

Des modèles animaux simiens ont également été récemment validés pour l'étude de l'oncogenèse induite par le virus. Un premier modèle animal, les marmosets (*Callithrix jacchus*, Cj), singes du nouveau monde, a permis de tester la transmission zoonotique du KSHV recombinant. Les résultats ont mis en évidence une séroconversion rapide et une réponse anticorps anti-KSHV vigoureuse. L'ADN du KSHV et LANA ont été rapidement détectés dans les tissus des singes infectés (Chang et al., 2009a). Par ailleurs, le rhesus monkey rhadinovirus est utilisé comme modèle d'étude, car phylogénétiquement proche du KSHV. Son infection mène à une prolifération cellulaire anormale mimant la pathogenèse du KSHV (Orzechowska et al., 2008; Wong et al., 1999). Un autre homologue du KSHV, le retroperitoneal fibromatosis-associated herpesvirus (RFHV) entraîne le développement de tumeurs malignes proches du SK chez les singes qui deviennent immunodéficients après infection avec un virus simien (Bruce et al., 2006).

V. Les miARN du KSHV

1. Découverte et organisation génomique

En 2004, Pfeffer et al. ont démontré pour la première fois l'existence de miARN codés par les virus dans des cellules B infectées de façon latente par EBV (Pfeffer et al., 2004). En 2005, ils ont également mis en évidence l'existence de miARN codés par le KSHV (Pfeffer et al., 2005). On recense actuellement 12 pré-miARN qui se répartissent en 25 miARN matures (Cai et al., 2005; Grundhoff et al., 2006; Pfeffer et al., 2005; Samols et al., 2005).

Les 12 pré-miARN du KSHV sont tous codés sur un même locus génomique dans la région associée à la latence où l'on retrouve LANA, v-cycline, v-FLIP et les Kaposines. Les miARN se nomment miR-K12-1 (ou miR-K1) à miR-K12-12 (ou miR-K12). Cette nomenclature est due à leur localisation proche de l'ORF K12 de la Kaposine. Les miR-K1 à K9 incluant K11 sont introniques et situés sur le même transcrit alors que miR-K10 et -K12 se situe dans l'ORF et en 3'UTR de la Kaposine (Cai and Cullen, 2006). Figure 6.

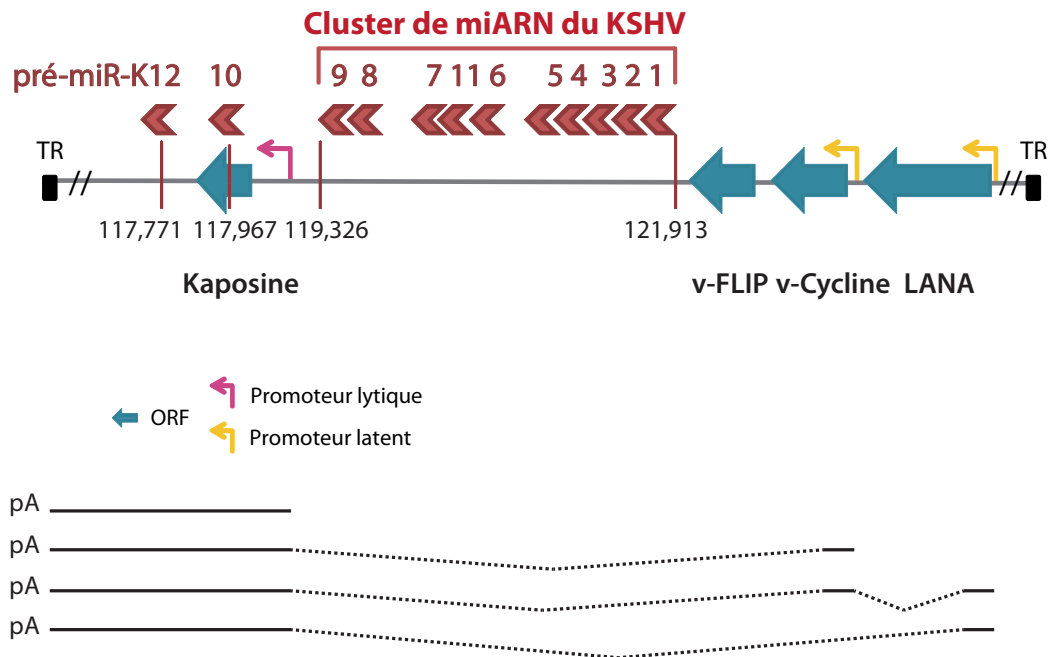


Figure 6 : Cluster de miARN du KSHV. Les douze pré-miARN du KSHV indiqués par les flèches rouges sont tous localisés dans la région associée à la latence. Dix sont sur un même transcrit primaire (pré-miR-K1 à K9 incluant pré-miR-K11). Pré-miR-K10 et -K12 sont situés dans la région codante et en 3'UTR de la Kaposine respectivement. Les coordonnées génomiques du cluster intronique des pré-miARN sont 122 209 à 119 153. En dessous, sont représentés les différents transcrits possibles, en ligne noire les exons et en pointillés les introns. D'après (Gottwein 2012).

2. Expression

L'expression des miARN est sous la dépendance de 2 promoteurs latents. Un premier promoteur permettant la synthèse d'un transcrit de 4.8 kb qui comprend les protéines de latence LANA, v-cycline et v-FLIP. Un deuxième promoteur qui permet la synthèse d'un transcrit contenant les protéines v-FLIP, v-cycline et les Kaposines. Tous ces transcrits latents sont exprimés dans les spindle-cells et les PEL. On retrouve un transcrit intronique de 9 kb incluant LANA, exprimé uniquement dans une lignée cellulaire spécifique (BC-1). Deux miARN, miR-K10 et miR-K12 sont également sous la dépendance d'un promoteur lytique permettant la synthèse d'un ARNm de 1.3 kb non épissé exprimant la Kaposine B (Cai and Cullen, 2006). Ces deux miARN sont également exprimés en phase lytique et sont des éléments cis-régulateurs négatifs qui déstabilisent la Kaposine et diminuent le taux d'expression de la protéine (Lin and Sullivan, 2011). Voir Figure 6.

3. Homologues des miARN du KSHV

Le rhésus rhadinovirus, un gamma-herpèsvirus proche du KSHV code 7 miARN localisés dans la région associée à la latence mais aucune conservation de séquence, mise à part entre miR-K10 et rR1-15-3p du RRV n'a été trouvée (Umbach and Cullen, 2010). Cependant les miARN des différents herpèsvirus, possèdent des convergences fonctionnelles et, spécifiquement dans le cas du KSHV, les séquences des miARN entre les différents isolats du virus sont aussi très conservées.

Des homologues fonctionnelles entre miARN viraux et humains existent. Certains miARN (miARN de référence ou isomiR) du KSHV partagent ainsi des séquences similaires à des miARN humains : miR-K11/miR-155 (Gottwein et al., 2007; Skalsky et al., 2007), miR-K10/miR-142-3p (Gottwein et al., 2011), miR-K3/miR-23 et miR-K6-5p avec miR-214 et miR-15/16 (Skalsky et al., 2007).

4. Polymorphisme et isomiR

Certains miARN du KSHV possèdent un polymorphisme : miR-K2, -4, -5, -6, -7, -9 (Gottwein, 2012). Une étude a démontré que miR-K5 possède un polymorphisme de A en G dans le brin passager retrouvé dans plus de 20 % de toutes les séquences analysées dans la lignée cellulaire BCBL-1. Ce polymorphisme d'un nucléotide (SNP) altère la structure secondaire de la tige de miR-K5 et diminue l'efficacité de maturation du miARN mature (Gottwein et al., 2006). De même pour miR-K9, qui est le miARN le plus variable dans les différents isolats. Son expression est perdue dans la lignée cellulaire BC-3, qui est la conséquence d'une grande variabilité dans la séquence primaire du miARN (Umbach and Cullen, 2010). Ceci sous entend que miR-K9 n'est pas essentiel pour le maintien de la latence, ni pour la réactivation lytique ni pour la lymphomagenèse (Gottwein, 2012). miR-K10 possède deux formes matures de référence, miR-K10a et miR-K10b, se distinguant par un nucléotide édité par l'enzyme ADAR sur le brin 3p en deuxième ou 3 troisième position de l'extrémité 5'. L'édition du miARN se produit durant la phase lytique et l'expression significativement fonctionnelle de miR-K10b a lieu durant cette phase. Les deux isoformes s'expriment au même niveau et partagent des cibles en commun tel que BCLAF1 (BCL2-associated transcription factor 1) (Lei et al., 2012; Umbach and Cullen, 2010) .

La présence d'une charge virale élevée dans le sang chez les patients atteints de la maladie de Castelman ou du syndrome des cytokines, où la présence d'un polymorphisme est important

dans la séquence des miARN, suggère que les variations de séquence des miARN jouent un rôle dans la pathogenèse. Cette variation de séquence peut en effet avoir un rôle dans l'activité du miARN (Ray et al., 2012). Récemment, il a en effet été démontré une expression aberrante de miARN dans des tumeurs humaines comme les leucémies lymphocytaires chroniques des cellules B et des lymphomes B (Caramuta et al., 2013). Ainsi une dérégulation de leur expression pourrait expliquer certaines pathologies. Les SNP dans les séquences de ces miARN peuvent également altérer leur structure secondaire et avoir un impact sur leur maturation. Le polymorphisme de séquence permet aussi d'agrandir le pool de cibles et donc d'augmenter l'effet du miARN.

5. Rôle des miARN du KSHV

Il est important de déterminer le « targetome » des miARN du KSHV pour identifier leurs fonctions (Tableau 1).

Tableau 1 : cibles et fonctions des miARN du KSHV. Seulement les cibles validées par tests fonctionnels sont indiquées dans ce tableau. Le gène, le miARN effecteur et les conséquences de la répression sont listées. Voir revue de Gotwein (Gottwein, 2012) pour les références.

Gène	miR-	Conséquences fonctionnelles
BACH1	K11	Augmente la viabilité sous stress oxydatif
BCLAF1	K5	Module l'activité des caspases
CASP3	K9-3p	Inhibition de l'apoptose
	K10a,	
	K10b	
	K1	
CDKN1A/p21	K3	Atténuation de l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p21
	K4-3p	
	K1	
IKBKE/IKK ϵ	K11	Stabilisation de la latence
MAF	K1	Sous-régulation des marqueurs d'expression LEC
	K6-5p	
	K11	
MICB	K7	Réduit la reconnaissance et l'activation des NK
NFIB	K3	Stabilisation de la latence par régulation du promoteur de RTA
NFKBIA/I κ B α	K1	Stabilisation de la latence par régulation du promoteur de RTA
RBL2	K4-5p	Dé-répression de l'ADN methyl transferase Dnmt1
SMAD5	K11	Atténuation du signal TGF-beta
TWEAKR	K10	Inhibition de la sécrétion de cytokines et de l'apoptose
KSHV RTA (ORF50)	K9-5p	Réduit l'expression de RTA et inhibe la réactivation lytique du KSHV
	K5	
	K7	
C/EBP β	K11	Inhibition de la sécrétion de cytokine

Les miARN du KSHV ciblent des ARNm nombreux et variés, et donc, régulent l'activité de différents processus physiologiques.

Le premier point de régulation est le contrôle de la réactivation lytique et le maintien de la phase de latence. La protéine RTA est suffisante et nécessaire pour la réactivation lytique, ainsi les miARN du KSHV comme miR-K9 vont cibler directement l'ARNm (Bellare and Ganem, 2009) ou bien encore comme miR-K3 réguler le promoteur de RTA en ciblant un facteur nucléaire (I/B) qui active le promoteur (Lu et al., 2010a).

Les programmes épigénétiques et transcriptionnels sont également contrôlés par les miARN du KSHV, comme miR-K4-5p qui régule le répresseur de transcription RBL2 (retinoblastoma-like 2) qui lui-même régule l'ADN méthyl transférase 1, 3a et 3b (DNMT1, 3a et 3b) (Lu et al., 2010b). Une délétion des miARN introniques du KSHV résulte en une diminution de la méthylation des îlots CpG du génome viral et cellulaire (Lei et al., 2010; Lu et al., 2010b). Beaucoup de facteurs de transcription sont des cibles des miARN du KSHV, ainsi la reprogrammation transcriptionnelle et épigénétique est une fonction importante des miARN du KSHV.

La dérégulation du cycle cellulaire ainsi que l'inhibition de la mort cellulaire contribuent aux propriétés oncogéniques du KSHV. Suffert *et al* ont montré qu'un effecteur d'apoptose, Caspase 3, était régulé par trois miARN, miR-K1, miR-K3 et miR-K4-3p (Suffert et al., 2011). De même miR-K11 a des propriétés oncogéniques supposées de par son homologie avec miR-155 classé comme oncomiR (Jiang et al., 2010).

Les miARN ont également des fonctions plus spécifiques permettant l'évasion au système immunitaire et la régulation des cytokines (Gottwein, 2012).

Les miARN du KSHV s'expriment à des taux très différents malgré le fait qu'ils se localisent tous sur le même transcrit primaire (Lin et al., 2010; Umbach and Cullen, 2010). Cette variation d'expression associée à la divergence de leurs rôles indique une modulation en fonction des cibles et des besoins du virus (Gottwein et al., 2011).

Il existe différents modes de synthèse des miARN, en plus de la voie canonique, qui sont détaillés dans la revue. Les miARN viraux partagent les mêmes particularités que les miARN cellulaires puisqu'ils utilisent la machinerie de l'hôte pour leur synthèse. Leur expression est donc régulée par les mêmes voies que les miARN cellulaires en plus des facteurs viraux spécifiques.

C. Les microARN

I. Généralité sur les miARN

1. Prédiction de tige-boucle contenant des miARN

Actuellement, la mise en évidence de miARN s'opère grâce au clonage et séquençage de petits ARN. De nombreux algorithmes ont été créés pour prédire les régions avec des tiges-boucles contenant des miARN et les résultats obtenus sont ensuite validés par séquençage. Généralement, une tige-boucle candidate possède une structure secondaire qui va être classée en fonction de sa stabilité thermodynamique, son nombre de nucléotides non appariés dans la tige, son nombre de boucle et la taille de sa boucle terminale.

2. Dénomination des miARN

Des règles sont définies pour nommer un miARN chez les animaux, ainsi on retrouve le préfixe « mir » suivis d'un numéro unique d'identification. Les miARN présents en multiples copies par différents gènes auront un chiffre permettant de les différencier (ex : mir-2-1) alors que les paralogues se distinguent par une lettre (ex : mir-1a). Si l'on se réfère aux miARN matures on utilise la dénomination miR-.

L'espèce dans laquelle le miARN est présent est indiqué par trois lettres précédant le nom du mir (exemple : hsa-miR-1 pour Homo sapiens miR-1).

Chaque nouveau miARN est soumis et rentré dans la base de données miRBase (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014)

3. Biogenèse des miARN

De façon canonique, les miARN dérivent d'un long transcrit primaire (pri-miARN) contenant une ou plusieurs tiges boucles imparfaites. Chez les animaux, le processus de maturation fait appel à de multiples étapes séquentielles impliquant deux enzymes de type RNase III, Drosha et Dicer. La première étape se déroule dans le noyau, où Drosha associée à son co-facteur DGCR8 va reconnaître puis cliver le pri-miARN en pré-miARN au niveau de l'extrémité de la tige pour relarguer un précurseur de miARN (pré-miARN) (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004a; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004) d'une longueur moyenne de 70 nucléotides (Lee et al., 2002). Le pré-miARN est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme grâce à une exportine-5 RAN-GTPase (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Le pré-miARN est reconnu par Dicer associé à son co-facteur TRBP

pour une deuxième étape de maturation, où cette fois l'enzyme va cliver au niveau de la boucle terminale à 22 nucléotides de l'extrémité de la tige pour relarguer un duplex de miARN contenant un brin 5p et un brin 3p (Bernstein et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Macrae et al., 2006; Zhang et al., 2004). Un des deux brins va ensuite être incorporé dans un complexe effecteur RISC (RNA induced silencing complex) contenant une protéine membre de la famille Argonaute (Ago) (Carmell et al., 2002). Le miARN chargé dans le complexe va ensuite permettre à ce dernier de cibler un ARNm par complémentarité de séquence. La région essentielle pour le ciblage se localise en 5' du miARN, précisément des nucléotides 2 à 7 ou 8, et se nomme région « seed » ou graine (Brennecke et al., 2005; Lai, 2002; Lewis et al., 2003). L'efficacité de maturation et de ciblage des miARN dépend de plusieurs caractéristiques : la localisation de la séquence complémentaire à la « seed » dans l'ARNm, la proximité des sites de liaison d'autre miARN, l'accessibilité du site de liaison et la structure secondaire de la tige boucle contenant le miARN (pour revue voir (Bartel, 2009)). Pour plus de détail sur la biogenèse et les voies alternatives de production des miARN se reporter à la revue section expression des miARN viraux.

II. Formation et évolution des miARN

1. Expression des miARN

a. Différents modes d'expression

Les miARN peuvent être exoniques (20 %), introniques (30 %) ou intergéniques (50 %) (Baskerville and Bartel, 2005; Berezikov et al., 2011; Han et al., 2009; Rodriguez et al., 2004). Dans le cas d'un miARN exonique, il y a une compétition entre l'expression du gène codant le miARN et ce dernier. En effet si le miARN est produit, il y aura altération de la phase codante du gène et donc aucune production de la protéine correspondante. Chez le KSHV, le taux de Drosha corrèle avec les phases de latence et lytique. En effet peu de protéines Drosha sont présentes lors de la phase lytique et inversement, Drosha est exprimée de façon abondante en phase latente. Ce taux détermine l'expression du miR-K10 et de la protéine Kaposine. Quand Drosha est surexprimée, elle va cliver abondamment le miR-K10 et donc peu de protéine Kaposine sera produite (Lin and Sullivan, 2011).

Les miARN intergéniques possèdent leurs propres promoteurs en comparaison aux miARN introniques qui dans la majorité des cas partagent leur promoteur avec le gène de l'hôte. Dans certains cas il a cependant été démontré que des miARN introniques étaient produits à partir

de transcrits alternatifs avec leur propre promoteur (Aboobaker et al., 2005; Isik et al., 2010; Martinez et al., 2008). De récentes études ont montré d'une part que Drosha interagit avec la machinerie d'épissage, qu'il existe une coordination entre l'épissage et la maturation du pri-miARN et d'autre part que l'épissage pouvait favoriser la maturation par Drosha (Agranat-Tamir et al., 2014; Kim and Kim, 2007; Mattioli et al., 2013).

Les miARN du KSHV sont en grande majorité introniques, en cluster sur un unique transcrit primaire. Je me focaliserai donc sur ces deux propriétés pour la suite de l'introduction.

b. Modèles d'expression des miARN introniques

Il existe trois modèles d'expression des miARN à partir d'intron : pré-épissage, co-épissage et post-épissage. Dans le cas du pré-épissage, le miARN est clivé avant formation des jonctions des deux exons, l'expression des miARN et de l'ARNm est donc mutuellement exclusive. Dans le cas du co-épissage, un complexe spécifique nommé « commitment complex » contenant les ribonucléoprotéines du système d'épissage et le microprocesseur se forme après liaison des exons entre eux. Enfin, dans le cas du post-épissage, il y a formation de l'intron en forme de lasso comprenant le miARN et l'ARNm (Brown et al., 2008). Certains miARN recouvrent le site d'épissage des introns et une compétition entre le microprocesseur et la machinerie d'épissage se produit (Figure 7) (Agranat-Tamir et al., 2014; Mattioli et al., 2013).

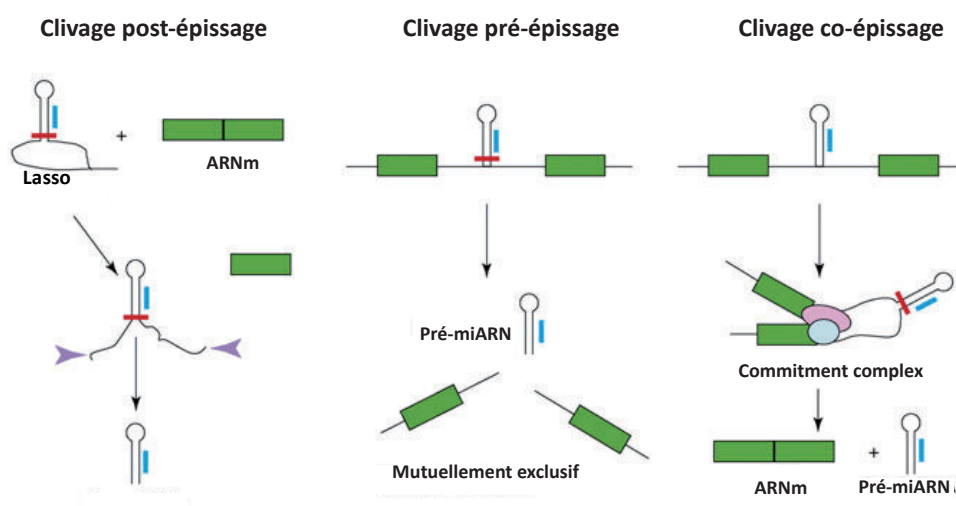


Figure 7 : différentes voies d'expression des miARN intronique. La production du miARN peut être post (production de l'ARNm et du pré-miARN), pré (production mutuellement exclusive de l'ARNm ou du pré-miARN) ou concomitant (production de l'ARNm et du pré-miARN) à l'épissage. En vert sont représentés les exons. D'après (Brown et al., 2008).

2. miARN en cluster

a. Formation des cluster

Plus de 30 % des miARN introniques et intergéniques chez les animaux sont retrouvés en cluster et la majorité des miARN sont co-exprimés (Altuvia et al., 2005; Bartel, 2004; Lee et al., 2002). Il existe 4 modèles expliquant l'origine des miARN en cluster. Le modèle général nommé « put together » propose que des miARN éloignés dépendants de deux promoteurs différents mais ayant des fonctions similaires se retrouvent sous la dépendance du même promoteur. Le modèle « left together », où deux miARN sont situés sur des loci différents dans le génome, vont lors d'un réarrangement génomique devenir proche et sous la dépendance du même promoteur. Le troisième modèle « tandem duplication » propose qu'un miARN se duplique pour former un transcrit polycistronique. Enfin le dernier modèle « new hairpin » explique qu'un nouveau miARN pourrait émerger dans un transcrit contenant déjà un miARN. Le nouveau miARN aurait acquis au fil des sélections une structure secondaire en tige-boucle optimale pour sa maturation et son expression (Marco et al., 2013).

b. Conservation et évolution des clusters de miARN

Peu de clusters de miARN sont conservés entre les espèces mais également entre les virus. Seulement deux clusters de miARN sont conservés chez les métazoaires : miR-92a/miR-92b ; miR-125/let-7/miR-100. Un faible nombre de miARN ont été perdus au cours de l'évolution des deutérostomiens et environ un tiers des miARN sont spécifiques à chaque *phylum*. Chez les animaux, le modèle le plus probable est la formation de nouvelles tiges-boucles sélectionnées au fil du temps par clivage par la machinerie de maturation des miARN. Les miARN en cluster sont très proches les uns des autres (minimum 3kb), généralement les séquences sont séparées de 130 nucléotides. La proximité physique d'un miARN avec un autre peut faciliter l'accès de Drosha au nouveau miARN et ceci suggère aussi qu'un régulateur d'un miARN peut altérer l'expression des miARN proches (Berezikov, 2011).

3. Evolution des miARN

a. Regroupement en famille

Les miARN retrouvés sous forme de cluster n'appartiennent pas tous forcément à la même famille. Les gènes des miARN ont été catégorisés dans différentes familles de miARN basées sur la séquence ou la structure du pré-miARN. Environ 73 % (15,554) des gènes de miARN dans miRBase R19 sont groupés dans des familles (Kozomara and Griffiths-Jones,

2014). Les miARN appartenant à la même famille ne co-localisent pas forcément mais possèdent des homologies fonctionnelles dans les différentes espèces. Pour appartenir à une même famille les miARN doivent avoir a/ un ancêtre commun ou montrer une forte conservation de séquence, b/ une conservation de la structure secondaire, c/ un duplex miARN 5p/3p similaire et partageant des caractéristiques fonctionnelles ou biologiques communes et d/ conserver une relation miARN/ seed/ cible. On retrouve des classes de miARN qui ne possèdent pas d'homologie de séquence mais partagent des propriétés structurales ou fonctionnelles. La famille la plus grande dans miRBase est celle de *let-7* (Kamanu et al., 2013).

b. Emergence de nouveaux miARN

Les nouveaux miARN sont tout d'abord exprimés à faible taux dans des tissus spécifiques pour limiter les effets délétères de la régulation de la cible correspondant à leur séquence seed. Généralement les miARN ayant une action délétère pour la cellule sont éliminés au fur et à mesure du transcriptome par la sélection naturelle. Dans le cas d'une action favorable pour l'organisme, le miARN est maintenu, son expression augmente et il n'est plus restreint à des tissus spécifiques. Les miARN anciens étaient exprimés dans des cellules spécifiques chez les ancêtres des protostome et deuterostome et leur motif d'expression s'est dispersé dans l'organisme au fil de l'évolution. D'un point de vue évolutif, miR-100 est le miARN le plus ancien, conservé chez les métazoaires et les cnidaires, et il était initialement présent uniquement dans des cellules autour de l'ouverture du tube digestif. D'après ce modèle, les miARN les moins conservés seraient les moins exprimés et avec les fonctions les moins importantes (Berezikov, 2011; Cuperus et al., 2011).

Les éléments transposables sont une source naturelle de miARN et pourraient expliquer la divergence du pool de miARN entre les espèces et permettraient de réguler leur activité délétère (Borchert et al., 2006; Heras et al., 2013; Piriyaongsa et al., 2007).

c. Expression des nouveaux miARN

Dans le cas du KSHV, l'expression différentielle des miARN suggère une évolution différente entre miARN, à savoir que certains seraient des miARN plus jeunes en cours de formation et d'optimisation de leur structure secondaire ou de leurs cibles.

Ainsi le changement d'expression de miARN est un facteur important pour l'évolution de nouveau phénotype. L'innovation des mécanismes de régulation des gènes au niveau post-transcriptionnel est une force motrice permettant l'évolution des miARN et donc des

organismes. 100 000 tiges-boucles sont prédites pour pouvoir coder des miARN dans le génome humain et récemment 1000 nouveaux candidats miARN ont été recensés chez la souris, certains se liant à DGCR8, d'autre interagissant avec Ago1 et 2 indiquant que ces candidats se lient aux protéines effectrices des miARN. Ces candidats se liaient également à des ARNm complémentaires. Une étude de leur niveau d'expression indique qu'ils sont exprimés à faible taux suggérant qu'ils sont encore en pleine évolution et peut-être pas tous fonctionnels. Une régulation de l'expression des nouveaux miARN se produit donc et détermine leur devenir (Friedländer et al., 2014).

La modulation de l'expression des miARN est un avantage car elle permet de modifier finement l'expression génique mais aussi les processus cellulaires en fonction de l'environnement et en réponse au stress en complément d'autres procédés (régulation transcriptionnelle et protéique).

III. Régulation des miARN

60% des gènes sont contrôlés par les miARN et un miARN peut réguler jusqu'à une centaine d'ARNm cibles (Friedman et al., 2009; Lewis et al., 2003). La diversité et l'abondance des miARN suggèrent qu'un vaste nombre de processus biologiques est contrôlé au moins en partie par les miARN. Ces derniers possèdent en effet des rôles variés tels que le contrôle du développement, de la différenciation, de la prolifération et de la mort cellulaire ou du métabolisme.

La dérégulation de l'expression des miARN est impliquée dans de nombreuses maladies comme les cancers, les problèmes cardiaques, les problèmes du système nerveux et certaines maladies génétiques. L'expression globale des miARN est fréquemment réduite dans les échantillons tumoraux comparés aux tissus normaux. Par exemple Let-7 est sous-exprimé dans le cas du cancer des poumons (Takamizawa et al., 2004). Inversement, la surexpression de ce miARN diminue la progression tumorale *in vivo* (Boyerinas et al., 2010). De même la surexpression de miR-21 et miR-155 jouent un rôle oncogène grâce leurs propriétés anti-apoptotiques (Jiang et al., 2010; Si et al., 2006). La régulation de l'expression d'un miARN permet également de contrôler le lieu d'action de ce dernier, en effet certains miARN sont exprimés de manière tissu-spécifique, comme par exemple miR-1 dans les muscles (Chen et al., 2006) ou miR-122 dans le foie (Girard et al., 2008).

La concentration cellulaire des miARN peut être régulée transcriptionnellement ou post-transcriptionnellement et chacune des étapes de la biogenèse est un point potentiel de régulation (Figure 8). Parallèlement au contrôle du taux de miARN, la régulation de l'activité des miARN est un élément crucial. Voir les revues pour les différents points de régulation énumérées ci-après (Davis and Hata, 2009; Finnegan and Pasquinelli, 2013; Krol et al., 2010). La figure 9 cite quelques exemples de protéines régulatrices.

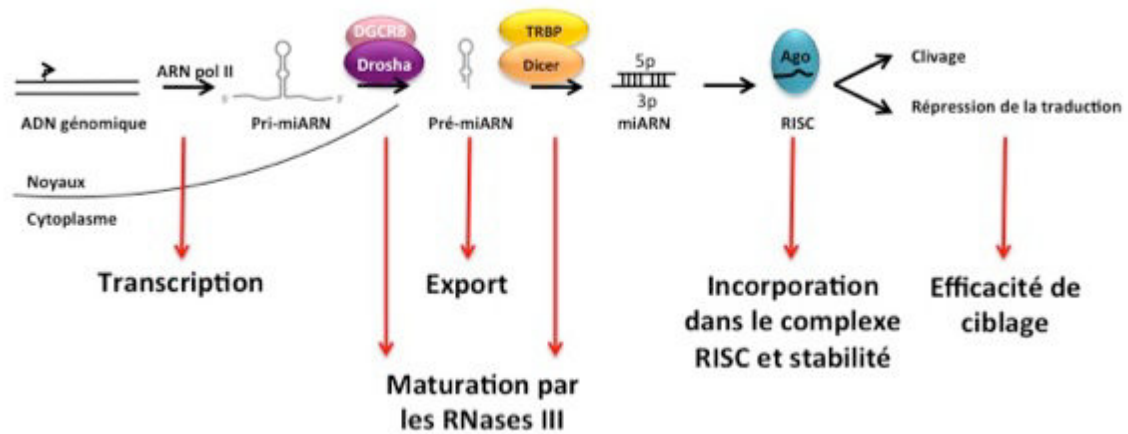


Figure 8 : différentes étapes de régulation de l'expression des miARN. Les miARN peuvent être régulés au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (maturation par Drosha et Dicer, export du pré-miARN, incorporation et sélection du brin de miARN dans le complexe RISC, stabilité et efficacité de ciblage du miARN mature).

1. Régulation transcriptionnelle

Le premier point de la régulation est le contrôle de la transcription du pri-miARN. Elle est similaire à celle des gènes codant des protéines. Ainsi les TATA box, les îlots CpG, les éléments d'initiation, certaines modifications des histones et les facteurs de transcriptions ont leur importance. Les miARN peuvent cibler directement des facteurs de transcription et un mécanisme d'autorégulation entre miARN et ces facteurs peut donc s'installer. Ainsi, *Let-7* effectue un auto-contrôle avec *c-Myc* (Sampson et al., 2007). Plusieurs facteurs de transcription peuvent se lier à un promoteur de miARN et contrôler son taux d'expression. Par exemple, HDAC4 favorise l'expression de miR-K1 (Nasser et al., 2008). L'alternance de méthylation et acétylation des histones et du génome régule également l'activité des promoteurs. Ainsi, la modification des histones va jouer un rôle de balance entre activation et répression de la transcription (Davis and Hata, 2009).

2. Microprocesseur

L'abondance des miARN ne corrèle pas toujours avec le taux de pri-miARN associé. En effet le complexe Drosha/DGCR8 (microprocesseur) joue un rôle pivot dans la régulation de l'abondance des miARN puisqu'il s'agit de la première étape de maturation. La reconnaissance et la liaison de DGCR8 constituent la première étape de régulation de la biogenèse. Une structure secondaire optimale en tige-boucle du pri-miARN est importante pour un bon clivage par le complexe Drosha/DGCR8. Les motifs structuraux sont donc des facteurs limitant de la maturation par Drosha. De plus il existe un rétrocontrôle entre Drosha et DGCR8. En effet DGCR8 stabilise Drosha et inversement Drosha peut cliver deux tiges-boucles situées en 5'UTR de l'ARNm codant DGCR8 et ainsi inhiber l'expression de ce dernier (Han et al., 2009). Il a également été constaté que la présence de Fer favorisait le clivage des pri-miARN (Quick-Cleveland et al., 2014). De même de nombreux co-facteurs semblent moduler l'activité de Drosha et DGCR8 (Krol et al., 2010). Cette partie sera détaillée dans la section IV.

3. Export

Le deuxième point de régulation est l'export du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme. Cette étape est dirigée grâce à l'Exportine 5, un facteur d'export nucléaire, qui reconnaît la structure en tige-boucle du pré-miARN et le transporte dans le cytoplasme par les pores nucléaires de façon Ran-GTP dépendante. Il est important de rappeler que cette régulation est dépendante de la longueur de la séquence et l'extrémité 3' sortante du pré-miARN (Bohnsack et al., 2004; Zeng and Cullen, 2004). Des knock-down de l'Exportine 5 diminuent le taux de miARN cytoplasmiques et donc la régulation de leurs cibles. Cependant, aucune accumulation de pré-miARN ne se produit dans le noyau, suggérant un rôle de stabilisateur et de protection de l'Exportine 5 sur le pré-miARN. Le taux d'Exportine 5 disponibles est un facteur limitant, une saturation de la machinerie sera dommageable pour la cellule avec une diminution de l'expression des miARN et à l'inverse lors d'une surexpression de l'Exportine 5 le taux de miARN augmente (Grimm et al., 2006; Lu and Cullen, 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2005).

4. Dicer

Le pré-miARN va être maturé par Dicer en association à son co-facteur TRBP (TAR RNA-binding protein). La structure secondaire et plus précisément la boucle terminale est

importante car c'est un élément clé dans la régulation de l'expression des miARN. Elle représente une plateforme de fixation de co-facteurs modulant la structure de la tige-boucle ou l'activité des enzymes de maturation. Par exemple, LIN-28B en se fixant à la boucle de pri-let-7 et pré-let-7 inhibe le clivage par Drosha et Dicer (Rybak et al., 2008; Wulczyn et al., 2007).

L'accumulation de Dicer est dépendante de TRBP. Cette dernière induit un réarrangement structural du domaine hélicase de l'enzyme favorisant son activité (Ma et al., 2008; Zhang et al., 2002). TRBP peut être phosphorylée et par conséquent stabilisée (Paroo et al., 2009), et par exemple dans le cas des carcinomes, la protéine TRBP est inactivée et Dicer ne clive plus les pré-miARN (Melo et al., 2009).

5. Activité

Le nombre de miARN actifs dans une cellule est directement associé à la protéine Ago et au complexe RISC. Le taux de protéines Ago dans la cellule contribue à la régulation des miARN. En effet une surexpression d'Ago mène à une surexpression des miARN. Ago est donc un facteur limitant de l'activité et de l'expression des miARN (Diederichs and Haber, 2007; O'Carroll et al., 2007).

Les variations de séquences dues à l'édition, aux SNP ou aux mutations ponctuelles modifient également le taux d'expression des miARN. Ces variations affectent en effet l'efficacité de maturation, leurs activités de ciblage en changeant le pool de cibles et la stabilité du miARN qui dépend du nombre de cibles et de leur complémentarité car les miARN parfaitement complémentaires déclinent plus rapidement (Davis and Hata, 2009).

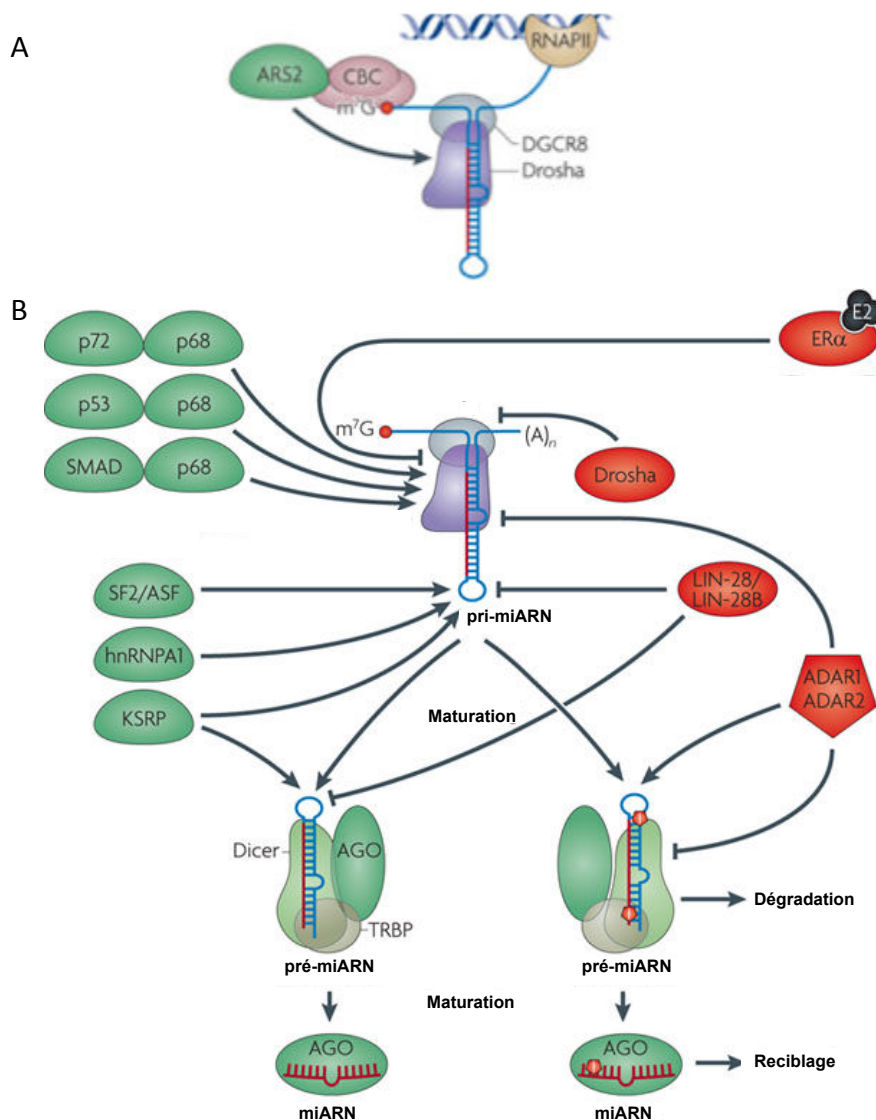


Figure 9 : A : régulation de la transcription (A) et de la maturation et de l'activité des miARN (B). Des exemples de protéines régulant les différentes étapes de la biogenèse des miARN sont représentés. Les protéines favorisant la maturation sont en vert et celle l'inhibant sont en rouge. ADAR est une enzyme d'édition, l'inosine intégrée dans la séquence est représentée par un pentagone rouge. D'après (Krol et al., 2010).

La première étape de maturation des miARN est dirigée par le microprocesseur. Elle définit les caractéristiques du miARN, à savoir :

- (a) sélectionner les tiges-boucles qui vont être clivées
- (b) moduler la quantité et la concentration de pré-miARN produites
- (c) définir les extrémités du miARN.

Ainsi pour l'étude de la régulation de l'expression des miARN, il est primordial d'analyser en détails le fonctionnement du microprocesseur.

D. Le microprocesseur

I. Composition et rôles dans la biogenèse des miARN

1. Généralité

Drosha associé à son co-facteur DGCR8 forme le microprocesseur. Ce complexe enzymatique est ubiquitaire mais le taux des protéines varie en fonction des lignées cellulaires. Le microprocesseur reconnaît la structure du pri-miARN de façon séquence indépendante. Des études précédentes indiquent que DGCR8 reconnaît la structure du pri-miARN, une tige d'environ 33 nucléotides connectée à une boucle terminale et des segments flanquants. DGCR8 reconnaît la jonction entre les séquences simples brins et les tiges-doubles brins et va positionner correctement Drosha sur la tige-boucle cible pour que cette dernière clive l'ARN et produise un pré-miARN (Han et al., 2004).

2. Co-facteurs

Le microprocesseur peut former un complexe plus large avec l'addition de protéines accessoires qui modulent l'activité du complexe d'une façon cellule spécifique (Gregory et al., 2004a). Ces protéines additionnelles permettent (voir figure 10):

- (a) de prévenir un clivage abortif du pri-miARN,
- (b) d'altérer la structure secondaire du pri-miARN pour favoriser ou inhiber le clivage,
- (c) d'augmenter le recrutement et le positionnement de Drosha sur la tige boucle et enfin
- (d) de favoriser l'activité de Drosha.

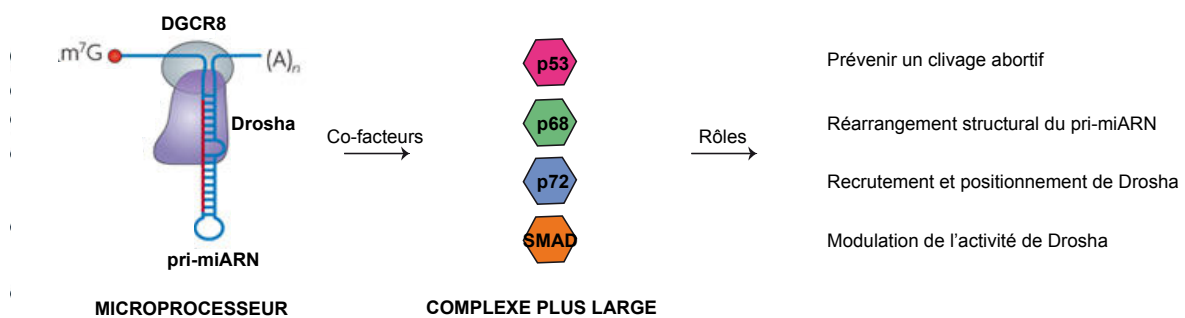


Figure 10 : co-facteurs du microprocesseur. Exemples de protéines modulant l'action de Drosha et DGCR8 ainsi que leurs actions. Inspiré de (Krol et al., 2010).

Des études de spectrométrie de masse associées à la technique d'immunoprécipitation montrent que les protéines p68 et p72 se lient au microprocesseur et ont une réelle implication dans l'activité du microprocesseur *in vivo*. Des études de simple ou double knock-down des deux protéines indiquent qu'elles agissent soit sous forme d'hétérodimère soit de façon redondante. Par exemple, il a été démontré que la protéine p68 ferait le lien entre le microprocesseur et le miARN et que la protéine p72 aurait un rôle hélicase dépendant. Le mécanisme d'interaction n'est pas encore formellement identifié mais les deux protéines induiraient un réarrangement de la tige pour favoriser le recrutement et la stabilité de Drosha, mais aussi pour permettre le recrutement de co-facteurs additionnels (Fukuda et al., 2007; Fuller-Pace and Ali, 2008). Des études montrent une interaction de p53 et SMAD avec p68 et Drosha (Bates et al., 2005; Warner et al., 2004). La liaison de ces facteurs accessoires servirait à une induction rapide des miARN en réponse aux stimuli extracellulaires.

II. Fonctions alternatives

1. Fonctions alternatives de Drosha

En plus de la maturation du pri-miARN, Drosha a la capacité de cliver les ARNm, comme par exemple les tiges-boucles contenues dans la séquence de DGCR8. Certaines structures en tiges-boucles ne contenant pas des miARN pourraient contrôler l'activité du microprocesseur en étant clivé. Dans ce cas-là, moins de microprocesseurs seraient disponibles pour la maturation des miARN (Chen et al., 2009; Han et al., 2009).

2. Fonctions alternatives de DGCR8

DGCR8 se lie à et clive d'autres types d'ARN non codant en plus des miARN comme les snoARN, ARNt, ARNr et lincARN (Li et al., 2012; Macias et al., 2012). La maturation des snoARN se fait de façon Drosha indépendante suggérant l'action d'autres RNases. De façon intéressante, les snoARN sont aussi une source de petits ARN non codants nommés sdARN (ARN dérivé de snoARN) qui s'associe à Ago et agissent comme des miARN fonctionnels (Scott and Ono, 2011). L'activité de DGCR8 est modulée par la phosphorylation de sites augmentant son activité (Herbert et al., 2013) et inversement la séquence de DGCR8 peut être clivée par des caspases, inhibant son activité (Gong et al., 2012).

3. Régulation des transposons et rétrotransposons par le microprocesseur

Récemment, Caceres et al ont montré que l'ARNm de LINE-1 (human long interspersed element 1), Alu et SVA peuvent être reconnus par le microprocesseur et dans le cas de LINE-1 clivé *in vitro* par Drosha. Des tests d'activité en culture cellulaire ont montré que le microprocesseur régule négativement LINE-1 et le rétrotransposon Alu *in vivo*. Sachant que plus de la moitié du génome humain est composé d'éléments transposables, le microprocesseur pourrait permettre la défense de l'intégrité génomique à grande échelle en réprimant les rétrotransposons de mammifère à un niveau post-transcriptionnel (Heras et al., 2013).

III. Structure du microprocesseur

1. Composition et structure de Drosha

La famille des RNases III inclue des ribonucléases spécifiques à l'ARN double brin qui partagent peu de motifs structuraux et fonctionnels communs. Les membres des RNases III sont retrouvés dans tous les règnes exceptés chez les archées. D'un point de vue évolutif, les enzymes RNase III sont apparues en premier chez les bactéries puis secondairement chez les eucaryotes par un mécanisme d'endosymbiose. Au minimum les enzymes RNase III sont composées d'un domaine nucléase avec une séquence conservée et d'un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRDB). Drosha possède deux domaines RNase III en tandem et un dsRBD en C-terminale. Les deux domaines RNase III forment un pseudo-dimère intramoléculaire clivant les extrémités 3' et 5' de la tige du pri-miARN. Les deux sites catalytiques sont décalés lors de la fixation à l'ARN ce qui explique pourquoi l'extrémité 3' est sortante de deux nucléotides. On retrouve également un domaine riche en proline et arginine. Figure 11.

Le domaine dsRBD de Drosha n'est pas suffisant pour une liaison correcte à l'ARN. L'enzyme nécessite la présence et l'action d'un co-facteur pour la liaison et le bon positionnement de ses domaines RNase III sur l'ARN, c'est pourquoi DGCR8 est un co-facteur essentiel de Drosha (Mueller et al., 2010; Nicholson, 2014).

2. Composition et structure de DGCR8

DGCR8 contient une région N-terminale requise pour la localisation nucléaire, un

domaine central de liaison au Fer (HBD), deux domaines de liaison à l'ARN double brin (dsRBD) et une queue conservée en C-terminale nécessaire à la co-immunoprécipitation avec Drosha. La région C-terminale qui inclue les deux domaines dsRBD et la queue conservée sont suffisantes pour la liaison au pri-miARN et à Drosha. Figure 11. Il a été démontré que la liaison du Fer à DGCR8 augmente son efficacité et la processivité de l'enzyme (Quick-Cleveland et al., 2014; Roth et al., 2013; Tsunetsugu-Yokota and Yamamoto, 2010; Weitz et al., 2014).

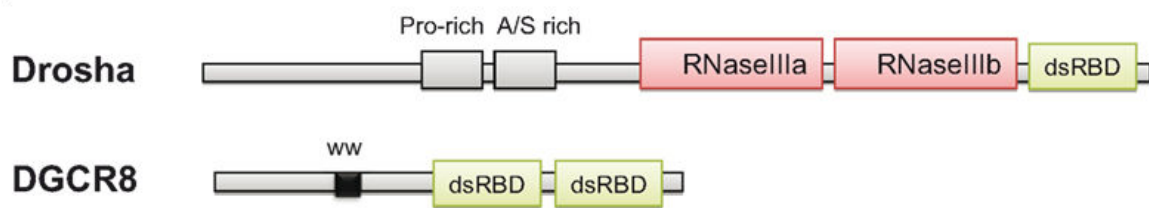


Figure 11 : Organisation génomique de Drosha et DGCR8. Les deux domaines RNase III sont indiqués en orangé (RIIIda et b) et les domaines de liaison à l'ARN (dsRBD) en vert. Le domaine WW de DGCR8 interagit avec le domaine riche en proline (Pro-rich) de Drosha. Le domaine de liaison au Fer de DGCR8 n'est pas représenté. D'après (Tsunetsugu-Yokota and Yamamoto, 2010).

IV. Reconnaissance et clivage du pri-miARN

Deux modèles s'opposent pour la reconnaissance de la tige boucle par DGCR8 et le clivage par Drosha : DGCR8 servirait d'ancre moléculaire au niveau de la jonction simple brin et double brin des segments flanquants et de la tige (base-anchor) (Han et al., 2006) ou alors au niveau de la boucle terminale et de la tige (loop-anchor) (Zeng and Cullen, 2005; Zeng et al., 2005). DGCR8 positionne Drosha qui va soit dans la première situation effectuer un clivage éloigné d'un tour d'hélice de la jonction d'environ 11 nucléotides, soit dans un deuxième cas réaliser le clivage après les 22 nucléotides de la boucle terminale. Figure 12. Dernièrement, Sullivan et al. ont montré que des boucles internes, la tige basale, les segments flanquants simple brin et la boucle terminale chez SV40 agiraient de manière coopérative pour le clivage par Drosha. Les auteurs proposent un mécanisme alternatif où les éléments structuraux incluant la tige et les segments flanquants permettraient le positionnement de DGCR8 et Drosha dans les régions basale et apicale double brin du pri-miARN (Burke et al., 2014). Il existe un modèle proposant en plus une trimérisation de DGCR8 sur le pri-miARN (exemple proposé avec pri-miR-30a). Ceci servirait de plateforme structurale avec une plus grande interface ARN/protéine activant le clivage par Drosha (Faller et al., 2010).

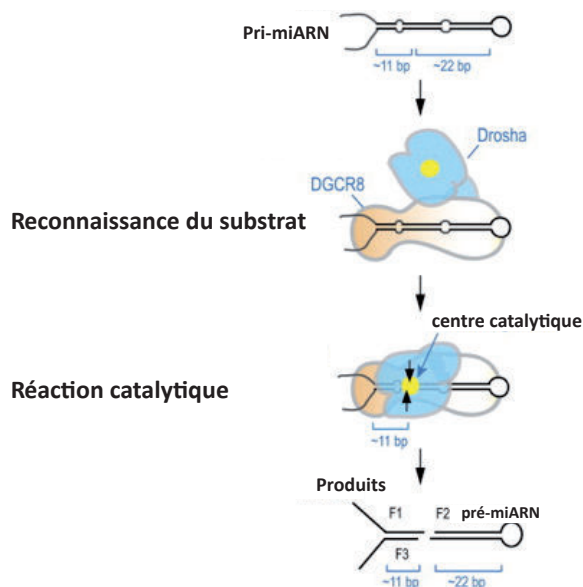


Figure 12 : modèle de reconnaissance du pri-miARN par DGCR8. DGCR8 sert d'ancre moléculaire à Drosha en reconnaissant la jonction simple brin – double brin de l'ARN (au niveau de la tige de 33 nucléotides ou de la boucle terminale). Après l'interaction de DGCR8 avec le pri-miARN, Drosha s'associe au substrat par l'intermédiaire de DGCR8 et clive le pri-miARN en pré-miARN. Le centre catalytique en jaune réunit les deux domaines RNase III, et clive la tige à environ 11 nucléotides de la base et produit une extrémité sortante de 2 nucléotides en 3'. D'après (Zeng et al., 2005)

Une gamme réduite de concentration de Drosha et DGCR8 permet une bonne efficacité de maturation du pri-miARN en pré-miARN. Dans le cas d'un taux trop bas, il se produit une maturation de miARN sous-optimaux et dans le cas d'une concentration trop élevée de microprocesseur des tige-boucles ne contenant pas de miARN seront clivées. Un changement d'expression de Drosha a un impact direct sur le taux de pré-miARN produits. Ainsi, dans le cas d'une expression faible de Drosha, les miARN sans mésappariement aux nucléotides 9-12 dans la tige sont surreprésentés (Sperber et al., 2014) .

Les cellules peuvent donc réguler l'expression des miARN en modulant l'expression de Drosha et permettre d'exprimer sélectivement certains miARN. De récentes études ont démontré que la structure secondaire du pri-miARN contrôle la spécificité et l'efficacité du processing par Drosha *in vitro* et *in vivo* suggérant que le clivage par Drosha est un mécanisme de régulation global du profil d'expression des miARN (Burke et al., 2014; Choudhury and Michlewski, 2012; Zeng and Cullen, 2005; Zeng et al., 2005).

OBJECTIFS DE LA THESE

L'accumulation de la plupart des miARN dans les différents tissus est contrôlée de manière fine dans l'espace et le temps, et des changements aberrants d'expression peuvent entraîner le développement de pathologies comme le cancer. De plus, beaucoup de miARN chez les animaux sont regroupés en cluster et transcrits sous forme d'un polycistron. Et ces miARN, retrouvés en cluster, s'expriment à des taux différents entre eux, suggérant une régulation au delà de la transcription et spécifique à chacun. Il est donc essentiel de comprendre ce qui permet la génération de miARN fonctionnels et dans les quantités physiologiques optimales. De récentes découvertes soulèvent l'importance de ce domaine de recherche. Notamment, le rôle des structures et séquences des précurseurs de miARN et de protéines accessoires (ou co-facteurs) pour leur maturation a été mis en évidence. Par ailleurs, peu de choses sont connues sur la régulation des miARN viraux, alors qu'ils sont une composante importante dans les relations hôte-pathogène. La première étape de régulation suivant la transcription est le clivage par le microprocesseur du pri-miARN en pré-miARN. Le microprocesseur constitué de Drosha et son co-facteur DGCR8 forme un complexe minimum essentiel et suffisant pour la maturation de pri-miARN (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004b). La présence et l'action de co-facteurs spécifiques du microprocesseur assistent et modulent l'action du complexe. De plus ils permettent d'affiner le site de coupure, évitant la production de formes diverse et sous-optimales de pré-miARN. Une erreur de coupure de Drosha va induire un changement de la séquence « seed » et donc une altération du pool de cible des miARN avec des effets physiologiques sur la cellule. La structure secondaire de la tige-boucle est également très importante. Des critères précis sont définis pour un clivage efficace en pré-miARN. Une boucle terminale trop large ou des segments flanquants simple brin inexistantes juxtaposés à la tige induisent des clivages abortifs de la tige boucle et donc des formes inactive de pré-miARN (Choudhury and Michlewski, 2012; Zeng and Cullen, 2005; Zeng et al., 2005). L'encombrement stérique et le repliement de l'ARN modulent enfin également l'activité du microprocesseur (Burke et al., 2014; Denli et al., 2004; Han et al., 2004; Zeng et al., 2005).

L'objectif principal de ce projet de thèse est de contribuer à ce domaine de recherche en étudiant la maturation des miARN du KSHV. Ce virus est l'agent étiologique du sarcome de Kaposi et peut être associé à des lymphomes agressifs de type B. De manière intéressante, le KSHV code 12 pré-miARN qui sont tous retrouvés dans une même région génomique et bien qu'ils soient exprimés en cluster sur un même pri-miARN, ils s'accumulent différemment dans les cellules infectées. Nous avons confirmé ces résultats par des

expériences préliminaires de banques de petits ARN et par northern blot quantitatif. Ceci suggère que leur expression est régulée de façon post-transcriptionnelle. Nous voulons comprendre cette régulation en étudiant la maturation du cluster de miARN par Drosha. Nos recherches se focaliseront sur l'identification des structures et séquences importantes pour cette maturation, ainsi que des protéines accessoires requises pour l'expression différentielle des miARN viraux.

Au commencement du projet de thèse, les données disponibles faisaient état d'une accumulation différentielle des miARN du KSHV entre eux et entre lignées cellulaires. Des laboratoires s'intéressaient au rôle de ces miARN et voulaient déterminer leur targetome afin d'évaluer l'importance de leur action. Cette dernière étant dirigée par le taux d'expression des miARN il est donc logique de s'intéresser à la régulation de l'expression des miARN. Ainsi l'étude d'un transcrite primaire codant plusieurs miARN comme c'est le cas pour le KSHV, est une opportunité pour l'étude de la régulation post-transcriptionnelle des miARN. On peut diviser le projet en trois grandes parties : (1) l'étude structurale du long cluster intronique de miARN, (2) l'efficacité de maturation des pré-miARN du KSHV par Drosha et (3) la recherche de co-facteurs de maturation des pré-miARN.

Nous avons tout d'abord vérifié le rôle de Drosha dans la maturation des miARN intronique du KSHV (partie A). Puis,

(1) la structure du cluster de miARN transcrite *in vitro* a été déterminé par la méthode de SHAPE (sondage à haut débit). Ceci nous a permis de voir si les miARN sont dans des structures en tige-boucle optimales pour le clivage par Drosha, et si la position des miARN dans le cluster à une importance significative. L'étude structurale a été restreinte au segment comprenant les 10 miARN introniques (miR-K1 à miR-K9, et miR-K11). Il est à noter que la technique de SHAPE est un outil puissant et a notamment permis à l'équipe de K. Weeks de déterminer la structure du génome entier du VIH (Watts et al., 2009) (partie B).

(2) En parallèle, nous avons analysé la maturation du cluster de miARN par Drosha, *in vitro* avec une enzyme recombinante et des transcrits d'ARN. L'efficacité d'excision des différents pré miARN a été analysée en fonction du temps par northern blot. Les résultats nous ont permis d'établir le début de la séquence d'évènements permettant la maturation d'un long ARN comportant de multiples tige-boucles, en miARN matures (partie C).

(3) La maturation par Drosha est une étape hautement régulée, impliquant des

protéines accessoires (ou co-facteurs). Ces protéines peuvent interagir soit directement avec Drosha/DGCR8 et faciliter l'assemblage du complexe de maturation (Microprocesseur), soit interagir directement avec le pri-miARN via des motifs de reconnaissance. Ces motifs semblent conservés et sont considérés comme des plateformes d'interaction pour la régulation de la maturation des miARN. Ainsi, un des projets de la thèse vise à identifier des co-facteurs impliqués dans la régulation de l'expression du cluster de miARN du KSHV.

L'approche utilisée consiste à incuber un transcrit ARN *in vitro* d'intérêt couplé à des billes d'agarose avec un extrait cellulaire infecté par le KSHV et de récolter les complexes. Les facteurs ainsi pêchés ont été identifiés par spectrométrie de masse et vont être caractérisés plus en avant par des test de knockdown et de surexpression partie D).

Combinés avec les résultats de quantification, nous avons pu établir un lien entre l'abondance des différents miARN, les caractéristiques structurales du long transcrit primaire et l'efficacité de maturation par Drosha. De même la fixation préférentielle de co-facteurs à certaine tige-boucle est un indice sur l'efficacité de maturation variable entre les miARN. Après avoir vérifier l'action de Drosha sur les pré-miARN du KSHV (partie A), nous avons voulu déterminer l'impact de la structure secondaire et de la position des tige-boucles codant ces miARN sur leur expression (partie B). Le projet se focalise ensuite sur la maturation par Drosha, pour cela nous avons effectuer différents types de tests de maturation *in vitro* afin d'analyser le mécanisme plus en détails (partie C). En parallèle, nous avons initié des expériences d'identification de cofacteurs pouvant moduler la liaison et l'action du microprocesseur (partie D).

RESULTATS

A. Rôle de Drosha dans l'expression des miARN du KSHV

I. Principe de l'expérience

La première étape a été de confirmer le rôle de Drosha dans le clivage des tiges-boucles en pré-miARN. Pour cela des tests de knock-down de Drosha par siARN ont été effectués et l'expression des pré-miARN et des miARN du KSHV a été analysée par northern-blot. L'expression des 10 pré-miARN introniques en condition de knock-down de Drosha a été comparée avec le taux d'expression des pré-miARN et des miARN en conditions normales. Des cellules HEK 293 n'exprimant pas naturellement les miARN du KSHV et n'étant pas infectées de façon naturelle, ont été transfectées ou non par des siARN dirigés contre Drosha. Après 48 heures de knock-down, un plasmide codant les 10 pré-miARN a été transfecté dans ces mêmes cellules. L'ARN et les protéines ont été ensuite récupérés après 48 heures d'expression du plasmide. L'efficacité du knock-down de Drosha a été vérifiée par western-blot et l'expression des pré-miARN par northern blot.

II. Résultats

1. Knock-down de Drosha

Le western-blot anti Drosha indique que le knock-down a été efficace. Nous ne détectons plus de protéine Drosha dans les échantillons transfectés avec les siARN anti Drosha comparé aux échantillons transfectés avec le siARN contrôle ou non transfectées (Figure 1).

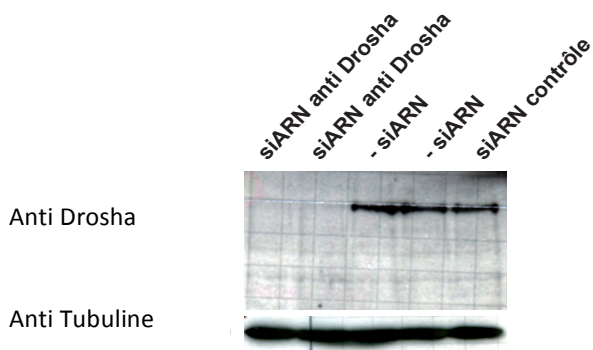


Figure 1 : Taux d'expression de la protéine Drosha lors du knock-down par siARN. Western-blot anti Drosha pour vérifier l'efficacité du knock-down par siARN. - siARN correspond au taux d'expression de Drosha dans des cellules HEK et siARN contrôle au taux de Drosha lors de la transfection d'un siARN contrôle n'affectant pas la quantité de Drosha. La tubuline est utilisée comme référence.

Les ARN extraits des mêmes cellules sont ensuite analysés par northern blot pour déterminer le niveau d'expression des miARN de KSHV en présence ou non de Drosha.

2. Expression des miARN du KSHV après knock-down de Drosha

En comparant les deux profils d'expression (expression des miARN après transfection avec siARN anti Drosha ou en condition d'expression normale) on observe une diminution nette de l'expression des pré-miARN et des miARN dans le cas du knock-down de Drosha. Dans le cas du miR-K1, en revanche, l'expression du miARN est stable. Ceci confirme l'action de Drosha pour la maturation des tiges-boucles en pré-miARN pour la majorité des miARN du KSHV. Figure 2.

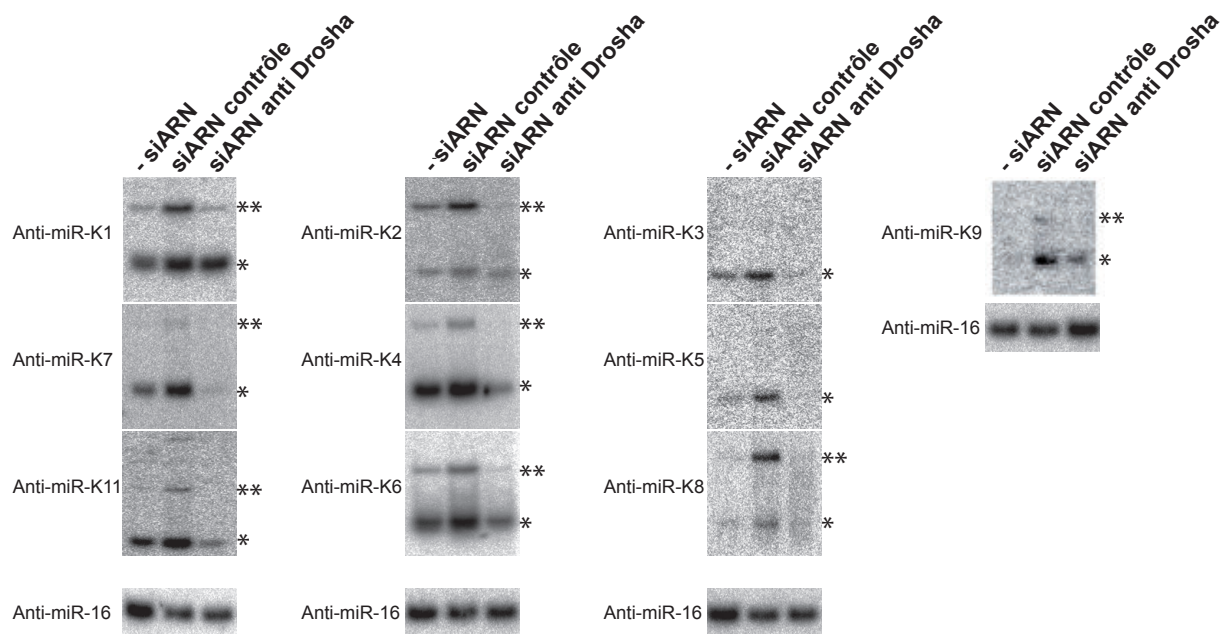


Figure 2 : Test d'expression des pré-miARN introniques lors d'un knock-down de Drosha dans des cellules HEK. Northern blot anti miARN intronique du KSHV en conditions normales d'expression du plasmide codant les miARN, lors d'une transfection d'un siARN contrôle et lors de la transfection de siARN anti Drosha. ** : forme pré-miARN, * : forme miARN

III. Matériel et méthodes

1. Lignée cellulaire

La lignée HEK 293 *GRIP* a été cultivée dans une atmosphère à 5% de CO₂ à 37 °C dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum fœtal de bœuf.

2. Knock-down de Drosha par siARN

Des cellules HEK 293 *GRIP* ont été déposées dans des plaques 6 puits (puits de 10 cm²) et transfectées avec le réactif lipofectamine 2000 (selon le protocole standard du fabricant (Invitrogen, Life technologies)) à 40 % de confluence avec 20 μ M de siARN anti Drosha pendant deux jours. Puis, les 10 pré-miARN intronique du KSHV ont été exprimés grâce à la transfection de 2 μ g de plasmide pcDNA-K10/12 .

Les ARN et les protéines ont ensuite été récoltés. Pour ceci, les cellules ont été lavées avec du DPBS, puis séparées en deux tubes. Le premier tube pour l'extraction des protéines et le deuxième pour celle des ARN. Les cellules ont été centrifugées à 4°C et le surnageant retiré. Le culot a été resuspendu dans 100 μ l de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02 % Sodium azide, 100 μ g/mL PMSF, 1 % NP-40 et un inhibiteur de protéase Roche EDTA free) et incubé 30 min. Le mix réactionnel a été centrifugé pour retirer les débris cellulaires et le surnageant gardé.

L'efficacité du knock-down a été testée par western blot. Le taux de protéines a été quantifié par Bradford et 50 μ g de protéines ont été déposés sur gel dénaturant SDS-PAGE 10 % (1mm d'épaisseur). Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose par électro-transfert liquide. La membrane a été bloquée avec du lait 5% et l'anticorps primaire de lapin anti Drosha a été dilué à 1/1000 dans du PBST (0.1 % tween-20). L'anticorps secondaire couplé à la peroxidase, anti lapin, a été dilué à 1/10000 dans du PBST. La révélation a été faite avec une solution de luminol (500 μ l) et une solution de peroxyde (500 μ l) (ECL) (0.125 ml de solution par cm² de membrane) (Thermo Scientific). L'autoradiographie a été faite avec la développeuse Kodak M35-M-X-OMAT-Processor.

Concernant les ARN, les cellules ont été centrifugées à 4°C, le surnageant est ensuite retiré et le culot repris dans du Tri-Reagent (Sigma-Aldrich). L'extraction d'ARN est en accord avec les recommandations du fabricant. Les ARN ont ensuite été analysés par northern blot comme précédemment décrit dans le matériel et méthode de l'article.

B. Rôle de la structure secondaire et de la position dans le transcrit primaire des tiges-boucles codant les miARN introniques dans la variation d'expression des miARN du KSHV

Le point essentiel du projet de thèse consiste à étudier le rôle de la structure secondaire du cluster des miARN introniques du KSHV dans la maturation par Drosha. En effet la structure secondaire de l'ARN dicte la fonction et l'activité de celui-ci. Nous souhaitons définir si les différentes tiges-boucles contenant les miARN possèdent un repliement optimal pour une bonne maturation par Drosha. En parallèle nous souhaitons savoir si le long transcrit primaire possède un cœur structural où certaines tiges-boucles seraient enfouies, et si des éléments *cis*-régulateurs tels que d'autres tiges-boucles pourraient réguler l'activité du microprocesseur.

Pour obtenir la structure secondaire du transcrit primaire intronique nous avons utilisé la méthode du SHAPE ou « selective 2' hydroxyl acylation revealed by primer extension » qui permet de prédire la structure secondaire de l'ARN avec une résolution de l'ordre du nucléotide. Les différentes étapes pour l'obtention des données issues de SHAPE consistent en : (1) la modification de l'ARN par un réactif spécifique, (2) une étape de rétro-transcription pour révéler les modifications et (3) le traitement des données (Deigan et al., 2009; McGinnis et al., 2012; Wilkinson et al., 2006).

I. Principe de l'expérience

1. Modification de l'ARN

Cette technique se base sur l'utilisation d'un réactif chimique qui va induire une acylation du groupement hydroxyle situé en 2' du ribose préférentiellement sur les nucléotides non appariés ou dans des régions flexibles. L'ARN doit être dans sa forme native et donc replié avant de subir la modification au réactif chimique. Il faut définir les concentrations optimales pour que la modification se fasse de façon statistique et qu'un brin d'ARN n'ait qu'une seule modification. Il existe différents réactifs chimiques (N-méthylisatoic anhydride ou NMIA, 1-méthyl-7-nitroisatoic anhydride ou 1M7 ou encore le

benzoyl cyanide) qui varient en fonction de leur temps de demi-vie. La réaction entre le réactif et l'ARN s'arrête après hydrolyse du réactif (figure 3 A/) (McGinnis et al., 2012).

2. Rétro-transcription par extension d'amorce couplée à des fluorochromes

Les sites modifiés sur l'ARN (acylé) vont avoir un encombrement stérique et seront détectés par rétro-transcription car la rétro-transcriptase va s'arrêter aux sites modifiés.

Pour l'étape de rétro-transcription par extension d'amorce, les amorces sont des ADN marqués de façon fluorescente. 4 amorces de même séquence avec 4 fluorochromes différents sont nécessaires pour la couverture d'une même région : une pour la rétro-transcription de l'ARN non modifié (contrôle négatif), une pour la rétro-transcription de l'ARN modifié (+), et deux autres pour un séquençage de type Sanger (figure 3 B/).

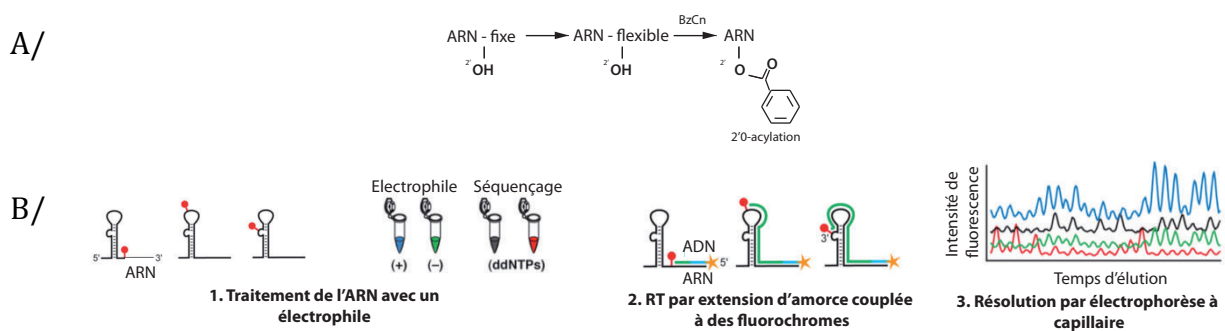


Figure 3 : Expériences de SHAPE. A/ Modification de l'ARN par le réactif du SHAPE, B/ Principe du SHAPE.

Il n'y a pas de limite de taille de l'ARN avec l'utilisation du SHAPE puisque ce système utilise des amorces fluorescentes pour recouvrir la séquence. Plus l'ARN sera grand, plus le nombre d'amorces fluorescentes nécessaires sera élevé.

3. Traitement des données

Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus sont ensuite fractionnés par électrophorèse à capillaire automatique, rendue possible par l'utilisation d'amorces fluorescentes pour l'étape de rétro-transcription. Le résultat de l'électrophorèse à capillaire constitue l'électrophérogramme et il va être ensuite analysé avec le logiciel ShapeFinder (Vasa et al., 2008) pour obtenir une réactivité pour chaque nucléotide. Ces réactivités corréleront avec le taux de modifications du nucléotide. Plus un nucléotide sera dans une région

flexible et/ou retrouvé non apparié, plus il aura de probabilité d'être modifié et donc d'avoir une forte réactivité. Les réactivités sont ensuite converties en pseudo-énergie libre ; ces données sont enfin transférées dans le logiciel de prédiction de structure secondaire RNAstructure (Reuter and Mathews, 2010).

4. Utilisation du SHAPE

La technique du SHAPE a permis d'obtenir la structure secondaire du génome viral entier du VIH en 2009 (Watts et al., 2009). Nous avons choisi d'utiliser cette technique puissante pour résoudre la structure secondaire du transcrit primaire intronique du KSHV. Grâce à cela nous avons pu mettre en évidence des différences structurales des tiges-boucles codant les miARN et ainsi expliquer l'abondance relative de chacun de ces miARN. En effet, une structure secondaire optimale de la tige-boucle favorise la maturation par Drosha du pri-miARN en pré-miARN. Cette structure optimale correspond à une boucle terminale flexible, une tige basale d'environ 11 nucléotides avant le duplex imparfait de miARN et des segments flanquants entourant la tige. De même, la position des tiges-boucles dans le cluster influence l'efficacité de clivage par le microprocesseur.

Une autre utilisation intéressante du SHAPE serait l'obtention de la structure secondaire de l'ARN *in vivo*. Deux nouveaux composés, le NIA (2-methylnicotinic acid imidazolide) et le FIA (2-methyl-3-furoic acidimidazolide), sont actuellement disponibles (Spitale et al., 2013). Leur solubilité et leur temps de demi-vie ont été augmentés pour améliorer leur efficacité. Ils réagissent avec l'ARN de la même façon que le NMIA en acylant l'ARN en 2'OH.

Récemment, le laboratoire de Kevin Weeks a développé une méthode permettant d'obtenir les réactivités de l'ARN en une seule expérience pour n'importe quelle taille d'ARN (Lusvarghi et al., 2013), en couplant les modifications de l'ARN au séquençage de nouvelle génération (NGS). Jusqu'alors, la couverture de la séquence obtenue par électrophorèse à capillaire était limitée à 300-500 nucléotides (technique utilisée lors de ma thèse).

II. Résultats : importance of the RNA secondary structure for the relative accumulation of clustered viral microRNAs

Les résultats obtenus pour cette partie sont décrits dans un article publié dans la revue Nucleic Acids Research.

Importance of the RNA secondary structure for the relative accumulation of clustered viral microRNAs

Maud Contrant[†], Aurélie Fender^{*†}, Béatrice Chane-Woon-Ming, Ramy Randrianjafy, Valérie Vivet-Boudou, Delphine Richer and Sébastien Pfeffer^{*}

Architecture et Réactivité de l'ARN – UPR 9002, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, Université de Strasbourg, 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg Cedex, France

Received December 12, 2013; Revised April 17, 2014; Accepted May 1, 2014

ABSTRACT

Micro (mi)RNAs are small non-coding RNAs with key regulatory functions. Recent advances in the field allowed researchers to identify their targets. However, much less is known regarding the regulation of miRNAs themselves. The accumulation of these tiny regulators can be modulated at various levels during their biogenesis from the transcription of the primary transcript (pri-miRNA) to the stability of the mature miRNA. Here, we studied the importance of the pri-miRNA secondary structure for the regulation of mature miRNA accumulation. To this end, we used the Kaposi's sarcoma herpesvirus, which encodes a cluster of 12 pre-miRNAs. Using small RNA profiling and quantitative northern blot analysis, we measured the absolute amount of each mature miRNAs in different cellular context. We found that the difference in expression between the least and most expressed viral miRNAs could be as high as 60-fold. Using high-throughput selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension, we then determined the secondary structure of the long primary transcript. We found that highly expressed miRNAs derived from optimally structured regions within the pri-miRNA. Finally, we confirmed the importance of the local structure by swapping stem-loops or by targeted mutagenesis of selected miRNAs, which resulted in a perturbed accumulation of the mature miRNA.

INTRODUCTION

Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) is a human gammaherpesvirus associated to oncogenic disorders, such as Kaposi's sarcoma, B-lymphomas or Castleman disease (1). Similarly to other herpesviruses, KSHV was shown to encode several microRNAs (miRNAs) deriving from 12

precursors. Interestingly, all KSHV pre-miRNAs are expressed as a polycistronic transcript from the same genomic region, which is associated to latency (2–4). Ten of them are in an intron (pre-miR-K1 to -K9 and pre-miR-K11) between K12 and v-FLIP open reading frames (ORFs), whereas pre-miR-K10 and -K12 are in the coding sequence and the 3' UTR of K12, respectively. All KSHV miRNAs are expressed during latency from the latent promoter located upstream of ORF73 (5). In addition, miR-K10 and miR-K12 are also induced during the lytic phase (2), and a recent study showed that they are all present at significant levels upon viral reactivation (6). Furthermore, they were detected in virions (7), indicating that they might play a role in the very early stages of infection.

Numerous functions, such as regulation of the immune response, cell cycle or apoptosis, have been attributed to KSHV miRNAs (see Ref. (8) for a recent review). However, much less is known regarding the regulation of expression of these viral products. In animals, miRNAs derive from a large primary transcript (pri-miRNA) that contains a unique or several miRNA precursors (pre-miRNA), structured in a stem-loop. The pri-miRNA is first processed in the nucleus by the RNase III enzyme Drosha, associated to its cofactor DGCR8, to release the pre-miRNA. After export into the cytoplasm, it is further processed by another RNase III enzyme, Dicer, associated to TAR recognition binding protein (TRBP), to generate the miRNA/miRNA* duplex. Upon unwinding, one of the two strands of the duplex is assembled into the RNA-induced silencing complex to modulate the expression of target mRNAs (reviewed in (9)). KSHV miRNAs, like the vast majority of miRNAs of viral origin, are expressed following this canonical pathway. A large proportion (up to 40%) of animal miRNAs are expressed in clusters (10), and interestingly this is also the case for gammaherpesviruses' miRNAs. Even though clustered miRNAs all derive from the same primary transcript, there is increasing evidence that the end products, i.e. miRNA mature sequences, do not accumulate to similar levels. This could be due to the regulation of a number of steps dur-

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 88 41 70 67; Fax: +33 3 88 60 22 18; Email: a.fender@ibmc-cnrs.unistra.fr

Correspondence may also be addressed to Sébastien Pfeffer. Tel: +33 3 88 41 70 60; Fax: +33 3 88 60 22 18; Email: s.pfeffer@ibmc-cnrs.unistra.fr

[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first 2 authors should be considered as Joint First Authors.

ing the processing of the pri-miRNA into mature miRNA. Thus, some have reported that Drosha and DGCR8 activity could be modulated by specific cofactors, such as, for example, hnRNPA1. Indeed, this protein was shown to bind specifically to pre-miR-18a within the pri-mir-17~92 cluster and to facilitate its processing, therefore, resulting in an increased expression of miR-18a (11). Alternatively, the processing of the pri-miRNA can also be modulated by structural determinants. In particular, researchers showed that the apical loop and the junction between the basal stem and the flanking segments of the stem-loop structure are crucial determinants for Drosha/DGCR8 recognition and cleavage (12–14). Moreover, the tertiary structure of long pri-miRNAs may affect the accessibility of stem-loops for Drosha/DGCR8 recognition (15,16). Finally, the processing of the pre-miRNA by Dicer is also affected by the RNA structure (see Ref. (17) for a review).

Here, we investigated the importance of RNA secondary structure of the long primary transcript containing the 10 intronic miRNAs from KSHV (pri-miR-K10/12) for the accumulation of mature miRNAs. Using deep sequencing and quantitative northern blot analysis, we first confirmed that the viral miRNAs accumulate to dramatically different levels; this phenomenon was dependent on the cell line tested. Using plasmids expressing either the complete primary transcript or only each individual miRNA separately, we also observed that the level of miRNA expression was dramatically influenced by the genomic context. Then, the secondary structure of pri-miR-K10/12 was determined in solution by taking advantage of high-throughput selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (hSHAPE) (18). This method is very powerful to assess the structure of long RNA, at every single nucleotide, as exemplified by the resolution of the 2D model of the entire HIV-1 genomic RNA (19). We could classify stem-loop structures embedding miRNAs into sub- or optimally folded ones for Drosha/DGCR8 recognition and cleavage. This correlated well with the expression level of the corresponding mature miRNAs in cells and was confirmed by a targeted mutational analysis. Altogether, we demonstrate that the RNA structure significantly governs the net accumulation of mature miRNAs in cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture conditions

All B-cell lines were cultured in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium containing 10% fetal calf serum. DG-75-EGFP or DG-75-K10/12 were grown in the presence of 7.5 µg/ml blasticidin (for gene insert maintenance). BC-3 growth medium was supplemented with 50 µM mercaptoethanol. DG-75-EGFP and DG-75-K10/12 stably express either EGFP protein or pri-miR-K10/12 comprising the 10 intronic pre-miRNAs (pre-miR-K1 to -K9 and pre-miR-K11, Supplementary Figure S1A) from KSHV and were generated previously (20,21).

RNA preparation

Total RNA was extracted from cells using Tri-reagent (MRC, Inc).

The pri-miR-K10/12, derived from BCBL-1 cell line, was transcribed from PCR-generated DNA templates carrying a T7 promoter. For primer sequences see Supplementary Table S1. *In vitro* RNA synthesis was done by T7 RNA polymerase (Ambion) and pri-miR-K10/12 transcript (3157 nt) was purified on a 0.8% low-melting agarose gel. The band of interest was melted at 65°C during 10 min, and after 5 min at 42°C, the RNA was eluted using 1 U of agarase 1 (Thermo Scientific) during 40 min at 42°C. After phenol/chloroform/isoamyl alcohol (PCI) extraction and ethanol precipitation, the RNAs were pelleted and recovered in MilliQ water.

Deep sequencing

Small RNA library preparation. Libraries were prepared as previously described with some modifications (22). Briefly, 10 µg of total RNA from BCBL-1, BC-3 and DG-75-K10/12 were size fractionated on a 17.5% urea denaturing polyacrylamide gel. The 19–33 nt band was excised, crushed and solved in 2 volumes of 0.3 M NaCl by overnight agitation at 4°C. Small RNAs were sequentially ligated to 3' adapter (5'-P-NNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG-[C7amino]) and then to 5' adapter (GUUCAGAGU-UCUACAGUCCACGAUCNNNN) (with truncated T4 RNA Ligase 2 and T4 RNA Ligase 1, respectively). Four degenerate bases were included at the 3' end of the 5' adapter and the 5' end of the 3' adapter to minimize ligation bias due to secondary structure formation (23,24). 3' ligation was done overnight at 16°C, in 12.5% PEG 8000 to optimize ligation. Prior to this, the 3' adapter was adenylated using the 5' DNA adenylation kit according to the manufacturer's recommendations (New England Biolab, #E2610S). After each ligation step the product was purified in denaturing polyacrylamide gel. In order to generate cDNA libraries, RNA was reverse transcribed with SuperScript III RT (Invitrogen) and primer GCCTG-GCACCCGAGAATTCCA, then amplified by PCR with forward primer AATGATACGCGACCACCGAGATC-TACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGA and different reverse primers for multiplex sequencing (RPI1, RPI4 and RPI5, Illumina PCR primers) during 14 or 17 cycles (for BC-3, or DG-75-K10/12 and BCBL-1 libraries, respectively) (45'' at 94°C, 85'' at 50°C and 60'' at 72°C). PCR products were sent for large-scale sequencing. Small RNA sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, member of the France Genomique program, using an Illumina HiSeq 2000 instrument with a read length of 50 nt.

Deep sequencing data analysis. Sequencing reads were pre-processed and annotated using a set of custom Python scripts encompassing different tools. First of all, the Dustmasker program (25) and FASTX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit) were successively applied to filter out low complexity reads and remove instances of the 3' adapter. Degenerate bases incorporated during the library preparation protocol were also trimmed at this step.

Remaining reads ≥ 15 nt in length were then mapped simultaneously to the human (assembly version hg19 – UCSC repository) and KSHV (accession number NC_009333.1 – RefSeq database) genomes using Bowtie 0.12.7 (26), permitting up to 2 mismatches in total with no more than 1 mismatch in the first 15 nucleotides of each read. Only alignments from the lowest mismatch stratum were recorded and reads that could map to more than 50 loci were discarded.

To obtain a global overview of each library, several non-coding RNA families were successively annotated using BEDTools 2.16.2 (27) by comparing their genomic coordinates to those of the aligned reads, and by keeping reads with at least 80% of their length inside the genomic feature. Sequences coming from known *Homo sapiens* and KSHV miRNAs (miRBase registry v.19, (28)) were thus identified, followed by those deriving from human rRNAs, tRNAs, snRNAs, snoRNAs and miscRNAs (UCSC (University of California, Santa Cruz) repository or Ensembl Release 68). During the quantification process, multiple mapped reads were weighted by the number of mapping sites in genomic features of interest. It must be noted that prior to this analysis, genomic coordinates of human and KSHV miRNAs were verified by aligning corresponding pre-miRNA and mature miRNA sequences (miRBase v.19) to the genomes used during the mapping step. Furthermore, two groups of hypothetical viral genomic features, antisense miRNAs (AS-miRs) and miRNA offset RNAs (moRs), were created and submitted to the same annotation process. KHSV AS-miRs were defined as opposite sequences to known miRNAs while moR-5p and moR-3p were defined as being the immediate 20 nt long flanking sequences surrounding the mature forms of each KSHV pre-miRNA.

Finally, less stringent mapping parameters were applied for the detailed analysis of KSHV miRNA isoforms. Indeed, reads with up to 9 mismatches in total were allowed in order to detect more miRNA altered forms: full length, 3'-trimmed, 3'-tailed, 5'-trimmed, 5'-tailed and every possible combination (5'-trimmed + 3'-trimmed, 5'-trimmed + 3'-tailed, 5'-tailed + 3'-trimmed and 5'-tailed + 3'-tailed); whether they are identical or different to the template sequence.

The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's (National Center for Biotechnology Information) Gene Expression Omnibus (GEO) (29) and will be accessible through GEO Series accession number GSE53296.

Northern blot analysis

Northern blot analyses were performed as described before (30). Briefly, after extraction using Tri-reagent (MRC, Inc), total RNA was separated on a 15% urea-acrylamide gel. After transfer on a nylon membrane (HybondNX, Amersham Biosciences) in MilliQ water, RNAs were crosslinked to the membrane by chemical treatment at 60°C using 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) (Sigma) for 1 h 30 min. RNAs were detected with specific 5'-³²P labeled oligonucleotides (Supplementary Table S1). The signals were quantified using a Fuji Bioimager FLA5100. For quantification, an RNA oligonucleotide (IDT) identical to the miRNA tested, along with

5 μ g of total yeast RNA (Ambion) was loaded at increasing concentration (from 0.1 to 10 fmol). A standard curve was generated by plotting the signal intensity against the amount of RNA oligonucleotides loaded, and was used to calculate the absolute amount of miRNAs in the different cell lines tested. miR-16 was probed as a loading control.

SHAPE analysis

RNA probing. One pmol of purified RNA was denatured 3 min at 95°C, cooled on ice 3 min and folded in Cacodylate buffer (10 mM sodium cacodylate pH 6.8, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) for SHAPE experiments (31,32) or folded in 10x structure buffer provided by Ambion for RNase T1 experiments, during 30 min at 37°C. After folding, 1 μ g of yeast total RNA (Ambion) was added and the mix was incubated with 100 mM of benzoyl cyanide (BzCN) in a final volume of 10 μ l during 1 min for chemical modification, or treated 15 or 25 min at 25°C with 0.05 U of RNase T1. BzCN was inactivated by addition of 90 μ l MilliQ water and enzymatic reactions were stopped with 5 μ l of 0.1 M EDTA. The modified RNAs were PCI extracted and ethanol precipitated. Control reactions of BzCN modification were treated with anhydrous Dimethyl sulfoxide (DMSO). Pelleted RNAs were resuspended in 7 μ l of 1x TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) before retrotranscription. Experiments were done in triplicate with different preparation of RNA transcripts.

Primer extension. Thirteen 21–24 nt long DNA primers (Life Technologies) were used for primer reverse transcription reactions (Supplementary Table S1 and Supplementary Figure S1B). Modified RNAs were denatured for 3 min at 95°C then cooled down on ice for 3 min. Reverse transcription reactions were performed according to Aktar *et al.*, with some modifications (33). Briefly, retrotranscription were done with 0.9 pmol of 5' fluorophore labeled primer (6-FAM for the treated sample and VIC® for negative control), 484 μ M dNTP, 1x RTB (Life Science), 2 U AMV RT enzyme (Life Science), 2 min at 42°C, 30 min at 50°C and 10 min at 60°C. In parallel, two sequencing reactions were done with 1 pmol of non-treated RNAs (per reaction), using ddATP and NED® labeled primer, or ddGTP and positron emission tomography labeled primer. ddNTP were at 5.56 μ M and dNTP at 42 μ M. All four reverse transcription reactions were pooled, then cDNAs were purified by phenol/chloroform extraction, ethanol precipitated and finally dissolved in 10 μ l deionized formamide.

SHAPE Data processing. Fluorophore labeled cDNAs were resolved by capillary electrophoresis using ABI 3130xl Genetic Analyzer, capillary size 50 cm. The resulting electropherograms were converted into SHAPE reactivities using SHAPE Finder software and normalized (34). This procedure has been described in detail in Athavale *et al.* (35). For the normalization of SHAPE reactivities, the 2% highest values from the pool were removed. Then the remaining 8% of the highest values were averaged and all reactivities were divided by this average value.

RNA secondary structure prediction and modelisation. We folded the entire cluster RNA (3157 nt) using the thermodynamics-based free energy minimization algorithm in the RNAstructure software package, version 5.3 (36). For the minimum free energy structure, we used the pseudo-energy constraints specific for SHAPE data with default values for the SHAPE slope (2.6 kcal/mol) and SHAPE intercept (−0.8 kcal/mol). The maximum pairing distances were set at 200 nucleotides. The final structure of pri-miR-K10/12 was drawn with Assemble 2 program, available at <http://bioinformatics.org/assemble> (37).

miRNA expression tests and mutagenesis

Plasmid pcDNA-K10/12, derived from pcDNA5 (Invitrogen) and containing the wild type (wt) pri-miR-K10/12, and plasmids expressing individual miRNAs pcDNA-K1, K2, K3, K4, K6, K7, K8, K9 and K11 have been described before (21).

Plasmid pcDNA-K10/12 was mutated using the Phusion site-directed mutagenesis kit (Thermo Scientific) and transformation of *Escherichia coli* TOP10 strain. Positive clones were identified by sequencing (GATC Biotech, France). Four swapping mutants were designed: mutant mut1 with swapped miR-K9- and miR-K6 stem-loops (minus the single-stranded flanking segments); mutant mut2 with swapped miR-K9- and miR-K11 stem-loops (minus the single-stranded flanking segments); mutant mut3 with swapped pre-miR-K5 and pre-miR-K6; mutant mut4 with swapped pre-miR-K5 and pre-miR-K11. Thirteen mutants termed mutA to mutM with various changes in the pre-miRNA sequence of miR-K2, K5 and K9 were designed. See text and Figure 6 and Supplementary Figure S6 for more details. Expression tests were conducted as follow: 2 µg of plasmids (wt and mutants mut1 to 4) or 0.9 µg of plasmids (wt and mutants mutA to M) were used to transfect HEK293Grip cells per 6 well/plate (mut1 to 4) or 12 well/plate (mutA to M). Total RNA was collected after 48 h and miRNA expression was analyzed by northern blot, using 5 µg of total RNA (mut1 to 4) or 7 µg of total RNA (mutA to M) and standard protocol. miR-16 was probed as a loading control and used for signal normalization.

RESULTS

Small RNAs expressed in KSHV infected or stable B cell lines

To get the precise sequence of KSHV mature miRNAs, as well as their isoforms, we deep sequenced small RNA libraries (19–33 nt long) deriving from a stable B-cell line expressing the 10 intronic pre-miRNAs (DG-75-K10/12, see Supplementary Figure S1A) (20,21), and two KSHV latently infected primary effusion lymphoma cell lines (BCBL-1 and BC-3). After preprocessing, a total of ~59.9, ~52.2 and ~59.1 M sequences were obtained from the DG-75-K10/12, BCBL-1 and BC-3, respectively (Supplementary Table S2). All three libraries were of good quality (less than 3.2% of ribosomal RNA fragments) and were highly enriched in miRNAs (from ~57% to ~72%, Supplementary Figure S2). Viral miRNAs represented ~9% of the total reads in DG-75-K10/12, BCBL-1 and ~44% in BC-3.

The sequences of significantly expressed KSHV miRNAs are listed in Supplementary Table S3. Consistent with previous reports, we were able to detect viral miRNAs from both arms in the KSHV infected B-cell lines BCBL-1 and BC-3, apart from miR-K9–5p and -3p in BC-3 (6,38,39). A significant number of reads corresponding to the viral miRNAs, with the notable exception of miR-K11–3p and -5p, was also retrieved from the stable B-cell line DG-75-K10/12 library.

As shown in Supplementary Table S3, the full length and unaltered version of each miRNA did not represent the entire population and sometimes not even the majority of the sequences (see Fraction in %). For example, we observed a non-templated U addition at the 3' end of miR-K2–3p, shifted 5' and/or 3' ends for miR-K1–5p, -K5–5p, -K11–5p, -K7–5p and -3p, -K8–3p, -K10a-3p and -K12–5p, suggesting shifted sites of cleavage by Drosha or Dicer. Mutated versions of miR-K4–5p (C9>U9, 99.75% of the total corresponding miRNA sequences) and miR-K4–3p (A5>G5, 69.21%) were observed in DG-75-K10/12. Given the high proportion of reads corresponding to the mutated miRNA, we can exclude sequencing errors. The same mutations were also present in the miRNA sequences from BCBL-1 and BC-3 cell lines but at very low frequencies (0.13% and 0.02% for C>U in miR-K4–5p in BCBL-1 and BC-3, respectively, and 4.35% and 1.76% for A>G in miR-K4–3p in BCBL-1 and BC-3, respectively). Notably, the corresponding genomic DNA did not contain these mutations, suggesting that the RNAs were edited in the DG-75 cells and with a lower rate in the two infected cell lines (Supplementary Figure S3).

For each KSHV miRNAs, we analyzed the sequences of the different isoforms. To allow for more miRNAs to be detected, the mapping stringency was reduced (see Materials and Methods). All the isoforms are listed in Supplementary Table S4. Altogether, sequences of miRNA isoforms reflect the biogenesis of the corresponding miRNAs, i.e. sequence heterogeneity may arise from imprecise cropping or dicing of the precursor, post-transcriptional modifications (terminal trimming or addition of non-templated nucleotides, modifications). We also observed moRs and AS-miRNA sequences for some KSHV miRNAs that were detectable by northern blot analysis (Supplementary Figure S4). These were mostly the same as those described previously (6). MoR sequences mapped just upstream of the pre-miRNAs and their 3' end coincided with the 5' end of the following miRNA sequence (Supplementary Figure S5). The 5' end of the moRs was less clearly defined.

Clustered miRNAs from KSHV accumulate at various levels in B-cells

Dramatic differences were observed between the read frequencies of each viral miRNAs (Supplementary Table S3), indicating that they accumulate to different levels in the cell. To validate this observation, we turned to a quantitative northern blot approach to evaluate the absolute amount of KSHV mature miRNAs in DG-75-K10/12, BCBL-1 and BC-3 cells. We restricted this analysis to the mature strands of the clustered miRNAs, with the addition of miR-K4–5p, -K6–5p and -K9–5p that appear to be significantly ex-

pressed in our libraries. miR-K9-5p is referenced in miR-Base as the passenger arm, but may be more expressed than the 3p arm according to our deep sequencing data.

We detected almost all tested miRNAs in the three cell lines, with the exception of miR-K9-5p and -3p, and miR-K11-3p that were absent in BC-3 and in DG-75-K10/12 cells, respectively. For some miRNAs, additional bands were observed, either above or below the full-length miRNA, as indicated on the blot by -1, -2 or +1 bands (Figure 1A). For miR-K1-5p, miR-K3-5p and miR-K4-3p, an asterisk indicates small RNA species that could correspond to 3'-truncated miRNAs, similar to the previously reported 17-nt long miR-K1-5p (40). For some miRNAs, we could also detect the precursor sequence, although not in a reproducible manner.

Absolute amounts of mature miRNAs were quantified and are compiled in Table 1. Interestingly, BC-3 global expression of viral miRNAs is ~3.8-fold higher than in BCBL-1 (~14174 versus ~3769 10⁻³ fmol/μg of total RNA). This confirms deep sequencing data from other groups (38,39) and our results where viral miRNA sequences in BC-3 represent up to 44% of total small RNAs versus 9% in BCBL-1. This higher expression of viral miRNAs may correlate with a ~3-fold increase in the number of KSHV episomes per cell in BC-3 compared to BCBL-1 cells (41). The lower expression of viral miRNAs in DG-75-K10/12 is probably due to the expression of the transgene from a cytomegalovirus (CMV) promoter.

As expected from the deep sequencing data, we observed dramatic differences in the accumulation of viral miRNAs between the three cell lines. We could clearly classify them in two groups based on their level of expression in percentage of all viral miRNAs. Indeed, while miR-K3-5p, -K4-3p, -K6-3p, -K7-3p and -K11-3p (with the exception of DG-75-K10/12 cells where it is absent) accumulate at levels ranging from ~8% to ~35%, the other miRNAs are expressed at lower levels (≤7%) (Table 1). The ranking in abundance varies between the different cell lines and may illustrate the importance of the cellular context for miRNA expression. To further explore the contribution of the genomic context for the relative accumulation of each miRNA, we also compared their expression level in transiently transfected HEK293Grip cells using constructs containing either the K10/12 cluster or a portion of it containing only one single pre-miRNA. As shown in Figure 1B, this resulted in notable differences in mature miRNA expression ranging from a complete loss of expression (miR-K2) to a more than 2-fold up-regulation (miR-K8).

Two major differences were observed in the KSHV miRNA profiles of the three cell lines: the absence of miR-K9-5p and -3p in BC-3 and of miR-K11-3p in DG-75-K10/12. As previously reported (38), sequencing of the viral genomic DNA identified several mutations within the pre-miR-K9 sequence in BC-3 compared to the sequence from RefSeq database (NC_009333.1) or to the BCBL-1 genomic sequence (Supplementary Figure S3). Whether these mutations may alter Drosha processing is currently not known. The DG-75-K10/12 cell line was generated by integrating in its genome the 10 intronic clustered miRNAs from BCBL-1 cells. We therefore expected to observe the same viral miRNA expression profile in the two cell lines. However,

miR-K11-3p, which is one of the most abundant miRNAs in BCBL-1, does not accumulate in the DG-75-K10/12 cells. We verified that no mutation occurred at the genomic DNA level in the pre-miR-K11 region (Supplementary Figure S3). Surprisingly, this lack of expression seems to be specific of the DG-75 cell line since miR-K11-3p significantly accumulated in the FLP-K10/12 HEK293 derived cell line ((21) and data not shown).

Finally, we compared our deep sequencing and quantitative northern blot data (Figure 2). Globally, miRNAs presenting with the highest number of reads seem to be the most abundant, as assessed by northern blot, but some discrepancies remain between the two technical approaches. This said, the protocol we used to prepare the libraries (with degenerate 3' and 5' adapters, (24)) significantly reduced the ligation bias observed in libraries prepared previously using classical adapters (data not shown).

SHAPE analysis of the KSHV miRNA cluster reveals multiple hairpin structures

In order to determine whether structural features of the primary transcript containing the 10 intronic clustered miRNAs from KSHV (i.e. pri-miR-K10/12) were involved in the differential accumulation of KSHV mature miRNAs, we used hSHAPE (18). This method is very powerful to assess the secondary structure of long RNA, at every single nucleotide. First, the ~3.2 kb *in vitro* transcribed pri-miR-K10/12 was treated with the electrophilic reagent BzCN that selectively reacts with the 2'-OH of riboses which are conformationally flexible. SHAPE reactivity thus reports on local nucleotide flexibility, i.e. unpaired nucleotides are more reactive.

Figure 3 shows the secondary structure of pri-miR-K10/12; 83% of the 2812 nucleotides analyzed from the 3157 nt of the RNA were resolved, with the exception of some regions that were difficult to retrotranscribe or not interrogated (i.e. the very 3' extremity). SHAPE constraints were used to create the secondary structure using the RNAstructure (36) and Assemble 2 programs (37). The secondary structure of miRNA-containing regions was additionally confirmed by RNase T1 treatment, a classical enzymatic probe used to assess unpaired G bases (Figure 4 and Supplementary Figure S5). In general, both SHAPE and RNase T1 reactivity correlated well with the single or double-stranded state of nucleotides, i.e. moderately and highly reactive nucleotides are often found in bulges or terminal loops and weakly reactive nucleotides are in helices (Figure 3). Globally, pri-miR-K10/12 is highly structured, folded into multiple hairpin structures (~30 in total) of various sizes (ranging from 7 to more than 50 bp; smaller hairpins were not considered). Notably, all the miRNA sequences were found in stem-loops, with the 5p and 3p arms forming imperfect duplexes. Many additional hairpin structures were found in pri-miR-K10/12. However, these were not processed, as we did not retrieve small RNA reads from these loci in the deep sequencing data set (not shown).

Interestingly, some regions predicted to be single-stranded were poorly reactive upon SHAPE treatment, suggesting potential long distance tertiary contacts between these regions and other parts of the RNA. For example,

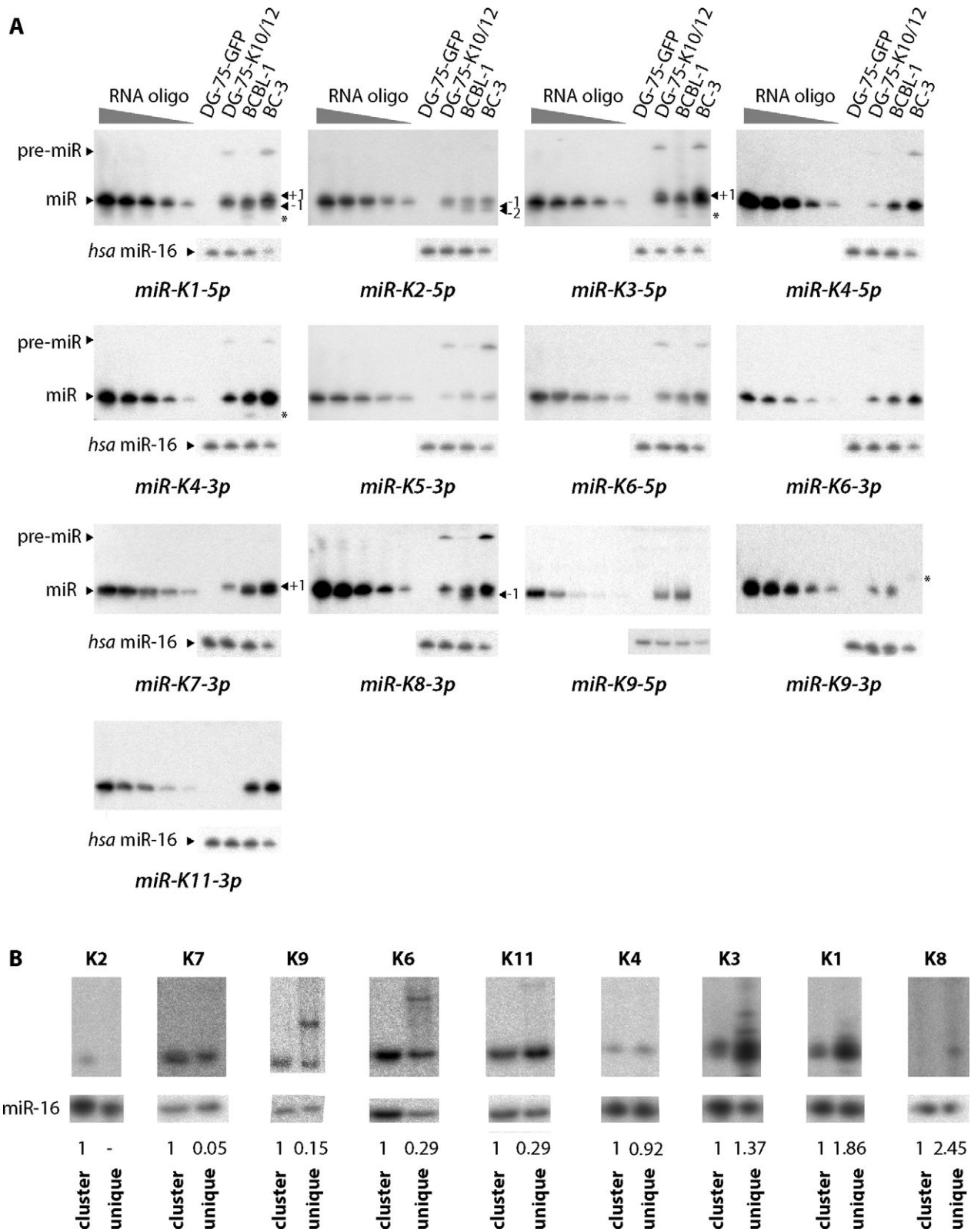


Figure 1. Absolute quantification of mature miRNAs from KSHV in various cell lines. (A) To quantify the absolute amount of each miRNA in the different cell types, a standard RNA oligonucleotide, identical to the tested miRNA, was loaded on the same gel at increasing amounts (0.1–10 fmol) along with 5 μ g (DG-75-EGFP, DG-75-K10/12 and BCBL-1) or 2.5 μ g (BC-3) of total RNA. Representative northern blots for each of the miRNA tested ($n = 3-4$) are shown. As a negative control, total RNA from a non-infected cell-line DG-75-EGFP was used. miR-16 was probed as a loading control. (B) pcDNA5 expression plasmids with the entire miRNA cluster (cluster) or only single pre-miRNA (unique) were transfected in HEK293Grip cells and total RNA analyzed by northern blot for the indicated miRNAs. miR-16 was probed as a loading control, and the KSHV miRNA signals quantified and normalized relative to the cluster-transfected cells, which was set to 1.

Table 1. Absolute quantification of KSHV miRNAs from various cell lines. miRNA accumulation is defined by an absolute amount (fmol of miRNA per μg of total RNA) and by a relative percentage of expression.

	DG-75-K10/12		BCBL-1		BC-3	
	10^{-3} fmol/ μg	%	10^{-3} fmol/ μg	%	10^{-3} fmol/ μg	%
miR-K1-5p	96.28 \pm 3.79	5.66	114.33 \pm 8.16	3.03	407.48 \pm 35.66	2.87
miR-K2-5p	53.58 \pm 10.26	3.15	43.25 \pm 2.83	1.15	90.59 \pm 13.23	0.64
miR-K3-5p	389.36 \pm 98.73	22.89	307.11 \pm 80.96	8.15	1739.90 \pm 394.52	12.28
miR-K4-5p	14.28 \pm 3.27	0.84	64.48 \pm 6.38	1.71	278.06 \pm 45.74	1.96
miR-K4-3p	266.03 \pm 30.92	15.64	638.33 \pm 94.78	16.93	2577.42 \pm 477.58	18.18
miR-K5-3p	10.68 \pm 3.99	0.63	30.29 \pm 7.94	0.80	78.12 \pm 13.06	0.55
miR-K6-5p	60.26 \pm 21.36	3.54	85.22 \pm 13.17	2.26	257.43 \pm 68.29	1.82
miR-K6-3p	263.15 \pm 44.71	15.47	451.99 \pm 41.72	11.99	1509.03 \pm 279.25	10.65
miR-K11-3p	-	0.00	872.40 \pm 162.05	23.14	2003.58 \pm 598.64	14.14
miR-K7-3p	312.61 \pm 146.44	18.38	830.43 \pm 219.40	22.03	4978.93 \pm 1115.48	35.13
miR-K8-3p	64.61 \pm 50.35	3.80	79.12 \pm 19.28	2.10	253.70 \pm 118.76	1.79
miR-K9-5p	121.06 \pm 23.94	7.12	181.12 \pm 53.32	4.81	-	0.00
miR-K9-3p	49.30 \pm 14.01	2.90	71.24 \pm 10.72	1.89	-	0.00
Total miRNA	1701.20	100.00	3769.31	100.00	14174.24	100.00

pre-miR-K3 and pre-miR-K9, which are moderately reactive to BzCN, show stretches of adenosines in their terminal loops that could be involved in tertiary contacts or stacked with neighboring bases (42). Other pre-miRNAs do not present such features and their nucleotides in the loop are clearly more modified. Alternatively, these regions may be embedded in the tertiary structure and thus not accessible for SHAPE reagent (19). To explore this possibility, pri-miR-K10/12 was treated with moderate and high concentrations of RNase T1. Nevertheless, we could not detect any nuclease resistant product that would correspond to potential embedded regions (data not shown).

Structural features of KSHV miRNA stem-loops

Recognition and efficient processing of a pri-miRNA by Drosha/DGCR8 relies on specific secondary features. Mutational studies from independent groups have helped to define such criteria (12–14,43,44). Thus, an optimal pri-miRNA is composed of a stem structure of about 3 helical turns (\sim 33–35 nt long) containing the miRNA duplex at its apical part, terminated by a flexible loop (\geq 10 nt) and flanked by single-stranded segments at its basal stem (\geq 9 nt long) (Figure 4A, left panel). The miRNA duplex (\sim 22 nt) contains numerous mismatches, whereas the basal stem (\sim 11 nt) is mainly perfectly base-paired, especially at its extremities forming stable platforms (12,13,43,44). In addition, it was described that a UG motif at position –14 and –13 from the 5' cleavage site, respectively, allowed for the right positioning of Drosha/DGCR8 (44). This basal stem together with flanking single-stranded regions form a key junction for Drosha/DGCR8 recognition (12,13,44). Finally, another key feature is the terminal loop: it should be flexible but not too large since pri-miRNAs with shorter loop or formed by \geq 15 nt were shown to be less efficiently processed (14,43). Additionally, a large loop may mimic, along with the miRNA duplex, the junction recognized by Drosha/DGCR8 and may lead to abortive cleavage \sim 11 nt from this position (12).

We monitored the presence or absence of each specific criterion, which allowed us to separate the different stem-loops

in two groups. Whereas miR-K3, -K6, -K11, -K7 and -K1 stem-loops present optimal structures (containing three to five out of five determinant), miR-K8, -K9, -K5, -K4 and -K2 stem-loops fold into suboptimal stem-loops (containing less than three determinants) (Table 2, Figure 4A and Supplementary Figure S5).

All the 'optimal' miRNA stem-loops possess flexible terminal loops and correct basal stems. The flanking segments were globally less structured than the basal stem. miR-K3, -K6 and -K8 stem-loops present at least one long single-stranded segment (either 5' or 3' of the cleavage site). Flanking regions of miR-K11, -K7 and -K1 stem-loops are composed of small hairpins (2–3 bp) surrounded by single-stranded segments. These regions may anyway contribute to the formation of the double-stranded–single-stranded junction important for Drosha/DGCR8 recognition.

The secondary structures of the other KSHV miRNA stem-loops presented with none or only one of the three key features, rendering them suboptimal for Drosha cleavage. Interestingly, none of the other stem-loops present in the sequence and which do not give rise to miRNAs had any of the structural determinants discussed above (data not shown).

The secondary structural features of miRNA stem-loops correlate with the cellular abundance of mature miRNAs

We compared the secondary structure data to the mature miRNA accumulation in the BCBL-1 cells (Tables 2 and 3). We generally observed a good correlation between the two data sets, with optimal hairpin structures leading to abundant mature miRNAs. However, there are some exceptions, such as miR-K1 and -K4 stem-loops. In the case of miR-K4 stem-loop, we could manually fold it in an alternative, more optimal, structure (Figure 4B). It presents a perfect basal stem of 11 nt with stable platforms and a G at –13 position, flanked by single-stranded segments. Thus, the new structure presents with three out of five determinants, rendering it optimal for Drosha/DGCR8 recognition and cleavage. In the case of miR-K1 stem-loop, another step after Drosha

Table 2. Structural features of miRNA stem-loops from KSHV pri-miR-K10/12

Region or motif	Terminal loop	Basal stem	Flanking segments	UG before basal stem	No of positive criteria
Criterion for optimal structure	([9-14] nt long)	~11 nt (± 2)	Stable platforms ^a	(at least one, ≥ 9 nt long)	
miRNA stem-loop					
K3	Y (13)	Y (11)	Y	Y	5
K6	Y (9)	Y (11)	Y	Y	4.5
K11	Y (11)	Y (10)	Y	N	4
K7	Y (14)	Y (13)	Y	N	3
K1	Y (13)	Y (11)	Y	N	3
K8	Y (11)	N (7)	+/-	Y	2.5
K9	N (8)	Y (11)	Y	N	2
K5	Y (9)	N (3)	+/-	N	1.5
K4	N (6)	N (7)	+/-	N	0.5
K2	N (16)	N (0)	N	N	0

For each KSHV miRNA stem-loop, the absence (N) or presence (Y) of positive structural criteria for Drosha/DGCR8 recognition and cleavage were determined. miRNA stem-loops were ranked in decreasing order of present determinant, defining two main groups (optimal and suboptimal) separated by a dotted line. Numbers in brackets indicate the length of the terminal loop (in nt) and of the basal stem (in bp). Stem-loops giving rise to abundant mature miRNAs in infected BCBL-1 cells are highlighted in gray.

^aThe basal stem can be paired at one (+/-, value of 0.5) or both extremities (Y), forming stable platforms.

^bOnly presence of a U at position -14 (+/-, value of 0.5).

processing, like, for example, the stability, may affect the mature miRNA abundance.

Altogether, we conclude that the secondary structure of the miRNA stem-loop controls to a significant level the net accumulation of the corresponding mature miRNA. We suppose that this is mainly due to the impact of structural features on Drosha/DGCR8 recognition and cleavage. Additionally, an optimal stem-loop structure may also be recognized by cellular cofactors that may increase Drosha/DGCR8 and/or Dicer activity and thus contribute to the mature miRNA accumulation.

Targeted mutagenesis of miRNA stem-loops within pri-miR-K10/12 affects miRNA cellular abundance

In order to test the impact of the secondary structure and the structural context of miRNA expression, we generated various mutant constructs in which we either exchanged the position of individual miRNA stem loops or performed selected point mutations or deletions to optimize the putative secondary structure of the stem-loop. These constructs were then expressed from the pcDNA5 plasmid in human HEK293Grip cells and miRNA expression was quantified by northern blot analysis.

The first set of mutants consisted in swapping whole stem loops and the results are shown in Figure 5. The miR-K9 stem-loop (comprising the entire hairpin structure but not the flanking single-stranded segments) was either swapped with miR-K6 (mutant 1) or miR-K11 (mutant 2) corresponding hairpins. miR-K9-5p is poorly expressed in infected cells compared to miR-K6-3p and

miR-K11-3p. These could be due to a suboptimal single-stranded-double-stranded junction or a poor accessibility of the stem-loop structure inside the tridimensional pri-miR-K10/12 (suggested by the weak reactivity of the RNA in this region). In both mutants, the expression of miR-K9-5p was significantly increased (~3.7-fold for mutant 1 and ~3.2-fold for mutant 2), whereas those of miR-K6-3p and miR-K11-3p were decreased by ~2.6- and ~2.7-fold, in the respective mutants (Figure 5A). This strongly supports our initial hypothesis that swapping of miRNA stem-loops might make a non-optimal structure optimal and vice versa, suggesting that positional context may have an impact.

The two other mutants concerned the swapping of pre-miR-K5 with pre-miR-K6 (mutant 3) or pre-miR-K11 (mutant 4) (Figure 5B). In both cases, the expression of pre-miR-K5 and the corresponding mature miR-K5-3p was unexpectedly strongly decreased (~4.8-fold for mutant 3 and ~5.6-fold for mutant 4). This may be due to several reasons. First, the secondary structure of the swapped pre-miR-K5 may be significantly altered and prevent Drosha/DGCR8 recognition and cleavage. Alternatively, the excision of pre-miR-K5 may be highly context dependent and requires additional primary sequence determinants. Finally, these effects might result from a more global change of the pri-miR-K10/12 structure. However, we do not favor this hypothesis since we could observe only minor changes of non-mutated miRNA expression (miR-K1-5p for both mutants, miR-K11-3p for mutant 3 and miR-K6-3p for mutant 4, from ~1.2- to ~1.3-fold variation). In addition, the expression of mutated miR-K6-3p and miR-K11-3p showed the

Table 3. Correlation between secondary structure, cellular abundance and targeting efficiency of KSHV miRNAs

KSHV miRNAs	Optimal secondary structure	Cellular Abundance in BCBL-1 (%)	Repression of RLuc in BCBL-1 ^a
miR-K1-5p	yes	3.03	10-fold
miR-K3-5p	yes	8.15	
miR-K4-3p	yes (alternative)	16.93	3 to 5-fold
miR-K6-3p	yes	11.99	
miR-K11-3p	yes	23.14	
miR-K7-3p	yes	22.03	2-fold
miR-K2-5p	no	1.15	
miR-K5-3p	no	0.80	≤ 0.4-fold
miR-K8-3p	no	2.10	
miR-K9-5p	no	4.81	

The miRNAs are ranked according to their capacity to regulate the corresponding RLuc-based indicator constructs harboring two perfectly complementary target sequences into the 3'UTR of the *Renilla* luciferase gene. In gray are emphasized the miRNAs presenting optimal secondary hairpin structures and high levels of abundance in BCBL-1 cells.

^aFrom Gottwein *et al.* (46).

expected phenotype. Their accumulation levels were both significantly decreased by ~9.7- and ~2.4-fold, respectively, as they were put in place of a poorly expressed miRNA.

The second set of mutants we generated consisted in more precise modifications to insert the missing features in sub-optimal stem loops. Thus, we reduced the size of the loop of miR-K2 (mutA), created a basal stem (mutB) or combined the two mutations (mutC). As can be seen in Figure 6A, the shortening of the loop region resulted in a better expression of miR-K2 both in the context of the full cluster and to some extent when miR-K2 was expressed alone. The creation of a basal stem only modestly increase the expression of this miRNA in the context of the cluster, but resulted in a strong overexpression in the context of a unique pre-miRNA construct. Finally, the combination of the two modifications did not impact positively the expression of miR-K2 compared to the loop mutant. Interestingly, the insertion of the basal stem from another miRNA (miR-K6) or of the basal stem and the flanking segments of the same miRNA resulted in a drop in the accumulation of miR-K2 (Supplementary Figure S6A), something we also observed for miR-K5 (Supplementary Figure S6B). These last results are consistent with the observations made in Figure 5B, where the insertion of the miR-K5 stem-loop in the context of miR-K6 resulted in a complete loss of expression. We could also optimize the expression of miR-K5 by creating a basal stem (Figure 6B), and of miR-K9 by increasing the size of the loop or by inserting flanking segments (Figure 6C). This latter result again confirmed the observation made using the swapping mutants where the K9 stem-loop was inserted in the genomic location of the K6 stem-loop.

Altogether, these results indicate that structural features and positional context of miRNA stem-loops into a long pri-miRNA significantly affect mature miRNA accumulation in cells.

DISCUSSION

It is well established that miRNA biogenesis is a highly regulated process. Indeed, miRNA expression is programmed in space and time, and aberrant accumulation or absence of a given miRNA may lead to diseases. Here, we looked into the importance of the secondary structure of a long viral pri-miRNA containing 10 miRNA precursors for the accumulation of mature miRNAs. Using deep sequencing and quantitative northern blot analysis, we confirmed that individual KSHV miRNAs accumulate to dramatically different levels. We then turned to the SHAPE approach to determine the secondary structure of the long primary transcript. This allowed us to define processing determinants for each miRNA stem-loop and we showed that miRNAs deriving from poorly structured stem-loop accumulated to lower levels compared to miRNAs originating from optimally structured precursors. Using targeted mutagenesis, we found that the position of a given miRNA stem-loop, and thus the structural context, within the pri-miRNA plays an important role for its expression. Finally, we demonstrated that optimizing the secondary structure of suboptimal miRNA stem-loops, such as miR-K2 or miR-K5, resulted in an increase in their expression.

As previously reported, we showed from our deep sequencing data that miRNAs are not represented in the cells as a unique population of sequences but as a broad variety of miRNA isoforms. They can differ by their 5' or 3' ends, show addition of non-templated nucleotides or result from editing. For example, we observed edited versions of miR-K4-5p (C9>U9) and miR-K4-3p (A5>I5). Interestingly, the edited versions of miR-K4-5p and miR-K4-3p were found at very low levels in infected B-cells, whereas they were overrepresented in the stable B-cell line. This suggests that the context of infection may inhibit the editing process of these miRNAs. Regarding nucleotide addition, we ob-

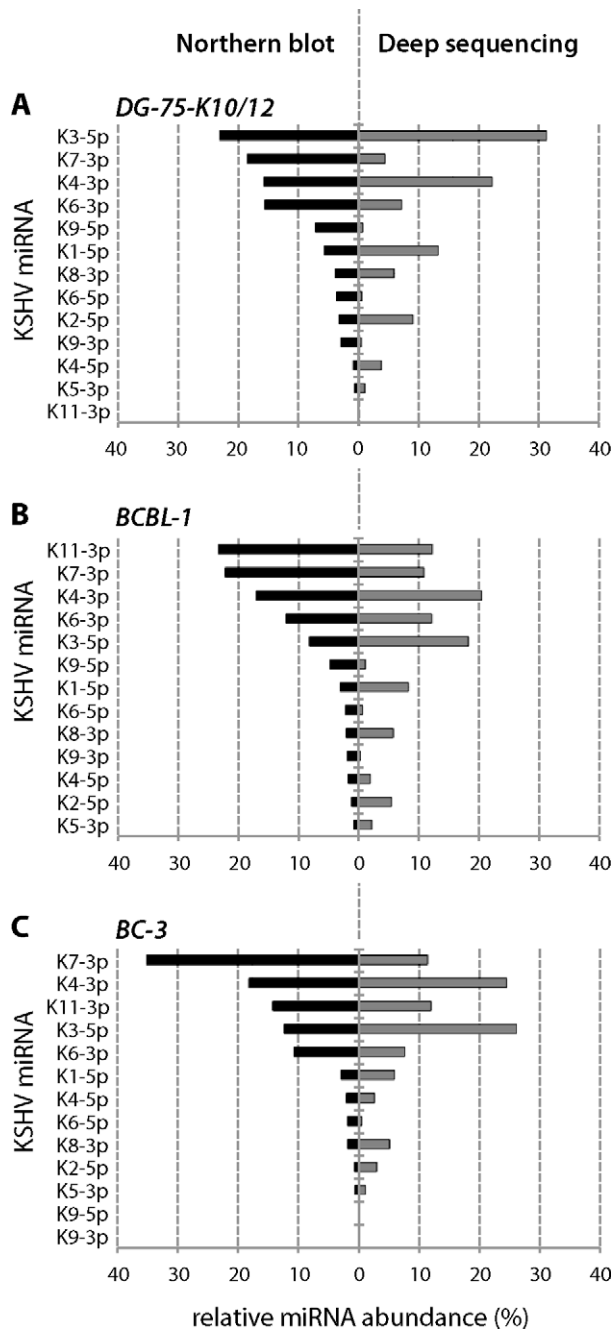


Figure 2. Relative miRNA abundance. KSHV miRNA abundance is given in percentage and was determined by using the total number of fmol (northern blot) or of reads (deep sequencing) of mature miRNAs as 100%. For each cell line, the miRNAs are ranked from the most to the least expressed according to northern blot analyses.

served mono-uridylation of miR-K2-3p. Pre-miR-K2 hairpin structure lacks the 3' 2-nt overhang, rendering it likely a suboptimal substrate for Dicer. Recently, Heo *et al.* showed that the pre-let-7 family also misses this feature, which significantly affects Dicer processing (45). The cell seems to cope with that by subjecting the defective pre-miRNAs to mono-uridylation, restoring the 3' 2-nt overhang and in-

creasing Dicer maturation. Therefore, pre-miR-K2 may be modified for the same reason.

In our study, we showed that the cellular abundance of the KSHV miRNAs differs dramatically among themselves, and this was dependent of the cellular context. This might be directly connected to the physiology of the cell and may depend on the necessity to regulate at defined levels corresponding miRNA targets. Indeed, concentrations of RNA molecules have to be precisely defined in order to reach the optimal cellular environment. Gottwein *et al.* previously reported on the mRNA targeting efficiency of the KSHV miRNAs, using luciferase reporter assays (46). We compared these data to our results on the cellular abundance and the structural features of the viral miRNAs in BCBL-1 (Table 3). Our study correlated well with Gottwein's data. It confirms that miRNA targeting efficiency is mainly governed by cellular abundance, an idea that was only speculated by the authors at that time. It would be interesting to identify the relative importance of each KSHV miRNAs in terms of associated diseases.

To understand how KSHV miRNA expression is regulated, we looked into the role of the secondary structure of the primary transcript. Many RNA molecules need to form an extremely precise secondary structure for their functions (e.g. rRNAs, tRNAs, etc.). In the case of miRNAs, the stem-loop structure, formed by distinct and defined modules, is important for the maturation by Drosha. Feng *et al.* showed that structural features determine the efficiency of Drosha processing *in vitro* and this correlates with the *in vivo* accumulation of miRNAs (47). This is in accordance with our data where highly expressed KSHV miRNAs are embedded in optimal secondary structures and poorly expressed miRNAs in suboptimal ones. We further proved the importance of specific criteria, such as the size of the terminal loop, the presence of a basal stem or of single-stranded flanking segments, by generating optimized mutants where we could increase the accumulation of otherwise lowly expressed miRNAs. However, we also observed that in some cases, the displacement out of the natural context of sequences flanking the miRNA stem-loop could have a dominant negative effect. Thus, the basal stem and flanking segments of miR-K6, which is optimally structured and well expressed, appear to abolish the correct processing of other miRNA stem-loops. This may be due, for example, to the duplication of important binding elements within the miRNA cluster or simply to the disruption of a long-distance interaction.

Up to now, only scarce data in the literature report on clustered miRNAs, and these concern exclusively the human miR-17-92a cluster. This cluster is composed of six well-folded stem-loops: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 and miR-92a-1. Chaulk *et al.* demonstrated that this cluster is composed of a core domain found in a compact globular tertiary structure and protected from Drosha cleavage. The authors propose a role of the tridimensional structure on the regulation of miR-17-92a expression, where the accessibility of pre-miRNAs determines the efficiency of Drosha processing. This would explain the low expression of miR-92, which is embedded within the core domain (15). Chakraborty *et al.* confirmed the importance of the tertiary structure. These authors made a shuffled pri-miR-17-92a where they switched the two halves

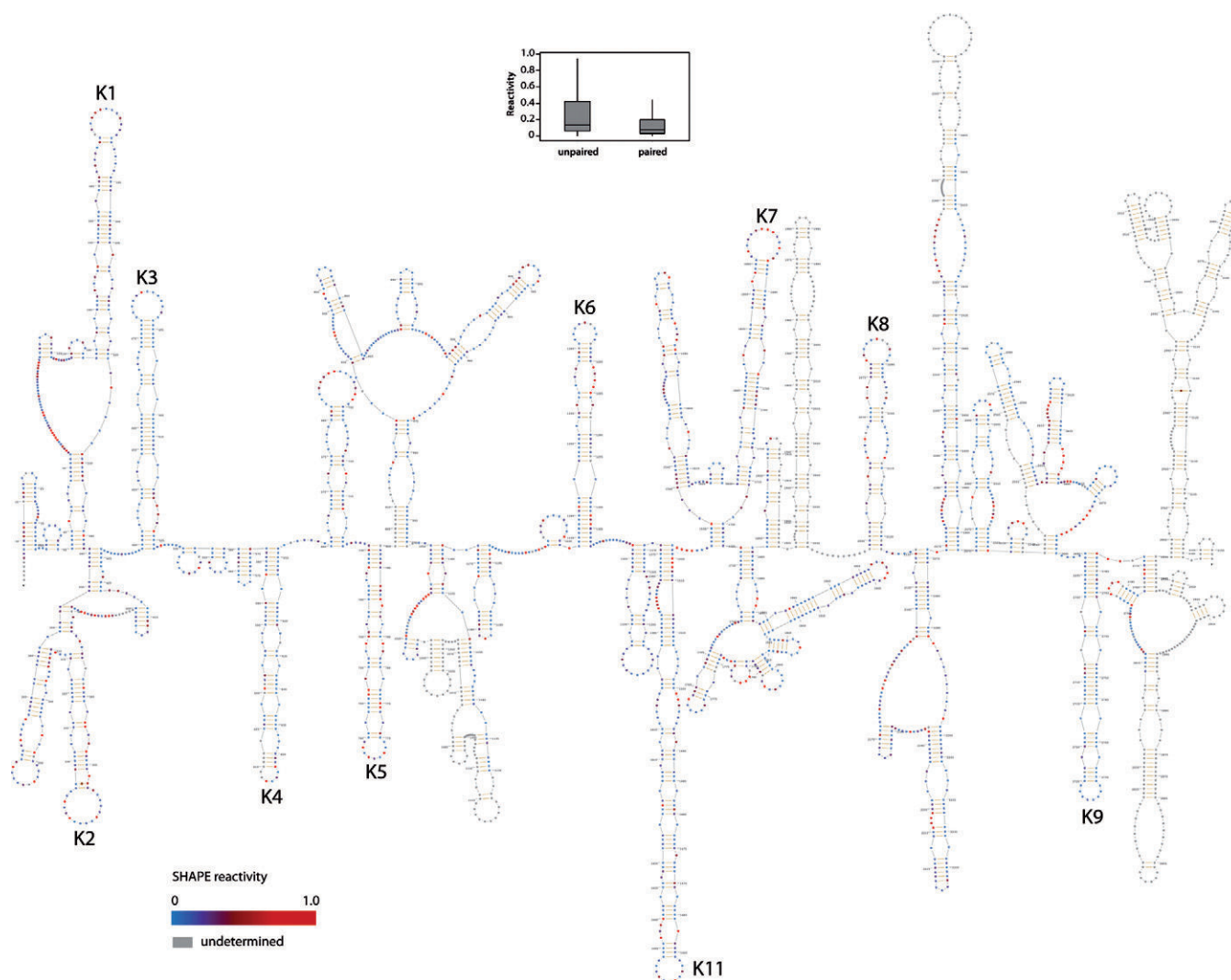


Figure 3. Secondary structure of KSHV pri-miR-K10/12. The secondary structure of pri-miR-K10/12, containing the intronic clustered pre-miRNAs (from pre-miR-K1 to -K9 and pre-miR-K11, as indicated in black), was determined in solution by SHAPE method. The 3157 nt-long RNA we used for the analysis was *in vitro* transcribed. Residues are colored with a gradient of blue to red according to the intensity of SHAPE reactivity (low to high, respectively). Nucleotides in gray were not determined. Box plots represent the SHAPE reactivity in function of the unpaired or paired fate of nucleotides in the 2D structure model. Paired nucleotides show a less scattered pattern than the one for unpaired nucleotides. Moreover median is smaller for paired than unpaired nucleotide.

of the molecule, resulting in pri-miR-20a-19a. There was a marked increase in the levels of various pre-miRNAs (pre-miR-20a, -19a and -92a), indicating a positional importance of the pre-miRNAs in the cluster (16). Similarly, we showed with mutants that the position of miRNA stem-loops within the pri-miR-K10/12 cluster is critical for the expression of mature miRNAs. We could not conclude regarding the existence of a core domain in the KSHV cluster. However, miR-K3 and -K9 stem-loops may be involved in tertiary interactions via stretches of adenosines in their respective apical loop, rendering them less accessible to Drosha. Moreover, sequences or structural features distinct from miRNA stem-loops may also constitute regulatory elements for Drosha cleavage. Finally, the processing of one miRNA may influence the subsequent processing of adjacent miRNAs.

Our data provide evidence that the secondary structure of the pri-miRNA is important for the good expression of clustered miRNAs. There are, however, limitations to our approach as we assessed the secondary structure of the pri-miR-K10/12 cluster using naked RNA. Indeed, some accessory proteins may act by inducing conformational changes in the RNA to satisfy or prevent the structural requirements for Drosha processing. Our results indicate that one of KSHV miRNA, miR-K4-3p, which is expressed at high levels, is embedded into a suboptimal secondary structure. However, we could predict an alternative hairpin structure that would be optimal for Drosha/DGCR8 recognition and cleavage. This alternative structure was not favored in terms of energy and may therefore require a specific RNA chaperone to be induced. Further work will be needed to assess this question in the particular case of miR-K4 stem-loop. Another limitation is that the Drosha processing step

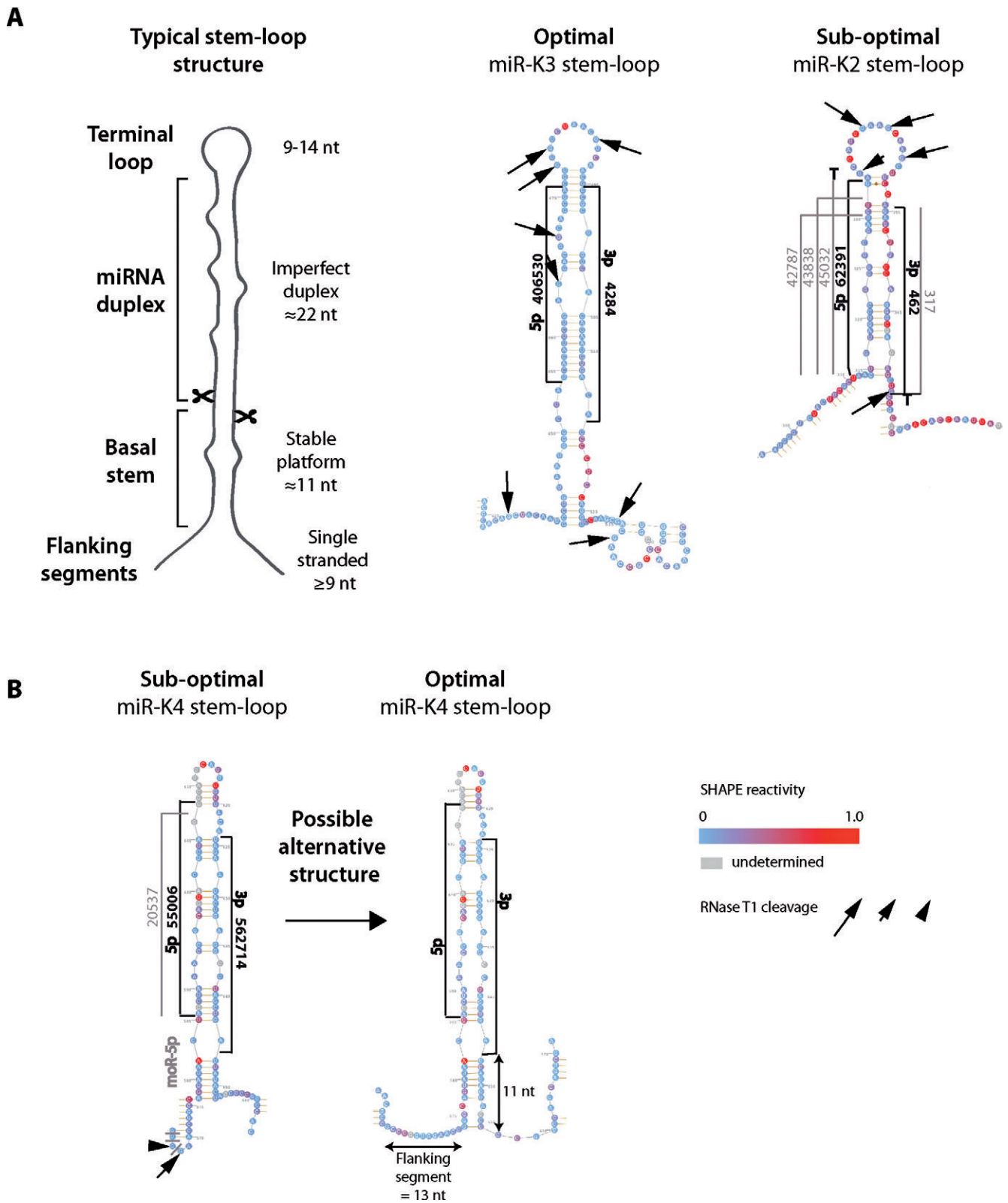


Figure 4. Secondary structure of typical and representative KSHV miRNA stem-loops. **(A)** On the left is depicted a typical miRNA stem-loop structure, with the different modules emphasized (see main text for details). miR-K3 and miR-K2 stem-loops (respectively optimally and suboptimally structured), composed of the pre-miRNA plus 20 nucleotides before and after the Droscha cleavage site, are represented as examples of optimal and suboptimal hairpin structures. SHAPE reactivity of each nucleotide is indicated. Arrows whose sizes are proportional to enzymatic activity indicate RNase T1 cleavages. The most abundant sequences of 5p and 3p arms of the miRNAs and the different isoforms are indicated in black and in gray, respectively, along with the number of sequence reads obtained by deep sequencing. Non-templated nucleotides found at the ends of the miRNA are shown. **(B)** In the case of miR-K4 stem-loop, manual folding allowed for an optimal alternative structure.

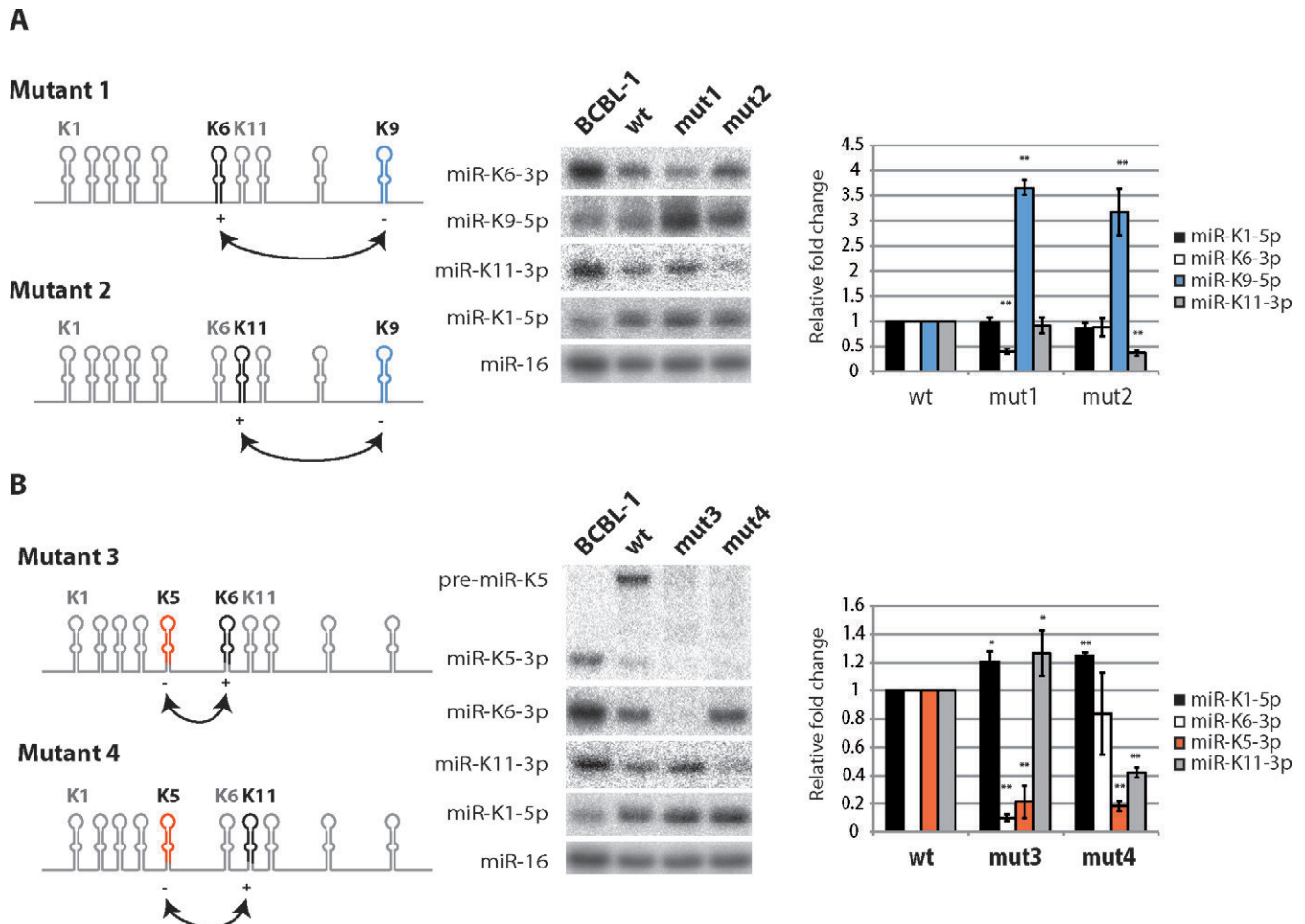


Figure 5. Swapping of KSHV miRNA stem-loops or pre-miRNAs. Either miR-K9 (A) or miR-K5 (B) stem-loops were swapped with miR-K6 or miR-K11 stem-loops. Left panel: schematic view of the mutants. The miRNA stem-loops (mutants 1 and 2) or the pre-miRNAs (mutants 3 and 4) are indicated in black and in color. The abundance of the corresponding mature miRNAs is indicated by + or -. Middle panel: northern blot analysis of the accumulation of mature miRNAs, after overexpression of wt and mutant plasmids in HEK293Grip cells ($n = 4$). miR-K1-5p and cellular miR-16 were probed as a control of expression and as a loading control, respectively. Right panel: histograms showing the relative expression of the different miRNAs from the mutated plasmids compared to the wt. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$.

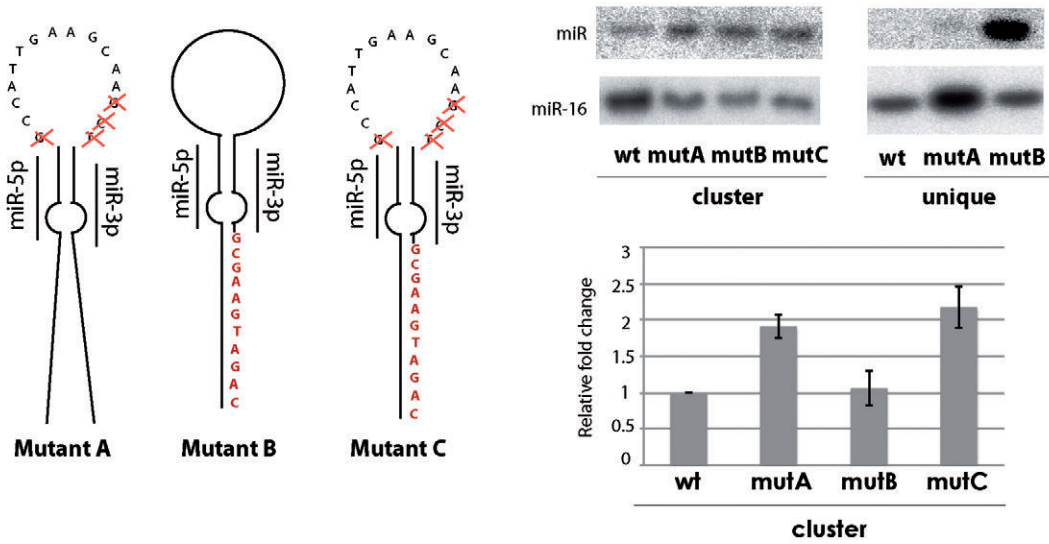
could occur cotranscriptionally (48) and, therefore, that the full-length primary transcript does not have time to accumulate. We do not believe that it is the case here because the miRNA cluster is located within an intron and there is ample evidence that the spliced mRNA accumulates (5), if indeed Drosha was cleaving stem-loops as they are being transcribed, then the intron would not have time to be formed and the pre-mRNA would be degraded by exoribonucleases (49). It is true, however, that the pre-miRNA processing could occur during splicing (50) and the full-length intron is short-lived, but the pre-miRNA must have sufficient time to accumulate and therefore to fold before being matured.

In addition to the importance of secondary structure, the primary sequence might also play a role in controlling the processing of miRNA precursors, as recently assessed by the Bartel laboratory (44). Indeed, some sequence motifs are conserved in human pri-miRNAs and the absence of these elements in sequences from *Caenorhabditis elegans* prevent them from Drosha cleavage in human cells. Hence, a $U_{-14}G_{-13}$ motif present at the basal stem of the pri-miRNA,

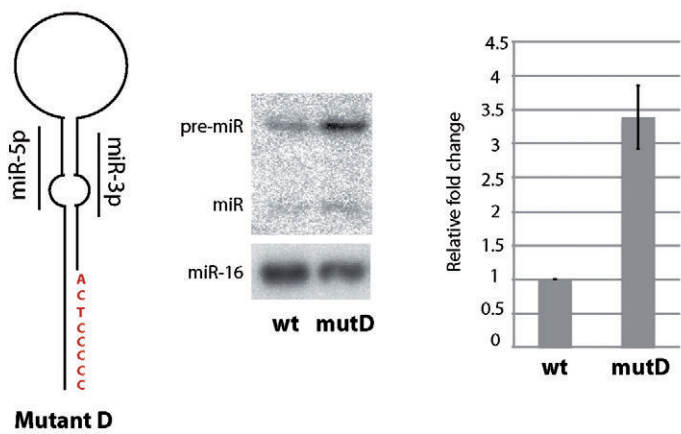
a CNNC motif at 17–18 nt downstream of the Drosha cleavage and UGUG sequence at position P24–P27 in the loop all favor the processing by Drosha. We looked for these specific motifs within the KSHV pri-miRNA. We found that well-expressed miRNAs that are embedded in optimal hairpin structures possess at least one of these determinants. For example, miR-K3 stem-loop that has the most optimal structure has the 3 primary sequence determinants. On the other hand, the least expressed miRNAs, miR-K2, -K5 and -K9, with non-optimal secondary structures, have none of these determinants.

It is worth noting that other viruses express their miRNAs in cluster. Interestingly, this is the case for another gammaherpesvirus, the Epstein–Barr virus (EBV), while betaherpesviruses, such as CMVs, have miRNAs dispersed along their genome. The advantage of expressing miRNAs from one locus is evident as the transcriptional control is much more easy to achieve. For viruses, such as KSHV and EBV, which go rapidly into latency, it therefore makes sense to be able to express all miRNAs at once. However, the dis-

A miR-K2



B miR-K5



C miR-K9

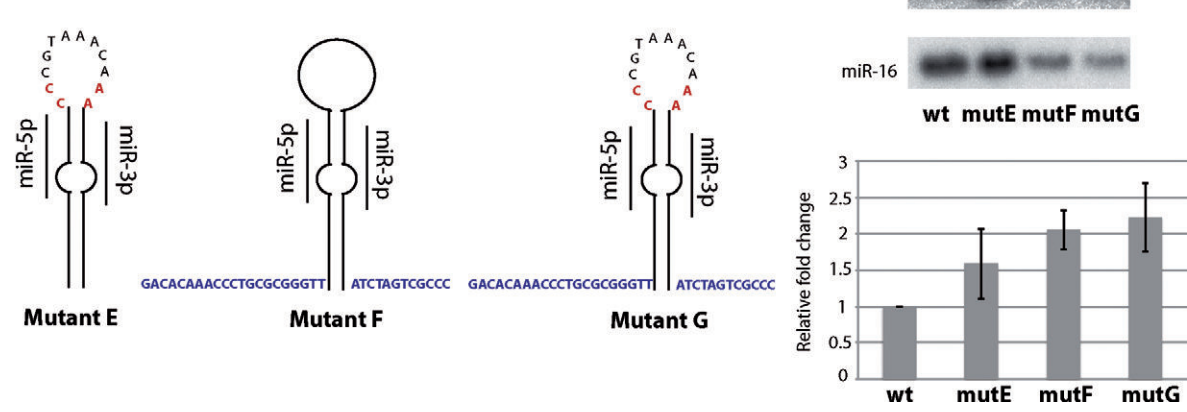


Figure 6. Targeted mutagenesis of suboptimal miRNA stem-loops. miR-K2 (A), miR-K5 (B) and miR-K9 (C) were mutated to optimize the secondary structure. Each missing criterion was added or changed, and the resulting mutants were cloned in the pcDNA-K10/12 or pcDNA-K2 expression plasmid. The resulting constructs were then transfected in HEK293Grip cells and total RNA was analyzed by northern blot for the studied miRNA. miR-16 was probed as a loading control. The histograms represent the relative expression of the different miRNAs from the mutated plasmids compared to the wt for three independent experiments. Inserted nucleotides are indicated in red and nucleotides derived from the miR-K6 stem-loop are indicated in blue, red crosses indicate deletions.

advantage will be that maybe each individual miRNA is not equally important within the cluster. Therefore, there is a need to modulate the accumulation of each miRNA. This regulation can occur at many different levels, and our results provide a first step to understand how the expression of such clustered miRNAs is regulated.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Fabrice Jossinet for his help on the use of Assemble program and for fruitful discussions. We also thank the IGBMC Microarray and Sequencing platform, member of the France Genomique program, for the sequencing of our libraries.

FUNDING

Agence Nationale pour la Recherche [labex netRNA, ANR-10-LABX-36]; European Union [ERC Starting Grant ncRNAVIR 260767, ERG Career Grant 268301]; Fondation pour la Recherche Médicale. M.C. is supported by a fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer. Source of open access funding: ERC Starting Grant [ncRNAVIR 260767].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Ganem, D. (2007) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds), *Fields Virology*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Vol. 5th, pp. 2847–2888.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M. et al. (2005) Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods*, **2**, 269–276.
- Cai, X., Lu, S., Zhang, Z., Gonzalez, C.M., Damania, B. and Cullen, B.R. (2005) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 5570–5575.
- Samols, M.A., Hu, J., Skalsky, R.L. and Renne, R. (2005) Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.*, **79**, 9301–9305.
- Cai, X. and Cullen, B.R. (2006) Transcriptional origin of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs. *J. Virol.*, **80**, 2234–2242.
- Lin, Y.-T., Kincaid, R.P., Arasappan, D., Dowd, S.E., Hunnicke-Smith, S.P. and Sullivan, C.S. (2010) Small RNA profiling reveals antisense transcription throughout the KSHV genome and novel small RNAs. *RNA N. Y. N.*, **16**, 1540–1558.
- Lin, X., Li, X., Liang, D. and Lan, K. (2012) miRNAs and usRNAs discovered in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus virions. *J. Virol.*, **86**, 12717–12730.
- Gottwein, E. (2012) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs. *Front. Microbiol.*, **3**, 165.
- Bartel, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215–233.
- Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T. and Margalit, H. (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2697–2706.
- Michlewski, G., Guil, S., Semple, C.A. and Cáceres, J.F. (2008) Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol. Cell*, **32**, 383–393.
- 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*, **125**, 887–901.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2005) Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.*, **280**, 27595–27603.
- Zhang, X. and Zeng, Y. (2010) The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7689–7697.
- Chaulk, S.G., Thede, G.L., Kent, O.A., Xu, Z., Gesner, E.M., Veldhoen, R.A., Khanna, S.K., Goping, I.S., MacMillan, A.M., Mendell, J.T. et al. (2011) Role of pri-miRNA tertiary structure in miR-17~92 miRNA biogenesis. *RNA Biol.*, **8**, 1105–1114.
- Chakraborty, S., Mehtab, S., Patwardhan, A. and Krishnan, Y. (2012) Pri-miR-17~92a transcript folds into a tertiary structure and autoregulates its processing. *RNA N. Y. N.*, **18**, 1014–1028.
- Starega-Roslan, J., Koscianska, E., Kozłowski, P. and Krzyzosiak, W.J. (2011) The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, **68**, 2859–2871.
- Merino, E.J., Wilkinson, K.A., Coughlan, J.L. and Weeks, K.M. (2005) RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4223–4231.
- Watts, J.M., Dang, K.K., Gorelick, R.J., Leonard, C.W., Bess, J.W., Swanstrom, R., Burch, C.L. and Weeks, K.M. (2009) Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*, **460**, 711–716.
- Dölken, L., Malterer, G., Erhard, F., Kothe, S., Friedel, C.C., Suffert, G., Marcinowski, L., Motsch, N., Barth, S., Beitzinger, M. et al. (2010) Systematic analysis of viral and cellular microRNA targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by RISC immunoprecipitation assay. *Cell Host Microbe*, **7**, 324–334.
- Suffert, G., Malterer, G., Hausser, J., Viiliäinen, J., Fender, A., Contrant, M., Ivacevic, T., Benes, V., Gros, F., Voinnet, O. et al. (2011) Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis. *PLoS Pathog.*, **7**, e1002405.
- Pfeffer, S. (2007) Identification of virally encoded microRNAs. *Methods Enzymol.*, **427**, 51–63.
- Hafner, M., Renwick, N., Brown, M., Mihailović, A., Holoch, D., Lin, C., Pena, J.T.G., Nusbaum, J.D., Morozov, P., Ludwig, J. et al. (2011) RNA-ligase-dependent biases in miRNA representation in deep-sequenced small RNA cDNA libraries. *RNA N. Y. N.*, **17**, 1697–1712.
- Sorefan, K., Pais, H., Hall, A.E., Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., Moulton, V. and Dalmay, T. (2012) Reducing sequencing bias of small RNAs. *Silence*, **3**, 4.
- Morgulis, A., Gertz, E.M., Schäffer, A.A. and Agarwala, R. (2006) A fast and symmetric DUST implementation to mask low-complexity DNA sequences. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol.*, **13**, 1028–1040.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, **10**, R25.
- Quinlan, A.R. and Hall, I.M. (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinform. Oxf. Engl.*, **26**, 841–842.
- Griffiths-Jones, S. (2004) The microRNA registry. *Nucleic Acids Res.*, **32**, D109–D111.
- Edgar, R., Domrachev, M. and Lash, A.E. (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 207–210.
- Tuddenham, L., Jung, J.S., Chane-Woon-Ming, B., Dölken, L. and Pfeffer, S. (2012) Small RNA deep sequencing identifies microRNAs and other small noncoding RNAs from human herpesvirus 6B. *J. Virol.*, **86**, 1638–1649.
- Mortimer, S.A. and Weeks, K.M. (2007) A fast-acting reagent for accurate analysis of RNA secondary and tertiary structure by SHAPE chemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 4144–4145.
- Mortimer, S.A. and Weeks, K.M. (2009) Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one-second snapshots and at single-nucleotide resolution. *Nat. Protoc.*, **4**, 1413–1421.

33. Aktar, S.J., Jabeen, A., Ali, L.M., Vivet-Boudou, V., Marquet, R. and Rizvi, T.A. (2013) SHAPE analysis of the 5' end of the Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) genomic RNA reveals structural elements required for genome dimerization. *RNA N. Y. N.*, **19**, 1648–1658.
34. Vasa, S.M., Guex, N., Wilkinson, K.A., Weeks, K.M. and Giddings, M.C. (2008) ShapeFinder: a software system for high-throughput quantitative analysis of nucleic acid reactivity information resolved by capillary electrophoresis. *RNA N. Y. N.*, **14**, 1979–1990.
35. Athavale, S.S., Gossett, J.J., Hsiao, C., Bowman, J.C., O'Neill, E., Hershkovitz, E., Preeprem, T., Hud, N.V., Wartell, R.M., Harvey, S.C. *et al.* (2012) Domain III of the T. thermophilus 23S rRNA folds independently to a near-native state. *RNA N. Y. N.*, **18**, 752–758.
36. Reuter, J.S. and Mathews, D.H. (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinform.*, **11**, 129.
37. Jossinet, F., Ludwig, T.E. and Westhof, E. (2010) Assemble: an interactive graphical tool to analyze and build RNA architectures at the 2D and 3D levels. *Bioinforma. Oxf. Engl.*, **26**, 2057–2059.
38. Umbach, J.L. and Cullen, B.R. (2010) In-depth analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA expression provides insights into the mammalian microRNA-processing machinery. *J. Virol.*, **84**, 695–703.
39. Gottwein, E., Corcoran, D.L., Mukherjee, N., Skalsky, R.L., Hafner, M., Nusbaum, J.D., Shamulailatpam, P., Love, C.L., Dave, S.S., Tuschl, T. *et al.* (2011) Viral microRNA targetome of KSHV-infected primary effusion lymphoma cell lines. *Cell Host Microbe.*, **10**, 515–526.
40. Li, Z., Kim, S.W., Lin, Y., Moore, P.S., Chang, Y. and John, B. (2009) Characterization of viral and human RNAs smaller than canonical MicroRNAs. *J. Virol.*, **83**, 12751–12758.
41. Han, S.-J., Marshall, V., Barsov, E., Quiñones, O., Ray, A., Labo, N., Trivett, M., Ott, D., Renne, R. and Whitby, D. (2013) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA single-nucleotide polymorphisms identified in clinical samples can affect microRNA processing, level of expression, and silencing activity. *J. Virol.*, **87**, 12237–12248.
42. Gutell, R.R., Cannone, J.J., Shang, Z., Du, Y. and Serra, M.J. (2000) A story: unpaired adenosine bases in ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.*, **304**, 335–354.
43. Zeng, Y., Yi, R. and Cullen, B.R. (2005) Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.*, **24**, 138–148.
44. Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E. and Bartel, D.P. (2013) Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell*, **152**, 844–858.
45. Heo, I., Ha, M., Lim, J., Yoon, M.-J., Park, J.-E., Kwon, S.C., Chang, H. and Kim, V.N. (2012) Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell*, **151**, 521–532.
46. Gottwein, E., Cai, X. and Cullen, B.R. (2006) A novel assay for viral microRNA function identifies a single nucleotide polymorphism that affects Drosha processing. *J. Virol.*, **80**, 5321–5326.
47. Feng, Y., Zhang, X., Song, Q., Li, T. and Zeng, Y. (2011) Drosha processing controls the specificity and efficiency of global microRNA expression. *Biochim. Biophys. Acta*, **1809**, 700–707.
48. Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I. and Proudfoot, N.J. (2008) Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 902–909.
49. Ballarino, M., Pagano, F., Girardi, E., Morlando, M., Cacchiarelli, D., Marchioni, M., Proudfoot, N.J. and Bozzoni, I. (2009) Coupled RNA processing and transcription of intergenic primary microRNAs. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 5632–5638.
50. Kim, Y.-K. and Kim, V.N. (2007) Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.*, **26**, 775–783.

C. Détermination de l'efficacité de clivage par Drosha du transcrit primaire intronique des miARN du KSHV

L'équipe de Narry Kim a mis au point une méthode pour des tests de maturation *in vitro* par le microprocesseur. Celle-ci repose sur l'expression de protéines Drosha et DGCR8 recombinantes, couplées à une étiquette FLAG dans des cellules humaines HEK 293. L'extrait protéique total peut être utilisé directement pour des tests enzymatiques *in vitro* en présence de substrats ARN. Alternativement, les protéines d'intérêts peuvent être purifiées par immunoprécipitation grâce à leur séquence FLAG. Cette méthode a notamment permis de mieux comprendre comment le clivage du microprocesseur fonctionne et de définir les éléments importants pour une bonne maturation du pri-miARN contenant un seul pré-miARN (Lee and Kim, 2007).

I. Objectifs

Nous avons pu voir que la structure secondaire et la localisation des tiges-boucles contenant les miARN dans le transcrit primaire du KSHV avait une influence sur l'accumulation des miARN matures. Cependant, nous n'avons pas démontré avec certitude que la régulation de l'expression des miARN du KSHV se faisait au niveau du clivage par Drosha. Dans cette partie, nous souhaitons donc définir plus précisément l'efficacité de clivage par Drosha des pré-miARN pour chacune des tiges-boucles formant le pri-miARN. Nous voulons définir les différentes étapes menant à l'expression des 10 pré-miARN introniques, à savoir si :

- (1) le profil de clivage des pré-miARN est précis ou si l'on détecte des formes alternatives de clivage (abortives ou des iso-pré-miARN)
- (2) un transcrit primaire permet la synthèse des 10 pré-miARN ou si certains vont être clivés préférentiellement (Figure 4)

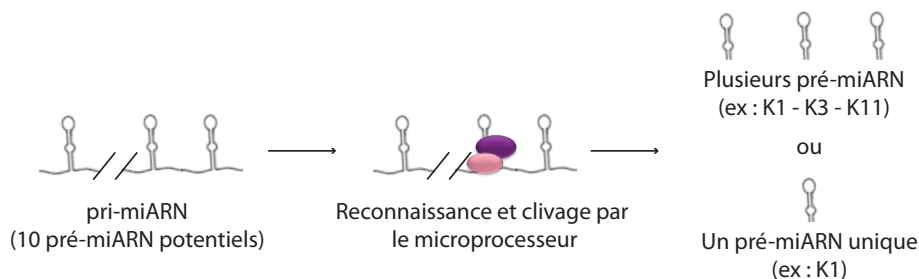


Figure 4 : synthèse sélective de pré-miARN. Le transcrit primaire du KSHV regroupe 10 tiges-boucles reconnues par le microprocesseur et permettant la synthèse de 10 pré-miARN différents. Un transcrit primaire peut soit permettre la synthèse de plusieurs pré-miARN ou un transcrit primaire ne permet la synthèse que d'un unique pré-miARN.

(3) certaines tiges-boucles sont clivées en premier et permettent le relâchement de la structure secondaire du cluster et donc le clivage d'autres tiges-boucles par après.

II. Expériences

Les expériences de knock-down de Drosha semblent indiquer une affinité différente de Drosha pour chaque pré-miRNA. De plus, nous avons montré que la structure secondaire et la localisation des tiges-boucles au sein du long transcrit primaire ont un rôle sur l'accumulation des miARN dans les cellules. Nous souhaitons maintenant tester l'efficacité de clivage du microprocesseur pour chacun des miARN contenus dans le transcrit primaire.

1. Test de maturation *in vitro* du transcrit intronique avec un extrait cellulaire total

a. Principe de l'expérience

L'ARN transcrit *in vitro* contenant les 10 pré-miARN intronique est incubé avec un extrait total enrichi en protéines Drosha et DGCR8 (voir partie IV matériel et méthodes, sous partie 2 préparation de l'extrait cellulaire). Les produits de clivage pour chacun des pré-miARN sont ensuite analysés et quantifiés au cours du temps par northern blot grâce à une gamme de concentration correspondant à la forme pré-miARN de référence. Ces quantifications sont ensuite soumises à un programme bio-informatique réalisé par P. Dumas (IBMC – Strasbourg) (langage de programmation Mathematica) pour l'obtention du coefficient de clivage par Drosha pour chacun des pré-miARN (défini par k_1). Nous obtenons au final une cinétique de clivage (en min^{-1}) du pri-miARN pour chacun des pré-miARN au cours du temps.

b. Résultats

Comme énoncé précédemment un transcrit primaire peut soit permettre la synthèse de plusieurs pré-miARN provenant de tiges-boucles différentes soit permettre la synthèse d'un unique pré-miARN provenant d'une seule tige-boucle. Cette sélection des tiges-boucles est guidée par l'accessibilité et l'affinité du microprocesseur pour la tige-boucle. Certaines tiges-boucles peuvent donc être préférentiellement maturées en pré-miARN. Les tests de modélisation effectués corrént avec la possibilité qu'un pri-miARN ne permette la synthèse sélective que de quelque pré-miARN.

➤ Profil de clivage

Les ARN produits par clivage sont analysés par northern blot avec des sondes dirigées contre un des brins des miARN. Ces derniers montrent le profil de coupures du pri-miARN en pré-miARN mais aussi en miARN matures. Ceci s'explique par la présence de Dicer dans nos extraits cellulaires totaux. Cependant nous n'avons pas procédé à une surexpression de l'enzyme en comparaison à Drosha et DGCR8. La maturation par Dicer n'est donc pas optimale.

D'après la figure 5 nous pouvons voir que le pri-miARN soumis à la maturation permet la synthèse des 10 pré-miARN introniques. De même nous avons une production des 10 miARN matures. Tous les pré-miARN et les miARN s'accumulent au cours du temps (de 1 à 70 minutes) et le profil de coupure révèle des produits uniques (une seule bande détectée) pour les miR-K1, -K3, -K5, -K6, -K9 et -K11. En effet, nous n'observons pas de formes alternatives en dehors du pré-miARN et du miARN. Concernant pré-miR-K2, -K4 et -K8 des produits ARN de tailles variables sont détectés.

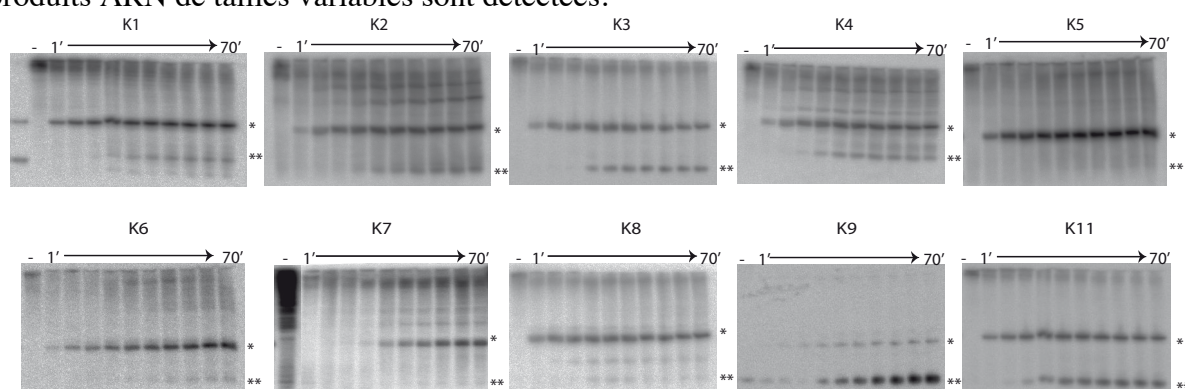


Figure 5 : profil de clivage du pri-miARN lors du test de maturation *in vitro* par Drosha. Le contrôle négatif sans l'extrait cellulaire est représenté par (-), le temps d'incubation avec l'extrait cellulaire est de 1 à 70 minutes. * pré-miARN, ** miARN mature.

➤ Cinétique de clivage

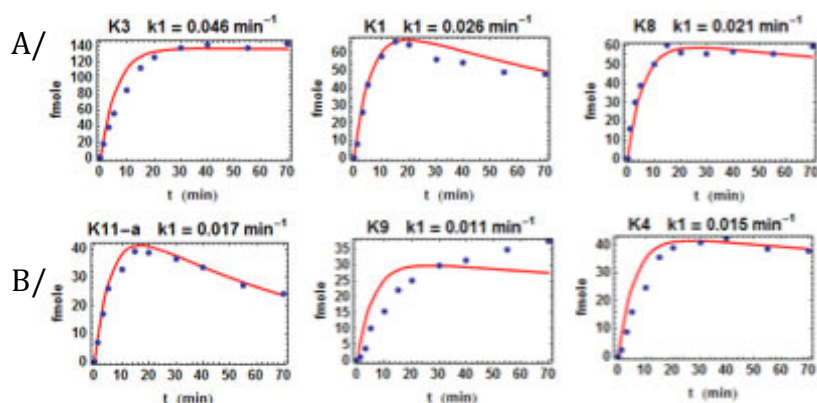
La quantité de pré-miARN obtenue au cours du temps permet de modéliser des courbes avec une constante de cinétique propre à chaque pré-miARN. Ces constantes cinétiques k_1 permettent de classer les pré-miARN en différentes catégories. D'après la figure 6, nous pouvons voir que :

- A/ certains pré-miARN sont rapidement clivés (k_1 variant de 0.046 à 0.021 min^{-1}) et s'accumulent abondamment de l'ordre de 130 à 60 fmol (pré-miR-K3, -K1, -K8)

- B/ certains pré-miARN sont clivés dans un délai moyen (k_1 entre 0.017 et 0.015 min^{-1}) et s'accumulent moyennement (entre 30 et 40 fmol) (pré-miR-K8, -K11, -K4, -K9)
- C/ certains pré-miARN présentent un délai de clivage (0.0075 à 0.0025 min^{-1}) et sont peu abondants (20 à 6 fmol) (pré-miR-K2, -K6 et -K7)
- D/ pré-miR-K5 présente une efficacité de clivage qui varie d'un test à l'autre.

D'après l'analyse des cinétiques de clivage, pré-miR-K2, -K4, -K6, -K7 et -K9 sont clivés avec un temps d'attente (délai avant la détection des premières coupures). Ceci indique que ces pré-miARN ne sont pas clivés immédiatement par le microprocesseur. Un problème d'accessibilité ou de structure secondaire pourrait freiner la maturation du pré-miARN. Dans le cas précis de pré-miR-K6 et -K7 les points ne sont pas alignés avec la courbe modélisée. Une possibilité est que ces pré-miARN pourraient nécessiter une première coupure dans le cluster pour être clivés comme leur cinétique de coupure ne corrèle pas avec le modèle proposé qui est qu'un seul miARN est clivé par brin d'ARN. De façon intéressante, l'efficacité de clivage corrèle avec l'abondance du pré-miARN obtenu dans ces tests. En effet, les pré-miARN préférentiellement produits et dont les quantités sont les plus élevées sont également clivés rapidement (Figure 6).

En analysant les profils obtenus pour les miARN matures nous pouvons voir que la production de miARN est très faible en comparaison avec celle des pré-miARN disponible et que la quantité de miARN diminue au cours du temps. Ceci suggère la présence et l'action de ribonucléases dans l'extrait cellulaire dégradant les pré-miARN et les miARN.



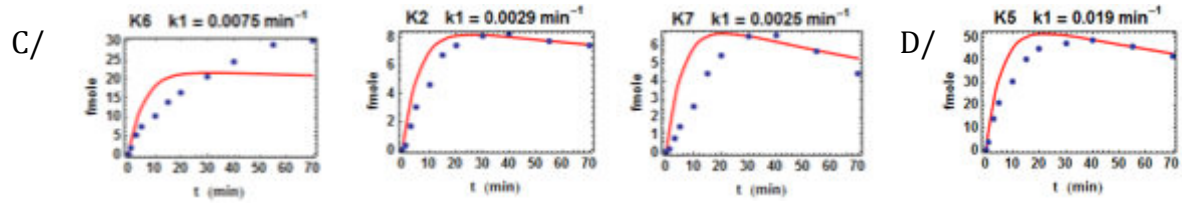


Figure 6 : cinétiques de clivage du pri-miARN lors du test de maturation *in vitro*. L'accumulation de pré-miARN est indiquée en fmol au court du temps (0 à 70 minutes). La courbe est indiquée en rouge et permet d'obtenir un coefficient de clivage nommé k_1 pour chacun des pré-miARN. Les cinétiques sont classées par groupe : A/rapide et abondant, B/ clivage et abondance moyens, C/ lent et peu abondant et D/ non constant.

2. Tests de maturation *in vitro* du transcrit intronique du KSHV avec Drosha et DGCR8 purifiées

a. Principe et optimisations

Afin de s'affranchir de l'action de RNases et de la production de miARN faisant suite au clivage par Drosha, nous avons effectué les mêmes tests de maturation *in vitro* mais en utilisant des protéines Drosha et DGCR8 purifiées par immunoprécipitation grâce à leur étiquette FLAG.

Des tests préliminaires avec une référence ont été menés avec différentes quantités de protéines immunoprecipitées afin de valider la méthode de purification. Pour cela un ARN transcrit *in vitro* contenant la séquence du pré-let-7 plus 100 nucléotides de part et d'autre (pri-let-7) a été soumis à un clivage *in vitro* par Drosha avec une quantité croissante de protéines (0.2, 1, 5 ng/ μ L) à deux temps différents d'incubation (15 et 30 minutes).

Nous pouvons constater que le pri-miARN est clivé en pré-miARN et que les sites de coupures semblent uniques avec une quantité plus élevée de microprocesseur. En effet, des formes alternatives sont observées avec des concentrations sous-optimales de protéine. La référence pour les expériences de maturation *in vitro* avec le cluster sera l'ARN pri-let-7 avec 5 ng/ μ l de protéines. Figure 7.

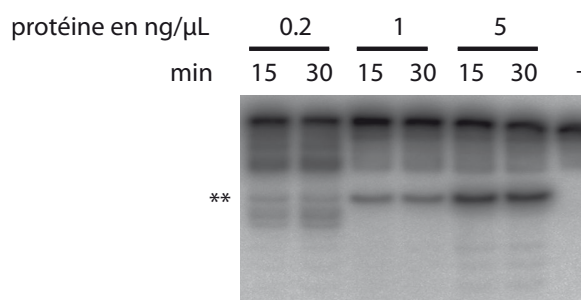


Figure 7 : test de maturation *in vitro* avec un immunoprecipité de Drosha et DGCR8 avec pri-let-7.

La quantité de protéines Drosha/DGCR8 et le temps d'incubation sont indiqués. Le contrôle non incubé est représenté par (-). ** pré-miARN.

De même nous avons optimisé les expériences de maturation *in vitro* avec le cluster de miARN introniques (résultats non montrés). Nous avons pu constater que la quantité de microprocesseur nécessaire pour obtenir une production de pré-miARN était plus élevée que dans le cas d'un pri-miARN unique comme pri-let-7. Ainsi pour le clivage du cluster nous utilisons 40 ng/ μ l d'immunoprécipité pour 250 fmol d'ARN alors que dans le cas de let-7 nous utilisons 5 ng/ μ l pour 500 fmol d'ARN.

b. Résultats

Les profils de coupure des pré-miARN avec Drosha et DGCR8 immunoprécipitées montrent des différences comparées aux profils obtenus avec l'extrait total (Figure 8). En effet des formes alternatives sont observées avec les protéines immunoprécipitées : pré-miR-K1, -K4, -K5 et -K7 montrent des formes beaucoup plus longues que le pré-miARN de référence, pré-miR-K8 et -K5 plus courtes (la taille n'est pas définie), et pré-miR-K3, -K4, -K5, -K6, -K8, -K11 et -K9 ont une forme alternative très proche de la taille du pré-miARN de référence. Nous avons utilisé une gamme de référence correspondant à la forme pré-miARN majoritaire pour le northern blot. Les coupures alternatives pourraient s'expliquer par l'absence de co-facteurs du microprocesseur affinant le positionnement et la coupure par Drosha. D'autre part la quantité de microprocesseur est plus importante dans l'extrait total comparé aux protéines immunoprécipitées (vérifié par western blot, non montré) et nous avons pu voir grâce que la précision et l'efficacité de clivage du pri-let-7 est dose dépendante. Dans ce cas, la concentration de Drosha/DGCR8 pourrait-être insuffisante dans nos expériences pour assurer une bonne maturation.

Les formes plus longues ou courtes comparé à la taille du pré-miARN de référence peuvent être des formes abortives de clivage et donc des formes inactives. Ceci peut être responsable du faible taux de pré-miARN et de miARN produits à partir de certaines tiges-boucles. Ceci expliquerait en partie la différence d'expression entre les miARN.

Concernant la vitesse d'apparition des pré-miARN, certaines sont très lentes et l'accumulation de pré-miRNA semble peu abondante comme pour pré-miR-K2, -K5 et -K7 (Figure 8).

Les expériences vont être reproduites et modélisées comme lors des tests de maturation *in vitro* avec l'extrait cellulaire afin de mieux comprendre l'action spécifique du microprocesseur.

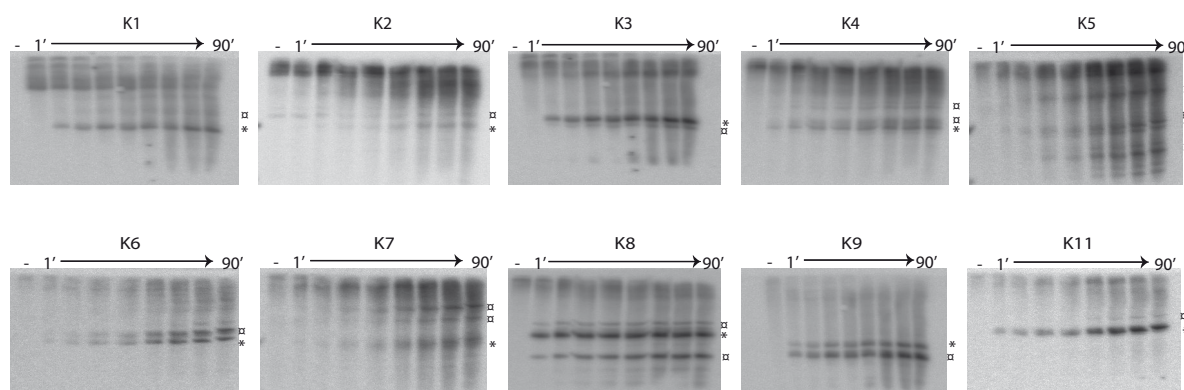


Figure 8 : profil de clivage du pri-miARN lors du test de maturation *in vitro* par Drossha. Le contrôle négatif sans l'extrait cellulaire est représenté par (-), le temps d'incubation avec l'extrait cellulaire est de 1 à 90 minutes (1' -> 90'). * pré-miARN. Les formes alternatives sont indiquées par □.

III. Conclusions

Lors de l'expérience avec l'extrait cellulaire total pré-miR-K7 et -K2 avaient une vitesse de maturation faible, étaient peu abondants et, comme pré-K4, -K9 et -K6, semblaient montrer un léger délai de clivage visible uniquement sur les courbes cinétiques. Dans les expériences avec le microprocesseur immunoprécipité cette fois nous remarquons sur le profil de coupure un délai de clivage pour les pré-miR-K2, -K5, -K6 et -K7. D'après l'allure de leurs cinétiques obtenues avec l'extrait cellulaire, pré-miR-K6 et -K7 nécessiterait une première coupure dans le pri-miARN pour être libéré. De façon intéressante, l'efficacité de clivage de pré-miR-K5 n'était pas constante avec l'extrait total enrichi. Enfin, les profils de coupures sont plus précis avec l'extrait total et l'accumulation de pré-miARN plus importante (voir tableau 1).

		Extrait total	Immunoprécipitation
Northern blot	Profil de clivage	Précis, une forme unique	Formes alternatives nombreuses
	Délai de maturation	Non visible	pré-miR-K2, -K5, -K6 et K7
Cinétique	Délai de maturation	pré-miR-K2, -K4, K6, -K7 et -K9	Pas de résultats
	Accumulation finale	Efficace	Pas de résultats

Tableau 1 : comparaison des résultats entre les deux méthodes des tests de maturation *in vitro* par Drossha. Le profil de coupure et l'accumulation des pré-miARN sur les northern-blot sont comparés entre le test de maturation *in vitro* issu de l'extrait total protéique ou d'immunoprécipités.

IV. Matériel et méthodes

1. Lignée cellulaire

La lignée HEK 293 *GRIP* a été cultivée dans une atmosphère à 5% de CO₂ à 37 degrés dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum fœtal de bœuf.

2. Tests de maturation *in vitro*

a. Production des ARN par transcription *in vitro*

Un gène synthétique contenant les 10 pré-miARN intronique de KSHV dérivant de la séquence de BCBL-1 sont synthétisés par PCR et comporte le promoteur T7. La polymérase T7 (Ambion) a permis la synthèse d'ARN de 3156 nucléotides qui ont été purifiés sur gel d'agarose low-melting 0.8 %. La bande d'intérêt a été chauffée à 65°C pendant 10 min et après 5 min à 42°C, l'ARN a été élué en utilisant 1 U d'agarase 1 (Thermo Scientific) pendant 40 min à 42°C. L'ARN a été extrait par phénol/chloroforme/acide isoamylique (PCI) et précipité à l'éthanol.

b. Préparation de Drosha/DGCR8 recombinates

Les cellules HEK 293 *GRIP* ont été étalées dans des boîtes de pétri de 60 cm². A 80% de confluence les cellules sont transfectées avec 8 µg de pCK-Drosha et 2 µg de pCK-DGCR8 (Lee and Kim, 2007) avec de la lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life technologies) selon le protocole standard. Après 48 heures de transfection les cellules ont été récoltées, centrifugées puis lysées dans du tampon de lyse (20 mM Tris-HCL pH 8.0, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 5% glycérol et des inhibiteurs de protéases EDTA free (Roche)) puis soniqué 5 min, 3 x 10 sec ON/OFF à haute fréquence à froid. L'extrait cellulaire a été ensuite centrifugé et le surnageant a été prélevé. Il peut être utilisé tel quel ou Drosha/DGCR8 peuvent être purifiées par immunoprécipitation. Brièvement, 150 µl de billes d'agaroses couplées à des anticorps anti FLAG ont été lavés 4 fois dans du tampon de lyse puis incubées avec l'extrait cellulaire deux heures à 4°C. Drosha et DGCR8 ont été éluées avec 200 µl de tampon d'éluion (contenant 6 µl d'anti-FLAG pour 100 µl total) pendant 1 heure à 4°C.

c. Test de maturation *in vitro*

500 pmol par conditions de temps dans le cas d'un extrait total ou 250 fmol d'ARN dans le cas d'un immunoprecipité du microprocesseur ont été dénaturés 3 min à 95°C,

refroidit 5 min dans la glace puis renaturés avec du tampon de structure 10x (Ambion) 45 min à 37°C. Dans le cas de l'immunoprécipité 40ng/ μ l de microprocesseur ont été utilisés par conditions de temps. Les tests de maturation *in vitro* ont été réalisés selon le protocole de Narry Kim (Lee and Kim, 2007). Brièvement 30 μ l de réaction contenaient 15 μ l d'extrait cellulaire total ou d'immunoprécipité, 6.4 mM de MgCl₂, 3 μ l d'ARN.

D. Identification de protéines accessoires impliquées dans la régulation des miARN introniques du KSHV

La biogenèse des miARN est un processus séquentiel hautement régulé qui convertit un transcrit primaire (pri-miARN) en miARN mature et actif. Les acteurs de cette régulation modulent l'expression des miARN en fonction de l'environnement cellulaire. Pour cela ils peuvent se lier soit aux enzymes de maturation des miARN (Drosha, Dicer, Ago) et à leurs co-facteurs directs (DGCR8, TRBP), soit se lier à l'ARN du pri- ou pré-miARN pour une action plus ciblée et spécifique. Dans le dernier cas, la boucle terminale du pré-miARN représente une plateforme de reconnaissance importante pour les protéines (Choudhury and Michlewski, 2012; Michlewski et al., 2008).

Les co-facteurs les plus représentatifs du microprocesseur sont p68 et p72. Par exemple, p68 peut favoriser la maturation par Drosha en association avec SMAD ou p53 pour miR-21 ou miR-16 respectivement, mais aussi l'inhiber lors de son association avec E2-ER α sur miR-16 (voir revue (Newman and Hammond, 2010)). Parallèlement à cette régulation, les co-facteurs peuvent se lier au pri- ou pré-miARN. Des études récentes ont montré que la boucle terminale qui est plus facilement exposée que la tige ou les segments flanquants, permet la fixation de nombreuses protéines. Dans le cas de pri-miR-18a, hnRNP A1 se fixe sur une séquence de la boucle qui est très conservée dans l'évolution et augmente la production de pré-miR-18a. Ce dernier appartient au cluster 17-92, et hnRNP A1 agit uniquement sur ce pré-miARN. La protéine va induire un réarrangement structural du pré-miARN et favoriser sa maturation par Drosha (Michlewski et al., 2010). Il existe aussi, des rôles antagonistes des protéines pour la maturation des pri-miARN, ainsi LIN-28 et KSRP interagissent avec pri-let-7. La première inhibant la maturation par Drosha et la seconde l'activant (Chang et al., 2009b; Trabucchi et al., 2009).

De nombreuses protéines agissent sur la maturation des miARN, mais d'autres évènements peuvent aussi réguler la biogenèse. Le Fer agit sur le microprocesseur et récemment une étude a démontré que le domaine de liaison au Fer dans la séquence de DGCR8, se liait au pri-miARN et favorisait l'interaction de DGCR8 au pri-miARN. Le composant du complexe de liaison à la coiffe nucléaire ARS2 est également important pour la fidélité du clivage du microprocesseur (Sabin et al., 2009). Enfin la séquence primaire peut être éditée (A-I) et cela peut altérer la maturation (Chawla and Sokol, 2014). Il a été démontré que l'enzyme d'édition ADAR pouvait affecter la maturation du pri-miARN indépendamment de son action d'édition dans le cas du pri-miR-376a2 (Heale et al., 2009).

Une des techniques permettant l'identification de ces co-facteurs est l'immunoprécipitation ou la chromatographie d'affinité de complexes protéiques avec l'ARN, suivis d'identification par spectrométrie de masse. Des recherches bioinformatiques de séquences consensus connues dans la séquence du pri-miARN peuvent orienter les recherches.

I. Objectifs

Nous souhaitons identifier et caractériser les co-facteurs potentiels responsables de la différence d'abondance et d'expression des miARN du KSHV. Nous avons effectué des expériences de chromatographie d'affinité avec des billes d'agarose couplées à l'ARN codant une tige-boucle intermédiaire artificielle spécifique contenant un miARN unique du cluster du KSHV (nommé SL-miARN pour stem-loop) avec un extrait cellulaire issu de BCBL-1 (cellule B infectée naturellement par le KSHV) (Figure 1). La séquence du SL-miARN contient le pré-miARN et 20 nucléotides de part et d'autre en 5' et 3'. Il s'agit de la longueur minimum pour d'une part avoir une interaction du microprocesseur avec l'ARN et d'autre part aboutir à un clivage par Drosha. Cette longueur permet d'avoir une certaine spécificité des co-facteurs. En effet, les tiges-boucles contenant les miARN sont très proches dans le cluster. Il faut donc restreindre au maximum les segments flanquants (pour ne pas obtenir de parties tronquées des miARN voisins).

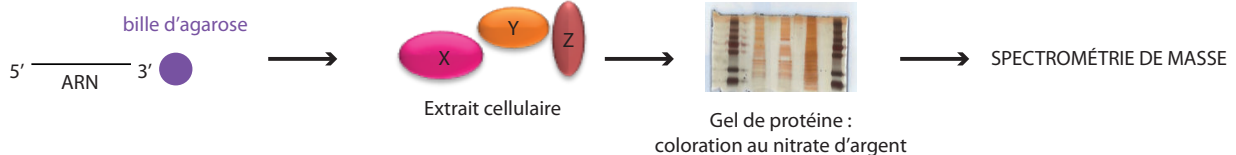


Figure 1 : principe de l'expérience d'identification de co-facteurs protéiques des tiges-boucles codant les miARN du KSHV.

II. Expériences de chromatographie d'affinité

1. Principe de l'expérience

Les SL-miARN sont transcrits *in vitro* à partir d'une matrice ADN amplifiée par PCR. Ils ont été ensuite liés à des billes d'agarose après modification de leur extrémité 3' par une solution de m-périodate et incubés avec un extrait cellulaire total de BCBL-1. Les protéines retenues sont ensuite analysées par spectrométrie de masse. Les expériences utilisent comme ARN candidats SL-miR-K4, SL-miR-K5 et SL-miR-K11. Lors de la détermination de la structure secondaire du transcrite primaire par la méthode de SHAPE, nous avons constaté que

pré-miR-K4 pourrait se replier de façon alternative en une structure secondaire optimale pour la maturation par Drosha. Cette structure alternative n'est pas la structure de référence du pré-miARN, ainsi nous avons supposé l'action d'un co-facteur qui pourrait induire un réarrangement structural comme dans le cas de pri-miR-18a. Concernant miR-K5 son expression est très faible, et miR-K11 varie en fonction des lignées cellulaires. Pour nos expériences, nous avons une référence qui contient la séquence de pré-let-7 plus 20 nucléotides de part et d'autre également. Elle nous permettra de valider notre protocole car on sait que pré-let-7 se lie par exemple à hnRNP A1, KSRP, LIN-28B et Drosha/DGCR8.

Dans le cas de SL-miR-K4 les expériences ont été menées en triplicat avec comme témoin positif SL-let-7 dans les deux premières expériences. En revanche, dans le cas de SL-miR-K5 et SL-miR-K11, les expériences n'ont été réalisées qu'une seule fois avec comme témoin positif le triplicat de SL-miR-K4. Les expériences se répartissent comme suit :

- a) billes seules, SL-let-7- SL-miR-K4
- b) billes seules, SL-let-7, SL-miR-K4
- c) billes seules, SL-miR-K4, SL-miR-K5 et SL-miR-K11.

2. Résultats

a. Vérifications de la purification par les billes couplées à l'ARN sur gel de polyacrylamide et coloration au nitrate d'argent

Afin de vérifier la qualité de purification et de comparer l'abondance des protéines entre les différents échantillons, l'extrait retenu avec l'ARN est déposé sur gel SDS-PAGE et coloré au nitrate d'argent.

Dans nos expériences, les protéines retenues avec les billes sont plus nombreuses qu'avec les ARN. Nous avons par la suite réussi à diminuer le nombre de protéines liées aux billes seules (voir résultats de la spectrométrie de masse). Cependant, nous ne détectons pas de bandes spécifiques à chacun des SL-miARN et le taux de protéines liées aux billes seules indiquent un bruit de fond important avec des protéines non-spécifiques liées aux SL-miARN. Figure 1.

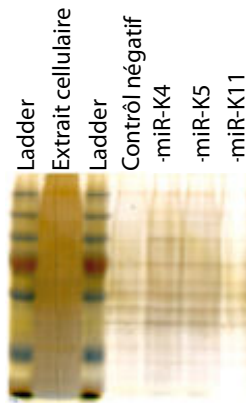


Figure 1 : exemple de coloration de gel de polyacrylamide au nitrate d'argent. Expérience c.

b. Qualité et abondance des protéines

Un total de plus de 1000 protéines a été récupéré lors des deux premières expériences a) et b) de chromatographie d'affinité. Lors de la dernière expérience c), dû à l'amélioration de la technique, nous avons pêché un peu plus de 400 protéines. Les protéines sont quantifiées et identifiées par spectrométrie de masse. La majorité des protéines sont en commun dans tous les échantillons, et malgré le bruit de fond et la forte proportion de protéines liées aux billes, nous avons retrouvé des protéines spécifiques à nos candidats SL-miARN. Les diagrammes de Venn montrent le nombre total de protéines ainsi que leurs répartition entre les différents candidats. Seul le diagramme de la dernière expérience est représenté. Figure 2.

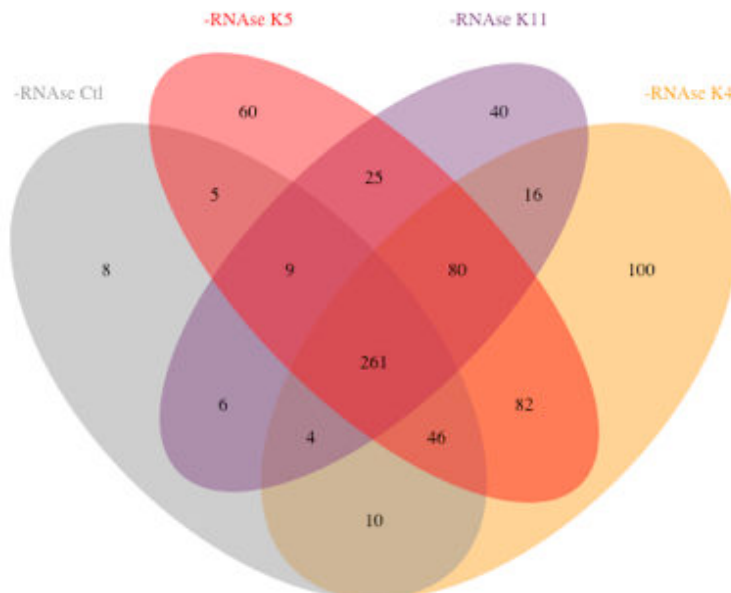


Figure 2 : diagramme de Venn de l'expérience c :

Le nombre total de protéines identifiées est indiqué en fonction des candidats. La majorité des protéines sont en commun aux billes et SL-miARN (261). Quantification des protéines dans les expériences a) et b); **Expérience a** : billes/let-7/miR-K4 (221) - billes/let-7 (48) - billes/miR-K4 (103) - let-7/miR-K4 (40) - billes (175) - let-7 (107) - miR-K4 (93). **Expérience b** : billes/let-7/miR-K4 (899) - billes/let-7 (80) - billes/miR-K4 (122) - let-7/miR-K4 (150) - billes (160)- let-7 (105) - miR-K4 (94).

c. Identification des protéines par spectrométrie de masse

Différentes protéines d'intérêt ont été identifiées, elles sont énumérées avec le nombre de spectres obtenus dans le tableau 1. Les protéines ont été identifiées à partir de la base Uniprot/Human. Le nombre de spectre reflète l'abondance des protéines.

Tableau 1 : tableau récapitulatif des protéines d'intérêt identifiées par spectrométrie de masse dans les différentes expériences. a, b, c font références aux expériences répétées en triplicat. Le chiffre dans les colonnes correspond au nombre de spectres obtenus par peptides de protéines.

Protéines identifiées	billes			SL-let-7		SL-miR-K4			SL-miR-K5	SL-miR-K11
	a	b	c	a	b	a	b	c	c	c
DICER	46.5			29	34	71			5	15
TRBP2				2	11	4	6		8	8
Drosha				6		2				
DGCR8					5					
LN28B				29	55	12		4	3	8
hnRNP A1	17	14	7	157	147	69	17	9	12	10
KHSRP		10	1	60	14			4	5	7
TUT7			-		5			-		
TUT4			-	3	1			-		
DI3L2			-		7			-		
ADAR	586.2	7		61	81	78	86	25	103	86
FUS		9		8	45	16	5	3	6	5
DDX5	45	47	7	7	41	62	40	13	21	15
DDX17	762.5	37	9	3	19	25	23	12	17	8
DHX30					34		20	3	3	5
DDX24		2			3		3	3		
DHX36					54				11	19
DDX56								2	2	
STAU1	2			27	35	26	42	11	9	8
STAU2					22		24	12	13	8
NOP56	178.6		2				4	3		
NOP58							2	5		
FBRL	172.3				1		4	1		
RBM4										1
P53										1
MCM5					2		5			1
CASP1					1		1	3		
RBM39		14			10		12	2	4	1
RBM25		14	1		6		4	3	2	1
XRN1	243			4	76	2	2			1
XRN2		2			83		8	1	2	5
PABP4					13		15		7	6

Nous avons retrouvés des protéines générales de la biogénèse ainsi que des co-facteurs connus. De plus certaines protéines sont spécifiques à chaque SL-miARN candidats.

➤ Protéines de la biogénèse des miARN

Des protéines participant à la biogénèse des miARN sont retrouvées associées aux SL-miARN confirmant le bon repliement en tige-boucle des candidats. Ainsi Dicer se lie aux candidats mais également aux billes, TRBP2 uniquement aux candidats, Drosha et DGCR8 sont liés à SL-let-7 et SL-miR-K4 mais dans une moindre mesure car une seule expérience a permis de les mettre en évidence. Ceci suggère une interaction transitoire ou faible entre le microprocesseur et les miARN.

➤ Protéines identifiées comme co-facteurs connus de let-7

Les protéines connues pour se lier à let-7, hnRNP A1, LIN-28B et KSRP ont été identifiées dans nos analyses de spectrométrie de masse. hnRNP A1 se lie aux billes et aux candidats, LIN28B lie également aux autres candidats, KSRP se lie majoritairement à SL-let-7 mais aussi aux autres miARN et dans quelques cas aux billes. De façon intéressante, le complexe de régulation négative de l'expression de let-7 (incluant Lin-28, TUT-4 (l'uridylyl transférase terminale 4), TUT-7 et Dis3L2 (DIS3 mitotic control homolog (*S. cerevisiae*)-like2)) est retrouvé lié spécifiquement à let-7. Lin-28B recrute les TUT qui catalysent l'uridylation de let-7 et induit sa dégradation par Dis3L2 (Chang et al., 2013; Thornton et al., 2012; Ustianenko et al., 2013).

➤ Protéines identifiées comme co-facteurs connus de miARN se liant aux candidats

De manière moins spécifique car liées aux candidats mais aussi aux billes, nous avons pu caractériser ADAR, FUS, de nombreuses hélicases comme DDX5 (p68) et DDX17 (p72) ou des protéines RBM (RNA-binding protein). ADAR peut induire, comme nous l'avons déjà cité auparavant, une édition de la séquence ARN mais aussi avoir un impact sur la régulation du pri-miARN indépendamment de son activité d'édition (Chawla and Sokol, 2014; Heale et al., 2009). La séquence du miR-K4 est éditée et il est possible que cette interaction avec ADAR soit la raison du polymorphisme du miARN. La protéine FUS est connue pour s'associer au pri-miARN et à Drosha afin d'aider cette dernière à se lier à l'ARN (Morlando et al., 2012). Dans nos expériences, FUS est retrouvée de façon plus abondante que Drosha

mais n'est pas suffisante pour la liaison de Drosha au pri-miARN. Toujours indépendamment des billes, STAU1 et 2 (Staufen double-stranded RNA-binding proteins), connues pour leur action dans la dégradation des ARNm, sont associés aux miARN et à let-7 (Kim et al., 2005). De même XRN1 et XRN2 (exoribonucléase like 1 et 2) sont identifiées.

- Proteines spécifiques à chacun des candidats
- SL-miR-K4

SL-miR-K4 se lie à NOP 56 - NOP 58 – Fibrillarine (FBRL). Les protéines nucléaires NOP 56 et NOP 58 forment un hétérodimère avec la Fibrillarine (une ARN méthyltransférase qui se lie au snoARN) (Gagnon et al., 2012; Lechertier et al., 2009). Les sno-ARN sont des petits ARN non codants localisés dans le noyau qui guide la machinerie de modification des ARN ribosomiques. Récemment, chez EBV, une tige boucle de type miARN répertoriée comme v-snoARN se lie à NOP 56, NOP 58 et Fibrillarine pour sa maturation (Hutzinger et al., 2009).

- SL-miR-K5

SL-miR-K5 ne se lie spécifiquement à aucune protéine. Cependant, comme SL-miR-K11, elle se lie à PABP4 (poly (A)- binding protein).

- SL-miR-K11

Cet ARN se lie à RBM4 (RNA-binding protein 4) et p53. RBM4 contrôle la traduction et peut inhiber la traduction coiffe dépendante mais aussi initier la traduction médiée par les IRES (internal ribosome entry site-mediated translation). Cette protéine interagit directement avec Ago2 et inhibe la traduction d'ARNm cible. Un complexe comprenant RBM4-Ago2 et miR-146a permet de réguler la traduction de TNFalpha et IL-6 (Brudecki et al., 2013).

Le facteur de transcription p53 permet la surexpression de certains miARN comme miR-143 et miR-16 en s'associant à p68. De façon intéressante, MCM5 se lie à SL-let-7, SL-miR-K4 et SL-miR-K11. MCM5 est régulé par le miR-885-5p et permet l'activation de p53 (Afanasyeva et al., 2011).

III. Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

a. Lignées cellulaires

Les cellules BCBL-1 sont des lignées cellulaires issues de lymphome des cavités du corps qui sont infectées par le KSHV. Le virus y est majoritairement en phase de latence. Les 12 pré-miARN y sont exprimés et les co-facteurs spécifiques naturels des pré-miARN sont présents.

Les cellules sont cultivées dans du milieu de culture RPMI supplémenté avec 10% de FCS, 1x du Pen-Strep et 1x de la L-glutamine à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

b. Préparation de l'extrait cellulaire

40 millions de cellules BCBL-1 par conditions ont été centrifugées pour être culotées et reprises dans 5 ml de DPBS. Après une deuxième étape de centrifugation, le culot a été repris dans 1ml de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02 % Sodium azide, 100 μ g/mL PMSF, 1 % NP-40 et un inhibiteur de protéase Roche EDTA free) et incubé 30 minutes dans la glace pour perméabiliser les membranes. Les mixtes ont ensuite été centrifugés pour culoter les déchets cellulaires. Le surnageant contenant l'ARN a été gardé.

2. Préparation des ARN et des billes d'agarose

a. Production des ARN

Pour synthétiser les candidats intermédiaire artificiel SL-let-7, SL-miR-K4, SL-miR-K5 et SL-miR-K11, le plasmide pca4 et un extrait ADN de cellule contenant la matrice de let-7 ont été utilisés pour amplifier par PCR des matrices ADN et des amorces spécifiques contenant une séquence promotrice pour l'ARN polymérase T7 (soulignée) à chaque candidats sont utilisées :

-SL-miR-K4 :

(for : GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAACCGGGCAGTATAACTAGC et

rev : GCTGGACGGAGGTAGTATAATCAGC)

-SL-miR-K5 :

(for : TAATACGACTCACTATAGGGACTAAGGGGGAGTTTGACCTAGGTAGTCC et

rev : TGGTCTTATGAGCGGGCTTGACCG),

-SL-miR-K11 :

(for : TAATACGACTCACTATAGGGCCTCATGCGAGGTTTCGCTTTGGTCACAGC et
rev : CCGCAAGGCACGGGGCCGCATCGG)

-SL-let-7 :

(for : GAAATTAATACGACTCACTATAGGATGTTCTTCTTCACTGTGGGATGAGGTAG
et rev : AGACTTTTCTATCACGTTAGGAAAG).

Les ADN ont ensuite été transcrits *in vitro* grâce à la polymérase T7 (Ambion) et les ARN ont été purifiés sur gel d'agarose low-melting 0.8 %. Le gel a été chauffé à 65°C pendant 10 min et après 5 min à 42°C, les ARN ont été élués en utilisant 1 U d'agarase 1 (thermo Scientific) pendant 40 min à 42°C. Les ARN ont été extraits par phénol/chloroforme/acide isoamylique (PCI) et précipités à l'éthanol.

b. Préparation des billes d'agarose et liaison à l'ARN

Les billes d'agarose ont été préparées pour être liées aux extrémités 3' des candidats ARN. 400 μ l de billes par condition ont été lavées 4 fois avec 2 ml d'acétate de sodium (AcONa) à 0.1 M et centrifugées pour être récupérées. Le surnageant a été retiré et les billes ont été resuspendues dans 300 μ l par condition d'AcONa à 1 M.

L'extrémité 3' des ARN doit être modifiées pour permettre la liaison aux billes d'agarose. 400 pmol d'ARN dilués dans 40 μ l final d'eau mQ ont été dénaturées 3 min à 95°C, mises dans la glace 3 min et renaturées 30 min à 37 °C dans du tampon de structure 1x (Ambion). Les 40 μ l d'ARN ont ensuite été incubés avec 360 μ l de sodium-m-periodate (5mM) pendant 1 heure dans le noir à 4°C.

Les ARN ont ensuite été précipités et resuspendus dans 100 μ l d'AcONa 0.1M et incubés avec les 300 μ l de billes préparées précédemment pendant toute la nuit à 4°C. Les ARN couplés aux billes ont ensuite été incubés 30 min à température ambiante. Les billes ont été récupérées par centrifugation et lavées 4 fois dans 1ml de solution D 1x (20 mM HEPES, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 100 mM DTT, 6 % Glycérol) et reprises dans 1ml final de solution D 1x.

c. Gel au nitrate d'argent

100 μ l de chaque solution contenant les billes d'agarose liées aux ARN ont été

centrifugés et le culot repris dans 20 μl d' H_2O mQ ajouté à 2.5 μl de bleu de protéine 10x et du tampon de dénaturation Laemmli 10x. Les protéines ont été chauffées 5 min à 95°C pour les libérer de l'ARN et l'échantillon a été déposé sur un gel 10 % SDS-PAGE (1.0mm). 2 μl de l'extrait protéique a été déposé en référence de charge ainsi qu'un marqueur de taille (Page ruler plus prestained protein ladder (Thermo Scientific)).

Dans le but de visualiser les protéines sur le gel, une coloration au nitrate d'argent a été réalisée.

3. Spectrométrie de masse

Les échantillons ont été précipités et directement digérés à la trypsine sur la nuit avant injection dans une chromatographie liquide couplé au spectromètre de masse Triple TOF 5600.

La spectrométrie de masse est une méthode destructive d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

L'appareil est capable de séparer ces ions (par un champ magnétique) et de les détecter/caractériser qualitativement et quantitativement. De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant car la substance ionisée se trouve dans un état excité qui provoque sa fragmentation.

Trois étapes sont nécessaires, volatiliser les molécules pour les séparer les unes des autres en passant d'un état de matière condensée à un état gazeux ; ioniser les molécules pour les transformer en ions et enfin mesurer le rapport m/z (masse/nombre de charges) ; analyser ce rapport car cette valeur de pic moléculaire permet de calculer la masse moléculaire. Les pics de fragmentation permettent de reconstituer une partie de la structure et l'intensité des pics permet de faire de l'analyse quantitative.

Un spectromètre de masse se compose d'une source d'ion pour volatiliser et ioniser (simultanément ou successivement), d'un analyseur qui sépare les ions en fonction du rapport m/z puis un détecteur. L'analyseur est une partie de l'appareil où règne un vide suffisant pour que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil pour atteindre le détecteur. Les appareils peuvent être couplés avec un système de chromatographie (TLC, GLC, HPLC, SFC) et certains appareils, plus sophistiqués font de la

spectrométrie à plusieurs dimensions (MS-MS ou spectrométrie de masse en tandem). Le premier étage de MS sert à sélectionner un ion avec un certain rapport m/z , et le second analysera les ions issus de la fragmentation dans la chambre de collisions de celui-ci.

Les protéines ont été identifiées à partir de la base Uniprot/Human. Le nombre de spectre reflète l'abondance des protéines. Toutes les données ont été filtrées pour éviter les faux positifs (<1%). Les protéines avec moins de 2 spectres ont été validées manuellement.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les miARN sont générés par l'action séquentielle et concertée de complexes qui permettent le clivage, l'export et le chargement du miARN dans le complexe effecteur RISC (MacFarlane and Murphy, 2010). De nombreuses études suggèrent que ces étapes de maturation servent de point de régulation à l'abondance et l'activité des miARN (Krol et al., 2010). Ces derniers sont capables de modifier rapidement l'expression génique mais aussi les fonctions cellulaires telle que la prolifération ou la mort cellulaire, en réponse à l'environnement cellulaire (Bartel, 2009). C'est pourquoi la régulation de la biogenèse des miARN est une des premières lignes de réponse pour modifier l'expression du programme génique. Ce réseau de régulation des miARN est complexe et possède de nombreux rétrocontrôles entre miARN, ARNm cibles et protéines, comme DGCR8 et Drosha (Han et al., 2009). De plus, un miARN peut réguler de nombreuses cibles simultanément. Ainsi, le contrôle de l'expression de miARN peut avoir des effets physiologiques importants pour la cellule (Garzon et al., 2006). Il est donc primordial que l'action engendrée par les miARN soit finement contrôlée dans l'espace et le temps.

La première étape de maturation du transcrite primaire contenant les miARN est effectuée par Drosha et DGCR8. Ce complexe protéique forme le microprocesseur, et de nombreux critères régissent l'interaction entre miARN et microprocesseur : l'activité du microprocesseur en lui même, la structure secondaire et l'accessibilité de la tige-boucle codant le miARN, la présence et l'action de co-facteur inhibant ou activant le clivage du pri-miARN. L'action du microprocesseur est déterminante puisqu'elle va définir la quantité de pré-miARN disponibles pouvant être ensuite maturés en miARN (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004b; Han et al., 2004; Landthaler et al., 2004). L'activité du microprocesseur est maîtrisée par la quantité de protéine disponible. La régulation entre DGCR8 et Drosha permet de maintenir un niveau optimal de complexe puisqu'uniquement une très fine gamme de concentration des acteurs permet un clivage optimal du pri-miARN. Des acteurs externes comme le Fer où des protéines secondaires vont également moduler son action (Quick-Cleveland et al., 2014; Weitz et al., 2014). Le complexe actif doit toutefois pouvoir accéder au site de reconnaissance et de clivage. Le repliement de l'ARN est donc un premier point limitant la maturation du pri-miARN. Il est régi par des codes stricts pour que la tige boucle contenant les miARN soit maturée de façon optimale (Burke et al., 2014; Choudhury and Michlewski, 2012; Zeng and Cullen, 2005; Zeng et al., 2005).

Un transcrite primaire peut contenir une ou plusieurs tiges-boucles codant des miARN. Dans ce dernier cas, il se pose donc la question de co-régulation (Baskerville and Bartel, 2005; Ryazansky et al., 2011; Saini et al., 2007, 2008). Par exemple, il existe des co-facteurs

spécifiques de miARN qui permettent de modifier l'efficacité de clivage individuellement (Davis and Hata, 2009; Newman and Hammond, 2010). Mon travail de thèse s'est focalisé sur ces deux aspects, par l'étude du cluster de miARN du KSHV.

Les miARN du KSHV sont tous codés à partir d'un même transcrit primaire (pri-miARN). Nos expériences de quantifications par banques de petits ARN et northern blots quantitatifs nous ont montré que ces miARN s'accumulaient de façon différentielle entre eux et entre lignées cellulaires, suggérant une régulation post-transcriptionnelle et spécifique à chacun des miARN.

Nous avons dans un premier temps réalisé des expériences de knock-down de Drosha pour confirmer le rôle de l'enzyme dans la maturation des miARN. Nous avons pu confirmer un rôle de Drosha pour les pré-miARN du KSHV, où seule la diminution de miR-K1 mature n'est pas flagrante. Ceci pourrait s'expliquer par la localisation du miARN sur l'ARN ou par une forte affinité de Drosha pour le miARN.

A. Rôle de la structure secondaire et de la position des tiges-boucles codant les miARN du KSHV

Nous avons, dans un premier temps, voulu déterminer les critères importants pour un clivage efficace. Puis nous avons recensé l'absence ou la présence de chacun de ces critères pour les différentes tiges-boucles codant les miARN du KSHV, afin de voir si nous avons une corrélation entre structure secondaire optimale et abondance du miARN. Enfin, nous avons analysé l'effet de la position des tiges-boucles contenant les miARN dans le cluster.

I. Conclusions

En comparant la présence et la longueur des segments flanquants, la présence d'une tige parfaite de 11 nucléotides avant le duplex du miARN et la taille de la boucle terminale, nous avons obtenu une corrélation pour tous les miARN entre structure secondaire optimale et abondance du miARN. Le repliement de la tige-boucle serait ainsi déterminant pour l'abondance des miARN où la plateforme de reconnaissance pour DGCR8 (jonction tige-

segment flanquant) est un élément clé. La boucle terminale est décisive dans cette interaction, tout comme la présence des segments flanquants. En plus du repliement, la position de la tige-boucle au sein du long transcrit influencerait l'efficacité de clivage.

Ainsi, par exemple, miR-K3, -K6 et -K11 sont très bien maturés et possèdent une structure secondaire optimale, en revanche miR-K2 et -K5 sont très peu abondants et possèdent une structure sous optimale. Les expériences d'échange de tiges-boucles dans le cluster confirment que l'environnement autour de miR-K5 et miR-K9 défavorise leur expression. D'autres facteurs pourraient se lier pour recruter Drosha/DGCR8 à proximité d'une tige-boucle non accessible ou induire des changements structuraux.

Les régions inter-miARN contiennent de nombreuses tiges-boucles. En recherchant les critères qui définissent une tige-boucle optimale pour la synthèse d'un miARN, nous avons pu voir que leurs structures secondaires sont sous-optimales. Cependant, ces tiges-boucles pourraient constituer des éléments régulateurs, où DGCR8 se lierait sans mener à une production de miARN mature. Ainsi la concentration de DGCR8 disponible serait modulée.

II. Perspectives des expériences

Les expériences de SHAPE utilisaient comme matrice un ARN transcrit *in vitro*, nu, et donc sans la présence de co-facteurs influant sur le repliement. Pour se rapprocher des conditions naturelles de repliement on pourrait envisager d'initier du SHAPE *in vivo* (Spitale et al., 2013). Pour cela il faudrait effectuer un knock-down de Drosha pour obtenir une quantité suffisante de pri-miARN. Certaines régions soumises à des variations de structure pourraient ainsi être analysées, comme la tige-boucle du miR-K4, que l'on suppose capable de réarrangements structuraux pour former une structure secondaire alternative optimale pour le clivage par Drosha.

Par les expériences de banques de petits ARN nous avons vu qu'il existe de nombreux isomiRs. Il serait également intéressant de vérifier leur activité avec une cible artificielle et de la comparer au miARN de référence. De même pour les moRs ou les ARN antisens.

B. Variations d'efficacité du clivage du pri-miARN intronique du KSHV par Drosha

Suite à la détermination de la structure secondaire du cluster de miARN du KSHV nous nous sommes focalisés sur l'étape de maturation par Drosha. Pour cela, nous avons effectué des tests de maturation *in vitro* pour analyser le mécanisme de clivage plus en détail. Les premières expériences de maturation *in vitro* par Drosha du pri-miARN intronique du KSHV sont encourageantes et nous montrent que l'efficacité de clivage est différente pour chacun des pré-miARN. Le profil de coupure des pré-miARN, le délai d'apparition, ainsi que l'abondance finale sont très variables.

I. Conclusions

Lors du test de maturation *in vitro* par Drosha nous obtenons une production de pré-miR-K1 rapide et abondante malgré le fait que lors du test de siARN dirigés contre Drosha la quantité de miR-K1 ne diminuait pas de façon flagrante. Ceci confirme que Drosha possède un rôle dans sa maturation.

Les résultats expérimentaux corrélerent avec le modèle mathématique proposant qu'un pri-miARN ne permette la synthèse que de quelque pré-miARN. La variation d'efficacité de maturation entre pré-miARN est évidente où certains sont rapidement excisés à un taux d'accumulation élevé (pré-miR-K3, -K1 et -K8) et inversement certains sont plus lents et semblent nécessiter un délai avant les premières coupures et l'accumulation du pré-miARN (pré-miR-K2, -K5, -K6 et -K7). Nous constatons une corrélation entre rapidité de maturation et abondance finale du pré-miARN. Cependant, les pré-miARN les plus abondants et rapidement clivés dans les expériences de maturation *in vitro*, ne sont pas forcément les plus abondants dans les expériences de banques de petits ARN et de northern blots quantitatifs à partir d'extraits cellulaires infectés. Nous avons pu voir que le profil d'expression entre miARN varie d'une souche cellulaire à une autre. Ainsi l'utilisation de cellule HEK pour préparer l'extrait enzymatique pourrait induire des variations de clivage comparées aux conditions naturelles d'infection. De plus, les étapes suivant la maturation par Drosha jouent également un rôle dans la régulation de l'abondance des miARN (tel que la maturation par Dicer, le chargement dans le complexe RISC, l'efficacité de ciblage ou le recyclage du miARN).

Le profil de clivage montre différents ARN coupés, certains très proches de la taille du pré-miARN naturel et d'autres ressemblant plus à des clivages abortifs. Ces dernières formes pourraient expliquer la faible abondance de certains miARN matures. Ces formes alternatives de clivages sont moins visibles dans le cas d'un extrait total. De plus, l'efficacité de clivage est moindre en condition *in vitro* par rapport aux conditions d'expression naturelle. Ainsi dans ces dernières, l'accumulation des formes alternatives est peut être régulée. Le rôle de la structure secondaire de la tige-boucle est très important pour la formation de coupures alternatives. En effet, nos expériences de SHAPE indiquent que les pré-miR-K1, -K5, -K7, -K4 et -K8 ne possèdent pas de segments flanquants et présentent des formes alternatives de coupure. Ainsi le microprocesseur pourrait reconnaître la jonction simple-brin/double brin avec une plus faible efficacité ou induire des clivages abortifs. De même pré-miR-K3, -K6 et -K11 sont les mieux structurés et ces pré-miARN ne possèdent pas de formes alternatives beaucoup plus longues ou courtes. Enfin, pré-miR-K6 et -K7 nécessitent peut-être un premier clivage dans le pri-miARN pour être maturés. *In vitro*, les concentrations à utiliser peuvent être plus importantes qu'*in vivo*. Mais les conditions expérimentales n'ont pas permis d'obtenir plus de protéines pures.

Le clivage par Drosha peut avoir lieu co-transcriptionnellement ou lors de l'épissage. Comme l'on détecte les bornes de l'intron dans le cas du KSHV l'excision ne se fait pas co-transcriptionnellement. Le fait d'incuber un transcrit déjà épissé avec les enzymes de maturation peut également être différent de la condition naturelle et induire des biais.

Au niveau de la régulation, la présence et le clivage de tiges-boucles autres que celles contenant les miARN peuvent servir d'éléments régulateurs. Elles peuvent constituer soit un produit résiduel de coupure ou soit un produit résultant d'une vraie coupure par Drosha dans la boucle et donc être des éléments régulateurs.

II. Perspectives

Afin de déterminer au mieux le rôle de Drosha, il serait intéressant de tester l'expression des pré-miARN dans le cas d'un double knock-down de Drosha et de Dicer ou lors d'une expérience de maturation *in vitro* où l'extrait cellulaire serait déplété de Drosha et Dicer afin de ne quantifier que la forme pré-miARN.

Il serait également intéressant d'effectuer un gradient de concentration de microprocesseur immunoprécipité à un temps unique, et de voir si le profil de clivage devient plus précis avec plus d'enzyme et à quel stade la réaction n'évolue plus. De même évaluer l'effet de l'ajout de

Fer dans la réaction sur l'efficacité de maturation des pré-miARN nous permettra de définir dans quelles conditions le clivage est optimal.

Concernant les formes alternatives dans le profil de coupure, les bandes pourraient être purifiées et séquencées afin de déterminer leurs bornes.

Les mutants de structure pourront être soumis aux tests de maturation *in vitro* en comparaison au cluster non muté. Nous pourrons ainsi observer des différences de maturation en lien avec la structure secondaire (mutants de miR-K2 ou mutants de position comme lors de l'échange de miR-K6 et -K9) et ainsi confirmer l'importance de cette dernière pour le clivage par Drosha.

Nous effectuerons le même test avec Dicer, en utilisant l'extrait clivé par Drosha, pour voir si la production de miARN est efficace et si l'abondance et l'efficacité de clivage du miARN corrélient avec l'abondance du pré-miARN.

Nous pourrons tenter de donner un ordre de clivage pour les miARN en déterminant les sites de coupures, ceci grâce à un gradient de concentration de Drosha clivant le pri-miARN, les formes ARN produites seront révélées par rétro-transcription avec les amorces de SHAPE. Les sites de coupures seront identifiés par électrophorèse à capillaire associé à SHAPEFinder au cours de leur apparition. Des premières expériences test ont été réalisées mais le profil de clivage est pour le moment difficilement interprétable dû à la quantité de pics présents. Il faudra déterminer les doses de microprocesseur minimales pour n'avoir que très peu de coupures des pri-miARN.

Des tests de maturation *in vitro* avec comme séquence d'ARN les tiges-boucles ne codant pas de miARN pourraient être réalisés puis analysés par northern blots afin de vérifier si le microprocesseur clive ces séquences ARN. De même des tests de gel-retard pourront être effectués pour détecter la liaison de DGCR8 à l'ARN.

Un mutant catalytique de Drosha permettrait de vérifier et d'analyser la liaison du microprocesseur sur les tiges-boucles codant des miARN ou non.

C. Identifications de protéines modulant la maturation des miARN introniques du KSHV

Pour les expériences de chromatographie d'affinité, des séquences contenant des miARN d'intérêt ont été liées à des billes d'agarose à leur extrémité 3', et incubées avec un extrait cellulaire total. Les protéines ont ensuite été purifiées et caractérisées par spectrométrie

de masse. Les expériences de chromatographies d'affinité nous ont permis d'identifier des protéines susceptibles d'avoir une action sur la maturation des miARN du KSHV. Nous avons choisi trois candidats, miR-K4 susceptible de subir un réarrangement structural, miR-K5 qui s'exprime très faiblement et miR-K11 qui s'exprime différemment suivant les lignées cellulaires.

I. Conclusions

Le choix de cette technique porte sur le fait qu'il existe peu de biais expérimentaux lors de la chromatographie et de la spectrométrie de masse. Elle permet d'identifier des protéines sans connaissance préalable. Cependant, nous avons beaucoup de bruit de fond dans nos échantillons et, des protéines peu abondantes ou se liant faiblement aux candidats ne seront pas forcément détectées. Nos expériences de chromatographie d'affinité sont devenues plus spécifiques et plus propres avec des améliorations au niveau des conditions de lavage. L'utilisation d'une référence tel que let-7, dont les protéines de liaison et de régulation sont connues (LIN-28B associé à TUT-4 et TUT-7 ainsi que Dis3l2) a permis de confirmer que les expériences ont fonctionné: les ARN sont bien repliés en tige-boucle et l'extrait cellulaire est actif et les protéines abondantes.

SL-miR-K4 se lie à des protéines (NOP56, NOP58 et Fibrillarine) connues pour leur implication dans la biogenèse des snoARN. Il existe une possible relation évolutive entre snoARN et les pré-miARN, où les sno-ARN seraient des précurseurs de certains miARN. Cependant, la recherche de motif spécifique de sno-ARN à partir de logiciels bio-informatiques indique que la tige-boucle du miR-K4 ne correspond pas au sno-ARN typique. De plus, le faible nombre de spectres obtenus et la présence des protéines dans les billes seules lors de l'une de nos expériences tempère la relevance de cette interaction.

Il existe des polymorphismes de séquence pour miR-K4, -K5 et -K11 et nous avons retrouvé une forme possiblement éditée de miR-K4 dans les résultats des banques. Les expériences de chromatographie d'affinité ont confirmé la liaison de l'enzyme d'édition ADAR sur ce candidat mais aussi sur miR-K5 et miR-K11.

Les expériences menées avec miR-K5 n'ont pas permis de mettre en évidence de complexes protéiques spécifiques ou de protéines se liant uniquement à miR-K5. Cependant nous avons vu que LIN-28B (régulateur négatif), se lie à la tige-boucle et cela pourrait expliquer sa faible accumulation. Dans ce cas FUS et hnRNP A1 auraient un rôle de régulateur négatif pour miR-

K5, au contraire des exemples décrits dans la littérature. En effet, FUS est une protéine de liaison à l'ARN connue pour stimuler la maturation de miARN qui recrute Drosha co-transcriptionnellement. hnRNPA1 est un régulateur multifonctionnel qui se lie aux boucles terminales des pri-miARN et peut réarranger la structure secondaire et faciliter la maturation par Drosha, comme c'est le cas pour pri-miR-18a (Michlewski et al., 2010; Morlando et al., 2012).

Enfin, un spectre pour p53 lié spécifiquement à miR-K11 est détecté. p53 est connue pour se lier à p68 et Drosha et favoriser la maturation du pri-miARN, et son identification pourrait expliquer en partie l'abondance de ce miARN (Newman and Hammond, 2010)

Des protéines régulant l'activité des miARN ont été identifiées. STAU1 et STAU2 se lient à tous les candidats, se sont des protéines de liaison de l'ARN double brin qui jouent un rôle dans le contrôle de la traduction des ARNm en les dégradant. Plus récemment il a été démontré que les protéines STAU formaient des complexes pouvant réguler la fonction des miARN *in vivo* (Hillebrand et al., 2007). De même, la poly(A)-binding protein 4, une protéine cytoplasmique qui permet la déadénylation des miARN s'associe à RISC et Ago et contrôle la répression traductionnel des ARNm et donc l'activité des miARN (Moretti et al., 2012).

II. Perspectives

Les chromatographies d'affinité de SL-miR-K5 et SL- miR-K11 devront être répétées afin de valider les possibles interactions que nous avons identifiées. Nous aimerions avoir une plus grande spécificité lors de l'étape de chromatographie d'affinité, et stabiliser les interactions entre protéines et ARN dans le cas de liaisons labiles. Une étape de cross-linking sera ajoutée afin de stabiliser les complexes labiles comme dans le cas du microprocesseur. Afin d'affiner les protéines retenues et d'être plus sélectif, les chromatographies d'affinité pourront être réalisées couplé à une dégradation aux RNases T1 et A. Ainsi seules les protéines en liaison avec l'ARN seront libérées suite à la digestion par les RNases de l'ARN non protégé et lié aux billes. Ceci permettra de ne garder que les protéines spécifiques.

Les mêmes expériences pourraient être effectuées avec des tiges-boucles ne codant pas les miARN afin de déterminer si des protéines régulant négativement la production de miARN sont fixées. De même ces expériences seront effectuées à nouveau avec des mutations dans la séquence des candidats.

Un extrait cellulaire de type DG-75 permettra de voir s'il existe des co-facteurs spécifiques expliquant l'absence d'expression de miR-K11 dans cette lignée cellulaire.

Les expériences devront être validées par des tests fonctionnels comme des knock-down ou des test de surexpression des protéines candidates, afin de voir leur effet sur les miARN d'intérêt.

Enfin, pêcher les complexes ARN/protéines *in vivo* représente un challenge. Ceci pourra être réalisé en transfectant un ARN couplé à son extrémité 3' avec une biotine suivit d'une chromatographie d'affinité biotine/ streptavidine. Les protéines retenues seront ensuite analysées par spectrométrie de masse.

D. Conclusions et perspectives générales

Un tableau récapitulatif des résultats des différentes expériences permet d'avoir une vision globale du rôle de la structure secondaire, de la position de la tige-boucle dans le cluster associé à l'efficacité de clivage par Drosha, aux potentiels co-facteurs, au rôle du miARN et à leurs variations de séquences.

D'après ce tableau nous pouvons tirer des conclusions pour certains miARN.

Ainsi, miR-K3 regroupe tous les critères pour une bonne maturation. Il est retrouvé de façon abondante et possède des rôles multiples et importants pour le virus (stabilisation de la latence et inhibition de l'apoptose) (Gottwein, 2012). Ceci tend à confirmer l'hypothèse qu'un miARN avec des fonctions importantes est favorablement mûré et exprimé. A l'inverse, miR-K2 ne possède aucun critère pour une bonne maturation et aucune fonction n'est décrite à ce jour pour ce miARN. Pré-miR-K2 nécessite un délai de coupure lors des tests de maturation *in vitro*, son accessibilité ou sa structure faisant peut être défaut pour une bonne maturation. Il pourrait donc être en évolution et en phase de sélection n'ayant acquis aucune cible précise pour le moment. La localisation du miR-K2, adjacent au miR-K3 pourrait favoriser son évolution.

miR-K4 est abondant, cependant il ne possède pas une structure secondaire optimale. Nous supposons l'action de co-facteurs induisant un réarrangement structural. Nous pouvons voir lors des tests de maturation *in vitro*, que dans le cas l'immunoprécipitation du microprocesseur, le profil possède des formes alternatives de clivage. Ceci confirme la possibilité de structures alternatives. La séquence du miR-K4 est éditée et lors des

expériences d'identification de protéines nous avons retrouvé la protéine d'édition ADAR liée au miARN.

miR-K5 se situe dans une région délétère pour son expression et d'après les profils de maturation *in vitro*, ce miARN nécessite un délai de clivage. De même, son efficacité de maturation est variable avec l'extrait total, la structure du pré-miARN pourrait être instable.

miR-K11 est abondant, possède les critères requis pour une bonne maturation et une fonction importante. Cependant dans la lignée artificielle DG75-K10-12 ce miARN n'est pas exprimé. Certains co-facteurs potentiels ont été identifiés comme p53 pouvant moduler son expression. Pré-miR-K9 ne semble avoir un délai de clivage qu'en présence de l'extrait cellulaire. Ceci signifie la présence de cofacteurs potentiels qui retarderaient sa maturation.

Enfin, miR-K1 possède une structure secondaire optimale et lors du test de maturation *in vitro* le pré-miARN s'accumule rapidement et de façon abondante en comparaison à la quantification absolue où miR-K1 se retrouve finalement peu exprimé en conditions naturelles d'infection. Son accumulation ne diminue que très faiblement lors du knock-down de Drosha. Une explication pourrait être que comme ce miARN est le premier localisé sur le transcrite primaire il est alors rapidement clivé. Le knock-down n'étant pas efficace à 100% il subsiste une faible proportion de Drosha dans nos cellules. Les enzymes restantes peuvent cliver les miARN de façon préférentielle où seuls les miARN possédant une forte interaction avec Drosha seront maturés (cas supposé de miR-K1). La régulation de son abondance se fait donc par la suite, après le clivage par Drosha. Soit la stabilité du pré-miARN est faible dans l'extrait total et explique pourquoi on détecte le miARN en faible abondance soit les étapes restantes (export, clivage par Dicer et intégration dans le complexe RISC) régulent l'expression de miR-K1.

Il serait intéressant de tester l'ajout de co-facteurs en *trans* lors des tests de maturation *in vitro* par Drosha dans le cas de l'immunoprécipitation et d'analyser les effets sur l'efficacité et l'abondance des pré-miARN. Alternativement, la déplétion de certains co-facteurs de l'extrait cellulaire par siARN pourrait apporter des éléments de réponse.

A plus long terme, les perspectives seront l'étude de l'interaction des miARN avec le virus et plus particulièrement l'effet des miARN sur le cycle viral. Il sera donc intéressant de voir l'effet de mutants de structure du transcrite primaire et de variations de co-facteurs sur : le maintien du virus dans la cellule hôte, la balance entre phase lytique et latente, et enfin sur la production de particules virales. En effet, lors de la phase de latence, le KSHV se maintient dans la cellule hôte sous forme d'épisome lié et non intégré à l'ADN cellulaire. Pour cela

nous pourrons comparer le nombre d'épisomes viraux en conditions natives et avec différents mutants. Les phases lytique et latente seront identifiées soit par western blot grâce à la présence de protéines spécifiques de chacune de ces phases, soit par immunofluorescence par l'utilisation d'un virus KSHV recombinant exprimant la GFP pendant la phase lytique. Pour finir, la production virale sera mesurée par des expériences d'infections et de PCR quantitative.

Les différents projets menés au cours de ma thèse ont permis d'une part de confirmer l'importance et d'autre part de définir plus précisément le rôle de la structure secondaire de l'ARN lors de la première étape de maturation des miARN. Le KSHV codant ses propres miARN et ces derniers étant localisés en cluster, nous avons pu, grâce à ce cas complexe, commencer l'étude cinétique de leur maturation où la position, l'affinité et le rôle de co-facteurs s'associent à la structure secondaire pour leur bonne maturation.

L'interaction entre le virus et l'hôte est étroite et spécifique puisque le virus utilise les constituants cellulaires pour son fonctionnement ainsi que pour la production et l'action de ses propres miARN. Ces étapes sont dépendantes de protéines virales et cellulaires et l'identification de ces dernières pour la synthèse des miARN viraux, initiée dans le dernier projet, permettra de comprendre le réseau de régulation entre le KSHV et les cellules humaines ainsi que les différentes pathologies associées au virus et découlant de l'action des miARN.

	miARN	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K11
Abondance		-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Structure secondaire	générale	+	-	++	+	-	++	+	/	-	+
	segments flanquants	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
	boucle terminale	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Importance de la position					-	+			-	+	
siDrosha		-	+	++	+	++	/	++	/		+
Maturation in vitro	extrait cellulaire										
	abondance finale	++	-	++	+	+	+	-	+	+	+
	cinétique k1	++	-	++	+	+	+	-	+	+	+
	profil		délai				délai	délai			délai possible
	clivage alternatif		+		+				+		
IP Drosha/ DGCR8											
profil		délai	+	+	délai	+				+	
clivage alternatif	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Co-facteurs spécifiques					+						+
Séquences											
	polymorphisme de séquence autres formes (moRs/AS)	+	U		A>G 3p et C>U 5p	(+) dans BC-1				(-) dans BC-3	(-) dans DG-75
	homologue de miARN cellulaire			+	+	+	+	+	+		+

?

Tableau récapitulatif. Légendes. **Abondance** ((+) = optimale, (-) = sous-optimale) ; **Structure secondaire** : générale ((+) = présence, (-) = absence) - segments flanquants et boucle terminale ((+) = optimale, (-) = sous-optimale) ; **Importance de la position** ((+) = position favorable, (-) = position défavorable) ; **siDrosha** (++) = impact important, (+) = impact non négligeable, (-) = impact mitigé) ; **Maturation in vitro extrait cellulaire – abondance finale** ((+) = abondant, (-) = peu abondant) - cinétique k1 (++) = cinétique rapide, (+) = cinétique efficace, (-) = cinétique lente) – profil (délai : clivage retardé par rapport aux autres miARN) - clivage alternatif ((+) = présence de formes alternatives) ; **Maturation in vitro IP Drosha/DGCR8** – profil (délai : clivage retardé par rapport aux autres miARN) ; clivage alternatif ((+) = présence de formes alternatives) ; **Co-facteur spécifiques** ((+) = présence de co-facteurs spécifiques) ; **Séquences** : polymorphisme de séquence ((+) = surexpression, (-) diminution) - autres formes (moRs/AS) ((+) = présence de formes ARN différentes) - homologue de miARN cellulaire ((+) = homologue des miARN cellulaires).

BIBLIOGRAPHIE

Aboobaker, A.A., Tomancak, P., Patel, N., Rubin, G.M., and Lai, E.C. (2005). *Drosophila* microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18017–18022.

Afanasyeva, E.A., Mestdagh, P., Kumps, C., Vandesompele, J., Ehemann, V., Theissen, J., Fischer, M., Zapatka, M., Brors, B., Savelyeva, L., et al. (2011). MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. *Cell Death Differ.* *18*, 974–984.

Agranat-Tamir, L., Shomron, N., Sperling, J., and Sperling, R. (2014). Interplay between pre-mRNA splicing and microRNA biogenesis within the supraspliceosome. *Nucleic Acids Res.* *42*, 4640–4651.

Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T., and Margalit, H. (2005). Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2697–2706.

An, F.-Q., Folarin, H.M., Compitello, N., Roth, J., Gerson, S.L., McCrae, K.R., Fakhari, F.D., Dittmer, D.P., and Renne, R. (2006). Long-term-infected telomerase-immortalized endothelial cells: a model for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency in vitro and in vivo. *J. Virol.* *80*, 4833–4846.

Antman, K., and Chang, Y. (2000). Kaposi's sarcoma. *N. Engl. J. Med.* *342*, 1027–1038.

Aoki, Y., Jaffe, E.S., Chang, Y., Jones, K., Teruya-Feldstein, J., Moore, P.S., and Tosato, G. (1999). Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6. *Blood* *93*, 4034–4043.

Arvanitakis, L., Geras-Raaka, E., Varma, A., Gershengorn, M.C., and Cesarman, E. (1997). Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* *385*, 347–350.

Bagn eris, C., Ageichik, A.V., Cronin, N., Wallace, B., Collins, M., Boshoff, C., Waksman, G., and Barrett, T. (2008). Crystal structure of a vFlip-IKKgamma complex: insights into viral activation of the IKK signalosome. *Mol. Cell* *30*, 620–631.

Bais, C., Santomasso, B., Coso, O., Arvanitakis, L., Raaka, E.G., Gutkind, J.S., Asch, A.S., Cesarman, E., Gershengorn, M.C., Mesri, E.A., et al. (1998). G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* *391*, 86–89.

Ballestas, M.E., Chatis, P.A., and Kaye, K.M. (1999). Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* *284*, 641–644.

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.
- Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA N. Y. N* 11, 241–247.
- Bates, G.J., Nicol, S.M., Wilson, B.J., Jacobs, A.-M.F., Bourdon, J.-C., Wardrop, J., Gregory, D.J., Lane, D.P., Perkins, N.D., and Fuller-Pace, F.V. (2005). The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *EMBO J.* 24, 543–553.
- Bechtel, J., Grundhoff, A., and Ganem, D. (2005a). RNAs in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 79, 10138–10146.
- Bechtel, J.T., Winant, R.C., and Ganem, D. (2005b). Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 79, 4952–4964.
- Bellare, P., and Ganem, D. (2009). Regulation of KSHV lytic switch protein expression by a virus-encoded microRNA: an evolutionary adaptation that fine-tunes lytic reactivation. *Cell Host Microbe* 6, 570.
- Berezikov, E. (2011). Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat. Rev. Genet.* 12, 846–860.
- Berezikov, E., Robine, N., Samsonova, A., Westholm, J.O., Naqvi, A., Hung, J.-H., Okamura, K., Dai, Q., Bortolamiol-Becet, D., Martin, R., et al. (2011). Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence. *Genome Res.* 21, 203–215.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.
- Biggar, R.J., Whitby, D., Marshall, V., Linhares, A.C., and Black, F. (2000). Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J. Infect. Dis.* 181, 1562–1568.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA N. Y. N* 10, 185–191.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101.
- Boshoff, C., and Chang, Y. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a new DNA tumor virus. *Annu. Rev. Med.* 52, 453–470.
- Boshoff, C., Endo, Y., Collins, P.D., Takeuchi, Y., Reeves, J.D., Schweickart, V.L., Siani, M.A., Sasaki, T., Williams, T.J., Gray, P.W., et al. (1997). Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science* 278, 290–294.
- Boshoff, C., Gao, S.J., Healy, L.E., Matthews, S., Thomas, A.J., Coignet, L., Warnke, R.A., Strauchen, J.A., Matutes, E., Kamel, O.W., et al. (1998). Establishing a KSHV+ cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterizing its growth in Nod/SCID mice. *Blood* 91,

1671–1679.

Boyerinas, B., Park, S.-M., Hau, A., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *17*, F19–F36.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* *3*, e85.

Brown, J.W.S., Marshall, D.F., and Echeverria, M. (2008). Intronic noncoding RNAs and splicing. *Trends Plant Sci.* *13*, 335–342.

Bruce, A.G., Bakke, A.M., Bielefeldt-Ohmann, H., Ryan, J.T., Thouless, M.E., Tsai, C.-C., and Rose, T.M. (2006). High levels of retroperitoneal fibromatosis (RF)-associated herpesvirus in RF lesions in macaques are associated with ORF73 LANA expression in spindleoid tumour cells. *J. Gen. Virol.* *87*, 3529–3538.

Brudecki, L., Ferguson, D.A., McCall, C.E., and El Gazzar, M. (2013). MicroRNA-146a and RBM4 form a negative feed-forward loop that disrupts cytokine mRNA translation following TLR4 responses in human THP-1 monocytes. *Immunol. Cell Biol.* *91*, 532–540.

Brulois, K.F., Chang, H., Lee, A.S.-Y., Ensser, A., Wong, L.-Y., Toth, Z., Lee, S.H., Lee, H.-R., Myoung, J., Ganem, D., et al. (2012). Construction and manipulation of a new Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus Bacterial artificial chromosome clone. *J. Virol.*

Burke, J.M., Kelenis, D.P., Kincaid, R.P., and Sullivan, C.S. (2014). A central role for the primary microRNA stem in guiding the position and efficiency of Drosha processing of a viral pri-miRNA. *RNA N. Y. N* *20*, 1068–1077.

Cai, X., and Cullen, B.R. (2006). Transcriptional Origin of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus MicroRNAs. *J. Virol.* *80*, 2234–2242.

Cai, Q., Verma, S.C., Lu, J., and Robertson, E.S. (2010). Molecular biology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related oncogenesis. *Adv. Virus Res.* *78*, 87–142.

Cai, X., Lu, S., Zhang, Z., Gonzalez, C.M., Damania, B., and Cullen, B.R. (2005). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 5570–5575.

Caramuta, S., Lee, L., Özata, D.M., Akçakaya, P., Georgii-Hemming, P., Xie, H., Amini, R.-M., Lawrie, C.H., Enblad, G., Larsson, C., et al. (2013). Role of microRNAs and microRNA machinery in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J.* *3*, e152.

Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., and Hannon, G.J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* *16*, 2733–2742.

Cesarman, E., Moore, P.S., Rao, P.H., Inghirami, G., Knowles, D.M., and Chang, Y. (1995). In vitro establishment and characterization of two acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences. *Blood* *86*, 2708–2714.

Chandran, B. (2010). Early events in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of

target cells. *J. Virol.* *84*, 2188–2199.

Chang, H., Wachtman, L.M., Pearson, C.B., Lee, J.-S., Lee, H.-R., Lee, S.H., Vieira, J., Mansfield, K.G., and Jung, J.U. (2009a). Non-Human Primate Model of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *PLoS Pathog.* *5*.

Chang, H.-M., Triboulet, R., Thornton, J.E., and Gregory, R.I. (2013). A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway. *Nature* *497*, 244–248.

Chang, T.-C., Zeitels, L.R., Hwang, H.-W., Chivukula, R.R., Wentzel, E.A., Dews, M., Jung, J., Gao, P., Dang, C.V., Beer, M.A., et al. (2009b). Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3384–3389.

Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* *266*, 1865–1869.

Chang, Y., Moore, P.S., Talbot, S.J., Boshoff, C.H., Zarkowska, T., Godden-Kent, null, Paterson, H., Weiss, R.A., and Mittnacht, S. (1996). Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature* *382*, 410.

Chawla, G., and Sokol, N.S. (2014). ADAR mediates differential expression of polycistronic microRNAs. *Nucleic Acids Res.* *42*, 5245–5255.

Chen, J., Ye, F., Xie, J., Kuhne, K., and Gao, S.-J. (2009). Genome-wide identification of binding sites for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic switch protein, RTA. *Virology* *386*, 290–302.

Chen, J.-F., Mandel, E.M., Thomson, J.M., Wu, Q., Callis, T.E., Hammond, S.M., Conlon, F.L., and Wang, D.-Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* *38*, 228–233.

Choudhury, N.R., and Michlewski, G. (2012). Terminal loop-mediated control of microRNA biogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 789–793.

Cuperus, J.T., Fahlgren, N., and Carrington, J.C. (2011). Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. *Plant Cell Online* *23*, 431–442.

Davis, B.N., and Hata, A. (2009). Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun. Signal.* *7*, 18.

Deigan, K.E., Li, T.W., Mathews, D.H., and Weeks, K.M. (2009). Accurate SHAPE-directed RNA structure determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 97–102.

Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231–235.

Diederichs, S., and Haber, D.A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* *131*, 1097–1108.

Dittmer, D.P., and Damania, B. (2013). Kaposi sarcoma associated herpesvirus pathogenesis

(KSHV) - an update. *Curr. Opin. Virol.* 3, 238–244.

Dittmer, D., Stoddart, C., Renne, R., Linquist-Stepps, V., Moreno, M.E., Bare, C., McCune, J.M., and Ganem, D. (1999). Experimental transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) to SCID-hu Thy/Liv mice. *J. Exp. Med.* 190, 1857–1868.

Dittmer, D.P., Richards, K.L., and Damania, B. (2012). Treatment of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-associated cancers. *Front. Microbiol.* 3, 141.

Duprez, R., Lacoste, V., Brière, J., Couppié, P., Frances, C., Sainte-Marie, D., Kassa-Kelembho, E., Lando, M.-J., Essame Oyono, J.-L., Nkegoum, B., et al. (2007). Evidence for a multiclonal origin of multicentric advanced lesions of Kaposi sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1086–1094.

Eltom, M.A., Jemal, A., Mbulaiteye, S.M., Devesa, S.S., and Biggar, R.J. (2002). Trends in Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma incidence in the United States from 1973 through 1998. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 1204–1210.

Faller, M., Toso, D., Matsunaga, M., Atanasov, I., Senturia, R., Chen, Y., Zhou, Z.H., and Guo, F. (2010). DGCR8 recognizes primary transcripts of microRNAs through highly cooperative binding and formation of higher-order structures. *RNA N. Y. N* 16, 1570–1583.

Finnegan, E.F., and Pasquinelli, A.E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, 51–68.

Franceschi, S., and Serraino, D. (1995). Kaposi's sarcoma and KSHV. *Lancet* 346, 1360–1361.

Friborg, J., Kong, W., Hottiger, M.O., and Nabel, G.J. (1999). p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* 402, 889–894.

Friedländer, M.R., Lizano, E., Houben, A.J., Bezdan, D., Bález-Coronel, M., Kudla, G., Mateu-Huertas, E., Kagerbauer, B., González, J., Chen, K.C., et al. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol.* 15, R57.

Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., et al. (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat. Cell Biol.* 9, 604–611.

Fuller-Pace, F.V., and Ali, S. (2008). The DEAD box RNA helicases p68 (Ddx5) and p72 (Ddx17): novel transcriptional co-regulators. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 609–612.

Ganem, D. (2007). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. In *Fields Virology*, D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, eds. (Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 2847–2888.

Gagnon, K.T., Biswas, S., Zhang, X., Brown, B.A., Wollenzien, P., Mattos, C., and Maxwell, E.S. (2012). Structurally Conserved Nop56/58 N-terminal Domain Facilitates Archaeal Box

- C/D Ribonucleoprotein-guided Methyltransferase Activity. *J. Biol. Chem.* 287, 19418–19428.
- Gaidano, G., Capello, D., Cilia, A.M., Gloghini, A., Perin, T., Quattrone, S., Migliazza, A., Lo Coco, F., Saglio, G., Ascoli, V., et al. (1999). Genetic characterization of HHV-8/KSHV-positive primary effusion lymphoma reveals frequent mutations of BCL6: Implications for disease pathogenesis and histogenesis. *Genes. Chromosomes Cancer* 24, 16–23.
- Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol. Med.* 12, 580–587.
- Giraldo, G., Beth, E., Coeur, P., Vogel, C.L., and Dhru, D.S. (1972). Kaposi's sarcoma: a new model in the search for viruses associated with human malignancies. *J. Natl. Cancer Inst.* 49, 1495–1507.
- Girard, M., Jacquemin, E., Munnich, A., Lyonnet, S., and Henrion-Caude, A. (2008). miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J. Hepatol.* 48, 648–656.
- Gong, M., Chen, Y., Senturia, R., Ulgherait, M., Faller, M., and Guo, F. (2012). Caspases cleave and inhibit the microRNA processing protein DiGeorge Critical Region 8. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 21, 797–808.
- Gottwein, E. (2012). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus microRNAs. *Front. Microbiol.* 3, 165.
- Gottwein, E., Cai, X., and Cullen, B.R. (2006). A novel assay for viral microRNA function identifies a single nucleotide polymorphism that affects Drosha processing. *J. Virol.* 80, 5321–5326.
- Gottwein, E., Mukherjee, N., Sachse, C., Frenzel, C., Majoros, W.H., Chi, J.-T.A., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Ohler, U., et al. (2007). A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* 450, 1096–1099.
- Gottwein, E., Corcoran, D.L., Mukherjee, N., Skalsky, R.L., Hafner, M., Nusbaum, J.D., Shamulailatpam, P., Love, C.L., Dave, S.S., Tuschl, T., et al. (2011). Viral microRNA targetome of KSHV-infected primary effusion lymphoma cell lines. *Cell Host Microbe* 10, 515–526.
- Gradoville, L., Gerlach, J., Grogan, E., Shedd, D., Nikiforow, S., Metroka, C., and Miller, G. (2000). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50/Rta protein activates the entire viral lytic cycle in the HH-B2 primary effusion lymphoma cell line. *J. Virol.* 74, 6207–6212.
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004a). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004b). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M.A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular

microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537–541.

Grundhoff, A., Sullivan, C.S., and Ganem, D. (2006). A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA N. Y. N* 12, 733–750.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016–3027.

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* 125, 887–901.

Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.-K., Yeom, K.-H., Yang, W.-Y., Haussler, D., Blelloch, R., and Kim, V.N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* 136, 75–84.

Heale, B.S.E., Keegan, L.P., McGurk, L., Michlewski, G., Brindle, J., Stanton, C.M., Caceres, J.F., and O’Connell, M.A. (2009). Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNA pathways. *EMBO J.* 28, 3145–3156.

Heras, S.R., Macias, S., Plass, M., Fernandez, N., Cano, D., Eyraes, E., Garcia-Perez, J.L., and Cáceres, J.F. (2013). The Microprocessor controls the activity of mammalian retrotransposons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1173–1181.

Herbert, K.M., Pimienta, G., DeGregorio, S.J., Alexandrov, A., and Steitz, J.A. (2013). Phosphorylation of DGCR8 increases its intracellular stability and induces a progrowth miRNA profile. *Cell Rep.* 5, 1070–1081.

Hillebrand, J., Barbee, S.A., and Ramaswami, M. (2007). P-body components, microRNA regulation, and synaptic plasticity. *ScientificWorldJournal* 7, 178–190.

Hughes, D.J., Kipar, A., Sample, J.T., and Stewart, J.P. (2010). Pathogenesis of a Model Gammaherpesvirus in a Natural Host. *J. Virol.* 84, 3949–3961.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834–838.

Hutzinger, R., Feederle, R., Mrazek, J., Schiefermeier, N., Balwierz, P.J., Zavolan, M., Polacek, N., Delecluse, H.-J., and Hüttenhofer, A. (2009). Expression and Processing of a Small Nucleolar RNA from the Epstein-Barr Virus Genome. *PLoS Pathog* 5, e1000547.

Isik, M., Korswagen, H.C., and Berezikov, E. (2010). Expression patterns of intronic microRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Silence* 1, 5.

Jalilvand, S., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., Buonaguro, L., Naraghi, Z.S., Shoja, Z., Ziaee, A.-A., Hamkar, R., Shahmahmoodi, S., Nategh, R., et al. (2012). Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 variants in Kaposi’s sarcoma from Iranian patients. *Virus Res.* 163, 644–649.

Jenner, R.G., Albà, M.M., Boshoff, C., and Kellam, P. (2001). Kaposi’s sarcoma-associated

- herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J. Virol.* *75*, 891–902.
- Jenner, R.G., Maillard, K., Cattini, N., Weiss, R.A., Boshoff, C., Wooster, R., and Kellam, P. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10399–10404.
- Jiang, S., Zhang, H.-W., Lu, M.-H., He, X.-H., Li, Y., Gu, H., Liu, M.-F., and Wang, E.-D. (2010). MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.* *70*, 3119–3127.
- Jones, T., Ye, F., Bedolla, R., Huang, Y., Meng, J., Qian, L., Pan, H., Zhou, F., Moody, R., Wagner, B., et al. (2012). Direct and efficient cellular transformation of primary rat mesenchymal precursor cells by KSHV. *J. Clin. Invest.* *122*, 1076–1081.
- Kamanu, T.K.K., Radovanovic, A., Archer, J.A.C., and Bajic, V.B. (2013). Exploration of miRNA families for hypotheses generation. *Sci. Rep.* *3*.
- Kasolo, F.C., Monze, M., Obel, N., Anderson, R.A., French, C., and Gompels, U.A. (1998). Sequence analyses of human herpesvirus-8 strains from both African human immunodeficiency virus-negative and -positive childhood endemic Kaposi's sarcoma show a close relationship with strains identified in febrile children and high variation in the K1 glycoprotein. *J. Gen. Virol.* *79* (Pt 12), 3055–3065.
- Kim, Y.-K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* *26*, 775–783.
- Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. (2005). Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* *120*, 195–208.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* *42*, D68–73.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 597–610.
- Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat. Genet.* *30*, 363–364.
- Lan, K., Kuppers, D.A., Verma, S.C., Sharma, N., Murakami, M., and Robertson, E.S. (2005). Induction of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen by the lytic transactivator RTA: a novel mechanism for establishment of latency. *J. Virol.* *79*, 7453–7465.
- Landthaler, M., Yalcin, A., and Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol. CB* *14*, 2162–2167.
- Lechertier, T., Grob, A., Hernandez-Verdun, D., and Roussel, P. (2009). Fibrillarin and Nop56 interact before being co-assembled in box C/D snoRNPs. *Exp. Cell Res.* *315*, 928–942.
- Lee, Y., and Kim, V.N. (2007). In vitro and in vivo assays for the activity of Drosha complex. *Methods Enzymol.* *427*, 89–106.

- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* *21*, 4663–4670.
- Lei, X., Bai, Z., Ye, F., Huang, Y., and Gao, S.-J. (2010). Regulation of herpesvirus lifecycle by viral microRNAs. *Virulence* *1*, 433–435.
- Lei, X., Zhu, Y., Jones, T., Bai, Z., Huang, Y., and Gao, S.-J. (2012). A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA and its variants target the transforming growth factor β pathway to promote cell survival. *J. Virol.* *86*, 11698–11711.
- Lewis, B.P., Shih, I. -hun., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* *115*, 787–798.
- Li, Z., Ender, C., Meister, G., Moore, P.S., Chang, Y., and John, B. (2012). Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs. *Nucleic Acids Res.* *40*, 6787–6799.
- Lin, Y.-T., and Sullivan, C.S. (2011). Expanding the role of Drosha to the regulation of viral gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11229–11234.
- Lin, Y.-T., Kincaid, R.P., Arasappan, D., Dowd, S.E., Hunicke-Smith, S.P., and Sullivan, C.S. (2010). Small RNA profiling reveals antisense transcription throughout the KSHV genome and novel small RNAs. *RNA N. Y. N* *16*, 1540–1558.
- Liu, L., Eby, M.T., Rathore, N., Sinha, S.K., Kumar, A., and Chaudhary, P.M. (2002). The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the Ikappa B kinase complex. *J. Biol. Chem.* *277*, 13745–13751.
- Lu, S., and Cullen, B.R. (2004). Adenovirus VA1 Noncoding RNA Can Inhibit Small Interfering RNA and MicroRNA Biogenesis. *J. Virol.* *78*, 12868–12876.
- Lu, C.-C., Li, Z., Chu, C.-Y., Feng, J., Feng, J., Sun, R., and Rana, T.M. (2010a). MicroRNAs encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus regulate viral life cycle. *EMBO Rep.* *11*, 784–790.
- Lu, F., Stedman, W., Yousef, M., Renne, R., and Lieberman, P.M. (2010b). Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency by virus-encoded microRNAs that target Rta and the cellular Rbl2-DNMT pathway. *J. Virol.* *84*, 2697–2706.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* *303*, 95–98.
- Lusvarghi, S., Sztuba-Solinska, J., Purzycka, K.J., Rausch, J.W., and Le Grice, S.F.J. (2013). RNA secondary structure prediction using high-throughput SHAPE. *J. Vis. Exp. JoVE* e50243.
- Ma, E., MacRae, I.J., Kirsch, J.F., and Doudna, J.A. (2008). Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J. Mol. Biol.* *380*, 237–243.
- MacFarlane, L.-A., and Murphy, P.R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr. Genomics* *11*, 537–561.

- Macias, S., Plass, M., Stajuda, A., Michlewski, G., Eyras, E., and Cáceres, J.F. (2012). DGCR8 HITS-CLIP reveals novel functions for the Microprocessor. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* *311*, 195–198.
- Mancuso, R., Biffi, R., Valli, M., Bellinvia, M., Turlaki, A., Athanasia, T., Ferrucci, S., Brambilla, L., Delbue, S., Ferrante, P., et al. (2008). HHV8 a subtype is associated with rapidly evolving classic Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.* *80*, 2153–2160.
- Marco, A., Ninova, M., Ronshaugen, M., and Griffiths-Jones, S. (2013). Clusters of microRNAs emerge by new hairpins in existing transcripts. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7745–7752.
- Martin, R.W., 3rd, Hood, A.F., and Farmer, E.R. (1993). Kaposi sarcoma. *Medicine (Baltimore)* *72*, 245–261.
- Martinez, N.J., Ow, M.C., Reece-Hoyes, J.S., Barrasa, M.I., Ambros, V.R., and Walhout, A.J.M. (2008). Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity. *Genome Res.* *18*, 2005–2015.
- Mattioli, C., Pianigiani, G., and Pagani, F. (2013). A competitive regulatory mechanism discriminates between juxtaposed splice sites and pri-miRNA structures. *Nucleic Acids Res.* *41*, 8680–8691.
- McCormick, C., and Ganem, D. (2005). The kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. *Science* *307*, 739–741.
- McGinnis, J.L., Dunkle, J.A., Cate, J.H.D., and Weeks, K.M. (2012). The mechanisms of RNA SHAPE chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 6617–6624.
- Melo, S.A., Roper, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., et al. (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat. Genet.* *41*, 365–370.
- Mesri, E.A., Cesarman, E., and Boshoff, C. (2010). Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 707–719.
- Michlewski, G., Guil, S., Semple, C.A., and Cáceres, J.F. (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol. Cell* *32*, 383–393.
- Michlewski, G., Guil, S., and Cáceres, J.F. (2010). Stimulation of pri-miR-18a processing by hnRNP A1. *Adv. Exp. Med. Biol.* *700*, 28–35.
- Moretti, F., Kaiser, C., Zdanowicz-Specht, A., and Hentze, M.W. (2012). PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 603–608.
- Morlando, M., Dini Modigliani, S., Torrelli, G., Rosa, A., Di Carlo, V., Caffarelli, E., and Bozzoni, I. (2012). FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *EMBO J.* *31*, 4502–4510.

- Mueller, G.A., Miller, M.T., Derose, E.F., Ghosh, M., London, R.E., and Hall, T.M.T. (2010). Solution structure of the Drosha double-stranded RNA-binding domain. *Silence* 1, 2.
- Muralidhar, S., Veytsmann, G., Chandran, B., Ablashi, D., Doniger, J., and Rosenthal, L.J. (2000). Characterization of the human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) oncogene, kaposin (ORF K12). *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 16, 203–213.
- Mutlu, A.D., Cavallin, L.E., Vincent, L., Chiozzini, C., Eroles, P., Duran, E.M., Asgari, Z., Hooper, A.T., La Perle, K.M.D., Hilsher, C., et al. (2007). In vivo-restricted and reversible malignancy induced by human herpesvirus-8 KSHV: a cell and animal model of virally induced Kaposi's sarcoma. *Cancer Cell* 11, 245–258.
- Nasser, M.W., Datta, J., Nuovo, G., Kutay, H., Motiwala, T., Majumder, S., Wang, B., Suster, S., Jacob, S.T., and Ghoshal, K. (2008). Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J. Biol. Chem.* 283, 33394–33405.
- Neipel, F., Albrecht, J.C., and Fleckenstein, B. (1997). Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity? *J. Virol.* 71, 4187–4192.
- Newman, M.A., and Hammond, S.M. (2010). Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev.* 24, 1086–1092.
- Nicholas, J., Ruvolo, V.R., Burns, W.H., Sandford, G., Wan, X., Ciuffo, D., Hendrickson, S.B., Guo, H.G., Hayward, G.S., and Reitz, M.S. (1997). Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nat. Med.* 3, 287–292.
- Nicholson, A.W. (2014). Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 5, 31–48.
- O'Carroll, D., Mecklenbrauker, I., Das, P.P., Santana, A., Koenig, U., Enright, A.J., Miska, E.A., and Tarakhovsky, A. (2007). A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway. *Genes Dev.* 21, 1999–2004.
- OETTLE, A.G. (1962). Geographical and racial differences in the frequency of Kaposi's sarcoma as evidence of environmental or genetic causes. *Acta - Unio Int. Contra Cancrum* 18, 330–363.
- Orzechowska, B.U., Powers, M.F., Sprague, J., Li, H., Yen, B., Searles, R.P., Axthelm, M.K., and Wong, S.W. (2008). Rhesus macaque rhadinovirus-associated non-Hodgkin lymphoma: animal model for KSHV-associated malignancies. *Blood* 112, 4227–4234.
- Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human micro-RNA generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139, 112–122.
- Parsons, C.H., Adang, L.A., Overvest, J., O'Connor, C.M., Taylor, J.R., Jr, Camerini, D., and Kedes, D.H. (2006). KSHV targets multiple leukocyte lineages during long-term productive infection in NOD/SCID mice. *J. Clin. Invest.* 116, 1963–1973.

- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734–736.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., et al. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* 2, 269–276.
- Piriyapongsa, J., Mariño-Ramírez, L., and Jordan, I.K. (2007). Origin and evolution of human microRNAs from transposable elements. *Genetics* 176, 1323–1337.
- Quick-Cleveland, J., Jacob, J.P., Weitz, S.H., Shoffner, G., Senturia, R., and Guo, F. (2014). The DGCR8 RNA-Binding Heme Domain Recognizes Primary MicroRNAs by Clamping the Hairpin. *Cell Rep.* 7, 1994–2005.
- Radkov, S.A., Kellam, P., and Boshoff, C. (2000). The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat. Med.* 6, 1121–1127.
- Ray, A., Marshall, V., Uldrick, T., Leighty, R., Labo, N., Wyvill, K., Aleman, K., Polizzotto, M.N., Little, R.F., Yarchoan, R., et al. (2012). Sequence analysis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) microRNAs in patients with multicentric Castlemans disease and KSHV-associated inflammatory cytokine syndrome. *J. Infect. Dis.* 205, 1665–1676.
- Regamey, N., Tamm, M., Wernli, M., Witschi, A., Thiel, G., Cathomas, G., and Erb, P. (1998). Transmission of human herpesvirus 8 infection from renal-transplant donors to recipients. *N. Engl. J. Med.* 339, 1358–1363.
- Renne, R., Zhong, W., Herndier, B., McGrath, M., Abbey, N., Kedes, D., and Ganem, D. (1996). Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat. Med.* 2, 342–346.
- Reuter, J.S., and Mathews, D.H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* 11, 129.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14, 1902–1910.
- Roth, B.M., Ishimaru, D., and Hennig, M. (2013). The core microprocessor component DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) is a nonspecific RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 288, 26785–26799.
- Ruocco, E., Ruocco, V., Tornesello, M.L., Gambardella, A., Wolf, R., and Buonaguro, F.M. (2013). Kaposi's sarcoma: etiology and pathogenesis, inducing factors, causal associations, and treatments: facts and controversies. *Clin. Dermatol.* 31, 413–422.
- Russo, J.J., Bohenzky, R.A., Chien, M.-C., Chen, J., Yan, M., Maddalena, D., Parry, J.P., Peruzzi, D., Edelman, I.S., Chang, Y., et al. (1996). Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14862–14867.
- Ryazansky, S.S., Gvozdev, V.A., and Berezikov, E. (2011). Evidence for post-transcriptional regulation of clustered microRNAs in *Drosophila*. *BMC Genomics* 12, 371.

- Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat. Cell Biol.* *10*, 987–993.
- Sabin, L.R., Zhou, R., Gruber, J.J., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., Lau, C.-K., Thompson, C.B., and Cherry, S. (2009). Ars2 regulates both miRNA- and siRNA- dependent silencing and suppresses RNA virus infection in *Drosophila*. *Cell* *138*, 340–351.
- Said, W., Chien, K., Takeuchi, S., Tasaka, T., Asou, H., Cho, S.K., de Vos, S., Cesarman, E., Knowles, D.M., and Koeffler, H.P. (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV or HHV8) in primary effusion lymphoma: ultrastructural demonstration of herpesvirus in lymphoma cells. *Blood* *87*, 4937–4943.
- Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., and Enright, A.J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 17719–17724.
- Saini, H.K., Enright, A.J., and Griffiths-Jones, S. (2008). Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics* *9*, 564.
- Samols, M.A., Hu, J., Skalsky, R.L., and Renne, R. (2005). Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* *79*, 9301–9305.
- Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., and Krueger, L.J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* *67*, 9762–9770.
- Sarid, R., Flore, O., Bohenzky, R.A., Chang, Y., and Moore, P.S. (1998). Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *J. Virol.* *72*, 1005–1012.
- Scott, M.S., and Ono, M. (2011). From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie* *93*, 1987–1992.
- Si, M.-L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., and Mo, Y.-Y. (2006). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* *26*, 2799–2803.
- Skalsky, R.L., Samols, M.A., Plaisance, K.B., Boss, I.W., Riva, A., Lopez, M.C., Baker, H.V., and Renne, R. (2007). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J. Virol.* *81*, 12836–12845.
- Sperber, H., Beem, A., Shannon, S., Jones, R., Banik, P., Chen, Y., Ku, S., Varani, G., Yao, S., and Ruohola-Baker, H. (2014). miRNA sensitivity to Drosha levels correlates with pre-miRNA secondary structure. *RNA N. Y. N* *20*, 621–631.
- Spitale, R.C., Crisalli, P., Flynn, R.A., Torre, E.A., Kool, E.T., and Chang, H.Y. (2013). RNA SHAPE analysis in living cells. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 18–20.
- Staskus, K.A., Zhong, W., Gebhard, K., Herndier, B., Wang, H., Renne, R., Beneke, J., Pudney, J., Anderson, D.J., Ganem, D., et al. (1997). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J. Virol.* *71*, 715–719.

- Suffert, G., Malterer, G., Hausser, J., Viiliäinen, J., Fender, A., Contrant, M., Ivacevic, T., Benes, V., Gros, F., Voinnet, O., et al. (2011). Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis. *PLoS Pathog.* 7, e1002405.
- Sun, R., Lin, S.F., Staskus, K., Gradoville, L., Grogan, E., Haase, A., and Miller, G. (1999). Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J. Virol.* 73, 2232–2242.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., et al. (2004). Reduced Expression of the let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Res.* 64, 3753–3756.
- THIJS, A. (1957). [Kaposi's angiosarcomatosis in the Belgian Congo & Ruanda-Urundi]. *Ann. Société Belge Médecine Trop.* 37, 295–308.
- Thornton, J.E., Chang, H.-M., Piskounova, E., and Gregory, R.I. (2012). Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7). *RNA N. Y. N* 18, 1875–1885.
- Tornesello, M.L., Biryahwaho, B., Downing, R., Hatzakis, A., Alessi, E., Cusini, M., Ruocco, V., Katongole-Mbidde, E., Loquercio, G., Buonaguro, L., et al. (2010). Human herpesvirus type 8 variants circulating in Europe, Africa and North America in classic, endemic and epidemic Kaposi's sarcoma lesions during pre-AIDS and AIDS era. *Virology* 398, 280–289.
- Trabucchi, M., Briata, P., Garcia-Mayoral, M., Haase, A.D., Filipowicz, W., Ramos, A., Gherzi, R., and Rosenfeld, M.G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 459, 1010–1014.
- Tsunetsugu-Yokota, Y., and Yamamoto, T. (2010). Mammalian microRNAs: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Virology* 1, 108.
- Umbach, J.L., and Cullen, B.R. (2010). In-depth analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA expression provides insights into the mammalian microRNA-processing machinery. *J. Virol.* 84, 695–703.
- Ustianenko, D., Hrossova, D., Potesil, D., Chalupnikova, K., Hrazdilova, K., Pachernik, J., Cetkovska, K., Uldrijan, S., Zdrahal, Z., and Vanacova, S. (2013). Mammalian DIS3L2 exoribonuclease targets the uridylylated precursors of let-7 miRNAs. *RNA N. Y. N* 19, 1632–1638.
- Vasa, S.M., Guex, N., Wilkinson, K.A., Weeks, K.M., and Giddings, M.C. (2008). ShapeFinder: a software system for high-throughput quantitative analysis of nucleic acid reactivity information resolved by capillary electrophoresis. *RNA N. Y. N* 14, 1979–1990.
- Vieira, J., O'Hearn, P., Kimball, L., Chandran, B., and Corey, L. (2001). Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus. *J. Virol.* 75, 1378–1386.
- Wabinga, H.R., Parkin, D.M., Wabwire-Mangen, F., and Mugerwa, J.W. (1993). Cancer in Kampala, Uganda, in 1989-91: changes in incidence in the era of AIDS. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 54, 26–36.

- Warner, D.R., Bhattacharjee, V., Yin, X., Singh, S., Mukhopadhyay, P., Pisano, M.M., and Greene, R.M. (2004). Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *324*, 70–76.
- Watts, J.M., Dang, K.K., Gorelick, R.J., Leonard, C.W., Bess, J.W., Swanstrom, R., Burch, C.L., and Weeks, K.M. (2009). Architecture and Secondary Structure of an Entire HIV-1 RNA Genome. *Nature* *460*, 711–716.
- Weitz, S.H., Gong, M., Barr, I., Weiss, S., and Guo, F. (2014). Processing of microRNA primary transcripts requires heme in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1861–1866.
- Whitby, D., Marshall, V.A., Bagni, R.K., Wang, C.D., Gamache, C.J., Guzman, J.R., Kron, M., Ebbesen, P., and Biggar, R.J. (2004). Genotypic characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in asymptomatic infected subjects from isolated populations. *J. Gen. Virol.* *85*, 155–163.
- Wilkinson, K.A., Merino, E.J., and Weeks, K.M. (2006). Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE): quantitative RNA structure analysis at single nucleotide resolution. *Nat. Protoc.* *1*, 1610–1616.
- Wong, S.W., Bergquam, E.P., Swanson, R.M., Lee, F.W., Shiigi, S.M., Avery, N.A., Fanton, J.W., and Axthelm, M.K. (1999). Induction of B Cell Hyperplasia in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques with the Simian Homologue of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J. Exp. Med.* *190*, 827–840.
- Wulczyn, F.G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwidzinski, E., Ninnemann, O., Strehle, M., Seiler, A., Schumacher, S., and Nitsch, R. (2007). Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *21*, 415–426.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.
- Yi, R., Doehle, B.P., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2005). Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA N. Y. N* *11*, 220–226.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* *32*, 4776–4785.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.* *280*, 27595–27603.
- Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B.R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.* *24*, 138–148.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E., and Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J.* *21*, 5875–5885.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single

processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68.

Zhou, F.-C., Zhang, Y.-J., Deng, J.-H., Wang, X.-P., Pan, H.-Y., Hettler, E., and Gao, S.-J. (2002). Efficient infection by a recombinant Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cloned in a bacterial artificial chromosome: application for genetic analysis. *J. Virol.* 76, 6185–6196.

Zhu, F.X., Chong, J.M., Wu, L., and Yuan, Y. (2005). Virion proteins of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 79, 800–811.

Ziegler, J.L., and Katongole-Mbidde, E. (1996). Kaposi's sarcoma in childhood: an analysis of 100 cases from Uganda and relationship to HIV infection. *Int. J. Cancer* 65, 200–203.

Zong, J.-C., Kajumbula, H., Boto, W., and Hayward, G.S. (2007). Evaluation of global clustering patterns and strain variation over an extended ORF26 gene locus from Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 40, 19–25.

Zong, J.C., Ciufu, D.M., Alcendor, D.J., Wan, X., Nicholas, J., Browning, P.J., Rady, P.L., Tying, S.K., Orenstein, J.M., Rabkin, C.S., et al. (1999). High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J. Virol.* 73, 4156–4170.

Etude de la régulation de l'expression des microARN de l'herpesvirus associé au sarcome de Kaposi

La dérégulation de l'expression des microARN peut induire des cancers. De plus, ils jouent un rôle crucial dans la pathogénèse et la survie des virus. L'herpèsvirus humain de type 8 (HHV-8 ou KSHV) est l'agent étiologique du sarcome de Kaposi et est impliqué dans la génération de lymphomes agressifs de type B. De manière intéressante, le génome ce virus code 12 pré-miARN localisés dans la région de latence et exprimés sur un même pri-miARN. Les miARN du KSHV sont importants pour le maintien de la latence, l'inhibition de l'apoptose ou encore la régulation du cycle cellulaire de l'hôte. Nous nous intéressons à leur expression et leur régulation durant l'infection virale. Nous avons résolu la structure secondaire de l'ARN codant ces miARN afin d'identifier les critères structuraux responsables de leur accumulation différentielle. Nous avons initié une analyse cinétique de la première étape de maturation et enfin nous essayons d'identifier des co-facteurs modulant leur expression.

Mots-clés : microARN – KSHV - SHAPE

It is now well known that modulation of microRNAs expression is linked to the development of cancers. Moreover, they play a crucial role in the pathogenesis and the survival of some viruses. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) is the etiologic agent of Kaposi's sarcoma and is involved in human aggressive B lymphomas generation. Its genome encodes 12 precursor miRNAs that are clustered in a latency region and expressed on a single long primary transcript. KSHV miRNAs are important to maintain the virus latency and to regulate or inhibit the host cell cycle or apoptosis, respectively. Therefore, understanding the regulation of KSHV miRNA accumulation is of prime importance. In this respect, we resolved the secondary structure of the miRNA cluster to identify structural criteria responsible of their differential accumulation. In addition, we started to analyse the mechanism of their maturation by kinetics studies. Finally we tried to identify some cofactors of miRNA expression.

Keywords : microRNA – KSHV – SHAPE