



HAL
open science

Etude de la régulation de l'expression des ARN non-codants au cours de l'infection par des virus à ARN : Implications de la protéine KSRP dans la réplication du virus de l'Hépatite C et de la souche HCoV-229E des Coronavirus

Camille Baudesson

► **To cite this version:**

Camille Baudesson. Etude de la régulation de l'expression des ARN non-codants au cours de l'infection par des virus à ARN : Implications de la protéine KSRP dans la réplication du virus de l'Hépatite C et de la souche HCoV-229E des Coronavirus. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2019. Français. NNT : 2019PESC0007 . tel-02316051

HAL Id: tel-02316051

<https://theses.hal.science/tel-02316051>

Submitted on 15 Oct 2019

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.

UNIVERSITE PARIS-EST

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, CRETEIL (ED 402)

INSERM U955-IMRB, Equipe 18 « Virus, Hépatologie, Cancer »



**Etude de la régulation de l'expression des ARN non-codants au cours de
l'infection par des virus à ARN : Implications de la protéine KSRP dans le cycle
de vie du virus de l'Hépatite C et de la souche HCoV-229E des Coronavirus**

Par Camille BAUDESSON

Thèse pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris-Est

Présentée et soutenue publiquement le 15/02/2019

Devant un jury constitué de :

Dr Annette MARTIN :	Rapportrice
Dr Sophie LEPODER :	Rapportrice
Dr Mirjam ZEISEL :	Examinatrice
Pr Bertrand SERAPHIN :	Examineur
Pr Jean-Michel PAWLITSKY :	Directeur de thèse
Pr Cyrille FERAY :	Co-directeur de thèse
Dr Patrice BRUSCELLA :	Encadrant de thèse

Résumé en français	6
Résumé en anglais	7
Remerciements	8
LEXIQUE	11
Liste des abréviations	12
Liste des Figures	14
Liste des Tableaux	16
Introduction	17
I- Emergence et réémergence de maladies infectieuses	17
A. Histoire des maladies infectieuses	17
B. Concept d'émergence virale.....	19
C. Nécessité de développements thérapeutiques	19
1- Début des Antiviraux.....	21
2- Antiviraux à Action Directe	22
3- Antiviraux ciblant l'hôte.....	23
II- Relation hôte-virus : Rôle des ARN non codants.....	25
A- Les Longs ARN Non-Codants	26
1- Biogénèse	26
2- Localisation subcellulaire et fonctions.....	28
3- Dégradation des lncARNs.....	30
4- lncARNs et infections virales	32
lncARNs dans la réponse cellulaire antivirale :.....	32
lncARNs en tant que facteurs proviraux :.....	33
B- Les microARNs	35
1- Biogénèse	35
Voie Canonique de maturation des miARNs	35
Voie Non Canonique de maturation des miARNs	42
2- Dégradation des microARNs	43
3- Fonction et localisation des microARNs	45
4- MicroARNs et infections virales	47
Impact des microARNs cellulaires sur l'infection virale	47
Impact de l'infection sur l'expression des microARNs cellulaires.....	48
Production et rôle des microARNs viraux.....	50
Les microARNs en tant que biomarqueur	51
Les microARNs en tant que biothérapie.....	52

III- Rôle de la protéine KSRP dans la régulation des ARNs	53
A- Généralités	53
1- Structure	54
2- Régulation post-traductionnelle	54
B- Fonctions	55
1- Rôle dans l'épissage des ARNs	55
2- Rôle dans la dégradation des ARNs	56
3- Rôle dans la maturation des microARNs	58
4- KSRP et lncARNs	61
C- KSRP et infections virales	62
1- KSRP et Enterovirus 71	63
2- KSRP et virus Influenza A	63
3- KSRP et Herpesviridae	64
IV- Modèles viraux : Cas du Virus de l'Hépatite C et de la souche HCoV-229E des Coronavirus.....	65
A- Physiopathologie de l'infection par le Virus de l'Hépatite C (VHC)	65
1- Epidémiologie	65
2- Transmission du virus de l'Hépatite C.....	66
3- Histoire naturelle de l'infection par le VHC	66
4- Structure de la particule virale	67
5- Génome viral et protéines virales.....	68
6- Cycle de vie du VHC	69
7- Antiviraux	72
8- Interaction virus - ARN non-codants.....	76
Cas des microARNs	76
Cas des lncARNs	77
B- Physiopathologie de l'infection par les Coronavirus.....	78
1- Généralités	78
2- Epidémiologie	79
3- Emergence et transmission.....	80
4- Histoire naturelle de l'infection Coronavirus.....	80
5- Structure de la particule virale	81
6- Génome et protéines virales.....	82
7- Cycle de vie du virus.....	83
8- Antiviraux	86
9- Interactions avec les ARN non codants	87

V-	Problématiques et objectifs de la thèse.....	89
1)	Etudier le rôle de KSRP dans la régulation de l'expression du miR-122 au cours de l'infection par le virus de l'Hépatite C	89
2)	Identification et étude de la régulation d'ARN non-codants modulés lors de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus et caractérisation du rôle de KSRP	90
	Matériels et Méthodes	92
I-	Culture Cellulaire	92
II-	Biologie moléculaire	93
III-	Biochimie	96
IV-	Séquençage à haut débit	101
	Résultats	107
I-	Cas du virus de l'hépatite C : Etude de la maturation viro-induite du miR-122 <i>via</i> la phosphorylation Akt-dépendante de la protéine KSRP.....	107
II-	Article I.....	109
III-	Caractérisation du rôle des phosphorylations de KSRP lors de l'infection VHC	110
A-	Mise en place d'une banque de plasmides exprimant des protéines KSRP-HA mutées sur des résidus phosphorylables spécifiques et étude de leur localisation subcellulaire.....	110
B-	Rôle des sites de phosphorylation de KSRP sur la réplication virale et la maturation de miR-122.....	114
IV-	Identification et étude de la régulation d'ARN non-codants modulés lors de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus et caractérisation du rôle de KSRP.....	123
A-	Caractérisation du rôle proviral de KSRP lors de l'infection par la souche HCoV-229E	123
B-	Etude de la modulation des ARN non-codants lors de l'infection HCoV-229E par séquençage à haut débit	127
1-	Cas des microARNs.....	128
2-	Cas des lncARNs	134
	Rôle du LinC00473 sur la réplication de la souche HCoV-229E.....	140
3-	Rôle de KSRP sur l'expression du LinC00473	145
	Discussion	148
I-	La phosphorylation viro-induite de la protéine KSRP en S193 promeut la maturation du miR-122 proviral	149
II-	La phosphorylation de KSRP en T692 influence la maturation de miR-122, la réplication virale ainsi que la localisation de la protéine.....	150
III-	Etude du rôle de la protéine KSRP et de son rôle dans le contrôle de l'expression des ARN non-codants lors de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus	156
	Conclusion générale	167

Annexes	169
I- Représentation schématique de la biogénèse des microARNs (voie canonique) et des lncARNs.....	169
II- Revue I – Frontiers in microbiology.....	170
III- Article II – Antimicrobial Agents and Chemotherapy.....	171
IV- Article III – Journal of Biological Chemistry	172
Bibliographie	173

Résumé en français

Les virus à ARN sont à l'origine de nombreuses épidémies depuis ces dernières décennies. Malgré des avancées thérapeutiques majeures, une majorité d'infection est actuellement orpheline de traitement. Le développement de nouveaux antiviraux à spectre large est une alternative thérapeutique pour maximiser le nombre de virus ciblés, minimiser les coûts de production et améliorer la prise pour les patients. Afin de trouver de nouvelles cibles cellulaires pour ce type d'approche thérapeutique, la compréhension des mécanismes moléculaires utilisés par les virus à ARN pour infecter l'hôte est essentielle.

Les virus utilisent des facteurs cellulaires pour survivre et se propager. Parmi ceux-ci, on trouve les microARNs (miARNs) et les longs ARNs non-codants (lncARNs) qui peuvent participer à la réponse antivirale cellulaire mais peuvent également être détournés par les virus pour favoriser l'infection. Ces deux familles d'ARN non-codants peuvent interagir avec des protéines cellulaires (« RNA-binding protein » (RBP)) parmi lesquelles la protéine KSRP. Cette RBP ubiquitaire est impliquée dans le contrôle de l'expression des ARNs en participant à l'épissage de certains pré-ARNm, à la dégradation des ARNs contenant des séquences riches en AU et à la maturation de certains miARNs. Ses fonctions et sa localisation sont dépendantes de la phosphorylation de certains résidus par les kinases cellulaires Akt, ATM et p38/MAPK.

Le but de ma thèse a été d'étudier la modulation de l'expression de ces deux classes d'ARN non-codants au cours de l'infection par des virus à ARN tels que le virus de l'Hépatite C (VHC) et la souche HCoV-229E des Coronavirus. Plus particulièrement nous avons cherché à étudier l'implication de la RBP KSRP dans la régulation d'ARN non-codants essentiels pour ces infections.

Mes recherches ont commencé par l'étude de la maturation du microARN-122 (miR-122), un facteur proviral de l'infection par le VHC. Nous avons montré que KSRP phosphorylée sur le résidu S193 par Akt interagissait avec le complexe nucléaire DROSHA/DGCR8 et ainsi était essentielle à la maturation du pri-miR-122 en miR-122 favorisant la réplication virale. Nous avons ensuite étudié le rôle des phosphorylations de KSRP par ATM et p38/MAPK sur la réplication virale et sur la maturation du miR-122. La phosphorylation par ATM ne semble pas jouer un rôle majeur sur ces deux paramètres. En revanche, la phosphorylation de KSRP sur le résidu T692 par la kinase p38/MAPK semble jouer un rôle positif sur la réplication virale.

Dans un second temps, par homologie avec les résultats obtenus dans le cas du VHC, nous avons étudié le rôle de KSRP lors de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus. En transfectant un siKSRP ou un plasmide exprimant la protéine KSRP, nous avons pu démontrer que KSRP était un facteur cellulaire proviral pour la réplication du virus.

Afin d'identifier les ARN non-codants modulés au cours de l'infection HCoV-229E et dont l'expression pouvait être régulée par KSRP, nous avons effectué deux analyses de séquençage à haut débit (« NGS »). L'analyse réalisée sur des cellules infectées vs non-infectées nous a permis d'identifier l'ensemble des miARNs et lncARNs dérégulés par le virus. Nous avons croisé ces résultats avec un second « NGS » fait sur des cellules infectées par HCoV-229E, inhibées pour KSRP et nous avons trouvé que l'expression d'un lncARN (LinC00473) était modulée dans les deux conditions expérimentales. En étudiant ce facteur cellulaire au cours de l'infection nous avons pu observer une forte induction KSRP-dépendante du LinC00473 à 24 h post-infection, puis une diminution à 48 h post-infection. L'inhibition de ce facteur entraîne une diminution de la réplication virale suggérant que le LinC00473 est un facteur cellulaire proviral au début de l'infection.

Nos résultats ont permis de montrer le rôle proviral de la protéine KSRP lors de deux infections virales (VHC et HCoV-229E des Coronavirus). Son implication dans la régulation de l'expression des ARNs fait de cette protéine un outil efficace pour découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques ARN non-codants au cours d'autres infections virales

Résumé en anglais

RNA viruses have been the cause of many epidemics in recent decades. Despite major therapeutic advances, a majority of infection is currently orphan for treatment. The development of new broad spectrum antivirals is a therapeutic alternative to maximize the number of targeted viruses, minimize production costs and improve access to population. In order to find new cellular targets for this type of therapeutic approach, understanding the molecular mechanisms used by RNA viruses to infect the host is essential.

Viruses exploit cellular factors to survive and to disseminate. Among those factors, microRNA (miRNA) and long non-coding RNA (lncRNA) can participate to cellular antiviral response but can also be hijacked by the virus to improve the infection. These two families of non-coding RNA could interact with cellular RNA-binding protein (RBP) such as KSRP. This ubiquitous protein is involved in RNA expression control *via* its participation to pre-mRNA splicing, decay of AU-rich element mRNA and maturation of microRNAs. The functions and localization of KSRP are dependent of post-modification by the cellular kinases Akt, ATM and p38/MAPK.

The aim of my thesis was to study the modulation of the expression of these two classes of non-coding RNA during infection by RNA viruses such as the hepatitis C virus (HCV) and the HCoV-229E strain of the Coronaviruses. More specifically, we evaluated the involvement of KSRP in the regulation of non-coding RNAs essential for these infections.

My research project began with the study of microRNA-122 (miR-122) the maturation. This miRNA is a proviral factor for HCV infection. We have shown that the Akt-dependent phosphorylation of S193-KSRP promoted the interaction of pri-miR-122 with the DROSHA / DGCR8 nuclear complex and thus was essential for the maturation of miR-122, finally promoting viral replication. We then investigated the role of KSRP phosphorylation by ATM and p38 / MAPK on viral replication and on miR-122 maturation. ATM phosphorylation does not seem to play a major role in these two parameters. In contrast, phosphorylation of KSRP on the T692 residue by p38 / MAPK kinase appears to play a positive role on viral replication.

In a second step, by homology with the results obtained in the case of the HCV infection, we studied the role of KSRP during the infection with the HCoV-229E strain of Coronaviruses. After siKSRP transfection or exogenous expression of the KSRP protein, we were able to demonstrate that KSRP was a proviral cellular factor for HCoV-229E replication.

In order to characterize the modulation of non-coding RNAs expression during HCoV-229E infection and to identify the non-coding RNAs whose expression could be regulated by KSRP, we performed two high-throughput sequencing ("NGS") assays. The analysis performed on infected and non-infected cells allowed us to identify all the miRNAs and lncRNAs whose expression was altered by the virus. We cross-examined these results with a second "NGS" performed on HCoV-229E infected cells inhibited for KSRP. We found that the expression of an lncRNA (LinC00473) was modulated under both experimental conditions. We demonstrated a strong KSRP-dependent induction of LinC00473 expression at 24 h post-infection, then a decrease at 48 h post-infection. Inhibition of this factor results in decreased viral replication suggesting that LinC00473 is a proviral cell factor at the onset of infection.

Our results have shown the proviral role of the KSRP protein during two viral infections (HCV and HCoV-229E of the coronaviruses). Its involvement in the regulation of RNA expression makes of KSRP an effective tool for discovering new non-coding RNA therapeutic targets for other viral infections.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Jean-Michel Pawlotsky pour m'avoir accueilli dans son laboratoire depuis presque 6 ans, depuis mon stage de licence jusqu'à la fin de ce doctorat. Je tiens à le remercier pour sa confiance, son apport scientifique et pour sa bienveillance envers les décisions que j'ai pu prendre au cours de ces années.

Je remercie le Pr Cyrille Féray pour sa présence, son implication dans mon projet, pour ses qualités scientifiques ainsi que pour nos longues réunions souvent essentielles pour l'avancée du projet.

Je remercie également les membres de mon jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Je suis arrivée dans ce laboratoire en avril 2013 et je ne l'ai plus jamais quitté. J'ai trouvé parmi les membres de cette équipe, une deuxième famille qui a su être là pour moi dans les bons moments comme dans les mauvais, que l'on rencontre tous au long de ces années de thèse.

Pour cela je tiens à tous les remercier, vous avez tous apporté une pierre à « l'édifice » et à la personne que je suis aujourd'hui.

Je tiens à remercier Jacqueline, pour m'avoir formé et pour m'avoir appris la rigueur. Bien plus qu'une collègue tu as été un repère pour moi durant toutes ces années grâce à tes nombreux conseils.

Je tiens à remercier Rozenn, sans toi ma thèse n'aurait pas été la même. Merci pour ces jeudis jogging à papoter. Tu as été très présente pour moi et je tiens à te remercier de m'avoir toujours poussé, écouté, épaulé dans les moments difficiles. Merci pour ton optimisme sans faille, pour tes encouragements.

Je tiens à remercier Flora et Quentin, mes acolytes durant toutes ses années. Vous avez toujours su me conseiller, me guider, vous avez été de vrais modèles pour moi. Merci pour tous nos petits-déjeuners, nos missions azotes, nos discussions collées contre le mur, nos chansons chantées à tue-tête. Sans vous cette thèse serait passée bien plus lentement, vous avez grandement participé à la joie que m'a procurée ce travail. Merci pour votre bienveillance et votre amitié.

Merci à Isaac et Nazim, pour m'avoir initié aux échecs et plus exactement à l'apéro pendant les échecs, la meilleure partie finalement. Ces soirées ne s'oublieront pas.

Je tiens à remercier Céline pour être apparue à une période de la thèse particulièrement difficile. Tu as su trouver les mots justes, les mots qui donnent envie d'avancer, ceux qui redonnent confiance, ceux qui te déculpabilise. Tu m'as donné envie d'aller au travail tous les jours (et ce n'était pas gagné). Plus qu'une collègue tu es une vraie amie sur qui l'on peut compter (t'es surtout la plus bonne bonne de mes copines).

Merci à Laurent, à nos moments potins, à nos concours de pays, à nos karaokés dans le L2... Merci pour toutes nos discussions qui ont été très enrichissantes (presque toutes dirons-nous...). J'ai adoré partagé ces moments avec toi et heureusement que tu étais là ! Reste la personne exceptionnelle que tu es.

Merci à Anthony, ta rigueur, ton implication et ta loyauté devraient être un modèle pour tous.

Merci à Camilia et Aurélie, vous avez beaucoup contribué à mon moral, vous avez toujours trouvé les bons mots et su écouter mes histoires improbables.

Merci à Margot et François pour l'aide qu'ils m'ont apporté à la fin de la thèse.

A Alexandre, pour nos discussions rhum, films et voyage. Comme Rozenn tu as été très présent et je t'en remercie chaleureusement.

Merci à mes copines Lila et Mélanie, pour leur soutien. Merci Lila de m'avoir toujours trouvé des séries totalement improbables à regarder (babybel) et surtout achète plus de vêtement rouge ça te va si bien... Merci Mélanie pour tous ces matins co-voiturage à refaire le monde !

Merci à Julia, pilier essentiel de ce laboratoire, merci pour ta disponibilité, pour avoir toujours tout fait pour que ma thèse se passe au mieux.

Merci à Fatima pour ses conseils toujours pertinents qu'ils soient professionnels ou personnels.

Je tiens à remercier particulièrement Hakim, sa femme et ses trois enfants que j'aime profondément. Merci d'avoir professionnellement été un modèle de franchise, de rigueur et d'intelligence. Merci de m'avoir montré que l'on peut gérer sa vie professionnelle et sa vie personnelle en étant excellent dans les deux domaines sans être obligé de faire des sacrifices. Tu m'as toujours soutenu et aidé dans mes décisions, merci d'avoir eu ce rôle avec moi. Je tiens également à te remercier pour tous les bons moments, les tatzettes, les blagues, les chansons parfois affreuses mais inoubliables.

A Patrice, aucun discours ne pourra réellement retranscrire l'admiration et le respect que j'ai pour toi. Tu as été la personne qui m'a donné envie de faire cette thèse, tu m'as supporté dans les moments les plus durs, tu as toujours été à mon écoute même durant mes monologues sur les suricates. Tu es la personne la plus humaine que je connaisse et c'est une chance de t'avoir comme modèle et comme chef. Même si tu supportes l'OM, personne n'est parfait. Merci d'avoir été une vraie figure paternelle ainsi qu'un ami, sans toi jamais je n'y serai arrivée.

Merci à Vanessa, pour tout le travail effectué sur mon projet. Je pense qu'on se souviendra de Christophe et Patrice en train de construire un patron pour découper des gels. Cela aurait mérité une photo.

Je tiens également à remercier mes amis, une vraie famille d'adoption. L'amitié est une chance et j'ai la chance d'être entourée de personnes très différentes mais toutes aussi exceptionnelles.

Merci à mes amis d'enfances, ceux avec qui j'ai grandi, avec qui j'ai fait les 400 coups, avec qui j'ai appris la loyauté, la générosité, la solidarité et surtout l'humour, merci à Hugo R, Camille, Katia, Jérémie, Charlie, Hugo M, Monica et Mahoua. Merci d'être présents depuis plus de 15 ans.

Merci à mes amis de Saint-Maur, dans l'adversité et l'ingratitude de l'adolescence on a su se construire ensemble et je suis heureuse de vivre ma vie d'adulte à vos côtés. Merci d'avoir été là tout au long de cette thèse, merci d'avoir trouvé mille moyens de me faire penser à autre chose le temps d'un we, d'un apéro, d'une sortie en forêt ou bien autour d'un bon repas partagé tous ensemble. Merci à David, Pachot, Alexis, Mielec et Aurore. Un merci tout particulier à David pour son aide, ses conseils, sa bonne humeur, son soutien et sa générosité.

Merci à Mélissa, tu as souvent été une bouffée d'air frais. Merci de m'avoir montré qu'on pouvait vivre différemment.

Merci à ma tuk tuk team, plus que des amis une vraie famille. A tous ces moments partagés ensemble, vous avez été chacun d'un soutien gigantesque. Merci à Fred, Métissa, Romain, Maïté, Nico, Gaby, Simon, Paul, Mika, Thomas, Julie, Benja, Ramy, Dani, Esther et Vasile.

A Delphine, mille mercis pour tout ce que tu as fait pour moi et ce que tu fais encore.

A Célia, à nos saucisses au chien, à notre fromage béni, merci pour ta compréhension, pour nos discussions de thésardes en détresse, on l'a fait !

A Baptiste et Mélo, votre folie aura égayé mes journées plus d'une fois !

A Marie et Camille, les meilleures, mes confidentes, mes partenaires in crime, on dit que les épreuves renforcent l'amitié, je pense que la nôtre sera donc solide à jamais.

Je tiens à remercier mes beaux-parents, Fabienne et Jp, présents depuis presque 10 ans. Vous m'avez ouvert les portes de votre famille et j'ai appris à vos côtés ce à quoi ressemble une belle et grande famille. Merci également de m'avoir toujours soutenu, de vous être occupés de moi, merci pour votre ouverture d'esprit, pour votre générosité sans limite. Merci également à tous les membres qui composent cette famille et qui font d'elle une entité unie.

Merci à mes best beaux-frères, Rafael et Colin, vous êtes les meilleurs. Merci Rafael de tout ce que tu as fait pour nous tu es le meilleur des sous-chefs.

Pour soutenir les épreuves, pour leur faire face il faut pouvoir s'appuyer sur des piliers solides et robustes. Merci à ma mère, qui a su nous aiguiller, nous élever pour que l'on donne constamment le meilleur de nous-même, à ma sœur Marine, plus qu'une sœur tu es le meilleur des réconforts, tu as toujours su trouver les mots justes et les mots drôles et à mon frère Guillaume qui m'a toujours encouragé, protégé et dont l'opinion a toujours été très importante pour moi. Vous êtes les piliers de ma vie, je ne vous dirai jamais assez à quel point je suis fière de vous et à quel point je vous aime.

Enfin, je tiens à remercier l'homme qui partage ma vie depuis 10 ans, merci Léo de m'avoir supporté au quotidien, de n'avoir cessé de m'encourager et de croire en moi. Tu m'as appris la patience (enfin on y est presque), vertu essentielle dans ce métier. Ta franchise, ta loyauté mais également ton humour font de chacune de mes journées un vrai bonheur.

LEXIQUE

- **Agent étiologique** : Un agent étiologique désigne un organisme principalement responsable de changements chez un hôte, conduisant à la maladie, tel qu'un pathogène ou un germe infectieux.
- **Emergence/ré-émergence** : L'émergence est l'apparition d'un nouveau pathogène dans un hôte donné. La ré-émergence est la réapparition de ce pathogène suite à une période d'absence.
- **Epidémie** : Une épidémie est la propagation rapide d'une maladie infectieuse à un grand nombre de personnes, dans une région donnée. Une épidémie peut durer quelques jours, quelques semaines ou plusieurs années.
- **Pandémie** : Une pandémie est une épidémie qui s'étend à la quasi-totalité d'une population d'un continent ou de plusieurs continents, voire dans certains cas au niveau mondial.
- **Hypolipémiant** : Molécule synthétique ou naturelle dont l'action vise à diminuer la concentration de lipides circulant dans le sang.
- **Morbidité** : nombre de personnes souffrant d'une maladie donnée pendant un temps donné, en général une année, dans une population. L'incidence (nouveaux cas) ou la prévalence (la somme de tous les cas) sont deux façons d'exprimer la morbidité d'une maladie.
- **Mortalité** : Nombre de décès lié à une même cause dans une population sur un temps donné
- **Prévalence** : Nombre de cas d'une maladie dans une population à un moment donné, englobant aussi bien les cas nouveaux que les cas anciens.
- **Zoonose** : Une zoonose est une maladie infectieuse ou parasitaire transmissible d'un animal vertébré à l'Homme.

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique
ARE : « AU-Rich Element », Element Riche en AU
ARN: Acide ribonucléique
BSAA: « Broad Spectrum Antiviral Agent », Agent Antiviral à Spectre Large
CHC: Carcinome Hépatocellulaire
CHIKV: « Chikungunya Virus », Virus Chikungunya
DAA: « Direct Acting Antiviral », Antiviral à Action Direct
DENV: « Dengue Virus », Virus de la Dengue
DGCR8: « DiGeorge syndrome chromosomal region 8 »
DMV: « Double Membrane Vesicle », Vésicule à double membrane
EBOV: « Ebola Virus », Virus Ebola
FDA: « Food and Drug Administration »
HBV: « Hepatitis B virus », Virus de l'hépatite B
hCMV : « human CytoMégaloVirus », CytoMégaloVirus Humain
HCoV: « Human CoronaVirus », Coronavirus Humain
HCV: « Hepatitis C virus », Virus de l'Hépatite C
HSV-1 : « Herpes Simplex Virus 1 », Virus de l'Herpès Simplex 1
HTA: « Host-Targeting Antiviral », Antiviral ciblant l'Hôte
IAV: « Influenza A virus », Virus Influenza A
IFN: Interféron
IRES: « Internal Ribosome Entry Site », Site d'Entrée interne des Ribosomes
ISG: « Interferon Stimulated Gene », Gène Stimulé par l'Interféron
KSRP: « KH-splicing regulatory protein »
LinCARN: « Long ARN intergénique »
IncARN: « Long non-coding RNA », Long ARN Non-Codant
MERS-CoV: « Middle East Respiratory Syndrome », Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient
miARN: microARN
NIAID: « National Institute of Allergy and Infectious Diseases »
NLS: « Nuclear Localization Site », Site de Localisation Nucléaire
Nt: Nucléotide
nsp: « Non-Structural Protein », Protéine Non-Structurale
RBP: « RNA binding protein », Protéine se fixant à l'ARN
RISC: « RNA induced silencing complex », Complexe d'interférence par ARN
RSG: Réplicon sous-génomique
SARS-CoV: « Severe Acute Respiratory Syndrome », Syndrome Respiratoire Aigü Sévère
Ser: Sérine
SIDA: Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquise
SP : « Signal Peptidase »
Thr: Threonine

TLR: « Toll-Like Receptor », Récepteur de type “Toll-Like”

VIH: Virus de l’Immunodéficience Humaine

WNV: « West Nile Virus », Virus du Nil Occidental

ZIKV: « Zika Virus », Virus Zika

Liste des Figures

Figure 1: Frise chronologique représentant les principales pandémies et épidémies du XIV^{ème} siècle à aujourd'hui.

Figure 2: Origine génomique des lncARNs.

Figure 3: Différentes étapes de la biogénèse des lncARNs et principales caractéristiques.

Figure 4: Rôles principaux des lncARNs dans la cellule.

Figure 5: Mécanismes moléculaires illustrant la balance entre la dégradation et la stabilité des lncARNs.

Figure 6: Implication des lncARNs dans la réponse immunitaire innée lors d'infections virales.

Figure 7: Formation du sfARN des *Flavivirus*.

Figure 8: Voie canonique de maturation des microARNs.

Figure 9: Structure de la tige-boucle du pri-miARN à l'origine de microARN mature.

Figure 10: Structure des protéines du complexe catalytique, DROSHA et DGCR8 chez l'Homme.

Figure 11: Structure de la protéine DICER.

Figure 12: Structure de la protéine AGO composant le cœur catalytique du complexe d'interférence RISC.

Figure 13: Rôles multiples du complexe RISC.

Figure 14: Voies de maturation des microARNs dépendantes et indépendantes des facteurs protéiques DROSHA, DGCR8 et DICER.

Figure 15: Implication des microARNs dans différents processus biologiques.

Figure 16 : Structure de la protéine KSRP.

Figure 17: Implication de KSRP dans le recrutement des RNases cellulaires.

Figure 18: Implication de KSRP au niveau nucléaire et cytoplasmique dans la maturation des microARNs.

Figure 19: KSRP participe au contrôle du métabolisme de glucose via le lncARN H19 et le microARN Let-7.

Figure 20: L'interaction de KSRP avec la protéine antivirale RIG-I permet le contrôle de la réponse immunitaire.

Figure 21: Développement d'un carcinome hépatocellulaire.

Figure 22: Structure schématique et hypothétique du virus de l'hépatite C.

Figure 23 : Représentation schématique du génome viral du VHC.

Figure 24: Cycle de vie du VHC.

Figure 25: Arbre phylogénétique des Coronavirus.

Figure 26: Représentation schématique de la particule virale des Coronavirus.

Figure 27: Génome de la souche SARS-CoV.

Figure 28: Cycle de vie du virus.

Figure 29: Représentation de la réplication des Coronavirus.

Figure 30 : Etape principale du séquençage à haut débit réalisé sur de l'ARN total.

Figure 31: Profil de migration attendu pour les petits ARN non-codants (microARN) lors du séquençage à haut débit sur du « Small RNA ».

Figure 32: Etape principale du séquençage à haut débit réalisé sur du « Small RNA ».

Figure 33: Localisation nucléo-cytoplasmique de la protéine KSRP endogène et des différentes constructions plasmidiques.

Figure 34: Analyse par western blot de l'expression de KSRP.

Figure 35: Etude de la réplication de la souche Jad du VHC et de la maturation de miR-122.

Figure 36: Localisation nucléo-cytoplasmique des plasmides mutés en aspartate.

Figure 37: Analyse par Immunoprécipitation d'ARN de l'affinité des différentes constructions plasmidiques de KSRP pour l'ARN VHC, le pri-miR-122 et l'ARNm c-jun.

Figure 38: Analyse de la réplication virale de la souche HCoV-229E dans des cellules MRC-5 dont l'expression de KSRP a été inhibée.

Figure 39: Analyse de la réplication virale dans des cellules MRC-5 transfectées avec un plasmide exprimant la protéine KSRP-HA.

Figure 40: Images de cellules MRC-5 observées 48 h post-infection par la souche HCoV-229E (M.O.I. de1).

Figure 41: Analyse par western blot de l'expression de KSRP.

Figure 42: Immunoprécipitation d'ARN analysant l'affinité de KSRP pour l'ARN viral et pour l'ARNm « ARE » c-jun.

Figure 43: Analyse croisée des microARNs et des pri-miARNs modulés au cours de l'infection HCoV-229E par « NGS total RNA » et « small RNA » dans les conditions infectée vs non-infectée par la souche HCoV-229E.

Figure 44: L'ARN viral interagit de manière directe avec des microARNs.

Figure 45: Représentation graphique des éléments communs modulés dans les deux analyses « NGS total RNA ».

Figure 46: Analyse de l'expression du LinC00473 et de l'ARN viral au cours de l'infection.

Figure 47: L'expression de LinC00473-1/2 est induite 24 h post-infection par HCoV-229E.

Figure 48: Inhibition de l'expression du LinC00473 par transfection de siARN.

Figure 49: Effet du siLinC00473 sur la réplication virale.

Figure 50: Rôle de KSRP sur l'expression du LinC00473 au cours de l'infection virale.

Figure 51: Quantification de l'interaction directe entre KSRP et l'ARN LinC00473-1 par Immunoprécipitation d'ARN.

Figure 52: Modèle schématique résumant les résultats obtenus sur les résidus S193 et T692.

Figure 53: Représentation schématique modélisant le rôle hypothétique du LinC00473 et de la protéine KSRP lors de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus.

Liste des Tableaux

Tableau 1: Impact liés aux virus émergents et/ou ré-émergents sur l'Homme.

Tableau 2: KSRP participe à la maturation de microARNs impliqués dans divers pathologies.

Tableau 3: KSRP peut participer au contrôle de l'infection de différents virus.

Tableau 4: Antiviraux à action directe de seconde génération, dirigés contre les différentes protéines non-structurales du VHC.

Tableau 5: Rôle des protéines non structurales.

Tableau 6: Oligonucléotides utilisés pour la production des formes mutantes KSRP-HA par le kit « Quick Change XL Site-directed mutagenesis kit ».

Tableau 7: Amorces utilisées pour le séquençage des formes mutantes KSRP-HA.

Tableau 8: Amorces utilisés pour la détection spécifique des virus JFH1 et HCoV-229E.

Tableau 9: Anticorps primaires utilisés.

Tableau 10: Anticorps secondaires utilisés.

Tableau 11: Tableau référençant les différentes constructions plasmidiques mutantes obtenues à partir d'un plasmide pKSRP-HA.

Tableau 12: Tableau récapitulatif du rôle de chaque plasmide mutant sur la réplication virale, sur l'expression de miR-122 et sur sa localisation majeure.

Tableau 13: Tableau récapitulatif de l'affinité des formes mutées KSRP-HA, KSRP-S193D-HA, KSRP-S193A-HA, KSRP-T692D-HA et KSRP-T692A-HA pour l'ARN viral, le pri-miR-122 et les ARN « ARE » tels que c-jun.

Tableau 14: MicroARNs et pri-microARNs dont l'expression est altérée au cours de l'infection virale d'après les résultats du « NGS small RNA » et « NGS total RNA » dans les conditions Infectées vs Non-infectées.

Tableau 15: Analyse en « miroir » des microARNs *via* les cibles ARNm dérégulées au cours de l'infection.

Tableau 16: Facteurs cellulaires modulés, communs aux deux analyses NGS.

Tableau 17: Modulation des lncARNs à 24h d'infection obtenue par analyse NGS sur de l'ARN total.

Introduction

I-Emergence et réémergence de maladies infectieuses

A. Histoire des maladies infectieuses

Au cours de son évolution, l'Homme a été confronté de nombreuses fois à des maladies dues à des microorganismes ayant causées différentes épidémies/pandémies mortelles (**Figure 1**).

Au XIVème siècle, une pandémie de peste appelée peste noire ou bubonique causée par la bactérie *Yersinia Pestis* a touché l'Europe, l'Asie, le Moyen-Orient et l'Afrique du Nord faisant plus de 25 millions de morts. Dans les années 1500, après la conquête du Nouveau-monde par les Européens, l'importation d'une souche de « Smallpox », agent étiologique de la variole, par les conquistadors espagnols a décimé 3 à 4 millions d'Amérindiens parmi les populations Aztèque et Inca [1]. La principale pandémie connue à ce jour reste l'épisode de grippe espagnole en 1918-1919 causée par la souche H1N1 du virus influenza A. En moins d'un an, le virus a infecté un tiers de la population mondiale et entraîné la mort de 20 à 50 millions de personnes [2, 3].

La révolution industrielle au début du XXème siècle ainsi que l'apparition et le développement de nouveaux moyens de transport ont causé l'arrivée de nouvelles maladies infectieuses. On pourra citer comme exemple l'épidémie de tuberculose due à la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* dans les métropoles industrielles d'Europe du Nord, parmi les premières causes de décès à cette époque [4].

Au cours de la deuxième moitié du XXème siècle, de nombreuses découvertes scientifiques portant sur l'identification et la compréhension du cycle de vie de divers pathogènes ainsi que sur le développement de nouveaux traitements (antibiotiques) et vaccins ont permis une diminution drastique de la mortalité liée aux microorganismes [5]. En parallèle, l'amélioration des conditions sanitaires (traitement de l'eau et conditions d'hygiène favorables) a également contribué à cette diminution.

Néanmoins, dans les années 1980, de nouvelles pandémies sont apparues, marquant un tournant dans l'étude des microorganismes pathogènes. En 1981, aux Etats-Unis, de nombreuses personnes meurent des suites d'infections opportunistes inhabituelles.

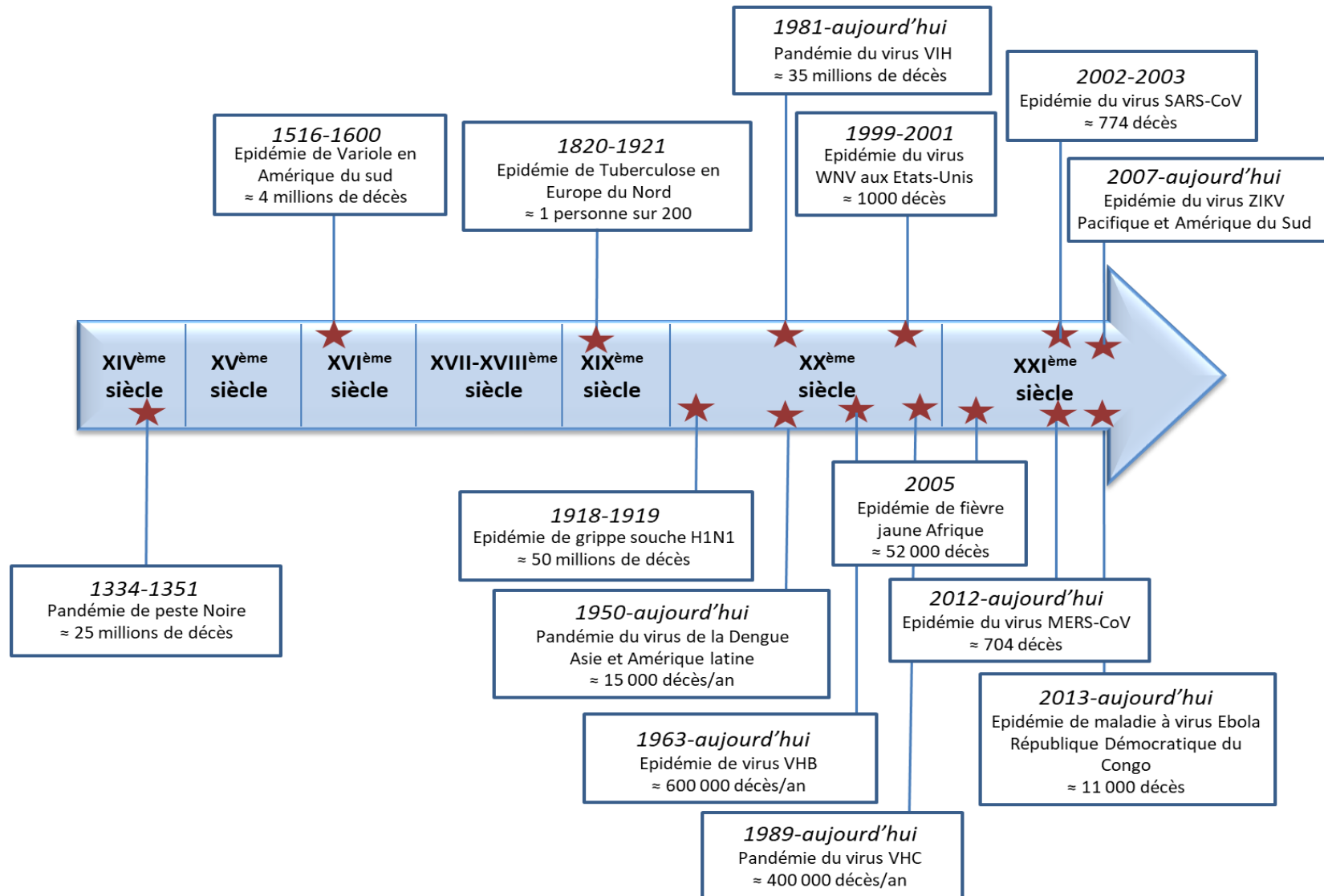


Figure 1 : Frise chronologique représentant les principales pandémies et épidémies du XIV^{ème} siècle à aujourd'hui. L'émergence et/ou la ré-émergence d'infections virales a été accélérée depuis le XX^{ème} siècle.

Très vite ce syndrome est appelé syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) [6]. Il faudra deux années supplémentaires pour identifier le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) comme l'agent étiologique du SIDA. Ce virus infecte actuellement 36,7 millions de personnes à travers le monde [7].

B. Concept d'émergence virale

Le concept d'émergence de maladies infectieuses a été défini en 1987 à Washington par le « National Institute of Allergy and Infectious Diseases » (NIAID) suite à l'émergence du virus du SIDA. Le but de cet institut est de mettre en place une lutte efficace contre les nouveaux agents pathogènes ou la réémergence de ces derniers. Le NIAID propose une définition de ce que l'on appelle « maladie émergente » et publie en 1991 une première liste recensant les agents étiologiques bactériens ou viraux responsables des maladies suivantes : la maladie de Lyme, la fièvre de Lassa, la dengue, le choléra et les fièvres hémorragiques virales [8].

A ce jour le concept de maladie émergente se définit comme une « Infection nouvellement apparue ou ayant déjà existée, dont l'incidence et/ou la proportion géographique augmente rapidement » [9].

C. Nécessité de développements thérapeutiques

L'émergence et la ré-émergence de virus humains hautement pathogènes posent depuis ces dernières années un problème de santé publique ainsi qu'un problème économique majeur (**Tableau 1**).

Famille virale	Virus	Symptômes	Morbidité	Mortalité	Population à risque
<i>Hepadnaviridae</i>	HBV	Développement d'un CHC	257 M/an	600 000/an	Adultes
	HCV	Développement d'un CHC	71 M/an	400 000/an	Adultes
<i>Flaviviridae</i>	WNV	Encéphalite, fièvre du "West Nile"	43 000 (Etats-Unis 1999-2015)	1000 depuis 1999	Enfants, Adultes, personnes âgées
	YFV	Fièvre hémorragique	84 000-170 000/an	29 000-60 000/an	Enfants, Adultes, personnes âgées

	DENV	Syndrome pseudo-grippal à fièvre hémorragique	96 M/an	15 000/an	Enfants ++, Adultes
	ZIKV	Microcéphalie, Syndrome de Guillain-Barré	Inconnue	Rare	Femmes enceintes
<i>Retroviridae</i>	HIV-1 /HIV-2	Destruction des cellules immunitaires	1,8 M/an	1 M/an	Adultes, enfants
<i>Coronaviridae</i>	MERS-CoV	Détresse respiratoire, Défaillance rénale	2029 depuis 2012	806 depuis 2012	Personnes âgées, immunodéprimés
	SARS-CoV	Détresse respiratoire	8096 (2002-2004)	774 depuis 2002	Adultes
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza A	Fièvre, Détresse respiratoire, myalgie	2,5 M/an (En France)	14 400 en 2016-2017	Personnes âgées, immunodéprimés
<i>Filoviridae</i>	EBOV	Fièvre hémorragique	29 000 (2013-2015)	11 000 (2013-2015)	Adultes, enfants, personnes âgées
<i>Togaviridae</i>	CHIKV	Douleurs articulaires sévères	Environ 200 000/an	Rare	Nouveau-nés, personnes âgées

Tableau 1 : Impacts liés aux virus émergents et/ou ré-émergents sur l'Homme.

(Données de l'OMS) **HBV** (« Hepatitis B Virus »), **HCV** (« Hepatitis C Virus »), **WNV** (« West Nile Virus »), **YFV** (« Yellow Fever Virus »), **DENV** (« Dengue Virus »), **ZIKV** (« Zika Virus »), **HIV-1/2** (« Human Immunodéficience virus ½ »), **Mers-CoV** (« Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus »), **SARS-CoV** (« Severe Acute Respiratory Syndrome »), **EBOV** (« Ebola Virus »), **CHIKV** (« Chikungunya Virus »).

On retrouve parmi ces virus, ceux responsables de « maladies chroniques » tels que les virus des Hépatites B (« Hepatitis B Virus », HBV) et C (« Hepatitis C Virus », HCV) ainsi que le VIH-1 causant chaque année plusieurs centaines de milliers de décès. Des virus respiratoires au risque pandémique élevé posent également des problèmes de santé publique de manière récurrente. Les souches de *Coronavirus* humains (HCoVs) associées au Syndrome Respiratoire Aigü Sévère (SARS-CoV) et au Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) ont été à l'origine de pandémies en 2003 et 2012 respectivement, causant de 30% à 50% de mortalité chez les patients infectés [10]. Une nouvelle épidémie de MERS-CoV a causé à ce jour 806 décès, principalement en Arabie Saoudite montrant le haut pouvoir pathogène de cette souche [11]. Le virus grippal Influenza A (« Influenza virus », IAV) est responsable d'une épidémie saisonnière annuelle mais peut être également responsable de pandémies sévères, de par sa capacité à muter facilement, ce qui fut le cas pour les souches H5N1 et H7N9 du IAV en 2003 et 2013 respectivement [12-14].

Le virus Ebola (« Ebola virus », EBV) a été identifié pour la première fois en 1976 dans une région de la République Démocratique du Congo. Entre 2014 et 2016 une nouvelle épidémie de fièvre hémorragique à virus Ebola est apparue en Afrique de l’Ouest causant 11 000 décès. Cet épisode a montré que le phénomène de ré-émergence virale n’affaiblissait en rien le degré de pathogénicité [15, 16].

En 2017, on a pu voir réapparaître en France une épidémie de rougeole chez les jeunes enfants et également chez les adultes malgré une campagne de vaccination de longue date et un vaccin efficace [17]. A ce jour, plus de 2 500 cas ont été reportés.

Enfin, on retrouve les cas d’émergence de nombreux arbovirus (« Arthropode-borne Virus ») dont la transmission se fait par un arthropode hématophage. On peut citer par exemple, le virus du Nil Occidental (« West Nile Virus », WNV), le virus du Chikungunya (« Chikungunya Virus », CHIKV), le virus de la fièvre jaune (« Yellow Fever Virus », YFV), le virus de la dengue (« Dengue Virus », DENV) ou encore depuis 2007, le virus Zika (« Zika virus », ZIKV) responsable de plusieurs centaines de milliers d’infections et de milliers de cas de microcéphalies chez les nouveau-nés dans le Pacifique et en Amérique du Sud [18].

En 2016, les infections des voies respiratoires inférieures par des pathogènes, dont des virus respiratoires, restaient la 4^{ème} cause de mortalité dans le monde [19]. Le développement d’antiviraux efficaces est donc nécessaire pour lutter contre de tels problèmes de santé publique qui touchent l’ensemble de la population mondiale.

1- Début des Antiviraux

En 1963, la « Food and Drug Administration » (FDA) approuve la mise sur le marché de l’idoxuridine, première molécule antivirale dirigée contre les virus de la famille des *herpesvirus*. Depuis, seulement 90 molécules antivirales parmi les milliers proposées ont été acceptées par la FDA et ne sont dirigées que contre 9 infections virales humaines [20] : VIH, VHC, VHB, HSV (« Herpès Simplex Virus »), IV (« Influenza Virus »), hCMV (« human CytoMegalovirus »), VZV (« Varicella-Zoster Virus »), RSV (« Respiratory Syncytial Virus ») et HPV (« Human PapillomaVirus »).

Le succès thérapeutique de certaines molécules est indéniable, c’est par exemple le cas des nouveaux antiviraux dirigés spécifiquement contre le VHC (cf **Chapitre IV-7**). Ces molécules

ont contribué à l'amélioration de l'espérance de vie des patients atteints d'infections virales chroniques.

Le développement de nouveaux traitements a été accéléré ces dernières années suite aux problèmes économiques et sanitaire qu'ont pu poser les infections par des virus tels que le ZIKV ou encore EBOV. Néanmoins, il reste à ce jour plus de 200 maladies infectieuses humaines orphelines de traitements [20]. Avec l'émergence annuelle de nouvelles pandémies virales il est donc essentiel de mettre au point de nouvelles stratégies antivirales.

Une stratégie adoptée afin d'assurer une efficacité thérapeutique maximale est le développement de molécules antivirales à spectre large (« Broad-Spectrum Antiviral Agent » BSAA) pouvant toucher des virus de même genre, de genres différents mais au sein d'une même famille ou encore de familles virales différentes. Le but de cette stratégie est le développement d'un nombre restreint de molécules « pan-virales ». Le développement de ces molécules à large spectre permettra de réduire les coûts de vente et donc facilitera l'accès au traitement pour l'ensemble des populations touchées. De plus, cela améliorera la prise du traitement par les patients.

Les stratégies pour le développement d'agents antiviraux à spectre large se focalisent sur deux aspects : les étapes du cycle de vie du virus et le système de défense antivirale de l'hôte.

2- Antiviraux à Action Directe

Les Antiviraux à Action Directe ou DAA (« Direct Acting Antiviral ») sont des molécules ciblant directement les protéines virales ou le génome viral. Ces molécules ont pour but d'inhiber les différentes étapes du cycle de vie du virus telles que l'attachement, la fusion à la membrane, la réplication ou encore l'assemblage des particules virales. De manière générale, les DAAs sont dirigés contre la polymérase ou les protéases virales. Depuis mars 2014, 90 DAAs ont été approuvés par la FDA dont 26 molécules pour le traitement du VIH.

Dans le cas de l'infection par le VHC, l'efficacité thérapeutique de la combinaison de DAAs ciblant spécifiquement la polymérase et la protéase virale donne l'espoir d'une guérison totale des patients atteints d'hépatite chronique.

Néanmoins, Il faut souligner que l'utilisation seule de DAAs peut avoir certains désavantages, comme l'apparition de souches virales développant des mutations de résistance aux traitements, une forte toxicité cellulaire ainsi qu'un coût de vente élevé de par leur spécificité d'action.

Pourtant, certains DAAs peuvent avoir une action antivirale à spectre large. On peut citer le cas du Docosanol qui est un inhibiteur de l'attachement pour les virus HSV, HCMV et VZV de la famille des *Herpesviridae* [21, 22]. On peut également citer l'exemple du favipiravir ou T-705 qui est un inhibiteur de polymérase virales. Cette molécule a été développée au Japon en 2014 pour le traitement des infections par les virus influenza A, B et C mais a également une activité antivirale contre la réplication de nombreux virus à ARN de polarité positive et négative (*Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Picornaviridae*, *Calciviridae*, *Arenaviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae*, *Rhabdoviridae* et *Paramyxoviridae*) [23]. Récemment, l'effet antiviral du favipiravir a été montré dans le traitement de virus responsables de maladies émergentes tels que le ZIKV [24] ainsi que sur le virus EBOV avec une étude clinique (JIKI, signifiant espoir en Malinke) menée sur l'Homme en 2016 [25]. Enfin, la ribavirine est l'exemple même d'un antiviral à spectre large bien que son action antivirale reste toujours à être éclaircie. Depuis les années 1990, la ribavirine a été donnée dans le cas du traitement du VHC en combinaison avec de l'Interferon-alpha2bpégylé. Cette combinaison a permis d'obtenir un taux de réponse virologique, assimilable à une guérison totale, de 45% pour le génotype 1, de 65% pour le génotype 4, de 70% pour le génotype 3 et de 85% pour le génotype 2 [26]. La ribavirine, ainsi que l'interféron, sont toujours utilisés en combinaison des nouveaux antiviraux dirigés contre le VHC. Cette molécule est également efficace dans le cas d'infection par d'autres Flavivirus tels que le DENV, mais également chez d'autres familles virales (*Paramyxoviridae*, *Filoviridae*) [20].

3- Antiviraux ciblant l'hôte

Les antiviraux ciblant l'hôte ou HTAs (« Host-Targeting Agents ») sont des composés ciblant directement des facteurs de l'hôte et/ou des voies de signalisation cellulaire essentielles pour le cycle de vie des virus. Comme les DAAs, les HTAs peuvent cibler des facteurs impliqués dans différentes étapes du cycle viral.

Deux stratégies sont généralement utilisées dans le développement d'antiviraux dirigés contre l'hôte : la première est d'inhiber des facteurs cellulaires essentiels dits « proviraux », la deuxième est de stimuler les mécanismes de défense immunitaire dits « antiviraux ».

Pour la première stratégie, on peut citer comme exemple des HTAs ayant une spécificité d'action comme le Maraviroc (inhibiteur du co-récepteur CCR5 dans l'entrée du VIH) [27] ou le Miravirsén (antagoniste du microARN-122, facteur proviral pour la réplication du VHC) [28]. Il existe également des traitements basés sur des combinaisons de HTAs avec par exemple l'inhibition de la calmoduline et de la synthèse d'acide gras par le pimozide et le TOFA (acide 5-(Tétradécyl-oxy)-2-furoïque), respectivement. En combinaison, ces deux molécules ont montré un potentiel antiviral *in vitro* et *in vivo* contre le CHIKV [29]. Enfin, il existe des HTAs à spectre large qui peuvent cibler le métabolisme lipidique dont nombre de virus sont dépendants. On trouve comme exemple le cas des statines qui sont des hypolipémiants [30] ayant un effet antiviral sur HCV, HBV, HIV, DENV ou encore IV.

Une autre cible de l'hôte présentant un fort potentiel thérapeutique à large spectre est la famille des Cyclophilines. Ces protéines cellulaires sont impliquées dans le cycle de vie de nombreux virus et peuvent catalyser en amont d'un résidu amino-acidique proline le changement de conformation de la liaison peptidique de la forme *trans* à la forme *cis*, et inversement (activité peptidyl proly isomérase). De nombreuses molécules ont été développées pour inhiber l'activité de cette famille de protéines montrant des résultats concluants contre HCV mais également chez d'autres *flavivirus* [31].

La stimulation de la réponse Interferon (IFN) et de l'activité des gènes stimulés par l'IFN (« IFN-stimulated genes », ISGs) est un des exemples pouvant illustrer la deuxième stratégie. Deux molécules agonistes du TLR7 (« Toll-Like Receptor 7 »), l'imiquimod et la gardiquimod, ont prouvé leur succès en améliorant la réponse immunitaire de l'hôte lors de l'infection par HPV et contre les rhinovirus (famille des *Picornavirus*) [32].

On trouve également des HTAs provenant de sources naturelles (bactéries, champignons, plantes). La Cyclosporine A, qui inhibe l'activité enzymatique des cyclophilines et qui est utilisée en tant qu'immunosuppresseur pour prévenir le rejet de greffe, provient du champignon *Tolypocladium inflatum gams* et a montré un effet antiviral contre, par exemple, le virus de l'Hépatite B [33]. L'acide Mycophénolique (MPA) isolé du champignon

Penicillium stoloniferum, bloque la synthèse des acides nucléiques en interférant avec la biosynthèse des purines, de manière similaire à la Ribavirine. La MPA a un effet antiviral sur les virus DENV, WNV, HBV, HEV, HCV et HIV en interférant avec la synthèse du génome viral [34-37]. Le MPA a également été testée sur la souche MERS-CoV et a un effet antiviral en ciblant spécifiquement la protéase virale nsp3 PL (« papain-like protease ») [38, 39].

Les HTAs à large spectre peuvent ainsi couvrir de multiples virus, de génotypes ou de familles différentes en réduisant le risque d'apparition de mutations de résistance. Néanmoins, ils peuvent être à l'origine d'une forte toxicité due à la dérégulation de facteurs cellulaires essentiels ou d'un dérèglement du système immunitaire [40].

Le développement et la combinaison de DAAs et de HTAs comme antiviraux à large spectre sont donc des moyens efficaces pour lutter contre les infections virales émergentes en limitant la toxicité cellulaire ainsi que l'apparition de virus résistants.

II- Relation hôte-virus : Rôle des ARN non codants

Les virus utilisent des facteurs cellulaires pour survivre et se propager. Il existe donc des stratégies virales de détournement des voies cellulaires pour promouvoir l'infection. Ces mécanismes de détournement ciblent des facteurs protéiques ou nucléiques, conduisant à une altération de nombreuses voies cellulaires leur permettant d'échapper à l'immunité innée/adaptative de l'hôte, d'induire leur réplication et dans certains cas, induire un état d'infection chronique.

De récentes études génomiques et transcriptomiques ont démontré que plus de 80% du génome humain pouvait être transcrit et seulement 2% codent des protéines. Le reste du génome serait transcrit sous forme d'ARN non-codants [41, 42]. Ces ARN sont classifiés selon leur taille pour donner deux sous-groupes : les petits ARN non-codants (microARNs) de taille inférieure à 200 nucléotides (nt) et les longs ARN non-codants de taille supérieure à 200 nt. Cette catégorie d'ARN a été montrée comme jouant un rôle central dans certains processus physiologiques et pathologiques.

Dans ce chapitre nous étudierons les interactions entre le virus et l'hôte, en nous focalisant sur les longs ARN non codants (« long non-coding RNA », lncARN) et les microARNs

(« microRNA » miARN). Un schéma récapitulant la biogénèse de ces deux types d'ARN non-codants sera trouvé en **Annexe 1**.

A- Les Longs ARN Non-Codants

1- Biogénèse

De manière générale, les lncARNs se caractérisent par leur taille supérieure à 200 nt et par l'absence de cadre ouvert de lecture, ce qui les différencie des ARN messagers (ARNm). Ils sont souvent faiblement exprimés et tissus-spécifiques. Ils peuvent être classés selon plusieurs critères dont : leur emplacement sur le génome, leur localisation subcellulaire ou encore selon leurs mécanismes d'action [43]. La structure et les fonctions des lncARNs étant toujours en cours de caractérisation, aucune classification basée sur ces critères n'est fixée.

La régulation transcriptionnelle des lncARNs est proche de celle des ARNm. En effet, de façon similaire aux ARNm, les promoteurs des lncARNs détiennent les mêmes sites d'activation de la transcription sur la chromatine et leur activité peut être modulée *via* les modifications épigénétiques suivantes : la triméthylation de l'histone 3 et de la lysine 4 (H3K4me3), l'acétylation de l'histone 3 et de la lysine 9 (H3K9ac) et enfin par la monométhylation de l'histone 3 et de la lysine 27 (H3K27me1) [44]. Ces modifications vont permettre de générer différentes classes de lncARN. Le motif H3K9me3, associé à la répression de la transcription des ARNm, est associé à la transcription de lncARN intergéniques (compris entre deux régions codantes) appelés linCARN [45]. Les lncARNs peuvent également venir de la transcription sens ou antisens d'une séquence codante, d'une région codante mais à partir du brin antisens et éloigné de la partie codante pour l'ARNm, d'une région intronique ou d'un pseudogène (**Figure 2**) [41].

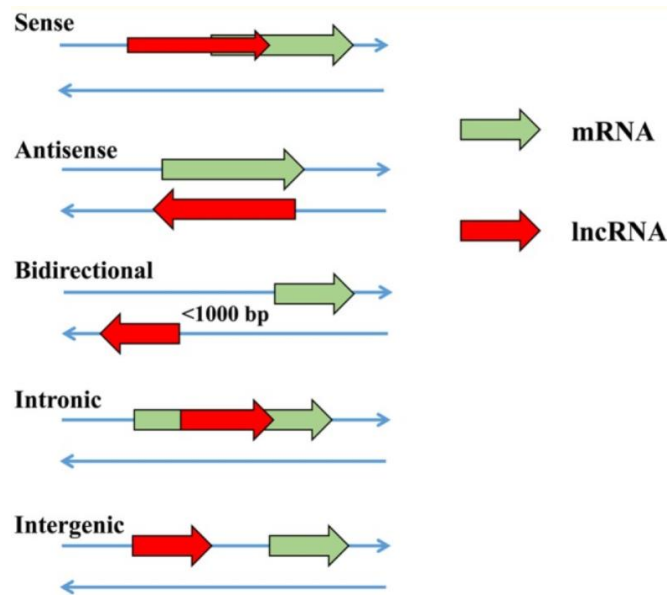


Figure 2 : Origine génomique des lncARNs. Les lncARNs peuvent venir de régions codantes, transcrits à partir du brin sens ou antisens codant l'ARNm, de région codante mais à partir du brin antisens et éloigné de la région codante pour l'ARNm, de région intronique entre deux exons ou de région intergénique [46].

La transcription est faite grâce à l'ARN polymérase II et nécessite le recrutement de facteurs de transcription (GATA, FOS) sur les sites de démarrage de la transcription.

Suite au recrutement du complexe d'initiation de la transcription, la phosphorylation du résidu sérine 5 localisé dans le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II permet l'addition de la coiffe au niveau de l'extrémité 5'-Non Codante (NC) de l'ARN néo-transcrit. L'ajout de la coiffe 7 méthyl guanosine (m^7G) confère une stabilité aux transcrits néoformés mais n'est pas présente chez tous les lncARNs. L'étape d'élongation se rapproche quant à elle du système de maturation des petits ARN non-codants et peut être régulée négativement par DICER1 et par le facteur oncogénique MYC [47].

Les transcrits des lncARNs peuvent être épissés par le complexe d'épissage des ARNm et peuvent également être épissés de manière alternative, permettant à partir d'un pré-ARN d'obtenir plusieurs isoformes différentes en éliminant des parties spécifiques du transcrit. On peut citer comme exemple le lncARN GNG12-AS1 pouvant donner jusqu'à 38 isoformes différentes [44, 48].

La stabilité du lncARN dépend également de la composition de sa région 3'-NC. Environ 60% des lncARNs peuvent avoir une queue poly(A) ajoutée de manière similaire à celle des ARNm (**Figure 3**) [49, 50]. L'interaction de cette séquence 3'-poly(A) avec la PABPC (« poly(A)-

binding protein cytoplasmic») cytoplasmique empêche la dégradation du transcrit à partir de son extrémité 3'-NC. A l'inverse, il a été montré que la protéine nucléaire PABPN1 (« poly(A)-binding protein nuclear 1 ») pouvait réguler négativement l'expression des lncARNs en permettant le recrutement du complexe de l'exosome nucléaire en 3' [51]. En l'absence de queue poly(A), la stabilité de certains lncARNs (MALAT1 et NEAT1) est assurée par la formation d'une structure secondaire en triple hélice au niveau de la région 3'-NC, ressemblant à la structure des ARN de transfert (ARNt) [52].

La présence de nombreux résidus sur la séquence des lncARNs permet une régulation post-transcriptionnelle. La modification la plus récurrente est la N6-méthyladénosine (m⁶A), retrouvée également chez les ARNm [47]. Ces modifications permettent de moduler la localisation ainsi que la fonction des lncARNs.

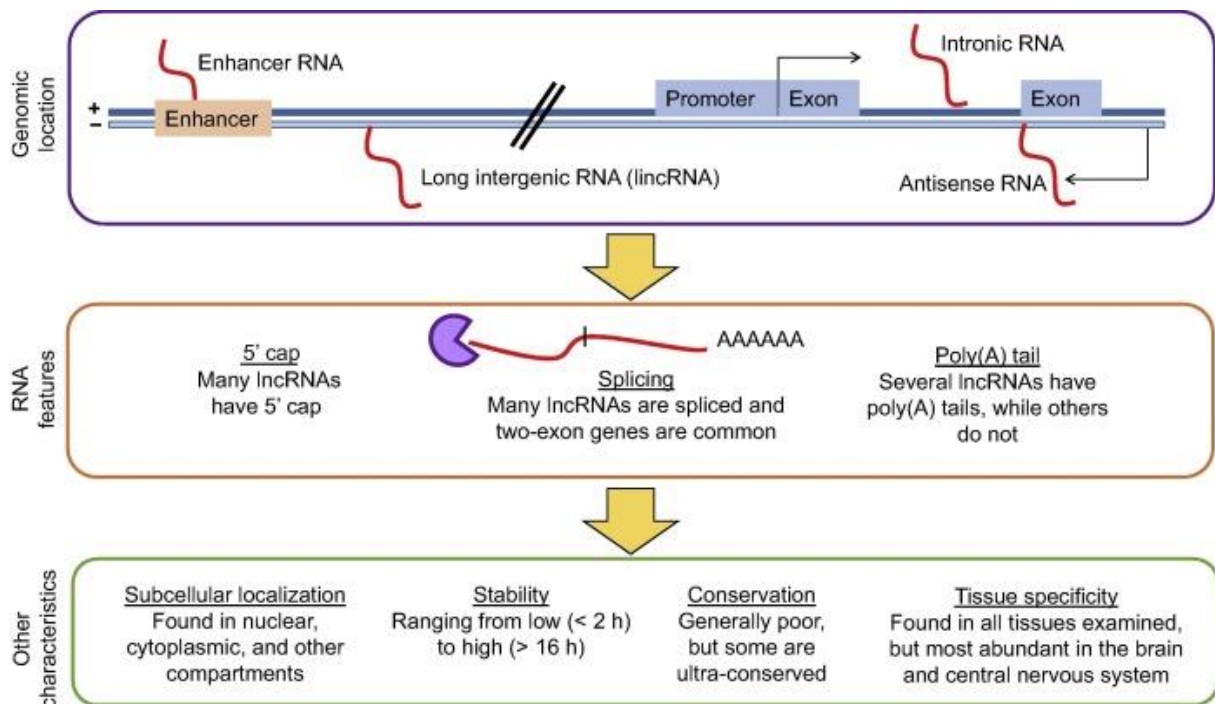


Figure 3: Différentes étapes de la biogénèse des lncARNs et principales caractéristiques. Les lncARNs sont transcrits à partir de différentes régions puis sont coiffés, polyadénylés et la plupart vont subir une étape d'épissage. Les lncARNs sont présents dans tous les compartiments cellulaires, leur stabilité est variable selon leurs fonction et ils sont généralement spécifiques d'un tissu donné [50].

2- Localisation subcellulaire et fonctions

Les lncARNs sont retrouvés principalement dans le noyau où ils participent à la régulation de différents processus tels que la modulation de l'état de la chromatine (**Figure 4A**),

l'organisation des domaines nucléaires ou encore la régulation de la transcription (**Figure 4B**) [53]. Ils peuvent également participer à l'épissage de certains pré-ARNm (**Figure 4C**) [54] et à la formation de structures nucléaires appelées « paraspeckle » impliquées dans la rétention d'ARNm (**Figure 4H**) [55].

Les lncARNs peuvent aussi être retrouvés dans le cytoplasme où leurs rôles sont multiples. Ils participent à la régulation de l'expression des ARNm au niveau traductionnel et au niveau de leur dégradation (**Figure 4D**), à la dégradation de certaines protéines (**Figure 4G**), à l'activation de voies cellulaires telles que la voie NF- κ B et au transport de protéines dans les différents compartiments cellulaires (**Figure 4I**) [56].

Plus récemment, les lncARNs ont été impliqués dans les mécanismes de régulation de l'expression des gènes par « effet éponge ». Leurs structures secondaires permettent leur interaction avec des acides nucléiques (ADN/ARN) et des « RNA-Binding Protein » (RBP). Ces interactions permettent aux lncARNs de contrôler la régulation de l'expression des gènes. Ils peuvent servir de molécules « leurre » pour les RBPs. Cette interaction crée une dérégulation de l'expression des ARNm cibles, influençant l'abondance et la traduction de ces derniers.

Cette association lncARN/RBPs peut affecter la localisation des lncARNs en séquestrant ce complexe dans un compartiment cellulaire spécifique et ainsi moduler des processus tels que la division cellulaire, la réponse oncogénique ou encore la différenciation des cellules musculaires [47].

Les lncARNs peuvent également interagir avec les miARNs. Cette interaction permet de réduire la biodisponibilité des miARNs pour le complexe d'interférence RISC (« RNA-Induced Silencing Complex ») et de contrôler le niveau d'expression des cibles ARNm de ces microARNs (**Figure 4E**) [56]. Enfin, certains lncARNs peuvent servir de précurseur pour la formation d'ARN non codants tels que des siARNs (régulateur de l'expression de gènes en dégradant les transcrits ARNm) (**Figure 4F**) [57-59] ou pour la formation de micro-peptides fonctionnels comme le peptide provenant du lncARN HOXB-AS3 impliqué dans le cancer du côlon en antagonisant la protéine hnRNPA1 responsable de la reprogrammation métabolique induite par le cancer [60, 61].

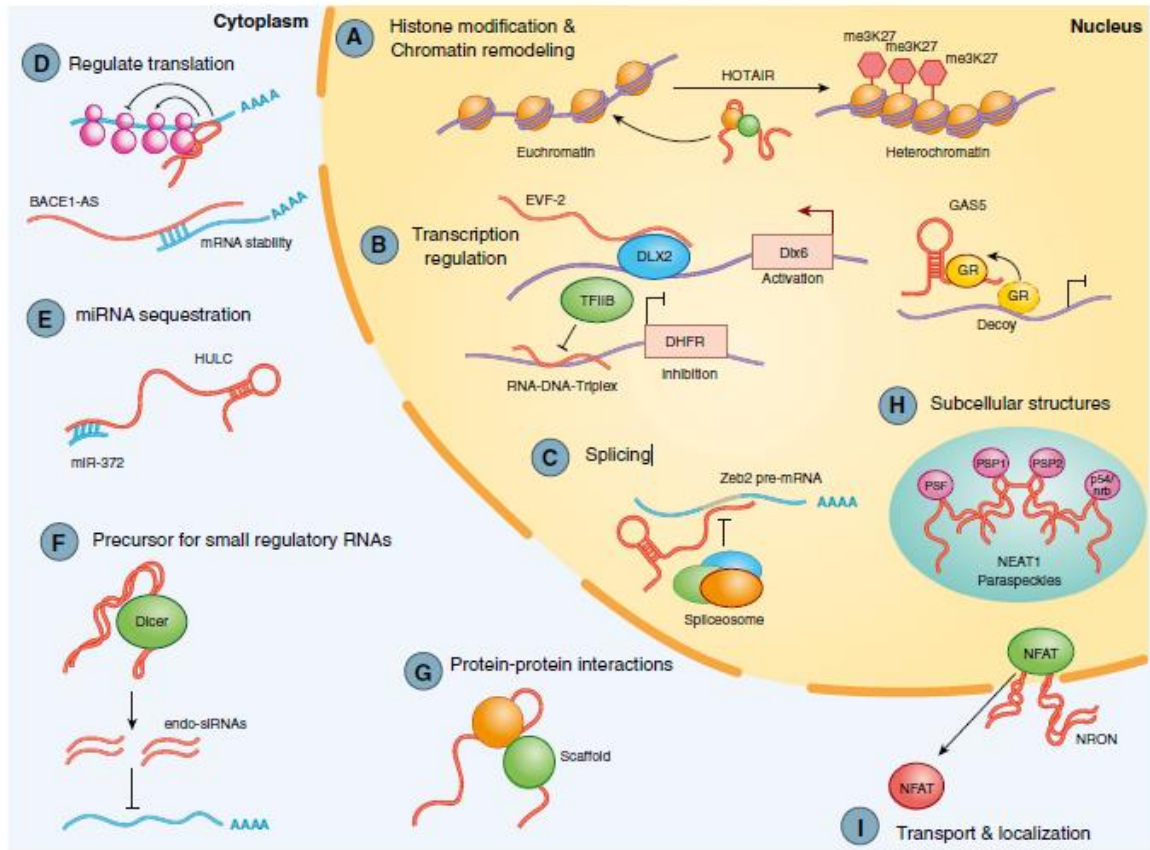


Figure 4: Rôles principaux des lncARNs dans la cellule. A : Les lncARNs guident le complexe de remodelage de la chromatine permettant le contrôle de la balance entre l'hétérochromatine et l'euchromatine B : Régulation de la transcription en favorisant le recrutement de l'ARN polymérase II, de facteurs ou de co-facteurs de transcription C : Participation à l'épissage des pré-ARNm D : Régulation de la traduction et de la stabilité des ARNm par complémentarité de séquence E : Séquestration des miARNs F : Précurseur de petits ARN non-codants G : Interaction avec des protéines H : Formation de structure subcellulaire pouvant séquestrer des protéines I : Transport de protéines. [62]

3- Dégradation des lncARNs

En 2012, une étude a montré que sur 800 lncARNs de mammifère testés, 29% étaient considérés comme instables avec une demi-vie inférieure à 2h, contrairement à 17% chez les ARNm. La stabilité des lncARNs pourrait dépendre de leur localisation sur le génome et de leur degré d'épissage. Un lncARN ayant subi une étape d'épissage semblerait être plus stable qu'un lncARN non-épissé provenant d'une région exonique. [63]

La majorité des lncARNs est structurellement proche des ARNm (7meG coiffe en 5' et queue poly(A) en 3') et peut être dégradée par la machinerie de dégradation des ARNm. La voie canonique de dégradation des ARNm est composée d'étapes de clivage de la coiffe, au niveau de l'extrémité 5'-NC, par la famille de RNases DCP (« mRNA Decapping »), et d'une

étape de déadénylation de l'extrémité 3'-NC par un complexe multi-protéique composé de ribonucléases et de déadénylases. La déadénylation de la queue poly(A) entraîne une déstabilisation de l'extrémité 3'-NC permettant le recrutement du complexe catalytique de l'exosome. Ce complexe nucléaire et cytoplasmique est composé d'une enzyme principale, Rrp41 assurant l'activité catalytique et de co-facteurs protéiques. Suite à la suppression de ces éléments stabilisateurs aux extrémités 5' et 3', la dégradation se poursuit par l'action d'exoribonucléases telles que les protéines de la famille XRN ou d'endoribonucléases telles que les protéines RMP1 ou IRE1.

Les lncARNs peuvent également être dégradés par la voie des miARNs et du complexe RISC. On peut citer comme exemple la dégradation des lncARNs *LINCARNAP21* et *HOTAIR* par le microARN let-7b [64, 65].

Enfin, plusieurs RBPs sont impliquées dans la dégradation des lncARNs. Leur capacité d'interaction spécifique avec les acides nucléiques permet aux RBPs de contrôler la stabilité ou la dégradation des lncARNs. La dégradation est activée par la reconnaissance de motifs spécifiques sur les lncARNs. Un exemple connu est celui de la protéine AUF1 qui a une affinité pour les régions riches en U/GU et peut interagir avec le lncARN NEAT1 conduisant à sa dégradation (**Figure 5**) [66].

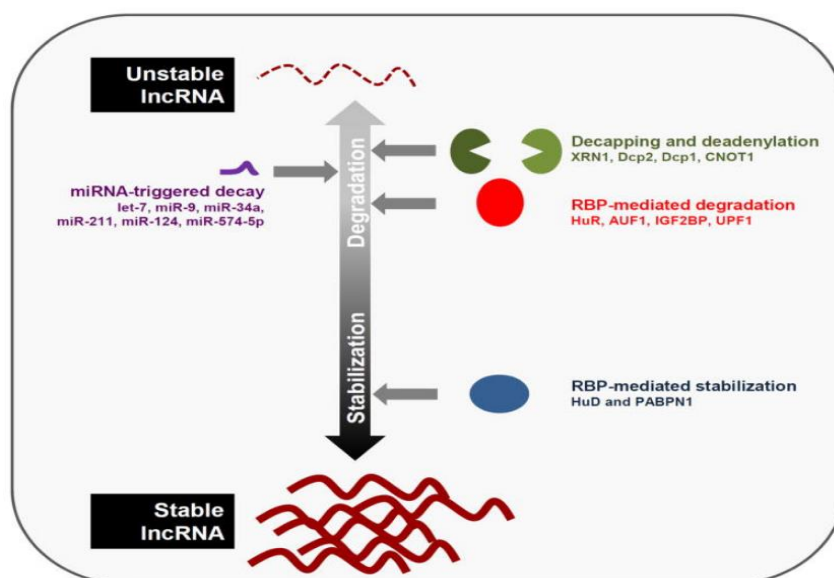


Figure 5 : Mécanismes moléculaires illustrant la balance entre la dégradation et la stabilité des lncARNs. La stabilité des lncARNs dépend de leur interaction avec d'autres facteurs protéiques ou ARN.

La déstabilisation et la dégradation des lncARNs sont dues au recrutement de RBPs telles que AUF1 ou de miARNs puis à l'action d'exo- ou d'endonucléases [67].

4- *LncARNs et infections virales*

Les infections virales induisent d'importantes modifications dans l'expression des gènes cellulaires. Le développement de technologies telles que le séquençage à haut débit a permis l'analyse du transcriptome de cellules infectées, mettant en évidence l'altération de l'expression de milliers de lncARNs cellulaires ou viraux [68].

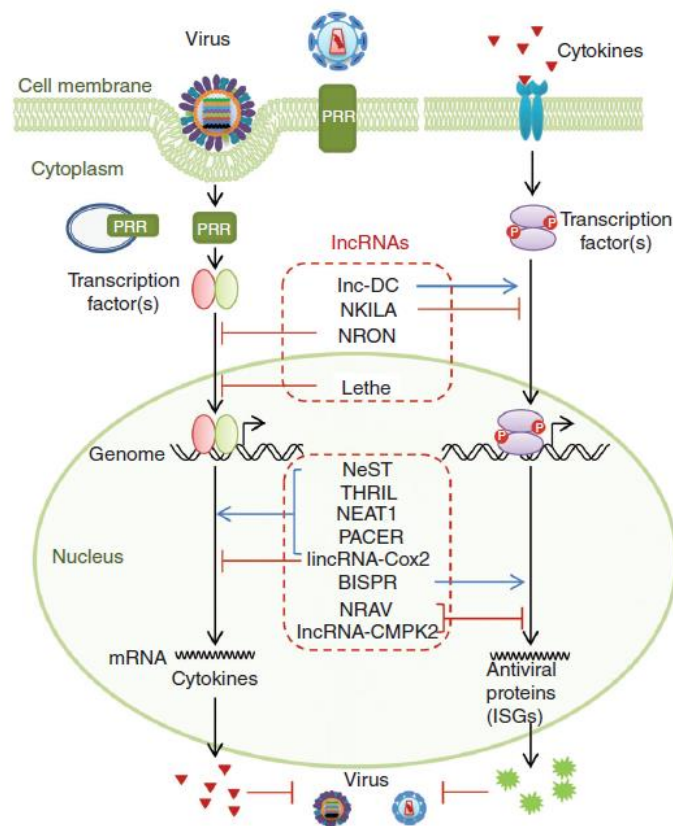


Figure 6: Implication des lncARNs dans la réponse immunitaire innée lors d'infections virales.

Les lncARNs peuvent participer à la réponse immunitaire innée en permettant la transcription de cytokine, en régulant les facteurs de transcription. Le virus peut également contrôler leur expression afin d'améliorer son cycle de vie.[68]

LncARNs dans la réponse cellulaire antivirale :

Lors de l'infection virale, la réponse immunitaire innée est déclenchée par la reconnaissance des pathogènes par des récepteurs spécifiques appelés PRR ("Pathogen Recognition Receptor"). Ces récepteurs peuvent être à la membrane de la cellule (« Toll-Like Receptor »,

TLRs 2 et 4), à la surface de l'endosome (TLRs 3, 7/8 et 9) ou dans le cytoplasme (RIG-I, MDA5) et vont permettre l'activation de facteurs de transcription tel que NF- κ B, essentiel dans la réponse immunitaire innée [68]. L'expression de lncARNs peut être modulée par ces PRRs. Le TLR2, présent à la surface des macrophages et des monocytes, peut induire l'expression de 159 lncARNs dont le lncARN THRIL impliqué dans l'activation du TNF- α et dans la réponse antivirale (**Figure 6**).

Les lncARNs peuvent également être acteur du processus de réponse antiviral en régulant des facteurs de transcription. Lors de l'infection à Hantavirus (HNTV), l'induction du lncARN NEAT1 par la voie RIG-I/IRF7 conduit à une boucle de rétrocontrôle positive. En effet, l'induction de ce lncARN entraîne la séquestration du facteur SPQF (« splicing factor proline- and glutamine-rich protein ») au niveau des paraspeckles. La séquestration de ce facteur promeut la transcription des facteurs RIG-I et DDX60 conduisant à l'activation de la voie de l'Interféron (IFN) et à la transcription du lncARN NEAT1 [69].

LncARNs en tant que facteurs proviraux :

Les virus sont également capables de moduler l'expression des lncARNs cellulaires pour favoriser leur cycle de vie. On peut donner comme exemple le lncARN-CMPK2 qui est surexprimé lors de l'infection VHC et va promouvoir l'infection en inhibant la réponse IFN [70]. Ceci est également le cas avec la surexpression du lncARN Lethe conduisant à l'inhibition de la voie NF- κ B, à la diminution de la transcription des interleukines IL-6 et -8 et à l'augmentation de facteurs cellulaires essentiels à la réplication du VHC [71].

Lors de l'infection par le virus Influenza A, l'augmentation de l'expression du lncARN-PAAN (« PA-associated noncoding RNA ») et son association à la protéine virale PA, composante du complexe de réplication, favorise la réplication [72].

Le lncARN NRON (« noncoding Repressor of NFAT ») est capable de s'associer au facteur NFAT phosphorylé et d'empêcher sa relocalisation nucléaire. Lors de l'infection par le VIH, la diminution de l'expression de ce lncARN conduit à une relocalisation nucléaire de NFAT où il peut ainsi être détourné par le virus pour faciliter sa traduction et sa réplication [73].

Enfin, une des stratégies adoptées par les virus pour favoriser l'infection est de mimer certains mécanismes moléculaires de la cellule. Certains virus ont ainsi développé la capacité de synthétiser leurs propres lncARNs.

On peut citer les sfARNs (« subgenomic flavivirus RNA ») retrouvés lors de l'infection par certains *Flavivirus*, qui sont issus de la dégradation partielle du génome viral par l'exonucléase cellulaire 5'→3' XRN1 (**Figure 7**). L'arrêt de l'action de XRN1 et donc le début de la formation du sfARN se fait généralement à 525 nt de l'extrémité 3'-NC du génome viral [74]. L'accumulation de cet ARN subgénomique et son interaction directe avec XRN1 inhibe l'activité de cette exonucléase. De ce fait, les cibles ARNm de cette RNase ne sont plus dégradées et leur accumulation entraîne une dérégulation dramatique de l'expression des gènes. Les sfARNs sont aussi impliqués dans l'inhibition de la voie IFN par un mécanisme encore peu connu [74]. Ceci permet au virus d'échapper au système immunitaire et participe à sa pathogénicité [75].

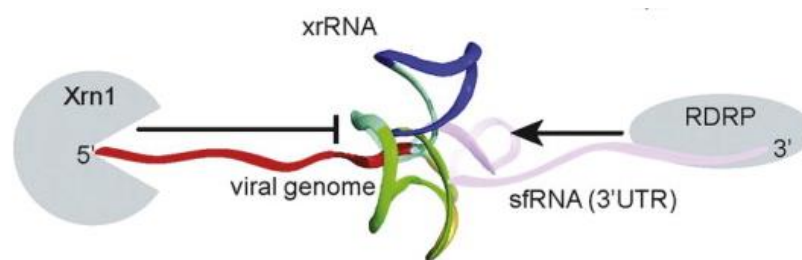


Figure 7: Formation du sfARN des *Flavivirus*. La RNase cellulaire XRN1 dégrade le génome viral par l'extrémité 5' et est arrêtée par une structure tige permettant la formation d'une structure virale tronquée appelée sfARN à 525 nt de la région 3'UTR [74].

Les lncARNs viraux sont transcrits par les polymérases cellulaires II ou III, retrouvés dans le noyau et dans le cytoplasme et peuvent être, de la même manière que les lncARNs cellulaires, polyadénylés comme le lncARN PAN [76].

Ce dernier est exprimé par le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (« Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus », KSHV). Ce lncARN viral est retrouvé dans le noyau et est abondant lors de la phase lytique du cycle viral. Il entraîne la diminution de plusieurs facteurs régulateurs de l'immunité dont l'IL-18, la RNase L, l'IFN-16 et l'IFN γ à travers l'inhibition de facteurs de transcription tels qu'IRF4. PAN participe aussi à la régulation du

cycle viral en interagissant avec les déméthylases UTX et JMJD3, permettant de modifier post-transcriptionnellement le génome viral et de passer de la phase latente à la phase lytique. Enfin, il aide au maintien de la phase latente en interagissant avec le facteur viral LANA [46].

La découverte récente des lncARNs et l'étude de leurs différents domaines de compétence font d'eux des cibles d'étude intéressantes dans la compréhension des mécanismes viraux et dans le développement de nouvelles stratégies antivirales.

B- Les microARNs

1- Biogénèse

Les microARNs font partis de la famille des petits ARNs non-codants et ont une longueur d'environ 22 nucléotides. En 1993, l'équipe de Lee, Feinbaum et Ambros découvre chez *C.elegans* un petit ARN non codant capable de réguler le développement larvaire. Il s'agit du premier microARN découvert appelé lin-4 [77]. Depuis, plus de 10 000 microARNs ont été identifiés chez diverses espèces telles que l'Homme, les plantes ou encore chez les virus.

La biogénèse des microARNs chez l'Homme est un processus complexe, la connaissance des différentes étapes de maturation est en constante évolution.

Voie Canonique de maturation des miARNs

Les miARNs matures sont le résultat de clivages de transcrits appelés « microARN primaires » (pri-microARNs) qui présentent une taille supérieure à 1kb. Les pri-miARNs peuvent être transcrits à partir de différentes régions sur le génome. Chez l'Homme, les microARNs viennent de régions introniques (mirtrons), de régions exoniques ou de régions intergéniques. Les séquences à l'origine de la transcription des miARNs sont souvent regroupées et donnent une entité transcriptionnelle polycistronique. Ces miARNs sont en général co-transcrits et subissent des clivages post-transcriptionnellement [78]. La transcription des pri-miARNs est faite par la ARN polymérase II mais peut être faite par la ARN polymérase III lorsqu'il s'agit de microARNs viraux [79, 80].

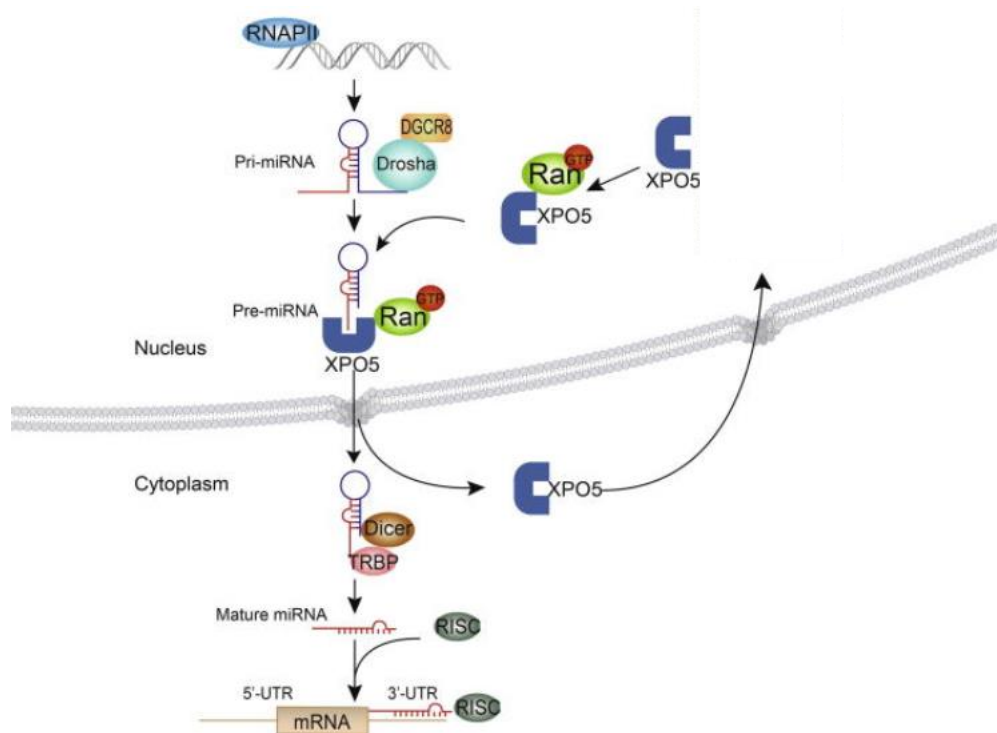


Figure 8 : Voie canonique de maturation des microARNs. Le pri-miARN est transcrit dans le noyau où une première étape de clivage va être effectuée par le complexe protéique DROSHA/DGCR-8 donnant un pré-miARN. Cette forme va ensuite être exportée vers le cytoplasme par l'Exportine-5 et libérée grâce à l'hydrolyse du GTP en GPD. Une dernière étape de maturation va être processée par la protéine DICER donnant un microARN mature pouvant être pris en charge par le complexe d'interférence RISC. Adapté de [81]

Le pri-miARN contient des structures en tige boucle dans lesquelles se trouvent les séquences des miARNs matures. Les pri-miARNs sont coiffés à leur extrémité 5' et polyadénylés à leur extrémité 3' de la même manière que les ARNm [82].

La structure du pri-miARN est essentielle pour définir l'efficacité avec laquelle il sera maturé. Il est composé dans sa partie apicale d'une boucle terminale de 10 nucléotides. La taille de la boucle ne doit pas dépasser 15 nucléotides au risque de voir une diminution de l'efficacité de maturation du pri-miARN. Le duplex formant le miARN mature est situé entre la boucle terminale et la partie basale et fait 22 nucléotides [83-85]. Il contient généralement des mésappariements de type G:U (« G:U wobble pair ») et des nucléotides non-appariés formant des renflements dans la structure du duplex. La partie basale forme le socle de la tige boucle et est relativement stable (**Figure 9**). Des motifs conservés sont retrouvés chez 79% des miARNs humains, dont le motif UG localisé à l'extrémité 5'-NC et le motif CNNC à l'extrémité 3'-NC du pri-miARN. Le motif CNNC permet une interaction avec la protéine SRp20 qui est un facteur d'épissage et améliore le clivage du pri-miARN [83].

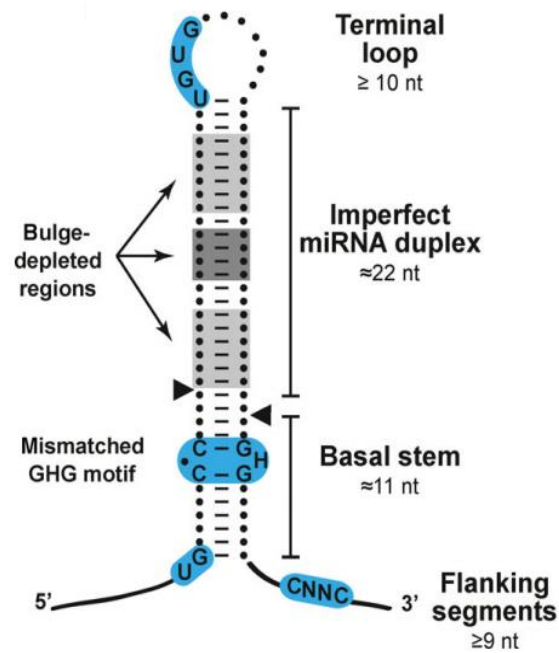


Figure 9: Structure de la tige-boucle du pri-miARN à l'origine de microARN mature. Les différents domaines retrouvés sur la structure tige-boucle du pri-miARN participent au processus de maturation en permettant le recrutement de facteurs protéiques et définissent également l'efficacité avec laquelle sera maturé le microARN [86].

La première étape de maturation des pri-miARNs en miARNs est effectuée par un complexe multi-protéique appelé « complexe microprocesseur » constitué des protéines DROSHA et DGCR8 (**Figure 8**).

DROSHA est une protéine principalement nucléaire appartenant à la famille des endonucléases à ARN de type III agissant sur les ARNs double brin. Elle compose le cœur du complexe de maturation des pri-miARNs. Link et *al* ont montré en 2016 que l'épissage de l'ARNm de DROSHA pouvait conduire à la formation de différentes isoformes pouvant également être présente au niveau du cytoplasme. La localisation de DROSHA dans le cytoplasme a par exemple été associée à l'interaction avec des pri-miARNs viraux circulaires [87].

DROSHA est composée d'un domaine N-terminal nécessaire à sa localisation nucléaire, un domaine central CED (« central domain ») essentiel à son activité catalytique, deux domaines en tandem ayant une activité RNase de type III, RIIIDa et RIIIDb, un domaine d'interaction avec les ARNs double brin (« double-stranded RNA-binding domain») et un domaine C-terminal (**Figure 10**). Le premier domaine RIIIDa a une activité catalytique sur la partie 3' du

pri-miARN et le domaine RIIIDb sur la partie 5'. Le domaine de fixation aux ARN est essentiel mais insuffisant pour créer une interaction assez forte avec le substrat [86, 88, 89].

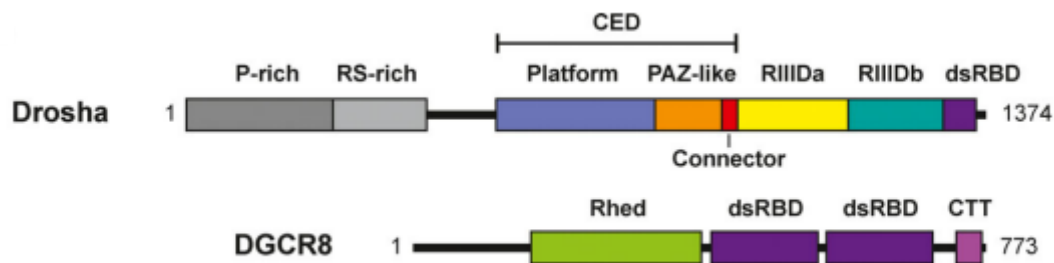


Figure 10: Structure des protéines du complexe catalytique, DROSHA et DGCR8 chez l'Homme. [86]

La protéine DGCR8 (« DiGeorge syndrome chromosomal region 8 ») est le co-facteur du complexe. Il s'agit d'une protéine nucléaire composée d'un domaine N-terminal contenant une séquence de localisation nucléaire suivit d'un domaine hème (« RNA-binding heme domain », Rhed) d'interaction avec les ARNs, de deux domaines d'interaction avec les ARNs double brin et d'une région C-terminale. Le domaine Rhed est nécessaire pour la dimérisation de DGCR8 et pour le processus de clivage des pri-miARNs. L'interaction de DGCR8 avec DROSHA se fait par sa partie C-terminale [90].

Le mécanisme de reconnaissance des pri-miARNs par le complexe DROSHA/DGCR8 a été longtemps controversé. Certaines études ont montré que le complexe se fixait au niveau de la boucle terminale du pri-miARN, permettant à DROSHA d'exercer son activité catalytique et de libérer le transcript néo-formé (miARN précurseur). Un autre modèle suggère que la protéine DGCR8 peut reconnaître la partie simple brin à la base de la tige boucle du pri-miARN et recrute ensuite DROSHA. Les deux parties, apicale et basale, sont en réalité essentielles et coordonnent la fixation du complexe et le clivage du pri-miARN. Le pri-miARN est clivé par DROSHA à 11 nucléotides de la partie basale et à 22 nucléotides du début de la partie apicale [84, 91]. Le complexe DROSHA/DGCR8 peut également nécessiter la présence de co-facteurs protéiques tels que KSRP (« KH Splicing Regulatory Protein ») pour améliorer la fixation du complexe sur le pri-miARN [92].

Ce nouveau transcrit est appelé miARN précurseur (pré-miARN) et fait une taille d'environ 65 nucléotides. Suite à cette première étape de maturation nucléaire, le pré-miARN est pris

en charge par un complexe de transport nucléo-cytoplasmique composé des protéines nucléaires : « Exportin 5 » (XPO5) et « RAN-GTP » (« GTP-binding nuclear protein »). Le pré-miARN est exporté vers le cytoplasme où l'hydrolyse du GTP en GDP par la famille des GTPases permet sa libération du complexe de transport dans le cytosol [93, 94].

Le pré-miARN est ensuite clivé par la protéine DICER (**Figure 8**).

DICER est une endonucléase à ARN de type III principalement cytoplasmique. Il existe différents homologues chez la Drosophile mais une forme unique chez l'Homme. La protéine est composée d'un domaine N-terminal hélicase, qui facilite la reconnaissance des pré-miARNs en interagissant avec leur boucle terminale, un domaine de fixation à l'ATP sur lequel se fixe le co-facteur TRBP, un domaine hélicase, un domaine PIWI-AGO-ZWILLE (PAZ) fixant les extrémités 5' et 3' du pré-miARN, une partie catalytique composée des domaines RNases III, RIIIDa et RIIIDb et enfin un domaine de fixation aux ARN double brin (**Figure 11**). La partie C-terminale de la protéine permet une dimérisation intramoléculaire créant une poche catalytique pour les pré-miARNs [95-97].

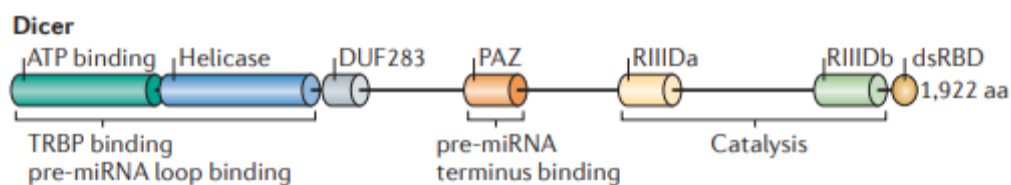


Figure 11: Structure de la protéine DICER. La protéine est composée d'un domaine de fixation au miARN, d'un domaine hélicase, d'un domaine PAZ interagissant avec les extrémités du pré-miARN et d'une partie catalytique [98].

DICER se fixe préférentiellement sur les pré-miARNs ayant deux nucléotides supplémentaires au niveau de la partie basale en 3'. La fixation se fait au niveau de l'extrémité 3'-NC du pré-miARN, à 21-25 nucléotides de la partie double brin [97, 99]. Chez les mammifères et les drosophiles, DICER se fixe aussi sur l'extrémité 5'-NC du pré-miARN et entraîne un clivage ne laissant que 22 nucléotides en amont de la tige-boucle [100]. La protéine DICER peut interagir avec des co-facteurs protéiques tels que TRBP (« TAR RNA-Binding Protein »), PACT (« Protein activator of PKR ») ou KSRP. Le rôle de PACT dans le clivage des pré-miARNs est encore peu connu. En revanche, TRBP module l'efficacité de maturation des pré-miARNs

ainsi que leur longueur et KSRP influence la fixation de DICER à certains pré-miARNs en interagissant avec leur boucle terminale [101, 102].

En 2012, Xhemalce et *al* ont montré que l'ARN méthyltransférase BCDIN3D était capable de rajouter un groupement O-méthyl au niveau de l'extrémité 5' monophosphate des pré-miARN-145 et -23b. Cette modification empêcherait la fixation de DICER, l'interruption de la maturation des miARNs et un changement dans la régulation de l'expression des gènes cibles de ces miARNs [103].

Le clivage par DICER conduit à la formation d'un miARN double brin. Ce duplex est pris en charge par des protéines de la famille AGO pour donner un miARN mature et fonctionnel et former le complexe d'interférence ARN, RISC (« RNA-induced silencing complex »).

L'assemblage du complexe RISC se compose de deux étapes, (i) la prise en charge du duplex par le complexe protéique et (ii) l'élimination d'un des deux brins du duplex. Le complexe RISC est formé principalement par la famille de protéines endonucléases Argonaute et par un miARN guide reconnaissant l'ARNm cible [104, 105].

Les protéines de la famille Argonaute sont présentes dans le génome de la plupart des eucaryotes, des bactéries et des archées. La famille est divisée en 3 classes, AGO, PIWI et WAGO, en fonction de leurs mécanismes d'action et de l'ARN avec lequel elles interagissent. Les protéines AGO se fixent aux siARNs et aux miARNs et sont au nombre de quatre sous-familles chez l'Homme AGO1, AGO2, AGO3 et AGO4 [98, 106].

La structure des protéines AGO est très conservée chez les eucaryotes. Elle se compose de quatre domaines : un domaine N-terminal, un domaine PAZ permettant la fixation à l'extrémité 3' de l'ARN guide, un domaine MID (« middle ») contenant une poche où se fixe l'extrémité 5' du miARN guide et un domaine PIWI, appartenant à la famille enzymatique des RNAses H, responsable de l'activité catalytique de la protéine (**Figure 12**) [107, 108].

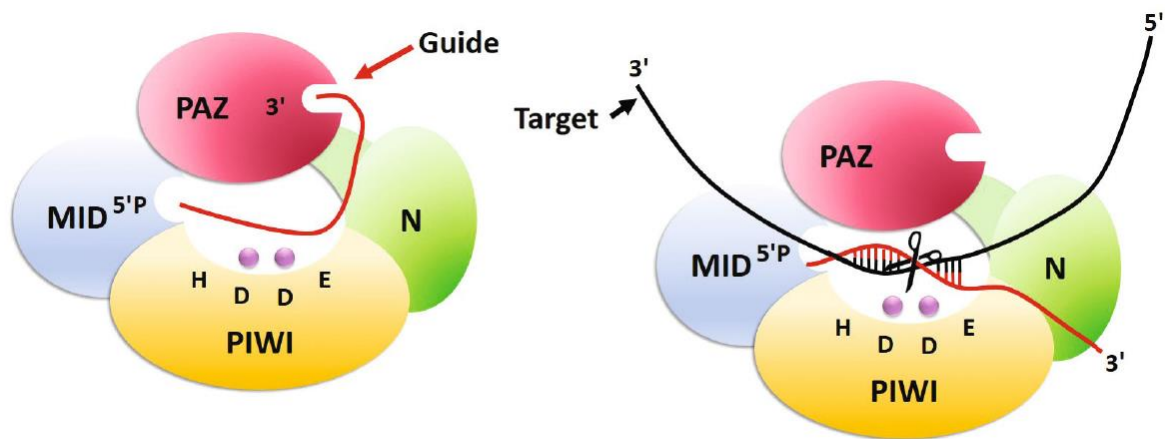


Figure 12 : Structure de la protéine AGO composant le cœur catalytique du complexe d'interférence RISC. A gauche : structure du complexe comportant le miARN guide A droite : Structure du complexe lors de l'interaction avec un ARNm cible. [105]

Lors de la formation du complexe RISC, le miARN duplex va être clivé et un seul des brins, l'ARN guide sera conservé dans le complexe RISC mature (miRISC). Le choix du brin chargé dans le complexe dépend de la stabilité de son extrémité 5', des protéines composant le complexe mais également du type cellulaire, de l'état de développement cellulaire ou de la présence de pathogènes. Les deux brins du duplex peuvent donc former séparément, avec AGO, un complexe mature ayant des cibles ARNm différentes [98, 109-111].

Le complexe RISC peut influencer l'expression des gènes à deux niveaux : de manière post-transcriptionnelle en entraînant la dégradation des ARNm ou en inhibant leur traduction et au niveau transcriptionnel en régulant la méthylation de l'ADN (**Figure 13**) [112].

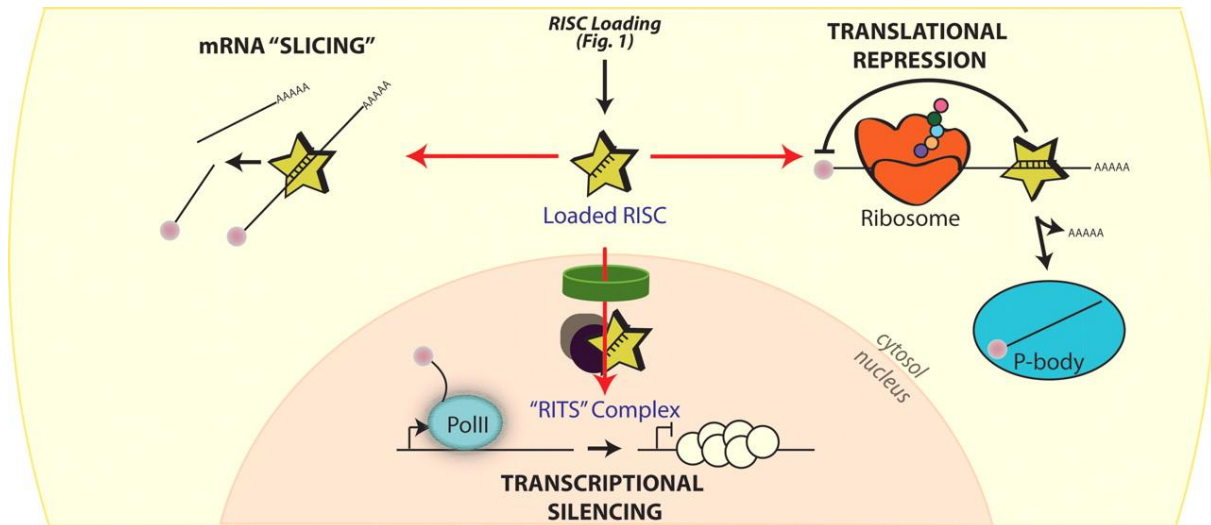


Figure 13: Rôles multiples du complexe RISC. Le complexe chargé avec un miARN guide va pouvoir participer à la répression de la traduction et à la dégradation de sa cible mais peut également participer au contrôle de la transcription en interagissant directement avec l'ADN génomique. Enfin, ce complexe peut participer au processus d'épissage des ARNm [113].

La complémentarité entre l'ARN guide et l'ARNm détermine le devenir de l'ARNm. Cette complémentarité est définie grâce à la région « seed » de 8 nucléotides, à l'extrémité 5' de l'ARN guide. Si l'appariement entre l'ARN guide et l'extrémité 3' de l'ARNm est parfait l'ARNm sera clivé et dégradé, en revanche si l'appariement est imparfait il y aura uniquement répression de la traduction [114]. Le complexe RISC peut également être impliqué dans le contrôle de la transcription en interagissant directement avec l'ADN ou bien participer à l'épissage de certains pré-ARNm [113].

Voie Non Canonique de maturation des miARNs

D'autres mécanismes peuvent être à l'origine de la maturation des miARNs. En effet, il a été montré, dans le cas de cellules déficientes pour DGCR8, DROSHA ou DICER, que certains miARNs étaient produits de manière non conventionnelle, et donc indépendamment de ces facteurs (**Figure 14**). Le premier mécanisme à avoir été décrit est celui de la production de miARN à partir de mirtrons. Les mirtrons sont des microARNs localisés dans les introns des ARNm. Leur maturation est indépendante de DROSHA et DGCR8 et le pré-miARN est généré grâce à l'épissage du pré-ARNm [115]. Le pré-miARN est ensuite exporté et rejoint la voie canonique de maturation des miARNs (voir ci-dessus). De plus, dans le cas du miR-320, la transcription peut donner directement un pré-miARN coiffé, indépendamment de l'action de

DROSHA, qui sera exporté dans le cytoplasme par l'Exportine 1 (différent de la voie canonique) et mûré par DICER [116].

La maturation de la plupart des miARNs est dépendante de DICER mais on trouve certains cas particuliers. Le miR-451 est clivé une première fois par DROSHA mais donne une tige boucle dont la longueur ne peut être prise en charge par DICER. Le pré-miARN est directement clivé par AGO2 puis par la protéine PARN (« poly(A) ribonucléase ») à son extrémité 3', donnant un miARN mature [117].

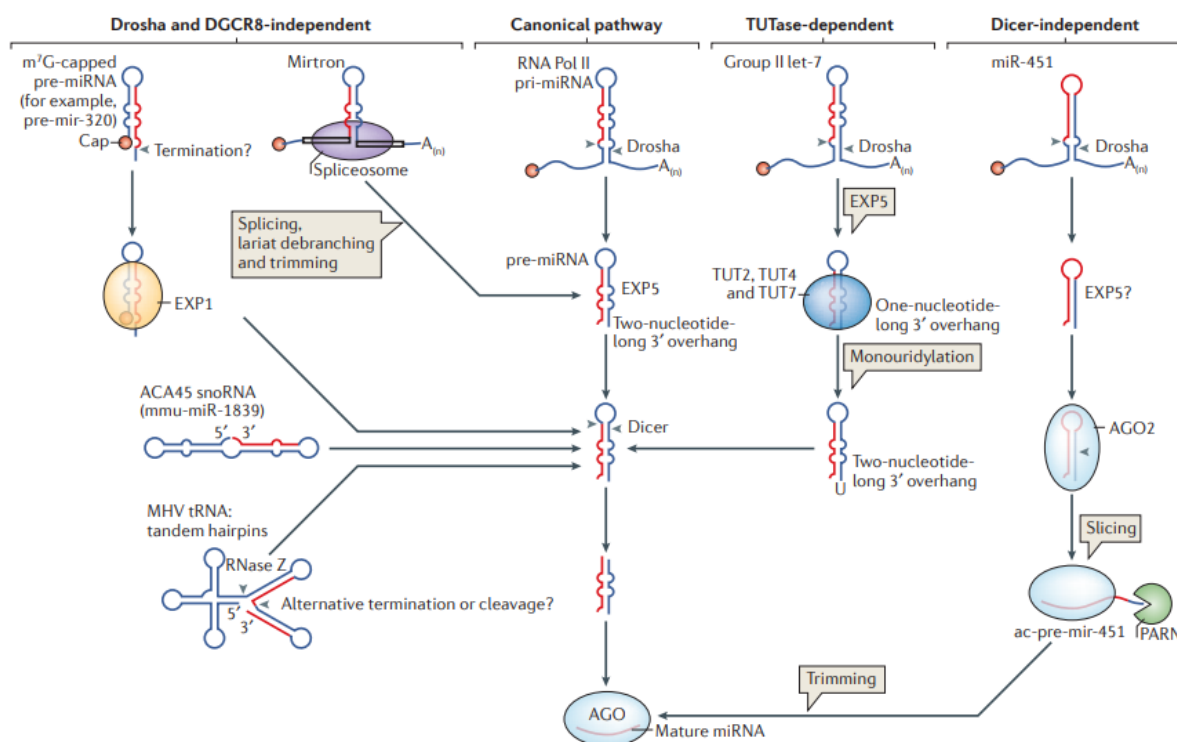


Figure 14 : Voies de maturation des microARNs dépendantes et indépendantes des facteurs protéiques DROSHA, DGCR8 et DICER. [98]

L'existence d'autres voies de maturation reflète la possibilité d'évolution de la biogénèse des miARNs. Cependant, seulement 1% des miARNs proviendraient de voies de maturation non-canoniques [98].

2- Dégradation des microARNs

Les microARNs font partis des membres les plus stables de la famille des ARNs [118]. Certains microARNs, comme le miR-125b, ont une demi-vie de 225h illustrant leur stabilité [119]. Cependant, la durée de vie des miARNs peut dépendre de leur rôle au sein de la cellule. Les microARNs peuvent participer à la régulation du cycle cellulaire, leur expression

est donc dépendante de la phase dans laquelle la cellule se trouve. On peut citer comme exemple le miR-503 ayant une demi-vie de 3h à 6h, dont l'expression diminue lors du passage de la phase G₀ à G₁ du cycle cellulaire [120].

De multiples facteurs contribuent à la stabilité des miARNs. L'ajout de nucléotides en 3' par la poly(A) polymérase GLD2 sur le miR-122 accroît sa stabilité dans les hépatocytes [121]. De plus, l'uridylation de résidus au niveau de l'extrémité 3'-NC a également été observée chez certains miARNs. Par exemple, l'uridylation du miR-26 par la protéine ZCCHC11 inhibe sa fonction et entraîne une augmentation de l'expression d'ARNm cibles tels que l'interleukine-6 [122].

La stabilité des microARNs peut être régulée par l'interaction de RBPs avec le complexe RISC. La fixation de la protéine GW182 à la protéine AGO au sein du complexe RISC permet la stabilisation des miARNs matures. En absence de GW182, les microARNs sont sujets à la dégradation 3'-5' par le complexe de l'exosome [123].

De plus, lors du chargement de l'ARN guide dans le complexe RISC, les protéines AGO jouent elles même un rôle protecteur face à la machinerie de dégradation des ARNs cellulaires.

On peut retrouver dans la séquence des microARNs matures la présence d'éléments déstabilisateurs pouvant entraîner leur dégradation. Les régions riches en AU sont généralement retrouvées dans la région 3'-NC des ARNm et peuvent être responsables de leur renouvellement rapide. Ces éléments peuvent également être retrouvés dans les séquences des miARNs et la fixation de RBPs sur ces éléments permet le recrutement de la machinerie de dégradation cellulaire [124].

Enfin, comme indiqué dans le paragraphe concernant les lncARNs, une augmentation de la stabilité des miARNs peut être due à leur séquestration par des lncARNs (« effet éponge »).

L'identification des enzymes responsables de la dégradation de microARNs a permis de mieux comprendre les mécanismes régulant leur stabilité. La dégradation des miARNs peut être effectuée par des exoribonucléases 5'→3' telles que XRN1 dans le cytoplasme et XRN2 dans le noyau. La voie de dégradation 3'→5' a été montrée comme jouant également un rôle dans leur dégradation. Les éléments catalytiques du complexe multiprotéiques de l'exosome (dégradation 3' → 5'), Rdrp41 et Dis3, ont été identifiés comme les ribonucléases

responsables de la dégradation de certains microARNs matures comme le miR-252-5p [125, 126].

3- Fonction et localisation des microARNs

Les microARNs représentent 1 à 3% du génome humain et régulent environ 30% des gènes codants pour des protéines. Cette régulation se fait par la répression de la traduction ou la dégradation d'ARNm cibles. Les microARNs sont retrouvés dans tous les compartiments cellulaires.

Leurs fonctions sont multiples et sont dépendantes du type cellulaire, de l'état de développement, de la présence de pathogènes ou de dysfonctionnements métaboliques.

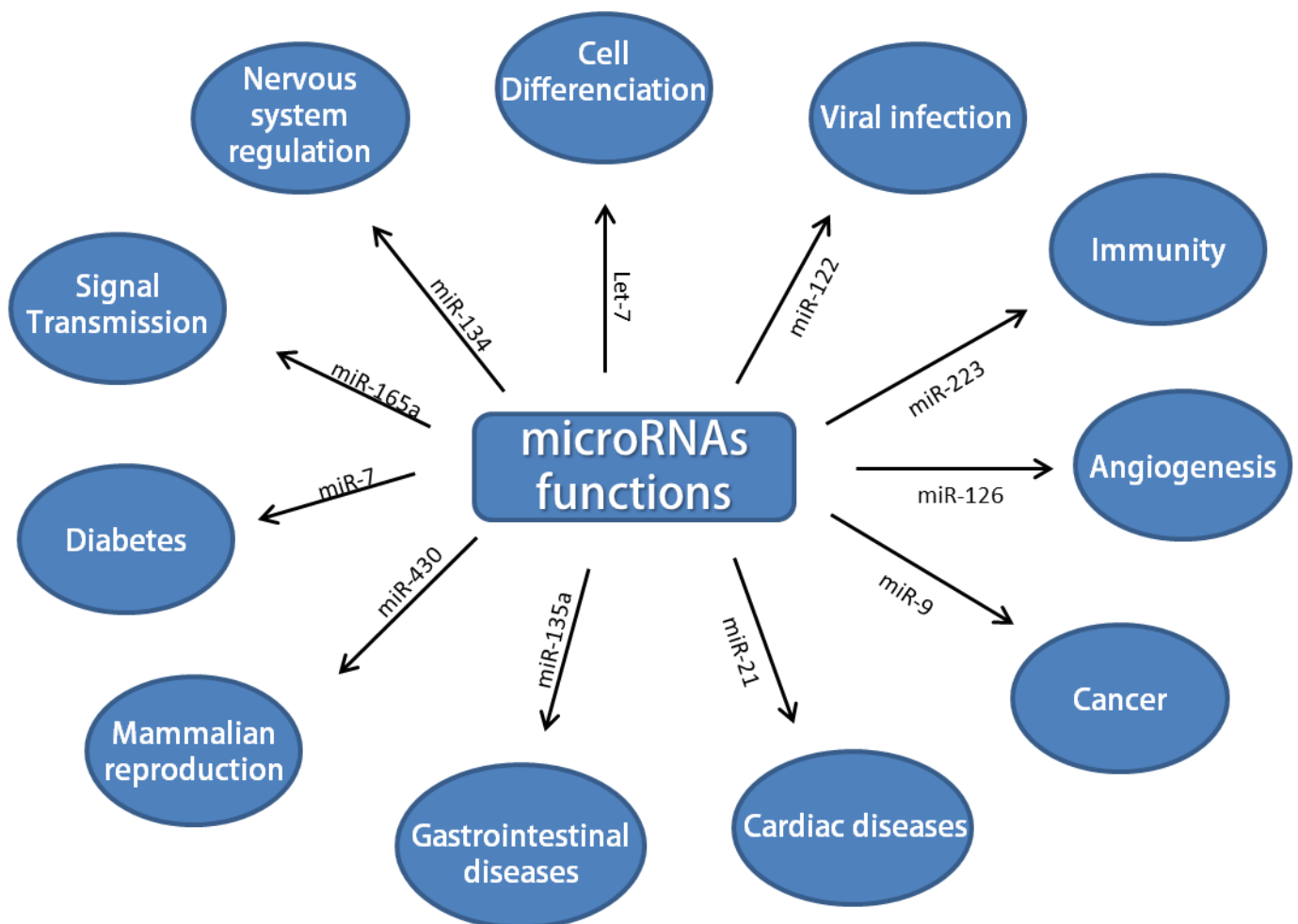


Figure 15 : Implication des microARNs dans différents processus biologiques. Les microARNs sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que la régulation des cellules du système nerveux, la reproduction, la transmission des signaux intercellulaires, la différenciation cellulaire. Ils peuvent aussi être impliqués dans certaines pathologies telles que des pathologies cardiaques, gastro-intestinales, des cancers ou encore des infections virales.

Les microARNs participent à la régulation de processus biologiques tels que la différenciation cellulaire, la reproduction, la carcinogenèse, l'immunité, certaines maladies cardiaques/intestinales, ou encore les infections virales (**Figure 15**).

Différenciation cellulaire :

Parmi les premiers microARNs mis en évidence, on retrouve la famille let-7. Les membres de cette famille sont impliqués dans diverses fonctions dont la différenciation cellulaire. En effet, cette famille de microARNs est nécessaire à la différenciation des cellules souches embryonnaires en cardiomyocytes [127].

Des études ont montré que les microARNs n'étaient pas uniquement utiles à la différenciation cellulaire mais participaient aussi au maintien de l'état différencié et à la plasticité cellulaire. Dans le cas du système nerveux, il a été montré que le miR-134 jouait un rôle dans le développement, la maturation et la plasticité des synapses influençant le développement de maladies telles que l'autisme ou la maladie d'Alzheimer [128].

Reproduction :

Dans le cas de la reproduction, les microARNs peuvent participer au contrôle de certaines étapes telles que la maturation des ovocytes, le développement du *corpus luteum* ou encore le développement embryonnaire [129].

Carcinogenèse et angiogénèse:

Les microARNs peuvent également être impliqués dans certaines pathogénèses. Le développement anormal de cellules conduisant à un cancer a pu être associé à de nombreux microARNs. En effet, leurs rôles dans le contrôle de l'expression des gènes en fait des cibles de choix lors de l'étude de facteurs pro- ou anti-tumoraux. On peut citer comme exemple les microARNs de la famille let-7 qui sont impliqués dans la régulation du proto-oncogène RAS. L'inhibition de let-7 dans les cellules cancéreuses conduit à une surexpression de RAS contribuant au processus de carcinogenèse [130]. Dans le cas du cancer du sein, le miR-9 est surexprimé, ce qui conduit à la diminution de l'expression du gène CDH1 de la cadhérine E, et ainsi favorise la mobilité facilitée pour les cellules tumorales [131]. L'installation de tumeur tissulaire entraîne un dérèglement du processus d'angiogénèse permettant à la tumeur d'être alimentée. Le miR-126 endothéliale, a montré *in vivo* un rôle pro-angiogénique en

réprimant l'expression du facteur anti-angiogénique Spred-1. De plus, miR-126 améliore l'action pro-angiogénique des facteurs de croissances VEGF (« Vascular Endothelium Growth Factor ») et FGF (« Fibroblast Growth Factor »).

Immunité :

Les miARNs peuvent aussi jouer un rôle au niveau de l'immunité. L'inhibition des différents facteurs de la machinerie de maturation des microARNs entraîne un défaut de formation des miARNs impliqués dans le système immunitaire provoquant l'apparition de maladies auto-immunes ou de cancers [129].

Maladie cardiaques ou intestinales :

Enfin, les microARNs sont impliqués dans le cas de maladies cardiaques ou intestinales. Le miR-21 régule la voie de signalisation ERK-MAP kinase dans les fibroblastes cardiaques ce qui joue un rôle sur la structure et la fonction du tissu cardiaque. L'expression de ce microARN est augmentée dans les fibroblastes de cœurs affaiblis, contribuant au développement de maladies cardiaques [132].

Les microARNs peuvent également jouer un rôle dans le cas du diabète en contrôlant l'expression de gènes tels que PDK1 (« 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 ») pour le miR-375, entraînant une diminution de l'expression des gènes de l'insuline et donc l'arrêt de sa sécrétion [133].

Enfin, les microARNs ont un rôle important lors d'infection par des pathogènes viraux. Leurs rôles seront détaillés dans le sous-chapitre suivant.

4- MicroARNs et infections virales

Impact des microARNs cellulaires sur l'infection virale

De multiples facteurs cellulaires et viraux participent au contrôle de l'expression des microARNs. Lors d'une infection, la détection du pathogène par les récepteurs cellulaires (PRRs) entraînent la modulation du transcriptome de l'hôte. Le changement d'expression des microARNs peut conduire à la surexpression de microARNs antiviraux participant à la réponse antivirale. Ces microARNs peuvent se fixer directement au génome viral et bloquer

la réplication et/ou la traduction ou peuvent diminuer l'expression de facteurs cellulaires proviraux.

Dans le cas de l'infection par le virus de la Dengue, la surexpression du miR-548g-3p qui cible le promoteur SLA (« Stem Loop A ») localisé au niveau de l'extrémité 5'-NC du génome viral, empêche le recrutement de la polymérase virale [134]. Un autre exemple est celui du Cocksackievirus B3 qui est un virus à ARN de la famille des *Picornaviridae* provoquant des cardiomyopathies. Lors de l'infection, il a été montré que le miR-342-5p avait pour cible la région codante 2C du génome viral entraînant sa dégradation [135].

Les microARNs peuvent également jouer un rôle antiviral en inhibant des facteurs de l'hôte identifiés comme proviraux. Durant l'infection par le WNV, une surexpression du miR-532-5p a été observée. Ce microARN a pour cible les ARNm codant pour les facteurs cellulaires SESTD1 (« SEC14 and spectrin domains 1 ») et de TAB3 (« TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein 3 »). Leur inhibition bloque la réplication de l'ARN viral [136].

Les microARNs cellulaires peuvent aussi avoir un rôle positif sur la réplication virale. L'interaction directe entre les microARNs et les ARN viraux peut être nécessaire pour la stabilité du génome viral ou pour la réplication virale [137]. Le cas du miR-122 dans l'infection par le VHC est le cas le plus représentatif. Le miR-122 peut se fixer au niveau de l'extrémité 5'-NC du génome viral sur deux sites spécifiques stimulant ainsi la réplication, la traduction en protégeant le génome viral de la dégradation médiée par la RNase cellulaire XRN1 [138-140]. De même, le virus bovin de la diarrhée virale (« Bovine viral diarrhea virus », BVDV) appartenant au genre des *Pestivirus* peut détourner le miR-17 et la famille let-7 des miARNs pour contrôler sa traduction. Ces microARNs peuvent se fixer dans la partie 3'-NC du génome viral entraînant une stabilisation de l'ARN viral et induisant une augmentation de la réplication et de la traduction [141].

Impact de l'infection sur l'expression des microARNs cellulaires

Au cours de leur évolution, les virus ont appris à échapper à la réponse cellulaire en détournant des facteurs cellulaires impliqués dans la réponse antivirale, en utilisant la machinerie cellulaire pour leur propagation ou encore en produisant des facteurs viraux pouvant cibler l'hôte.

Les microARNs ont un rôle important dans la réponse immunitaire innée et acquise. Certains virus ont appris à inhiber l'expression et/ou l'activité de miARNs impliqués dans la réponse antivirale.

Pour inhiber l'activité des miARNs antiviraux, le virus de la mosaïque du concombre (« cucumber mosaic virus », CMV) cible directement le complexe RISC. La protéine 2b du virus inhibe la protéine AGO1 diminuant ainsi l'activité des microARNs et promouvant la réplication virale [142].

Les virus ont également la capacité d'accélérer la dégradation des microARNs antiviraux en produisant des ARNs non codants complémentaires de ces microARNs. Le cytomégalovirus humain produit un ARN non codant appelé « miRNA decay element », miRDE contenant des sites de fixation pour les membres de la famille miR-17. La fixation de ces microARNs sur le miRDE entraîne leur dégradation et une augmentation de la synthèse d'ADN viral et de virions [143]. Le virus de l'herpès- γ Saimiri exprime un ARN non codant riche en U, HSUR 1, complémentaire du miR-27. La fixation de ce miARN sur HSUR 1 entraîne sa dégradation, induit l'activation des lymphocytes T et contribue au processus d'oncogenèse [144].

Le concept « d'effet éponge », décrit précédemment chez les lncARNs, peut être retrouvé entre les microARNs et l'ARN viral. L'exemple le plus relevant est le cas du miR-122 dans le cas du VHC. La séquestration du miR-122 par le génome viral conduit à une dérépression des cibles du miR-122 et permet l'installation d'un environnement fertile pour le développement de carcinome hépatocellulaire (CHC) [138]. De même, le virus de l'hépatite B séquestre le miR-let-7a entraînant une augmentation de l'expression des cibles de ce microARN, parmi lesquelles sont retrouvées des proto-oncogènes, facilitant l'installation d'un CHC [145].

Enfin, les microARNs cellulaires peuvent avoir un rôle proviral en inhibant des facteurs antiviraux de l'hôte. Lors de l'infection par les virus DENV, VSV ou encore JEV, l'induction du miR-146 dans les cellules microgliales humaines, inhibe la production d'IFN de type I. miR-146 a pour cible les récepteurs de l'IL-1, IRAK1 et IRAK2, ainsi que le récepteur du TNF, TRAF6. La surexpression de miR-146 conduit à une diminution de la réponse inflammatoire et à une augmentation de la réplication [146-149]. Ce modèle est également retrouvé dans le cas de l'infection par l'entérovirus 71 [150].

Les microARNs sont donc, sous l'influence de l'infection, capables de réguler la réponse antivirale ou encore de réguler de manière pro- ou antivirale les différentes étapes du cycle de vie du virus.

Production et rôle des microARNs viraux

Certains virus ont la capacité de générer leurs propres microARNs, appelés v-miARNs (v-miRs). On retrouve ces v-miRs chez les virus à ADN et à ARN. Ils peuvent, comme les microARNs cellulaires, être maturés de manière canonique. Cependant, certains v-miRs peuvent être maturés indépendamment de DROSHA ou de DICER. La maturation des microARNs viraux provenant de virus à ARN se fait directement dans le cytoplasme appuyant l'idée que les v-miRs peuvent être maturés de manière non-canonique. Par exemple, la souche Kunjin du WNV contient un sfARN dans son extrémité 3'-NC dont les structures en tige-boucle servent de substrat pour DICER permettant de générer un microARN viral mature appelé KUN-miR-1 [151].

Les microARNs viraux ont pour fonction de réguler la persistance virale, la prolifération des virions, l'échappement au système immunitaire ou encore la survie des cellules de l'hôte lorsque l'on parle d'infection chronique [152].

Persistance virale :

Les miARNs viraux peuvent réguler les ARNm de l'hôte. Le KSHV produit à partir de son génome viral plusieurs microARNs dont le v-miR-K1. Ce microARN, lorsqu'il est exprimé, va cibler la partie 3' de l'ARNm d' $\text{ikB}\alpha$ activant la voie NF κ B et inhibant la phase lytique de l'infection. En contrôlant le transcriptome de l'hôte, le virus module sa propre réplication [153]. De manière similaire, le v-miR BART18 provenant de l'infection par le virus EBV cible l'ARNm de MAP3K2 et prévient la phase lytique [154].

Enfin, les virus codent des microARNs capables de cibler leur propre génome et ainsi régulent leur propre cycle de vie. A partir de leur anti-génome, les virus produisent des v-miRs parfaitement complémentaires de leurs ARN. Par exemple, le virus EBV exprime le vmiR BART20 qui peut inhiber l'expression des gènes viraux précoces BZLF1 et BRLF1 afin de rester dans la phase de latence de l'infection [155].

Echappement au système immunitaire :

Des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse immunitaire antivirale peuvent être la cible de v-miRs. Le CMV humain produit 3 microARNs viraux, v-miR-UL112-1, v-miR-US5-1 et v-miR-US5-2 ciblant les gènes codants pour l'IL-6 et le TNF- α . La diminution de l'expression de ces facteurs bloque la réponse antivirale [156].

Les v-miRs peuvent aussi cibler des microARNs cellulaires. Dans le cas de l'infection par HIV-1, le virus exprime, à partir de son extrémité 3'-NC un microARN appelé HIV1-miR-H1 capable de diminuer l'expression du microARN antiviral cellulaire miR-149 [157].

La capacité des virus à produire des microARNs viraux à partir de la machinerie de maturation cellulaire, capables d'améliorer la réplication virale et de bloquer la réponse antivirale en fait des candidats intéressants pour le développement de thérapies antivirales.

Les microARNs en tant que biomarqueur

La modulation de l'expression des microARNs cellulaires durant l'infection virale peut servir de biomarqueur pour le diagnostic et l'avancement d'infections virales, ainsi que pour la détection de maladies liées à l'infection, principalement des cancers. La caractérisation des microARNs en tant que biomarqueur a principalement été faite dans le cas d'infections par le VHC, le VIH-1, le VHB et certains virus de la famille des *Herpesviridae*. L'évaluation de l'implication des microARNs dans une pathologie spécifique peut être faite à partir des microARNs intracellulaires et des microARNs extracellulaires appelés aussi microARNs circulants.

Les microARNs intracellulaires jouent un rôle important dans la réponse antivirale. Malgré la réponse immunitaire mise en place par la cellule, certains miARNs peuvent également être utilisés par les virus pour créer un environnement favorable au développement de l'infection et à la persistance virale. La quantification de ces microARNs pourrait donc permettre de diagnostiquer le type et l'état d'avancement d'une infection virale spécifique. Par exemple, durant l'infection par le CMV humain, la surexpression des biomarqueurs miRs 200c- et 200b- permet le maintien de la phase de latence et donc la persistance virale [158]. Les virus HPV, CMV, HCV, HBV ou encore les entérovirus sont capables de manipuler l'expression de certains microARNs pour diminuer la réponse inflammatoire.

Le biomarqueur idéal est une molécule facilement et rapidement quantifiable par des méthodes d'analyse non-invasives à tous les stades de l'infection, spécifique et sensible, avec une demi-vie longue [159].

Les microARNs extracellulaires sont des biomarqueurs idéaux car ils répondent à l'ensemble de ces critères et peuvent être isolés directement à partir de fluides biologiques (sérum, plasma, salive, urine, lait maternel). Ils peuvent être sécrétés par les cellules sanguines ou de manière directe par des organes tels que le foie, le cœur ou encore les muscles. Plusieurs hypothèses sur leurs fonctions ont été émises, ils pourraient être sécrétés afin de servir de régulateur intercellulaire de la réponse inflammatoire, afin de réguler leur expression au niveau intracellulaire ou de manière passive suite à la mort cellulaire.

Il existe une certitude sur le fait que les microARNs circulants soient fonctionnels et impliqués dans la réponse antivirale [160]. De plus, certains virus peuvent produire des microARNs circulants. Le virus EBV est capable de sécréter des microARNs viraux pouvant passer des lymphocytes B infectés aux cellules T et aux monocytes non infectés. Ce processus permet l'inactivation des cellules T et participe à la persistance virale [161]. L'étude des microARNs circulants spécifiquement modulés par l'infection virale pourrait être un moyen efficace de déterminer l'origine du pathogène et le type de cellules infectées. La détection de microARNs pourrait également servir à évaluer la progression de la maladie chez le patient infecté et par conséquent permettrait de moduler le traitement au cours de l'infection [162].

Les microARNs en tant que biothérapie

La possibilité d'utiliser les microARNs en tant que biomarqueurs, ainsi que leur rôle dans le cycle viral de nombreux virus, en fait de bonnes cibles pour le développement de molécules thérapeutiques. Une des stratégies existante est le développement de molécules agonistes ou antagonistes directs de microARNs. Ces molécules peuvent réguler l'expression de microARNs pro- ou antiviraux et permettre l'amélioration de la réponse antivirale et/ou diminuer la réplication virale.

On notera dans le cas du VHC, le développement de molécules ciblant le miR-122 proviral avec l'entrée en phase 2b (Test du médicament sur un nombre réduit de patient humain) du

Miravirsén. Cette approche permet une diminution significative et durable de la charge virale chez les patients [163, 164].

L'utilisation d'agoniste ou d'antagoniste de miARNs permettrait également de stimuler la réponse antivirale, de manière indirecte en inhibant certains facteurs cellulaires proviraux.

La cible de ces molécules pourrait également être le génome viral où leur fixation entraînerait une diminution de la réplication, de la traduction et une augmentation de la dégradation. On peut citer comme exemple le développement d'un agoniste du miR-31 antiviral dans le cas du VHB qui irait cibler directement la séquence X du génome viral [165]. L'utilisation de molécules antagonistes contre les microARNs viraux peut aussi être un moyen de contrôler l'infection [162].

La stratégie vaccinale associée aux miARNs est aussi une stratégie en cours de développement. Une des stratégies en cours d'étude est l'incorporation de séquence cible d'un ou plusieurs miARNs dans le génome viral utilisé pour la vaccination. Lorsque le génome vaccinal va rentrer dans la cellule, la séquence ciblée par le miARN va être reconnue et le génome viral sera donc inhibé créant ainsi un virus atténué. Ce moyen permet d'obtenir des vaccins tissus spécifiques en ciblant des microARNs propres à certains organes ou tissus, on peut citer comme exemple l'incorporation d'une séquence ciblée par let-7 dans le vaccin dirigé contre la souche H1N1 du virus IAV diminuant sa réplication dans les cellules bronchiales [166, 167].

III- Rôle de la protéine KSRP dans la régulation des ARNs

A- Généralités

La protéine KSRP (« K Homology splicing regulator protein ») aussi appelée KHSRP ou FBP2 (« FUSE-binding protein 2») est une protéine cellulaire ubiquitaire appartenant à la famille des RBPs. Il existe cinq isoformes différentes de la protéine. La répartition nucléocytoplasmique de KSRP dépend du type cellulaire. KSRP a été décrite pour la première fois en 1996 pour sa capacité de fixation au motif FUSE (« Far Upstream Element ») sur le promoteur du gène *c-myc* [168]. Depuis KSRP a été décrite dans plusieurs fonctions biologiques concernant la régulation de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

1- Structure

KSRP est une protéine de 75 kDa codée à partir du chromosome 19p13.3. Elle est composée d'une séquence de localisation nucléaire retrouvée dans la région N-Terminale, d'une partie centrale organisée en quatre domaines KH (KH1, KH2, KH3 et KH4) et d'une partie C-terminale (**Figure 16**). Les domaines KH sont des domaines d'environ 70 acides aminés, connus pour leur rôle dans l'interaction avec les acides nucléiques simples brins mais également avec les protéines. Les différents domaines interagissent avec leurs cibles ARN et/ou protéines, avec une affinité et une spécificité qui leur est propre. Ils sont composés de structures secondaires en hélice α et en feuillet β et d'un domaine GxxG essentiel pour leurs liaisons avec certains ARNs [169]. Les domaines KH sont reliés entre eux par des séquences dont la flexibilité leur permet d'avoir des interactions avec les autres domaines et avec leurs cibles. Le domaine KH2 a une affinité pour les séquences riches en AU, les domaines KH1 et KH3 pour les séquences riches en G/U et le domaine KH4 pour les séquences riches en GA [170]. Les domaines KH3 et KH4 sont impliqués dans la fixation aux ARNs, KH3 reconnaît les régions riches en G présentes chez les pré-miARNs et est nécessaire pour la fixation du domaine KH4 aux ARNm. KH3 est aussi le domaine responsable de l'interaction avec les membres de l'exosome [171].

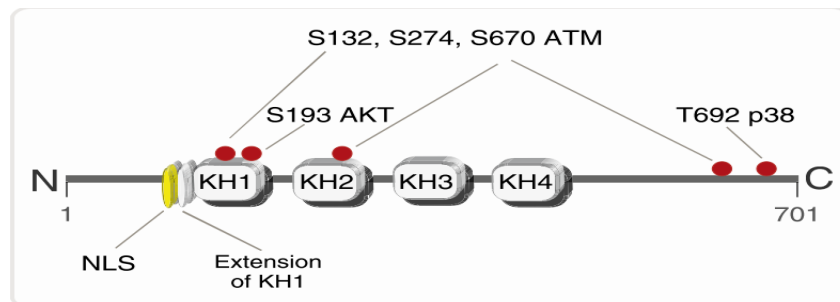


Figure 16 : Structure de la protéine KSRP. La protéine est principalement composée d'une structure NLS, de quatre domaines KH et de cinq sites de phosphorylation [172].

2- Régulation post-traductionnelle

La protéine KSRP contient des sites de modifications post-traductionnelles régulant son interaction avec ses cibles. Ces modifications sont également à l'origine du passage d'une fonction à une autre en changeant la conformation spatiale de la protéine et donc sa biodisponibilité. KSRP peut-être phosphorylée par la kinase Akt sur le résidu Sérine 193 (Ser,

S) présente dans le domaine KH1, par la kinase ATM en S132 (KH1), S274 (KH2) et S670 (Domaine c-terminal) et par la MAP kinase (« mitogen-associated protein kinase ») p38 en Thréonine 692 (Thr, T) (Domaine C-terminal) (**Figure 16**). La phosphorylation en S193 par Akt modifie la conformation du domaine KH1 permettant la fixation de la protéine chaperonne 14-3-3 ζ et la localisation nucléaire où KSRP participe à la maturation de certains pri-miARNs en s'associant avec le complexe DROSHA/DGCR8 [173].

Lors de la réponse de la cellule aux dommages faits sur l'ADN, la kinase nucléaire ATM peut phosphoryler KSRP et lui permettre de maturer certains pri-miARNs [174].

Enfin, la phosphorylation par p38 en T692 diminue l'affinité de KSRP pour les ARNm « ARE » [175].

KSRP est également SUMOylée par la protéine SUMO1 (« Small ubiquitine-like modifier ») sur la lysine 87 (Lys, K). La SUMOylation sur ce site diminue l'affinité de KSRP pour les pri-miARNs et pour le complexe DROSHA/DGCR8 [176].

L'ensemble de ces modifications définissent la localisation de la protéine ainsi que son rôle au sein de la cellule. Néanmoins, il n'existe pas à l'heure actuelle de données suffisantes pour établir un modèle de relation entre les modifications post-traductionnelles de la protéine, sa localisation et sa fonction dans un type cellulaire ou dans un contexte pathologique donné.

B- Fonctions

1- Rôle dans l'épissage des ARNs

L'épissage est un processus nucléaire décrit chez les eucaryotes qui permet la maturation des ARN pré-messagers en ARN messagers matures. C'est un point de contrôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes. Lors de la transcription de l'ADN génomique, l'ARN peut contenir des séquences codantes (exons) et des séquences non-codantes (introns), qu'il faut éliminer pour obtenir un ARNm mature.

L'épissage peut se faire de manière alternative. L'épissage alternatif peut être tissu spécifique et permet l'obtention, à partir d'un pré-ARN messager, de plusieurs ARNm matures codants pour des protéines différentes. L'épissage implique la présence d'un

complexe multi-protéique d'épissage, le « spliceosome », comprenant des petites ribonucléoprotéines U1, U2, U4/6 et U5 et des protéines contrôlant l'épissage telles que hnRNPF ou hnRNPH. Ces protéines se fixent à des séquences régulatrices présentes sur l'ARN pré-messager et contrôlent l'inhibition ou la fixation du complexe d'épissage. KSRP fait partie de ces protéines pouvant réguler l'épissage. Le rôle de KSRP dans l'épissage des ARNm a été décrit pour la première fois en 1996 par Min *et al* dans des cellules neuronales et non-neuronales. Ils ont montré que KSRP pouvait se fixer spécifiquement sur une région riche en G/U présente dans la région intronique en aval de l'exon N1 du gène neuronal *src* et en favorisait l'épissage [177]. Dans les cellules HeLa, il a été montré que KSRP pouvait interagir avec la protéine hnRNPH et la protéine Nucléophosmine pour améliorer l'épissage du gène *rpl3*, en se fixant à l'intron 3 [178].

KSRP peut avoir un rôle négatif dans l'épissage de certains pré-ARNm. Dans un modèle d'érythroblaste, il a été montré que KSRP en interagissant avec la protéine hnRNPA1 se fixait sur la séquence répressive de l'exon 16 (ESS16) du pré-ARN messager 4.1R. Ceci entraîne l'arrêt de l'épissage de l'ARNm, la surexpression du facteur ontogénique PU.1 et le développement de leucémie érythroblastique [179].

2- Rôle dans la dégradation des ARNs

KSRP, grâce à la présence des domaines KH, peut interagir avec différents ARN dont les ARNm. KSRP participe à la régulation de l'expression des gènes de par sa capacité à entraîner la dégradation de transcrits ayant des motifs spécifiques dans leur séquence. Parmi ces motifs on retrouve les régions riches en séquence AU « ARE » retrouvées notamment dans la région 3'-Non codante des ARNm. Les éléments riches en AU sont séparés en trois classes. La première classe est une répétition d'une à trois fois du motif AUUUA dans une région riche en U, la deuxième est une répétition de ce motif un grand nombre de fois dans une région riche en U et enfin la troisième classe, qui reste encore à préciser, serait une région riche en U [180]. Depuis janvier 2018, une nouvelle classification des éléments riches en AU a été publiée par Bakheet *et al*. Cette classification se base sur la corrélation entre le nombre d'élément ARE répété et la distance entre ces éléments [181]. L'avantage de cette nouvelle classification est l'inclusion des séquences AREs retrouvées dans les pré-ARE-ARN messagers donc une plus grande couverture de ces séquences et de leur impact sur le contrôle de

l'expression des gènes. Néanmoins, cette classification exclue les régions riches en U retrouvée dans les extrémités 3'-NC de certains ARN cellulaires ou viraux.

La présence du motif « ARE » coïncide avec la dégradation rapide des ARNm chez les mammifères et est retrouvé dans la région 3'-Non-codante des transcrits ayant une demi-vie courte tels que les cytokines, les chemokines, les proto-oncogènes ou encore les régulateurs du cycle cellulaire. KSRP, grâce aux domaines KH3 et KH4, peut se fixer aux motifs « ARE » des ARNm permettant le recrutement d'exoribonucléases et d'endoribonucléases telles que le complexe de l'exosome, PARN (« polyA RiboNuclease), la famille d'enzyme de décoiffage (complexe de « decapping », DCP), la famille de RNAses XRN (XRN1, XRN2) (**Figure 17**). Il a été montré que l'exosome cellulaire ne pouvait pas se fixer sur les ARNm sans la présence de RBPs comme KSRP [180]. Le recrutement des RNAses cellulaires par KSRP permet de contrôler des fonctions biologiques comme le processus inflammatoire / l'immunité innée, la carcinogénèse, ou la différenciation.

Les cytokines jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée / la réponse inflammatoire. Le contrôle de ces molécules est finement régulé afin d'éviter une expression prolongée pouvant nuire à l'organisme. L'expression anormale de cytokines peut conduire à l'aggravation de pathologies telles que des maladies neuro-dégénératives ou encore certains cancers. Le point de contrôle le plus décrit est le contrôle post-transcriptionnel. En effet l'ARNm des cytokines peut être régulé par la machinerie de dégradation des ARNs. KSRP intervient dans ce contrôle en se fixant aux ARE contenus dans l'extrémité 3'-NC des ARNm des cytokines ce qui entraîne le recrutement de RNAses cellulaires. KSRP est par exemple impliquée dans la régulation de l'ARNm du TNF- α [182].

KSRP est également un facteur intervenant dans le développement neuronal en déstabilisant l'ARNm de la protéine neuronale GAP43 [183].

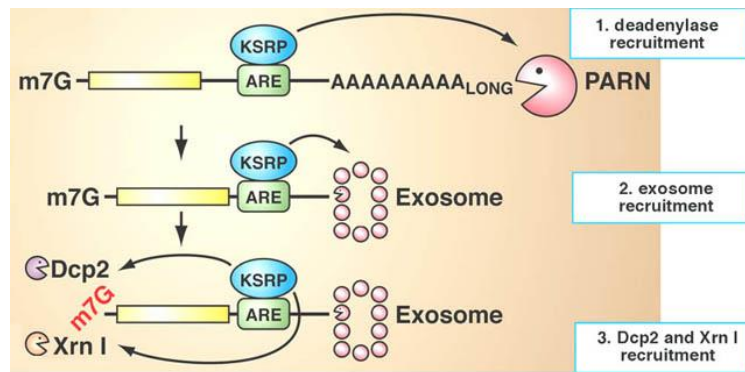


Figure 17 : Implication de KSRP dans le recrutement des RNases cellulaires. La fixation de KSRP sur une région riche en AU permet le recrutement de RNases cellulaires en 3' et en 5' [168].

3- Rôle dans la maturation des microARNs

La maturation des microARNs est un processus moléculaire complexe faisant intervenir deux complexes multi-protéiques majeurs. Le passage du pri-miARN vers le pré-miARN est assuré dans le noyau par le complexe DROSHA/DGCR8 et le passage du pré-miARN vers le miARN mature est assuré dans le cytoplasme par le complexe DICER. DROSHA et DICER sont des ribonucléases formant le cœur catalytique de leur complexe respectif. Dans ces complexes sont également retrouvés des partenaires protéiques participant à la régulation du clivage des brins d'ARN. Parmi ces partenaires on peut citer SMAD1, p68/p70, hnRNPA1 ou encore KSRP [168].

KSRP participe à la biogénèse de certains microARNs en interagissant avec DROSHA dans le noyau et/ou avec DICER dans le cytoplasme (**Figure 18**). De par sa capacité à interagir avec les ARN simple brin il a été montré que KSRP se fixait à la l'extrémité simple brin de la tige boucle des microARNs en cours de maturation. Le domaine KH3 de la protéine est capable de reconnaître avec une grande spécificité et affinité des régions riches en G relativement courtes, dont la région riche en G retrouvée sur la boucle terminale du miARN en cours de formation. La fixation de KSRP favorise le recrutement des ribonucléases sur le microARN en cours de maturation [102].

La maturation des miARNs par KSRP dépend de son état de phosphorylation. La phosphorylation de KSRP par Akt en S193 dans le cytoplasme diminue son affinité pour les ARN portant des séquences « ARE » et augmente son affinité pour certains pri-miARNs

lorsqu'elle est relocalisée au noyau. Il a aussi été montré que la protéine nucléaire ATM pouvait phosphoryler KSRP sur trois sérines (S132, S274 et S670) entraînant une augmentation de l'affinité de KSRP pour la boucle terminale de certains pri-miARNs impliqués dans le processus de réparation des dommages faits sur l'ADN [174].

Le rôle de KSRP dans la maturation des microARNs de la famille let-7 a été largement étudié. Let-7 est un important suppresseur de tumeur connu pour son rôle dans la régulation des protéines oncogènes. Ce miARN est impliqué dans différents processus biologiques tels que la différenciation cellulaire, l'apoptose ou encore la prolifération cellulaire. La fixation de KSRP sur le motif « AGGGU » de la boucle terminale du pri-Let-7 et du pré-Let-7 entraîne le recrutement des complexes DROSHA et DICER et l'obtention du microARN mature [184].

De plus, la maturation de Let-7 par KSRP est à l'origine d'une boucle de rétrocontrôle négative de l'expression de ce microARN. En effet, une des cibles de Let-7 est l'ARNm de DICER. La diminution de l'expression de DICER par l'action de let-7 entraîne une augmentation du pré-let-7 et une diminution de la forme mature [185].

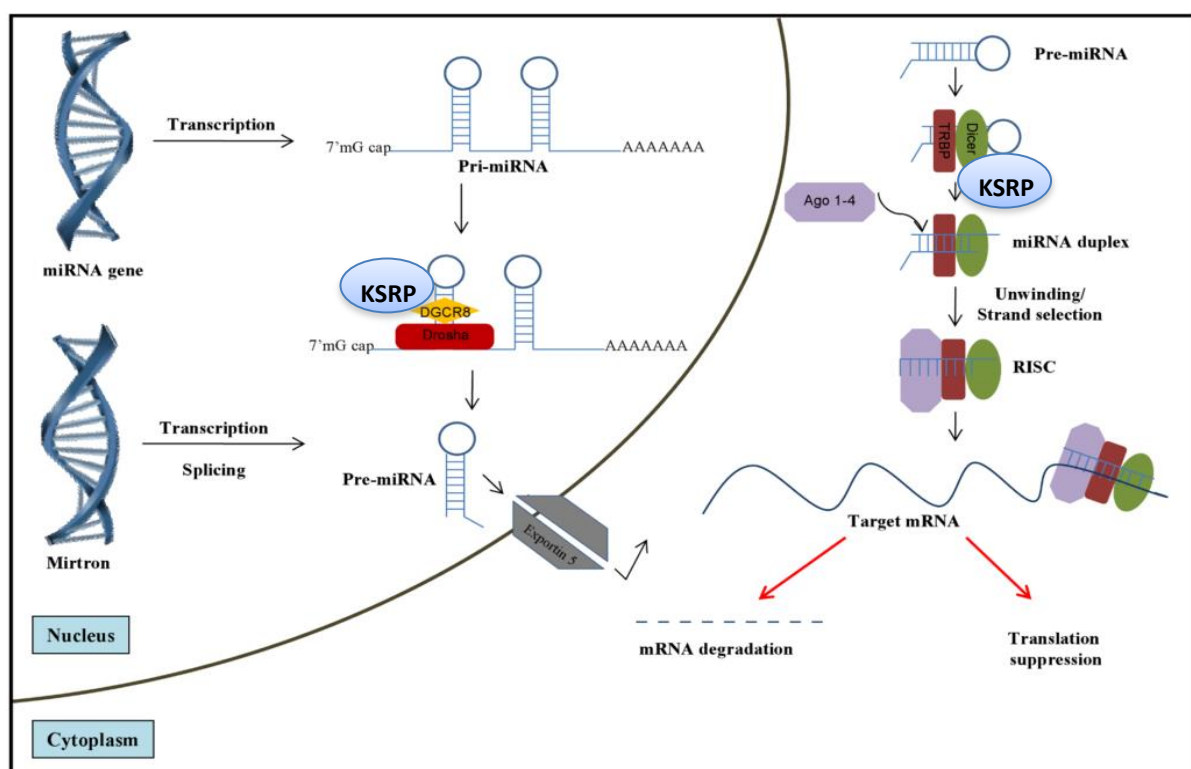


Figure 18 : Implication de KSRP au niveau nucléaire et cytoplasmique dans la maturation des microARNs. KSRP interagit avec le complexe DROSHA/DGCR8 dans le noyau permettant la maturation du pri-

miARN en pré-miARN et dans le cytoplasme avec DICER permettant la maturation du pré-miARN en miARN mature. Adapté de [186].

KSRP est également impliquée dans la maturation d'autres microARNs jouant un rôle dans certaines pathologies (**Tableau 2**).

miARN régulé	Tissu	Fonction du microARN	Pathologie entraînée par la dérégulation de ce microARN	Réf
miR-145	Tissu adipeux blanc	Métabolisme lipidique	Inhibition de la lipolyse	[187]
miR-26	Tissu pulmonaire	Régule l'expression du facteur PTEN (contrôle le cycle cellulaire)	Cancer du poumon à petite cellule	[188]
Let-7	Tissu osseux	Suppresseur de tumeur	Ostéosarcome	[189]
miR-155	Tissu pulmonaire	Réponse inflammatoire	Mucoviscidose	[190]

Tableau 2 : KSRP participe à la maturation de microARNs impliqués dans diverses pathologies.

En effet, la phosphorylation de KSRP par la protéine kinase cellulaires Akt (Akt1 et Akt2) promeut la maturation des microARNs myogéniques (myomiRs) dans la phase précoce de différenciation cellulaire [191]. KSRP participe également au contrôle du métabolisme des lipides en induisant la maturation du pri-miR-145 dans le tissu adipeux blanc, ce qui régule négativement le processus de lipolyse. MiR-145 a pour cible les gènes *Foxo1* et *Cgi58* codant pour des régulateurs de la lipolyse. La maturation du miR-145 par KSRP entraîne une diminution de ces facteurs régulateurs, conduisant à l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux blanc [187].

KSRP peut aussi être associée à différents processus tumoraux.

Dans le cas du cancer du poumon à petite cellule, KSRP participe au processus de tumorigénèse en favorisant la maturation du miR-26 dont la cible est la protéine suppressive de tumeur PTEN. La surexpression de KSRP entraîne une augmentation de l'expression de

miR-26 et une diminution de l'expression de PTEN conduisant au développement de la tumeur [188].

L'ostéosarcome est un cancer des os touchant principalement les enfants et les adolescents. Il a été montré que la surexpression de KSRP était associée à une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses. Pruksakorn et *al* ont émis l'hypothèse que le rôle de KSRP dans le développement de ce type de cancer pouvait venir de son rôle dans la dégradation des ARN « ARE » mais pouvait également, en participant à la maturation de la famille let-7 jouer un rôle négatif sur le développement de tumeurs [189].

KSRP peut également jouer un rôle dans la réponse immunitaire en régulant l'expression de certains microARNs. Il a été montré que la maturation du miR-155 était dépendante de KSRP et permettait de contrôler la réponse inflammatoire. Dans le cas de la mucoviscidose, KSRP augmente la maturation du pri-miR-155 et du pré-miR-155 qui à son tour induit une réponse inflammatoire aggravant la maladie [190].

4- KSRP et lncARNs

Le rôle de KSRP sur la maturation ou la dégradation des lncARNs est peu décrit à ce jour. Seule l'interaction entre KSRP et le lncARN H19 dans les cellules myoblastiques murines C2C12 a été étudiée. Cette interaction implique le domaine KH1 de KSRP et l'exon 1 du lncARN H19 dans le cytoplasme. H19 sert de « point d'ancrage » moléculaire pour la fixation de KSRP aux ARNm « ARE » cibles et pour le recrutement du complexe multiprotéique de l'exosome. Cette interaction favorise donc la dégradation des ARNm « ARE » cibles de KSRP, dont la myogénine dans le cas des cellules C2C12, permettant de garder les cellules dans un état indifférencié [192].

Cette interaction entre KSRP et H19 a également été décrite dans les cellules musculaires chez les patients atteints d'un diabète de type 2.

H19 peut servir d'éponge à microARN, comme pour le microARN let-7 et diminue leur biodisponibilité. Il a été montré chez les patients sains, qu'une hyperinsulinémie activait la voie PI3K/Akt par le récepteur à l'insuline, conduisant à la phosphorylation de KSRP en S193. Cette phosphorylation augmente l'affinité de KSRP pour les pri-miARNs myogéniques dont let-7, qui va pouvoir inhiber l'expression du lncARN H19. Cette inhibition permet une

augmentation de la biodisponibilité de let-7 qui peut alors inhiber l'expression du récepteur à l'insuline « INSR » et arrêter l'absorption de glucose. La régulation du métabolisme du glucose dans les cellules musculaires est donc dépendante d'un rétrocontrôle négatif entre H19 et let-7. Chez les patients atteints de diabète de type 2 il y a une diminution globale de l'expression du lncARN H19 conduisant à l'inhibition du récepteur à l'insuline et donc à une diminution de la sensibilité à l'insuline dans les cellules musculaires (**Figure 19**) [193].

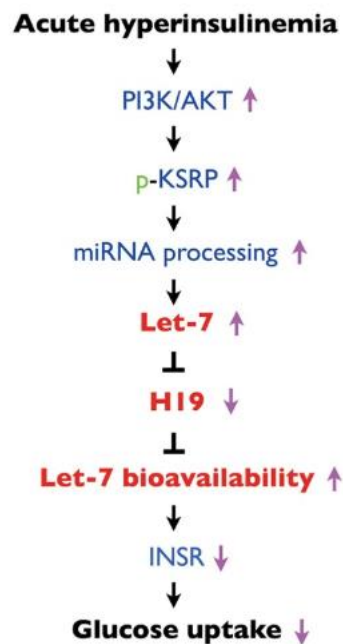


Figure 19 : KSRP participe au contrôle du métabolisme de glucose via le lncARN H19 et le microARN Let-7. Une balance physiologique impliquant le lncARN H19, le miARN let-7 et KSRP permet de réguler la sécrétion d'insuline et le stockage du glucose. Le cas du diabète est représenté par les flèches violettes [193].

c- KSRP et infections virales

Chez les mammifères, la réponse cellulaire innée lors d'une infection virale se fait grâce à des récepteurs (PRR) reconnaissant des composants viraux (ARN viral, glycoprotéines virales *etc...*). Cette reconnaissance entraîne l'activation de voies cellulaires telles que la voie RIG-I et l'activation de la réponse immunitaire.

RIG-I (« Retinoic acid-inducible gene I ») est un récepteur cytoplasmique reconnaissant les éléments viraux tels que les ARN viraux doubles brins. Cette voie est donc une des premières activées lors de l'infection. Elle entraîne l'induction de l'IFN de type I qui à son tour stimule

la voie immunitaire JAK/STAT et augmente l'expression des gènes stimulés par l'interféron. Soonthornvacharin et *al* ont montré par une approche *in silico*, puis expérimentale que KSRP pouvait former un complexe stable avec RIG-I en interagissant avec son domaine régulateur (DR), également impliqué dans la reconnaissance des éléments viraux. Cette interaction permet un contrôle de la réponse immunitaire innée en évitant une induction aléatoire de l'interféron I et en augmentant le seuil de sensibilité de RIG-I pour les éléments viraux. KSRP joue donc un rôle dans le déclenchement de la réponse immunitaire lors d'infections virales (**Figure 20**) [194].

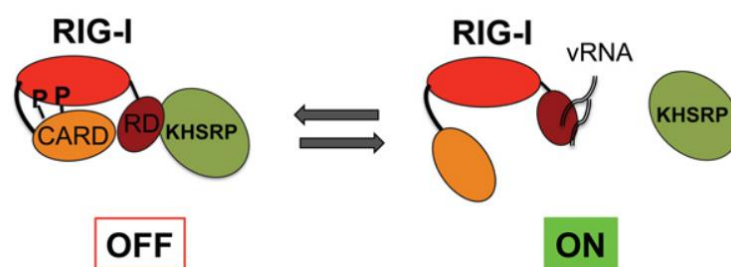


Figure 20 : L'interaction de KSRP avec la protéine antivirale RIG-I permet le contrôle de la réponse immunitaire. KSRP a la capacité d'interagir avec le domaine RD de la protéine RIG-I empêchant le déclenchement d'une réponse immunitaire aléatoire [194].

1- KSRP et Enterovirus 71

Le virus à ARN Enterovirus 71 appartient à la famille des *Picornaviridae*. Le génome viral est non-coiffé et polyadénylé, avec dans sa région 5'-NC un site d'entrée interne des ribosomes (« Internal ribosome entry site », IRES) permettant l'initiation de la traduction. Dans un premier temps la fixation de KSRP sur cet IRES régule négativement la traduction virale. Puis l'activation viro-induite de caspases cellulaires et du protéasome entraîne la dégradation ou le clivage de KSRP en une forme tronquée dépourvue de son extrémité C-terminale. Cette forme tronquée peut alors se fixer au niveau de l'IRES du génome viral et permet le recrutement de la machinerie de traduction. KSRP tronquée devient alors un facteur positif pour la traduction virale (**Tableau 3**) [195].

2- KSRP et virus Influenza A

Le rôle de KSRP a été évalué chez deux souches du virus Influenza A, la souche H5N1 hautement pathogénique et la souche H9N2 moins pathogénique. L'infection par le virus IAV

induit dans de nombreux cas une dérégulation des cytokines, aussi appelé choc cytokinique typiquement caractérisé par la présence élevée de cytokines et d'IFN. Liu et *al* ont comparé, entre les deux souches, l'expression de nombreuses cytokines et de protéines régulant leur expression afin de caractériser la différence de virulence. KSRP est fortement induite lors de l'infection par la souche H9N2 mais pas par l'infection H5N1 suggérant que KSRP joue un rôle dans la pathogénicité de la souche H9N2. KSRP est impliquée dans les voies NF- κ B, JAK/STAT et MAPK/p38 et ces voies de signalisation sont en lien avec la réponse immunitaire de l'hôte. La surexpression de KSRP dans les cellules infectées par la souche H9N2 stimule donc la sécrétion d'IFN- α/β qui à leur tour peuvent stimuler les ISGs et diminuer la réplication virale (**Tableau 3**) [196].

3- KSRP et Herpesviridae

Une analyse protéomique quantitative a été effectuée chez les virus HSV-1 et HCMV afin de déterminer les facteurs de l'hôte dérégulés lors de l'infection et pouvant avoir une influence sur la réplication virale. KSRP fait partie des protéines modulées de manière positive au cours des deux infections. Les résultats obtenus ont montré que cette surexpression de KSRP jouait un rôle positif sur la réplication virale en interférant avec la réponse immunitaire. En effet, KSRP régule le niveau d'expression des gènes *Ifna4* et *Ifnb* en interagissant avec les « ARE » présents dans leur région 3'-Non codante et en entraînant leur dégradation. La surexpression de KSRP entraîne une augmentation de la dégradation de ces gènes responsables de la production d'interféron et donc une diminution de la réponse immunitaire innée. Il a été montré que des souris KSRP^{-/-} produisaient assez d'interféron pour rendre la souris réfractaire à l'infection HSV-1. KSRP est donc un facteur proviral dans le cas de l'infection par HSV-1 et HCMV (**Tableau 3**) [197, 198].

Virus	Famille virale	Effet de KSRP sur le virus	Mécanismes	Références
Entérovirus 71	<i>Picornaviridae</i>	Négatif (Forme complète) Positif (forme tronquée)	KSRP tronquée se fixe à l'IRES virale et active la traduction des protéines virales	[195]
Influenza A (souche H9N2)	<i>Orthomyxoviridae</i>	Négatif	Stimule la réponse inflammatoire	[196]
HSV-1, HCMV	<i>Herpesviridae</i>	Positif	Inhibe les facteurs IFN α 4 et IFN β	[197]

Tableau 3: KSRP peut participer au contrôle de l'infection de différents virus

IV- Modèles viraux : Cas du Virus de l'Hépatite C et de la souche HCoV-229E des Coronavirus

A- Physiopathologie de l'infection par le Virus de l'Hépatite C (VHC)

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un des agents étiologiques principaux des hépatites chroniques, des cirrhoses et des carcinomes hépatocellulaires. Dans les années 1970, le Pr Harvey J Alter découvre que les cas d'hépatites post-transfusionnelles ne sont pas dues aux virus de l'Hépatite A ni au virus de l'Hépatite B. Il faudra attendre les années 1980 pour que le virus responsable des « hépatites non A non B » soit découvert et nommé virus de l'Hépatite C ou VHC [199]. Il existe à ce jour 8 géotypes différents et de nombreux sous-types du virus.

1- Epidémiologie

On estime aujourd'hui que 71 millions de personnes sont infectées chroniquement par le VHC soit une séoprévalence mondiale de 1% (Données de l'OMS). La prévalence est différente en fonction des régions du monde, l'Afrique subsaharienne et l'Asie du sud-est sont des régions endémiques dont la prévalence atteint les 10%. En Europe, la prévalence d'infection est entre 0.4 et 3.5%. On estime aujourd'hui entre 3 à 4 millions le nombre de personnes nouvellement infectées par le VHC. Ce virus est responsable de 399 000 décès par an principalement dus au développement de complications hépatiques comme la cirrhose et

à l'aggravation de cette dernière en carcinome hépatocellulaire (CHC) [200]. Malgré les récents traitements développés, le VHC reste un enjeu majeur de santé publique et son étude reste importante afin de mieux caractériser les conséquences physiopathologiques liées à l'infection.

2- Transmission du virus de l'Hépatite C

Le virus de l'hépatite C se transmet par voie parentérale, l'infection étant principalement transmise par transfusion sanguine jusque dans les années 1990. Dans les pays industrialisés, la majorité des infections est désormais limitée à l'échange de seringues contaminées chez les personnes faisant usage de drogues et à la transmission nosocomiale, grâce au dépistage systématique des poches de sang avant transfusion sanguine [200].

3- Histoire naturelle de l'infection par le VHC

Dans la majorité des cas, l'infection par le VHC est asymptomatique. Lors de l'infection par le VHC, la réponse immunitaire innée est amorcée mais est ensuite inhibée par le virus, ce qui résulte en une faible réponse immunitaire adaptative. Selon l'âge lors de l'infection, 60 à 90% des infections aiguës deviennent chroniques. Environ 50% des personnes présentant une infection chronique développent une fibrose hépatique. Cette dernière est caractérisée par l'accumulation de composants de la matrice extracellulaire fibreuse dans le parenchyme hépatique, due à un processus cicatriciel excessif. L'expression ultime de la fibrose est la cirrhose. L'architecture hépatique est alors transformée par la formation de nodules de régénération parenchymateux, entourés et séparés par des septa fibreux qui perturbent les fonctions hépatiques. Environ 2 à 5% des patients cirrhotiques développent un CHC chaque année (**Figure 21**). Aux Etats-Unis, en Europe et au Japon plus de 60% des CHC sont associés au VHC.

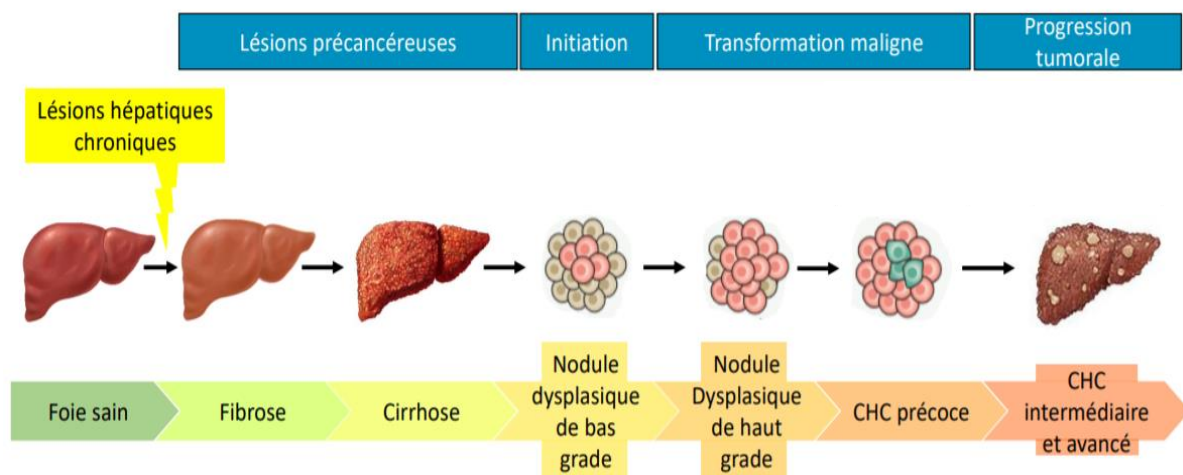


Figure 21 : Développement d'un carcinome hépatocellulaire. L'infection par le VHC ainsi que l'installation d'une infection chronique conduisent au développement de lésions hépatiques responsables de la formation d'un foie fibrotique puis d'une cirrhose. La cirrhose conduit à l'initiation d'un état pré-cancéreux suivi par la formation d'un carcinome hépatocellulaire [201, 202].

4- Structure de la particule virale

Le VHC est un virus enveloppé de 55 à 65nm de diamètre appartenant à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Hepacivirus*. Son génome est composé d'un ARN linéaire de polarité positive protégé par une nucléocapside à symétrie icosaédrique. La particule virale est entourée d'une bicouche phospho-lipidique contenant des hétérodimères des protéines virales structurales E1 et E2 (**Figure 22**).

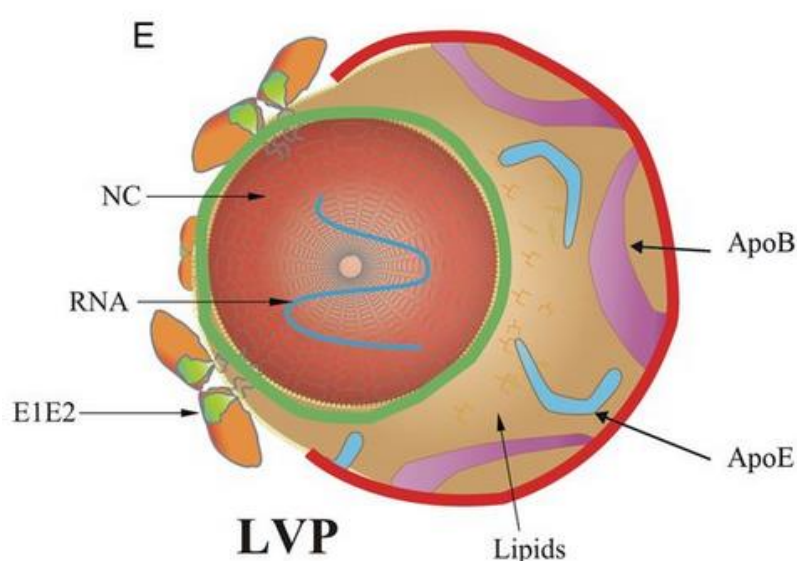


Figure 22: Organisation Structurale schématique et hypothétique du virus de l'hépatite C encapsidé. L'ARN viral est encapsidé et entouré d'une bicouche phospho-lipidique exprimant des

hétérodimères des protéines structurales E1-E2 à sa surface. La particule virale est associée à une lipoparticule formée de lipides et de protéines telles que l'Apolipoprotéine B ou E (ApoB et ApoE) afin de former une lipo particule virale. [203]

5- Génome viral et protéines virales

Le génome viral est un ARN simple brin de polarité positive d'environ 10 kb non-coiffé et non-polyadénylé. Il est composé d'une région 5'-NC d'environ 340 nt contenant les signaux nécessaires à la réplication et une séquence IRES permettant la traduction des protéines virales de manière coiffe-indépendante. Le génome viral comporte une seule phase ouverte de lecture qui code une polyprotéine virale. Celle-ci sera clivée par différentes protéases cellulaires, comme les protéases SP (« Signal peptidase) et SPP (« Signal-peptide peptidase) responsables du clivage entre les protéines structurales E1 et Core [204] et par des protéases virales. Le clivage de la polyprotéine aboutit à la formation de 10 protéines classées en protéines structurales et non-structurales. On trouve quatre protéines structurales, les glycoprotéines E1/E2 forment l'enveloppe de la particule virale tandis que la protéine Core forme la capsid. La viroporine p7 semble former un canal ionique et a un rôle dans la maturation de la particule virale et dans son relargage. Les protéines non-structurales sont au nombre de six : les protéines NS2 et NS3 sont les protéases virales responsables du clivage de la polyprotéine, la protéine NS4A est le cofacteur de la protéase NS3, la protéine NS4B dont l'activité est peu décrite permettrait la formation d'un réseau membranaire (« Membranous Web ») lieu de réplication et d'assemblage du virus. Cette structure contenant des vésicules à double membrane, composée de protéines cellulaires et virales, est essentielle pour le virus car elle permet de limiter la présence de facteurs antiviraux tels que RIG-I ou MDA5 et la présence de RNAses cellulaires. La protéine NS5A est une phosphoprotéine qui ne possède pas d'activité enzymatique mais a un rôle essentiel dans la réplication et l'assemblage virale. Enfin la protéine NS5B est la polymérase virale. Le génome viral se termine par une extrémité 3' non-codante divisée en 3 parties. Une première partie de 30 nt relativement variable, une deuxième partie comprenant une région poly U/UC de taille variable en fonction des génotypes et une troisième partie de 98 nt très conservée formant trois structures tige-boucle (**Figure 23**).

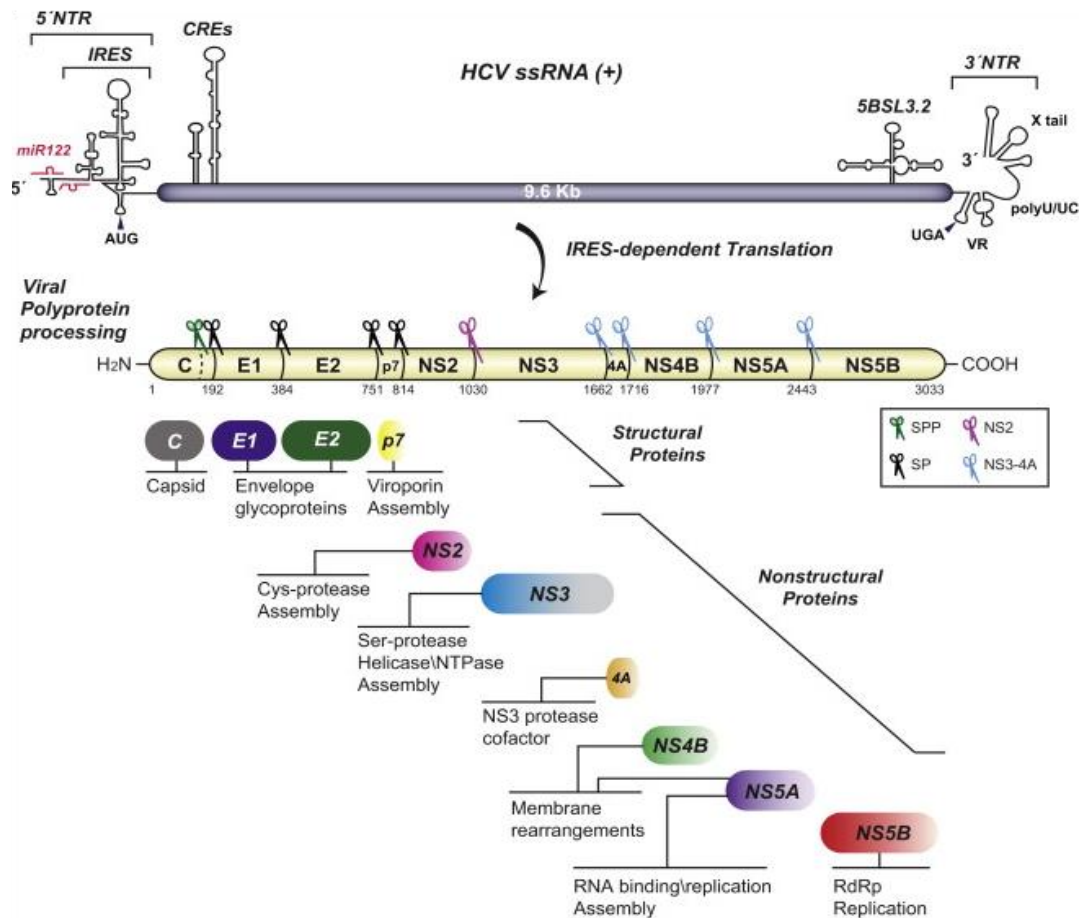


Figure 23 : Représentation schématique du génome viral du VHC.

Le génome du VHC est composé d'une IRES permettant sa traduction en 5'-NC ainsi que plusieurs sites d'interaction pour le miR-122. En 3'-UTR, une région variable et une région poly(U) sont retrouvées. Le génome viral code une polyprotéine clivée par des protéases cellulaires et virales donnant quatre protéines structurales E1, E2, core et p7 et six protéines non-structurales NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B [205].

6- Cycle de vie du VHC

Le VHC infecte uniquement l'Homme et le chimpanzé et présente un tropisme hépatique majoritaire. Néanmoins, des cas d'infections de lymphocytes B et T ainsi que de cellules dendritiques ont déjà été rapportés [206, 207].

La glycoprotéine E2 est l'élément majoritairement responsable de l'attachement de la particule virale sur la cellule. Les récepteurs cellulaires du VHC sont multiples et impliquent différentes voies biologiques. Après reconnaissance et attachement à ses récepteurs, le virion entre dans la cellule par endocytose de manière clathrine-dépendante (**figure 24**) [208]. La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome fait intervenir une acidification du pH qui permet la libération du génome viral dans le cytoplasme (**Figure 24**).

L'ARN viral (+) non coiffé est ensuite traduit de manière IRES-dépendante par la machinerie cellulaire en recrutant notamment la sous-unité 40s du complexe de traduction. La polyprotéine virale néo-formée est ensuite clivée par les protéases cellulaires et virales au niveau du réticulum endoplasmique (**Figure 24**). Suite à cette première phase de traduction de l'ARN viral, le complexe de réplication va pouvoir être mis en place.

Le processus de réplication nécessite les protéines virales non structurales NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B. La réplication se fait dans des structures vésiculaires à double membrane appelées « DMV » (« double-membrane vesicle », « membranous web ») issues d'un remodelage intracellulaire des membranes (Réticulum endoplasmique, Golgi,) nécessitant les protéines virales NS4B et NS5A. On trouve dans ces structures des protéines cellulaires telles que VAPA ou VAPB pouvant interagir avec NS5A et permettant à NS5B de se placer correctement sur le génome viral ou encore certaines cyclophilines [209]. Les DMVs permettent également de protéger les protéines virales ainsi que l'ARN viral de la dégradation par des RNAses cellulaires ou de la reconnaissance par des récepteurs cellulaires antiviraux (PRRs), de rassembler tous les facteurs nécessaires à la réplication virale et de coordonner spatialement les différentes étapes du cycle de vie du virus (réplication, traduction et assemblage).

NS5B, la polymérase à ARN ARN-dépendante est l'enzyme clé responsable de la réplication génomique. A partir du brin (+) du génome viral, le brin (-) va être synthétisé créant une structure double brin. Le brin (-) néo formé va ensuite servir à la transcription de nouveau brin (+). Les brins (+) nouvellement synthétisés vont être transportés hors du complexe de réplication pour pouvoir être traduits ou vont être encapsidés afin de former de nouveaux virions.

La réplication génomique ainsi que la traduction de la polyprotéine virale nécessitent des facteurs cellulaires tels que le microARN proviral miR-122. Ce microARN a la capacité d'interagir avec l'extrémité 5'-NC du génome viral permettant la stabilisation de l'ARN viral et favorise la réplication génomique.

La formation d'un nouveau virion nécessite l'empaquetage du génome viral et son relargage dans la matrice extracellulaire. Pour cela, l'ARN viral est délocalisé des DMVs et va être entouré d'une nucléocapside composée de la protéine core, le protégeant de la dégradation

cellulaire [210]. Le métabolisme lipidique de la cellule est étroitement impliqué dans l'assemblage et la sécrétion des virions. En effet, il a été montré que la protéine Core était associée aux gouttelettes lipidiques permettant le transport de l'ARN viral et son encapsidation. L'implication de protéines cellulaires est également en cours d'étude dans ce processus mais certaines sont déjà connues. Les protéines DGAT-1 (« diacylglycerol O-acetyltransferase 1 ») et cPLA2 (« cytosolic phospholipase A2 ») favorisent le transport du complexe ARN viral-Core jusqu'aux gouttelettes lipidiques [209].

Les virions contenant l'ARN viral sont de faible densité et peuvent être comparés aux lipoprotéines cellulaires de faible densité. Les virions sont ensuite synthétisés par bourgeonnement au niveau du réticulum endoplasmique et exportés par exocytose en suivant la voie de sécrétion des « VLDL » (« Very low density lipoprotein ») [211]. Les protéines cellulaires ApoB et MTP participent également à la sécrétion des nouveaux virions [209].

Le cycle de vie du VHC est un processus dynamique dont la coordination est encore peu comprise. La compréhension de la spatio-temporalité de l'infection est extrêmement importante à comprendre afin de pouvoir adapter les traitements et leur efficacité en fonction des cycles d'infection.

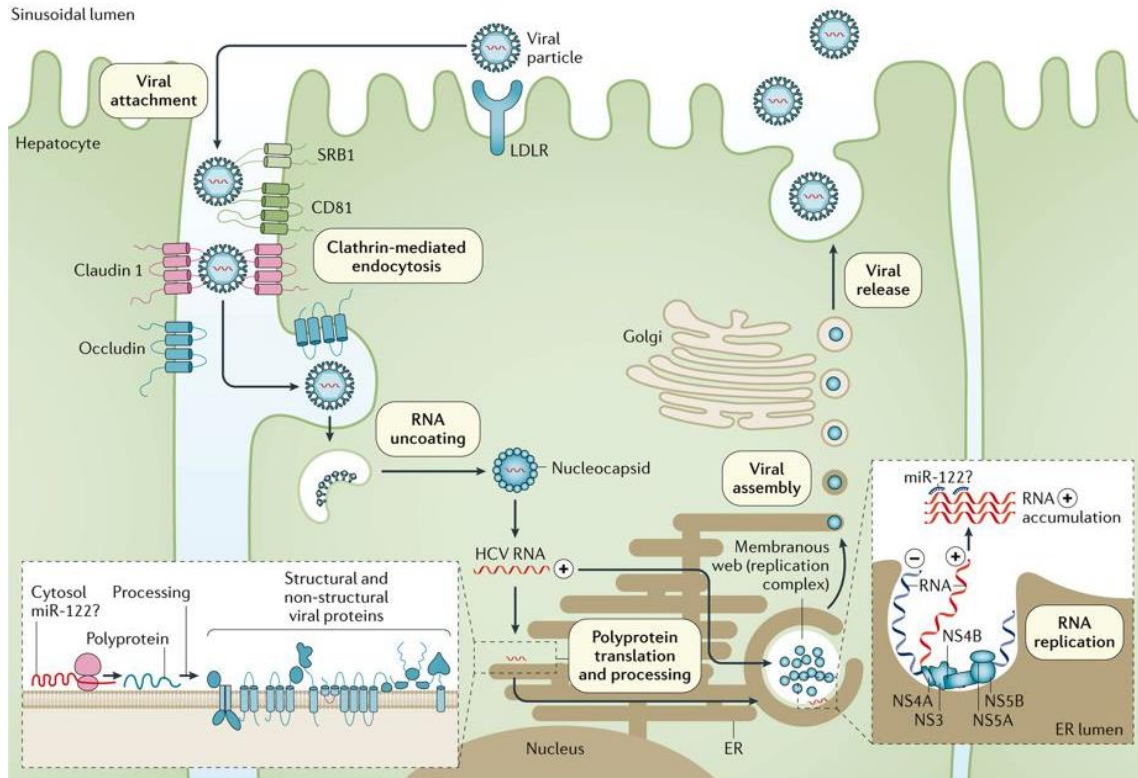


Figure 24 : Cycle de vie du VHC. Après fixation aux différents récepteurs cellulaires, le virus entre de manière clathrine-dépendante dans la cellule. L'acidification du pH de l'endosome permet la libération du génome viral qui sera traduit en une polyprotéine. Cette dernière sera clivée par des protéases cellulaires et virales, et les protéines non-structurales du VHC ainsi formées permettront la mise en place des DMVs, lieu de réplication du virus. Le génome viral brin (+) peut ensuite être répliqué en brin (-) servant de matrice pour la formation de nouveaux brins (+), ou peut être de nouveau traduit ou bien assemblé au sein d'une nouvelle particule virale libérée par exocytose grâce à la voie de sécrétion des VLDL dans le milieu extérieur [212].

7- Antiviraux

De 1990 à 2011, le traitement administré aux patients chroniquement infectés par le VHC a été une combinaison entre la Ribavirine et l'interféron alpha2pegylé. Ce traitement a montré une efficacité globale de moins de 50% et inégale selon les génotypes. De plus, il a été associé à de nombreux effets secondaires [213].

Durant cette dernière décennie, de nouvelles molécules ciblant une ou plusieurs protéines virales (antiviraux à action directe, DAAs) ont été développées. Les premières molécules sont des inhibiteurs de la protéase virale NS3, ayant obtenu en 2011 l'autorisation de mise sur le marché par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (« Food and drug administration ») aux Etats-Unis et par l'agence européenne des médicaments (« European medicines agency »). Ces molécules, administrés en combinaison avec la ribavirine et l'interféron pégylé, amélioraient significativement la réponse thérapeutique

mais présentait des effets secondaires importants (rashes cutanés, anémie sévère). Le développement de nouvelles générations de DAAs était alors nécessaire.

Depuis 2014, de nouvelles générations de DAAs ont été mises sur le marché. Ces molécules sont classées en quatre groupes, basés sur leur mécanisme d'action (**Tableau 4**) :

- Les inhibiteurs de protéase virale (NS3/4A) de deuxième génération tels que le *Simeprevir*, sont efficaces contre les génotypes 1 et 4 mais présentent cependant une faible barrière à la résistance (le virus peut évoluer, muter et devenir résistant à ces molécules) et des effets secondaires notables. Enfin, de nouvelles molécules anti-protéases de dernière génération (Glecaprevir et voxilaprevir, disponibles depuis 2017) sont efficaces contre l'ensemble des génotypes et présentent une haute barrière à la résistance.

- Les inhibiteurs de la protéine NS5A tels que le *Ledipasvir* ou le *Daclatasvir*, sont efficaces sur la plupart des génotypes mais présentent cependant une faible barrière à la résistance. Les inhibiteurs de NS5A de dernière génération, tel que le *pibrentasvir* présente une barrière génétique virale élevée.

- Les inhibiteurs dirigés contre la polymérase virale NS5B divisés en deux sous-catégories. Les inhibiteurs de polymérase peuvent être des inhibiteurs nucléosidiques tels que le *Sofosbuvir* ou non-nucléosidiques tels que le *Dasabuvir*. Le Sofosbuvir est la molécule la plus utilisée grâce à son activité pangénotypique et une haute barrière à la résistance. Cet antiviral constitue une base pour la majorité des traitements en combinaison avec d'autres DAAs. L'efficacité actuelle des DAAs permet aujourd'hui d'exclure l'utilisation de l'interféron pégyle et de la ribavirine du traitement du VHC.

Les combinaisons de ces molécules de deuxième génération permettent d'obtenir des taux de RVS de plus de 95% pour tous les génotypes, y compris chez les patients difficiles à traiter (cirrhose, défaillance rénale, transplantation hépatique). [214, 215].

Classe d'inhibiteur	Molécule	Génotype	Barrière à la résistance
Inhibiteurs de protéase (NS3/4A)	Simeprevir, Boceprevir	1,4	faible
Inhibiteur de polymérase (NS5B) de type nucléosidique	Sofosbuvir	Pan-génotypique	haute
Inhibiteur de polymérase (NS5B) de type non-nucléosidique	Dasabuvir	1	Faible
Inhibiteur de la protéine NS5A	Ledipasvir, Daclatasvir	50% des génotypes	Haute

Tableau 4 : Antiviraux à action directe de seconde génération, dirigés contre les différentes protéines non-structurales du VHC.

Malgré l'efficacité des traitements prescrits, cette solution reste coûteuse.

Parallèlement au développement d'antiviraux spécifiques, d'autres stratégies thérapeutiques avaient été développées pour cibler les facteurs de l'hôte tels que les protéines impliquées dans le métabolisme lipidique ou encore les ARN non-codants tels que le microARN 122. Ce microARN dont l'expression est spécifique du foie a un rôle essentiel dans le métabolisme lipidique et dans la réponse liée au stress [216].

Dans le cas de l'infection VHC, il a été montré par Jopling et al que la séquestration du miR-122 endogène conduisait à la diminution de l'ARN viral [217]. Le miR-122 se fixe directement à l'extrémité 5'-NC de l'ARN viral sur deux sites et à la différence du rôle « classique » d'un microARN, joue un rôle positif sur la réplication et la traduction du virus. De plus, la fixation du complexe RISC-miR-122 au niveau de l'extrémité 5'-NC permet de protéger l'ARN viral de la dégradation cellulaire [218]. Enfin, la fixation d'un grand nombre de molécules de miR-122

sur le génome viral entraîne une dérégulation de l'expression des ARNm cibles du miR-122 et l'installation d'un microenvironnement fertile pour le développement d'un CHC. De par son rôle dans le cycle de vie du virus, le miR-122 est une cible thérapeutique intéressante.

En 2010, une molécule antagoniste du miR-122, appelée SPC3649 ou Miravirsén, a été développée par le laboratoire Santaris au Danemark et testée sur des chimpanzés atteints d'hépatite C chronique. Cet antagoniste est un oligonucléotide complémentaire de l'extrémité 5' du miR-122, entraînant sa séquestration et a montré une efficacité dans la diminution de la charge virale chez l'animal après 12 semaines de traitement. De plus, aucun signe de développement de résistance et peu d'effet secondaire ont été observés [219].

Chez l'Homme, le Miravirsén en monothérapie a montré une efficacité sur l'ensemble des génotypes *in vitro*. La molécule a été jusqu'en phase 2a d'essai clinique chez des patients naïfs de traitement et entraînait une diminution de la charge virale, continue et prolongée après l'arrêt du traitement. De plus, la prise du Miravirsén n'affectait pas le niveau global d'expression des autres microARNs.

Le Miravirsén a été donné en combinaison de DAAs chez des patients naïfs de traitement et/ou résistants à certains DAAs. La haute barrière génétique au développement de virus résistant met en lumière les avantages du Miravirsén.

En 2014, un autre inhibiteur potentiel du miR-122, le RG-101 (Regulus Therapeutics Inc., San Diego, CA, USA), a été développé, basé sur une prise unique afin de faciliter le traitement pour les patients. La molécule est rapidement métabolisée par le foie et a montré une efficacité *in vitro* sur le génotype 1 incluant les souches mutantes résistantes aux DAAs. Dans une étude clinique de phase 1, 15 patients sur 28 ayant reçu une dose unique de RG-101 ont montré une diminution significative de la charge virale et sur ces 15, 12 ont un niveau d'ARN viral indétectable.

Malgré l'efficacité indéniable des DAAs, le développement de molécules alternatives pourraient être une solution dans certaines impasses thérapeutiques ou pour optimiser le traitement.

8- Interaction virus - ARN non-codants

Cas des microARNs

Depuis la découverte la fonction provirale de miR-122, plusieurs microARNs ont été identifiés comme jouant un rôle dans le cycle de vie du VHC et ont été proposés comme nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Un site de fixation (« seed ») pour le miR-196b a été mis en évidence dans la partie codante pour la protéine NS5A du génome viral. Durant l'infection, l'expression du miR-196b est induite par l'IFN β et conduit à la diminution de la réplication virale dans les cellules Huh7, les hépatocytes primaires murins et dans les cellules mononuclées du sang périphérique. De plus, le miR-196b a pour cible l'ARNm de la protéine Bach1 qui a pour rôle de réprimer l'expression de la protéine anti-inflammatoire HMOX1. La surexpression du miR-196b entraîne donc la diminution de l'expression de Bach1, l'augmentation de l'expression de HMOX1 et la diminution de l'ARN viral. Le miR-196b a donc un effet antiviral direct en ciblant l'ARN viral et un effet indirect en provoquant la surexpression d'un facteur anti-inflammatoire.

Le miR-199a-3p a été identifié comme ayant un effet antiviral chez certains virus de la famille des *Herpesviridae*, chez le virus de la forêt de Semliki et chez le virus de l'Hépatite C. MiR-199a-3p participe à la modulation des voies de signalisation PI3K/Akt et ERK/MAPK qui sont impliquées dans la réplication virale. Ce microARN détient deux sites de fixation sur l'ARN viral des génotypes 1b et 2a du VHC au niveau de l'IRES suggérant un effet antiviral direct. La surexpression de ce microARN diminue de 80% à 90% la réplication virale ce qui laisse à penser que le développement d'un agoniste du miR-199a-3p peut être une solution thérapeutique envisageable. La mise en évidence d'un effet antiviral direct et/ou indirect de ce microARN est toujours en cours [220].

Il a été montré par Bandyopadhyay et al que l'infection des cellules Huh7.5 et des cellules étoilées du foie par le VHC entraînait une diminution de l'expression du miR-29. De plus, la surexpression de ce microARN conduit à une diminution de 70% de la réplication du VHC, à l'inhibition de la prolifération des cellules étoilées du foie et de la production de collagène. Le mécanisme expliquant l'effet antiviral du miR-29 sur le VHC n'a pas encore été défini [221].

La modulation de l'expression des microARNs par l'infection permet également d'utiliser ces microARNs comme biomarqueurs de l'évolution de l'infection et des maladies hépatiques associées. On peut citer l'exemple du miR-21 dont l'expression est corrélée avec la charge virale, l'installation d'un état fibrotique et le niveau de transaminase dans le sérum des patients.

L'étude de l'expression des microARNs et de leurs cibles lors de l'infection permet donc de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux qui gouvernent l'installation d'une infection chronique.

Cas des lncARNs

Depuis leur découverte, différentes fonctions ont été attribuées aux lncARNs incluant la prolifération cellulaire, le développement cellulaire ou encore le contrôle de l'homéostasie. Le rôle des lncARNs a également été décrit dans le cas de plusieurs infections virales dont l'infection VHC. Dans certains cas il est difficile de discriminer si la dérégulation d'un lncARN résulte de la réponse cellulaire antivirale ou est directement induite par les protéines virales.

Plusieurs exemples de lncARNs dont l'expression est directement modifiée par le virus de l'hépatite C ont été répertoriés dans la littérature. On peut citer comme exemple le cas du lncARN oncogénique PVT-1 dont l'expression est fortement augmentée après infection. Ce lncARN est induit au niveau transcriptionnel par le proto-oncogène *c-myc* dont l'expression est augmentée en présence de la protéine virale NS5A. La transcription de PVT-1 génère un ARN circulaire capable de reverser l'état de sénescence cellulaire en séquestrant le microARN let-7 et en entraînant l'accumulation des ARNm cibles de let-7. L'induction de ce lncARN par le VHC conduit à une prolifération anormale des cellules hépatiques et au développement d'un CHC [222, 223].

Les cellules infectées exprimant la protéine core ont un niveau plus élevé du lncARN HOTAIR. Ce lncARN a pour cible la protéine SIRT1 impliquée dans le métabolisme du glucose et des lipides. L'inhibition de ce facteur par HOTAIR entraîne une altération des voies métaboliques positives pour la réplication virale. De plus un niveau élevé d'HOTAIR corrèle à des facteurs de mauvais pronostic du CHC (invasion tumorale, métastase et progression de la tumeur) [224].

D'autres lncARNs sont fortement modulés au cours de l'infection VHC et participent indirectement au cycle de vie du virus. La réponse antivirale médiée par l'interféron conduit à la dérégulation de l'expression des lncARNs. De manière intéressante, ces lncARNs sont localisés dans le génome, proches des ISGs qu'ils régulent. Le lncARN NRIR est le premier lncARN décrit comme étant un régulateur négatif de la transcription de certains ISGs. En effet, le rôle de ce lncARN est d'inhiber l'expression des ISGs impliquées dans la réponse inflammatoire. Dans le cas de l'infection VHC, NRIR inhibe le niveau d'expression de facteurs antiviraux tels que la vipérine ou le facteur IFITM1 entraînant une augmentation de la réplication virale. Un autre exemple est celui du lncARN Lethe. Ce lncARN est induit par l'activation du facteur STAT3 après l'infection. Suite à l'infection, l'activation de STAT3 améliore la réplication virale en régulant de manière positive l'expression du lncARN Lethe qui va inhiber la réponse interféron en inhibant les facteurs PKR, OAS et IRF1 [71].

Il existe également des lncARNs capables d'inhiber directement des étapes du cycle viral. Le lncARN GAS5 cytoplasmique est surexprimé au cours de l'infection virale et détient un site de fixation de la protéine virale NS3 entraînant l'inhibition de la réplication par la séquestration de la protéine virale [225].

B- Physiopathologie de l'infection par les Coronavirus

1- Généralités

Les différentes souches de Coronavirus appartiennent à l'ordre *Nidovirale*, à la famille des *Coronaviridae* et à la sous-famille des *Orthocoronavirinae*. Ces virus infectent une grande variété d'espèce dont l'Homme, et possède un tropisme multi-organes, en majorité respiratoire, entérique et hépatique. La sous-famille des *Orthocoronavirinae* se divise en 4 genre distincts : les Coronavirus- alpha, -beta, -gamma et -delta (**Figure 25**).

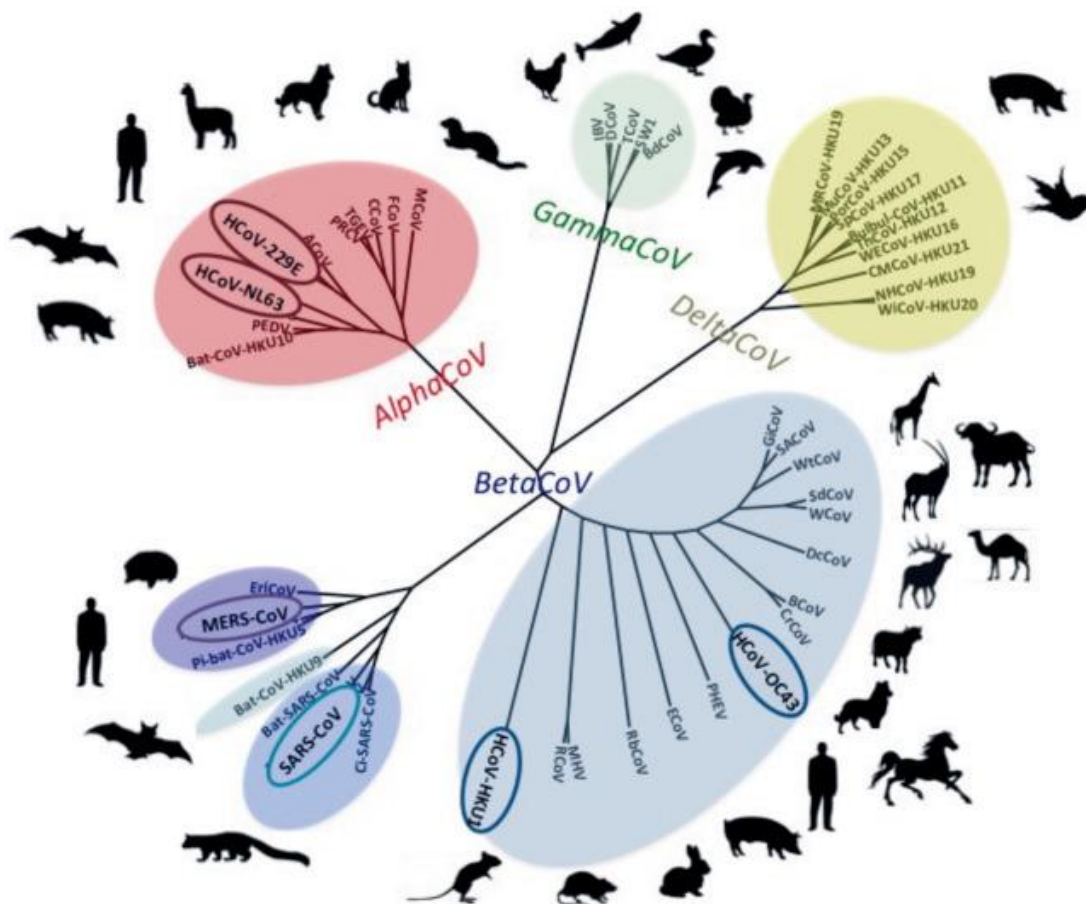


Figure 25 : Arbre phylogénétique des Coronavirus. Les *Orthocoronavirinae* sont divisés en 4 genres, les alpha, beta, gamma et delta Coronavirus. Six souches de Coronavirus infectent l'Homme, les souches HCoV-229E, -NL63, -HKU1, -OC43 ainsi que les souches MERS-CoV et SARS-CoV. [226]

2- Epidémiologie

Actuellement, six souches de Coronavirus sont capables d'infecter l'Homme. Les souches HCoV-229E, NL63, HKU1 et OC43 sont retrouvées dans la population générale de manière endémique et sont généralement associées à des pathologies bénignes. En 2002, a émergé dans la province de Guangdong en Chine une nouvelle souche de Coronavirus humain appelée SARS-CoV. L'infection s'est poursuivie jusqu'en juillet 2003 faisant 8096 cas à travers le monde et causant 774 décès. En 2012, le MERS-CoV est identifié à partir d'un patient Saoudien décédé des suites de détresse respiratoire. Cette nouvelle souche de Coronavirus a un taux de mortalité avoisinant les 35% malgré une transmission inter-humaine relativement faible. Depuis le premier cas d'infection, 27 pays ont notifié des cas de MERS-CoV dont l'Arabie Saoudite qui a recensé 80% des cas humains. A ce jour, 2 279 cas ont été reportés par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dont 806 décès (www.WHO.int).

3- Emergence et transmission

Les Coronavirus Humains bénins se transmettent de manière directe par l'intermédiaire de sécrétions oropharyngées dispersées par la toux des personnes infectées. Les transmissions de manière indirecte, manu-portées et respiratoires semblent plus rares bien que possibles [227].

Les Coronavirus ont pour réservoir naturel des espèces animales (principalement les chauves-souris) mais également le chat, le porc, le bœuf ou encore certaines espèces aviaires. Néanmoins, il semblerait que ce virus ait la capacité de franchir les barrières d'espèce. En effet, les souches SARS-CoV et MERS-CoV sont considérées comme des zoonoses, l'Homme n'étant pas leur réservoir naturel. Elles proviendraient de l'évolution de souches présentes chez la civette palmiste masquée pour le SARS-CoV et du dromadaire pour le MERS-CoV. Il a été montré que les virus à ARN ont une grande capacité de mutation de par l'absence d'activité 3'-5' correctrice de relecture de la polymérase virale. Néanmoins, malgré quelques mutations les Coronavirus ne sont pas des virus considérés comme ayant un fort taux de mutation. L'importante plasticité du génome des Coronavirus fait donc de ces virus des agents à fort potentiel évolutif. Il a par exemple été montré que le génome du Coronavirus OC43 ressemblait à 90% au génome du Coronavirus bovin. Il semblerait que la capacité des Coronavirus à passer les barrières d'espèce soit due à des recombinaisons homologues. La proximité géographique entre l'Homme et l'animal augmente la probabilité d'un passage inter-espèce. De plus, la facilité de l'Homme à se déplacer à travers le monde augmente le risque de transmission d'Homme à Homme et d'animaux à Homme [228].

4- Histoire naturelle de l'infection Coronavirus

Les premières souches de Coronavirus humaines HCoV-229E et HCoV-OC43 ont été découvertes dans les années 1960. Depuis quatre autres souches humaines ont été identifiées : SARS-CoV en 2002, NL63 en 2004, HKU1 en 2005 et la souche MERS-CoV en 2012. Avant l'apparition des souches SARS-CoV et MERS-CoV, les souches humaines étaient responsables d'infections des voies respiratoires hautes et basses comme les rhumes hivernaux. Des infections pulmonaires plus sévères ont été observées chez les personnes âgées, les nourrissons et les personnes immunodéprimées.

Les Coronavirus peuvent également être responsables de troubles entériques et neurologiques [229, 230]. Le lien entre l'infection et ces symptômes restent néanmoins controversé.

Dans le cas des infections par SARS-CoV et MERS-CoV, les symptômes peuvent aller jusqu'à la détresse respiratoire aigüe avec possibilité de pneumonie pour la souche MERS-CoV. De plus, des manifestations extra-pulmonaires comme des manifestations gastro-intestinales (forte diarrhée) peuvent être observés.

5- Structure de la particule virale

Les Coronavirus sont des virus enveloppés. La particule virale fait entre 80 à 120 nm de diamètre. On retrouve à la surface du virion, trois protéines composant l'enveloppe virale. La protéine majoritaire est la glycoprotéine S pour « spike » organisée en trimère et formant des spicules donnant aux Coronavirus observés sous microscopie électronique cet aspect de couronne à l'origine de leur nom.

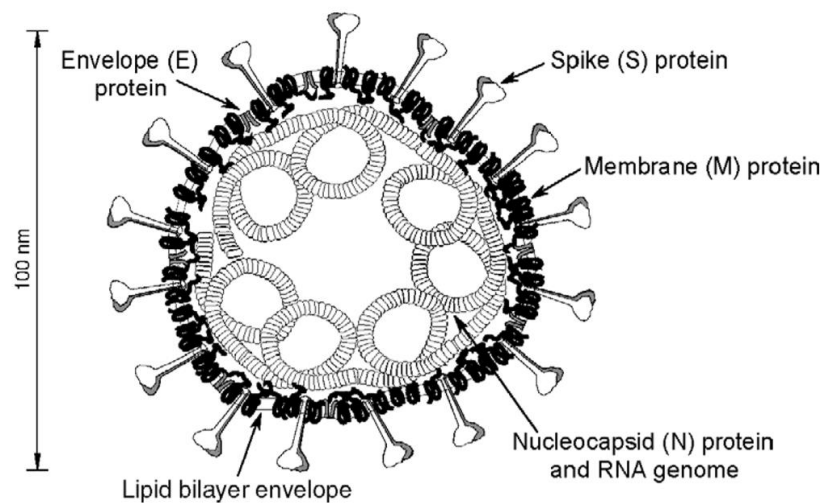


Figure 26 : Représentation schématique de la particule virale des Coronavirus. La particule virale est composée de la protéine d'enveloppe (E), de la protéine Spike (S) et de la protéine membranaire (M). L'ARN viral est protégé par une nucléocapside. [231]

La protéine virale Spike est responsable de l'attachement et de l'entrée dans la cellule. On retrouve également la protéine d'enveloppe E et la protéine transmembranaire M. Le génome viral est protégé par la nucléoprotéine N formant une nucléocapside hélicoïdale (**Figure 26**). Chez certains betacoronavirus on peut retrouver une dernière protéine structurale, la protéine HE (Hemagglutine Esterase).

6- Génome et protéines virales

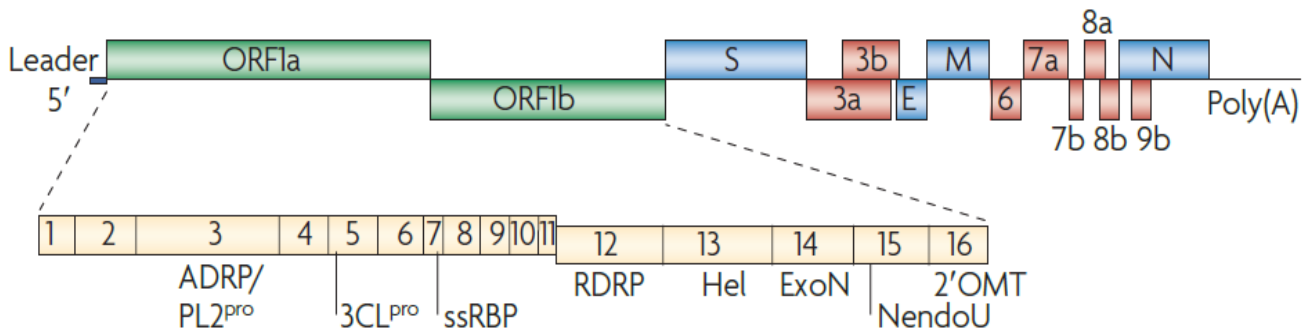


Figure 27 : Génome de la souche SARS-CoV. Le génome viral est composé de 14 cadres, deux principaux ORF1a et ORF1b (en vert), quatre donnant les protéines structurales (en bleu) et 8 donnant des protéines accessoires (en rouge). Les deux ORF principales codent les 15 à 16 protéines non-structurales (nsp) [232].

L'ARN viral des Coronavirus possède une taille variant de 25 à 32 kb. C'est un ARN viral non segmenté, simple brin, de polarité positive qui possède certaines caractéristiques des ARN messagers cellulaires comme la présence d'une coiffe en 5'-Non codant et une queue poly(A) en 3'-Non codant. Le génome viral est composé de 6 à 14 cadres ouverts de lecture (« Open Reading Frame », ORF) (**Figure 27**). Les deux tiers du génome viral sont codés par deux ORFs (1a et 1ab) qui se chevauchent, donnant 15 à 16 protéines non-structurales (« non-structural protein », nsp) en fonction des souches de Coronavirus. La traduction 5'→3' de l'ARN génomique entraîne la synthèse de la polyprotéine pp1a ou de la polyprotéine pp1ab en cas de décalage du cadre de lecture de type « -1 ».

Ces polyprotéines sont clivées par des protéases cellulaires et virales ayant une activité principalement 3CL^{pro} (« 3 Chymotrypsin like-proteinase »). Elles donnent les protéines non-structurales suivantes (**Tableau 5**) : nsp1 est impliquée dans l'échappement de la réponse antivirale, nsp3 et nsp5 sont les protéases virales, nsp12 est la polymérase ARN-dépendante principale, nsp8 a également une fonction de polymérase mais agirait comme primase pour initier la réplication, nsp13 contient un domaine hélicase hautement conservé, nsp7, 8, 9 et 10 jouent un rôle sur la formation des ARN génomiques et sous-génomiques et sont essentiels à la réplication, nsp13, 14 et 16 permettent la formation de la coiffe au niveau de l'extrémité 5'-NC et nsp14 a également une activité exonucléase 3'→5' avec un rôle dans le contrôle de la fidélité de la transcription. Malgré l'action de la protéine nsp14 sur le contrôle de la fidélité de la transcription, les Coronavirus sont des virus pouvant accumuler des

mutations expliquant en partie la capacité de passer les barrières inter-espèces relativement facilement.

Protein	Functions
Nsp1	Host mRNA degradation; translation inhibition; cell cycle arrest; inhibition of IFN signaling
Nsp2	Unknown
Nsp3	Papain-like proteases (PL1 ^{pro} , PL2 ^{pro}) (polyprotein processing); poly(ADP-ribose) binding; DMV formation (?); IFN antagonist; nucleic acid binding; deubiquitinating activity
Nsp4	DMV formation (?)
Nsp5	Main protease (M ^{pro} , 3CL ^{pro}); polyprotein processing
Nsp6	DMV formation (?)
Nsp7	Single-stranded RNA binding
Nsp8	Primase
Nsp9	Part of replicase complex
Nsp10	Part of replicase complex
Nsp11	Unknown
Nsp12	RNA-dependent RNA polymerase
Nsp13	Helicase; nucleoside triphosphatase activity; RNA 5'-triphosphatase activity
Nsp14	3'→5' exoribonuclease; RNA cap formation (guanine-N7)-methyltransferase
Nsp15	Endonuclease
Nsp16	RNA cap formation (2'O-methyltransferase)

DMV, double-membrane vesicle; IFN, interferon.

Tableau 5 : Rôle des protéines non structurales. [232]

Enfin, le dernier tiers du génome viral est constitué des ORFs codant pour les protéines structurales S, E, M, N et pour la protéine HE codée par certains Coronavirus du genre β , améliorant l'attachement lors de l'entrée du virus.. On retrouve également dans cette partie certaines protéines accessoires encore mal caractérisées et spécifiques de certaines souches virales.

7- Cycle de vie du virus

La première étape du cycle de vie du virus est son attachement à la membrane cellulaire. La reconnaissance des récepteurs membranaires par le virus est dépendante de la glycoprotéine transmembranaire Spike retrouvée sur l'enveloppe du virus. Les récepteurs cellulaires utilisés par le virus sont différents selon les souches de Coronavirus. La souche HCoV-229E utilise l'aminopeptidase N, les souches HCoV-NL63 et SARS-CoV utilise l'ACE2

(« Angiotensin converting enzyme 2 »), la souche murine MHV utilise le CEACAM1 (« Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 ») et enfin pour la souche MERS-CoV le récepteur utilisé est le DDP4 (« Dipeptidyl peptidase 4 ») [231, 233]

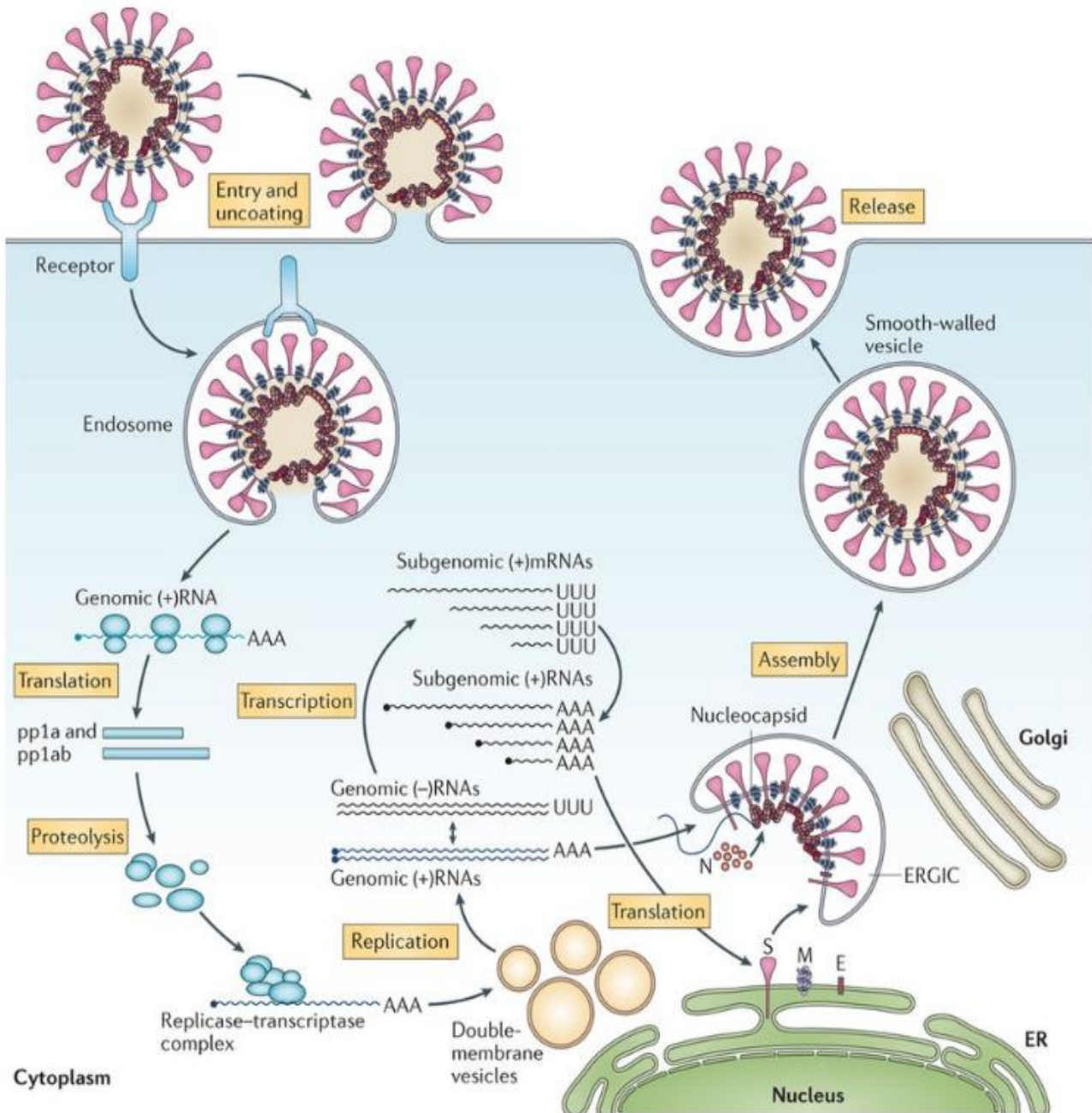


Figure 28 : Cycle répliatif des Coronavirus. Les Coronavirus reconnaissent différents récepteurs cellulaires et entrent dans la cellule par endocytose. L'acidification du pH permet la libération du génome viral dans le cytoplasme où le génome viral va pouvoir être traduit en deux polyprotéines principales pp1a et pp1ab donnant les protéines structurales. Le génome va ensuite être répliqué afin de donner un ARN brin (-) servant de matrice pour la formation de nouveaux brins (+) et d'ARN sous-génomique. Les particules virales sont ensuite assemblées au sein d'un nouveau virion, libéré par exocytose. [234]

Les coronavirus reconnaissent différents récepteurs à la surface de la cellule et rentrent par endocytose. La libération du génome viral conduit à la traduction des polyprotéines pp1a et pp1ab ainsi qu'à la réplication du génome viral.

Les mécanismes d'entrée du virus sont encore peu caractérisés cependant deux voies ont été identifiées : la première étant une entrée par endocytose suite à la fixation du virion sur son récepteur cellulaire et la deuxième une entrée par fusion à la membrane entraînant la libération directe du génome viral dans le cytoplasme (**Figure 28**). Ces modes d'entrée sont dépendants du tropisme cellulaire ainsi que du mode de culture cellulaire.

Suite à la libération du génome viral dans le cytoplasme, une première étape de traduction permet la formation des polyprotéines pp1a et pp1ab qui suite à une étape de clivage par des protéases cellulaires vont donner jusqu'à 16 protéines virales non-structurales (nsp).

Les nsp produites vont s'associer à certains facteurs cellulaires tels que la cyclophiline A [235] pour former un complexe multi-protéique appelé complexe de « réplication/traduction ». Ce complexe va permettre la réplication du génome viral ainsi que la production d'ARNs sous-génomiques.

La réplication virale se fait au niveau des structures DMVs formées à partir du remaniement de membranes cellulaires. Les polymérases virales et principalement la RdRp nsp12 permettent la formation d'un antigénome de polarité négative (-). Cet antigénome va servir de matrice pour la formation de nouveaux génomes viraux de polarité positive qui seront protégés de la dégradation par la nucléocapside formée à partir de la protéine N puis empaquetés au niveau du ERGIC (« Endoplasmic reticulum Golgi Intermediate Compartment ») (**Figure 28**).

Lors de la réplication du brin (+) en brin (-) la polymérase virale est capable de synthétiser des ARN sous-génomiques de taille différente ayant tous la même extrémité 3'-NC. En effet, la RdRp a la capacité de « sauter » littéralement des séquences appelées TRS (« Transcription Regulatory sequences ») localisées entre deux ORFs. Ces ARN sous-génomiques brin (-) servent de matrice à la formation d'ARN sous-génomique brin (+) (**Figure 29**).

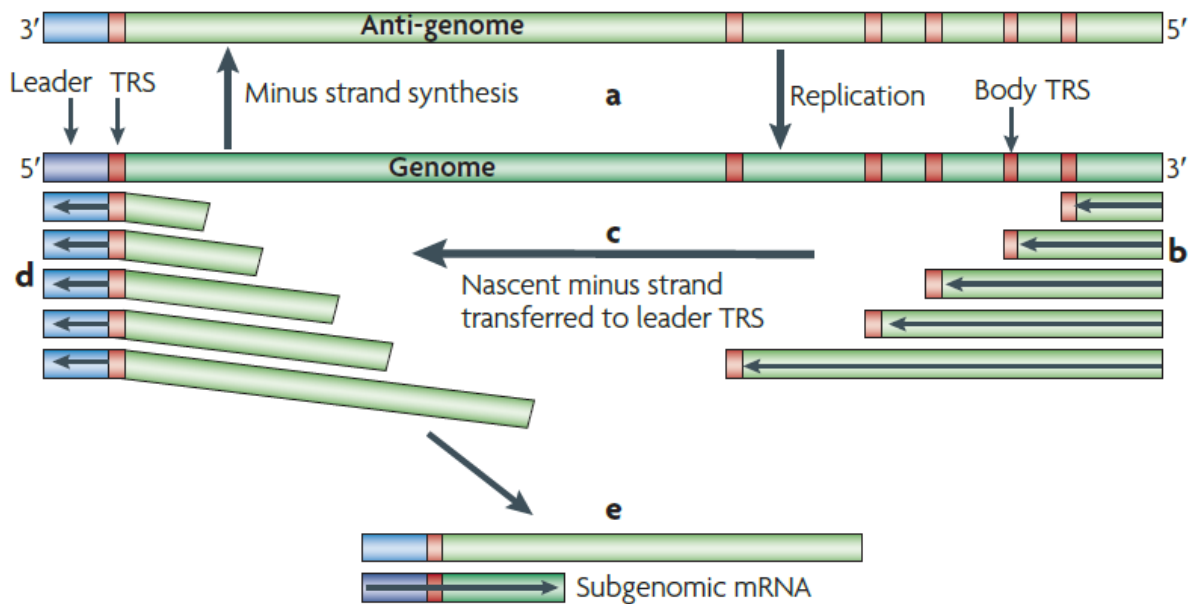


Figure 29 : Représentation de la répllication des Coronavirus. a : La polymérase virale utilise le brin (+) comme matrice pour la formation du brin (-) à l'origine de la synthèse de nouveaux génomes brin (+). b : La synthèse de nouveaux brins (-) peut être arrêtée par une séquence de régulation de la transcription (TRS) en rouge. c : Après l'arrêt de la synthèse du brin (-) au niveau de la séquence TRS, la polymérase est transférée jusqu'à la séquence « leader » située en 5' en bleu. d : La polymérase termine la synthèse des brins moins complémentaires de la séquence « Leader ». e : La synthèse des brins (+) conduit à la formation, à partir de ces brins (-), d'ARNm viraux sous-génomiques. [232]

L'assemblage des virions se fait au niveau de la structure ERGIC (« Endoplasmic reticulum Golgi Intermediate Compartment ») puis il y a libération des nouvelles particules virales par exocytose ou bien à la suite de la lyse de la cellule hôte, les Coronavirus étant des virus lytiques. [234]

8- Antiviraux

Actuellement, il n'existe pas de traitements ou de moyens de préventions, antiviraux ou vaccins, dédiés spécifiquement aux Coronavirus. Suite aux épisodes d'infection par le SARS-CoV et le MERS-CoV, le besoin de nouvelles thérapies anti-Coronavirus semble essentiel. Une des stratégies pouvant conduire rapidement à la découverte de molécules anti-Coronavirus est de tester une banque de molécules déjà existantes sur le marché ayant des propriétés antivirales sur d'autres virus. Cette stratégie a permis de montrer que des molécules telles que la ribavirine, l'hexachloropène, la nitazoxanide ou encore l'homoharringtonine avaient un effet anti-Coronavirus *in vitro* [236]. Par exemple, la Ribavirine a été administrée en combinaison d'interféron-alfa-2a à des macaques rhésus et à

des patients infectés avec le MERS-CoV et leur taux de survie a été amélioré. Néanmoins l'utilisation de Ribavirine entraîne l'apparition d'effets secondaires importants [237].

Le génome des Coronavirus contient dans ses extrémités 5'-NC et 3'-NC des séquences cis-régulatrices. La présence de ces éléments rend les Coronavirus sensibles aux Cyclophilines cellulaires. L'effet antiviral de la cyclosporine A a été testé et a montré une activité antivirale *in vitro*.

D'autres molécules ont montré un effet antiviral en ciblant des étapes du cycle de vie du virus. Les inhibiteurs des protéases cellulaires cathepsine, furine ainsi que de la protéine TMPRSS2 empêchent l'entrée du virus dans la cellule *in vitro*.

D'autres stratégies antivirales sont en cours d'étude comme : l'utilisation du plasma ou du sang total de patients guéris, l'utilisation d'anticorps mono- ou polyclonaux dirigés contre les récepteurs cellulaires utilisés pour l'attachement du virus, l'injection d'immunoglobuline en intraveineuse (« Intravenous immunoglobulin », IVIG) ou encore le développement de peptides agonistes ou antagonistes dirigés contre les éléments viraux.

L'IVIG est utilisée dans le cas de maladies non-virales incluant la maladie d'Alzheimer ou encore des cas d'épilepsie ou dans le cas de maladies virales telles que l'Hépatite A ou l'Hépatite B [238]. Dans le cas du MERS-CoV, l'IVIG n'a pas donné de résultats prometteurs et a conduit à de sérieux effets secondaires tels que des thromboses ou des insuffisances rénales.

Le développement de peptides synthétiques est une stratégie permettant l'inhibition des interactions protéine-protéine. Ils ont peu d'effets secondaires, une meilleure tolérance que les antiviraux chimiques et une grande spécificité d'action. C'est une technique ayant fait ses preuves sur d'autres infections virales (Virus de la vallée du Rift, EBOV ou encore VSV). Actuellement des peptides dirigés contre la protéine virale Spike afin d'inhiber la fusion du virus à la membrane et l'entrée virale sont en cours d'étude [239].

9- Interactions avec les ARN non codants

Les ARN non codants et leur rôle dans le cycle de vie des Coronavirus ont été très peu étudiés.

Il a été montré par Cui et *al* que la nucléoprotéine N de la souche HCoV-OC43 des betaCoronavirus pouvait, par sa capacité d'interaction avec les ARNs double brin, inhiber le processus d'interférence ARN cellulaire. En effet, N peut interagir avec le complexe RISC et inhiber la réponse antivirale médiée par ce mécanisme cellulaire [240]. On peut citer comme exemple l'interaction directe entre la protéine N et le miR-9 qui est un répresseur de NF-κB. La séquestration de ce microARN par la protéine N entraîne l'activation de la voie de signalisation NF-κB [241].

Les microARNs ont également été étudiés chez la souche porcine TGEV (« transmissible Gastroenteritis Virus ») des alphaCoronavirus. Plusieurs microARNs ont été décrits dans le cas de l'infection TGEV. On peut citer comme exemple le miR-27b pouvant réprimer la voie mitochondriale de l'apoptose en ciblant le facteur RUNX1. En contrôlant l'expression du miR-27b, la souche TGEV peut contrôler la lyse cellulaire [242]. De plus, un autre exemple de microARN modulé par le virus au cours de l'infection est le microARN 30a-5p. Ce microARN a pour cible le facteur represser de JAK-STAT et les protéines SOCS1 et SOCS3 permettant la production d'IFN. En condition infectieuse, Le virus entraîne la diminution de l'expression de ce microARN *via* le facteur cellulaire IRE1α ce qui conduit à une diminution de la production d'interféron [243].

De plus, l'équipe de Ma et *al*, a réalisé une expérience de séquençage à haut débit sur des échantillons infectés par la souche TGEV et a montré qu'un grand nombre d'ARN codants et non-codants étaient dérégulés au cours de l'infection [244].

Les virus à ARN cytoplasmiques tels que les Coronavirus ont la capacité de coder leurs propres ARN non-codants. Dans le cas du SARS-CoV, il a été montré que le virus générerait trois petits ARN non codants appelés svARN (« small viral RNA ») représentant 18% des séquences virales totales présentes dans la cellule. Ces svARNs sont issus pour deux d'entre eux de la séquence génomique codant pour nsp3 et le dernier de la séquence codante pour N. La biogénèse de ces ARNs viraux est indépendante de la voie canonique de maturation des microARNs. Ils sembleraient contribuer au contrôle du cycle de vie du virus et/ou inhiber la réponse antivirale cellulaire. Néanmoins leurs rôles restent à être éclaircis [245].

V- Problématiques et objectifs de la thèse

L'émergence de nouvelles infections virales orphelines de traitements depuis ces dernières années augmente le besoin de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux régissant l'infection. Une infection est caractérisée par l'équilibre opposant la réponse antivirale médiée par l'hôte, au détournement de facteurs cellulaires par le virus, nécessaires à son cycle de vie. L'étude des ARN non codants cellulaires lors d'infections virales a montré que ces facteurs jouaient un rôle essentiel dans la réponse antivirale mais également dans les différentes étapes du cycle viral. L'étude de ces facteurs et la compréhension des mécanismes définissant leur implication pro- ou antivirale au cours d'une infection est donc essentielle et permettrait de trouver de nouvelles cibles à potentiel thérapeutique.

Ma thèse a pour but d'étudier l'implication des ARN non codants et plus particulièrement des microARNs et des lncARNs dans le cycle de vie de deux virus modèles de laboratoire, le virus de l'Hépatite C et la souche HCoV-229E des Coronavirus. De plus nous avons cherché à définir le rôle éventuel de la protéine KSRP dans la biogénèse et/ou le contrôle de l'expression de ces facteurs.

1) Etudier le rôle de KSRP dans la régulation de l'expression du miR-122 au cours de l'infection par le virus de l'Hépatite C

Lors de ma deuxième année de master, nous nous sommes intéressés aux rôles des RNAses cellulaires et des RBPs lors de l'infection VHC. Parmi les facteurs testés, nous avons montré que l'inhibition de la protéine KSRP entraînait une diminution de la réplication génomique. Les premiers résultats générés ont montré que cette protéine avait un rôle proviral sur la réplication de la souche JFH1 du VHC. KSRP est une protéine cellulaire nucléaire et cytoplasmique dont la fonction et la localisation dépendent de son état de phosphorylation. Elle dispose de cinq sites de modifications post-traductionnelles par les kinases Akt, ATM et p38/MAPK.

Cette protéine est impliquée dans la maturation de certains microARNs et dans la dégradation des ARN ayant des motifs « ARE ». Il s'agit donc d'un facteur étroitement impliqué dans le contrôle de l'expression et de la régulation des ARN.

Parmi les différentes fonctions de KSRP, nous avons étudié son rôle dans la maturation des microARNs et plus particulièrement dans la maturation du miR-122, un facteur proviral essentiel pour le virus de l'hépatite C.

Dans la littérature il a été montré que la phosphorylation de KSRP en S193 par la kinase Akt diminuait son affinité pour les ARN « ARE » et augmentait son affinité pour les pri-microARNs.

Le premier objectif de ma thèse a été de déterminer le rôle de la protéine KSRP et de sa phosphorylation en S193 par Akt sur la maturation du miR-122 dans un contexte d'infection et de caractériser le(s) mécanisme(s) permettant au virus de détourner KSRP au profit de la maturation de miR-122.

Le deuxième objectif de cette étude consacrée au VHC, a été d'étudier l'impact des autres modifications post-traductionnelles de KSRP par les kinases ATM et p38/MAPK. En effet, dans la littérature il n'existe pas de relation entre les différents sites de phosphorylation de KSRP, la localisation de la protéine et sa fonction dans un contexte infectieux. Nous avons donc voulu déterminer l'importance de chaque site de phosphorylation au cours de l'infection par le VHC sur la maturation de miR-122, sur la réplication virale ainsi que sur la dégradation des ARN « ARE ». Le but de cette partie étant d'obtenir un spectre global d'information sur les différentes fonctions de KSRP lors d'une infection virale.

2) Identification et étude de la régulation d'ARN non-codants modulés lors de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus et caractérisation du rôle de KSRP

La deuxième partie de mes travaux de thèse s'est portée sur l'étude d'un autre virus à ARN, la souche HCoV-229E des Coronavirus.

Deux études ont été réalisées en parallèle.

Dans un premier temps nous avons voulu identifier des ARN non-codants modulés au cours de l'infection et pouvant être essentiels pour le cycle de vie du virus. L'identification de nouveaux facteurs cellulaires pro- et/ou antiviraux ainsi que l'étude de leur régulation dans

un contexte d'infection permettraient de mieux comprendre les mécanismes viro-induits régissant l'infection virale.

La modulation des ARN non-codants identifiés sera ensuite caractérisée afin de comprendre l'impact de l'infection sur ces ARN non-codants et inversement l'impact de leur modulation sur le virus et la cellule.

Dans un deuxième temps, par analogie avec l'étude sur le virus de l'Hépatite C, nous avons voulu évaluer l'effet de la protéine KSRP sur la réplication génomique de la souche HCoV-229E à différents temps d'infection virale.

Enfin, nous avons cherché à caractériser l'importance de la fonction de KSRP dans la régulation des ARN non-codants identifiés dans la première partie de l'étude.

Matériels et Méthodes

I- Culture Cellulaire

A- Lignées cellulaires

Des lignées cellulaires hépatiques Huh7.5.1, Huh7.5 hébergeant de façon stable un réplicon sous-génomique du VHC de génotype 1b (exprimant le gène de résistance à la néomycine et la séquence sous-génomique du VHC de génotype 1b, pFK-I 389 neo/NS3-3'/5.1 fourni par le Dr Ralf Bartenschlager, Université de Heidelberg, Allemagne), Hep3B (lignée hépatocytaire exprimant faiblement le microARN-122) ainsi qu'une lignée pulmonaire diploïde MRC-5 ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen, Carlsbad, Californie) supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal inactivé (Invitrogen), de 1% d'antibiotiques (50 IU/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine) (Invitrogen) et de 0.1 µg/ml d'antifongique (Amphotéricine B, Life Technologies) à 37°C et sous 5% de CO₂. Les cellules Huh7.5-RSG ont été soumises à une pression de sélection par l'ajout de 600µg/ml de Geneticine (G418, Invitrogen).

B- Modèles d'infection

1- *Virus de l'Hépatite C*

Les cellules Huh7.5.1 ont été infectées à 37°C avec la souche Jad, dérivée du modèle HCVcc JFH-1 (génotype 2A), hautement adaptée à la culture cellulaire, contenant trois mutations dans les parties codantes pour NS5A et NS5B [246] (fourni par le Dr Annette Martin, Institut Pasteur, France [247]).

2- *Souche HCoV-229E des Coronavirus*

La souche HCoV-229E a été fournie par le Pr Astrid Vabret du CHU de Caen (France). Le stock de virus a été produit dans des cellules diploïdes MRC-5 (RD-Biotech, Besançon, France) à 38 doublements. Dix millions de cellules MRC-5 ensemencées la veille dans des flasques T75 cm² ont été infectées avec 5 ml de virus HCoV-229E pendant 4h à 35°C, 5% de CO₂ sous agitation puis 5 ml de milieu DMEM supplémenté de 2% de SVF ont été ajoutés afin d'atteindre un volume final de 10 ml. Les 10 ml de virus produits ont été récupérés 72h post-infection lorsque 95% des cellules ont été lysées puis utilisés pour infecter deux flasques T75

cm2 ensemencées avec des cellules MRC-5 38 doublements. Ce processus a été répété jusqu'à obtention d'un stock de 500 ml de virus.

II- Biologie moléculaire

A- Construction des plasmides mutants pour KSRP

Le plasmide pKSRP-HA, obtenu à partir d'un plasmide pCMV contenant un gène de résistance à l'ampicilline, fusionné avec une étiquette HA (Fourni par le Pr Michele Trabucchi, Inserm U1065, C3M Université de Nice, France) a été utilisé pour produire des variants de la protéine KSRP-HA mutés sur certains résidus phosphorylables. Le kit « Quick Change XL Site-directed mutagenesis kit » (Stratagene, San Diego, California) ainsi que les amorces du **Tableau 6** ont été utilisés pour obtenir les différents mutants de la protéine KSRP.

Amorce	Séquence
S132A sens	5' GGAGACTCAATCAGT <u>GCT</u> CAACTTGGACCCATC 3'
S132A antisens	3' CCTCTGAGTTAGTCAC <u>GAG</u> TGAACTGGGTAG 5'
S132D sens	5' GGAGACTCAATCAGT <u>GAT</u> CAACTTGGACCCATC 3'
S132D antisens	3' CCTCTGAGTTAGTCA <u>CTA</u> GTTGAACTGGGTAG 5'
S193A sens	5' CGAGCGCAGTGT <u>GCC</u> TTGACAGGAGC 3'
S193A antisens	3' GCTCGCGTCACAC <u>CGG</u> AACTGTCCTCG 5'
S274A sens	5' AATTCAGGACGGAG <u>CTC</u> CAGAATACGAATG 3'
S274A antisens	3' TTAAGTCCTGCCT <u>CGA</u> GTCTTATGCTTAC 54
S670A sens	5' CCAGGAGCTCCCCAGG <u>CGC</u> CCAGCCAGACTAC 3'
S670A antisens	3'GGTCCTCGAGGGGGTCC <u>GCG</u> GTCCGGTCTGATG 5'
T692A sens	5' TACTACGGACAGG <u>CCC</u> AGGTCCTGGC 3'
T692A antisens	3' ATGATTGCCTGTCC <u>GGG</u> TCCAGGACCG 5'
T692D sens	5' TACTACGGACAGG <u>ACC</u> AGGTCCTGGC 3'
T692D antisens	3' ATGATGCCTGTCC <u>TGG</u> TCCAGGACCG 5'

Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés pour la production des formes mutantes KSRP-HA par le kit « Quick Change XL Site-directed mutagenesis kit ».

Le clonage a été effectué en introduisant le plasmide d'intérêt dans une souche bactérienne E.coli XL-Gold ultracompetent (Stratagene) par transformation bactérienne en subissant un double choc thermique (30 sec à 42°C puis 2 min dans la glace). Les bactéries ont ensuite été cultivées sur un milieu de type BHI (« Brain Heart Infusion ») gélosé additionné d'ampicilline à une concentration de 100 µg/ml pendant 24h à 37°C.

Le clone sélectionné a ensuite été amplifié dans un milieu de culture BHI liquide supplémenté d'ampicilline à 37°C sur la nuit.

L'ADN plasmidique a été extrait à l'aide du kit « GeneJET Plasmid Midiprep Kit » (ThermoFischer Scientific) puis a été séquencé en utilisant le kit « BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » (Applied Biosystem) ainsi que les amorces suivantes :

Amorce	Séquence
Primer 1 sens	5' GAGACAGTTGGAAGATGGAG 3'
Primer 1 antisens	5' ATCCGAGATCCGTACTIONCATT 3'
Primer 2 sens	5' GGAGGAGTACTACAAGAAGC 3'
Primer 2 antisens	5' AAAGCATGTGAGACACAGAA 3'
Primer 3 sens	5' CAATACCTACCCCCAGTGG 3'
Primer 3 antisens	5' TCGCTCTCTCGCCAAACAAA 3'

Tableau 7 : Amorces utilisées pour le séquençage des formes mutantes KSRP-HA

B- Transfection

1- siARNs KSRP et siARN contrôle

Un ensemble de quatre siARNs « Smartpool Human Custom ON-TARGET plus siRNA » (Dharmacon, HorizonDiscovery, Etats-Unis) ciblant la partie codante de l'ARNm de la protéine KSRP ainsi qu'un ensemble de trois siARNs conçus pour cibler spécifiquement l'extrémité 3'-NC de l'ARNm ont été utilisés pour inhiber l'expression de la protéine KSRP. Les cellules Hep3B, Huh7.5, Huh7.5.1, Huh7.5-RSG ou MRC-5 ont été ensemencées dans des plaques 24 puits à hauteur de 150 000 cellules/puits pour les cellules hépatiques et 120 000 cellules/puits pour les cellules MRC-5 dans du milieu DMEM complet. Les cellules ont été transfectées en suspension avec une concentration finale de 5 µM de siARN KSRP ou de

siARN contrôle (Dharmacon) en utilisant le Dharmafect IV (Dharmacon, HorizonDiscovery) puis laissées en culture pendant 24 h à 72 h.

2- Plasmides KSRP

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 12 puits à hauteur de 200 000 cellules/puits pour les cellules hépatiques et 180 000 cellules/puits pour les cellules MRC-5. Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 2 µg de plasmide permettant la production de différentes protéines KSRP-HA (pKSRP-HA, pKSRP-S193D, pKSRP-S193A) ainsi qu'un plasmide contrôle pCMV-Cypridina Luciférase (New England Biolabs) en utilisant la lipofectamine 3000 (Life Technologies).

3- Co-transfection siARN KSRP ciblant l'extrémité 3'-NC et plasmides pKSRP mutants

Afin d'inhiber l'expression de KSRP endogène, des cellules Huh7.5 ont étéensemencées à hauteur de 200 000 cellules/puits dans des plaques 12 puits et ont été transfectées en suspension avec un 5µM d'un siARN KSRP et d'un siARN contrôle en utilisant le Dharmafect IV. Après 96h de culture, Les cellules ont été transfectées avec 1 µg d'un plasmide exprimant la protéine KSRP-HA d'intérêt ou d'un plasmide contrôle.

C- Extraction d'ARN total et Rt-qPCR

L'extraction d'ARN total a été réalisée en utilisant le « RNeasy mini kit » (Qiagen, Hilden, Germany) et les ARNs obtenus ont été quantifiés par spectrophotométrie avec le NanoDrop 1000 (NanoDrop Products, Wilmington, Delaware). La transcription inverse des ARN totaux permettant d'obtenir un pool d'ADN complémentaire (« complementary DNA », cDNA) a été réalisée en utilisant le kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription » (Applied Biosystems, Foster City, California). La synthèse d'un ADN complémentaire d'un microARN a nécessité l'utilisation du kit « TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit » (Applied Biosystems, Foster City, California). Les ADN complémentaires viraux ont été amplifiés par PCR quantitative avec le « Taqman Gene Expression Master Mix » (ThermoFisher Scientific) en utilisant les amorces et sondes suivantes (**Tableau 8**) :

Sonde	Séquence
Jad-5'-NC sens	5'- GCA-GAA-AGC-GTC-TAG-CCA-TGG-CGT-3'
Jad-5'-NC antisens	5'- CTC-GCA-AGC-ACC-CTA-TCA-GGC-AGT-3'
Jad-5'NC FAM	5'-6-FAM CAT-AGT-GGT-CTG-CGG-AAC-CGG-TGA-GT-TAMRA-3'
HCoV-229E sens	5'- CGC-AAG-AAT-TCA-GAA-CCA-GAG-3'
HCoV-229E antisens	5'- GGG-AGT-CAG-GTT-CTT-CAA-CAA-3'
HCoV-229E FAM	5'- FAM CCA-CAC-TTC-AAT-CAA-AAG-CTC-CCA-AAT-TAMRA-3'

Tableau 8: Amorces utilisés pour la détection spécifique des virus JFH1 et HCoV-229E

Les résultats ont été normalisés avec la GAPDH humaine « GAPDH Human Endogenous Control » (ThermoFischer Scientific) ou avec l'ARNr 18s dans le cas des ARN totaux. La quantification des microARNs a été normalisée avec le snARN U6 (RNU6B).

Le niveau de pri-miARN et des ARNm cellulaires a été mesuré en utilisant les sondes spécifiques « Taqman Pri-microRNA assay » (Life Technologies) et celui des microARNs avec les sondes « Taqman microRNA assay » (Life Technologies).

III- Biochimie

A. Western Blot

1- Lyse cellulaire

Les différents types cellulaires,ensemencés en plaque 12 puits à hauteur de 200 000 cellules/puits pour les cellules hépatiques et 180 000 cellules/puits pour les MRC-5, ont été rincés avec du PBS -/- (« Phosphate Buffered Saline, Life Technologies) puis lysés dans un tampon de lyse froid (1% NP40, 10% glycerol, 100 mM Tris pH 8, 100 mM KCl, additionné d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases).

4- Dosage BCA

L'extrait de protéine total a été quantifié par dosage colorimétrique BCA avec le kit « Pierce BCA protein assay kit » (ThermoFischer Scientific). La densité optique des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde de 562 nm puis comparée à celle des échantillons d'une

gamme étalon resuspendue dans le même tampon de lyse, pour déterminer la concentration des échantillons.

5- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les lysats cellulaires ont été analysés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide « NuPage 4-12 % Bis-Tris Gel » (Life Technologies). La migration a été effectuée dans un tampon « NuPAGE™ MES SDS Running Buffer » (Life Technologies) pendant 15 min à 50 Volts puis 45 min à 150 Volts. Le transfert a ensuite été effectué sur une membrane de nitrocellulose « Nitrocellulose membrane, 0.45 µM » (Life Technologies) dans un tampon de transfert EtOH 1X pendant 1h à 100 Volts à 4°C. La membrane a été incubée 1h dans un tampon de saturation, TBS (« Tris Buffered-Saline) 1X, 0.1 % Tween (Tween 20, Sigma Aldrich), 5% BSA, puis « overnight », à 4°C, avec les anticorps décrits dans le **tableau 9**. La membrane a été lavée 3 fois avec du TBS 1X puis a été mise à incuber avec un anticorps secondaire dilués au 1/10 000ème dans le tampon de saturation pendant 1h à température ambiante. La membrane a ensuite été lavée 3 fois au TBS 1X-0.1 % Tween puis révélée par chemiluminescence en utilisant le réactif « Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent » (GE healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni). La quantification des bandes protéiques obtenues a ensuite été effectuée avec le logiciel ImageQuant Las4000.

B- Immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées dans des chambres de culture sur lame, de 8 puits « Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System » (ThermoFischer Scientific) à hauteur de 12 000 cellules/puits puis traitées dans différentes conditions expérimentales. Les cellules ont été rincées au PBS +/- (Ca²⁺ et Mg²⁺) puis fixées au Formaldéhyde 4% pendant 10 min à l'abri de la lumière. Les cellules fixées ont été rincées trois fois au PBS +/- puis perméabilisées avec du méthanol 100% froid pendant 10 min à -20°C. Les cellules perméabilisées ont été rincées trois fois au PBS +/- puis incubées dans un tampon de saturation (Triton X-114 0.3%, BSA fraction V 10 mg/ml dans du PBS +/-) pendant 1h à 37°C en chambre humide. Les cellules ont ensuite été incubées 1h avec les anticorps d'intérêts (**Tableau 9**) dilués dans du « DAKO Real Antibody Diluent » (Agilent, Santa Clara CA, Etats-Unis) à 37°C en chambre humide. Les puits ont été rincés au PBS +/- trois fois puis incubés avec un anticorps secondaire dilué au 1/400ème (**Tableau 10**) pendant 1h à 37°C en

chambre humide à l'abri de la lumière. Les cellules ont ensuite été rincées trois fois avec du PBS +/- puis le montage de la lame a été réalisé avec du « ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI » (ThermoFischer Scientific). Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence (Zeiss, Oberkochen, Allemagne), avec le logiciel Zeiss Zen (Version 2012) au grossissement 20X et 40X.

C- Proximity Ligation Assay *in situ*

La technique de « Proximity Ligation Assay *in situ* » a été réalisée avec le kit « Duolink® In Situ Detection Reagents Orange » (Sigma Aldrich). Après fixation, et saturation, les cellules ont été incubées avec deux anticorps spécifiques d'espèces différentes dilués dans du « DAKO Real Antibody Diluent » (Agilent) 1h à 37°C en chambre humide. Les cellules ont été rincées trois fois au PBS +/- puis incubés 1h à 37°C en chambre humide avec deux anticorps secondaires couplés à des oligonucléotides « Plus » et « Minus » complémentaires. Trois lavages au PBS +/- ont été réalisés puis les cellules ont été incubées 30 min à 37°C en chambre humide dans un tampon contenant l'enzyme de ligation permettant la liaison entre les séquences nucléotidiques des anticorps secondaires si la distance est de moins de 40 nm. Les cellules ont été lavées avec le tampon fourni par le kit sur les recommandations du fournisseur puis incubées 1h45 à 37°C en chambre humide à l'abri de la lumière, avec une polymérase et un tampon contenant des oligonucléotides couplés à un fluorophore (Cyanine 3, 594 nm) reconnaissant l'ADN synthétisé par amplification par cercle roulant. Trois lavages avec un tampon fourni par le kit ont été réalisés puis le montage a été réalisé avec du « ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI ». Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) avec le logiciel Zeiss Zen (Version 2012) au grossissement 20X et 40X. Le signal a été quantifié avec le logiciel Duolink ImageTool (Sigma-aldrich).

D- Immunoprécipitation d'ARN

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri 60 X 15 mm à hauteur de 3 000 000 cellules/puits puis traitées selon différentes conditions expérimentales. Les cellules ont été rincées au PBS -/- froid, « crosslinkées » aux UV avec l'appareil « CL-1000 UV Crosslinking Chamber » (LabX, Midland Canada) à la puissance de 4000 mJ/cm² et de 2000 mJ/cm² et lysées dans un tampon « RIP lysis buffer » supplémenté d'inhibiteurs de protéases

et de RNAses (Roche). L'immunoprécipitation d'ARN a été réalisée avec le kit « Magna RIP™ RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit » (Merck milipore, Darmstadt, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Les billes magnétiques ont été rincées 2 fois avec le « RIP Wash buffer » puis incubées pendant 30 min sous agitation à température ambiante avec 5 µg d'anticorps anti-KSRP (NBP1-18910, Novus), anti-HA (H1847-53C, US biological), anti-Ago2 (ab32381, Abcam) ou anti-ARN double brin (J2, Scicons) ou 5 µg d'anticorps contrôle (IgG purifié) de la même espèce. Trois lavages ont été réalisés puis les billes ont été incubées avec le lysat cellulaire sur la nuit à 4°C, sous agitation. Un volume de 10 µl d'échantillon a été gardé afin de servir de contrôle avant immunoprécipitation « input ». Les billes ont ensuite été rincées 7 fois avec le tampon de lavage en utilisant un support aimanté, puis l'ensemble des échantillons, billes et input, ont été traitées à la protéinase K pendant 30min sous agitation à 54°C. Le surnageant a été récupéré et une extraction au phénol/Chloroforme/alcool isoamylique a été réalisée. Les ARNs extraits ont été précipités à l'éthanol en utilisant des solutions salines ainsi qu'une solution de précipitation fournies dans le kit. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 14 000 rpm pendant 45 min à 4°C, lavés avec de l'éthanol 80% puis centrifugés de nouveau pendant 30 min. Les culots ont été séchés à température ambiante pendant 10 min puis resuspendus dans de l'eau « RNase free ». Les ARN obtenus ont été quantifiés au NanoDrop 1000 (ThermoFischer).

Protéine détectée	Référence de l'Anticorps	Espèce	Dilution Western Blot	Dilution Immunofluorescence / PLA
Akt	CST 4691	Lapin	1/1000ème	1/400ème
P-Akt	CST 4060	Lapin	1/1000ème	1/400ème
KSRP	NBP1-18910	Lapin	1/1000ème	1/1000ème
KSRP	Ab56438	Souris		1/500ème
GAPDH-HRP conjugate	CST 3683	Lapin	1/1000ème	
RXXS*/T*	CST 6950	Lapin	1/1000ème	1/400ème
Ago2	ab32381	Lapin		1/200ème
HA	US biological H1847-53C	Souris		1/500ème
HA	Sigma-Aldrich H6908	Lapin	1/1000ème	
KSRP	ab56438	Souris		1/500ème
DROSHA	ab12286	Lapin		1/1000ème
ARN double brin	Scicons J2	Souris		1/200ème
NS5A		Chèvre		1/1000ème

Tableau 9 : Anticorps primaires utilisés

Espèce reconnue	Référence	Dilution	Espèce
Lapin-HRP	ThermoFischer	1/10 000ème	Chèvre
Souris-HRP	ThermoFischer	1/10 000ème	Chèvre
Souris-AlexaFluor 488nm	ThermoFischer	1/400ème	Chèvre
Lapin-AlexaFluor 594nm	ThermoFischer	1/400ème	Chèvre

Tableau 10 : Anticorps secondaires utilisés

IV- Séquençage à haut débit

Les cellules MRC-5 ont étéensemencées en boîte de Pétri 60 X 15 mm à hauteur de 2.10^6 cellules/puits en triplicata. Ces cellules ont été inhibées pour l'expression de KSRP par transfection d'un siARN KSRP (5 μ M) ou traitées avec un siARN contrôle (5 μ M). Les cellules ont été infectées 24 heures post-transfection des siARNs par la souche HCoV-229E à une M.O.I de 1 pendant 24h. Les cellules ont été lavées au PBS -/-, « crosslinkées » aux UV à 400 mJ/cm² et 200 mJ/cm² puis lysées dans un tampon de lyse « RLT » (Qiagen). Un deuxième panel de cellules a été utilisé comme contrôle non-infecté ou a été infecté pendant 24h avec la souche HCoV-229E à une M.O.I de 1, puis les cellules de chaque condition ont été lysées selon le même protocole que précédemment. Les ARN ont été extraits avec le kit « RNeasy mini kit » (Qiagen) et quantifié avec le nanodrop 1000 (Life Technologie)

A partir d'une concentration de 50 ng/ μ l, l'ARN total a été séquencé avec le kit « TruSeq stranded Total RNA, Ribozero human, mouse, rat, Illumina) (Figure 30). Une étape de dénaturation des échantillons a été réalisée à 68°C pendant 5 min puis la déplétion des ribosomes a été effectuée en incubant les échantillons avec des billes magnétiques pendant 1 min et en les incubant 1 min supplémentaire à température ambiante. Le surnageant a été collecté puis les ARN ont été purifiés en les incubant avec des billes magnétiques « RNA clean up XP beads » (Beckmann Coulter, Californie, Etats-Unis) 15 min à température ambiante, puis 5 min sur portoir magnétique. Deux lavages à l'éthanol 70% ont été

effectués, puis les billes contenant les ARN ont été récupérées. Les ARN ont été fragmentés en les incubant avec un tampon de fragmentation 8 min à 94°C. L'ADNc a été synthétisé en utilisant l'enzyme de transcription « Superscript II Reverse Transcriptase » (Life technologie) en suivant le programme suivant : 10 min à 25°C, 15 min à 42°C et 15 min à 70°C. Le second brin d'ADN a ensuite été synthétisé en utilisant le kit « Second strand marking master mix » puis incubé 1h à 16°C. L'ADN a ensuite été purifié avec de l'EtOH 80% sur bille comme précédemment. Une adénine a été ajoutée aux extrémités 3' des fragments en incubant les échantillons avec un mix d'adénine 30 min à 37°C puis 5 min à 70°C. Les adaptateurs contenant les index ont été liés aux fragments par complémentarité entre l'adénine à l'extrémité 3' et la thymine présente sur les adaptateurs. Les échantillons ont été incubés avec les adaptateurs et avec un mélange de ligation 10 min à 30°C puis ont subi une étape de purification sur billes. Les fragments d'ADN ont ensuite été amplifiés par PCR en suivant le programme suivant :

-30 sec à 98°C	} 15 cycles
-10 sec à 98°C	
-30 sec à 60°C	
-30 sec à 72°C	
-5 min à 72°C	

Suite à une dernière étape de purification sur bille, la librairie a été validée par électrophorèse en utilisant le kit « High sensitivity D1000 Screentape » (Agilent) sur l'appareil « TapeStation 4200 System » (Agilent). Les échantillons ont ensuite été quantifiés par fluorescence avec le kit « Picogreen DNAquantification » (Life Technologie) et ont été normalisés à 10nM.



Figure 30 : Etape principale du séquençage à haut débit réalisé sur de l'ARN total

Parallèlement, une banque de miARN a été réalisée à partir d'1µg d'ARN extrait en utilisant le « RNeasy mini kit » (Qiagen) en suivant le protocole du kit « Truseq Small RNA » (Illumina) (**Figure 32**). Une première étape de fixation des adaptateurs aux extrémités 3' et 5' des ARN a été réalisée. Les échantillons ont été incubés avec les adaptateurs 3' 2 min à 70°C puis avec l'enzyme de ligation « T4 RNA ligase depletion mutant » 1h à 28°C. Les adaptateurs 5' ont été incubés 2 min à 70°C puis ont été rajoutés au mélange contenant les échantillons et les adaptateurs 3'. L'ensemble a été incubé avec 10 mM d'ATP et avec la « T4 RNA ligase » pendant 1h à 28°C. Une étape de transcription inverse a ensuite été effectuée. Les amorces ont été incubées avec 12.5 nM de dNTP pendant 2 min à 70°C puis ont été mises en contact avec les échantillons et avec l'enzyme de transcription inverse « Superscript II reverse transcriptase » 1h à 50°C. Les ADNc ont ensuite été amplifiés par PCR en suivant le programme suivant :

-30 sec à 98°C	} 11 cycles
-10 sec à 98°C	
-30 sec à 60°C	
-15 sec à 72°C	
-10 min à 72°C	

La librairie a été validée par électrophorèse en utilisant le kit « High sensitivity D1000 Screentape » (Agilent) sur l'appareil « TapeStation 4200 System » (Agilent).

Les ADNc ont été purifiés par excision après migration sur gel de polyacrylamide à 145 Volts pendant 60 min.

Les bandes d'intérêt ont été découpées entre les marqueurs de taille 145 pb et 160 pb afin de récupérer spécifiquement les miARNs couplés aux adaptateurs (**Figure 31**).

Les bandes de gel de polyacrylamide ont ensuite été broyées par centrifugation à 20 000 g pendant 2 min, incubées avec de l'eau ultrapure 2h sous agitation à température ambiante puis passées sur des colonnes à filtre de 0,45 µm et centrifugées 10 sec à 600 g. L'éluat a été incubé avec un mix contenant du glycogène, du NaOAc 3M, un marqueur d'ADN 0.1X (Novagen, Merck millipore, Canada) et de l'Ethanol 100 % puis centrifugé 20 min à 20 000 g à 4°C. Le culot a été lavé à l'éthanol 70 %, centrifugé 2 min à 20 000g puis resuspendu dans 10 mM de Tris-HCl.

La librairie a été validée par électrophorèse en utilisant le kit « High sensitivity D1000 Screentape » (Agilent) sur l'appareil « TapeStation 4200 System » (Agilent).

Les échantillons ont ensuite été quantifiés par fluorescence avec le kit « Picogreen DNA quantification » (Life Technologie) et ont été normalisés à 2 nM.

Les banques « total RNA » et « small RNA » ont ensuite été mélangées et ont subi une étape de dénaturation suivant le protocole « 16s Metagenomic » du kit « MiSeq » (Illumina). Les banques ont été diluées dans un tampon « HT1 » afin d'atteindre une concentration finale de 6 pM. Les banques ont ensuite été séquençées avec l'appareil « NextSeq 500/550 » (Illumina) en utilisant une cassette « High output v2 75 cycles » (Illumina).

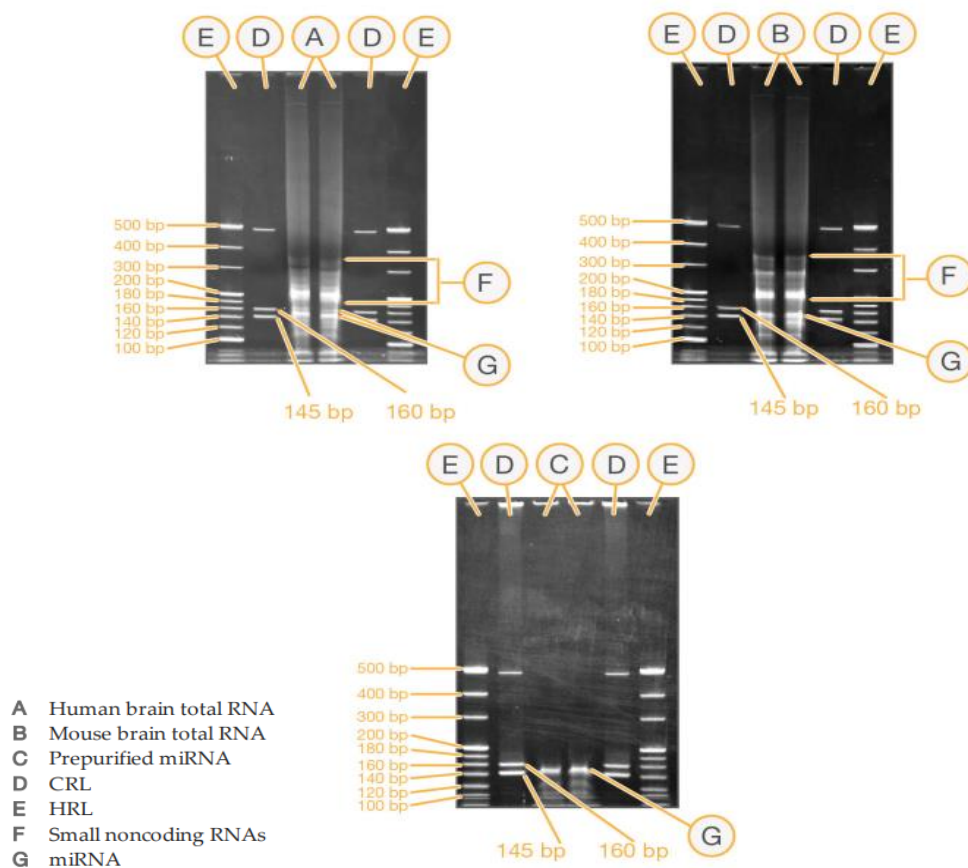


Figure 31 : Profil de migration attendu pour les petits ARN non-codants (microARN) lors du séquençage à haut débit sur du « Small RNA »

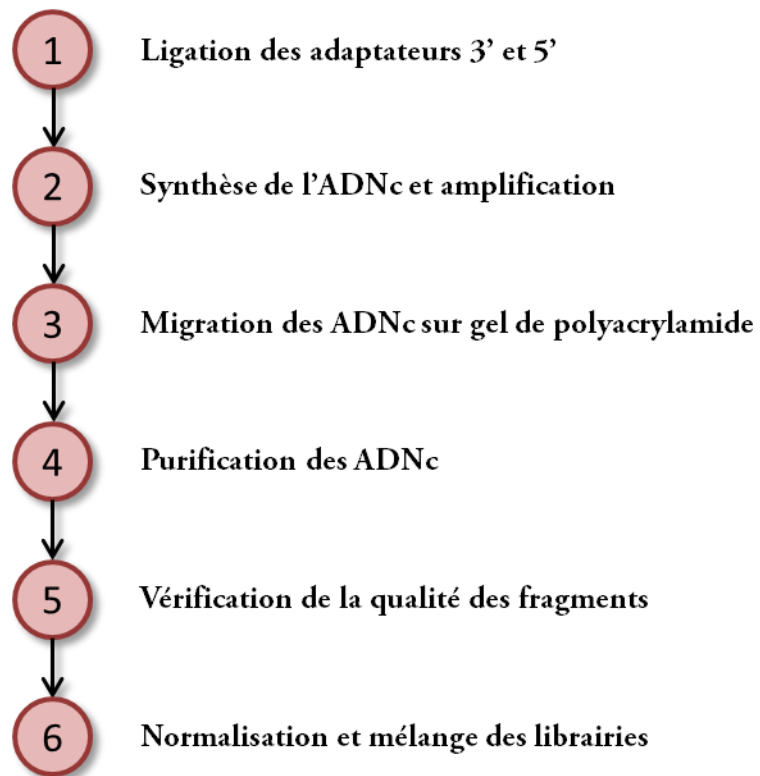


Figure 32 : Etape principale du séquençage à haut débit réalisé sur du « Small RNA »

Résultats

I- Cas du virus de l'hépatite C : Etude de la maturation viro-induite du miR-122 *via* la phosphorylation Akt-dépendante de la protéine KSRP

MiR-122, le microARN majoritaire du foie, est connu dans la littérature pour être un facteur proviral essentiel pour le cycle de vie du virus de l'hépatite C [138]. De ce fait, ce microARN reste une des cibles les plus importantes pour le développement de HTA [248]. Néanmoins, le mécanisme par lequel le miR-122 est induit lors de l'infection reste encore peu clair.

Une étude transcriptomique réalisée sur des cellules Huh7.5.1 infectées par la souche JFH1 de génotype 2a a montré que l'expression de certaines protéines était altérée durant l'infection [249]. Parmi les candidats, plusieurs protéines capables de se fixer aux ARNs ont été identifiées et la protéine KSRP a particulièrement retenu notre attention. Cette protéine impliquée dans la régulation des ARNm riches en AU est aussi connue pour son rôle dans la maturation des microARNs. Ainsi, nous avons voulu évaluer l'implication de cette protéine dans la régulation de la maturation du microARN-122 lors de l'infection VHC.

Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle de KSRP sur l'expression de miR-122 dans des cellules Huh7.5.1, puis sur la répllication virale. En inhibant l'expression de KSRP par transfection de siARN, nous avons pu constater que la quantité de miR-122 était significativement réduite dans les cellules Huh7.5.1. De même, la répllication du VHC (souche Jad, génotype 2a) était significativement diminuée dans ces conditions expérimentales. Ces résultats suggèrent un rôle proviral de la protéine *via* la maturation de miR-122. Nous avons confirmé ces résultats en analysant le rôle de KSRP dans des cellules hépatocytaires Hep3B, présentant une quantité fortement réduite de miR-122 intracellulaire, et par transfection de plasmides codant pour différents variants de la protéine KSRP-HA. Nous avons ainsi montré que la phosphorylation de KSRP au niveau du résidu Sérine193 par la kinase cellulaire Akt était cruciale pour la maturation de miR-122 et la répllication du VHC.

Nous savons d'après la littérature que la phosphorylation en Sérine193 par la kinase Akt diminue l'affinité de KSRP pour le complexe de dégradation 3'-5' des ARNs (exosome cytoplasmique) et augmente son affinité pour les pri-miARNs nucléaires. Nous avons donc

voulu déterminer si le virus pouvait moduler la phosphorylation de S193-KSRP par Akt ainsi que la localisation de la protéine. Pour cela, nous avons étudié la localisation ainsi que la quantité de KSRP phosphorylée en S193 dans un contexte infectieux et dans des cellules contenant un réplicon de génotype 1b avec la technique de « *in situ* Proximity Ligation Assay ». Nous avons constaté une augmentation significative de la quantité totale et nucléaire de phospho-S193-KSRP phosphorylés dans les cellules infectées ou répliquant le virus de l'hépatite C.

Nous avons poursuivi notre étude en montrant une hyperphosphorylation de la kinase Akt en Serine 473 (phosphorylation activatrice) dans des cellules infectées par la souche Jad (génotype 2a) 24 h post-infection.

Ces résultats suggèrent que lors de l'infection par le VHC, l'augmentation viro-induite de S193-KSRP par Akt pourrait induire la maturation de miR-122 et particulièrement la maturation du pri-miR-122 nucléaire. Afin de montrer l'importance de la phosphorylation en S193 dans la maturation du miR-122, des cellules Huh7.5 ont été traitées avec un inhibiteur spécifique de l'activité kinase d'Akt empêchant par conséquent la phosphorylation de KSRP en S193. Nous avons pu observer une diminution de l'expression du miR-122 validant l'importance de l'activité kinase d'Akt sur la phosphorylation de la protéine et sur la maturation de miR-122.

Nous avons évalué la localisation subcellulaire de différentes protéines KSRP-HA mutées sur le résidu Sérine 193, et montré que la localisation nucléaire de KSRP-HA était conditionnée par la phosphorylation du résidu S193. Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle de KSRP dans la maturation du pri-miR-122. La participation de KSRP au sein du complexe de maturation des pri-miARNs a été évaluée par immunoprécipitation d'ARN et nous avons pu constater une diminution d'interaction entre DROSHA et le pri-miR-122 en absence de KSRP. Ces résultats suggèrent que la protéine participe à la formation du complexe de maturation des pri-miARNs. Ces expériences ont également montré une forte diminution de l'interaction entre la protéine KSRP-HA et le pri-miR-122 dans le cas d'une mutation S193A, non phosphorylable par Akt.

Enfin, un modèle établissant le rôle de la phosphorylation viro-induite de S193-KSRP par Akt sur la maturation de miR-122 et sur la réplication du VHC a été validé par des expériences de rétablissement phénotypiques ainsi qu'en hépatocytes primaires humains.

L'ensemble de ces travaux est actuellement en cours de soumission dans Gastroenterology

II- Article I

III- Caractérisation du rôle des phosphorylations de KSRP lors de l'infection VHC

A- Mise en place d'une banque de plasmides exprimant des protéines KSRP-HA mutées sur des résidus phosphorylables spécifiques et étude de leur localisation subcellulaire.

Nous avons précédemment montré que la protéine KSRP phosphorylée par Akt sur la S193 était un facteur proviral pour l'infection VHC en participant à la maturation de miR-122. La protéine KSRP peut être phosphorylée sur quatre autres résidus par les kinases cellulaires ATM et p38/MAPK. Il a été montré dans la littérature que l'état de phosphorylation de la protéine détermine sa localisation ainsi que sa fonction [250].

Dans la suite de ce travail, nous avons voulu déterminer si la phosphorylation d'autres résidus de KSRP pouvait être impliquée dans la maturation de miR-122 et/ou la réplication virale.

Pour étudier le rôle de la phosphorylation de chaque résidu de manière indépendante ou en combinaison, une banque de plasmides mutés sur les différents sites de phosphorylation de KSRP a été créée. Les résidus ont été mutés en alanine, mimant un état non-phosphorylable, ou en aspartate, mimant un état de phosphorylation permanent de la protéine. Ces plasmides sont présentés dans le **tableau 11**.

Plasmides mutants	Kinases associées aux résidus mutés de KSRP
pCMV	-
pKSRP-HA	-
pKSRP-S193A-HA	Akt
pKSRP-S193D-HA	Akt
pKSRP-T692A-HA	p38
pKSRP-S193A-T692A-HA	Akt, p38
pKSRP-S193D-T692D-HA	Akt, p38
pKSRP-S193D-T692A-HA	Akt, p38

pKSRP-S132A-S670A-HA	ATM
pKSRP-S132A-S274A-S670A-T692A-HA	ATM, p38
pKSRP-S132A-S274A-S670A-HA	ATM
pKSRP-S132A-S670A-S193A-T692A-HA	Akt, ATM, p38
pKSRP-S132A-S193A-S274A-S670A-T692A-HA	Akt, ATM, p38
pKSRP-S132A-S193A-S274A-S670A-HA	Akt, ATM

Tableau 11 : Tableau référençant les différentes constructions plasmidiques mutantes obtenues à partir d'un plasmide pKSRP-HA. En rouge : le résidu sérine phosphorylable par Akt, en bleu : le résidu Thréonine phosphorylable par p38-MAPK, en vert : les trois résidus sérines phosphorylables par ATM, mutation S→A non-phosphorylable, mutation S. →D phosphomimétique.

Afin de déterminer l'importance de chaque site de phosphorylation sur la réplication virale et sur la maturation de miR-122 un « alanine-scanning » a ainsi été effectué. Les plasmides exprimant les protéines mutées en alanine sur un seul ou plusieurs sites de phosphorylation ont été transfectés dans des cellules Huh7.5-RSG (génotype 1b) puis leur localisation et leur répartition nucléo-cytoplasmique ont été déterminées par « *in situ* Proximity Ligation Assay » (« *in situ* PLA »). Cette technique d'immunofluorescence permet la détection spécifique de protéines en interaction (distantes de moins de 40 nm) ou de modifications post-traductionnelles sur une seule protéine. Elle fait intervenir des anticorps secondaires couplés à des oligonucléotides dont la complémentarité permet l'obtention, grâce à une polymérase, d'un signal fluorescent quantifiable.

Un couple d'anticorps dirigés contre KSRP (KSRP^{mouse} X KSRP^{rabbit}) a été utilisé afin de détecter la protéine KSRP endogène. Les protéines exogènes mutées issues de la transfection de plasmide ont été détectées spécifiquement en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine KSRP et un anticorps dirigé contre l'étiquette HA (KSRP^{rabbit} X HA^{mouse}).

La **figure 33b** montre la répartition nucléo-cytoplasmique de la protéine endogène, en présence de virus, principalement nucléaire avec 76.9 % dans le noyau et 23,1 % dans le cytoplasme. La localisation des protéines mutées est présentée dans la **figure 33a** et la quantification du signal fluorescent émis lors de la PLA avec le logiciel « Duolink® ImageTool » en **figure 33b**. Nous pouvons voir que la protéine KSRP-HA est principalement

nucléaire (65 % de signal dans le noyau) de manière similaire à la protéine KSRP endogène. Nous pouvons observer que les plasmides exprimant les protéines suivantes sont majoritairement cytoplasmiques, KSRP-S193A-HA (81,1 %), KSRP-S132A-S274A-S670A-HA (68%), KSRP-S132A-S193A-S274A-S670A-HA (67%), KSRP-S193A-T692A-HA (67%) et KSRP-S132A-S193A-S274A-S670A-T692A-HA (69%). Parallèlement, la protéine KSRP-T692A-HA est principalement nucléaire avec 81% de signal PLA dans le noyau.

La phosphorylation de ces sites et/ou la combinaison de ces phosphorylations influence donc la répartition nucléo-cytoplasmique de la protéine dans les cellules exprimant les protéines non-structurales du VHC. Cette différence de répartition suggère que KSRP pourrait avoir des rôles différents en fonction de son profil de phosphorylation, pouvant définir un caractère pro- ou antiviral.

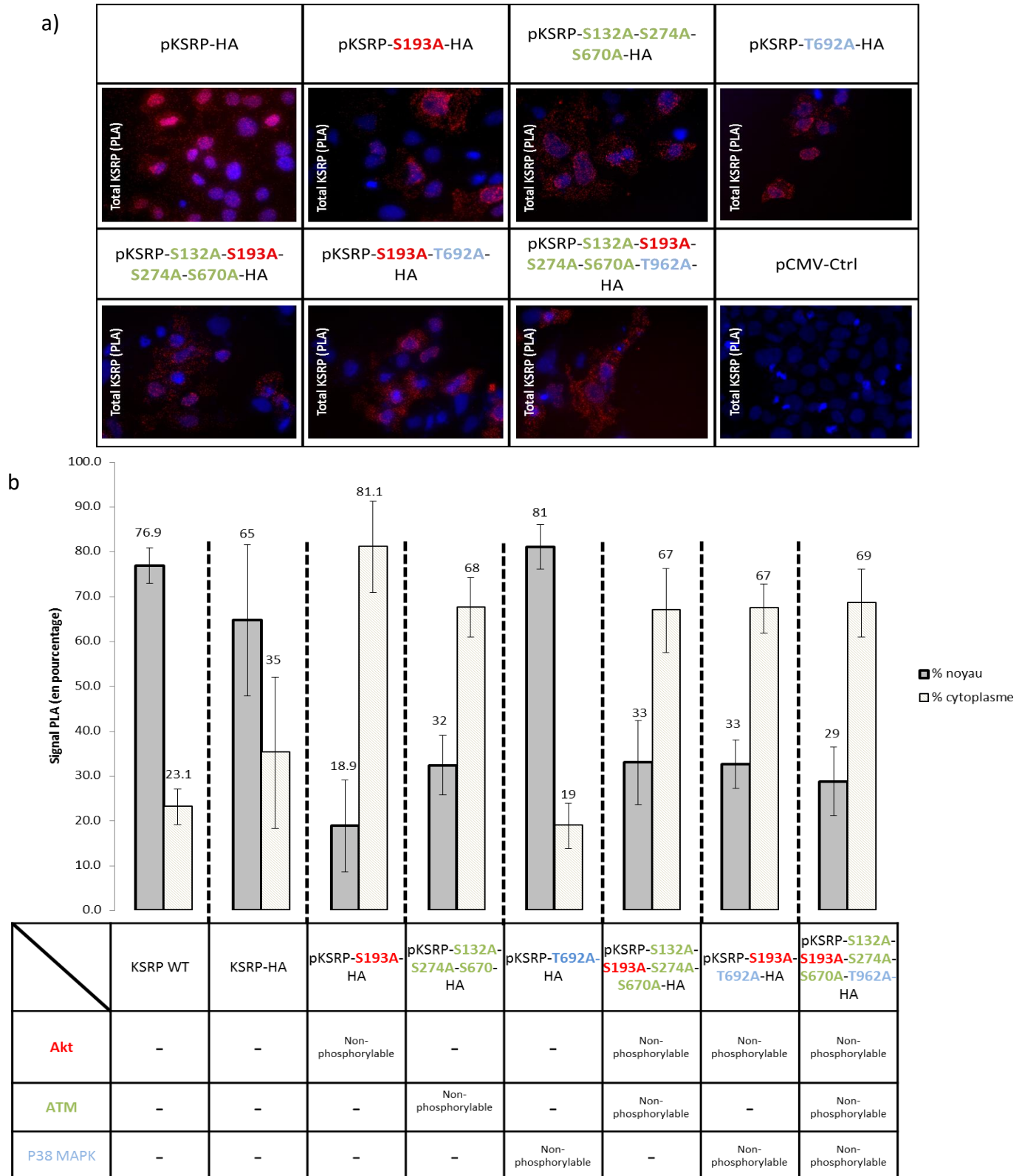


Figure 33 : Localisation nucléo-cytoplasmique de la protéine KSRP endogène et des différentes constructions plasmidiques. a) : *In situ* PLA réalisée avec le couple KSRP^{mouse} X KSRP^{rabbit} afin de montrer spécifiquement la localisation de KSRP endogène et avec le couple HA^{mouse} X KSRP^{rabbit} pour montrer les protéines mutées. b) : Histogramme récapitulant le signal PLA (en pourcentage) dans chaque compartiment cellulaire

B- Rôle des sites de phosphorylation de KSRP sur la réplication virale et la maturation de miR-122

Afin d'évaluer l'impact de la phosphorylation de ces résidus sur la réplication virale et sur la maturation de miR-122, les plasmides exprimant des protéines KSRP mutées ont été transfectés dans des cellules Huh7.5.1 puis infectées avec la souche Jad du VHC (MOI=0.1). Les ARN totaux et les protéines pour chaque condition ont été prélevés en cinétique à 8h, 24h et 48h post-infection. Afin d'observer uniquement l'effet des protéines exogènes mutées, l'expression de KSRP endogène a été préalablement inhibée à l'aide d'un mélange de trois siARNs (siKSRP^e) ciblant spécifiquement la partie 3'-NC de l'ARNm, une région absente des constructions plasmidiques (voir article ci-dessus).

La diminution de l'expression de la protéine KSRP endogène a été vérifiée à 48h post-infection par western blot (**Figure 34**).

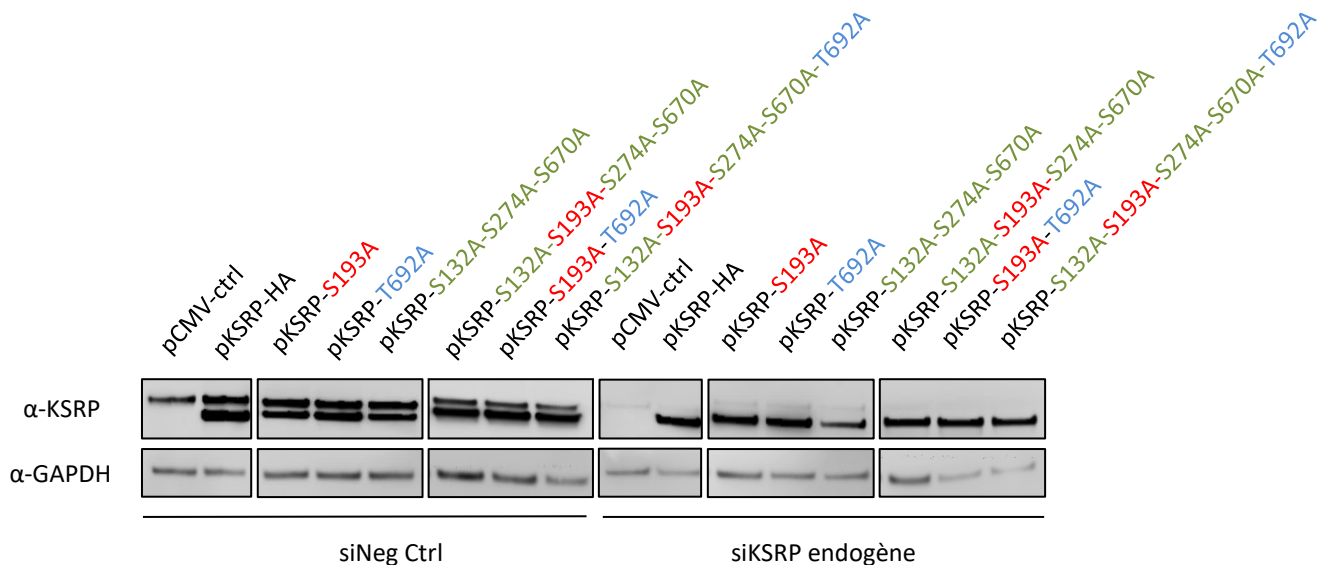


Figure 34 : Analyse par western blot de l'expression de KSRP. Les cellules Huh7.5.1 ont été transfectées avec un mélange de trois siKSRP spécifiques, puis avec différents plasmides exprimant des protéines KSRP mutées sur des résidus spécifiques. Les cellules ont ensuite été infectées avec la souche Jad pendant 48h. L'extinction de KSRP a été vérifiée par western blot à 48h post-infection.

Nous pouvons observer dans les conditions transfectées avec un siARN contrôle et avec les plasmides, deux bandes correspondant à la protéine KSRP. La bande de haut poids moléculaire (PM) correspond à l'isoforme endogène de KSRP, discriminable car elle est retrouvée dans le plasmide contrôle. La bande de PM inférieur correspond à l'isoforme

codée par le plasmide. Nous pouvons noter que la bande correspondant à l'isoforme endogène à la même intensité que l'isoforme issue du plasmide indiquant la nécessité de réduire l'expression de KSRP endogène pour observer seulement l'effet des protéines KSRP non-phosphorylables. Dans la condition siKSRP endogène, on constate que seule la bande correspondant à l'isoforme issue du plasmide est détectable indiquant une bonne extinction de KSRP endogène. De plus, aucune bande n'est détectable dans la condition siKSRP/pCMV-ctrl validant notre contrôle négatif.

La réplication du VHC ainsi que la maturation de miR-122 ont été mesurées par RT-qPCR pour chaque plasmide transfecté dans la condition siKSRP endogène à 8h, 24h et 48h (**Figure 35**).

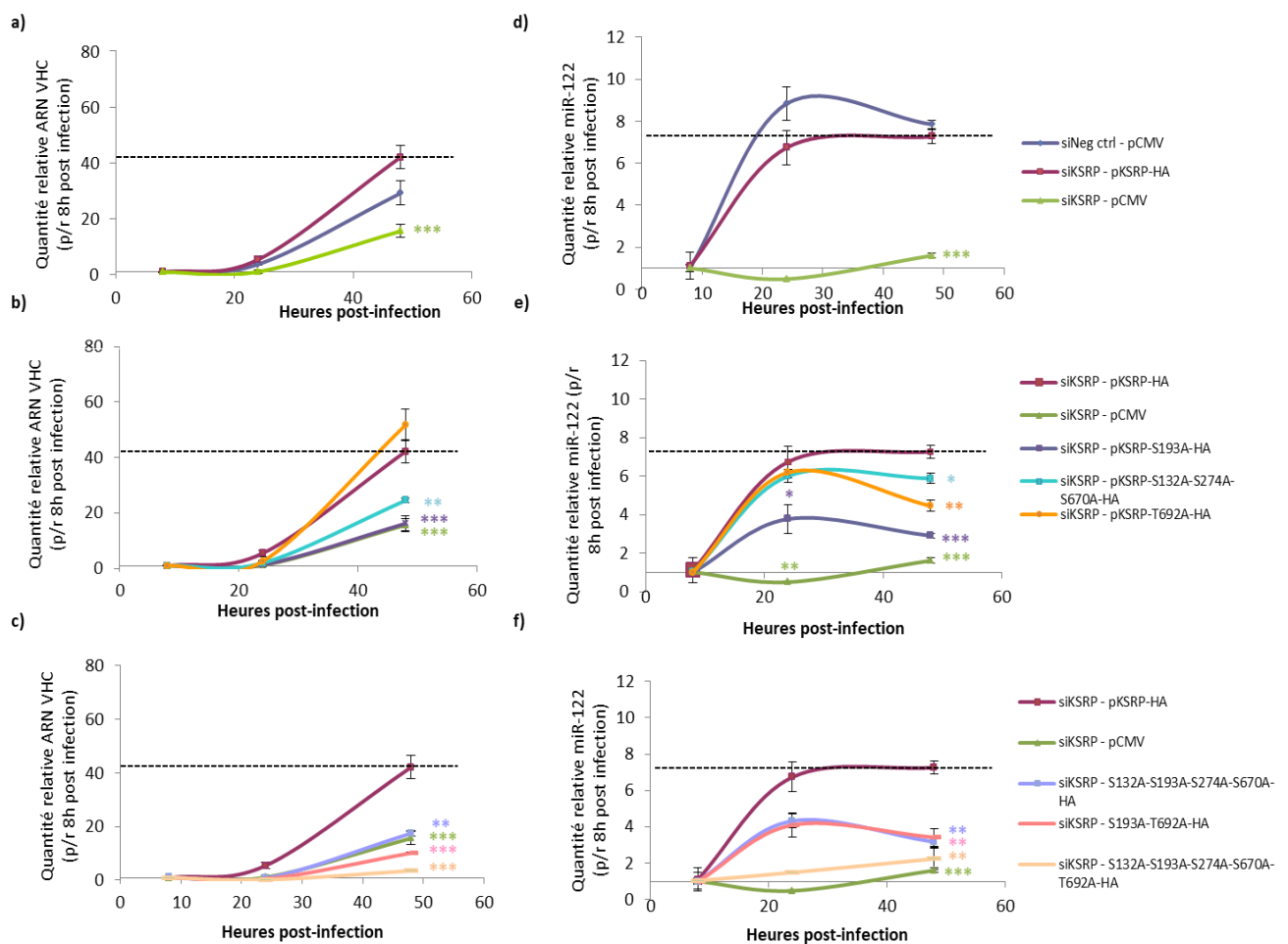


Figure 35 : Etude de la réplication de la souche Jad du VHC et de la maturation de miR-122.

Les cellules Huh7.5 ont été transfectées avec un siKSRP endogène, avec les différentes constructions plasmidiques puis infectées pendant 48h. La réplication virale ainsi que la quantité de miR-122 ont été analysées par RT-qPCR à 8 h, 24 h et 48 h post infection, normalisées avec la GAPDH pour le virus et avec le RNU6B pour miR-122. Les analyses statistiques (Student's t-test) ont été réalisées par rapport aux valeurs obtenues pour la transfection de siKSRP – pKSRP-HA. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Les analyses ont été faites par rapport au point 8h post-infection. La condition siKSRP – pKSRP-HA au point 48 h post-infection a été prise comme référence, car ceci correspond à la réplication génomique virale en présence de la protéine KSRP exogène, qui sera par la suite mutée sur certains résidus phosphorylables (**Figure 35**).

Nous pouvons observer sur la **figure 35a**, qu'en absence de KSRP endogène (condition siKSRP – pCMV ctrl) la réplication est diminuée d'un facteur 2.8-fois à 48 h par rapport à la condition siKSRP - pKSRP-HA confirmant le rôle proviral de KSRP.

Nous avons ensuite étudié l'effet des plasmides codant des protéines KSRP non-phosphorylables, mutées uniquement sur une voie (Akt, ATM ou p38/MAPK) (**Figure 35b**).

Nous pouvons observer que la forme KSRP-T692A-HA permet un niveau de réplication génomique comparable à la valeur de référence.

La forme KSRP-S132A-S274A-S670A-HA diminue la réplication virale par rapport à la valeur de référence. Ce résultat suggère que les sites de KSRP phosphorylables par ATM auraient un rôle proviral lors de l'infection par le VHC.

La forme KSRP-S193A-HA est la forme la plus antivirale de ce panel. On peut observer une diminution d'un facteur 2.8-fois (de manière comparable à la transfection de siKSRP – pCMV ctrl) par rapport à la condition de référence confirmant l'importance de la phosphorylation de ce site pour la réplication génomique virale. Ce résultat rejoint ceux obtenus dans le cadre du travail en cours de soumission.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la combinaison de plusieurs résidus mutés en alanine sur la réplication génomique virale (**Figure 35c**).

La forme la plus antivirale est la protéine KSRP mutée en alanine sur les cinq sites de phosphorylation. On peut observer une diminution de la réplication d'un facteur 10-fois par rapport à la condition de référence et d'un facteur 4.5-fois par rapport à la condition siKSRP – pCMV ctrl.

De manière intéressante, lorsque l'on combine la mutation S193A sur les plasmides mutés pKSRP-S132A-S274A-S670A-HA et pKSRP-T692A-HA (sites phosphorylables par ATM et par p38/MAPK, **Figure 35c**) on observe une diminution très significative de la réplication virale

(effet potentialisateur négatif). La transfection du plasmide exprimant KSRP-S193A-T692A-HA entraîne une diminution de la réplication virale d'un facteur 5-fois par rapport à la forme KSRP-T692A-HA et celle du plasmide exprimant KSRP-S132A-S193A-S274A-S670A-HA entraîne une diminution de la réplication d'un facteur 1.5-fois par rapport à la forme KSRP-S132A-S274A-S670A-HA.

Suite à ces résultats nous avons évalué l'impact des sites de phosphorylation de KSRP sur l'expression de miR-122 dans des cellules Huh7.5 infectées avec la souche Jad du VHC (**Figure 35d, 35e et 35f**).

De la même manière que pour le VHC, l'expression de miR-122 a été normalisée par rapport à la condition 8h post-infection. Nous pouvons tout d'abord remarquer que l'expression de miR-122 est fortement augmentée à 24 h dans la condition de référence siKSRP – pKSRP-HA puis se stabilise à 48 h (**Figure 35d**).

Nous pouvons observer une réduction de l'expression de miR-122 dans la condition siKSRP - pCMV ctrl par rapport à la valeur de référence, confirmant que KSRP est bien impliquée dans la maturation de ce microARN (**Figure 35d**).

Nous pouvons observer sur la **figure 35e** l'effet des plasmides exprimant les protéines mutées en alanine sur une seule voie de phosphorylation, sur la maturation de miR-122. La forme KSRP-T692A-HA entraîne une augmentation de la quantité de miR-122 à 24 h identique à celle de la forme KSRP-HA ou KSRP-S132A-S274A-S670A-HA, puis une légère diminution à 48 h post-infection d'un facteur 1.6-fois par rapport à la valeur de référence (**Figure 35e**). La forme KSRP-T692A-HA semble donc jouer un rôle sur la maturation du miR-122.

On notera également que la transfection du plasmide exprimant la forme KSRP-S132A-S274A-S670A-HA entraîne une modeste diminution de la maturation de miR-122 à 48 h post-infection (**Figure 35e**) qui pourrait être mis en parallèle avec la réduction de la réplication virale observée **figure 35b**. Les sites de phosphorylation ciblés par ATM pourraient jouer un rôle dans la maturation de miR-122.

La transfection de la forme KSRP-S193A-HA entraîne une diminution d'un facteur 1.8-fois et 2.5-fois du miR-122 par rapport à la valeur de référence à 24 h et 48 h post-infection,

respectivement. La **S193** est donc un résidu essentiel pour la maturation du miR-122 et pour la réplication virale.

Par la suite nous avons étudié l'effet de la combinaison de plusieurs résidus mutés en alanine sur la quantité de miR-122 (**Figure 35f**). La combinaison de la **S193A** avec les résidus phosphorylables par la kinase ATM ou la kinase p38/MAPK présente un effet potentialisateur négatif par rapport à la mutation **T692A** ou aux mutations **S132A-S274A-S670A**. En effet les formes KSRP-**S132A-S193A-S274A-S670A**-HA et KSRP-**S193A-T692A**-HA entraînent une diminution de l'expression de miR-122 d'un facteur 2.3 et 2.1-fois par rapport à la valeur de référence à 48 h post-infection, respectivement.

Cet effet potentialisateur négatif indique que la mutation **S193A** possède un effet dominant sur les formes non-phosphorylables **T692A** et **S132A-S274A-S670A** quant à la maturation de miR-122.

L'expression de la protéine KSRP-HA mutée en alanine sur ses cinq sites de phosphorylation entraîne une diminution de l'expression de miR-122 à 24 h et 48 h post-infection. Cette forme ne semble pas participer à la maturation de miR-122. D'après l'analyse faite sur les autres groupes nous pouvons suggérer que l'état de phosphorylation de la S193 semble donc être dominant pour la maturation de miR-122. Le rôle de la phosphorylation du résidu de KSRP substrat pour p38/MAPK reste à être confirmé alors que ceux substrats pour ATM semble jouer un rôle modeste dans cette maturation.

En mettant en parallèle tous les résultats obtenus (localisation nucléo-cytoplasmique des formes mutées, implication sur la réplication virale et sur la maturation de miR-122) nous pouvons conclure que la phosphorylation par ATM des trois résidus présents sur KSRP semble jouer un rôle proviral dans la réplication génomique et moindre dans la maturation de miR-122. La forme mutée en **S132A-S274A-S670A** est retrouvée majoritairement dans le cytoplasme (68%), l'addition de la **S193A** ne change pas sa répartition nucléo-cytoplasmique mais accentue l'effet antiviral et la diminution de l'expression de miR-122.

Les résultats obtenus pour la forme KSRP-**T692A**-HA suggèrent que cette forme joue le même rôle proviral pour la réplication du VHC que la forme non-mutée, malgré une diminution modeste (1.6-fois) de la quantité de miR-122 à 48h post-infection. La transfection

de ce mutant de KSRP entraîne une augmentation de l'expression de miR-122 à 24 h post-infection puis une diminution à 48 h (**Figure 35e**) suggérant que ce résidu pourrait avoir un rôle différent de celui de la **S193**. Ce mutant de KSRP, bien que présentant une localisation majoritairement nucléaire, ne reverse pas totalement le phénotype induit par la transfection de siKSRP^e sur l'expression de miR-122 à 48 h post-infection. L'addition de la **S193A** sur la forme KSRP-**T692A**-HA entraîne un changement de la localisation subcellulaire de la protéine, passant d'une forme nucléaire (81 % de signal dans le noyau) à une forme majoritairement cytoplasmique (67 % de signal dans le cytoplasme). La transfection de ce double mutant entraîne une diminution de la maturation de miR-122 et de la réplication virale.

Enfin, nous pouvons conclure que la phosphorylation du résidu **S193**, ainsi que sa localisation nucléaire, sont essentielles pour le cycle de vie du virus et pour la maturation de miR-122.

L'ensemble de ces résultats sont résumés dans la **Tableau 12** ci-dessous :

Plasmides	Effets sur la réplication virale 48 h p-i (% de la référence)	Effets sur l'induction de l'expression de miR-122 48 h p-i (% de la référence)	Localisation subcellulaire majoritaire
pKSRP-HA	Référence (100%)	100%	Nucléaire
pKSRP- T692A	Proviral (120%)	60%	Nucléaire
pKSRP- S193A	Antiviral (38%)	40%	Cytoplasmique
pKSRP- S132A-S274A-S670A -HA	Antiviral (57%)	80%	Cytoplasmique
pKSRP- S193A-T692A -HA	Antiviral (24%)	47%	Cytoplasmique
pKSRP- S132A-S193A-S274A-S670A -HA	Antiviral (40%)	43%	Cytoplasmique
pKSRP- S132A-S193A-S274A-S670A-T692A -HA	Antiviral (8%)	44%	Cytoplasmique

Tableau 12 : Tableau récapitulatif du rôle de chaque plasmide mutant sur la réplication virale, sur l'expression de miR-122 et sur sa localisation majeure.

Suite à ces résultats nous avons décidé d'étudier l'effet de la phosphorylation des sites S193 et T692 sur le virus. Nous avons utilisé, en plus de nos constructions en alanine, des plasmides exprimant les formes KSRP-S193D-HA et KSRP-T692D-HA mimant un état de phosphorylation définitif. La localisation de ces formes a été déterminée par *in situ* PLA. Sur la **figure 36** nous pouvons observer que les deux formes sont majoritairement nucléaires.

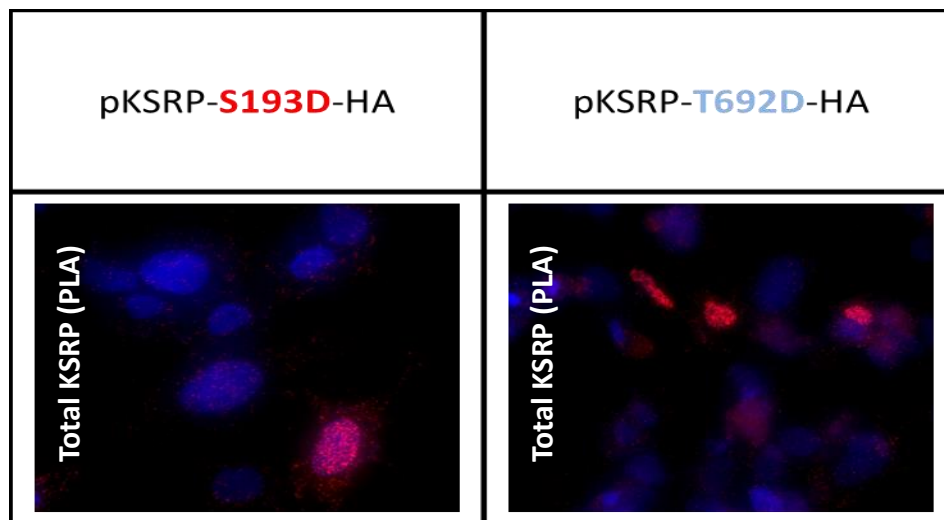


Figure 36: Localisation nucléo-cytoplasmique des plasmides mutés en aspartate. La localisation des plasmides pKSRP-S193D-HA et pKSRP-T692D-HA a été analysée par *in situ* PLA en utilisant le couple d'anticorps KSRP^{rabbit} X HA^{mouse} dans des cellules Huh7.5-RSG.

Afin de regarder l'impact de la phosphorylation en S193 ou en T692 nous avons transfecté les formes phospho-mimétiques (aspartate, D) et non-phosphorylables (Alanine, A) de la S193 et de la T692 dans des cellules Huh7.5-RSG. Afin de déterminer le degré d'interaction directe des formes transfectées pour le pri-miR-122, le VHC ou pour les ARNm ARE tel que c-jun, nous avons utilisé la technique d'immunoprécipitation d'ARN à 24 h post-transfection.

Sur la **figure 37** sont représentés les facteurs d'enrichissement des ARN VHC, du pri-miR-122 et de l'ARNm c-jun 24h post-transfection pour les protéines portant des mutations au niveau des résidus substrats de la voie Akt (**figure 37a**) et pour les protéines portant des mutations au niveau des résidus substrats de la voie p38/MAPK (**figure 37b**). Chaque condition a été normalisée par rapport à l'IgG contrôle et par la quantité d'ARN dans la fraction non-immunoprécipitée (INPUT).

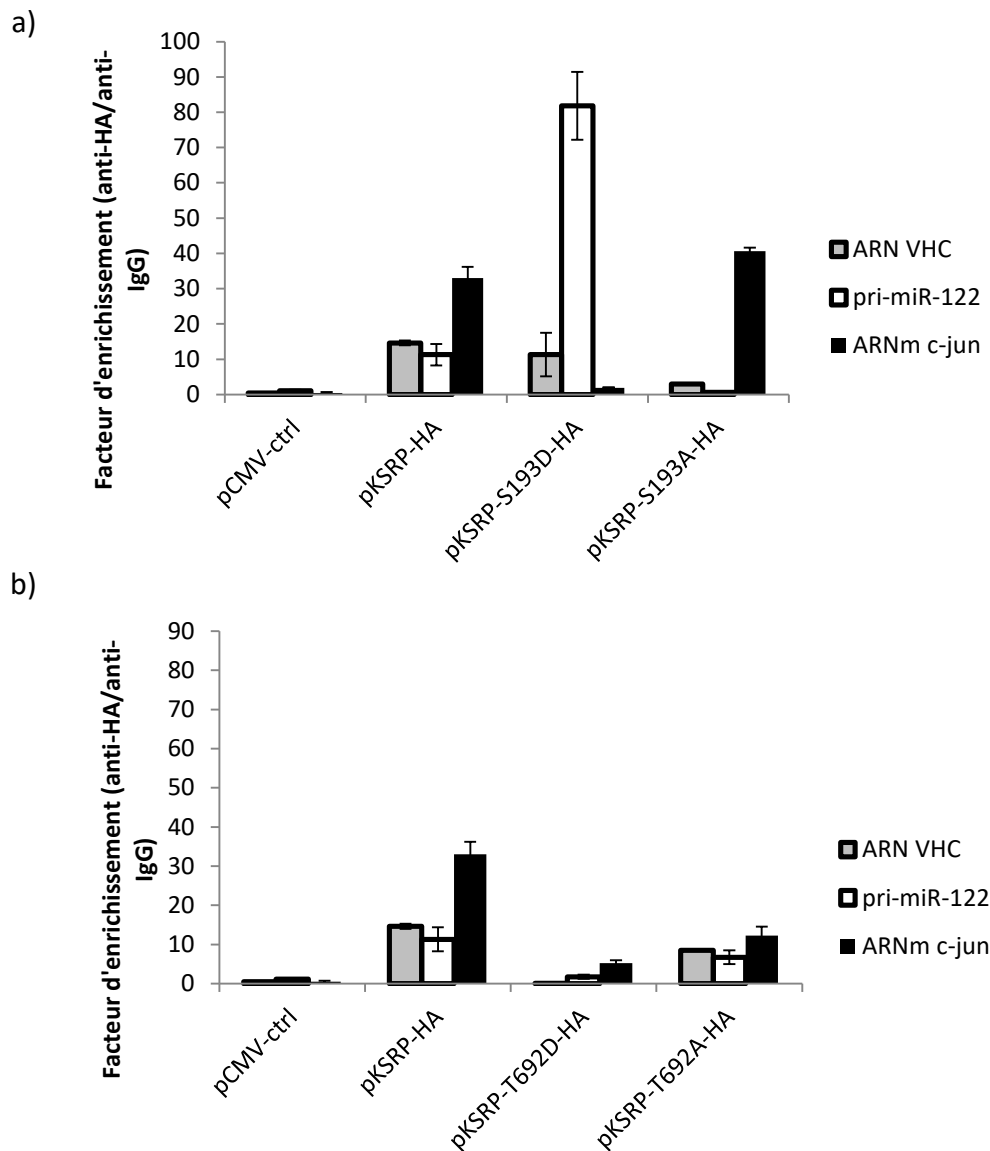


Figure 37 : Analyse par Immunoprécipitation d'ARN de l'affinité des différentes constructions plasmidiques de KSRP pour l'ARN VHC, le pri-miR-122 et l'ARNm c-jun. Les cellules Huh7.5-RSG ont été transfectées avec les plasmides mutés sur les résidus substrats des voies Akt ou p38-MAPK pendant 24h. Suite à une étape de « crosslinking » aux UV, une immunoprécipitation d'ARN a été réalisée en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette HA. L'analyse de l'affinité a été faite par RT-qPCR par rapport à la quantité d'ARN cible dans la fraction de départ (INPUT).

Dans la condition d'expression de la protéine KSRP-HA, nous pouvons observer une interaction directe de KSRP avec l'ARN viral, le pri-miR-122 et avec l'ARNm « ARE » c-jun. De manière intéressante, cette interaction est plus importante avec l'ARNm c-jun qu'avec le pri-miR-122. Les résultats obtenus avec la protéine KSRP-HA seront utilisés comme référence pour l'analyse des formes mutantes. Dans la condition KSRP-S193D-HA nous observons une interaction pour l'ARN VHC similaire à la forme KSRP-HA. En revanche, le facteur

d'enrichissement pour le pri-miR-122 est 8-fois supérieur à celui de KSRP-HA et 16-fois inférieur pour l'ARNm c-jun.

Dans la condition KSRP-S193A-HA, l'interaction pour l'ARN VHC et pour le pri-miR-122 est diminuée d'un facteur 7-fois et 80-fois, respectivement. Cette forme garde en revanche une grande affinité pour l'ARNm c-jun avec un facteur d'enrichissement supérieur à 40-fois.

Concernant le résidu T692, nous pouvons voir que la forme KSRP-T692D-HA, phospho-mimétique présente peu d'affinité pour l'ARN viral et pour l'ARNm c-jun. Malgré sa localisation nucléaire, l'interaction directe de cette protéine avec le pri-miR-122 est faible.

La forme KSRP-T692A-HA, interagit avec le VHC mais de manière moins importante que la forme KSRP-HA. Cette forme montre une perte d'affinité pour l'ARNm c-jun par rapport à la condition de référence et interagit directement avec le pri-miR-122 de manière comparable à la référence (pKSRP-HA).

Ces résultats nous permettent de dire que la forme KSRP-S193D-HA a donc une grande affinité pour les pri-miARNs dont le pri-miR-122 et que la forme KSRP-S193A-HA, du fait de sa localisation cytoplasmique, est plus affine pour les ARN « ARE ». De plus, la forme KSRP-T692A-HA semble pouvoir interagir avec les ARN « ARE » et les pri-miARNs. La T692D ne semble pas avoir d'affinité pour les facteurs testés. Enfin, les formes KSRP-HA, KSRP-S193D-HA et KSRP-T692A-HA semblent avoir une affinité pour l'ARN viral (**Tableau 13**).

Protéines	Affinité pour le VHC (% de la référence)	Affinité pour le pri-miR-122 (% de la référence)	Affinité pour les ARN « ARE » (% de la référence)
KSRP-HA	100%	100%	100%
KSRP-S193D-HA	77%	723%	6%
KSRP-S193A-HA	20%	5%	123%
KSRP-T692D-HA	0.1%	15%	15%
KSRP-T692A-HA	58%	59%	37%

Tableau 13 : Tableau récapitulatif de l'affinité des formes mutées KSRP-S193D-HA, KSRP-S193A-HA, KSRP-T692D-HA et KSRP-T692A-HA par rapport à la forme non-mutée KSRP-HA,

pour l'ARN viral, le pri-miR-122 et les ARN « ARE » tels que c-jun (% de la référence KSRP-HA).

IV- Identification et étude de la régulation d'ARN non-codants modulés lors de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus et caractérisation du rôle de KSRP

Suite à l'étude du rôle proviral de KSRP sur le virus de l'hépatite C et sur la maturation du miR-122, nous avons cherché à savoir si cette protéine pouvait servir d'outil pour la découverte de nouveaux ARNs non-codants pro- et ou antiviraux, impliqués dans le cycle de vie d'autres virus à ARN de polarité positive.

Pour cela, nous avons mené en parallèle deux approches nous permettant de répondre à notre problématique. Nous avons tout d'abord évalué le rôle potentiel de KSRP dans le cycle de vie de virus à ARN de polarité positive, puis à l'aide de techniques de séquençage à haut débit nous avons cherché des ARN non codants modulés lors de l'infection ou dont les cibles cellulaires pouvaient être dérégulées.

Cette étude a été réalisée sur la souche modèle HCoV-229E de la famille des Coronavirus. Cette famille virale nous a particulièrement intéressé car elle a été la cause de deux épidémies, en 2003 et 2012, ayant causé environ 35% de mortalité pour la souche MERS-CoV. Cette famille étant actuellement dépourvue de traitement antiviral efficace il est donc essentiel d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans le cycle de vie des Coronavirus et de découvrir de nouvelles cibles à potentiel thérapeutique.

A- Caractérisation du rôle proviral de KSRP lors de l'infection par la souche HCoV-229E

De manière similaire à l'étude faite sur le VHC, nous avons dans un premier temps évalué l'effet de KSRP sur la réplication de la souche modèle HCoV-229E. Pour cela, un siARN dirigé contre l'ARNm KSRP a été transfecté pendant 24 h dans des fibroblastes pulmonaires humains (MRC-5). Les cellules ont ensuite été infectées pendant 24h et 48h avec la souche HCoV-229E et la réplication virale a été analysée par RT-qPCR. Nous pouvons voir sur la **Figure 38a** l'efficacité d'extinction de l'expression de KSRP (80 % d'extinction à 24h post-infection et 75 % à 48h post-infection). Sur la **figure 38b** nous pouvons remarquer une

diminution significative de la réplication virale d'un facteur 10 en absence de KSRP, à 24h et 48h post-infection. Ces résultats suggèrent que KSRP est un facteur proviral pour la réplication de la souche HCoV-229E

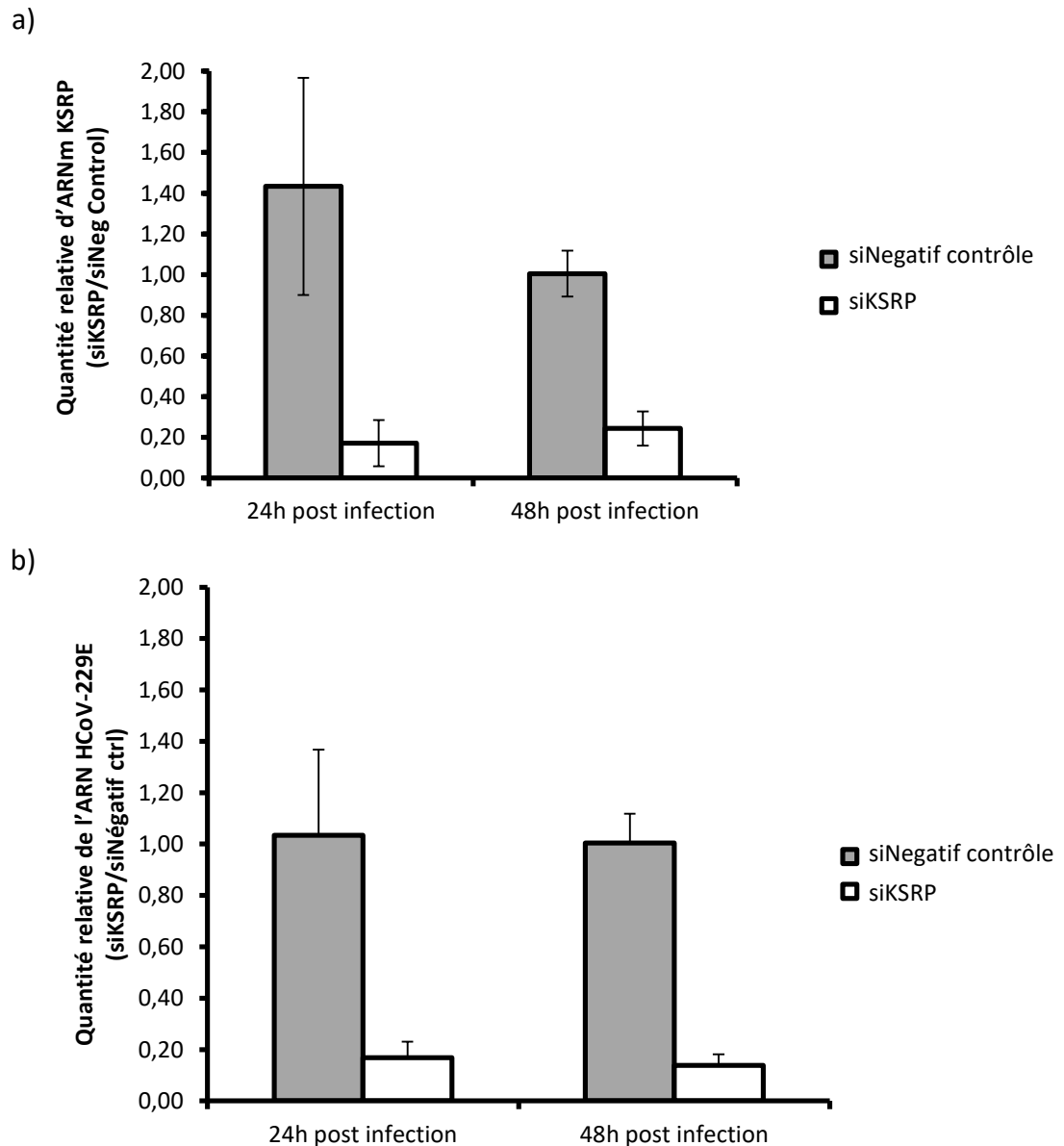


Figure 38: Analyse de la réplication virale de la souche HCoV-229E dans des cellules MRC-5 dont l'expression de KSRP a été inhibée. Des cellules MRC-5 ont été transfectées avec un siKSRP puis infectées avec la souche HCoV-229E à une M.O.I. de 1. L'extinction de KSRP ainsi que la réplication virale ont été quantifiés par RT-qPCR, après normalisation avec l'ARNm GAPDH.

Nous avons vérifié ces résultats par transfection d'un plasmide exprimant la protéine KSRP-HA pendant 24 h dans des cellules MRC-5 infectées avec la souche HCoV-229E. L'ARN viral a été quantifié 24 h- et 48 h-post infection.

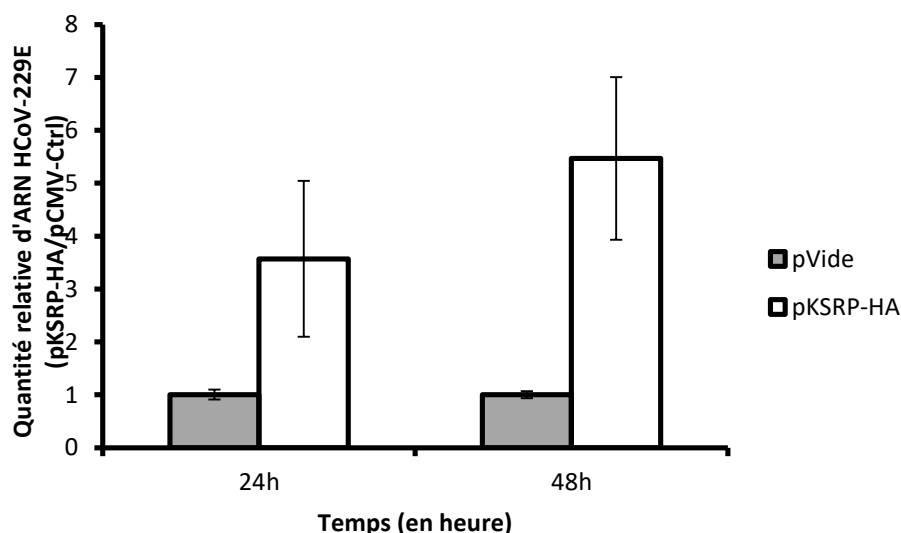


Figure 39 : Analyse de la réplication virale dans des cellules MRC-5 transfectée avec un plasmide exprimant la protéine KSRP-HA. Des cellules MRC-5 ont été transfectées avec un plasmide exprimant KSRP-HA puis infectées pendant 24h et 48h avec la souche HCoV-229E à une M.O.I. de 1. La réplication virale a été analysée par RT-qPCR, après normalisation avec l'ARNm GAPDH.

Les résultats obtenus montrent une augmentation de la réplication virale d'un facteur 3,5-fois à 24 h post-infection dans la condition pKSRP-HA et une augmentation d'un facteur 5,5-fois à 48 h post-infection (**Figure 39**). La surexpression de KSRP entraîne donc un effet positif sur le virus ce qui renforce les résultats précédents et nous permet de dire que KSRP est un facteur proviral pour la réplication de la souche HCoV-229E.

Les Coronavirus étant des virus cytolitiques, nous avons également évalué l'effet de la transfection du plasmide pKSRP-HA sur la lyse des cellules à 48h post-infection, une lyse maximale de plus de 95% étant habituellement observée à 72h à une M.O.I. de 1.

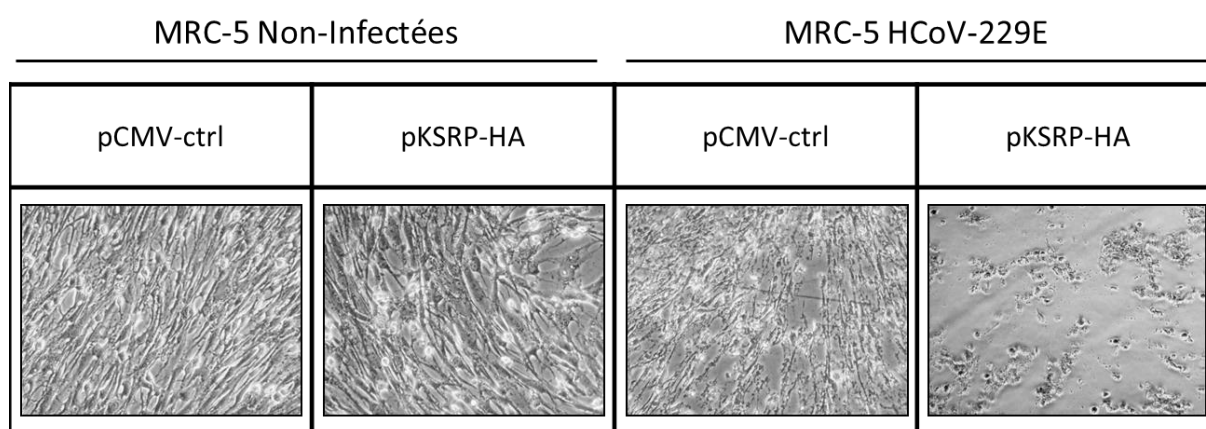


Figure 40 : Images de cellules MRC-5 observées 48 h post-infection par la souche HCoV-229E (M.O.I. de 1). L'effet cytolitique de la souche HCoV-229E a été mesuré suite à la transfection d'un plasmide exprimant la protéine KSRP-HA ou d'un plasmide pCMV-ctrl (microscope optique Grossissement 20X).

Sur la **figure 40** sont représentées les photos des cellules MRC-5 infectées ou non-infectées ayant été transfectées avec un plasmide contrôle (pCMV-ctrl) ou avec le plasmide pKSRP-HA. Dans la condition non-infectée, aucune lyse cellulaire n'est observable pour les deux conditions. Ceci indique que la mort cellulaire observée dans la condition infectée n'est pas due à la transfection de plasmides. Dans la condition infectée, on observe une lyse cellulaire à 48h post-infection pour le pCMV-ctrl correspondant à l'effet cytopathogène du virus. En revanche, dans la condition pKSRP-HA infectée on observe la lyse cellulaire de plus de 90% des cellules. La surexpression de KSRP semblerait donc promouvoir la lyse cellulaire entraînée par la formation de nouvelles particules virales.

L'ensemble des résultats des **figures 38,39 et 40** indiquent que KSRP est un facteur proviral pour la réplication de la souche HCoV-229E.

L'expression de KSRP a ensuite été analysée par western Blot à 24h, 48h et 72h post-infection (**Figure 41**).

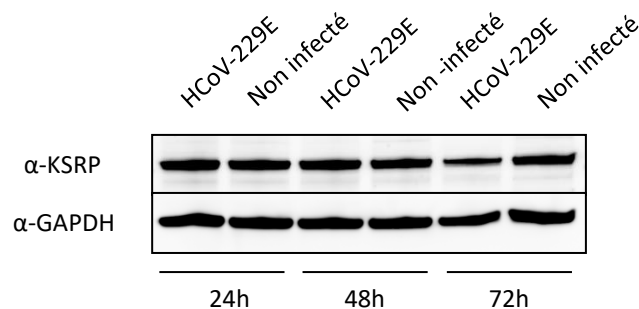


Figure 41 : Analyse par western blot de l'expression de KSRP. L'expression de KSRP a été analysée par Western blot à 24 h, 48 h ou 72 h post-infection par la souche HCoV-229E.

Les résultats obtenus **figure 41**, ne montrent aucun changement significatif d'expression de la protéine KSRP au cours de l'infection par rapport à la condition non infectée. Le rôle proviral de KSRP pourrait donc être dû à des modifications post-traductionnelles de la protéine.

Afin de déterminer si le rôle proviral de KSRP dans les cellules infectées est dû à une interaction directe avec le génome viral, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation d'ARN 24 h post-infection par la souche HCoV-229E.

Les résultats de la **Figure 42** indiquent que KSRP n'interagit pas directement avec l'ARN HCoV-229E. En revanche, KSRP interagit directement avec l'ARNm c-jun (facteur d'enrichissement de 90 fois dans la condition non-infectée). Dans la condition infectée, on observe une diminution d'affinité entre KSRP et l'ARNm c-jun d'un facteur 8-fois.

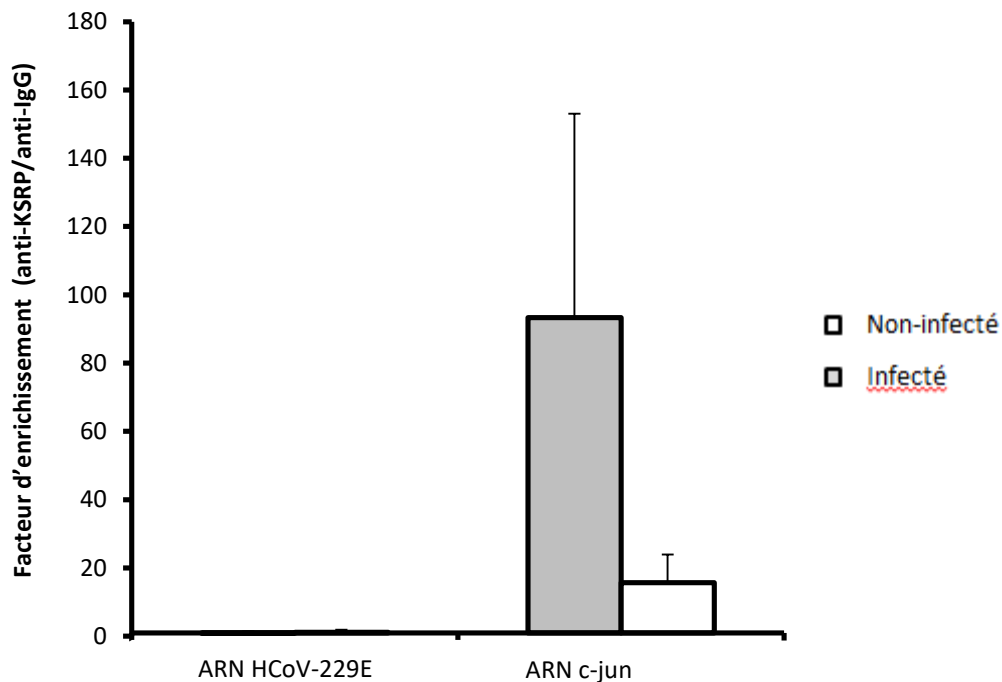


Figure 42 : Immunoprécipitation d'ARN analysant l'affinité de KSRP pour l'ARN viral et pour l'ARNm « ARE » c-jun. Les cellules MRC-5 ont été infectées pendant 24h avec la souche HCoV-229E puis ont été « crosslinkées » aux UV. L'immunoprécipitation d'ARN a été réalisée en utilisant un anticorps anti-KSRP^{rabbit}.

Ces résultats suggèrent un changement de fonction de KSRP au cours de l'infection qui impliquerait une diminution de son interaction directe pour les ARN « ARE » et donc potentiellement un rôle dans le contrôle de l'expression d'autres ARNs, tel que certains microARNs. De plus, le rôle proviral de KSRP lors de l'infection par la souche HCoV-229E est indirect.

B- Etude de la modulation des ARN non-codants lors de l'infection HCoV-229E par séquençage à haut débit

Une seconde approche, menée en parallèle avec l'évaluation du rôle de KSRP lors de l'infection par la souche HCoV-229E, avait pour but d'identifier des ARN non-codants essentiels dans le cycle de vie de ce Coronavirus. Pour cela, nous avons utilisé la technique

de séquençage à haut débit (« Next Generation Sequencing, NGS ») sur des ARNs totaux (« total RNA ») ou de petite taille (« small RNA ») extraits de cellules MRC-5 non-infectées ou infectées pendant 24 h à la M.O.I. de 1 par la souche HCoV-229E. Une seconde expérience a été réalisée, avec des cellules MRC-5 infectées, traitées avec un siNeg Ctrl ou un siKSRP. L'analyse « total RNA » permettra de quantifier l'expression de tous les ARN cellulaires, alors que l'analyse « small RNA » renseignera sur l'expression des miARNs dans les conditions expérimentales suivantes : non-infectée vs infectée, ou siNeg Ctrl vs siKSRP. L'analyse croisée de ces séquençages permettra d'identifier les ARNm, ARN non-codants, miARNs cellulaires régulés par l'infection HCoV-229E et dépendants de l'expression de KSRP.

1- Cas des microARNs

Le **tableau 14** résume les microARNs humains ainsi que les pri-miARNs identifiés par l'analyse « NGS small RNA » et « NGS total RNA », respectivement, dans la condition infectée (24 h) vs non-infectée. On notera que l'analyse « NGS small RNA » dans la condition infectée siKSRP vs siNeg ctrl n'ayant pu aboutir, cette étude sera réalisée ultérieurement. Les miARNs surexprimés sont indiqués en bleu, sous-exprimés en vert et les miARNs retrouvés à la fois dans l'analyse « NGS small RNA » et « NGS total RNA » sont indiqués en rouge.

Analyse « NGS small RNA »	miARN	Quantité relative (en Log2 Fold Change)	Analyse « NGS total RNA »	pri-miARN	Quantité relative (en Log2 Fold Change)
Surexprimé	HSA-MIR-4519	2,64	Surexprimé	HSA-MIR-568	3,02
Surexprimé	HSA-MIR-568	2,61	Surexprimé	HSA-MIR-6861	3,02
Surexprimé	HSA-MIR-4517	2,44	Surexprimé	HSA-MIR-3143	2,78
Surexprimé	HSA-MIR-6821-5P	2,37	Surexprimé	HSA-MIR-4517	2,61
Surexprimé	HSA-MIR-711	2,33	Surexprimé	HSA-MIR-711	2,49
Surexprimé	HSA-MIR-3143	2,28	Surexprimé	HSA-MIR-4271	2,45
Surexprimé	HSA-MIR-6821-3P	2,26	Surexprimé	HSA-MIR-4519	2,38
Surexprimé	HSA-MIR-6844	2,24	Surexprimé	HSA-MIR-6821	2,36
Surexprimé	HSA-MIR-6073	2,18	Surexprimé	HSA-MIR-6844	2,17
Surexprimé	HSA-MIR-4324	2,16	Surexprimé	HSA-MIR-6073	2,01
Surexprimé	HSA-MIR-4720-5P	2,10	Surexprimé	HSA-MIR-6502	1,93
Surexprimé	HSA-MIR-4485	2,08	Surexprimé	HSA-MIR-621	1,82
Surexprimé	HSA-MIR-3187-5P	2,03	Surexprimé	HSA-MIR-24-2	1,59

Surexprimé	HSA-MIR-24-3P	2,01	Surexprimé	HSA-MIR-612	1,51
Surexprimé	HSA-MIR-1	1,95	Surexprimé	HSA-MIR-1281	1,50
Surexprimé	HSA-MIR-6783-3P	1,95	Surexprimé	HSA-MIR-3187	1,22
Surexprimé	HSA-MIR-645	1,95	Surexprimé	HSA-MIR-4657	1,15
Surexprimé	HSA-MIR-4461	1,92	Sous-exprimé	HSA-MIR-636	-1,04
Surexprimé	HSA-MIR-6502-3P	1,85	Sous-exprimé	HSA-MIR-22	-1,15
Surexprimé	HSA-MIR-621	1,82	Sous-exprimé	HSA-MIR-3658	-1,18
Surexprimé	HSA-MIR-612	1,53	Sous-exprimé	HSA-MIR-3687	-1,32
Surexprimé	HSA-MIR-1281	1,44	Sous-exprimé	HSA-MIR-4521	-1,44
Surexprimé	HSA-MIR-4657	1,38	Sous-exprimé	HSA-MIR-199A-2	-1,51
Surexprimé	HSA-MIR-1244	0,86	Sous-exprimé	HSA-MIR-21	-1,58
Sous-exprimé	HSA-MIR-7111-3P	-0,68	Sous-exprimé	HSA-MIR-654	-1,77
Sous-exprimé	HSA-MIR-4253	-0,88	Sous-exprimé	HSA-MIR-1304	-1,93
Sous-exprimé	HSA-MIR-762	-1,08	Sous-exprimé	HSA-MIR-155	-1,93
Sous-exprimé	HSA-MIR-21-3P	-1,26	Sous-exprimé	HSA-MIR-329-2	-1,93
Sous-exprimé	HSA-MIR-4521	-1,30	Sous-exprimé	HSA-MIR-541	-1,94
Sous-exprimé	HSA-MIR-3658	-1,30	Sous-exprimé	HSA-MIR-376B	-1,97
Sous-exprimé	HSA-MIR-3687	-1,31	Sous-exprimé	HSA-MIR-6845	-1,99
Sous-exprimé	HSA-MIR-22-3P	-1,40	Sous-exprimé	HSA-MIR-412	-2,00
Sous-exprimé	HSA-MIR-433-5P	-1,78	Sous-exprimé	HSA-MIR-4449	-2,02
Sous-exprimé	HSA-MIR-4449	-1,78	Sous-exprimé	HSA-MIR-377	-2,22
Sous-exprimé	HSA-MIR-637	-1,82	Sous-exprimé	HSA-MIR-590	-2,26
Sous-exprimé	HSA-MIR-6892-3P	-2,04	Sous-exprimé	HSA-MIR-889	-2,37
Sous-exprimé	HSA-MIR-541-3P	-2,06	Sous-exprimé	HSA-MIR-145	-2,44
Sous-exprimé	HSA-MIR-1229-5P	-2,22	Sous-exprimé	HSA-MIR-433	-2,51
Sous-exprimé	HSA-MIR-300	-2,43	Sous-exprimé	HSA-MIR-3917	-2,62
Sous-exprimé	HSA-MIR-134-3P	-2,46	Sous-exprimé	HSA-MIR-300	-2,62
Sous-exprimé	HSA-MIR-3917	-2,52	Sous-exprimé	HSA-MIR-335	-2,68
Sous-exprimé	HSA-MIR-4763-3P	-2,54	Sous-exprimé	HSA-MIR-503	-2,72
Sous-exprimé	HSA-MIR-622	-3,05	Sous-exprimé	HSA-MIR-134	-2,77
			Sous-exprimé	HSA-MIR-622	-3,06
			Sous-exprimé	HSA-MIR-221	-3,10
			Sous-exprimé	HSA-MIR-27B	-3,13

Tableau 14 : MicroARNs et pri-microARNs dont l'expression est altérée au cours de l'infection virale d'après les résultats du « NGS small RNA » et « NGS total RNA » dans les conditions Infectées vs Non-infectées. En bleu : miARN dont l'expression est surexprimée. En vert : miARN dont l'expression est sous-exprimée. En rouge : miARN identifiés dans les deux analyse « NGS ». La quantité relative est mesurée en log2 Fold Change.

L'analyse des « NGS » indique que seuls 43 microARNs matures sont modulés par l'infection HCoV-229E (19 sous-exprimés et 24 surexprimés). Dans le cas des pri-miARNs, 46 sont modulés par l'infection, avec 29 sous-exprimés et 17 surexprimés.

Nous avons identifié 27 microARNs communs aux deux conditions, 15 étant surexprimés dans les conditions pri-miARNs et miARN matures et 12 étant sous-exprimés dans les conditions pri-miARNs et miARNs matures (**Figure 43**). Ces données semblent suggérer que l'expression de ces microARNs est altérée au cours de l'infection, au niveau de la transcription des pri-miARNs.

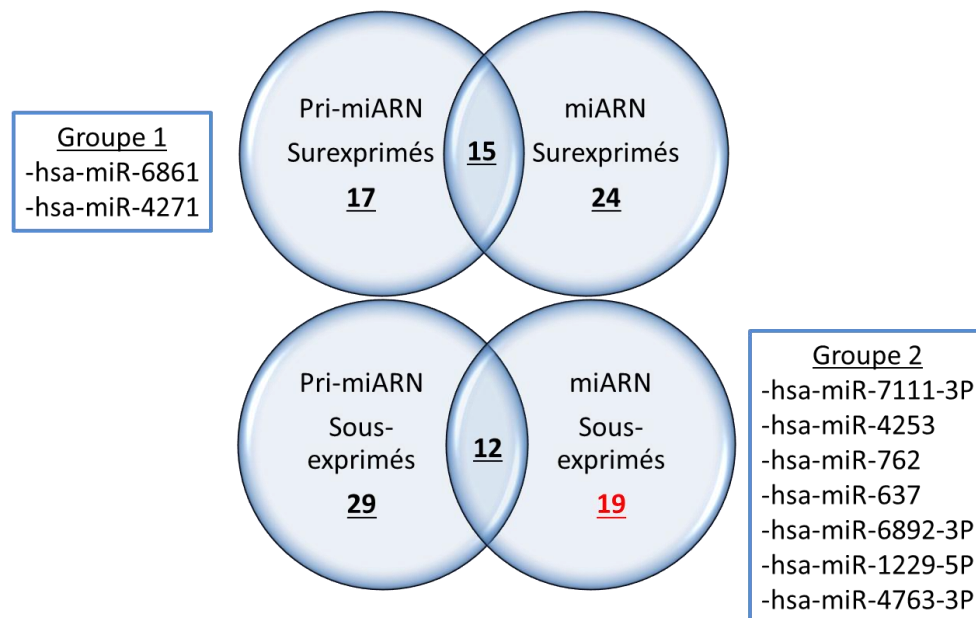


Figure 43: Analyse croisée des microARNs et des pri-miARNs modulés au cours de l'infection HCoV-229E par « NGS total RNA » et « small RNA » dans les conditions infectée vs non-infectée par la souche HCoV-229E.

Ces analyses n'ont pas permis de mettre en évidence des candidats pour lesquels l'expression du pri-miARN était surexprimée et le miARN mature correspondant sous-exprimée et/ou inversement. Ainsi, pour identifier des miARNs dont la maturation était altérée par l'infection HCoV-229E, nous avons sélectionné les miARNs matures sous-exprimés dont l'expression du pri-miARN correspondant restait inchangée (groupe 1) et les pri-miARN surexprimés dont l'expression du miARN mature correspondant n'était pas modifiée (groupe 2).

Nous avons trouvé 7 candidats appartenant au groupe 2 (**figure 43**) dont 3 ont une expression diminuée d'un facteur supérieur à 2-fois et pourraient être intéressants à étudier (hsa-miR-4763-3P, hsa-miR-1229-5P et hsa-miR-6892-3P, **figure 43**). Concernant le groupe 1, deux candidats (hsa-miR-6861 et hsa-miR-4271, **figure 43**) ont été trouvés avec une augmentation de leur expression d'un facteur supérieur à 2-fois.

Nous avons également réalisé une analyse ontologique afin d'identifier des microARNs essentiels pour la souche HCoV-229E *via* la dérégulation de l'expression de leurs cibles ARNm lors de l'infection (analyse ontologique « miroir »). Le **tableau 15** correspond à une classification de microARNs par nombre de cibles ARNm modulés au cours de l'infection. Dans cette liste de microARNs, deux sont retrouvés dans le **tableau 14**, le miR-300 sous-exprimé d'un facteur 2,6, avec 129 cibles surexprimées et le miR-1 surexprimé d'un facteur 1,95, avec 93 cibles sous-régulées.

microARN cellulaire	Direction	Nombre de gènes	adj.Pval
hsa-miR-124-3p	Sous-régulés	146	1.9e-11
hsa-miR-1-3p		93	9.4e-07
hsa-miR-4446-3p		18	2.8e-04
hsa-miR-191*		47	3.4e-03
hsa-miR-765		39	4.0e-03
hsa-miR-9		91	4.0e-03
hsa-miR-26b-5p		138	6.6e-03
hsa-miR-608		38	6.6e-03
hsa-miR-138		49	7.6e-03
hsa-miR-96		74	8.9e-03
hsa-miR-144	Sur-régulés	177	1.0e-32
hsa-miR-335-5p		323	2.9e-29
hsa-miR-340		178	1.2e-23
hsa-miR-495		163	1.2e-23
hsa-miR-30b		182	5.1e-23
hsa-miR-30e		164	6.0e-23
hsa-miR-93		167	7.4e-23
hsa-miR-300		129	1.2e-22
hsa-miR-30a		182	1.5e-22
hsa-miR-374b		98	1.2e-21
hsa-miR-30c		152	4.5e-21
hsa-miR-374a		95	2.5e-20
hsa-miR-30d		146	3.4e-20
hsa-miR-137		149	4.5e-20
hsa-miR-101		128	6.5e-20

Tableau 15 : Analyse en « miroir » des microARNs *via* les cibles ARNm dérégulées au cours de l'infection. Cette analyse ontologique a été réalisée avec les logiciels MirTarBase, MicroCosm et RegNetwork.

Enfin, cette analyse ontologique en « miroir » du « NGS total RNA » a permis d'identifier 14 microARNs dont l'expression est inchangée dans le « NGS small RNA », alors que leurs cibles ARNm sont surexprimées au cours de l'infection. Ces résultats suggèrent que ces microARNs pourraient être captés par l'ARN viral ou se fixer sur d'autres facteurs que les ARNm cibles.

Ainsi, suite à cette analyse ontologique en « miroir » nous avons voulu déterminer s'il existait des microARNs pouvant se fixer directement à l'ARN HCoV-229E. Pour cela des cellules MRC-5 ont été infectées pendant 24 h avec la souche HCoV-229E à la M.O.I. de 1 puis nous avons évalué par immunoprécipitation d'ARN et par *in situ* PLA l'existence d'une interaction directe entre l'ARN viral et la protéine Ago, membre du complexe de RISC. Un anticorps anti-panAgo puis un anticorps anti-Ago2 (la protéine principale du complexe RISC) et un anticorps anti-ARN double-brin permettant la détection de l'ARN viral en cours de réplication ont été utilisés.

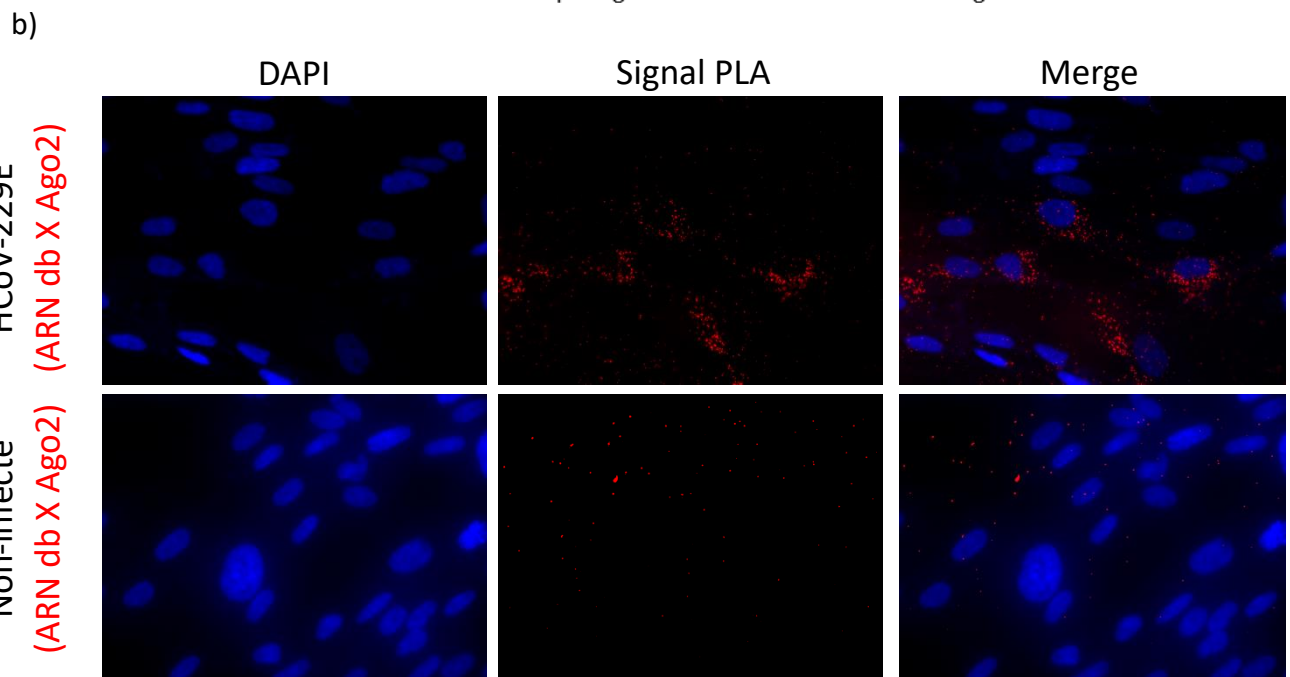
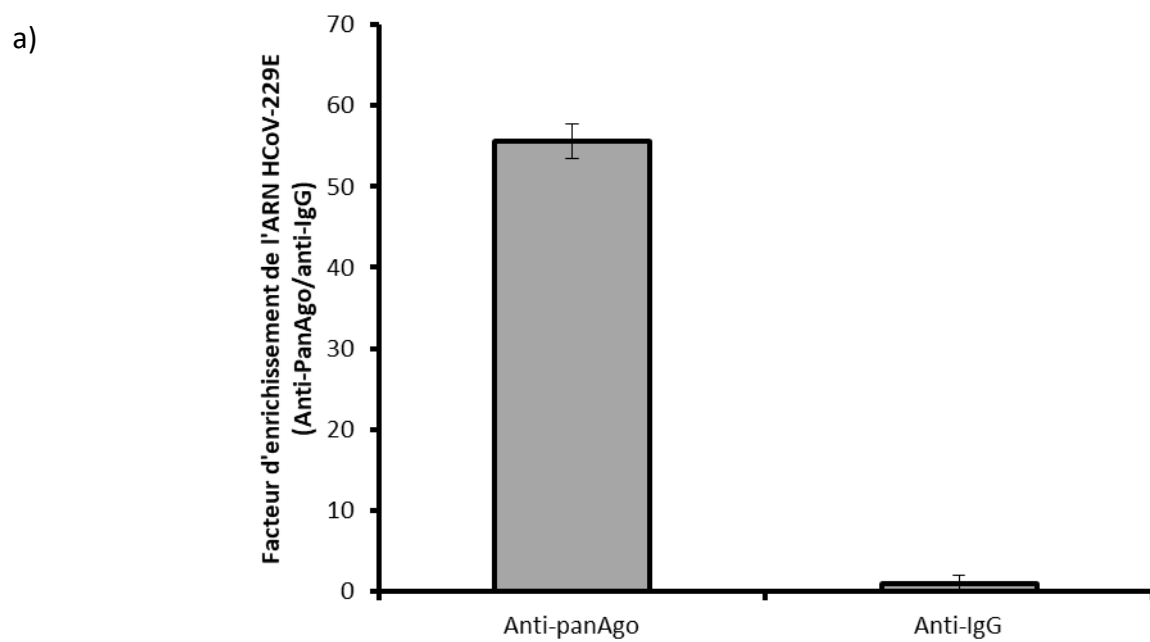


Figure 44: L'ARN viral interagit de manière directe avec des microARNs. a) : Une immunoprécipitation d'ARN a été réalisée sur des cellules MRC-5 infectées en utilisant un anticorps anti-panAgo afin de détecter l'affinité entre l'ARN viral et les microARNs. b) : Une expérience d'*in situ* PLA a été réalisée en utilisant le couple d'anticorps Ago2^{rabbit} X ARN db^{mouse}. Le signal PLA représente la colocalisation entre les deux anticorps

La **figure 44a** indique le facteur d'enrichissement (quantification par RT-qPCR) de l'ARN viral HCoV-229E après immunoprécipitation d'ARN avec un anticorps anti-panAgo par rapport à un anti-IgG. Les résultats obtenus montrent que l'ARN viral interagit directement avec panAgo (facteur d'enrichissement d'environ 55-fois par rapport à l'IgG contrôle).

La **figure 44b** est un échantillon représentatif des résultats obtenus par *in situ* PLA (anti-Ago2 x anti-ARN db). Nous pouvons observer les noyaux par coloration au DAPI (bleu) et le signal PLA ($\lambda = 594$ nm, rouge) mettant en évidence la proximité entre l'ARN viral double brin et la protéine Ago2 (<40 nm). Dans la condition non-infectée, aucun signal de PLA n'est détectable. En revanche, dans la condition infectée (HCoV-229E), nous pouvons observer un signal PLA autour du noyau.

Ces résultats suggèrent qu'un ou plusieurs microARNs auraient la capacité d'interagir de manière directe avec l'ARN viral.

2- Cas des lncARNs

Les analyses faites par séquençage « NGS total R NA » dans les conditions infectée vs non-infectées et siKSRP vs siNeg ctrl ont mis en évidence la dérégulation de l'expression de nombreux ARN au cours de l'infection. Afin d'identifier les ARNs dont l'expression était modulée par l'infection, et dépendant de KSRP, nous avons croisé les résultats des deux analyses « NGS total RNA ».

Les résultats sont représentés sur la **figure 45**.

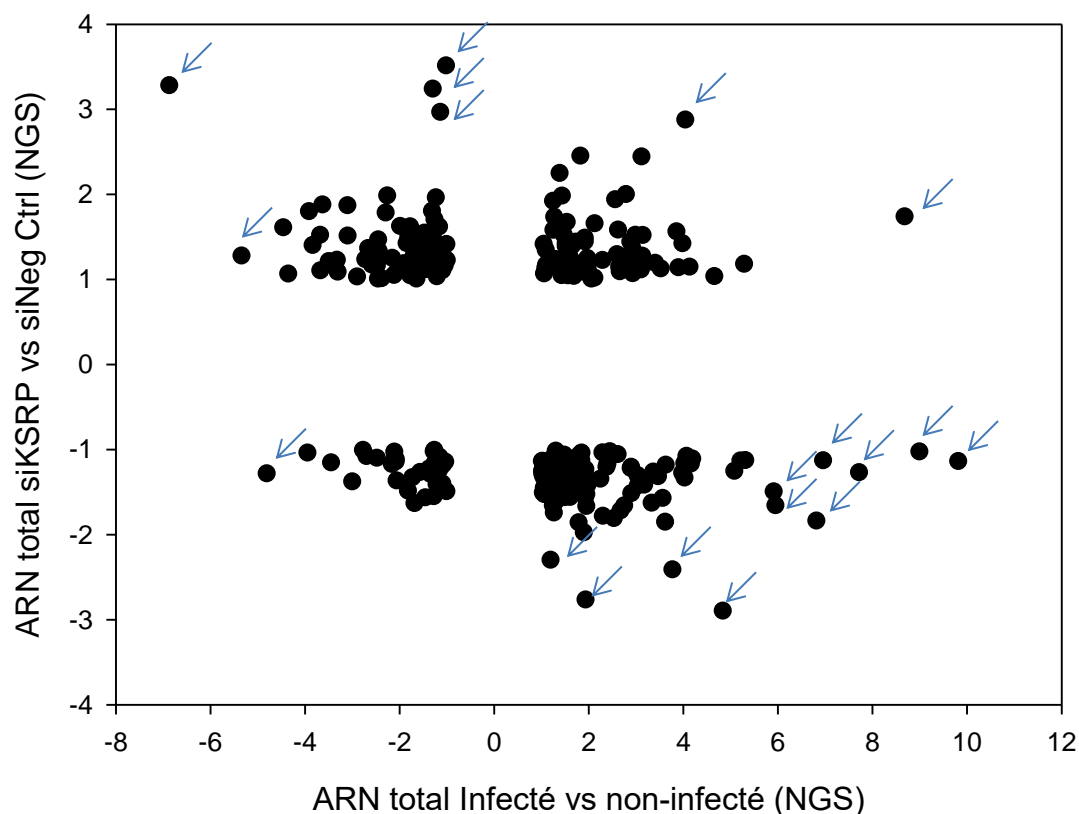


Figure 45 : Représentation graphique des éléments communs modulés dans les deux analyses « NGS total RNA ». Les flèches représentent les facteurs cellulaires dont la modulation est significative pour les deux analyses.

Nous avons identifié 19 facteurs cellulaires modulés significativement à la fois par l’infection HCoV-229E et par KSRP. Le **tableau 16** résume la modulation de ces facteurs cellulaires dans chaque analyse « NGS », les fonctions cellulaires, l’implication potentielle dans le cycle de vie des virus, l’expression dans le tissu pulmonaire et la présence éventuelle de motifs riches en AU (« ARE ») au sein de leurs séquences ARN (ARE database).

Gène	NGS inf/NI	NGS siKSRP/siCtrl	Type de molécule	Fonctions	Rôles majeurs lors d’infections virales	Motifs « ARE »	Expression dans les MRC-5	Réfs
<i>SLC14A1</i>	Sous-exprimé	Surexprimé	Protéine (UTB)	• Transport de l’urée	• Aucun décrit actuellement	Non	-	[251]
<i>INSC</i>	Sous-exprimé	Surexprimé	Protéine (INSC)	• Contrôle la différenciation asymétrique des neuroblastes	• Aucun décrit actuellement	Oui	-	[252]

F2RL1	Sous-exprimé	Surexprimé	Protéine (PAR-2)	<ul style="list-style-type: none"> Récepteur lié à la modulation de la réponse inflammatoire et à l'immunité innée et adaptative 	<ul style="list-style-type: none"> Améliore la réplication du virus HSV1 Entraîne une dysfonction dans la myocardite liée au virus Coxsackie B3 Protège des infections IAV 	Oui	+	[253, 254] [255]
KCNN2	Sous-exprimé	Surexprimé	Protéine (KCNN2)	<ul style="list-style-type: none"> Canal Potassium dépendant du Calcium 	<ul style="list-style-type: none"> Aucun décrit actuellement 	Oui	+	[256]
NGF	Sous-exprimé	Sous-exprimé	Protéine (NGF)	<ul style="list-style-type: none"> Contrôle la prolifération, la croissance, le maintien de l'état différencié et la survie de certains neurones 	<ul style="list-style-type: none"> Inhibe les Th2 et protège de l'infection RSV Rôles multiples lors de l'infection par HSV-1 et -2 	Non	-	[257]
PDE3A	Surexprimé	Sous-exprimé	Protéine (PDE3A)	<ul style="list-style-type: none"> Rôle dans la contractilité du cœur et des muscles Rôle dans la fertilité 	<ul style="list-style-type: none"> Aucun décrit actuellement 	Non	+	[258]
LINC00473	Surexprimé	Sous-exprimé	LincARN	<ul style="list-style-type: none"> Rôle dans la décidualisation Participe au phénotype thermogénique des tissus adipeux 	<ul style="list-style-type: none"> Aucun décrit actuellement 	Non	-	[259]
HTR2A	Surexprimé	Sous-exprimé	Protéine (5-HT2A récepteur)	<ul style="list-style-type: none"> Récepteur de la sérotonine 	<ul style="list-style-type: none"> Aucun décrit actuellement 	Non	-	[260]
TESC	Surexprimé	Sous-exprimé	Protéine (Tescalcine)	<ul style="list-style-type: none"> Participe à la régulation osmotique des cellules Participe à la différenciation cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> Aucun décrit actuellement 	Non	+	[261]
HSPA6	Surexprimé	Sous-exprimé	Protéine (HSP70)	<ul style="list-style-type: none"> Protéine chaperonne impliquée dans de multiples processus cellulaires (transport, réponse au stress) 	<ul style="list-style-type: none"> Impliquée dans le cycle viral de nombreux virus dont HBV, ZIKV, HIV-1, EBV e 	Non	NC	
LINC00161	Surexprimé	Sous-exprimé	linCARN	<ul style="list-style-type: none"> Impliqué dans l'apoptose dans le cas d'ostéosarcome 	<ul style="list-style-type: none"> Aucun décrit actuellement 	Non	-	[262]
PPARGC1A	Surexprimé	Sous-exprimé	Protéine (PGC-1 α)	<ul style="list-style-type: none"> Rôle dans le métabolisme énergétique et dans la biogénèse des 	<ul style="list-style-type: none"> Impliquée dans la réplication des virus HBV, HCV 	Non	+	[263-265]

mitochondries								
FGF10	Surexprimé	Sous-exprimé	Protéine (FGF10)	<ul style="list-style-type: none"> • Croissance cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Application thérapeutique dans le cas d'infection à virus Influenza 	Non	+	[266]
TMEM100	Surexprimé	Sous-exprimé	Protéine (TMEM100)	<ul style="list-style-type: none"> • Morphogénèse cardiaque, développement vasculaire, contrôle de la douleur 	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun décrit actuellement 	Non	++	[267, 268]
RGCC	Surexprimé	Sous-exprimé	Protéine (RGCC)	<ul style="list-style-type: none"> • Régule le cycle cellulaire après induction par p53 	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun décrit actuellement 	Non	+++	[269]
RASL11A	Surexprimé	Sous-exprimé	Protéine (RasL11a)	<ul style="list-style-type: none"> • Modulateur des pré-ARNr et des ADNr 	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun décrit actuellement 	Non	+	[270]
RCAN2	Surexprimé	Surexprimé	Protéine (Calcipressine-2)	<ul style="list-style-type: none"> • Régule la voie Calcineurine/NFAT par inhibition de la calcineurine 	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun décrit actuellement 	Oui	+	
ANKRD33	Surexprimé	Surexprimé	Protéine (PANKY)	<ul style="list-style-type: none"> • Co-facteur de transcription inhibe l'activité « DNA-binding » de CRX (facteur de transcription) 	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun décrit actuellement 	Non	-	[271]
KDR	Surexprimé	Surexprimé	Protéine (VEGFR2)	<ul style="list-style-type: none"> • Récepteur au VEGF 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmente la sévérité de l'infection par le virus de la Dengue • Hyperperméabilisation au VEGF lors de l'infection Hantaan-Virus • Polarise les cellules endothéliales dans le cas du VIH par formation du complexe VEGFR2/Intégrine • Participe au processus d'angiogénèse induit par le poliovirus • Rôle anti-inflammatoire contre l'infection HSV-1 	Oui	++	

Tableau 16 : Facteurs cellulaires modulés, communs aux deux analyses NGS. Le tableau regroupe la modulation dans chaque analyse « NGS total RNA », le type de molécule, les fonctions cellulaires

de ces facteurs, les liens avec une ou plusieurs infections virales, la présence de séquence(s) riche en AU et enfin leur niveau d'expression dans le poumon.

Parmi ces facteurs, 17 codent des protéines et 2 sont des ARN non-codants de type lncARN (LinC00473 et LinC00161). Ces éléments sont majoritairement modulés dans la condition infectée vs non-infectée. Nous avons évalué l'expression des lncARNs dans le « NGS total RNA » infecté vs non-infecté (**tableau 17**).

Regulation	Ensembl ID	Quantité relative (en Log2)	Adj.Pval	Symbole	Chr	Type
Surexprimé	ENSG00000223414	9.80992491355581	3.09e-09	LINC00473	6q27	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000226935	5.94668482723928	3.09e-08	LINC00161	21q21.3	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000281832	4.7182058095966	1.54e-05	LINC00602	6q27	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000188660	2.65971134230311	1.07e-02	LINC00319	21q22.3	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000234880	2.60884640851172	7.60e-04	LINC00163	21q22.3	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000258667	2.28785792611372	9.12e-03	HIF1A-AS2	14q23.2	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000229236	2.05563855984131	1.83e-03	TTY10	Yq11.223	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000233220	1.61465354605604	1.72e-02	LINC00167	11q24.3	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000266904	1.29610617894395	4.51e-04	LINC00663	19p13.11	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000221953	1.11631846915943	1.51e-02	C1orf229	1q44	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000245532	1.06890565413336	4.78e-05	NEAT1	11q13.1	lincRNA
Surexprimé	ENSG00000268388	1.02169205788637	6.79e-09	FENDRR	16q24.1	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000197182	-1.00939793319686	1.40e-04	MIRLET7BHG	22q13.31	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000235770	-1.22523371031053	3.00e-02	LINC00607	2q35	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000214548	-1.32071494475281	9.72e-07	MEG3	14q32.2	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000234883	-1.4002164401723	1.23e-03	MIR155HG	21q21.3	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000198468	-1.41034448340411	1.26e-03	FLVCR1-AS1	1q32.3	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000223403	-1.58156719246826	7.70e-06	MEG9	14q32.31	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000230417	-2.1556381286595	7.90e-04	LINC00856	10q22.3	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000230417	-2.1556381286595	7.90e-04	LINC00595	10q22.3	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000228221	-2.15726663108705	4.00e-05	LINC00578	3q26.32	lincRNA
Sous-exprimé	ENSG00000260910	-2.45543826159408	1.08e-06	LINC00565	13q34	lincRNA

Tableau 17 : Modulation des lincRNAs à 24h d'infection obtenue par analyse NGS sur de l'ARN total. Les lincRNAs dont la modulation est supérieur à 2 fold change sont représentés en rose, ceux inférieur à 2 fold change sont représentés en bleu.

En rose, sont représentés les lncARNs dont la modulation de l'expression est supérieure à un facteur 2-fois. En bleu, sont représentés les lncARNs dont la modulation de l'expression est inférieure à un facteur 2-fois. Quatre lncARNs sont diminués d'un facteur supérieur ou égal à 2-fois. Sept lncARNs sont surexprimés, dont trois avec un facteur supérieur à 2-fois.

Le lncARN dont la surexpression est la plus importante est le LinC00473 avec un facteur d'augmentation supérieur à 9-fois. Aucun lncARN n'ayant été décrit dans le cas de l'infection par les Coronavirus nous avons voulu étudier l'impact de la surexpression du LinC00473 au cours de l'infection ainsi que rôle de KSRP sur le contrôle de l'expression de ce lncARN.

Rôle du LinC00473 sur la réplication de la souche HCoV-229E

Dans un premier temps, nous avons vérifié les résultats obtenus en séquençage à haut débit (« NGS total RNA ») sur l'expression du LinC00473. Des cellules MRC-5 ont été infectées à la M.O.I. de 1 avec la souche HCoV-229E pendant 24 h et 48 h puis l'expression des deux isoformes existantes pour ce lncARN ainsi que celle du virus ont été analysées par RT-qPCR (Figure 46).

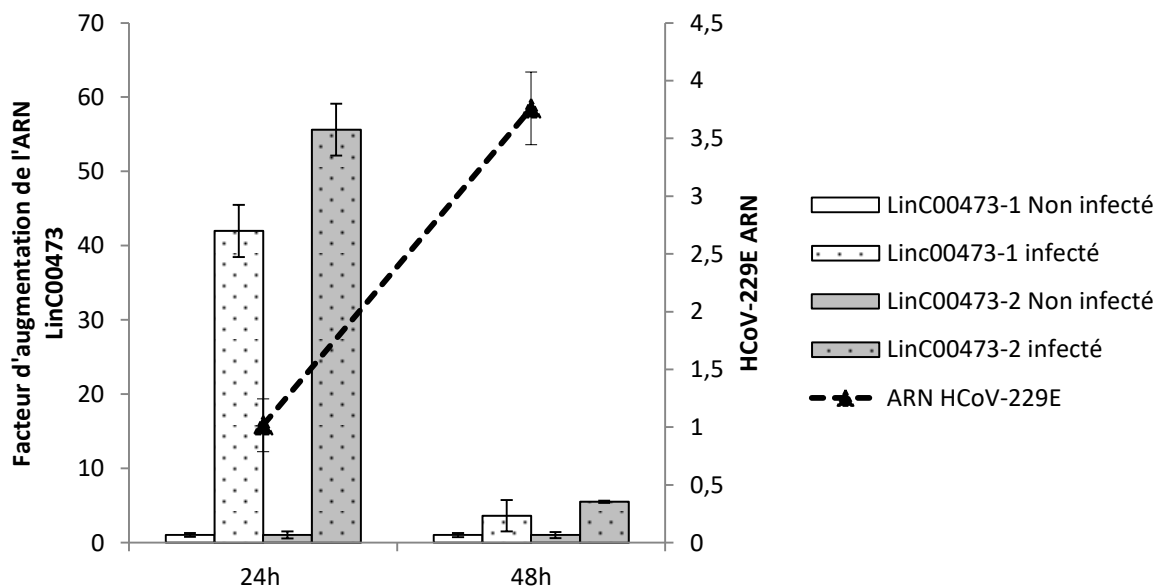


Figure 46 : Analyse de l'expression du LinC00473 et de l'ARN viral au cours de l'infection. Des cellules MRC-5 ont été infectées pendant 24 h ou 48 h avec la souche HCoV-229E puis l'expression du linC00473 (isoformes 1 et 2) et de la réplication ont été mesurées à chaque temps par RT-qPCR. L'expression du LinC00473 a été normalisée par la GAPDH et exprimée par rapport à la condition non-infectée. L'ARN HCoV-229E a été normalisé par la GAPDH et exprimée par rapport à 24 h d'infection.

A 24 h, l'expression du LinC00473 (isoforme 1 et 2) est augmentée de plus d'un facteur 42-fois et 55-fois, respectivement, dans la condition infectée par rapport à la condition non-

infectée. A 48 h, on observe une diminution de l'expression de chaque isoforme du LinC00473 d'un facteur 10-fois et une augmentation de la réplication virale d'un facteur 4-fois. Ces résultats confirment les quantifications obtenues lors de l'analyse « NGS total RNA » et suggèrent que ce facteur serait impliqué dans le cycle de vie du virus 24 h post-infection.

Nous avons cherché à déterminer si ce lncARN était un facteur cellulaire dont l'expression serait altérée par l'infection par HCoV-229E. Nous avons infecté des cellules MCR-5 à différentes M.O.I., la dilution 1/5 du virus correspondant à une M.O.I. de 1. Nous avons ensuite analysé l'expression de chaque isoforme de LinC00473 à 24 h et 48 h post-infection (Figure 47).

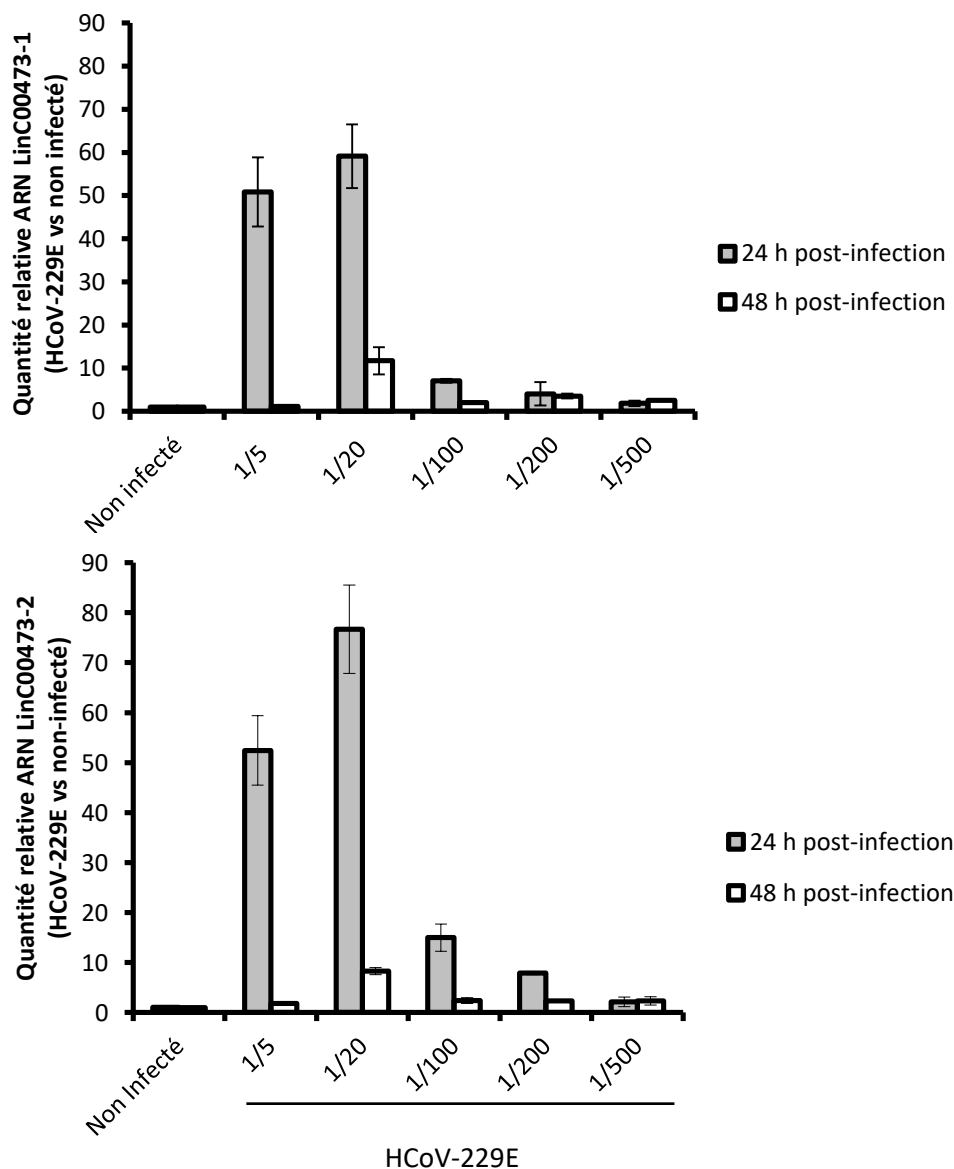


Figure 47: L'expression de LinC00473-1/2 est induite 24 h post-infection par HCoV-229E. Des cellules MRC-5 ont été infectées à différentes M.O.I. pendant 24h et 48h puis l'expression du LinC00473-1 et LinC00473-2 ont été mesurées par RT-qPCR, après normalisation avec la GAPDH et comparées à la condition non-infectée.

A 24 h post-infection nous pouvons voir une augmentation de l'expression du LinC00473 (isoforme 1 et 2) dans les cellules infectées à des M.O.I. de 1 ($1/5^{\text{ème}}$), 0.25 ($1/20^{\text{ème}}$) et 0.05 ($1/100^{\text{ème}}$), cette augmentation est peu significative pour des infections à des M.O.I. plus faibles, notamment 0.025 ($1/200^{\text{ème}}$) et 0.01 ($1/500^{\text{ème}}$).

A 48 h post-infection, l'expression des deux isoformes de LinC00473 diminue d'un facteur 25-50-fois pour l'infection à M.O.I. de 1, d'un facteur 5-10 fois pour la condition M.O.I. de 0.25, et d'un facteur peu significatif pour la condition M.O.I. de 0.025. Aucun changement d'expression des isoformes de LinC00473 n'est observable entre les points 24 h et 48 h pour l'infection à une M.O.I. de 0.01. L'induction de l'expression de ce lncARN semblerait dépendante de la quantité de particule virale présente dans le milieu lors de l'infection et/ou de la réplication.

Afin de mieux comprendre l'impact du linC00473 sur la réplication virale nous avons inhibé son expression par transfection de siARN. La transfection a été faite dans des MRC-5 non-infectée avec 5 μ M de siARN afin de vérifier son efficacité sur les deux isoformes de LinC00473.

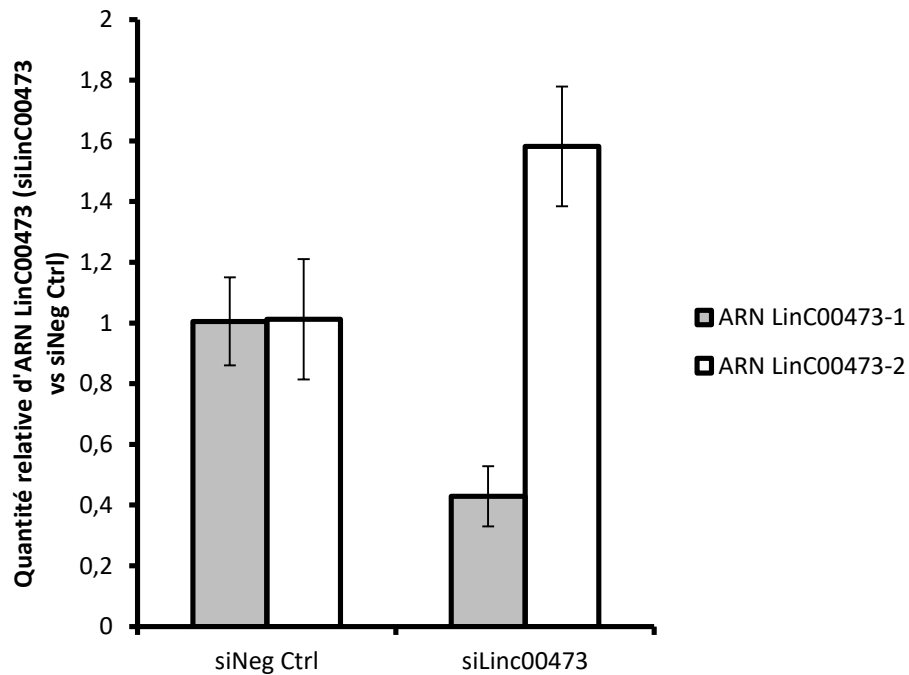


Figure 48 : Inhibition de l'expression du LinC00473 par transfection de siARN. Des cellules MRC-5 ont été transfectées avec un siLinC00473 et l'expression de chaque isoforme du LinC00473 a été mesurée par RT-qPCR à 72h post-transfection, normalisée par rapport à la GAPDH, et exprimée par rapport à la condition siNeg Ctrl.

L'expression des isoformes de LinC00473 est représentée sur la **Figure 48**. Dans la condition non-infectée, on observe une diminution d'environ 60% de la quantité d'ARN LinC00473-1, mais aucune réduction de l'expression de LinC00473-2 à 72h post-transfection, par rapport au siNeg Ctrl. La diminution de l'expression est significative uniquement dans le cas de l'isoforme 1 du LinC00473, et la transfection de ce siARN ne pourra pas permettre d'étudier le rôle de LinC00473-2 dans le cycle de vie de HCoV-229E.

Afin d'évaluer le rôle de linC00473-1 dans le cycle viral, le siARN précédemment testé a été transfecté dans des cellules MRC-5 qui, 24 h post-transfection, ont été infectées avec la souche HCoV-229E pendant 48 h à deux M.O.I. différentes: 1 et 0.25.

L'expression du LinC00473-1 ainsi que la réplication virale ont été analysées par RT-qPCR et sont représentées sur la **Figure 49**.

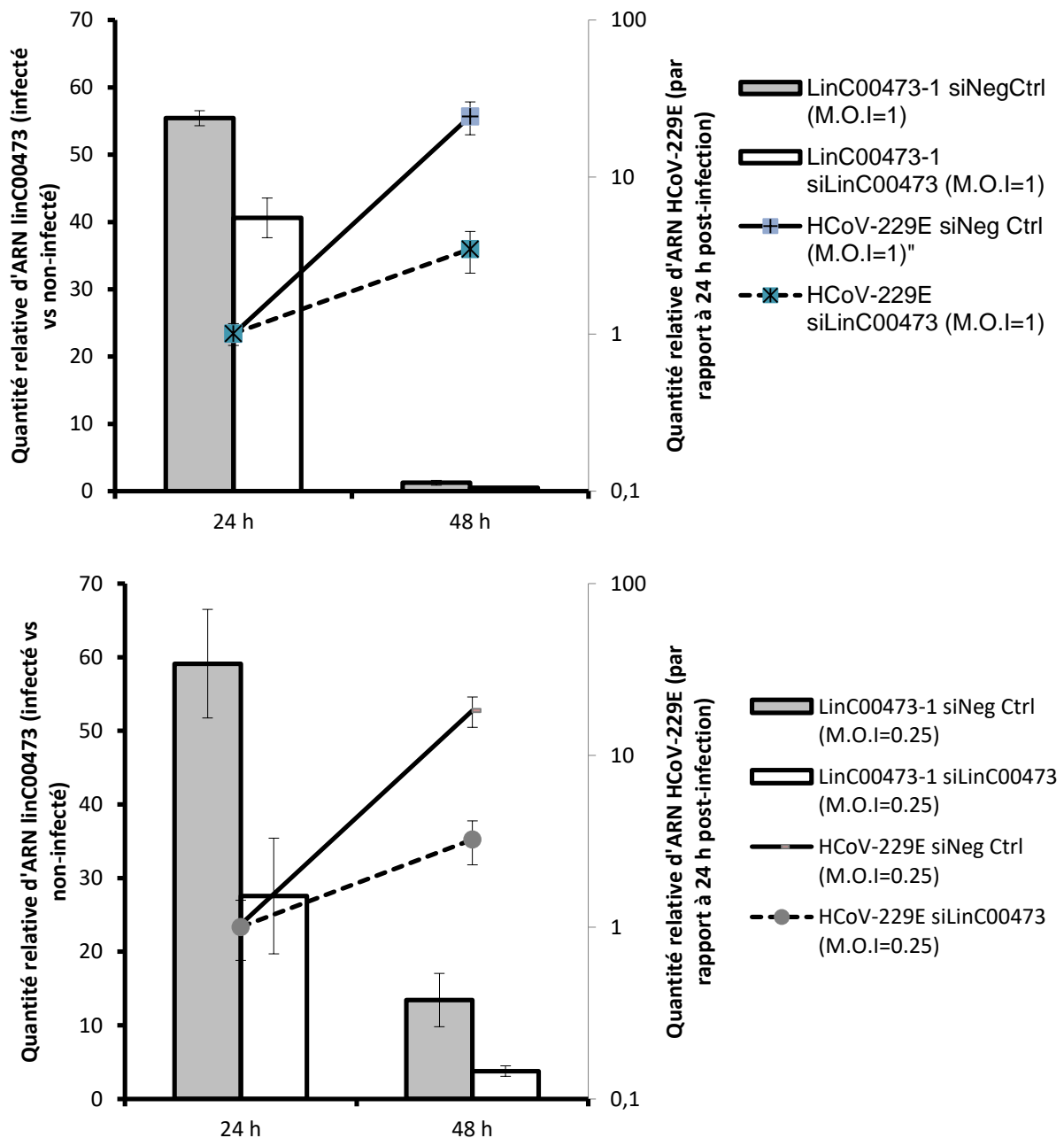


Figure 49: Effet du siLinC00473 sur la réplication virale. Suite à la transfection du siLinC00473 des cellules MRC-5 ont été infectées avec deux M.O.I différentes (1 et 0.25) puis l'expression du LinC00473 et de la réplication virale a été mesurée par RT-qPCR. Les résultats ont été normalisés par la condition non-infectée.

A 24h post-infection, la transfection de siLinC00473-1 entraîne une diminution de l'induction viro-induite du LinC00473-1 à M.O.I=1 (environ 30%) et M.O.I=0.25 (environ 55%). Cet effet se traduit par une diminution de la réplication virale à 48h post-infection, indiquant que ce LncARN est un facteur proviral pour le HCoV-229E.

3- Rôle de KSRP sur l'expression du LinC00473

L'analyse « NGS total RNA » dans les MRC-5 infectées pendant 24 h par la souche HCoV-229E et préalablement traitées avec un siKSRP, a montré que l'expression du LinC00473 était diminuée en absence de KSRP. Nous avons donc cherché à déterminer si KSRP pouvait avoir un rôle sur l'expression de ce lncARN.

Des cellules MRC-5 ont été transfectées avec le siKSRP^e ou un siNeg Ctrl puis infectées avec la souche HCoV-229E à une M.O.I. de 1 pendant 24 h, 48 h et 72 h. L'expression du LinC00473 et de l'infection virale ont été mesurées par RT-qPCR et représentées dans la **Figure 50a**. L'inhibition de l'expression de KSRP a été mesurée par western blot à 24 h, 48 h et 72 h post-infection et est représentée **Figure 50b**.

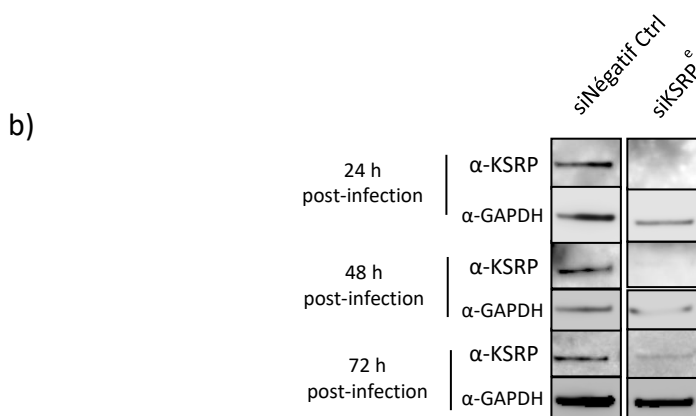
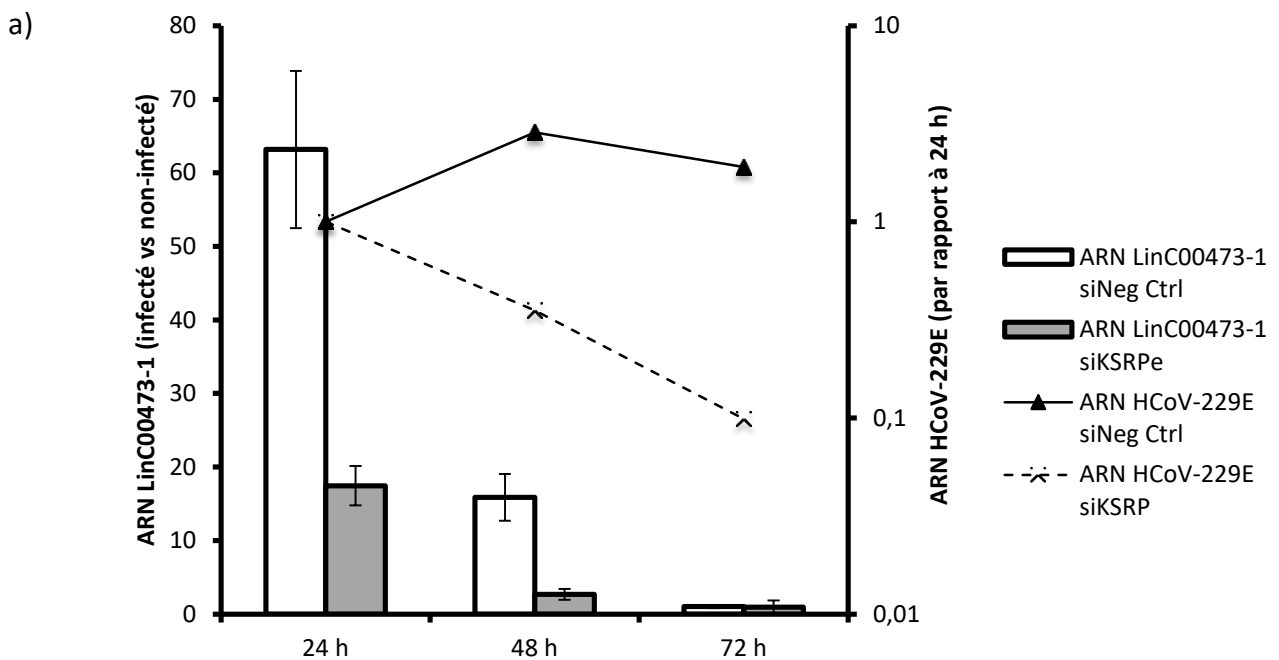


Figure 50 : Rôle de KSRP sur l'expression du LinC00473 au cours de l'infection virale. a) L'expression de KSRP a été éteinte par transfection de siARN (siKSRP^e) dans des cellules MRC-5 pendant 24 h, puis les cellules ont été infectées pendant 24 h, 48 h et 72 h. L'expression du linC00473 et de l'ARN viral ont été mesurées par RT-qPCR, normalisées avec la GAPDH et comparée à la condition siNeg Ctrl. b) L'inhibition de l'expression de KSRP endogène a été mesurée par RT-qPCR à 24 h, 48 h et 72 h post-infection en utilisant un anticorps dirigé contre KSRP et un anticorps dirigé contre la GAPDH utilisée comme contrôle.

A 24 h post-infection, soit 48 h post-transfection de siARN, on observe une augmentation de l'expression du LinC00473-1 d'un facteur 63-fois, comparée à la condition non-infectée, puis une diminution de l'expression au cours du temps, comme observé précédemment (**Figure 49**). Dans la condition siKSRP, l'augmentation de l'expression du LinC00473-1 induite par l'infection est fortement limitée (17-fois au lieu de 63-fois à 24 h post-infection et 2.7-fois au lieu de 16-fois à 48 h post-infection). Ces résultats suggèrent que la présence de KSRP est nécessaire pour l'induction de l'expression du facteur proviral LinC00473-1.

De plus, nous observons, comme démontré précédemment, une diminution de la quantité d'ARN HCoV-229E au cours du temps, dans la condition siKSRP^e par rapport au siNeg Ctrl.

Ces résultats suggèrent que la fonction provirale de KSRP lors de l'infection HCoV-229E pourrait être liée à un rôle de cette protéine qui favoriserait l'expression de LinC00473-1. Pour évaluer cette hypothèse nous avons réalisé une immunoprécipitation d'ARN en utilisant un anticorps anti-KSRP et en mesurant l'expression du LinC00473-1 dans des cellules MRC-5 infectées pendant 24 h par HCoV-229E, au moment de l'induction de l'expression de ce lncARN.

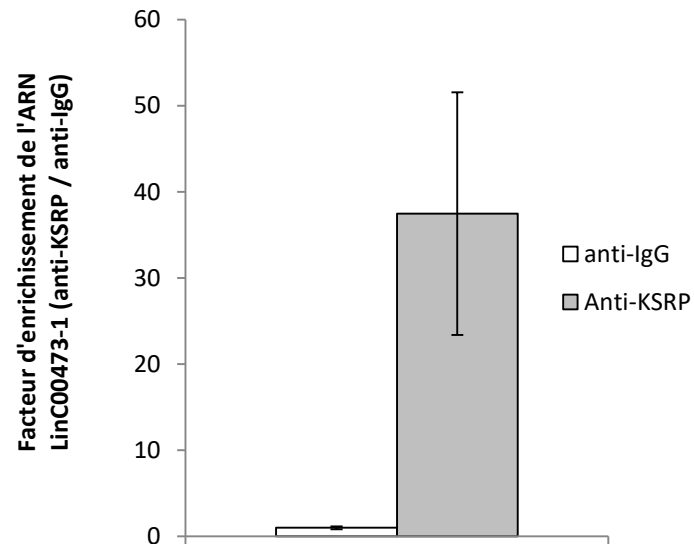


Figure 51 : Quantification de l'interaction directe entre KSRP et l'ARN LinC00473-1 par Immunoprécipitation d'ARN. L'ARN immunoprécipité a été quantifié par RT-qPCR, normalisé par rapport à l'INPUT (ARN total, avant immunoprécipitation) et comparé à l'IgG.

L'interaction directe de KSRP pour le LinC00473 a été représentée sur la **figure 51**. Nous pouvons voir que dans la condition infectée, KSRP interagit directement avec l'ARN LinC00473-1 avec un facteur d'enrichissement de 37-fois par rapport à l'IgG contrôle. Cette interaction directe entre KSRP et l'ARN LinC00473 renforce nos résultats précédents et l'hypothèse du contrôle de l'expression de ce lncARN proviral par KSRP au cours de l'infection par HCoV-229E.

Discussion

Ces dernières années, l'émergence et/ou la ré-émergence de nombreuses infections virales ont particulièrement inquiété la communauté scientifique. Les virus HIV, HCV et HBV ont été à l'origine de nombreux décès depuis leurs découvertes et malgré des avancées thérapeutiques majeures, restent encore une cause de morbidité et de mortalité importante. Plus récemment, de nouvelles infections virales, telles que l'épidémie de MERS en 2012 dans la péninsule arabique, ont attiré l'attention des chercheurs. En effet, ces nouvelles infections sont pour la plupart orphelines de traitements spécifiques et sont donc difficiles à contrôler et à éradiquer.

Le développement d'antiviraux directs ou indirects a montré une grande efficacité avec comme exemples, le développement d'antiviraux HCV-spécifiques ayant entraîné une guérison quasi-totale des patients ou encore le contrôle de la virémie chez les patients séropositifs du VIH. Néanmoins, le développement d'antiviraux spécifiques est un processus long et extrêmement coûteux. Afin d'optimiser d'un point de vue financier le processus de développement de nouveaux antiviraux et le nombre de virus ciblés par ces derniers, la communauté scientifique s'oriente vers une approche pan-virale, avec des molécules pouvant toucher plusieurs virus au sein d'une même famille virale ou encore des virus de familles différentes. L'intérêt de telles molécules est donc une couverture virale majeure et une diminution du coût de production.

Cependant, le développement de nouvelles thérapeutiques pan-virales nécessite, en amont, la compréhension des mécanismes moléculaires utilisés à la fois par le virus et par l'hôte qui influencent l'infection virale.

L'étude des fonctions des ARN non-codants constitue une approche de choix dans cette stratégie antivirale car une molécule d'ARN non-codant peut réguler de nombreux gènes cellulaires. De plus, de nombreuses études ont montré l'importance des ARN non-codants au cours de différentes pathologies, dont les infections virales. Parmi les ARN non-codants, les acteurs les plus étudiés sont les microARNs. Ce sont de petits d'ARN d'environ 22 nucléotides dont la complémentarité pour leurs cibles entraîne l'arrêt de la traduction et/ou la dégradation de l'ARN. Ils ont été décrits dans de nombreuses infections virales. Ils peuvent participer à la réponse antivirale médiée par la cellule ou bien être détournés par le virus

afin d'améliorer son cycle de vie. Les virus ont également la capacité de produire leurs propres microARNs.

Les lncARNs font également parti de la famille des ARN non-codants. Leurs fonctions cellulaires sont variées et toujours en cours de description et leurs implications dans le cycle de vie des virus encore peu connues.

Le travail de ma thèse a porté sur l'étude des ARN non-codants au cours de l'infection par le virus de l'Hépatite C ou par la souche HCoV-229E des Coronavirus. Cette étude a également porté sur la régulation viro-induite de la protéine cellulaire KSRP dans le contrôle de l'expression de ces ARN non-codants. Cette « RNA-binding protein » ubiquitaire a été décrite pour son rôle dans l'épissage des ARN, dans la dégradation des ARNm « ARE » et enfin dans la maturation de certains microARNs.

I- La phosphorylation viro-induite de la protéine KSRP en S193 promeut la maturation du miR-122 proviral

La première partie de mon travail a porté sur l'étude de la maturation du miR-122 au cours de l'infection par le virus de l'hépatite C. Nous avons montré que la protéine KSRP participait à la maturation de ce microARN, essentiel à la réplication du VHC. Plus particulièrement, nous avons proposé un modèle de la régulation de la maturation de miR-122 au cours de l'infection par le VHC. Dans ce modèle, la phosphorylation viro-induite de KSRP en S193 par Akt est essentielle pour la formation du complexe tripartite KSRP - pri-miR-122- DROSHA permettant la maturation du pri-miR-122 vers le pré-miR-122. De fait, au cours de l'infection VHC, l'hyper-phosphorylation d'Akt induite par le virus entraîne la phosphorylation de KSRP en S193, sa localisation nucléaire et augmente son interaction pour DROSHA et pour le pri-miR-122. La protéine KSRP est donc un facteur proviral pour l'infection VHC. Ces résultats sont actuellement en cours de soumission.

Notre étude s'est focalisée sur la maturation de la forme primaire du miR-122, le pri-miR-122, néanmoins il n'est pas exclu que KSRP puisse également participer à la maturation du pré-miR-122 dans le cytoplasme. Il a été montré par Trabucchi et *al* que KSRP pouvait participer à la maturation de certains pré-miARN dans le cytoplasme en interagissant de manière directe avec la protéine DICER. Il faut néanmoins noter que l'étude spécifique des pré-miARNs est difficile à cause des séquences communes retrouvées avec le pri-miARN et

également avec le miARN mature. L'utilisation de la technique de Northern blot pourrait permettre de discriminer les formes pri-miR-122, pré-miR-122 et miR-122 mature par leur différence de taille.

Si nous avons montré que la phosphorylation de S193-KSRP par Akt était essentielle pour la maturation du pri-miR-122, il serait également intéressant d'étudier l'impact de la phosphorylation de KSRP par les kinases cellulaires ATM et p38/MAPK au cours de l'infection.

II- La phosphorylation de KSRP en T692 influence la maturation de miR-122, la réplication virale ainsi que la localisation de la protéine

La deuxième partie de mon travail a donc porté sur l'étude du rôle des autres résidus phosphorylables de KSRP. Comme dit précédemment, KSRP peut être phosphorylée par les kinases ATM et p38/MAPK sur les sérines 132, 274 et 670 ainsi que sur la thréonine 692.

Les voies ATM et p38/MAPK sont activées au cours de l'infection [272, 273]. En effet, une des conséquences liée à l'infection virale est la formation de dommages sur la structure de l'ADN [274]. En réponse à ce stress, le processus cellulaire de réparation des dommages à l'ADN est activé et fait intervenir la voie ATM, majoritairement nucléaire. L'activation de ce processus lors de l'infection pourrait permettre la phosphorylation de KSRP par ATM et la maturation de certains microARNs spécifiques [174]. La voie p38/MAPK est également activée au cours de l'infection. Cette voie de signalisation est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire entre les phases G1/S et G2/M, dérégulées par l'infection et plus particulièrement par la séquestration de la cycline B1 par la protéine structurale core [272]. La voie p38/MAPK est également impliquée dans l'activation du facteur NF- κ B et donc dans la production de nombreuses cytokines responsables de la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire. L'activation de ces deux voies au cours de l'infection peut entraîner la phosphorylation de KSRP et peut participer au contrôle de sa localisation et de sa fonction.

Afin d'étudier le rôle de ces phosphorylations nous avons développé une banque de plasmides mutés sur chaque résidu substrat d'Akt, d'ATM et/ou de p38/MAPK en alanine ou en aspartate mimant un état non-phosphorylé ou, au contraire phospho-mimétique,

respectivement. Nous avons également généré des constructions plasmidiques portant des mutations sur plusieurs résidus afin d'étudier les combinaisons de phosphorylation et de déterminer le profil de phosphorylation de KSRP responsable de son activité provirale

De plus, nous avons choisi des siARNs ciblant spécifiquement la partie 3'-NC de l'ARNm de KSRP, non retrouvée dans la séquence des plasmides, afin de diminuer l'expression de la protéine KSRP endogène et d'étudier spécifiquement l'effet de la transfection des plasmides mutants sur la réplication virale et la maturation de miARNs. La transfection de siKSRP^e entraîne une diminution significative de la quantité de protéine à 96 h post-transfection. Ce mélange de trois siARNs a été utilisé pour l'étude du rôle des phosphorylations de KSRP au cours de l'infection VHC dans les cellules Huh7.5.1 mais également pour la troisième partie de ce travail, portant sur l'étude des ARN non-codants et du rôle de KSRP au cours de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus.

Nous avons décidé d'étudier le rôle de chaque résidu phosphorylable de KSRP en réalisant un « alanine-scanning ». Ainsi, chaque plasmide contenant la séquence de KSRP avec un ou plusieurs résidu(s) phosphorylable(s) muté en alanine, était transfecté dans des hépatocytes préalablement traités avec le siKSRP^e. Ces cellules ont ensuite été infectées et récoltées sur trois points de cinétique à 8 h, 24 h et 48 h post-infection (**Figure 35a-f**). La réplication virale et l'expression de miR-122 ont été mesurées par RT-qPCR.

Nos résultats montrent que la transfection du pKSRP-HA dans un contexte siKSRP^e rétablit la réplication virale et l'expression de miR-122 à des niveaux équivalents de ceux observés avec la protéine KSRP endogène (**figure 35a et d**). Ainsi, la protéine KSRP-HA présente les mêmes caractéristiques que la protéine KSRP endogène quant à son rôle sur la réplication génomique du VHC et la maturation de miR-122.

Nous avons pu voir que la voie ATM semblait jouer un rôle dans la réplication génomique et la maturation de miR-122. En effet, la forme non-phosphorylable diminue significativement la réplication génomique et entraîne une réduction modeste de l'expression de miR-122 par rapport à la forme KSRP-HA. Ce fort effet antiviral pourrait donc s'expliquer en partie par une diminution de l'expression de miR-122, et/ou une autre fonction liée à la localisation cytoplasmique de cette protéine. Enfin, ces résidus substrats de la kinase ATM pourraient être impliqués dans la maturation d'autres microARNs.

Nos résultats montrent que l'expression exogène d'une protéine KSRP-T692A-HA, non-phosphorylable par la voie p38/MAPK, favorise la réplication virale de manière comparable à l'expression de la protéine KSRP-HA, mais entraînerait une diminution de la maturation (1.6-fois) de miR-122 à 48 h (**Figures 35**). Ainsi, la transfection de la protéine KSRP-T692A-HA dans un contexte siKSRP aurait un rôle proviral, tout en réduisant l'expression de miR-122 par un mécanisme qui reste à définir. On notera, que ce variant de KSRP, principalement nucléaire, possède une affinité moins importante pour le pri-miR-122 que la protéine KSRP-HA (59% de la référence) (**figure 37**).

Cependant, nos résultats montrent également que l'induction de l'expression de miR-122 à 24 h post-infection est équivalente à celle observée dans le cas de la transfection du plasmide pKSRP-HA. L'absence de corrélation entre la réplication génomique et la diminution de l'expression de miR-122 à 48 h post-infection devra être confirmée et complétée par des expériences supplémentaires.

D'après Briata et *al* la phosphorylation du résidu T692 entraîne une perte d'affinité de KSRP pour les ARN « ARE » [175]. Ceci est confirmé par les résultats obtenus **figure 38** montrant une diminution de l'interaction de KSRP-T692D-HA avec l'ARNm c-jun par rapport à KSRP-T692A-HA. L'ARN du VHC contient dans sa région 3'-NC une séquence poly(U) considérée comme un « ARE » et pourrait donc être sujet à la dégradation médiée par la fixation de RBPs telles que KSRP. La **figure 37** montre une interaction directe de KSRP-T692A-HA avec l'ARN du VHC et le pri-miR-122. Ces interactions sont diminuées dans le cas de l'étude de la protéine phospho-mimétique KSRP-T692D-HA.

Grâce à l'étude de la localisation subcellulaire des protéines KSRP-HA mutées, ainsi que de leur rôle sur la réplication virale et la maturation de miR-122, nous parvenons aux conclusions suivantes :

- Tous les variants de KSRP-HA qui présentent une localisation majoritairement nucléaire sont proviraux pour la réplication génomique.
- Tous les variants de KSRP-HA qui présentent une localisation majoritairement cytoplasmique sont antiviraux pour la réplication génomique.

- La localisation nucléaire des variants KSRP-HA pourrait limiter l'interaction avec l'ARN viral, les ARN « ARE » et permettre l'interaction avec le pri-miR-122.
- L'interaction nucléaire de KSRP-T692A-HA avec le pri-miR-122 semble favoriser la maturation vers le miR-122 à 24 h post-infection. La réduction de l'expression de miR-122 observée à 48 h ne corrèle pas avec une diminution de la réplication génomique. Ce rôle proviral de la forme KSRP-T692A-HA est à confirmer.
- La réduction de l'expression de miR-122 par l'expression exogène de KSRP-S132A-S274A-S670A-HA 48 h post-infection, corrèle avec une diminution de la réplication génomique et une localisation cytoplasmique qui pourrait limiter l'interaction avec le pri-miR-122 et/ou favoriser l'interaction avec l'ARN viral et/ou les ARN « ARE ».
- L'ajout de la mutation **S193A** dans un contexte KSRP-T692A a un effet potentialisateur négatif sur la maturation de miR-122 et la réplication génomique. Contrairement au mutant T692A, la transfection du double mutant **S193A-T692A** est antivirale par rapport au contrôle KSRP-HA ou à la transfection de plasmide exprimant la forme KSRP-T692A. L'ajout de la mutation **S193A** entraîne un changement de localisation de la protéine KSRP-T692A-HA qui devient majoritairement cytoplasmique (**Tableau 12**). La localisation de ce double mutant pourrait expliquer la diminution de la quantité de miR-122 et pourrait favoriser l'interaction avec l'ARN VHC, expliquant une forte inhibition de la réplication virale.
- La forme de KSRP non-phosphorylable sur l'ensemble des résidus substrats d'Akt, ATM et p38/MAPK montre une diminution de la réplication génomique significativement plus importante que dans la condition siKSRP - pCMV ctrl (**figure 35c**), c'est-à-dire en l'absence de KSRP. On notera que dans ces deux conditions la réduction de l'expression de miR-122 est équivalente (**figure 35f**). Cet effet négatif sur la réplication génomique, indépendamment de la réduction de l'expression de miR-122, suggère l'existence d'un mécanisme antiviral additionnel qui reste à être défini.

Ces résultats renforcent l'hypothèse que lors de l'infection, la localisation nucléaire de KSRP limite toute interaction directe avec les ARN « ARE » et l'ARN viral et donc réduit leur dégradation.

Chaque voie a été étudiée indépendamment les unes des autres puis en combinaison. Nous avons, dans le cadre de « l'alanine-scanning » créé des plasmides exprimant des protéines non-phosphorylables mutées sur les sites de phosphorylation cibles des voies Akt/ATM et Akt/p38/MAPK.

Nous avons pu constater que l'ajout de la mutation en **S193A** sur les constructions non-phosphorylables par les voies ATM et p38/MAPK diminuait la réplication virale mais également la maturation de miR-122. Ce résidu semble devoir, au cours de l'infection, être phosphorylé par Akt pour que KSRP puisse jouer son rôle de facteur proviral.

Nous en avons donc déduit que la **S193** était un résidu essentiel et dominant sur les autres résidus, que la phosphorylation des résidus **S132**, **S274** et **S670** par ATM semblait être impliquée dans la réplication virale et modestement dans la maturation de miR-122, que la forme KSRP-**T692**-HA semblait devoir être non-phosphorylée et la nucléaire pour avoir un effet positif sur la réplication génomique. Enfin, la forme de KSRP non-phosphorylée pour les résidus substrats pour Akt, ATM, p38/MAPK est un facteur antiviral pour le cycle de vie du VHC à la fois par un défaut de maturation de miR-122 et un rôle cytoplasmique direct/indirect sur le VHC restant à définir.

Ces résultats ont été résumés **figure 52** dans un modèle schématisant le rôle des formes KSRP-**S193** endogène, KSRP-**T692A**-HA, KSRP-**S193A**-HA et KSRP-**S193A-T692A**-HA sur la réplication virale et sur la maturation de miR-122. Cette figure résume également les points à éclaircir afin de comprendre les mécanismes permettant au virus de moduler l'expression de KSRP et de ce fait l'expression de miR-122 et sa propre réplication virale.

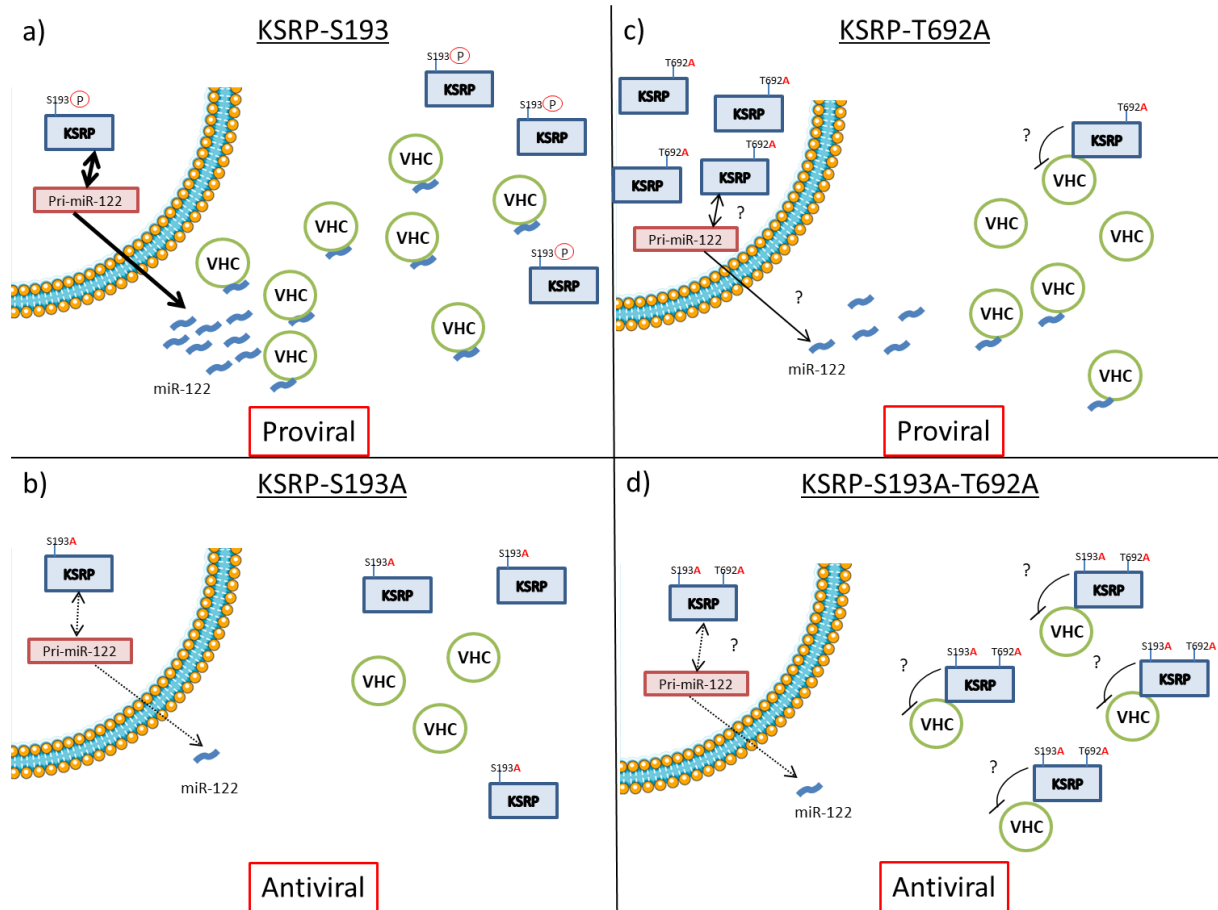


Figure 52 : Modèle schématique résumant les résultats obtenus sur les résidus S193 et T692. a) En condition d'infection, KSRP est phosphorylée par Akt sur le résidu **S193** ce qui entraîne une augmentation de l'affinité pour le pri-miR-122 nucléaire et une augmentation de la maturation en miR-122 nécessaire à la réplication virale. b) La mutation en alanine du résidu **S193** de KSRP relocalise la protéine au cytoplasme diminuant l'expression du miR-122 mature et la réplication virale. c) La forme KSRP-**T692A**-HA est majoritairement nucléaire ce qui peut empêcher son interaction avec l'ARN viral et donc sa dégradation. Elle peut interagir avec le pri-miR-122 mais son action favorisant la maturation reste à être caractérisée. d) La forme KSRP-**S193A-T692A**-HA est antivirale pour la réplication et pour la maturation du miR-122. Son interaction avec le pri-miR-122 est limitée du fait de sa localisation cytoplasmique et son rôle sur l'ARN viral reste à être défini.

Afin de déterminer précisément le ou les profils de phosphorylation de KSRP au cours de l'infection, il serait nécessaire d'effectuer des expériences de spectrométrie de masse, en utilisant des extraits protéiques KSRP-HA à différents temps d'infection. Cette technique permettrait de nous donner les différents profils de phosphorylation de KSRP présents au cours de l'infection, et plus particulièrement le profil majoritaire et dominant, expliquant le caractère proviral de cette protéine.

La suite de ce travail sera de confirmer nos hypothèses en construisant des combinaisons de mutants en Alanine et/ou en Aspartate sur les différents résidus (notamment S193 et T692),

d'étudier leur localisation et leur rôle sur la réplication et la maturation des microARNs. La construction de ces combinaisons est actuellement en cours.

De plus, en dehors de l'étude du profil de phosphorylation, il serait intéressant d'étudier la conformation spatiale de la protéine. En effet, il a été montré dans la littérature par plusieurs équipes que la conformation spatiale de KSRP, et plus particulièrement des domaines KH, déterminait l'interaction de la protéine avec ses cibles [275]. La phosphorylation des différents résidus pourrait également participer à ces changements de conformation et donc au choix des éléments cellulaires et/ou viraux interagissant avec KSRP. Enfin, des changements de conformation spatiale de la protéine pourraient expliquer la capacité de certains résidus à être phosphorylé ou non, et le rôle « dominant » de la phosphorylation en S193.

Le miR-122 est le microARN majoritaire des hépatocytes et le premier exemple de microARN proviral. Son étude est donc essentielle pour pouvoir développer des molécules thérapeutiques contre ce facteur. Néanmoins, de nombreux microARNs cellulaires ont été décrits comme jouant un rôle antiviral contre le VHC [163]. Leur maturation serait intéressante à étudier afin de voir si KSRP y participe et peut avoir un rôle antiviral lors de l'infection.

Cette protéine ne peut pas directement servir de cible thérapeutique de par son spectre d'action au sein de la cellule mais peut être un outil pour découvrir de nouveaux ARNs pro-et/ou antiviraux.

III- Etude du rôle de la protéine KSRP et de son rôle dans le contrôle de l'expression des ARN non-codants lors de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus

La troisième partie de ma thèse a porté sur l'étude des ARN non-codants au cours de l'infection par la souche modèle HCoV-229E des Coronavirus. Cette famille de virus à ARN simple brin de polarité positive, est responsable d'infections des voies respiratoires et est à l'origine de deux épidémies causées par les souches SARS-CoV en 2003 et MERS-CoV en 2012. Il n'existe pas de traitement thérapeutique contre ces virus malgré une mortalité avoisinant les 35% pour le MERS-CoV.

Actuellement, peu d'informations sont connues sur le rôle des ARN non codants au cours de l'infection par les Coronavirus. Aucun lncARN n'a été identifié comme un facteur cellulaire modulant leur cycle de vie, et seul le microARN 9 a été montré comme interagissant directement avec la protéine de nucléocapside de la souche HCoV-OC43 des Coronavirus entraînant la potentialisation de la voie NF- κ B [241].

La souche HCoV-229E infecte les cellules des voies respiratoires et est responsable de rhumes bénins chez l'adulte mais pouvant avoir de sérieuses conséquences chez les nourrissons, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées. Cette souche virale sert également de modèle pour étudier le cycle de vie de Coronavirus mortels tels que le SARS-CoV ou le MERS-COV.

L'objectif de notre étude était de découvrir de nouveaux ARN non-codants pouvant moduler la réplication virale de la souche HCoV-229E et dont l'expression pouvait être dépendante de KSRP. Ces deux approches ont été menées en parallèle au cours de ma thèse.

Dans un premier temps, le rôle de KSRP sur la réplication de la souche modèle HCoV-229E des Coronavirus a été évalué. Suite aux résultats obtenus dans le cadre de l'étude du rôle de KSRP lors de l'infection VHC, cette stratégie devait servir de preuve de concept quant à l'utilisation de KSRP comme outil pour identifier des ARN non-codants régulant le cycle de vie d'autres virus. Nous avons donc utilisé un siARN dirigé contre KSRP afin d'inhiber son expression dans des cellules MRC-5. Parallèlement, nous avons transfecté un plasmide exprimant la protéine KSRP contenant un tag HA. Nous avons mesuré la réplication virale par RT-qPCR et nous avons pu constater que KSRP semblait jouer un rôle proviral dans le cycle de vie du HCoV-229E à 24 h et 48 h post-infection. L'effet cytopathique a également été évalué par microscopie optique. La surexpression de KSRP semblait accélérer le processus de lyse provoqué par le virus. KSRP est donc être un facteur proviral dans le cas de l'infection HCoV-229E.

Notre étude a ensuite porté sur la fonction de KSRP au cours de l'infection virale. Par western blot, nous avons pu constater qu'il n'y avait aucune augmentation significative de la quantité de protéine KSRP au cours de l'infection. Ces résultats nous ont amené à étudier les modifications post-traductionnelles de KSRP pouvant affecter ses différentes fonctions.

Nous avons dans un premier temps recherché si le rôle proviral de KSRP lors de l'infection HCoV-229E était direct ou indirect. Pour cela nous avons étudié par immunoprécipitation d'ARN l'interaction directe de KSRP avec le génome viral. Nous avons utilisé un anticorps reconnaissant la protéine KSRP et nous avons quantifié l'ARN HCoV-229E (brin (+)) ainsi que l'ARNm c-jun (portant des « ARE ») par RT-qPCR. Nous n'avons pas détecté d'interaction directe significative entre KSRP et l'ARN HCoV-229E. En outre, nous avons pu observer une perte d'affinité pour l'ARNm c-jun entre la condition non-infectée et infectée. Ces résultats suggèrent que le rôle proviral de KSRP passerait soit par la stabilisation d'ARNm « ARE » soit par la régulation de l'expression d'ARN non-codants.

Afin de répondre aux deux problématiques posées dans cette partie de mon projet de recherche, nous avons réalisé deux séquençages à haut débit sur l'ARN total (« NGS total RNA ») et sur des ARN de petites tailles (« NGS small RNA »). Nous avons réalisé ces analyses sur des cellules MRC-5 infectées par HCoV-229E pendant 24 h à la M.O.I. de 1 vs des cellules non-infectées afin d'identifier les facteurs cellulaires dont l'expression était altérée par l'infection.

Une deuxième analyse a été réalisée sur des cellules infectées par HCoV-229E, à la M.O.I. de 1, pendant 24h et préalablement transfectées avec un siARN contrôle ou avec un siARN dirigé contre KSRP. Ceci afin d'obtenir les variations liées à l'inhibition de l'expression de KSRP dans la condition infectée.

Le séquençage à haut débit sur le « NGS small RNA » sur la condition infectée/non-infectée a permis de mettre en évidence 43 microARNs dérégulés au cours de l'infection. L'expression des microARNs ne variant que très peu, nous obtenons des modulations allant au maximum jusqu'à un facteur 3 fois en log2Fold Change.

Les microARNs surexprimés peuvent être des microARNs nécessaires à la réplication virale ou des microARNs participant à la réponse cellulaire antivirale. Les microARNs sous-exprimés peuvent être la conséquence d'une régulation induite par le virus pour diminuer la réponse antivirale médiée par la cellule. Le rôle pro- ou antiviral de ces microARNs doit être vérifié en inhibant ou en surexprimant leur expression dans des cellules MRC-5 infectées. De plus, il serait intéressant d'étudier l'affinité de ces microARNs pour le virus afin de voir si l'un d'eux pourrait avoir un rôle direct, positif ou négatif, sur l'ARN viral.

Nous avons réalisé l'analyse « NGS total RNA » dans la condition infectée vs non-infectée afin de pouvoir identifier les pri-miARNs modulés au cours de l'infection. Nous avons détecté 46 pri-miARNs modulés, 17 surexprimés et 29 sous-exprimés. Nous avons croisé ces résultats avec ceux obtenus dans l'étude « NGS small RNA » afin de mettre en évidence les microARNs dont le mécanisme de maturation était altéré.

Nous avons identifié deux candidats dont l'expression du pri-miARN était augmentée mais dont l'expression du miARN n'était pas modulée : le miR-6861 et le miR-4271. Nous avons également trouvé sept microARNs dont l'expression était diminuée, mais dont l'expression du pri-miARN était inchangée : les miR-7111-p, -4253, -762, -637, -6892-3p, -1229-5p et -4763-3p. Ces microARNs pourraient être de bonnes cibles d'études ultérieures car ils semblent subir des altérations de leur maturation durant l'infection.

La même analyse sur le « NGS small RNA » aurait dû être faite dans la condition siKSRP vs siNégatif contrôle dans des cellules infectées par HCoV-229E, mais suite à un problème lors du séquençage nous n'avons pas obtenu de résultats exploitables. Cette analyse sera réalisée ultérieurement afin de déterminer si certains microARNs dérégulés lors de l'infection pourraient être dépendants de KSRP.

Les microARNs participent à la régulation de l'expression des gènes en se fixant par complémentarité à un ARNm cible entraînant ainsi l'arrêt de sa traduction et/ou sa dégradation. Lors de l'analyse faite sur le « NGS total RNA » infectée vs non infectée, nous avons identifié de nouveaux miARNs par une analyse ontologique en « miroir ». Les ARNm dont l'expression était significativement modulée ont été regroupés par familles de miARNs.

Nous avons identifié 10 familles de microARNs dont les cibles ARNm étaient sous-régulées. Ceci suggère que l'expression de ces miARNs devrait être augmentée dans l'infection et détectée dans le séquençage « NGS small RNA ». Sur l'ensemble de ces dix microARNs, seul le miR-1 a été retrouvé dans l'analyse « NGS small RNA ». Parmi les cibles de miR-1, on retrouve des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la voie JAK-STAT, dans la voie RIG-I et certains TLR. Le miR-1 serait donc une cible intéressante à étudier, sa surexpression pouvant être induite par le virus afin de diminuer des facteurs cellulaires antiviraux.

Nous avons également pu identifier 15 familles de miARNs dont les cibles ARNm étaient surexprimées dans la condition infectée. Parmi ces microARNs, le miR-300 est le seul dont l'expression est retrouvée sous-réglée dans le « NGS small RNA », au cours de l'infection. Aucune variation d'expression significative des autres candidats miARNs n'a été détectée dans le « NGS small RNA ». Néanmoins, la dé-répression de leurs cibles ARNm suggère que ces miARNs pourraient être captés par d'autres éléments cellulaires ou viraux. Ces résultats suggèrent l'existence d'un phénomène « d'éponge » limitant la régulation de l'expression des ARNm par des microARNs dans certaines infections virales (exemple du miR-122 lors de l'infection par le VHC).

Les miARNs se fixent à leurs cibles par l'intermédiaire du complexe RISC et de la protéine Ago2. Ainsi, pour évaluer l'hypothèse selon laquelle certains miARNs seraient captés par l'ARN HCoV-229E, nous avons étudié par immunoprécipitation d'ARN et par *in situ* PLA l'existence d'une interaction directe entre le complexe RISC et l'ARN viral. Nous avons pu quantifier une interaction directe entre Ago2 et l'ARN HCoV-229E, que nous avons pu également visualiser par fluorescence. L'existence de sites d'interaction entre des miARNs cellulaires et l'ARN viral est probable, le génome viral faisant environ 30 kb. L'identification de ces miARNs par des techniques de HITS-CLIP ou de PAR-CLIP mêlant l'immunoprécipitation d'ARN au séquençage à haut débit permettrait de valider les résultats obtenus par l'analyse en « miroir » « NGS total RNA » et/ou de caractériser de nouveaux miARNs se fixant directement à l'ARN HCoV-229E, ainsi que la séquence virale ciblée.

Afin d'étudier les facteurs modulés au cours de l'infection et notamment ceux pouvant dépendre de KSRP, nous avons fait le choix de croiser les résultats obtenus sur l'analyse des séquençages « NGS total RNA » dans les deux conditions, infectée vs non-infectée et siKSRP vs siNégatif ctrl. Nous avons choisi 19 facteurs cellulaires dont l'expression était modulée de manière significative dans chaque « NGS » (**Figure 45**).

Nous avons recensé chaque facteur sélectionné selon le type de molécule, sa fonction, sa présence dans le tissu pulmonaire, la présence d'une séquence « ARE » et enfin s'il existait des données liants ce facteur aux infections virales (**Tableau 16**).

Parmi ces éléments, deux ARN non-codants de la famille des LinCARNs ont été sélectionnés. Les lncARNs LinC00473 et LinC00161 sont surexprimés dans la condition infectée vs non-

infectée et sous-exprimés dans la condition siKSRP vs siNégatif ctrl. Le LinC00473 étant le facteur majoritairement surexprimé dans la condition infectée vs non-infectée nous avons décidé d'en étudier le rôle dans le cycle de vie de la souche HCoV-229E ainsi que son lien potentiel avec KSRP.

Le linC00473 est localisé dans une région intergénique sur le chromosome 6 chez l'Homme, subit un épissage donnant deux isoformes que nous avons appelé LinC00473-1 pour l'isoforme 1 et LinC00473-2 pour l'isoforme 2. L'alignement de leurs séquences nous a montré que les 500 premiers nucléotides étaient communs entre les deux isoformes et que l'isoforme 2 (1123 nucléotides) était plus courte que l'isoforme 1 (1832 nucléotides).

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier les données obtenues par l'analyse « NGS total RNA » lors de l'infection. Pour cela, des cellules MRC-5 ont été infectées pendant 24 h et 48 h avec la souche HCoV-229E à la M.O.I de 1. Les cellules ont ensuite été lysées et l'expression des deux isoformes du linC00473 ont été évaluées par RT-qPCR. Nous avons pu observer une augmentation très significative de l'expression des deux isoformes du linC00473 à 24 h post-infection. De manière intéressante, une diminution de leur expression est observée 48 h post-infection.

Nous avons en parallèle, confirmé la réplication virale dans cette expérience en observant une augmentation de la réplication à 48 h post-infection par rapport au point à 24 h post-infection.

Ces données confirment donc les résultats obtenus par séquençage « NGS total RNA » à 24 h post-infection et suggèrent une induction viro-induite de l'expression des isoformes de linC00473.

L'expression viro-induite des isoformes de LinC00473 a été validée par quantification de ces lncARNs par RT-qPCR, dans des conditions d'infection à différentes M.O.I. Nous avons pu constater une forte induction du LinC00473 pour les M.O.I fortes (1 à 0.05) mais une faible induction pour les M.O.I plus basses. Nous avons également retrouvé la diminution de l'expression des isoformes de LinC00473 à 48h pour les M.O.I. fortes. Cette information confirme que l'induction de l'expression du linC00473 est dépendante de l'infection.

Ces résultats nous ont permis de faire deux hypothèses concernant ce facteur :

- Le LinC00473 est un facteur proviral jouant un rôle dans la mise en place de la réplication virale (24 h post-infection).
- Le LinC00473 est un facteur impliqué dans la réponse antivirale de la cellule.

Afin de vérifier nos hypothèses, nous avons étudié la réplication virale dans des cellules MRC-5 infectées avec la souche HCoV-229E, inhibées pour l'expression du LinC00473 par transfection de siARN. Nous avons constaté que seule l'expression de l'isoforme 1 était inhibée après transfection du siARN. Ce siARN n'étant pas efficace sur l'isoforme 2, nous n'avons pas pu étudier son impact sur le virus. L'étude de cette isoforme pourra être faite grâce à la construction de plusieurs siARN spécifiquement dirigées contre l'isoforme 2 du LinC00473.

La suite de notre étude s'est donc focalisée sur l'expression de l'isoforme 1 du LinC00473. L'expression du LinC00473-1 est significativement réduite à 72 h post-transfection dans les cellules non-infectées. Nous avons donc analysé la réplication virale à 24 h et 48 h post-infection par la souche HCoV-229E, dans des cellules MRC-5 transfectées pendant 24h avec un siLinC00473 ou un siNeg Ctrl. Parallèlement à la réduction de l'expression du LinC00473-1, nous avons pu constater une inhibition très significative de la réplication du HCoV-229E, suggérant que le LinC00473-1 est un facteur proviral pour le virus (**Figure 49**).

Nous avons résumé l'ensemble de ces hypothèses dans la **figure 53**. En effet, un des modèles pouvant expliquer le rôle de KSRP et du LinC00473 au cours de l'infection serait qu'au cours de l'infection, KSRP participe à l'épissage du pré-LinC00473 afin de donner les deux isoformes LinC00473-1 et LinC00473-2. Ce LinCARN pourrait avoir un rôle proviral indirect en permettant la rétention de facteurs antiviraux protéiques ou ARN (miARN) ou en régulant la transcription de facteurs pro- et/ou antiviraux. De plus, une interaction directe pourrait exister entre le linCARN et l'ARN viral qui pourrait être vérifiée par immunoprécipitation d'ARN.

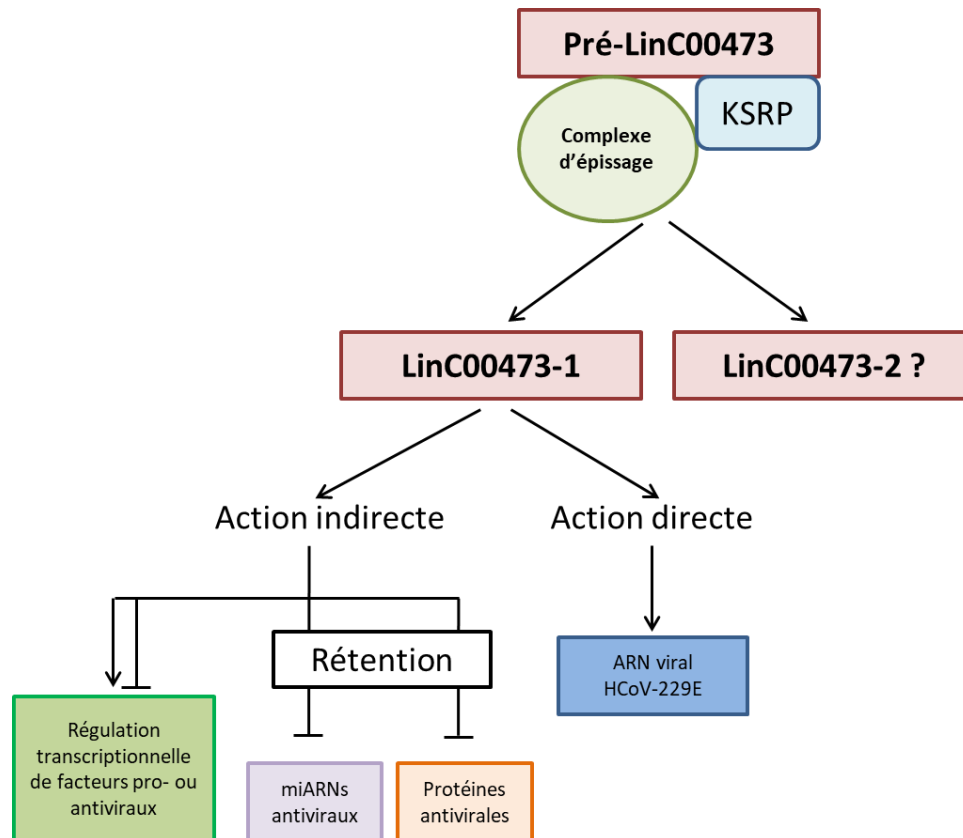


Figure 53 : Représentation schématique modélisant le rôle hypothétique du LinC00473 et de la protéine KSRP lors de l'infection par la souche HCoV-229E des Coronavirus.

La suite de ces travaux serait de déterminer le mécanisme moléculaire par lequel le LinC00473 joue un rôle proviral. Les lncARNs cellulaires peuvent être impliqués dans de nombreuses infections par des virus à ADN ou à ARN, de polarité positive ou négative [276]. Ils peuvent jouer un rôle positif ou négatif dans la régulation de l'infection virale de manière IFN-dépendante ou -indépendante [46]. La majorité des mécanismes décrits dans la littérature concernant le rôle des lncARNs au cours de l'infection, sont des mécanismes indirects où les lncARNs peuvent réguler l'expression de facteurs cellulaires pro- ou antiviraux et ainsi influencer l'infection virale. Il serait donc intéressant d'identifier les partenaires cellulaires protéiques et/ou nucléiques pouvant interagir avec le LinC00473 afin de voir si ce facteur pourrait inhiber un ou plusieurs facteur(s) participant(s) à la réponse immunitaire médiée par la cellule. Les techniques de spectrométrie de masse et de séquençage haut débit sur des protéines/ARNs cellulaires purifiés par immunoprécipitation dans des cellules infectées, et avec un anticorps anti-double brin pourrait répondre à ces questions.

Les lncARNs sont également des éponges à miARN [277] qui régulent leur expression et ainsi que celle de leurs cibles en ARNm. Une des hypothèses pouvant expliquer le rôle proviral du LinC00473 serait que celui-ci séquestre des microARNs antiviraux. Pour étudier cette hypothèse, des cellules MRC-5 pourraient être transfectées avec un LinC00473 synthétisé *in vitro*, marqué à la Digoxygénine en 3' puis infectées pendant 24 h. Une immunoprécipitation pourra ensuite être réalisée en utilisant un anticorps anti-digoxygénine qui va interagir spécifiquement avec le LinC00473 transfecté. Le produit de l'immunoprécipitation pourra ensuite être séquencé (« NGS small RNA ») afin de déterminer les microARNs en interaction avec le linC00473 au cours de l'infection. Cette technique pourrait permettre de mettre en évidence de nouveaux microARNs antiviraux lors de l'infection HCoV-229E.

En étudiant l'interactome du LinC00473 en condition infectée, nous pourrions déterminer si une interaction directe pourrait exister entre l'ARN viral HCoV-229E et le LinC00473. Dans ce cas il serait intéressant de déterminer le site de fixation du LinC00473 sur l'ARN viral. Il serait également intéressant de regarder si une affinité pourrait exister entre ce lncARN et des protéines virales. Dans le cas de l'infection par le VHC, il a été montré que la mise en place des DMVs faisait intervenir des facteurs cellulaires et viraux permettant la formation et le maintien de l'intégrité des DMVs [278]. De manière similaire, le LinC00473 pourrait potentiellement interagir avec certaines protéines non-structurales, servir d'ancrage moléculaire, pour promouvoir la formation du complexe de réplication.

De plus, les lncARNs sont impliqués dans différents processus biologiques tels que le contrôle de la transcription ou de la traduction. Il semble donc nécessaire d'étudier l'affinité du LinC00473 pour l'ARN viral par Immunoprécipitation d'ARN. Le virus HCoV-229E étant coiffé et polyadénylé, l'interaction potentielle entre l'ARN viral et le LinC00473 ne jouerait probablement pas un rôle de protection contre des RNAses cellulaires, mais pourrait permettre d'améliorer la fixation d'autres éléments tels que les complexes de transcription et de traduction. Néanmoins, il n'existe pas dans la littérature d'exemple d'interaction directe entre un lncARN cellulaire et un génome viral.

La suite de ce travail a été d'étudier le rôle de la protéine KSRP sur le contrôle de l'expression du LinC00473. En effet, les résultats obtenus par « NGS total RNA » dans la condition infectée siKSRP vs siNeg ctrl indiquaient une diminution du LinC00473 dans la condition siKSRP. Afin de vérifier ces résultats, des cellules MRC-5 ont été transfectées avec

un siKSRP ou un siNeg ctrl, puis infectées jusqu'à 72 h. L'expression du linC00473 et de l'ARN viral ont été analysées par RT-qPCR à 24 h, 48 h et 72 h post-infection. Nous avons pu constater qu'en absence de KSRP, l'induction de l'expression du linC00473 était significativement réduite à 24 h et 48h post-infection par rapport au contrôle. A partir de 48 h, la diminution de l'expression du LinC00473 est retrouvée dans les conditions siKSRP et siNeg ctrl par rapport aux cellules non-infectées. Ces résultats suggèrent que KSRP ne semble pas impliquée dans cette diminution. En analysant l'ARN viral, nous pouvons voir que dans la condition siKSRP, la réplication virale diminue à 48 h et à 72 h post-infection. Ces résultats suggèrent que KSRP serait impliquée dans l'induction du LinC00473 permettant l'installation de la réplication virale.

L'affinité entre KSRP et le LinC00473 a ensuite été évaluée par immunoprécipitation d'ARN en condition infectée. Nous avons pu constater qu'il existait une interaction directe entre KSRP et l'isoforme 1 du LinC00473. L'inhibition de l'expression de KSRP conduisant à l'inhibition de l'expression du LinC00473, nous avons exclu l'hypothèse que la protéine puisse réguler l'expression du LinC00473 en entraînant sa dégradation.

Le premier article décrivant la protéine KSRP a mis en lumière son rôle dans l'épissage des pré-ARNm [177]. L'inhibition de la protéine conduisant à l'inhibition de l'expression de l'isoforme 1 du LinC00473, notre hypothèse est que KSRP participerait à l'épissage de ce lncARN.

D'autre part, les résultats obtenus en séquençage à haut débit ont permis d'identifier d'autres lncARNs modulés au cours de l'infection (**Tableau 18**). Il serait intéressant d'étudier les autres lncARNs dérégulés au cours de l'infection afin d'évaluer leur rôle dans le cycle de vie de HCoV-229E.

De manière plus générale, l'étude du LinC00473-1 a permis de mettre en évidence un nouveau facteur proviral, dont l'expression est fortement induite dans les cellules MRC-5, uniquement dans les premiers temps de l'infection. La compréhension des mécanismes régissant l'action provirale de ce facteur pourrait conduire au développement de molécules antivirales appartenant à la famille des HTAs bloquant la réplication virale. Des molécules dirigées directement contre le LinC00473-1 pourraient être envisagées et testées à des temps précoces de l'infection. La mise en évidence de l'importance des lncARNs au cours de

l'infection par HCoV-229E met en lumière la possibilité de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'infection par les Coronavirus.

De plus, si notre hypothèse concernant l'effet éponge du LinC00473 sur des microARNs antiviraux s'avérait vraie, des mimics de ces microARNs pourraient être utilisés comme molécules antivirales à la base de nouvelles approches thérapeutiques.

L'étude des lncARNs et des microARNs semble être essentielle afin de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux de l'infection ainsi que les relations entre l'hôte et le virus.

Enfin, l'étude « NGS total RNA » sur l'infection HCoV-229E a permis de mettre en évidence des ARN non-codants modulés au cours de l'infection dont l'expression pouvait être dépendante de la protéine KSRP. Nous disposons au laboratoire de deux autres souches de Coronavirus, la souche HCoV-OC43 de type betacoronavirus et de la souche HCoV-NL63 de type alphacoronavirus comme pour la souche HCoV-229E. Nous disposons également de souches cliniques issues de prélèvement de patients. Suite à la confirmation de l'implication du LinC00473 dans le cycle de vie de la souche HCoV-229E il serait intéressant de transposer cette étude aux souches HCoV-OC43 et HCoV-NL63 ainsi qu'aux souches cliniques.

Conclusion générale

L'étude de la protéine KSRP lors de l'infection par des virus à ARN a permis de mettre en évidence les rôles multiples que cette « RNA-binding protein » peut avoir sur le contrôle de l'expression des ARN (miARN, lncARN, ARNm).

Au cours de l'infection par le virus de l'Hépatite C, nous avons pu démontrer que la phosphorylation du résidu S193 de KSRP, substrat d'Akt participait à la maturation du microARN 122 proviral. L'hyper-phosphorylation de la kinase Akt induite par le virus permet la phosphorylation de KSRP en S193. Ainsi, par des modifications post-traductionnelles, le virus peut moduler la localisation ainsi que la fonction de cette protéine. La localisation nucléaire de KSRP phosphorylée en S193 lui confère une affinité pour les pri-miARNs et pour le complexe DROSHA/DGCR8 lui permettant de maturer le pri-miR-122 en pré-miR-122. L'évaluation du rôle des autres sites de phosphorylation de KSRP a permis de montrer que les résidus substrats d'ATM ne semblaient pas jouer un rôle majeur dans le rôle proviral de la protéine. En revanche, la modulation du résidu T692 de KSRP, substrat de la kinase p38MAPK, semblerait participer au rôle proviral de KSRP. La localisation nucléaire et la non-phosphorylation de ce résidu favoriserait la réplication virale de manière miR-122 indépendante.

L'étude du rôle de KSRP a également été évaluée dans le cas de l'infection par la souche HCoV-229E. Par des techniques de biologie cellulaire et moléculaire nous avons pu montrer que KSRP avait un rôle proviral lors de l'infection. Afin d'identifier de nouveaux ARN non-codants impliqués dans le cycle de vie de HCoV-229E, et leur éventuelle régulation par KSRP, deux analyses de séquençage à haut débit ont été effectuées sur des cellules infectées vs non-infectées et sur des cellules infectées transfectées avec un siKSRP vs un siNégatif ctrl.

Nous avons pu montrer qu'un nombre important de microARNs et de lncARNs étaient modulés au cours de l'infection. L'ensemble de ces facteurs feront l'objet d'une analyse complète afin de déterminer leurs rôles au niveau du cycle viral.

Enfin, en croisant les analyses « NGS total ARN » effectuées dans les conditions « infectée vs non-infectée » et « siKSRP vs siNégatif ctrl » nous avons pu établir une liste de facteurs cellulaires modulés au cours de l'infection et dépendants de KSRP. Parmi ces facteurs, le

LinC00473 a particulièrement attiré notre attention du fait de l'augmentation de son expression à 24 h post-infection. En étudiant l'expression des deux isoformes de ce facteur à 24 h et 48 h d'infection nous avons pu confirmer les résultats de l'analyse « NGS total RNA ». Nous avons également observé une forte diminution de l'expression de ce lncARN à 48 h post-infection. Ces résultats corrélerent avec une augmentation de la réplication virale au cours du temps.

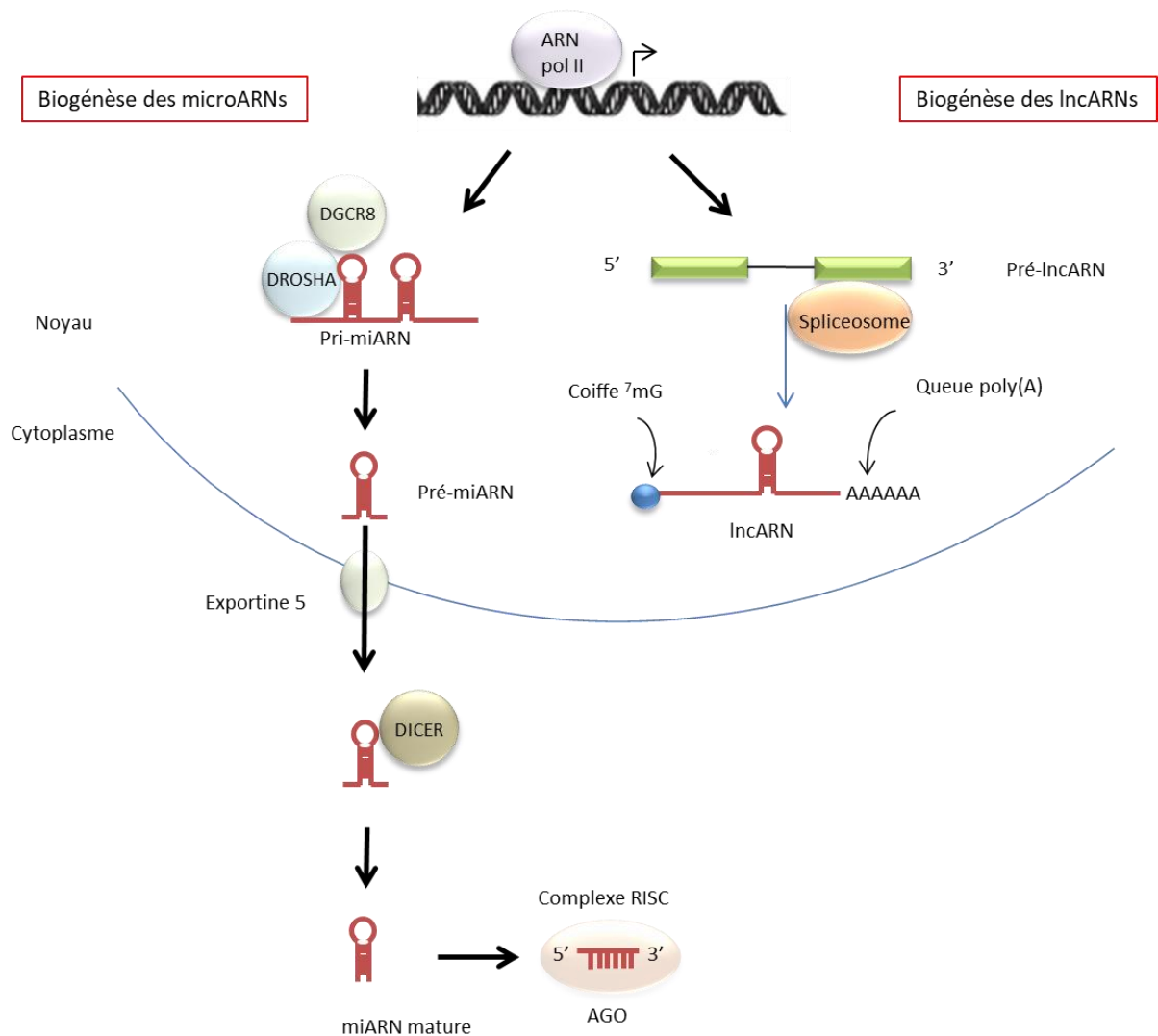
En étudiant la réplication dans des cellules inhibées pour l'expression de l'isoforme 1 du LinC00473 nous avons pu observer une diminution de l'infection suggérant que ce facteur participe à la mise en place de la réplication de la souche HCoV-229E et est un facteur proviral.

L'étude de la protéine KSRP au cours de l'infection HCoV-229E a permis de mettre en évidence la modulation de l'expression du LinC00473-1 impliqué dans le cycle de vie du virus.

Ces travaux ont permis d'étudier la protéine KSRP comme un outil pour découvrir de nouveaux ARN non-codants modulés au cours d'infection par des virus à ARN. La mise en évidence de nouveaux ARN non-codants dérégulés au cours de l'infection et l'étude de leur expression pourrait permettre de mieux comprendre le cycle de vie de ces virus et de découvrir de nouvelles cibles pour le développement de molécules antivirales.

Annexes

I- Représentation schématique de la biogénèse des microARNs (voie canonique) et des lncARNs



Annexe 1 : Représentation schématique de la voie canonique de maturation des microARNs et de la biogénèse des lncARNs. Les microARNs et les lncARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II à partir de régions génomiques différentes. Le pri-microARN généré va être clivé par le complexe nucléaire DROSHA/DGCR8 en pré-miARN. Ce dernier va être exporté vers le cytoplasme via l'Exportine-5 et être clivé par le complexe DICER en un microARN double brin mature. Un seul brin de ce microARN va être chargé dans le complexe d'interférence RISC dont la protéine cœur est la protéine AGO2. Les lncARNs vont être transcrits en pré-lncARN, une partie des ces pré-lncARN peuvent être épissés par le complexe du spliceosome. Les lncARNs peuvent ensuite être coiffés et/ou polyadénylés.

II- Revue I – Frontiers in microbiology

Title: Viruses and miRNAs: More Friends than Foes

Patrice Bruscella, Silvia Bottini, Camille Baudesson, Jean-Michel Pawlotsky, Cyrille Feray and Michele Trabucchi

Abstract:

There is evidence that eukaryotic miRNAs (hereafter called host miRNAs) play a role in the replication and propagation of viruses. Expression or targeting of host miRNAs can be involved in cellular antiviral responses. Most times host miRNAs play a role in viral lifecycles and promote infection through complex regulatory pathways. miRNAs can also be encoded by a viral genome and be expressed in the host cell. Viral miRNAs can share common sequences with host miRNAs or have totally different sequences. They can regulate a variety of biological processes involved in viral infection, including apoptosis, evasion of the immune response, or modulation of viral life-cycle phases. Overall, virus/miRNA pathway interaction is defined by a plethora of complex mechanisms, though not yet fully understood. This article review summarizes recent advances and novel biological concepts related to the understanding of miRNA expression, control and function during viral infections. The article also discusses potential therapeutic applications of this particular host–pathogen interaction.

Implication dans ce travail

Au cours de ce travail, j'ai participé à la conception et à l'élaboration du plan de la revue, à la recherche bibliographique ainsi qu'à la relecture de la revue.

III- Article II – Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Title : Characterization of the Anti-Hepatitis C Virus Activity of New Nonpeptidic Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors with the Potential for Broad Anti-Flaviviridae Activity

Quentin Nevers, Isaac Ruiz, Nazim Ahnou, Flora Donati, Rozenn Brillet, Laurent Softic, Maxime Chazal, Nolwenn Jouvenet, Slim Fourati, Camille Baudesson, Patrice Bruscella, Muriel Gelin, Jean-François Guichou, Jean-Michel Pawlotsky, Abdelhakim Ahmed-Belkacem

Abstract:

Although members of the *Flaviviridae* display high incidence, morbidity, and mortality rates, the development of specific antiviral drugs for each virus is unlikely. Cyclophilins, a family of host peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases (PPlases), play a pivotal role in the life cycles of many viruses and therefore represent an attractive target for broad-spectrum antiviral development. We report here the pangenotypic anti-hepatitis C virus (HCV) activity of a small-molecule cyclophilin inhibitor (SMCypI). Mechanistic and modeling studies revealed that the SMCypI bound to cyclophilin A in competition with cyclosporine (CsA), inhibited its PPlase activity, and disrupted the CypA-nonstructural protein 5A (NS5A) interaction. Resistance selection showed that the lead SMCypI hardly selected amino acid substitutions conferring low-level or no resistance *in vitro*. Interestingly, the SMCypI selected D320E and Y321H substitutions, located in domain II of the NS5A protein. These substitutions were previously associated with low-level resistance to cyclophilin inhibitors such as alisporivir. Finally, the SMCypI inhibited the replication of other members of the *Flaviviridae* family with higher 50% effective concentrations (EC_{50} s) than for HCV. Thus, because of its chemical plasticity and simplicity of synthesis, our new family of SMCypIs represents a promising new class of drugs with the potential for broad-spectrum anti-*Flaviviridae* activity as well as an invaluable tool to explore the role of cyclophilins in viral life cycles.

Implication dans le travail :

Au cours de ce travail, j'ai participé à certaines expérimentations sur l'étude de l'action des SMCypI sur le virus de l'hépatite C en réalisant des extractions d'ARN et des qPCR.

IV- Article III – Journal of Biological Chemistry

Title : Hepatitis C virus induces a prediabetic state by directly impairing hepatic glucose metabolism in mice

Lerat H, Imache M, Polyte J, Gaudin A, Mercey M, Donati F, Baudesson C, Higgs MR, Picard A, Magnan C, Fougelle F, Pawlotsky JM.

Abstract:

Virus-related type 2 diabetes is commonly observed in individuals infected with the hepatitis C virus (HCV); however, the underlying molecular mechanisms remain unknown. Our aim was to unravel these mechanisms using FL-N/35 transgenic mice expressing the full HCV ORF. We observed that these mice displayed glucose intolerance and insulin resistance. We also found that Glut-2 membrane expression was reduced in FL-N/35 mice and that hepatocyte glucose uptake was perturbed, partly accounting for the HCV-induced glucose intolerance in these mice. Early steps of the hepatic insulin signaling pathway, from IRS2 to PDK1 phosphorylation, were constitutively impaired in FL-N/35 primary hepatocytes via deregulation of TNF α /SOCS3. Higher hepatic glucose production was observed in the HCV mice, despite higher fasting insulinemia, concomitant with decreased expression of hepatic gluconeogenic genes. Akt kinase activity was higher in HCV mice than in WT mice, but Akt-dependent phosphorylation of the forkhead transcription factor FoxO1 at serine 256, which triggers its nuclear exclusion, was lower in HCV mouse livers. These findings indicate an uncoupling of the canonical Akt/FoxO1 pathway in HCV protein-expressing hepatocytes. Thus, the expression of HCV proteins in the liver is sufficient to induce insulin resistance by impairing insulin signaling and glucose uptake. In conclusion, we observed a complete set of events leading to a prediabetic state in HCV-transgenic mice, providing a valuable mechanistic explanation for HCV-induced diabetes in humans

Implication dans le travail:

Au cours de ce travail, j'ai participé à l'étude du récepteur IRS2 en réalisant des tests ELISA et des Western Blot. J'ai également participé à l'analyse de ces résultats.

Bibliographie

1. Theves, C., E. Crubezy, and P. Biagini, *History of Smallpox and Its Spread in Human Populations*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(4).
2. Rafeek, R.A.M., M.V.M. Divarathna, and F. Noordeen, *History and current trends in influenza virus infections with special reference to Sri Lanka*. Virusdisease, 2017. **28**(3): p. 225-232.
3. Luthy, I.A., V. Ritacco, and I.N. Kantor, *[One hundred years after the "Spanish" flu]*. Medicina (B Aires), 2018. **78**(2): p. 113-118.
4. Banuls, A.L., et al., *Mycobacterium tuberculosis: ecology and evolution of a human bacterium*. J Med Microbiol, 2015. **64**(11): p. 1261-9.
5. Rappuoli, R., *From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases*. Nat Med, 2004. **10**(11): p. 1177-85.
6. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006841.
7. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
8. Jean-François Saluzzo, P.V., Jean-Paul Gonzalez, *LES VIRUS ÉMERGENTS* 2013.
9. Morens, D.M., G.K. Folkers, and A.S. Fauci, *The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 242-9.
10. Graham, R.L., E.F. Donaldson, and R.S. Baric, *A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(12): p. 836-48.
11. Hui, D.S., et al., *Middle East respiratory syndrome coronavirus: risk factors and determinants of primary, household, and nosocomial transmission*. Lancet Infect Dis, 2018.
12. Kumar, B., et al., *The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control*. Arch Virol, 2018. **163**(4): p. 831-844.
13. Zhang, F., et al., *Characterization of pseudoparticles paired with hemagglutinin and neuraminidase from highly pathogenic H5N1 influenza and avian influenza A (H7N9) viruses*. Virus Res, 2018. **253**: p. 20-27.
14. Poovorawan, Y., et al., *Global alert to avian influenza virus infection: from H5N1 to H7N9*. Pathog Glob Health, 2013. **107**(5): p. 217-23.
15. Cantoni, D. and J.S. Rossman, *Ebolaviruses: New roles for old proteins*. PLoS Negl Trop Dis, 2018. **12**(5): p. e0006349.
16. Elshabrawy, H.A., T.B. Erickson, and B.S. Prabhakar, *Ebola virus outbreak, updates on current therapeutic strategies*. Rev Med Virol, 2015. **25**(4): p. 241-53.
17. Bernadou, A., et al., *Measles outbreak linked to insufficient vaccination coverage in Nouvelle-Aquitaine Region, France, October 2017 to July 2018*. Euro Surveill, 2018. **23**(30).
18. Krauer, F., et al., *Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barre Syndrome: Systematic Review*. PLoS Med, 2017. **14**(1): p. e1002203.
19. http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/.
20. De Clercq, E. and G. Li, *Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years*. Clin Microbiol Rev, 2016. **29**(3): p. 695-747.
21. Abdel-Haq, N., et al., *New antiviral agents*. Indian J Pediatr, 2006. **73**(4): p. 313-21.
22. Marcelletti, J.F., *Synergistic inhibition of herpesvirus replication by docosanol and antiviral nucleoside analogs*. Antiviral Res, 2002. **56**(2): p. 153-66.
23. Delang, L., R. Abdelnabi, and J. Neyts, *Favipiravir as a potential countermeasure against neglected and emerging RNA viruses*. Antiviral Res, 2018. **153**: p. 85-94.
24. Kim, J.A., et al., *Favipiravir and Ribavirin Inhibit Replication of Asian and African Strains of Zika Virus in Different Cell Models*. Viruses, 2018. **10**(2).
25. Sissoko, D., et al., *Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea*. PLoS Med, 2016. **13**(3): p. e1001967.
26. Pol, S. and M. Corouge, *Treatment of hepatitis C: perspectives*. Med Mal Infect, 2014. **44**(10): p. 449-54.

27. Woollard, S.M. and G.D. Kanmogne, *Maraviroc: a review of its use in HIV infection and beyond*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 5447-68.
28. Pawlotsky, J.M., *The science of direct-acting antiviral and host-targeted agent therapy*. Antivir Ther, 2012. **17**(6 Pt B): p. 1109-17.
29. Karlas, A., et al., *A human genome-wide loss-of-function screen identifies effective chikungunya antiviral drugs*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11320.
30. Gilbert, C., et al., *Statins could be used to control replication of some viruses, including HIV-1*. Viral Immunol, 2005. **18**(3): p. 474-89.
31. Nevers, Q., et al., *Characterization of the Anti-Hepatitis C Virus Activity of New Nonpeptidic Small-Molecule Cyclophilin Inhibitors with the Potential for Broad Anti-Flaviviridae Activity*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(7).
32. Jones, S.E.F., et al., *Human Papillomavirus DNA Methylation Predicts Response to Treatment Using Cidofovir and Imiquimod in Vulval Intraepithelial Neoplasia 3*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(18): p. 5460-5468.
33. Watashi, K., et al., *Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)*. Hepatology, 2014. **59**(5): p. 1726-37.
34. Wang, Y., et al., *Calcineurin inhibitors stimulate and mycophenolic acid inhibits replication of hepatitis E virus*. Gastroenterology, 2014. **146**(7): p. 1775-83.
35. Kang, S., et al., *Suppressing dengue-2 infection by chemical inhibition of Aedes aegypti host factors*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(8): p. e3084.
36. Diamond, M.S., M. Zachariah, and E. Harris, *Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA*. Virology, 2002. **304**(2): p. 211-21.
37. Henry, S.D., et al., *Mycophenolic acid inhibits hepatitis C virus replication and acts in synergy with cyclosporin A and interferon-alpha*. Gastroenterology, 2006. **131**(5): p. 1452-62.
38. Hart, B.J., et al., *Interferon-beta and mycophenolic acid are potent inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus in cell-based assays*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 3): p. 571-7.
39. Cheng, K.W., et al., *Thiopurine analogs and mycophenolic acid synergistically inhibit the papain-like protease of Middle East respiratory syndrome coronavirus*. Antiviral Res, 2015. **115**: p. 9-16.
40. Martinez, J.P., et al., *Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature*. Nat Prod Rep, 2015. **32**(1): p. 29-48.
41. Dhanoa, J.K., et al., *Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review*. J Anim Sci Technol, 2018. **60**: p. 25.
42. Djebali, S., et al., *Landscape of transcription in human cells*. Nature, 2012. **489**(7414): p. 101-8.
43. St Laurent, G., C. Wahlestedt, and P. Kapranov, *The Landscape of long noncoding RNA classification*. Trends Genet, 2015. **31**(5): p. 239-51.
44. Derrien, T., et al., *The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression*. Genome Res, 2012. **22**(9): p. 1775-89.
45. Mele, M., et al., *Chromatin environment, transcriptional regulation, and splicing distinguish lincRNAs and mRNAs*. Genome Res, 2017. **27**(1): p. 27-37.
46. Meng, X.Y., et al., *Long Non-Coding RNAs: Emerging and Versatile Regulators in Host-Virus Interactions*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1663.
47. Samudiyata, G. Castelo-Branco, and A. Bonetti, *Birth, coming of age and death: The intriguing life of long noncoding RNAs*. Semin Cell Dev Biol, 2018. **79**: p. 143-152.
48. Niemczyk, M., et al., *Imprinted chromatin around DIRAS3 regulates alternative splicing of GNG12-AS1, a long noncoding RNA*. Am J Hum Genet, 2013. **93**(2): p. 224-35.
49. Wilusz, J.E., *Long noncoding RNAs: Re-writing dogmas of RNA processing and stability*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(1): p. 128-38.
50. Fang, Y. and M.J. Fullwood, *Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2016. **14**(1): p. 42-54.

51. Beaulieu, Y.B., et al., *Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1*. PLoS Genet, 2012. **8**(11): p. e1003078.
52. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(1): p. 47-62.
53. Vance, K.W. and C.P. Ponting, *Transcriptional regulatory functions of nuclear long noncoding RNAs*. Trends Genet, 2014. **30**(8): p. 348-55.
54. Beltran, M., et al., *A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition*. Genes Dev, 2008. **22**(6): p. 756-69.
55. Clemson, C.M., et al., *An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles*. Mol Cell, 2009. **33**(6): p. 717-26.
56. Noh, J.H., et al., *Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018. **9**(3): p. e1471.
57. Golden, D.E., V.R. Gerbasi, and E.J. Sontheimer, *An inside job for siRNAs*. Mol Cell, 2008. **31**(3): p. 309-12.
58. Czech, B., et al., *An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 798-802.
59. Pang, K.C., et al., *Genome-wide identification of long noncoding RNAs in CD8+ T cells*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7738-48.
60. Anderson, D.M., et al., *A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance*. Cell, 2015. **160**(4): p. 595-606.
61. Huang, J.Z., et al., *A Peptide Encoded by a Putative lncRNA HOXB-AS3 Suppresses Colon Cancer Growth*. Mol Cell, 2017. **68**(1): p. 171-184 e6.
62. Karlsson, O. and A.A. Baccarelli, *Environmental Health and Long Non-coding RNAs*. Curr Environ Health Rep, 2016. **3**(3): p. 178-87.
63. Clark, M.B., et al., *Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability*. Genome Res, 2012. **22**(5): p. 885-98.
64. Yoon, J.H., et al., *LincRNA-p21 suppresses target mRNA translation*. Mol Cell, 2012. **47**(4): p. 648-55.
65. Yoon, J.H., et al., *Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2939.
66. Yoon, J.H., et al., *PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5248.
67. Yoon, J.H., J. Kim, and M. Gorospe, *Long noncoding RNA turnover*. Biochimie, 2015. **117**: p. 15-21.
68. Ouyang, J., J. Hu, and J.L. Chen, *lncRNAs regulate the innate immune response to viral infection*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016. **7**(1): p. 129-43.
69. Ma, H., et al., *The Long Noncoding RNA NEAT1 Exerts Antihantaviral Effects by Acting as Positive Feedback for RIG-I Signaling*. J Virol, 2017. **91**(9).
70. Kambara, H., et al., *Negative regulation of the interferon response by an interferon-induced long non-coding RNA*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(16): p. 10668-80.
71. Xiong, Y., et al., *The STAT3-regulated long non-coding RNA Lethe promote the HCV replication*. Biomed Pharmacother, 2015. **72**: p. 165-71.
72. Wang, J., et al., *Host Long Noncoding RNA lncRNA-PAAN Regulates the Replication of Influenza A Virus*. Viruses, 2018. **10**(6).
73. Imam, H., et al., *The lncRNA NRON modulates HIV-1 replication in a NFAT-dependent manner and is differentially regulated by early and late viral proteins*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8639.
74. Clarke, B.D., et al., *Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region*. Virus Res, 2015. **206**: p. 53-61.
75. Ng, W.C., et al., *The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome*. Viruses, 2017. **9**(6).
76. Fortes, P. and K.V. Morris, *Long noncoding RNAs in viral infections*. Virus Res, 2016. **212**: p. 1-11.

77. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
78. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
79. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
80. Kincaid, R.P., J.M. Burke, and C.S. Sullivan, *RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(8): p. 3077-82.
81. Wu, K., et al., *The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer*. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2018. **16**(2): p. 120-126.
82. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
83. Auyeung, V.C., et al., *Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing*. Cell, 2013. **152**(4): p. 844-58.
84. Han, J., et al., *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
85. Zeng, Y. and B.R. Cullen, *Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences*. J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27595-603.
86. Creugny, A., A. Fender, and S. Pfeffer, *Regulation of primary microRNA processing*. FEBS Lett, 2018. **592**(12): p. 1980-1996.
87. Link, S., S.E. Grund, and S. Diederichs, *Alternative splicing affects the subcellular localization of Drosha*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(11): p. 5330-43.
88. Kwon, S.C., et al., *Structure of Human DROSHA*. Cell, 2016. **164**(1-2): p. 81-90.
89. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
90. Senturia, R., et al., *Structure of the dimerization domain of DiGeorge critical region 8*. Protein Sci, 2010. **19**(7): p. 1354-65.
91. Zeng, Y., R. Yi, and B.R. Cullen, *Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha*. EMBO J, 2005. **24**(1): p. 138-48.
92. Trabucchi, M., et al., *KSRP Promotes the Maturation of a Group of miRNA Precursors*. Adv Exp Med Biol, 2011. **700**: p. 36-42.
93. Bohnsack, M.T., K. Czaplinski, and D. Gorlich, *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA, 2004. **10**(2): p. 185-91.
94. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
95. Zhang, H., et al., *Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III*. Cell, 2004. **118**(1): p. 57-68.
96. Gu, S., et al., *The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo*. Cell, 2012. **151**(4): p. 900-11.
97. Macrae, I.J., et al., *Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer*. Science, 2006. **311**(5758): p. 195-8.
98. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
99. MacRae, I.J., K. Zhou, and J.A. Doudna, *Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(10): p. 934-40.
100. Park, J.E., et al., *Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing*. Nature, 2011. **475**(7355): p. 201-5.
101. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
102. Trabucchi, M., et al., *The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 1010-4.
103. Xhemalce, B., S.C. Robson, and T. Kouzarides, *Human RNA methyltransferase BCDIN3D regulates microRNA processing*. Cell, 2012. **151**(2): p. 278-88.

104. Kawamata, T. and Y. Tomari, *Making RISC*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(7): p. 368-76.
105. Olina, A.V., et al., *Argonaute Proteins and Mechanisms of RNA Interference in Eukaryotes and Prokaryotes*. Biochemistry (Mosc), 2018. **83**(5): p. 483-497.
106. Su, H., et al., *Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing*. Genes Dev, 2009. **23**(3): p. 304-17.
107. Song, J.J., et al., *Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1434-7.
108. Frank, F., N. Sonenberg, and B. Nagar, *Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 818-22.
109. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
110. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
111. Meijer, H.A., E.M. Smith, and M. Bushell, *Regulation of miRNA strand selection: follow the leader?* Biochem Soc Trans, 2014. **42**(4): p. 1135-40.
112. Law, J.A. and S.E. Jacobsen, *Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(3): p. 204-20.
113. Pratt, A.J. and I.J. MacRae, *The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine*. J Biol Chem, 2009. **284**(27): p. 17897-901.
114. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2056-60.
115. Berezikov, E., et al., *Mammalian mirtron genes*. Mol Cell, 2007. **28**(2): p. 328-36.
116. Xie, M., et al., *Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA*. Cell, 2013. **155**(7): p. 1568-80.
117. Cifuentes, D., et al., *A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity*. Science, 2010. **328**(5986): p. 1694-8.
118. Towler, B.P., C.I. Jones, and S.F. Newbury, *Mechanisms of regulation of mature miRNAs*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(6): p. 1208-14.
119. Gantier, M.P., et al., *Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(13): p. 5692-703.
120. Rissland, O.S., S.J. Hong, and D.P. Bartel, *MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 993-1004.
121. Katoh, T., et al., *Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2*. Genes Dev, 2009. **23**(4): p. 433-8.
122. Jones, M.R., et al., *Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(9): p. 1157-63.
123. Yao, B., et al., *Defining a new role of GW182 in maintaining miRNA stability*. EMBO Rep, 2012. **13**(12): p. 1102-8.
124. Sethi, P. and W.J. Lukiw, *Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex*. Neurosci Lett, 2009. **459**(2): p. 100-4.
125. Bail, S., et al., *Differential regulation of microRNA stability*. RNA, 2010. **16**(5): p. 1032-9.
126. Towler, B.P., et al., *The 3'-5' exoribonuclease Dis3 regulates the expression of specific microRNAs in Drosophila wing imaginal discs*. RNA Biol, 2015. **12**(7): p. 728-41.
127. Kuppasamy, K.T., et al., *Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(21): p. E2785-94.
128. Sempere, L.F., et al., *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation*. Genome Biol, 2004. **5**(3): p. R13.

129. Huang, Y., et al., *Biological functions of microRNAs: a review*. J Physiol Biochem, 2011. **67**(1): p. 129-39.
130. Sassen, S., E.A. Miska, and C. Caldas, *MicroRNA: implications for cancer*. Virchows Arch, 2008. **452**(1): p. 1-10.
131. Ma, L., et al., *miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(3): p. 247-56.
132. Thum, T., et al., *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 980-4.
133. El Ouaamari, A., et al., *miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2708-17.
134. Wen, W., et al., *Cellular microRNA-miR-548g-3p modulates the replication of dengue virus*. J Infect, 2015. **70**(6): p. 631-40.
135. Wang, L., et al., *MiR-342-5p suppresses coxsackievirus B3 biosynthesis by targeting the 2C-coding region*. Antiviral Res, 2012. **93**(2): p. 270-9.
136. Slonchak, A., et al., *Human MicroRNA miR-532-5p Exhibits Antiviral Activity against West Nile Virus via Suppression of Host Genes SESTD1 and TAB3 Required for Virus Replication*. J Virol, 2015. **90**(5): p. 2388-402.
137. Dickson, A.M. and J. Wilusz, *Strategies for viral RNA stability: live long and prosper*. Trends Genet, 2011. **27**(7): p. 286-93.
138. Luna, J.M., et al., *Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122*. Cell, 2015. **160**(6): p. 1099-110.
139. Henke, J.I., et al., *microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA*. EMBO J, 2008. **27**(24): p. 3300-10.
140. Masaki, T., et al., *miR-122 stimulates hepatitis C virus RNA synthesis by altering the balance of viral RNAs engaged in replication versus translation*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(2): p. 217-28.
141. Scheel, T.K., et al., *A Broad RNA Virus Survey Reveals Both miRNA Dependence and Functional Sequestration*. Cell Host Microbe, 2016. **19**(3): p. 409-23.
142. Feng, L., C.G. Duan, and H.S. Guo, *Inhibition of in vivo Slicer activity of Argonaute protein 1 by the viral 2b protein independent of its dsRNA-binding function*. Mol Plant Pathol, 2013. **14**(6): p. 617-22.
143. Lee, S., et al., *Selective degradation of host MicroRNAs by an intergenic HCMV noncoding RNA accelerates virus production*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(6): p. 678-90.
144. Pawlica, P., W.N. Moss, and J.A. Steitz, *Host miRNA degradation by Herpesvirus saimiri small nuclear RNA requires an unstructured interacting region*. RNA, 2016. **22**(8): p. 1181-9.
145. Deng, M., et al., *Hepatitis B virus mRNAs functionally sequester let-7a and enhance hepatocellular carcinoma*. Cancer Lett, 2016. **383**(1): p. 62-72.
146. Sharma, N., et al., *miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells*. J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 30.
147. Zhang, Y. and Y.K. Li, *MicroRNAs in the regulation of immune response against infections*. J Zhejiang Univ Sci B, 2013. **14**(1): p. 1-7.
148. Wu, S., et al., *miR-146a facilitates replication of dengue virus by dampening interferon induction by targeting TRAF6*. J Infect, 2013. **67**(4): p. 329-41.
149. Hou, J., et al., *MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 2150-8.
150. Ho, B.C., et al., *Inhibition of miR-146a prevents enterovirus-induced death by restoring the production of type I interferon*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3344.
151. Hussain, M., 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**(5): p. 2210-23.

152. Bruscella, P., et al., *Viruses and miRNAs: More Friends than Foes*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 824.
153. Lei, X., et al., *Regulation of NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and viral replication by a KSHV microRNA*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(2): p. 193-9.
154. Qiu, J. and D.A. Thorley-Lawson, *EBV microRNA BART 18-5p targets MAP3K2 to facilitate persistence in vivo by inhibiting viral replication in B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(30): p. 11157-62.
155. Jung, Y.J., et al., *MicroRNA miR-BART20-5p stabilizes Epstein-Barr virus latency by directly targeting BZLF1 and BRLF1*. J Virol, 2014. **88**(16): p. 9027-37.
156. Hook, L.M., et al., *Cytomegalovirus miRNAs target secretory pathway genes to facilitate formation of the virion assembly compartment and reduce cytokine secretion*. Cell Host Microbe, 2014. **15**(3): p. 363-73.
157. Kaul, D., A. Ahlawat, and S.D. Gupta, *HIV-1 genome-encoded hiv1-mir-H1 impairs cellular responses to infection*. Mol Cell Biochem, 2009. **323**(1-2): p. 143-8.
158. O'Connor, C.M., J. Vanicek, and E.A. Murphy, *Host microRNA regulation of human cytomegalovirus immediate early protein translation promotes viral latency*. J Virol, 2014. **88**(10): p. 5524-32.
159. Liang, H., et al., *The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014. **5**(2): p. 285-300.
160. Lee, C.H., J.H. Kim, and S.W. Lee, *The Role of MicroRNA in Pathogenesis and as Markers of HCV Chronic Infection*. Curr Drug Targets, 2017. **18**(7): p. 756-765.
161. Pegtel, D.M., et al., *Functional delivery of viral miRNAs via exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(14): p. 6328-33.
162. Louten, J., et al., *MicroRNAs Expressed during Viral Infection: Biomarker Potential and Therapeutic Considerations*. Biomark Insights, 2015. **10**(Suppl 4): p. 25-52.
163. Hoffmann, T.W., G. Duverlie, and A. Bengrine, *MicroRNAs and hepatitis C virus: toward the end of miR-122 supremacy*. Virol J, 2012. **9**: p. 109.
164. Gebert, L.F., et al., *Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(1): p. 609-21.
165. Maepa, M.B., et al., *Sustained Inhibition of HBV Replication In Vivo after Systemic Injection of AAVs Encoding Artificial Antiviral Primary MicroRNAs*. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. **7**: p. 190-199.
166. Tan, M., et al., *The microRNA-let-7b-mediated attenuated strain of influenza A (H1N1) virus in a mouse model*. J Infect Dev Ctries, 2016. **10**(9): p. 973-981.
167. Drury, R.E., D. O'Connor, and A.J. Pollard, *The Clinical Application of MicroRNAs in Infectious Disease*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1182.
168. Briata, P., et al., *KSRP, many functions for a single protein*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 1787-96.
169. Hollingworth, D., et al., *KH domains with impaired nucleic acid binding as a tool for functional analysis*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(14): p. 6873-86.
170. Gherzi, R., et al., *KSRP controls pleiotropic cellular functions*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **34**: p. 2-8.
171. Garcia-Mayoral, M.F., et al., *The structure of the C-terminal KH domains of KSRP reveals a noncanonical motif important for mRNA degradation*. Structure, 2007. **15**(4): p. 485-98.
172. Briata, P., et al., *Functional and molecular insights into KSRP function in mRNA decay*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(6-7): p. 689-94.
173. Gherzi, R., et al., *The RNA-binding protein KSRP promotes decay of beta-catenin mRNA and is inactivated by PI3K-AKT signaling*. PLoS Biol, 2006. **5**(1): p. e5.
174. Zhang, X., et al., *The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response*. Mol Cell, 2011. **41**(4): p. 371-83.
175. Briata, P., et al., *p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts*. Mol Cell, 2005. **20**(6): p. 891-903.

176. Yuan, H., et al., *SUMO1 modification of KHSRP regulates tumorigenesis by preventing the TL-G-Rich miRNA biogenesis*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 157.
177. Min, H., et al., *A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer*. Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 1023-36.
178. Russo, A., et al., *Autoregulatory circuit of human rpL3 expression requires hnRNP H1, NPM and KHSRP*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(17): p. 7576-85.
179. Douablin, A., et al., *HnRNP A1 tethers KSRP to an exon splicing silencer that inhibits an erythroid-specific splicing event in PU.1-induced erythroleukemia*. Am J Cancer Res, 2015. **5**(4): p. 1410-22.
180. Gherzi, R., et al., *A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery*. Mol Cell, 2004. **14**(5): p. 571-83.
181. Bakheet, T., E. Hitti, and K.S.A. Khabar, *ARED-Plus: an updated and expanded database of AU-rich element-containing mRNAs and pre-mRNAs*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D218-D220.
182. Li, X., et al., *KSRP: a checkpoint for inflammatory cytokine production in astrocytes*. Glia, 2012. **60**(11): p. 1773-84.
183. Bird, C.W., et al., *KSRP modulation of GAP-43 mRNA stability restricts axonal outgrowth in embryonic hippocampal neurons*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79255.
184. Nicastro, G., et al., *Noncanonical G recognition mediates KSRP regulation of let-7 biogenesis*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(12): p. 1282-6.
185. Repetto, E., et al., *Let-7b/c enhance the stability of a tissue-specific mRNA during mammalian organogenesis as part of a feedback loop involving KSRP*. PLoS Genet, 2012. **8**(7): p. e1002823.
186. Gupta, A., et al., *MicroRNAs, hepatitis C virus, and HCV/HIV-1 co-infection: new insights in pathogenesis and therapy*. Viruses, 2012. **4**(11): p. 2485-513.
187. Lin, Y.Y., et al., *KSRP and MicroRNA 145 are negative regulators of lipolysis in white adipose tissue*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(12): p. 2339-49.
188. Tong, L., et al., *KH-type splicing regulatory protein (KHSRP) contributes to tumorigenesis by promoting miR-26a maturation in small cell lung cancer*. Mol Cell Biochem, 2016. **422**(1-2): p. 61-74.
189. Pruksakorn, D., et al., *Overexpression of KH-type splicing regulatory protein regulates proliferation, migration, and implantation ability of osteosarcoma*. Int J Oncol, 2016. **49**(3): p. 903-12.
190. Bhattacharyya, S., et al., *Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **433**(4): p. 484-8.
191. Briata, P., et al., *PI3K/AKT signaling determines a dynamic switch between distinct KSRP functions favoring skeletal myogenesis*. Cell Death Differ, 2012. **19**(3): p. 478-87.
192. Giovarelli, M., et al., *H19 long noncoding RNA controls the mRNA decay promoting function of KSRP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(47): p. E5023-8.
193. Gao, Y., et al., *The H19/let-7 double-negative feedback loop contributes to glucose metabolism in muscle cells*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(22): p. 13799-811.
194. Soonthornvacharin, S., et al., *Systems-based analysis of RIG-I-dependent signalling identifies KHSRP as an inhibitor of RIG-I receptor activation*. Nat Microbiol, 2017. **2**: p. 17022.
195. Chen, L.L., et al., *Enterovirus 71 infection cleaves a negative regulator for viral internal ribosomal entry site-driven translation*. J Virol, 2013. **87**(7): p. 3828-38.
196. Liu, A.L., et al., *Comparative analysis of selected innate immune-related genes following infection of immortal DF-1 cells with highly pathogenic (H5N1) and low pathogenic (H9N2) avian influenza viruses*. Virus Genes, 2015. **50**(2): p. 189-99.
197. Lin, W.J., et al., *Posttranscriptional control of type I interferon genes by KSRP in the innate immune response against viral infection*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(16): p. 3196-207.

198. Chai, F., et al., *Subcellular quantitative proteomic analysis reveals host proteins involved in human cytomegalovirus infection*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1854**(8): p. 967-78.
199. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. *Science*, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
200. WHO. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. 2017.
201. Llovet, J.M., et al., *Hepatocellular carcinoma*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16018.
202. Nault, J.C., et al., *Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis*. *Hepatology*, 2014. **60**(6): p. 1983-92.
203. Piver, E., et al., *Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture*. *Gut*, 2017. **66**(8): p. 1487-1495.
204. Pene, V., et al., *Role of cleavage at the core-E1 junction of hepatitis C virus polyprotein in viral morphogenesis*. *PLoS One*, 2017. **12**(4): p. e0175810.
205. Paul, D., V. Madan, and R. Bartenschlager, *Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land*. *Cell Host Microbe*, 2014. **16**(5): p. 569-79.
206. Chen, C.L., et al., *Hepatitis C virus has a genetically determined lymphotropism through co-receptor B7.2*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 13882.
207. Blackard, J.T., N. Kemmer, and K.E. Sherman, *Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences*. *Hepatology*, 2006. **44**(1): p. 15-22.
208. Blanchard, E., et al., *Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis*. *J Virol*, 2006. **80**(14): p. 6964-72.
209. Sharma, G., H. Raheja, and S. Das, *Hepatitis C virus: Enslavement of host factors*. *IUBMB Life*, 2018. **70**(1): p. 41-49.
210. Gawlik, K. and P.A. Gallay, *HCV core protein and virus assembly: what we know without structures*. *Immunol Res*, 2014. **60**(1): p. 1-10.
211. Andre, P., et al., *Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles*. *J Virol*, 2002. **76**(14): p. 6919-28.
212. Manns, M.P., et al., *Hepatitis C virus infection*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 17006.
213. Feld, J.J., et al., *Ribavirin revisited in the era of direct-acting antiviral therapy for hepatitis C virus infection*. *Liver Int*, 2017. **37**(1): p. 5-18.
214. Pawlotsky, J.M., *Hepatitis C Drugs: Is Next Generation the Last Generation?* *Gastroenterology*, 2016. **151**(4): p. 587-90.
215. Puchades Renau, L. and M. Berenguer, *Introduction to hepatitis C virus infection: Overview and history of hepatitis C virus therapies*. *Hemodial Int*, 2018. **22 Suppl 1**: p. S8-S21.
216. Fukuhara, T. and Y. Matsuura, *Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection*. *J Gastroenterol*, 2013. **48**(2): p. 169-76.
217. Jopling, C.L., et al., *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. *Science*, 2005. **309**(5740): p. 1577-81.
218. Shimakami, T., et al., *Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus*. *J Virol*, 2012. **86**(13): p. 7372-83.
219. Borgia, G., et al., *The therapeutic potential of new investigational hepatitis C virus translation inhibitors*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2016. **25**(10): p. 1209-14.
220. Murakami, Y., et al., *Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a*. *J Hepatol*, 2009. **50**(3): p. 453-60.
221. Bandyopadhyay, S., et al., *Hepatitis C virus infection and hepatic stellate cell activation downregulate miR-29: miR-29 overexpression reduces hepatitis C viral abundance in culture*. *J Infect Dis*, 2011. **203**(12): p. 1753-62.
222. Panda, A.C., et al., *Identification of senescence-associated circular RNAs (SAC-RNAs) reveals senescence suppressor CircPVT1*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(7): p. 4021-4035.

223. Higgs, M.R., H. Lerat, and J.M. Pawlotsky, *Hepatitis C virus-induced activation of beta-catenin promotes c-Myc expression and a cascade of pro-carcinogenetic events*. *Oncogene*, 2013. **32**(39): p. 4683-93.
224. Li, Z.Q., et al., *Hepatitis C virus core protein impairs metabolic disorder of liver cell via HOTAIR-Sirt1 signalling*. *Biosci Rep*, 2016. **36**(3).
225. Qian, X., et al., *Long non-coding RNA GAS5 inhibited hepatitis C virus replication by binding viral NS3 protein*. *Virology*, 2016. **492**: p. 155-65.
226. Nathalie Kin, A.V., *Les infections à coronavirus humains*. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2016. **2016**(487): p. 25-33.
227. Vabret, A., et al., [*Human coronaviruses*]. *Pathol Biol (Paris)*, 2009. **57**(2): p. 149-60.
228. Guan, Y., et al., *Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China*. *Science*, 2003. **302**(5643): p. 276-8.
229. Bohmwald, K., et al., *Neurologic Alterations Due to Respiratory Virus Infections*. *Front Cell Neurosci*, 2018. **12**: p. 386.
230. Zhou, J., et al., *Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: virus-host cell interactions and implications on pathogenesis*. *Virol J*, 2015. **12**: p. 218.
231. Masters, P.S., *The molecular biology of coronaviruses*. *Adv Virus Res*, 2006. **66**: p. 193-292.
232. Perlman, S. and J. Netland, *Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis*. *Nat Rev Microbiol*, 2009. **7**(6): p. 439-50.
233. Fehr, A.R. and S. Perlman, *Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1282**: p. 1-23.
234. de Wit, E., et al., *SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses*. *Nat Rev Microbiol*, 2016. **14**(8): p. 523-34.
235. de Wilde, A.H., et al., *Cyclophilins and cyclophilin inhibitors in nidovirus replication*. *Virology*, 2018. **522**: p. 46-55.
236. Cao, J., J.C. Forrest, and X. Zhang, *A screen of the NIH Clinical Collection small molecule library identifies potential anti-coronavirus drugs*. *Antiviral Res*, 2015. **114**: p. 1-10.
237. Khalid, M., et al., *Ribavirin and interferon-alpha2b as primary and preventive treatment for Middle East respiratory syndrome coronavirus: a preliminary report of two cases*. *Antivir Ther*, 2015. **20**(1): p. 87-91.
238. Lee, S., H.W. Kim, and K.H. Kim, *Antibodies against Hepatitis A and Hepatitis B Virus in Intravenous Immunoglobulin Products*. *J Korean Med Sci*, 2016. **31**(12): p. 1937-1942.
239. Xia, S., et al., *Peptide-Based Membrane Fusion Inhibitors Targeting HCoV-229E Spike Protein HR1 and HR2 Domains*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(2).
240. Cui, L., et al., *The Nucleocapsid Protein of Coronaviruses Acts as a Viral Suppressor of RNA Silencing in Mammalian Cells*. *J Virol*, 2015. **89**(17): p. 9029-43.
241. Lai, F.W., et al., *Human coronavirus OC43 nucleocapsid protein binds microRNA 9 and potentiates NF-kappaB activation*. *J Virol*, 2014. **88**(1): p. 54-65.
242. Zhao, X., et al., *miR-27b attenuates apoptosis induced by transmissible gastroenteritis virus (TGEV) infection via targeting runt-related transcription factor 1 (RUNX1)*. *PeerJ*, 2016. **4**: p. e1635.
243. Ma, Y., et al., *The Coronavirus Transmissible Gastroenteritis Virus Evades the Type I Interferon Response through IRE1alpha-Mediated Manipulation of the MicroRNA miR-30a-5p/SOCS1/3 Axis*. *J Virol*, 2018. **92**(22).
244. Ma, X., et al., *Differentially expressed non-coding RNAs induced by transmissible gastroenteritis virus potentially regulate inflammation and NF-kappaB pathway in porcine intestinal epithelial cell line*. *BMC Genomics*, 2018. **19**(1): p. 747.
245. Morales, L., et al., *SARS-CoV-Encoded Small RNAs Contribute to Infection-Associated Lung Pathology*. *Cell Host Microbe*, 2017. **21**(3): p. 344-355.
246. Kaul, A., et al., *Cell culture adaptation of hepatitis C virus and in vivo viability of an adapted variant*. *J Virol*, 2007. **81**(23): p. 13168-79.

247. Boukadida, C., et al., *NS2 proteins of GB virus B and hepatitis C virus share common protease activities and membrane topologies*. J Virol, 2014. **88**(13): p. 7426-44.
248. Liu, F., et al., *Efficient Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Combination Treatment with miR-122 Antagonism and Direct-acting Antivirals in Cell Culture Systems*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 30939.
249. Colman, H., et al., *Genome-wide analysis of host mRNA translation during hepatitis C virus infection*. J Virol, 2013. **87**(12): p. 6668-77.
250. Diaz-Moreno, I., et al., *Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(3): p. 238-46.
251. Hou, R., et al., *SLC14A1: a novel target for human urothelial cancer*. Clin Transl Oncol, 2017. **19**(12): p. 1438-1446.
252. An, H., et al., *Inscuteable maintains type I neuroblast lineage identity via Numb/Notch signaling in the Drosophila larval brain*. J Genet Genomics, 2017. **44**(3): p. 151-162.
253. Sutherland, M.R., W. Ruf, and E.L. Pryzdial, *Tissue factor and glycoprotein C on herpes simplex virus type 1 are protease-activated receptor 2 cofactors that enhance infection*. Blood, 2012. **119**(15): p. 3638-45.
254. Khoufache, K., et al., *Protective role for protease-activated receptor-2 against influenza virus pathogenesis via an IFN-gamma-dependent pathway*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7795-802.
255. Weithauser, A., et al., *Protease-activated receptor-2 regulates the innate immune response to viral infection in a coxsackievirus B3-induced myocarditis*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(19): p. 1737-45.
256. Yu, C.C., et al., *KCNN2 polymorphisms and cardiac tachyarrhythmias*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(29): p. e4312.
257. Freeman, R.S., et al., *NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand?* Prog Brain Res, 2004. **146**: p. 111-26.
258. Begum, N., W. Shen, and V. Manganiello, *Role of PDE3A in regulation of cell cycle progression in mouse vascular smooth muscle cells and oocytes: implications in cardiovascular diseases and infertility*. Curr Opin Pharmacol, 2011. **11**(6): p. 725-9.
259. Liang, X.H., et al., *Non-coding RNA LINC00473 mediates decidualization of human endometrial stromal cells in response to cAMP signaling*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 22744.
260. Serretti, A., A. Drago, and D. De Ronchi, *HTR2A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies*. Curr Med Chem, 2007. **14**(19): p. 2053-69.
261. Bao, Y., et al., *Expression and evolutionary conservation of the tescalcin gene during development*. Gene Expr Patterns, 2009. **9**(5): p. 273-81.
262. Wang, Y., et al., *Long non-coding RNA LINC00161 sensitises osteosarcoma cells to cisplatin-induced apoptosis by regulating the miR-645-IFIT2 axis*. Cancer Lett, 2016. **382**(2): p. 137-146.
263. Sanchis-Gomar, F., et al., *Mitochondrial biogenesis in health and disease. Molecular and therapeutic approaches*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(35): p. 5619-33.
264. Shalaby, R.E., et al., *PGC1alpha Transcriptional Adaptor Function Governs Hepatitis B Virus Replication by Controlling HBcAg/p21 Protein-Mediated Capsid Formation*. J Virol, 2017. **91**(20).
265. Bernsmeier, C., et al., *Hepatitis C virus dysregulates glucose homeostasis by a dual mechanism involving induction of PGC1alpha and dephosphorylation of FoxO1*. J Viral Hepat, 2014. **21**(1): p. 9-18.
266. Quantius, J., et al., *Influenza Virus Infects Epithelial Stem/Progenitor Cells of the Distal Lung: Impact on Fgfr2b-Driven Epithelial Repair*. PLoS Pathog, 2016. **12**(6): p. e1005544.
267. Mizuta, K., et al., *TMEM100: A Novel Intracellular Transmembrane Protein Essential for Vascular Development and Cardiac Morphogenesis*, in *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease: From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology*, T. Nakanishi, et al., Editors. 2016: Tokyo. p. 169-170.

268. Weng, H.J., et al., *Tmem100 Is a Regulator of TRPA1-TRPV1 Complex and Contributes to Persistent Pain*. *Neuron*, 2015. **85**(4): p. 833-46.
269. Saigusa, K., et al., *RGC32, a novel p53-inducible gene, is located on centrosomes during mitosis and results in G2/M arrest*. *Oncogene*, 2007. **26**(8): p. 1110-21.
270. Pistoni, M., et al., *Chromatin association and regulation of rDNA transcription by the Ras-family protein RasL11a*. *EMBO J*, 2010. **29**(7): p. 1215-24.
271. Sanuki, R., et al., *Panky, a novel photoreceptor-specific ankyrin repeat protein, is a transcriptional cofactor that suppresses CRX-regulated photoreceptor genes*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(4): p. 753-8.
272. Spaziani, A., et al., *Role of p38 MAPK and RNA-dependent protein kinase (PKR) in hepatitis C virus core-dependent nuclear delocalization of cyclin B1*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(16): p. 10983-9.
273. Lai, C.K., et al., *Hepatitis C virus NS3/4A protein interacts with ATM, impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation*. *Virology*, 2008. **370**(2): p. 295-309.
274. Shawki, S.M., et al., *Increased DNA damage in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma*. *DNA Cell Biol*, 2014. **33**(12): p. 884-90.
275. Diaz-Moreno, I., et al., *Orientation of the central domains of KSRP and its implications for the interaction with the RNA targets*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(15): p. 5193-205.
276. Liu, W. and C. Ding, *Roles of LncRNAs in Viral Infections*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 205.
277. Bayoumi, A.S., et al., *Crosstalk between Long Noncoding RNAs and MicroRNAs in Health and Disease*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(3): p. 356.
278. Madan, V., et al., *Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(5): p. 1361-72 e1-9.