



**HAL**  
open science

# Identification et caractérisation de facteurs impliqués dans la réponse cellulaire aux ARN double brin

Olivier Petitjean

► **To cite this version:**

Olivier Petitjean. Identification et caractérisation de facteurs impliqués dans la réponse cellulaire aux ARN double brin. Biologie cellulaire. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAJ110 . tel-03934736

**HAL Id: tel-03934736**

**<https://theses.hal.science/tel-03934736>**

Submitted on 11 Jan 2023

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

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

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**Institut de biologie moléculaire et cellulaire de Strasbourg**

**Architecture et réactivité de l'ARN – UPR9002**

**THÈSE** présentée par :

**Olivier PETITJEAN**

soutenue le : **18 septembre 2020**

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

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie**

**Identification et caractérisation de  
facteurs impliqués dans la réponse  
cellulaire aux ARN double brin.**

**THÈSE dirigée par :**  
**PFEFFER Sébastien**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**  
**CIAUDO Constance**  
**SALEH Carla**

Assistant professeur, ETH Zurich  
Professeur des universités, Institut Pasteur

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**  
**IMLER Jean-Luc**  
**VIVES Romain**

Professeur des universités, Université de Strasbourg  
Directeur de recherche, Université de Grenoble



# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude aux Pr. Constance Ciaudo, Pr. Carla Saleh, Pr. Jean-Luc Imler et au Dr. Romain Vivès qui ont accepté d'être rapporteurs et examinateurs de ce manuscrit de thèse.

Je remercie une seconde fois les Pr. Constance Ciaudo et Jean-Luc Imler pour leur participation à mon comité de mi-thèse et pour m'avoir apporté des conseils qui m'ont été utiles afin de terminer ma thèse dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie le Dr. Sébastien Pfeffer pour m'avoir accueilli et pour avoir dirigé mes travaux au sein de son laboratoire pour ces quelques années, mais aussi pour les discussions scientifiques que l'on a pu avoir.

Merci aussi au Dr. Erika Girardi pour l'encadrement de mes travaux de thèse, c'est à ses côtés que j'ai appris à être plus rigoureux. Sans oublier ses nombreux conseils et nos discussions qui m'ont beaucoup apporté.

Je remercie tous mes collègues et mes camarades de thèse avec qui nous avons pu échanger nos connaissances, partager nos échecs et nos réussites.

Merci bien sûr à ma famille et à mes amis pour leur soutien indéfectible.



# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I. PREFACE</b> .....	<b>1</b>
<b>II. VIRUS ET EVOLUTION HOTE-PATHOGENE</b> .....	<b>3</b>
A. GENERALITES SUR LES VIRUS .....	3
B. CYCLE D'UN VIRUS A ARN .....	4
i. Généralités sur les virus à ARN .....	4
ii. Le virus de SINV – Généralités .....	5
iii. Le virus de SINV – Cycle .....	6
iv. Les hôtes de SINV et leur réponse antivirale .....	9
C. ADAPTATION DES MECANISMES DE DEFENSE ANTIVIRAUX .....	9
<b>III. L'EVOLUTION DE LA LUTTE CONTRE LES ACIDES NUCLEIQUES</b> .....	<b>11</b>
A. CHEZ LES PROCARYOTES .....	11
B. CHEZ LES EUCARYOTES .....	11
i. Les acides nucléiques exogènes .....	12
ii. L'interférence par ARN .....	13
iii. La réponse IFN .....	17
iv. Incompatibilité ARNi et IFN .....	22
<b>IV. APPROCHE GLOBALE D'INACTIVATION GENIQUE AFIN ETUDIER LA REPONSE ANTIVIRALE CHEZ LES MAMMIFERES</b> .....	<b>37</b>
A. INTRODUCTION AU PRINCIPE DU CRIBLE .....	37
B. MUTAGENESE ALEATOIRE – LES AGENTS PHYSIQUE/CHIMIQUE ET LES ELEMENTS MOBILES .....	37
C. SUPPRESSION PARTIELLE OU TOTALE .....	38
i. Généralités sur les cribles .....	38
ii. Suppression totale – Les cribles CRISPR .....	41
iii. Les cribles ARNi – Suppression partielle .....	45
D. IDENTIFICATION DES FACTEURS DE L'HOTE IMPLIQUES DANS L'INFECTION VIRALE EN UTILISANT DES CRIBLES A HAUT DEBIT .....	47
<b>V. OBJECTIFS</b> .....	<b>49</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>50</b>
<b>I. IDENTIFICATION DES FACTEURS IMPLIQUES DANS LA SURVIE CELLULAIRE EN REPONSE AUX ARNDB (SYNTHETIQUES OU VIRAUX)</b> .....	<b>50</b>
A. LA LIGNEE HCT116 EST ADAPTEE POUR NOTRE APPROCHE CRISPR-CAS9 .....	50
B. "GENOME-WIDE CRISPR-CAS9 SCREEN REVEALS COMMON FACTORS IN dsRNA AND SINDBIS VIRUS-INDUCED CELL DEATH" .....	52
<b>II. IDENTIFICATION DES FACTEURS IMPLIQUES DANS L'(IN)COMPATIBILITE ENTRE L'ARNI ET LA REPONSE IFN</b> <b>80</b>	
A. MISE EN PLACE D'UN SYSTEME RAPPORTEUR DE L'ARNI .....	80
i. Système TEV .....	80
ii. Le système PGK .....	84
B. LA PERTE DE L'EXPRESSION DE PKR NE RESTAURE PAS L'ARNI DANS LES HCT116 .....	93
C. CRIBLE CRISPR-CAS9 PAR PERTE DE FONCTION POUR IDENTIFIER LES FACTEURS DE RESTRICTION DE L'ARNI .....	95
D. ANALYSE BIO-INFORMATIQUE DU CRIBLE .....	96

E.	VALIDATIONS DES GENES DU CRIBLE .....	100
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>104</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>		<b>113</b>
A.	PLASMIDES ET SIARN .....	113
B.	CULTURE CELLULAIRE .....	114
C.	VIRUS .....	115
D.	REALISATION DES LIGNEES KO .....	115
E.	TESTS DE VIABILITE CELLULAIRE .....	116
F.	ADRESSAGE D'ACIDES NUCLEIQUES DANS LES CELLULES .....	117
G.	PREPARATION D'ARN DOUBLE BRIN .....	117
H.	CRIBLES CRISPR-CAS9 .....	118
I.	MICROSCOPIE ET CYTOMETRIE .....	120
J.	ANALYSE PAR QPCR .....	121
K.	ANALYSE NORTHERN BLOT DE LA FORMATION DE SIARN .....	121
<b>REFERENCES .....</b>		<b>122</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>147</b>

# Tables des illustrations

## Figures

FIGURE 1 – CLASSIFICATION DE BALTIMORE. ....	3
FIGURE 2 – CYCLE VIRAL SIMPLIFIE D'UN VIRUS A ARN DE POLARITE POSITIVE. ....	5
FIGURE 3 - GENOME DE SINV. ....	5
FIGURE 4 – REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE DU VIRUS DE SINDBIS. ....	8
FIGURE 5 – MODELE DE COEVOLUTION DES ORGANISMES CELLULAIRES ET DES ELEMENTS LES PARASITANT. ....	10
FIGURE 6 – EVOLUTION DES SYSTEMES DE DEFENSE ANTIVIRAUX DES ORGANISMES CELLULAIRES. ....	10
FIGURE 7 – RECONNAISSANCE DES ACIDES NUCLEIQUES EXOGENES. ....	12
FIGURE 8 – VOIE DES siARN ET DES miARN. ....	16
FIGURE 9 – SCHEMA RECAPITULATIF DE LA REPONSE IFN-I. ....	21
FIGURE 10 – LES CRIBLES SUR PLAQUE. ....	39
FIGURE 11 – LES CRIBLES SOUS FORME DE POPULATION. ....	40
FIGURE 12 - REPRESENTATION DE SpCas9. ....	43
FIGURE 13 – INACTIVATION GENIQUE EN UTILISANT CRISPR-Cas9. ....	45
FIGURE 14 – SENSIBILITE DES CELLULES HCT116 AUX ACIDES NUCLEIQUES ET A L'INFECTION PAR SINV. ....	51
FIGURE 15 – DOSAGE DE L'ARNM DE L'IFN-B. ....	52
FIGURE 16 – VOIE SIMPLIFIEE DE LA BIOGENESE DES HEPARANES SULFATES. ....	54
FIGURE 17 – REPRESENTATION DE L'IMPLICATION DU COMPLEXE COG DANS LE TRAFIC VESICULAIRE RETROGRADE. ....	55
FIGURE 18 - VISUALISATION DU RETABLISSEMENT DE L'ARNi GRACE A L'APPARITION DE FLUORESCENCE. ....	81
FIGURE 19 – ILLUSTRATION DU SYSTEME RAPPORTEUR SPLIT-GFP. ....	82
FIGURE 20 - TRANSFECTION DU SYSTEME TEV. ....	83
FIGURE 21 – COMPARAISON DE LA TRANSFECTION DU SYSTEME TEV ENTRE HEK293T ET HEK293T-TEV. ....	84
FIGURE 22 – REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME RAPPORTEUR AVEC DEUX PROTEINES FLUORESCENTES. ....	85
FIGURE 23 – MISE EN PLACE DE LA LIGNEE MONOCLONALE HCT116-Cas9-CITRINE/mCHERRY. ....	86
FIGURE 24 – LA LIGNEE HCT116-Cas9-CITRINE/mCHERRY EST SENSIBLE AUX siARNS. ....	87
FIGURE 25 – LA LIGNEE HCT116-Cas9-CITRINE/mCHERRY EST SENSIBLE AUX ARNDB. ....	88
FIGURE 26 – SURVIE A L'ARNDB DES DIFFERENTES LIGNEES HEK293T. ....	90
FIGURE 27 – PRODUCTION DE siARN DANS LES LIGNEES HEK293T NODiceΔPKR COMPLEMENTEES. ....	91
FIGURE 28 – FONCTIONNALITE DU SYSTEME PPGK. ....	92
FIGURE 29 – SENSIBILITE DES HCT116-Cas9-CITRINE/mCHERRY-ΔPKR AUX ARNDB. ....	94
FIGURE 30 – CRIBLE CRISPR-Cas9 POUR VISUALISER LE RETABLISSEMENT DE L'INTERFERENCE PAR ARN. ....	95
FIGURE 31 – INSTANTANE REPRESENTANT L'ETAPE DU TRI PAR CYTOMETRIE EN FLUX DES CELLULES DU CRIBLE. ....	96
FIGURE 32 – PROTOCOLE D'IDENTIFICATION DES GENES IMPLIQUES DANS LE RETABLISSEMENT DE L'ARNi. ....	99
FIGURE 33 – B4GALT7 ET INTERFERENCE PAR ARN. ....	101
FIGURE 34 – COG4 ET INTERFERENCE PAR ARN. ....	102
FIGURE 35 – ARN TOTAL DE HEK293T ± KO COG4 TRANSFECTEES AVEC DE L'ARNDB Cy5. ....	103



## Tableaux

<b>TABLEAU 1 – ABONDANCE DES PROTEINES ARGONAUTE ET COPIES DU GENE DICER EN FONCTION DES ORGANISMES.</b> .....	17
<b>TABLEAU 2 - LIGAND ET ACTIVITE DES PROTEINES AVEC ACTIVITE DIRECTE APRES RECONNAISSANCE DE L'ARNDB.</b> .....	19
<b>TABLEAU 3 – LOCALISATION ET LIGAND DES DIFFERENTS PRR.</b> .....	19
<b>TABLEAU 4 – RECAPITULATIF DES DERNIERS VSR OBSERVES.</b> .....	33
<b>TABLEAU 5 - AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES APPROCHES SOUS FORME DE POPULATION OU SUR PLAQUE</b> .....	41
<b>TABLEAU 6 – CARACTERISTIQUES DES PRINCIPALES TECHNIQUES GLOBALES D'INACTIVATION GENIQUE.</b> .....	46
<b>TABLEAU 7 – ALIGNEMENT DES SEQUENCES EN UTILISANT MAGECK.</b> .....	97
<b>TABLEAU 8 – DENOMBREMENT DES ARNG ET DETERMINATION DE L'INDEX GINI EN UTILISANT MAGECK.</b> .....	97
<b>TABLEAU 9 – TAUX DE FAUSSE DECOUVERTE DE GENES ENRICHIS DANS LES ECHANTILLONS TRIES.</b> .....	98
<b>TABLEAU 10 – TABLEAU DES PLASMIDES ET siARN UTILISES LORS DE LA THESE.</b> .....	113
<b>TABLEAU 11 – TABLEAU DES CELLULES UTILISES LORS DE LA THESE.</b> .....	114
<b>TABLEAU 12 – LISTE DES DIFFERENTS GUIDES UTILISES POUR REALISER LES KO.</b> .....	115
<b>TABLEAU 13 – RECAPITULATIF DES DIFFERENTES AMORCES UTILISEES POUR CRIBLER LES KO PAR PCR.</b> .....	116
<b>TABLEAU 14 – SEQUENCE DES AMORCES UTILISEES POUR LA PRODUCTION DE L'ARNDB.</b> .....	117
<b>TABLEAU 15 – LISTE DES AMORCES UTILISEES POUR LE SEQUENÇAGE ILLUMINA</b> .....	120

# Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AGO : Argonaute

ARN : acide ribonucléique

ARNi : interférence par ARN

ARNm : ARN messager

Cas : protéine associée au locus CRISPR

CHS : chalcone synthase

CMV : cytomégalo virus humain

COG : Complexe oligomérique conservé de l'appareil de Golgi

crARN : ARN CRISPR

CRISPR : courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées

CRISPRi : inactivation de la transcription par CRISPR

Cy5 : cyanine5

db : double brin

dCas9 : Cas9 dont les sites catalytiques ne sont plus fonctionnels

DNase : désoxyribonucléase

EMS : méthanesulfonate d'éthyle

FACS : tri cellulaire induit par fluorescence

FDR : taux de fausse découverte

FH : facteurs de l'hôte

GAG : Glycosaminoglycanes

GFP : protéine fluorescente verte

GlcA : acide glucuronique

GlcNAc : N-Acetylglucosamine

HCS : crible à haut contenu

HCT116 : lignée tumorale de colon humain 116

HEK293T : lignée de rein d'embryon humain 293T

hNPC : cellule progénitrice de neurones humain

HS : héparanes sulfates

HSPG : Protéoglycane à héparane sulfate

IFN : interféron

IFNAR : récepteur de l'interféron- $\alpha/\beta$

IFNGR : récepteur de l'interféron- $\gamma$

ISG : gènes induits par l'interféron

KD : *knockdown* (délétion transitoire)

KO /  $\Delta$  : *knockout* (délétion)

miARN : microARN

MOI : multiplicité d'infection

MTS : signal de translocation mitochondrial

NES : signal d'exportation nucléaire

NHEJ : jonction d'extrémités non homologues

NLS : signal de localisation nucléaire

NMD : dégradation des ARN non sens

PAM : motif adjacent au protospacer

PAPS : 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate

PGK : phosphoglycerate-kinase

piARN : ARN interagissant avec Piwi

pPGK : plasmide miReporter-PGK

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

RFP : protéine rouge fluorescente

RISC : complexe d'interférence induit par l'ARN

RLR : récepteur de type RIG-I

RNase : ribonucléase

RT-qPCR - PCR quantitative en temps réel

sb : simple brin

sgARN : ARN guide unique

shARN : ARN à petite tige-boucle

siARN : petit ARN interférent

SINV : virus de Sindbis

SKL : signal d'adressage au péroxysome

sTEV : séquence de clivage par la protéase TEV

TALEN : nucléase effectrice de type activateur de la transcription

TEV : protéase du virus de la gravure du tabac

TLR : récepteur de type Toll

tracrARN : crARN *trans* activateur

TSS : site de départ de la transcription

VSR : Suppresseur viral de l'interférence par ARN

ZFN : nucléase à doigt de zinc

# Introduction

## I. Préface

Les premières lignes de cette introduction ont été rédigées lors du confinement mis en place pour lutter contre l'épidémie de COVID-19 causée par le SARS-CoV-2 (Park, 2020). Cette situation exceptionnelle met en lumière l'importance de la virologie dans le monde contemporain. En dépit d'avancées scientifiques constantes, les virus restent des causes majeures de maladies, de morbidité et de mortalité avec de lourdes conséquences économiques. L'étude des virus est cruciale pour mieux comprendre le virus contre lequel nous sommes en lutte. Pourquoi l'hôte infecté présente ces symptômes ? Quels sont les mécanismes qui en sont responsables ? Comment ces symptômes peuvent être expliqués à l'échelle de la cellule ? Sont autant de questions dont les réponses peuvent être obtenues grâce à la recherche fondamentale.

La virologie a contribué à de nombreuses révolutions de la biologie contemporaine (ADN support de l'information génétique, transcriptase inverse) et c'est à ce sujet qu'avec d'autres camarades de master, nous avons rédigé une revue sous la direction du professeur David Gilmer (Bellott *et al.*, 2017 - Disponible en annexe).

Contrairement aux autres microorganismes, les virus sont incapables de se répliquer indépendamment de leur hôte. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires qui détournent les fonctions de la cellule qu'ils infectent afin de s'amplifier. Ce parasitage associé à une capacité d'altération et de transfert de l'information génétique, au même titre que les transposons, fait des virus un moteur fondamental de l'évolution du vivant (Koonin & Dolja, 2013). Cependant, il peut être nécessaire de freiner l'évolution et la dissémination de ces éléments génétiques au sein d'un organisme afin de préserver l'intégrité génétique de l'hôte. C'est pour cette raison que toutes les espèces vivantes sur notre planète ont mis en place des systèmes permettant la reconnaissance et la lutte contre ces pathogènes. Cette lutte perpétuelle entre hôte et pathogène est au centre des travaux qui vont être présentés dans cette thèse.

Pour cette introduction, nous allons dans un premier temps nous intéresser aux virus et à leur importance dans l'évolution hôte-pathogène avant de se focaliser sur les virus à ARN et plus particulièrement à notre virus modèle, le virus de Sindbis (SINV).

Dans un second temps, nous allons décrire les réponses antivirales majoritaires qui ont été mises en place au niveau cellulaire au sein des organismes supérieurs : la réponse interféron (IFN) et

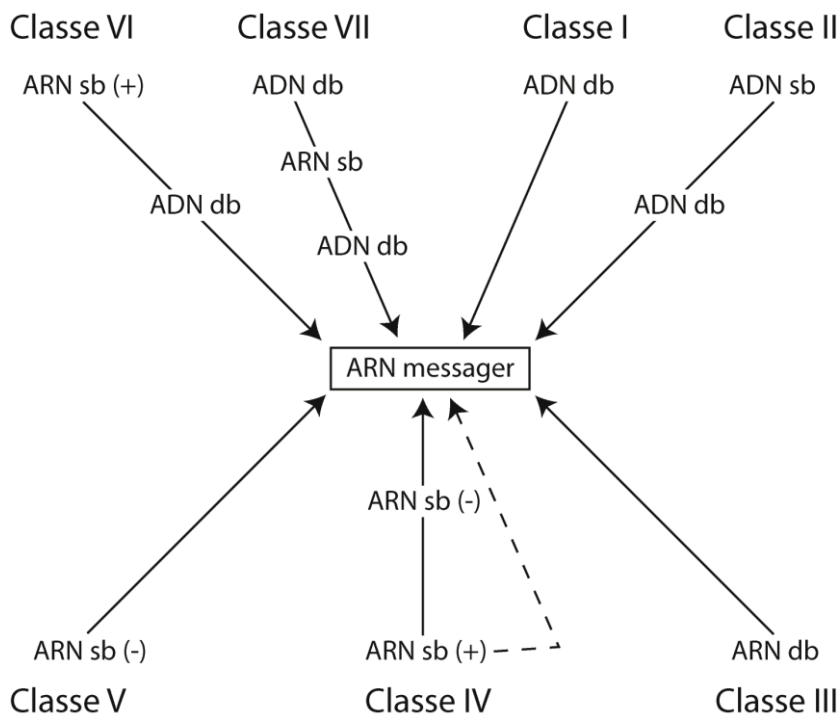
l'interférence par ARN (ARNi). Nous verrons que ces réponses ne sont pas mutuellement exclusives, et présenterons l'état de l'art sur le lien entre la réponse IFN et l'ARNi chez les mammifères.

Dans un dernier temps, nous allons présenter les différentes techniques pouvant être mises en place afin d'approfondir la connaissance de la réponse cellulaire aux ARNdb avant de présenter l'objectif de la thèse.

## II. Virus et évolution hôte-pathogène

### a. Généralités sur les virus

Les virus sont des entités présentes dans tous les habitats connus, infectant toutes les formes de vie sur notre planète, même celles dont on a longtemps pensé qu'elles étaient résistantes aux infections virales telles que les nématodes (Félix *et al.*, 2011) et les copépodes (Dunlap *et al.*, 2013). Contrairement aux formes de vie cellulaires qui se basent sur l'ADN double brin (db) pour stocker l'information génétique et qui utilisent comme intermédiaire un ARN messenger (ARNm) simple brin (sb) de polarité positive comme matrice pour la traduction des protéines, les virus possèdent diverses manières de stockage de l'information génétique. Ainsi, la classification de Baltimore recense les différents types de virus en fonction de la nature de leur acide nucléique génomique et sa manière de l'exprimer (Baltimore, 1971 ; King, 2012) (Figure 1).



**Figure 1 – Classification de Baltimore.**

La classification de Baltimore est composée de 7 classes distinctes qui diffèrent en fonction de la nature du génome viral (ADN, ARN, simple brin (sb) ou double brin (db)) et de sa manière de l'exprimer en ARNm. L'ARN messenger étant toujours la forme nécessaire pour l'expression des protéines virales, les intermédiaires permettant la production de l'ARNm à partir du génome viral sont indiqués sur le long des flèches menant à l'ARNm. Les pointillés représentent la possibilité de l'ARNsb génomique à être directement utilisé en tant qu'ARNm. + et - représentent la polarité de l'ARNdb.

Les virus ne sont pas seulement ubiquitaires et diversifiés, ils représentent également l'entité biologique la plus abondante sur Terre (Mushegian, 2020), à savoir un nombre de particules virales de l'ordre de  $10^{31}$ . Si l'on souhaite faire un bref aparté vis-à-vis de ce nombre gargantuesque, on pourrait souligner le fait qu'il est actuellement estimé qu'il y a dans l'océan 1 000 fois plus de bactéries que de protistes, et que les virus sont approximativement 10 fois plus nombreux que ces bactéries. A titre de comparaison, la quantité de virus dans un litre d'eau océanique est supérieure à la population humaine sur terre. Pour reprendre le chercheur Curtis A. Suttle « Si les aliens prélevaient aléatoirement un bout de notre planète, ils observeraient

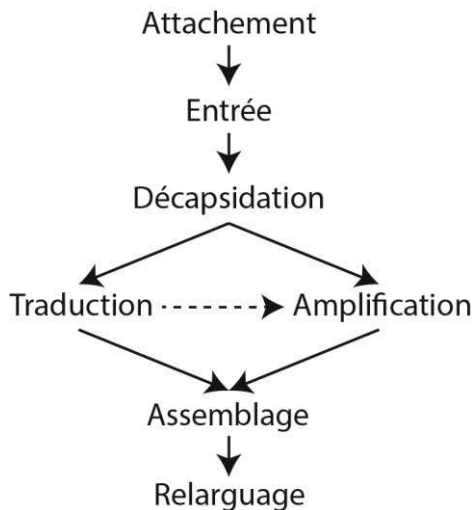
une planète dominée par la vie microbienne, surreprésentée par les virus » (Suttle, 2013). Pourtant ces virus ne représentent qu'une faible proportion de notre biomasse totale, approximativement 1/2750<sup>ème</sup> (Bar-On *et al.*, 2018).

## b. Cycle d'un virus à ARN

### i. Généralités sur les virus à ARN

Dans ce manuscrit, nous allons nous intéresser aux virus à ARN de polarité positive (Classe IV). Ces virus sont abondants chez les eucaryotes et représentent l'agent étiologique de nombreuses maladies telles que l'hépatite C (HCV), chikungunya (CHIKV), la dengue (DENV), Zika (ZIKV), la fièvre jaune (YFV), le rhume commun (HRV) et les très actuels virus causant des détresses respiratoires de la famille des coronavirus (MERS, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2). Les virus à ARN de polarité positive peuvent-être classés en superfamilles distinctes (*Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*), néanmoins, les similarités entre leurs mécanismes de réplication permettent de présenter SINV, virus modèle des *Togaviridae* utilisé tout au long de ma thèse, sans pour autant s'éloigner du cycle viral canonique des virus de classe IV (Figure 1 & Figure 2).

Ce cycle débute par l'attachement de la particule virale à la surface cellulaire afin de permettre son entrée au sein de la cellule. Après avoir pénétré dans la cellule, la particule virale se décapside afin de libérer le génome viral dans le cytoplasme. Étant donné que le génome est un ARN de polarité positive, il est directement pris en charge par la machinerie cellulaire et est traduit afin de produire les protéines non structurales dans un premier temps et les protéines structurales dans un second temps. D'abord, le génome va être amplifié grâce aux protéines virales non structurales néosynthétisées en concert avec des protéines cellulaires. Puis, les protéines structurales sont exprimées afin de compléter le cycle viral lors de la génération de nouvelles particules infectieuses. Une fois relarguées dans le milieu extracellulaire, ces particules vont renouveler ce cycle infectieux (Figure 2).

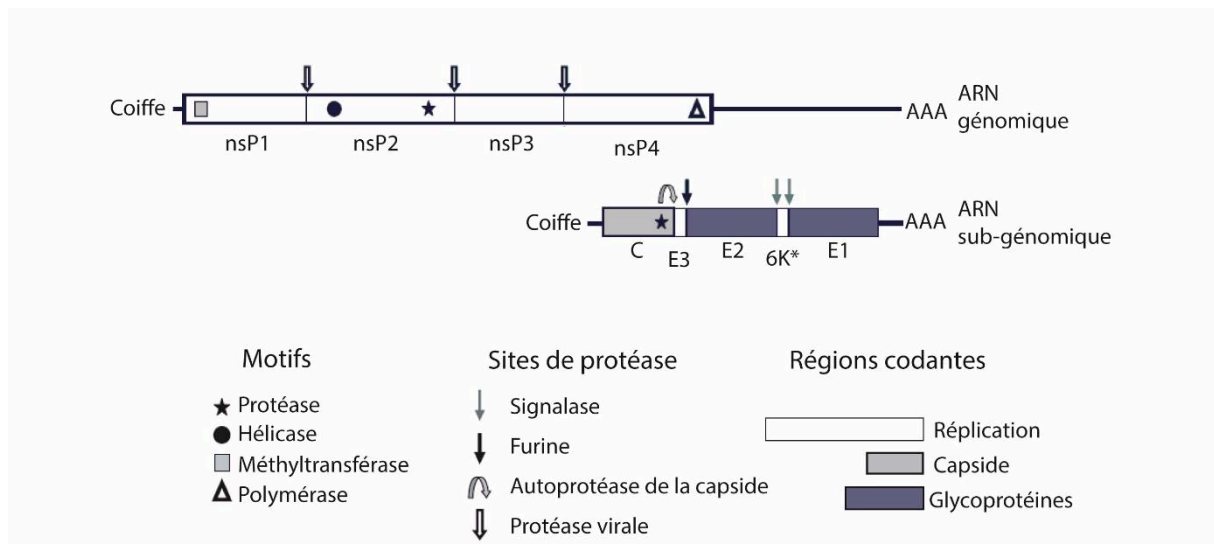


**Figure 2 – Cycle viral simplifié d'un virus à ARN de polarité positive.**

Après s'être attaché sur la surface cellulaire, la capsid virale pénètre dans la cellule puis le génome viral est décapsidé. Le génome est un ARN de polarité positive qui va être directement traduit afin de produire les protéines structurales et non structurales qui vont pouvoir, en utilisant aussi des facteurs de l'hôte, amplifier le génome viral. Les génomes viraux ainsi amplifiés vont être encapsidés pour produire de nouvelles particules virales qui vont pouvoir être relarguées dans le milieu extracellulaire et renouveler ce cycle.

### ii. Le virus de SINV – Généralités

Le virus de Sindbis est le virus modèle de la famille des *Togaviridae*, constituée uniquement du genre *Alphavirus*. Les *Togaviridae* sont une famille de petits virus enveloppés (65-70 nm) avec des génomes à ARNs non segmentés de polarité positive de 10 à 12 kb. Le génome possède une coiffe en 5' et une queue poly-A en 3' (Figure 3). L'ARN de polarité négative produit pour former l'intermédiaire de réplication ne possède ni coiffe, ni queue poly-A. Un ARN subgénomique codant pour les protéines structurales est transcrit à partir de l'ARN de polarité négative et possède une coiffe 5' et une queue poly-A 3' (Figure 3).



**Figure 3 - Génome de SINV.**

Les ARN (sub)génomiques possèdent une coiffe en 5' et une queue poly A en 3'. L'ARN génomique permet l'expression des protéines impliquées dans la réplication du virus, l'ARN subgénomique permet l'expression des protéines structurales (capsid et glycoprotéines). Les protéines sont traduites sous forme de polyprotéines dont les motifs et la maturation par les différentes activités protéasiques sont indiquées sur le schéma (Adapté de Fields *et al.*, 2013).

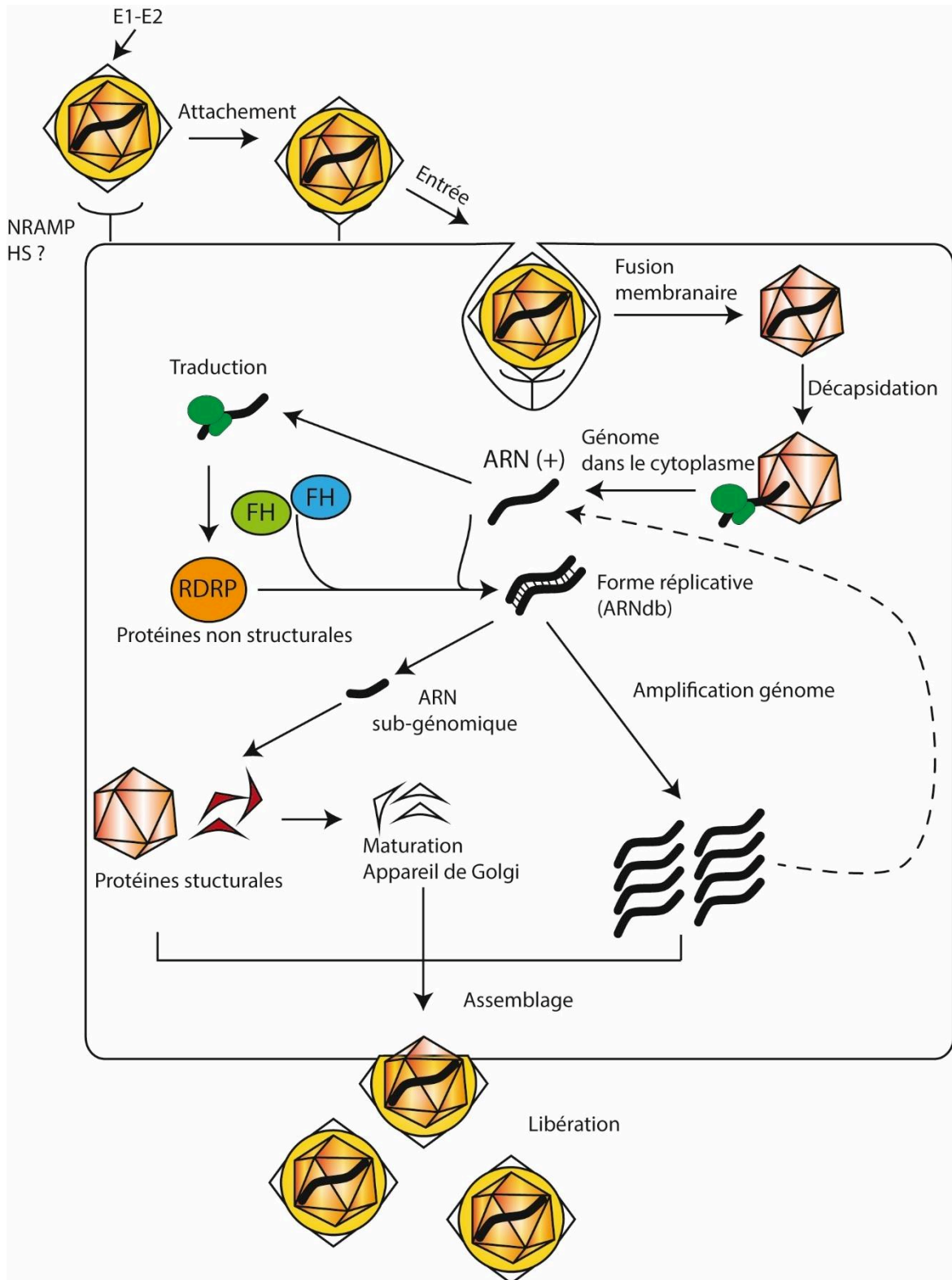
### iii. Le virus de SINV – Cycle

La Figure 4 est un récapitulatif des étapes fondamentales du cycle infectieux du virus de SINV. L'attachement de SINV est principalement dirigé par l'interaction de la protéine virale E2 avec les récepteurs NRAMP (Rose *et al.*, 2011). L'implication des héparanes-sulfates (HS) dans l'infection est encore débattue car il semblerait que cela soit plutôt un biais de sélection en culture cellulaire (Byrnes & Griffin, 2000, 1998; Klimstra *et al.*, 1998). En raison des résidus fortement sulfatés des HS, ces derniers présentent une charge négative globale qui peut interagir électrostatiquement avec les résidus basiques des glycoprotéines de surface virales des virus enveloppés ou des protéines de capsid virale des virus non enveloppés et sont ainsi régulièrement identifiés en tant que facteur d'attachement viral (Barth *et al.*, 2003; Bose & Banerjee, 2002; Byrnes & Griffin, 1998; Rusnati *et al.*, 2009; Vlasak *et al.*, 2005). Après reconnaissance et interaction avec le récepteur de SINV, la particule virale pénètre dans la cellule par endocytose clathrine-dépendante (DeTulleo & Kirchhausen, 1998) et la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme par fusion membranaire (Glomb-Reinmund & Kielian, 1998). La nucléocapside se désagrège par interaction des protéines de capsid avec les ribosomes pour relarguer le génome viral dans le cytoplasme (Wengler & Wengler, 1984, 2002). Une fois dans le cytoplasme, l'ARN génomique de SINV est utilisé en tant qu'ARN messenger pour la synthèse des protéines non-structurales impliquées dans la réplication du virus. Ces protéines sont exprimées à partir d'une polyprotéine qui doit être clivée afin d'obtenir des protéines fonctionnelles (pour revue : Fields *et al.*, 2013). La réplication du génome est initiée à la surface cytoplasmique d'endosomes/lysosomes et forme une structure nommée sphérule. La réplication, induite par les protéines virales non-structurales avec l'aide de facteurs de l'hôte (FH) va produire des ARN de polarité négative qui vont servir de matrice pour produire les ARN génomique et subgénomique viraux (Froshauer *et al.*, 1988). Il faut noter que c'est lors de cette étape qu'est généré un intermédiaire de réplication, l'ARN double brin. Cet ARNdb est hautement immunogène car synonyme de réplication virale, comme nous verrons plus tard dans ce manuscrit.

Les protéines structurales sont issues de la traduction de l'ARN subgénomique et sont modifiées et maturées dans la partie *trans* de l'appareil de Golgi (Zhang *et al.*, 2003). Le cycle viral se termine par l'association des protéines structurales (capsid avec glycoprotéines) afin de promouvoir le bourgeonnement de la nucléocapside contenant le génome viral (Jose *et al.*, 2012) lors duquel le virus acquiert son enveloppe.



Le virion mature de SINV est composé d'unités répétées des glycoprotéines transmembranaires E1 et E2. E1 est impliquée dans la fusion membranaire (Garoff *et al.*, 1980; Omar & Koblet 1988; Wahlberg & Garoff 1992) et E2 dans la fixation des récepteurs (Byrnes & Griffin, 1998; Klimstra *et al.*, 1998). De plus, le virion mature est constitué des protéines de capsid, d'une enveloppe lipidique provenant de l'hôte et d'une molécule d'ARN génomique (Paredes *et al.*, 1993). Le virion existe aussi sous une forme immature dans laquelle la protéine E2 n'est pas maturée mais est sous une forme précurseur (PE2) afin de stabiliser la protéine de fusion lors de son transit dans l'environnement acide de l'appareil de Golgi (Paredes *et al.*, 1998).



**Figure 4 – Représentation schématique du cycle du virus de Sindbis.**

Après attachement et endocytose, la nucléocapside de SINV est libérée dans le cytoplasme par fusion membranaire. La nucléocapside se désagrège afin de relarguer le génome viral dans le cytoplasme. L'ARN génomique cytoplasmique est directement traduit afin de produire les protéines non structurales qui, avec l'aide de facteurs de l'hôte (FH) permettent la production de la forme répliquative du virus qui est un ARNdb. De cette forme répliquative le génome est amplifié et un ARN subgénomique est produit afin de produire les protéines structurales qui vont être maturées dans l'appareil de Golgi. Les génomes néosynthétisés et les protéines

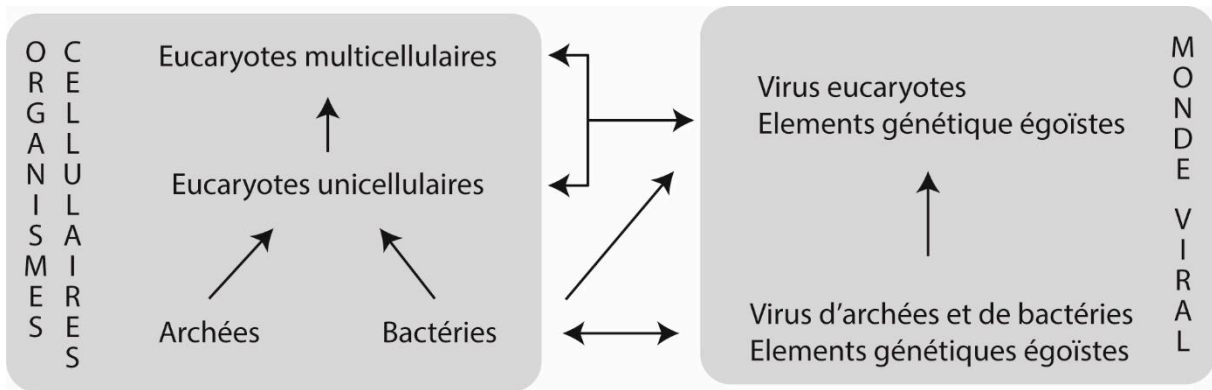
structurales vont ensuite pouvoir s'assembler afin de produire de nouvelles particules virales qui vont pouvoir être libérées dans le milieu extracellulaires. Voir texte pour détails.

#### iv. Les hôtes de SINV et leur réponse antivirale

Le virus de SINV est un arbovirus. De l'anglais *arthropod-borne virus*, signifiant virus transmis par les arthropodes. Ces derniers sont généralement maintenus en effectuant une alternance infectieuse entre l'insecte vecteur et l'hôte terminal vertébré. Le virus de SINV est transmis à l'humain par le moustique. Chez le moustique, l'interférence par ARN est le mécanisme de lutte contre le virus de SINV (Campbell *et al.*, 2008; Khoo *et al.*, 2010) alors que les vertébrés mettent en place la réponse IFN (Akhrymuk *et al.*, 2016; Burke *et al.*, 2009; Ryman *et al.*, 2000) afin de lutter contre ce virus. SINV est donc soumis à deux mécanismes de défense antiviraux différents en fonction de l'hôte. Quel que soit son hôte, SINV produit un ARNdb lors de sa réplication qui va être impliqué dans la mise en place des réponses ARNi et IFN, ce qui en fait le modèle d'étude idéal pour ma thèse.

#### c. Adaptation des mécanismes de défense antiviraux

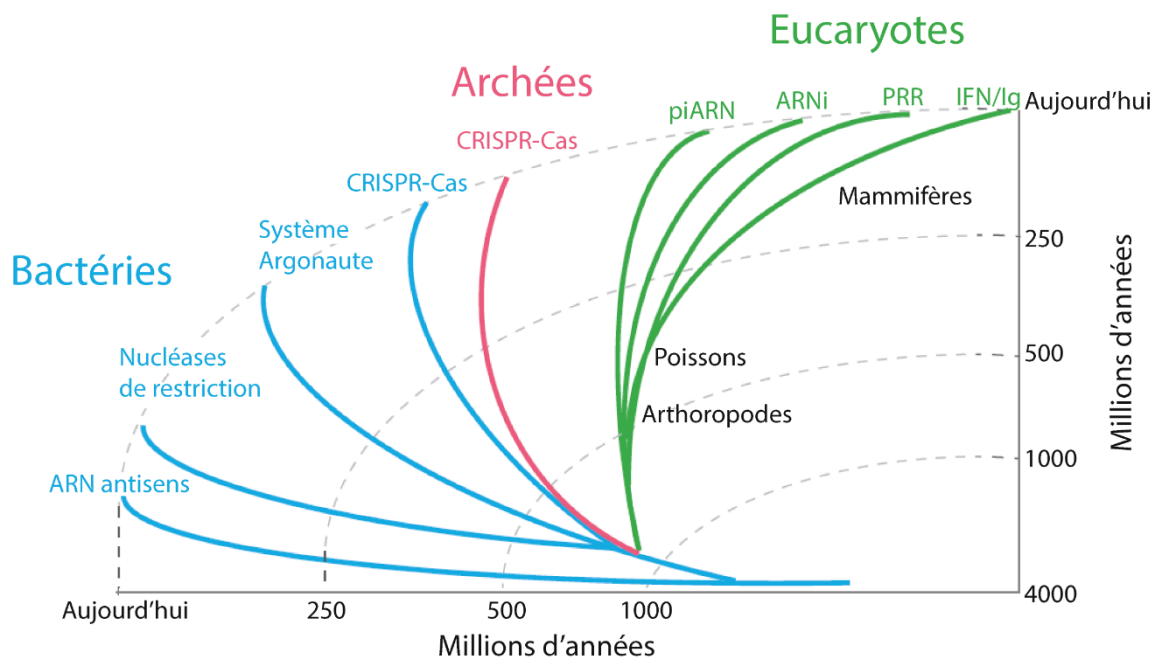
L'interaction hôte-virus influence bilatéralement l'évolution de tous les organismes, et elle est couramment décrite comme une course aux armements dans laquelle les hôtes développent continuellement des moyens de défenses contre des virus qui évoluent constamment pour les contrecarrer (Forterre & Prangishvili, 2009). Cependant, l'interaction hôte-virus n'est pas uniquement délétère. En effet, la majorité de notre ADN génomique semble provenir d'éléments mobiles (Solyom & Kazazian, 2012). Certains de ces éléments nous ont apportés des fonctions cruciales telles que la télomérase, nécessaire à la réplication chromosomique de tous les eucaryotes (Gladyshev & Arkhipova, 2011) et la présence de syncytines permettant le développement du placenta (Dupressoir *et al.*, 2012). Les virus et leurs hôtes ont dû coexister quel que soit le stade de l'évolution (Figure 5), entraînant ainsi une adaptation graduelle aux infections (Koonin, 2009; Koonin *et al.*, 2015; Koonin & Dolja, 2013).



**Figure 5 – Modèle de coévolution des organismes cellulaires et des éléments les parasitant.**

Quel que soit l'organisme, le monde viral s'adapte. Pour chaque forme d'organisme cellulaire, il existe des virus mais aussi des éléments mobiles égoïstes les infectant. Modifié de Koonin & Dolja, 2013.

Pour chaque forme de vie cellulaire, il existe des virus et des éléments mobiles (éléments génétiques égoïstes, rétroïdes – nous ne nous attarderons pas sur ces éléments lors de cette thèse) qui ont imposé la mise en place de moyens de défense que nous allons détailler par la suite (Figure 6).



**Figure 6 – Evolution des systèmes de défense antiviraux des organismes cellulaires.**

CRISPR (*Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats* – Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées) ; Cas (*CRISPR associated protein* – protéine associée à CRISPR) ; piARN (*PIWI-interacting RNA* – ARN interagissant avec Piwi) ; ARNi (Interférence par ARN) ; PRR (*Pathogen recognition receptor* - Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires) ; IFN (Interféron) ; Ig (Immunoglobuline). Adapté de tenOever, 2016.

### III. L'évolution de la lutte contre les acides nucléiques

La réplication incontrôlée des virus peut s'avérer fatale pour les organismes infectés. La lutte contre les acides nucléiques existe depuis leur apparition. Tous les organismes cellulaires possèdent plusieurs niveaux de défense contre les acides nucléiques.

#### a. Chez les procaryotes

Même si notre projet de recherche n'est pas focalisé sur les procaryotes, il est intéressant de présenter la contrainte de la reconnaissance des acides nucléiques exogènes procaryotes afin de souligner les similarités avec les systèmes eucaryotes. Il semblerait que la première ligne de défense qui est apparue soit la transcription d'un ARN antisens pour contrecarrer la mobilité des éléments mobiles (Figure 6). Ces ARN antisens sont retrouvés chez les procaryotes afin de réguler l'amplification des plasmides, des transposons et des bactériophages (tenOever, 2016; Wagner *et al.*, 2002).

Par la suite, les procaryotes ont mis en place des endonucléases séquence-spécifiques permettant de couper spécifiquement une séquence d'ADN qui est absente dans le génome de l'hôte (Kobayashi, 2001). Ce mode de défense s'est ensuite complexifié en passant par les systèmes de restriction/modification (Tock & Dryden, 2005), jusqu'à l'apparition des premiers systèmes de défense mettant en commun les endonucléases spécifiques et les ARN antisens (Figure 6). Ceux-ci sont connus sous le nom de CRISPR-Cas et Argonaute. Le système CRISPR-Cas9 se base sur l'incorporation de l'ADN génomique de bactériophage ou d'ADN plasmidique au sein du génome de l'hôte procaryote qui sera ensuite transcrit puis maturé afin de servir de guide pour une nucléase Cas9 (Marraffini, 2015). Le système basé sur les nucléases de la famille Argonaute se base quant-à-lui sur l'association de ces nucléases à de petits ADN ou ARN exogènes les guidant afin de combattre les acides nucléiques chez les bactéries (Ryazansky *et al.*, 2018).

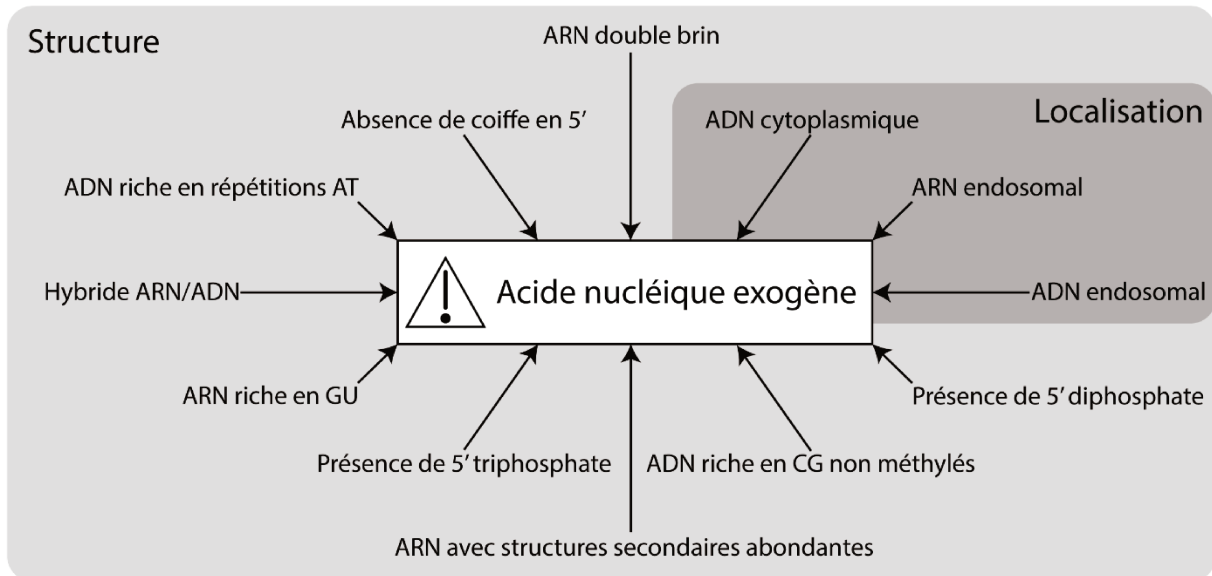
#### b. Chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, les deux principales lignes de défense antivirales innées sont la réponse de l'interférence par ARN et la réponse interféron en plus de la voie des ARN interagissant avec PIWI (*PIWI-interacting RNAs* – piARN) qui est majoritairement spécifique à la lutte contre les transposons (Figure 6). Lors de ce manuscrit, nous n'aborderons pas l'immunité adaptative présente chez les mammifères (pour revue : Chaplin, 2010). Cependant, avant de détailler les différents types de lignes de défense antivirale, nous allons faire un aparté

afin de présenter les éléments pouvant induire la reconnaissance d'un acide nucléique comme étranger à la cellule.

#### i. Les acides nucléiques exogènes

Quel que soit l'organisme, la reconnaissance des acides nucléiques exogènes est primordiale afin d'établir une réponse antivirale. Ces acides nucléiques exogènes peuvent être reconnus de plusieurs manières, que ce soit à cause de leur structure ou de leur localisation (Figure 7).



**Figure 7 – reconnaissance des acides nucléiques exogènes.**

Les différentes structures tel que de l'ARN double brin (Alexopoulou *et al.*, 2001; Yoneyama *et al.*, 2004), les ARNs riches en GU/polyU (Heil *et al.*, 2004; Hornung *et al.*, 2005; Judge *et al.*, 2005), les extrémités 5' triphosphate (Hornung *et al.*, 2006; Schlee *et al.*, 2009) et 5' diphosphates (Goubau *et al.*, 2014), l'absence de coiffe/modifications de la coiffe (Habjan *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014; Schuberth-Wagner *et al.*, 2015), les longs transcrits avec des structures secondaires abondantes (George *et al.*, 2014; Saito *et al.*, 2008), les répétitions d'ADN AT (Ablasser *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2009) ou les répétitions GC non méthylées (Hartmann & Krieg, 2000; Hemmi *et al.*, 2000; Krieg *et al.*, 1995) et les hybrides ADN/ARN (Mankan *et al.*, 2014; Rigby *et al.*, 2014) sont reconnus en tant qu'acide nucléique exogène. D'autre part, la localisation des acides nucléiques peut aussi jouer un rôle dans cette reconnaissance, tel que les ADN cytoplasmiques (Ishikawa *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2008) et les ARN (Kleinman *et al.*, 2012; Tatematsu *et al.*, 2013) où ADN (Hemmi *et al.*, 2000) présents dans les endosomes.

La Figure 7 n'est pas exhaustive et cherche seulement à témoigner des nombreux signaux pouvant initier une réponse antivirale. Cependant, l'ARNdb cytoplasmique est la signature de l'infection virale la plus présente du fait d'être produit par une vaste majorité des virus lors de la réplication de virus à ARN ou de la transcription convergente des virus à ADN (Weber *et al.*, 2006). Cet ARN double brin peut lui-même contenir des modifications comme indiqué dans la

Figure 7. Dans la suite de ce mémoire, nous allons uniquement nous intéresser à l'ARN double brin en tant qu'acide nucléique exogène.

## ii. L'interférence par ARN

### 1. Historique

Les premières observations du mécanisme de l'ARNi remontent aux travaux de Napoli et Jorgensen en 1990 sur coloration de pétunias (Napoli *et al.*, 1990). Lors de la tentative de surexpression de la chalcone synthase (CHS) dans les pétunias, les auteurs ont remarqué une diminution de l'expression de la CHS dans certains individus et ont conclu que l'introduction du transgène induisait une « cosuppression » du gène endogène en *trans*. Des observations similaires ont été faites chez le champignon *Neurospora crassa* (Romano & Macino, 1992) et chez le ver *Caenorhabditis elegans* (Guo & Kemphues, 1995) dans lequel l'introduction d'un ARN sens ou antisens au gène par-1 conduisait à la dégradation de son ARNm. Les phénotypes présentés ci-dessus ont été expliqués par Andrew Fire et Craig C. Mello en 1998 (Fire *et al.*, 1998) ce qui leur a valu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006. Dans cet article, les auteurs ont remarqué que l'ARNdb est la cause de l'extinction de l'expression des gènes, et que les phénotypes observés par Guo & Kemphues en 1995 étaient dus à des contaminations d'ARNdb dans leur préparation d'ARNsb sense/antisense. En parallèle, la voie des microARN (miARN) a été découverte en 1993 (Lee *et al.*, 1993). L'existence des produits de dégradation de l'ARNdb en petits ARN interférents (*small interfering RNA* – siARN) ont été découverts par Hamilton et Baulcombe en 1999 dans la plante (Hamilton & Baulcombe, 1999) puis observés au sein de la Drosophile (Hammond *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000) et leur capacité effectrice rapidement déterminée (Elbashir *et al.*, 2001a, 2001b). La découverte de l'implication de la protéine Dicer dans la production de siARN (Bernstein *et al.*, 2001) a ouvert la voie sur la recherche des protéines impliquées dans la voie de l'ARNi et a permis la découverte et la compréhension de l'activité des protéines de la famille Argonaute (pour revue : Meister, 2013) et leur implication dans le complexe d'interférence induit par l'ARN (*RNA-induced silencing complex* – RISC) (Carmell *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2002; pour revue : Pratt & MacRae, 2009). S'en est suivie la caractérisation des différents mécanismes de l'interférence par ARN (pour revue, Wilson & Doudna, 2013).

L'interférence par ARN est un mécanisme retrouvé dans une vaste majorité d'eucaryotes et fait référence aux mécanismes d'inhibition séquence-spécifique comprenant des petits ARN non codants et des complexes ribonucléoprotéiques avec des fonctions pouvant être impliquées dans la défense antivirale, la régulation des gènes et du contrôle des transposons.

Ces trois fonctions sont respectivement attribuées à la voie des siARN, des miARN et des piARN

## 2. Les siARN

La voie des siARN est initiée par la dégradation d'un long ARNdb cytoplasmique en duplexes de siARN de 21 à 23 paires de bases par la ribonucléase de type III (RNase-III) Dicer (Bernstein *et al.*, 2001) pouvant être assistée de son cofacteur TRBP (Chendrimada *et al.*, 2005). La protéine Dicer est une RNase constituée en général d'au minimum deux domaines catalytique RNaseIII, un domaine hélicase, un domaine de fixation à l'ARNdb et un domaine PAZ (Shabalina & Koonin, 2008). Chez les plantes, champignons et vers, la production des siARN est amplifiée par la synthèse *de novo* d'ARNdb réalisée par une ARN polymérase ARN dépendante cellulaire permettant une nouvelle accumulation de siARN dits secondaires (Wassenegger & Krczal, 2006). Les duplexes de siARN produits par Dicer ont deux nucléotides sortants aux extrémités 3' et un groupement phosphate en 5' (Elbashir *et al.*, 2001b). Un des brin du duplexe de siARN va pouvoir être chargé (brin guide) dans une protéine de la famille Argonaute afin de former le complexe RISC (Hammond *et al.*, 2000) qui va pouvoir aller inhiber de façon séquence-spécifique l'ARN dont la séquence est complémentaire à la séquence du siARN chargé dans Argonaute. Les cibles parfaitement complémentaires sont clivées par les protéines AGO catalytiquement actives. Le génome humain code pour 8 protéines Argonaute (4 de la sous-famille PIWI et 4 de la sous-famille AGO). Les protéines de la sous-famille AGO (AGO1-AGO4) ont différentes implications dans l'ARNi et seulement les protéines AGO2 (Liu *et al.*, 2004) et dans une moindre mesure AGO3 (Park *et al.*, 2017) sont capables d'exercer une activité catalytique et donc de couper directement l'ARN cible lors d'un appariement parfait (Figure 8).

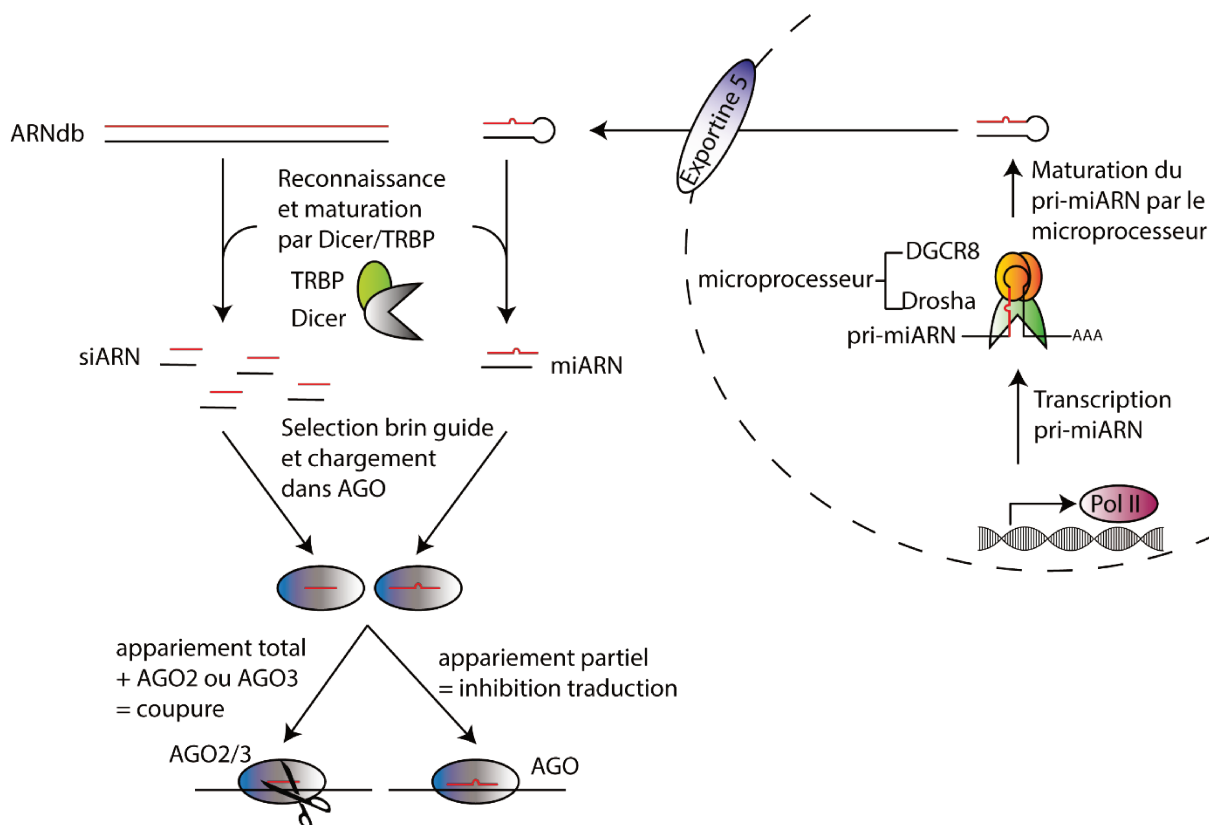
Cette voie antivirale est quasi-ubiquitaire chez les eucaryotes. Elle est le principal mécanisme de défense antiviral chez les plantes et les invertébrés (de Faria *et al.*, 2013; Szittyá & Burgyán, 2013; Zhou & Rana, 2013). La production des siARN est étroitement liée à l'infection virale (Félix *et al.*, 2011; Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; Molnar *et al.*, 2005; van Rij *et al.*, 2006). Le caractère fondamental de cette voie antivirale dans ces organismes est illustré par : **(1) La présence de protéines virales inhibant ce mécanisme.** Lorsque des stratégies de défense efficaces telles que l'ARNi ont été mises en place, les virus ont subi une forte pression évolutive afin de contrecarrer ce mécanisme et continuer à prospérer. C'est dans ce cadre que les protéines suppresseurs de l'interférence par ARN (*viral suppressor of RNA silencing* – VSR) ont émergé. Ces protéines sont présentes dans de nombreux virus de plantes et d'insectes et



inhibent des étapes clé de l'ARNi telles que la détection de l'ARNdb, la production des siARN, la formation et/ou l'activité du complexe RISC (Silhavy *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Pour des revues complètes sur les VSR, voir Bellott, Gilmer, & Michel 2019; Burgyán & Havelda 2011; Gammon & Mello 2015. **(2) La pression évolutive constante appliquée sur les protéines principales de l'ARNi (Dicer, Ago).** Afin de s'adapter aux VSR, les gènes impliqués dans l'ARNi doivent eux-aussi évoluer de façon rapide. Ainsi, on retrouve les protéines impliquées dans la voie de l'ARNi (protéines Dicer, Argonaute) parmi les protéines subissant une évolution rapide chez les invertébrés (Obbard *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2018). **(3) L'inhibition de ce mécanisme induit une hausse de la mortalité et du titre viral dans ces organismes.** Enfin, l'inhibition de l'expression de protéines impliquées dans le processus de l'ARNi induit une augmentation du titre viral au sein des cellules infectées (Deleris *et al.*, 2006; Félix *et al.*, 2011; Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; Mourrain *et al.*, 2000; Schott *et al.*, 2005).

### 3. Les miARN

La voie des microARN dérive des siARN et est impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle de nombreux processus cellulaires (Bartel, 2018; Shabalina & Koonin, 2008). Le mode de fonctionnement des miARN est identique à celui des siARN mais leur biogenèse est différente. Les miARN dérivent de longs ARN transcrits par l'ARN Polymérase II (Pol II) nommés miARN primaires (pri-miARN) (Lee *et al.*, 2004). Les pri-miARN se replient et forment des structures en tige-boucle susceptibles d'être reconnus et maturés par le complexe Microprocesseur constitué de la RNase-III Drosha (Lee *et al.*, 2003) et son cofacteur DGCR8 (Han *et al.* 2004). Cette maturation consiste en la production d'un miARN dit précurseur (pré-miARN) d'approximativement 65 nucléotides qui va pouvoir être exporté du noyau par la protéine Exportine 5 (Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003) afin d'être maturé une seconde fois dans le cytoplasme par Dicer (Lee *et al.*, 2002) et rejoindre la voie des siARN pour les étapes subséquentes. Il faut noter que chez les mammifères, l'appariement miARN/ARN est majoritairement partiel et dans ce cas, l'inhibition se fait par blocage de la traduction, déadénylation, retrait de la coiffe et dégradation de l'ARN cible (Jonas & Izaurralde, 2015) (Figure 8).



**Figure 8 – Voie des siARN et des miARN.**

La voie des siARN débute par la reconnaissance et la maturation d'un long ARNdb cytoplasmique par Dicer/TRBP en duplexes de siARN de 21 à 23 pb. Un brin du duplexe (brin guide) est chargé dans une protéine de la famille Argonaute afin de former le complexe RISC pour couper un ARN cible ou inhiber sa traduction. En parallèle, la voie des miARN débute par la transcription d'un pri-miARN par l'ARN polymérase II au sein du noyau, puis ce pri-miARN est maturé en pré-miARN par le microprocesseur composé de DGCR8 et Drosha. Le pré-miARN est ensuite exporté dans le cytoplasme par l'exportine-V et rejoint la voie des siARN lors de sa maturation par Dicer/TRBP. L'effet de RISC sur l'ARN cible (coupure ou inhibition de la traduction) dépend de la protéine AGO chargée et de la complémentarité de l'appariement entre le petit ARN (si/miARN) et l'ARN cible. Voir texte ci-dessus pour détails.

Selon les espèces, on remarque que le nombre de protéines de la famille Argonaute et le nombre de copie du gène Dicer varient (Tableau 1). Ces variations peuvent être dues à une fonctionnalisation indépendante des différentes protéines chez un même organisme, pouvant témoigner d'exigences enzymatiques différentes tel que, par exemple, Dcr-2 de drosophile qui a une fonction spécifiquement antivirale (Galiana-Arnoux *et al.*, 2006).

**Tableau 1 – Abondance des protéines Argonaute et copies du gène Dicer en fonction des organismes.**

Espèce	Nombre de protéines de la famille Argonaute	Nombre de copies du gène Dicer	Références
<b>S. pombe</b>	1	1	(Carmell <i>et al.</i> , 2002; Carmichael <i>et al.</i> , 2004)
<b>C. elegans</b>	27	1	(Ketting <i>et al.</i> , 2001; Yigit <i>et al.</i> , 2006)
<b>D. melanogaster</b>	5	2	(Y. S. Lee <i>et al.</i> , 2004; Williams & Rubin, 2002)
<b>A. Thaliana</b>	10	4	(Henderson <i>et al.</i> , 2006; Hunter <i>et al.</i> , 2003)
<b>H. Sapiens</b>	8	1	(Lau <i>et al.</i> , 2012; Sasaki <i>et al.</i> , 2003)

### iii. La réponse IFN

Chez les mammifères, l'importance de l'ARNi dans la réponse antivirale est encore largement débattue car ce mécanisme est éclipsé par la réponse interféron. Nous consacrerons la partie suivante à ce débat ARNi/IFN chez les mammifères.

#### 1. Historique

Dans les années 1950, il était établi que sous certaines conditions, des cellules infectées par un virus étaient résistantes à une seconde infection virale. Par des mécanismes à l'époque inconnus, les chercheurs concluaient qu'un virus pouvait interférer avec d'autres. C'est en 1957 que le terme « interféron » a été utilisé pour la première fois par Isaacs & Lindenmann afin de décrire un élément qui semblait être produit par les cellules qui interféraient avec l'infection par le virus de la grippe (Isaacs & Lindenmann, 1957). Il s'est avéré par la suite que l'interféron (IFN) est une protéine appartenant à une famille composée de trois types principaux (I, II et III) qui se distinguent les uns des autres par les récepteurs avec lesquels ils interagissent (pour revue : de Weerd & Nguyen, 2012). Les types d'IFN comprennent eux-mêmes des sous-types. L'IFN-I est la plus grande classe d'IFN chez l'humain, elle est constituée de : IFN- $\alpha$  ( $\alpha 1$  jusqu'à  $\alpha 13$ ), IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\nu$ , IFN- $\xi$  dont la grande diversité traduit une expression différentielle en fonction des tissus, des effets distincts et une affinité variable avec le complexe dimérique qui reconnaît l'IFN-I, le récepteur de l'interféron- $\alpha/\beta$  (IFNAR). Une majorité des cellules est capable de produire de l'IFN- $\alpha/\beta$  lors de l'infection virale, et dans ce manuscrit, lorsque nous parlerons d'IFN il s'agira de l'IFN-I et précisément de l'IFN- $\alpha/\beta$  sans considérer les sous-types d'IFN- $\alpha$ . Il n'existe qu'un seul type d'IFN-II, l'IFN- $\gamma$  qui interagit avec le récepteur de l'interféron- $\gamma$  (IFNGR). L'IFN- $\gamma$  est produit par les cellules immunitaires mais peut activer un grand nombre de cellules porteuses de IFNGR (Valente *et al.*, 1992). L'IFN- $\gamma$  peut amorcer la réponse IFN-I et joue un rôle important dans transition de

l'immunité innée à l'adaptative (Schroder *et al.*, 2004). L'IFN-III est le dernier type d'IFN découvert en date, il est composé d'IFN- $\lambda$  ( $\lambda 1$  jusqu'à  $\lambda 4$ ) qui interagissent avec le complexe hétérodimérique composé du récepteur 2 à l'interleukine 10 (IL-10R2) et du récepteur de l'IFN- $\lambda 1$  (IFNLR1). L'IFN de type III semble être restreint aux cellules épithéliales (Sommereyns *et al.*, 2008) et induit des signaux similaires aux IFN-I (Bolen *et al.*, 2014; Marcello *et al.*, 2006). La réponse IFN est une réponse complexe qui se met en place face à de nombreux stimuli. Cette thèse se focalise sur l'immunité aux acides nucléiques et je renvoie le lecteur aux revues suivantes pour de plus amples informations sur la réponse IFN dans d'autres contextes (Chaplin, 2010; Fensterl *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2014; Tough, 2004).

Le lien entre la réponse interféron et la reconnaissance des acides nucléiques a été mis en évidence dans les années 1960, lorsque qu'il a été observé que de l'ARN double brin (ARNdb) et du poly(I:C) sont capables d'initier la production d'IFN-I (Isaacs *et al.*, 1963). Depuis, de nombreux récepteurs impliqués dans la reconnaissance aux acides nucléiques ont été découverts. Il existe deux types de récepteurs aux acides nucléiques chez les mammifères, les récepteurs qui induisent une réponse antivirale (production de cytokines) et les récepteurs qui ont une action directe sur l'acide nucléique qu'ils reconnaissent.

## 2. Les récepteurs qui possèdent une activité directe

Le Tableau 2 liste les récepteurs possédant une activité directe lors de la reconnaissance d'un ARNdb. L'activité de ces récepteurs peut être directement dirigée contre l'acide nucléique et entraîner sa dégradation, sa modification afin qu'il ne puisse plus être fonctionnel ou la fixation de protéines pour empêcher sa traduction. D'autres protéines telles que des RNases et des DNases sont des récepteurs qui possèdent une activité directe mais qui ne sont pas impliqués dans la réponse aux ARNdb (pour revue : Hartmann, 2017; Schlee & Hartmann, 2016) (Figure 9).

**Tableau 2 - Ligand et activité des protéines avec activité directe après reconnaissance de l'ARNdb.**

Récepteur	Ligand	Activité	Références
<b>PKR</b>	ARNdb	PKR phosphoryle eIF2a qui cause la séquestration du facteur eIF2B → inhibition de la traduction eIF2-dépendante	Gross et al.; Meurs <i>et al.</i> , 1990; Sudhakar <i>et al.</i> , 2000
<b>OAS/RNaseL</b>	ARNdb	OAS produit du 2'-5'-oligoadénosine → active la RNaseL → dégrade les ARN cytoplasmiques	Floyd-Smith <i>et al.</i> , 1981; Hovanessian & Justesen, 2007; Wreschner <i>et al.</i> , 1981
<b>ADAR1</b>	ARNdb	Modification des adénosines en inosines pour déstabiliser le double brin et restreindre la fonction de l'ARN	George <i>et al.</i> , 2014; Mannion <i>et al.</i> , 2014; Samuel, 2011
<b>IFIT1/5</b>	ARNsb 5' triphosphate (ARNdb si extrémités sortantes)	Fixation sur l'ARN afin d'inhiber sa traduction par compétition	Abbas <i>et al.</i> , 2013; Pichlmair <i>et al.</i> , 2011

### 3. Les récepteurs qui activent la réponse interféron

Les récepteurs induisant une réponse antivirale lors de la reconnaissance d'ARNdb appartiennent à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern recognition receptors* – PRR) et peuvent être subdivisés en 2 sous-familles : les récepteurs endosomiques de type Toll (*Toll-like receptors* – TLR) et les récepteurs cytoplasmiques de type RIG-I (*RIG-I-like receptors* – RLR). Il existe aussi d'autres sous familles de PRR, telles que les AIM-2-like (*AIM2-like receptors* – ARL) et les senseurs cGAS-STING qui ne reconnaissent pas l'ARNdb de manière canonique mais de l'ADN (Civril *et al.*, 2013; Hornung *et al.*, 2009). Ces sous familles de PRR se distinguent les unes des autres par leur localisation et la nature des acides nucléiques qu'ils reconnaissent (Tableau 3) (pour revue : Brubaker *et al.* 2015).

**Tableau 3 – Localisation et ligand des différents PRR.**

Famille	Localisation	Protéine	Ligand	Références
<b>TLR</b>	Endosome	TLR3	ARNdb	Alexopoulou <i>et al.</i> , 2001
<b>RLR</b>	Cytosol	RIG-I	ARNdb avec extrémité 5' di ou triphosphate	Goubau <i>et al.</i> , 2014; Marq <i>et al.</i> , 2011; Poeck <i>et al.</i> , 2010
		MDA5/LGP2	ARNdb	Bruns & Horvath, 2015; Pichlmair <i>et al.</i> , 2009; del Toro Duany <i>et al.</i> , 2015

Ces récepteurs ont tous pour finalité l'activation d'une réponse antivirale consistant en la production d'interféron, de cytokines pro-inflammatoires et la stimulation de gènes induits par l'interféron (*IFN-stimulated genes* – ISG) (Figure 9).

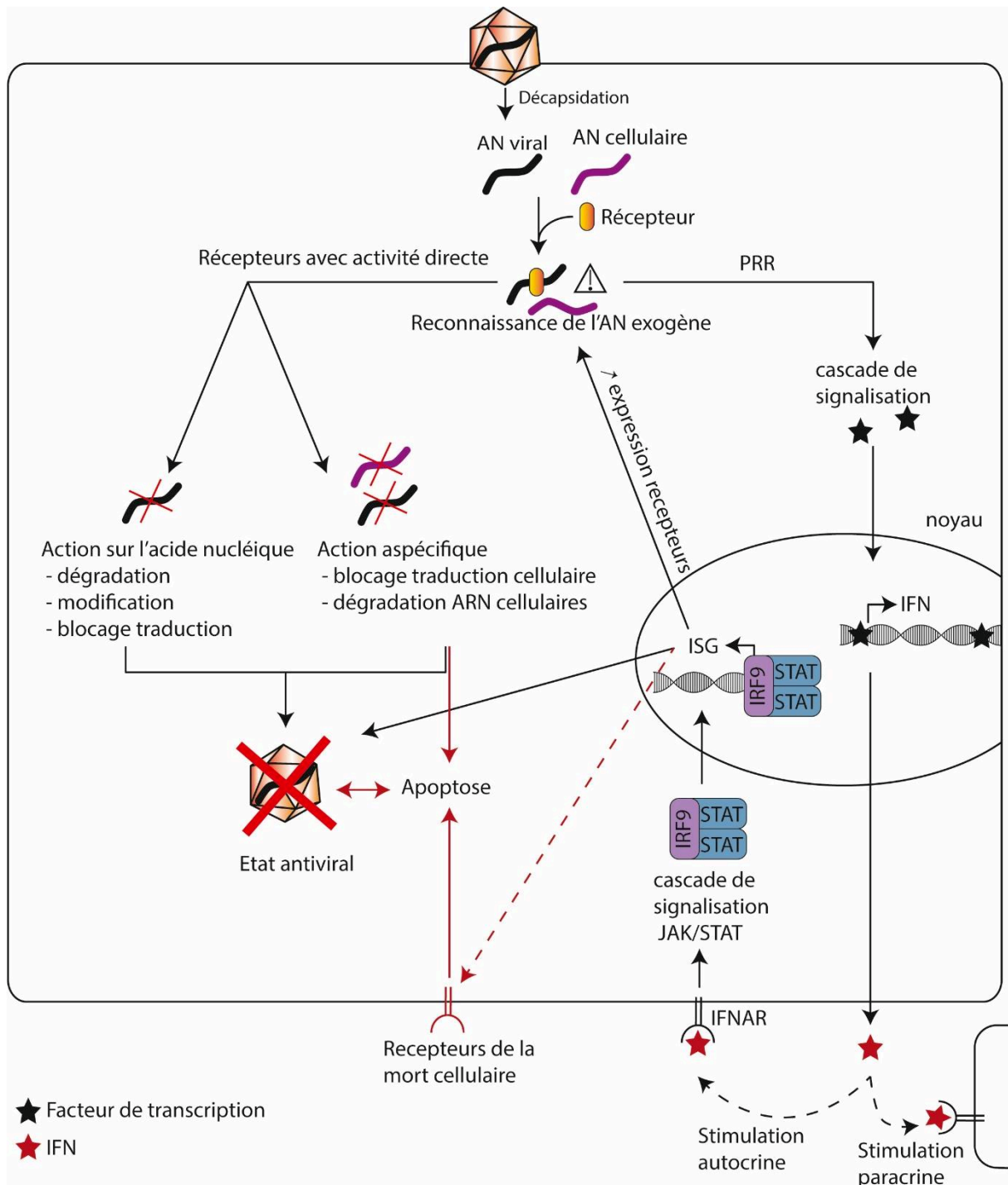
#### 4. Suites de l'activation de la réponse IFN

L'activation de la réponse IFN permet la production d'IFN qui va pouvoir stimuler la cellule de façon autocrine et les cellules avoisinantes de façon paracrine en se fixant sur les récepteurs de l'interféron (Figure 9). Cette fixation induit la cascade de signalisation JAK/STAT dont l'association de STAT avec IRF9 permet la transcription des ISG (Bluyssen & Levy, 1997. Pour revues Majoros *et al.*, 2017; Villarino *et al.*, 2015). Ces ISG ont de nombreuses propriétés antivirales (in)directes et vont permettre l'amplification de la réponse IFN et la mise en place d'un état cellulaire antiviral (pour revue Schneider *et al.*, 2014; Schoggins, 2019) dont l'une des manifestations est l'induction de la mort cellulaire programmée : l'apoptose. Lors de l'induction de la réponse IFN, les récepteurs aux acides nucléiques présentés précédemment qui appartiennent eux-aussi aux ISG vont être surexprimés en plus des régulateurs de la réponse IFN. D'autres protéines ayant des effets antiviraux directs tel que la protéine antirétrovirale Mx2 qui empêche l'entrée nucléaire du génome rétro-transcrit des rétrovirus, inhibant ainsi l'intégration des rétrovirus, voient également leurs expressions stimulées (Goujon *et al.*, 2013; Kane *et al.*, 2013).

#### 5. L'activation de la réponse IFN induit l'apoptose

La mise en place de l'apoptose dans des cellules infectées par un virus est bénéfique pour l'organisme car il permet de prévenir la réplication virale et la dissémination de celui-ci. En plus des protéines avec un effet antiviral direct dont l'activité est délétère pour la cellule telles que PKR et RNaseL (pour revue : Chawla-Sarkar *et al.*, 2003), l'IFN est impliqué dans l'activation classique de l'apoptose, via l'induction de la cascade des récepteurs de la mort cellulaire (Chawla-Sarkar *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001).

La Figure 9 est un récapitulatif de la réponse IFN liée aux acides nucléiques dans une cellule de mammifère.



**Figure 9 – Schéma récapitulatif de la réponse IFN-I.**

Lors de l'infection d'une cellule de mammifère par un virus, ce dernier relargue son acide nucléique (AN) génomique au sein de la cellule. Certains récepteurs peuvent discriminer les AN endogènes des exogènes et ainsi reconnaître exclusivement les AN exogènes. La reconnaissance de ces AN exogènes est dirigée par deux types de récepteurs, les récepteurs avec une activité directe, qu'elle soit spécifique sur l'AN exogène ou aspécifique sur tous les AN présents dans la cellule. En parallèle, les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) vont engendrer une cascade de signalisation lors de la reconnaissance d'un AN exogène. Cette cascade de signalisation aboutit par la production d'IFN qui va pouvoir stimuler la cellule de façon autocrine et les cellules avoisinantes de façon paracrine. La fixation de l'IFN sur son récepteur IFNAR induit la cascade de signalisation JAK/STAT qui va pouvoir, lors de l'association de STAT avec IRF9, conduire à la production de gènes stimulés par l'IFN (ISG) afin d'amplifier l'état antiviral de la cellule. Voir texte pour détails.

#### iv. Incompatibilité ARNi et IFN

L'implication de Dicer en tant que récepteur avec une activité directe dirigée contre les ARNdb exogènes est encore débattue (Shapiro *et al.*, 2010). En effet, chez les mammifères, la totalité de la machinerie de l'ARNi est présente et fonctionnelle mais son implication antivirale n'est pas définitivement établie du fait de la réponse IFN. Chez les mammifères, l'introduction de longs ARNdb dans une cellule somatique de mammifère conduit à une perte globale de l'expression protéique et induit la mort cellulaire de manière IFN-dépendante. Pour certains, l'IFN peut avoir supplanté l'ARNi chez les mammifères lors de l'évolution. La possible incompatibilité entre ARNi et IFN a fait l'objet de la revue ci-dessous que j'ai rédigée avec le Dr. Thomas Montavon et le Dr. Sébastien Pfeffer (Petitjean *et al.*, 2018).

1. *En avoir ou pas, l'interférence par l'ARN comme défense antivirale chez les mammifères*



# En avoir ou pas, l'interférence par l'ARN comme défense antivirale chez les mammifères

Olivier Petitjean<sup>a</sup>  
 Thomas Montavon<sup>a</sup>  
 Sébastien Pfeffer

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

<spfeffer@unistra.fr>

<sup>a</sup>Contribution équivalente

**Résumé.** Présent chez la majorité des eucaryotes, le *RNA silencing* ou interférence par l'ARN (RNAi) est un mécanisme de régulation de l'expression de gènes dirigé par des petits ARN et participant à de nombreux processus biologiques. Chez les plantes, les nématodes et les insectes, ce mécanisme est primordial dans la défense antivirale. Chez les mammifères, bien que présent dans le cadre de la voie des microARN, son importance dans la défense antivirale reste encore vivement débattue. Ces dernières années, plusieurs études ont tenté de répondre à la question de savoir si le RNAi antiviral était conservé chez les mammifères. À l'heure actuelle, ces études, parfois contradictoires, n'ont pas permis de répondre de manière définitive à cette problématique. Dans cette revue, nous présenterons les arguments en faveur ou en défaveur d'une conservation chez les mammifères de ce moyen de défense, et montrerons que ce mécanisme semble être fonctionnel et actif en contexte viral chez les mammifères dans certains types cellulaires et/ou dans certaines conditions.

**Mots clés :** interférence par l'ARN, défense antivirale, réponse interféron, immunité innée, mammifères

**Abstract.** RNA silencing is a small RNA based mechanism regulating gene expression and involved in many biological processes in most eukaryotes. In plants, nematodes and arthropods, this mechanism participates to antiviral defense. In mammals, although the RNA silencing machinery is present and needed for the microRNA pathway, its importance as an antiviral defense is still debated. In recent years, several studies have attempted to answer to the question of whether RNA silencing as an antiviral pathway is retained in mammals. However, these studies did not provide a clear answer yet. In this review, we will present the arguments for and against a relevant antiviral role of RNA interference (RNAi) in mammals, by discussing examples of active and functional mammalian antiviral RNAi in specific cell types and/or in specific conditions.

**Key words:** RNA interference, antiviral defense, interferon response, innate immunity, mammals

## Introduction

L'extinction de gènes par l'ARN (que nous appellerons dans la suite de l'article *RNA silencing*) fait référence à un ensemble de mécanismes utilisant tous un ARN de petite taille (une vingtaine de nucléotides) comme guide pour diriger une protéine vers ses ARN cibles. L'origine de ces petits ARN est variable mais, au cœur de leur biogenèse, on retrouve des éléments-clés :

- un précurseur de plus grande taille, majoritairement double-brin, qui donne naissance de manière séquentielle ou non à la molécule fonctionnelle finale ;
- l'assemblage du petit ARN ainsi généré sur une protéine effectrice, qui est invariablement de la famille Argonaute ;
- la fixation de cette protéine de manière séquence-dépendante sur son substrat.

Dans cette revue, nous allons nous focaliser sur une famille de petits ARN non codants qui regroupe deux classes bien distinctes mais partageant des similarités : les microARN (miARN) et les petits ARN interférents (siARN pour *small interfering RNA*). Les premiers sont de petits ARN régulateurs, exprimés par la cellule et qui dérivent de longs

**Tirés à part :** S. Pfeffer

transcrits primaires (pri-miARN) synthétisés dans le noyau par l'ARN polymérase II. Ce pri-miARN est ensuite coupé une première fois dans le noyau par la ribonucléase (RNase) de type III, Drosha, et son cofacteur DGCR8, pour donner un précurseur (pré-miARN) d'environ 70 nucléotides (nt) structurés en épingle à cheveux (sh pour *short hairpin*). Le pré-miARN est alors exporté dans le cytoplasme par la protéine Exportine-5, où il sera clivé par une autre RNase III, Dicer, assistée de son cofacteur TRBP, pour générer un duplex d'ARN d'environ 22 nt ayant, comme signature RNase III-spécifique, deux nucléotides sortants en 3'. Le duplex est ensuite dissocié et un des deux brins est incorporé dans une protéine de la famille Argonaute (AGO), ce qui donne naissance au complexe RISC (pour *RNA-Induced Silencing Complex*). Le miARN ainsi maturé sert de guide à la protéine AGO pour lui permettre de reconnaître des ARN messagers (ARNm) cibles, le plus souvent dans leur région 3' non traduite (3' UTR). Après fixation sur son ARN cible, la protéine AGO recrute une protéine adaptatrice, connue sous le nom de GW182 ou TNRC6, qui à son tour recrute d'autres facteurs qui vont permettre de réguler négativement la traduction de l'ARNm ciblé ainsi que sa stabilité (voir *figure 1* et la référence [1] pour revue).

Les siARN, quant à eux, peuvent être considérés comme le produit d'un mécanisme de défense en réponse à une attaque par des acides nucléiques étrangers à la cellule tels que les acides nucléiques d'origine virale. Les propriétés physicochimiques des acides nucléiques exogènes (groupement 5' triphosphate, absence de coiffe ou présence de structure ARN double brin (ARNdb) par exemple), ou leur localisation subcellulaire (présence d'ADN dans le cytoplasme), sont reconnues comme autant de signaux de danger par la cellule et nécessitent la mise en place d'une réponse appropriée. Un des mécanismes de défense basé sur la reconnaissance de l'ARNdb est justement directement fondé sur le *RNA silencing*. En effet, plusieurs organismes dont les plantes, les insectes et les nématodes utilisent des protéines de type Dicer pour cliver les ARNdb viraux en siARN, qui sont ensuite chargés dans une protéine AGO afin de pouvoir cibler l'ARN viral génomique ou messenger et ainsi bloquer l'accumulation du virus dans la cellule [2]. L'importance de ce mécanisme est illustrée par la mise en évidence, dans la quasi-totalité des virus infectant les plantes ou les arthropodes, de protéines virales permettant de contrecarrer le *RNA silencing* antiviral appelées suppresseurs viraux du *RNA silencing* (VSR) [3, 4]. Nous allons ici faire une revue des données récentes de la littérature, parfois contradictoires, dans le but de tenter de répondre à la question de la conservation de ce mécanisme chez les mammifères.

En effet, chez les mammifères, la principale réponse antivirale est la réponse interféron (IFN) (*figure 2*). La reconnaissance d'ARNdb par des récepteurs

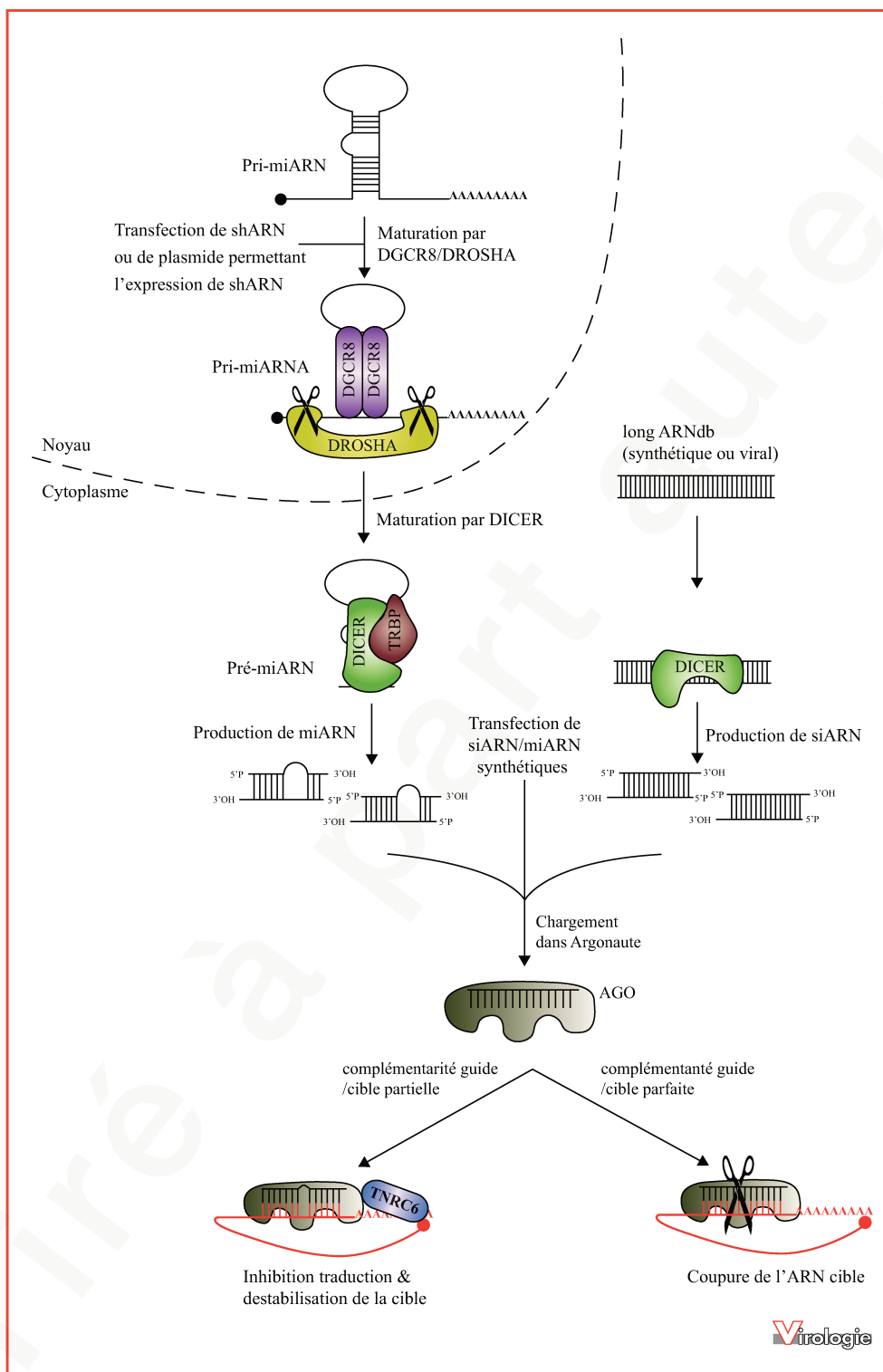
spécifiques appelés PRR (pour *Pathogen Recognition Receptors*) incluant les récepteurs cytoplasmiques RLR (*RIG-Like Receptors*) conduit à leur interaction avec la protéine MAVS (*Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein*), ce qui déclenche une voie de signalisation permettant la transcription du gène interféron. L'interféron de type I (IFN-I) va être sécrété puis va stimuler, de manière autocrine, la cellule et de façon paracrine, les cellules avoisinantes en se liant au récepteur de l'IFN-I (IFNAR). La fixation d'IFN à l'IFNAR conduit à une cascade de signalisation qui permet la transcription des gènes de réponse à la stimulation par l'interféron (*Interferon Stimulated Genes* [ISG]). La réponse interféron mène la cellule à un état antiviral pro-apoptotique identifié par une chute de la traduction canonique induite par l'activation de la protéine kinase R (PKR) (voir mécanisme de la *figure 2*) et la dégradation des ARN viraux et cellulaires par la RNase L.

Afin de considérer le *RNA silencing* comme un mécanisme fonctionnel de défense antivirale chez les mammifères, il faut pouvoir montrer que :

- des siARN viraux sont produits de manière Dicer-dépendante et qu'ils sont chargés sur une protéine de la famille AGO ;
- ces siARN sont fonctionnels et permettent effectivement de restreindre l'infection virale ;
- l'inactivation de protéines-clés dans la production de ces siARN résulte en une hypersensibilité au virus.

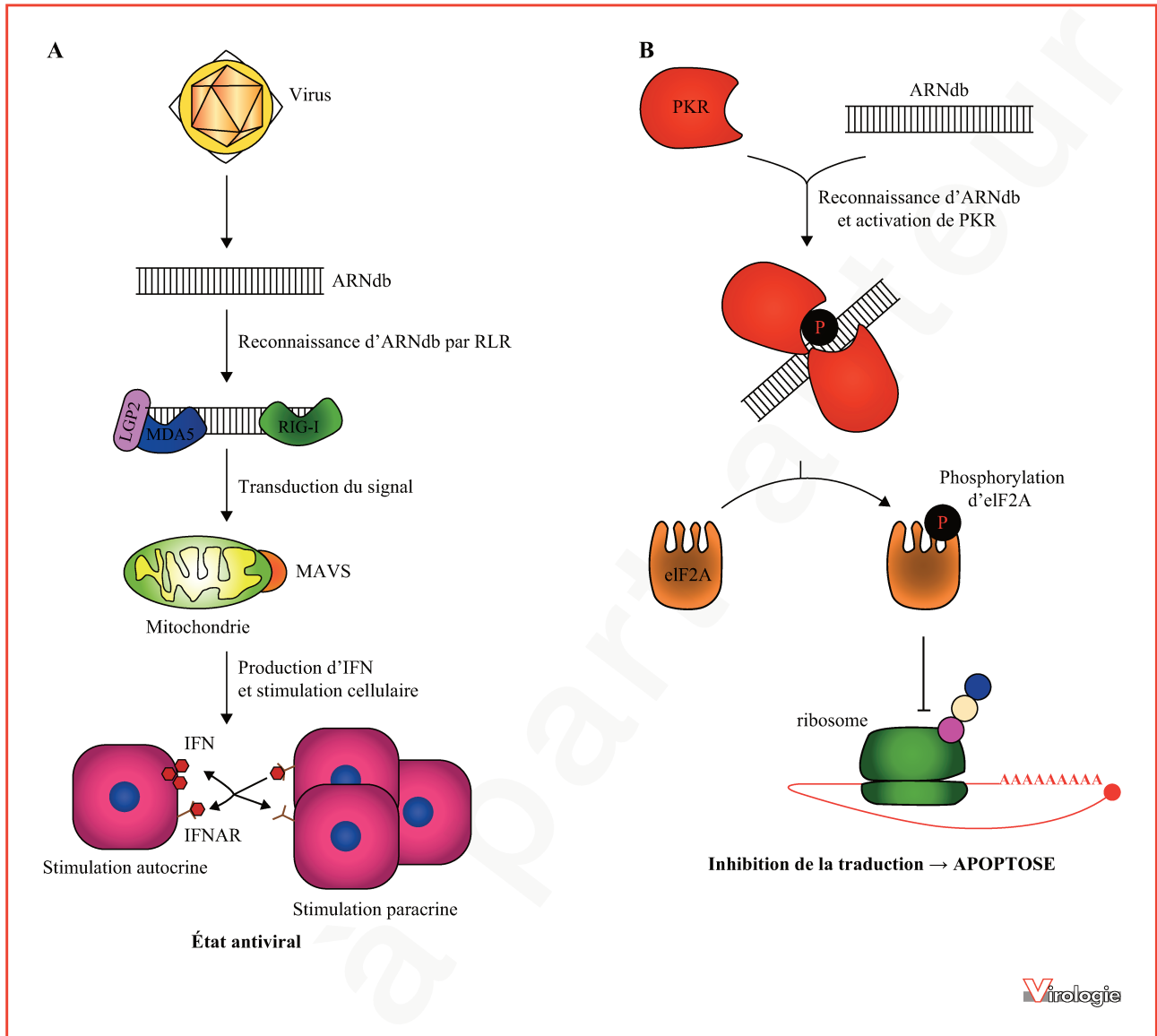
### Le *RNA silencing* ne semble pas être un mécanisme antiviral dans les cellules somatiques de mammifères

Une des premières caractéristiques du *RNA silencing* antiviral, aussi bien contre les virus à ARN que les virus à ADN, est la présence de siARN dérivant du génome viral (vsiARN) [5]. Ces vsiARN possèdent les caractéristiques de petits ARN (sARN) produits par les enzymes Dicer, à savoir : une taille d'environ 22 nt de long et des extrémités 3' sortantes [2, 5]. Dans le cadre d'une infection virale, les vsiARN sont produits à partir d'ARNdb synthétisés par la polymérase virale lors de la réplication du virus ou par des ARN polymérases ARN dépendantes (RdRp) de l'hôte [2]. Chez les plantes, les insectes et le ver, les vsiARN sont facilement détectables par des techniques d'analyse moléculaire conventionnelles telles que le northern blot [6-8]. Le développement des techniques de séquençage à haut débit au milieu des années 2000 a permis une analyse à la fois quantitative et qualitative des sARN. Ainsi, l'analyse de vsiARN par cette technique a montré qu'ils pouvaient représenter jusqu'à 13 % des sARN produits chez



**Figure 1. Le RNA silencing chez les mammifères.**

La production des microARN débute par la transcription du pri-miARN. Ce pri-miARN est ensuite clivé par DROSHA assistée de DGCR8 pour produire un pré-miARN. Le pré-miARN et les ARNdb sont reconnus et maturés par DICER (+TRBP dans le cas des miARN) pour produire les petits ARN (miARN et siARN) qui seront ensuite chargés dans une protéine effectrice Argonaute (AGO) qui, en fonction du degré de complémentarité entre le guide et la cible, va engendrer une inhibition traductionnelle ou la coupure de l'ARN cible.



**Figure 2. La réponse interféron de type I. A) Les virus sont reconnus par des récepteurs qui déclenchent la réponse IFN-I.** L'ARNdb produit par les virus lors d'un cycle infectieux est reconnu par différents récepteurs, notamment ceux appartenant à la famille des *RIG-Like Receptors* (RLR) tels que RIG-I, LGP2 ou MDA-5. Cette identification va engendrer une cascade de signalisation dont l'un des éléments-clés est la protéine MAVS (*Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein*). La finalité de la transduction de ce signal est la production d'interférons (IFN) qui vont être sécrétés pour stimuler le récepteur IFNAR de la cellule productrice (stimulation autocrine) et des cellules avoisinantes (stimulation paracrine) pour conduire à un état cellulaire antiviral. **B) La présence d'ARNdb cytoplasmique conduit à la mort cellulaire.** La protéine kinase R (PKR) peut reconnaître l'ARNdb à l'aide de son domaine de fixation à l'ARNdb. Cette fixation va conduire à la dimérisation et l'autophosphorylation de PKR qui, une fois activée, va phosphoryler le facteur traductionnel eIF2A. Cette phosphorylation empêche l'activité de eIF2A et inhibe ainsi la traduction canonique, conduisant à l'induction de l'apoptose. De plus, PKR est un gène dont l'expression est fortement augmentée après stimulation par IFN.

des plantes infectées par le virus de la mosaïque du tabac [9]. Chez les mammifères, bien que plusieurs études aient démontré l'existence de miARN codés par certains virus [10-12], la visualisation de vsmiARN semble être moins évidente. En effet, un grand nombre d'analyses par séquençage

à haut débit des sARN dans différentes lignées cellulaires somatiques, infectées par une large gamme de virus à ARN de polarité positive ou négative (dont les virus de Sindbis [SINV], de la grippe [IAV], de la dengue [DENV], du West Nil [WNV], de l'hépatite C [HCV], de la stomatite

vésiculaire [VSV], ou de la poliomyélite) n'ont pas permis de mettre en évidence l'accumulation d'un niveau significatif de vsiARN produits par Dicer [13-18].

Une des études les plus exhaustives sur la présence de vsiARN dans des cellules de mammifères a été réalisée en 2010 par une collaboration entre plusieurs laboratoires [18]. Dans cette analyse, les auteurs ont étudié, par séquençage à haut débit, l'accumulation de sARN provenant de six virus différents. Cette étude a montré que l'accumulation de ces petits ARN viraux (vsARN) est très basse de manière générale [18]. De plus, les auteurs ont observé que pour le poliovirus, le WNV et le VSV, le ratio entre les vsARN provenant du brin positif et négatif reflète plus une dégradation aléatoire des acides nucléiques viraux qu'un clivage par Dicer. Une observation confortant cette idée est que dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), déficients pour la protéine Dicer et infectés par le poliovirus, le nombre de vsARN ne diminue pas. En 2013, deux études indépendantes ont analysé, par séquençage à haut débit, l'accumulation des vsARN provenant de différentes lignées de laboratoire issues de cellules de rein humain (HEK293T) ou de singe vert (Vero) infectées par le SINV de la famille des *Togaviridae* [13, 14]. Une fois de plus, les auteurs n'ont pas réussi à visualiser la production de vsiARN par Dicer. Comme en 2010 [18], les auteurs de ces deux études ont observé une distribution aléatoire de la taille des vsARN, suggérant également une dégradation aspécifique du génome viral. En 2013, notre équipe a également démontré qu'une partie des vsARN est produite par la RNase L, une endonucléase ubiquitaire induite par l'interféron et jouant un rôle-clé dans la réponse cellulaire lors d'une infection virale [14].

En 2014, deux laboratoires ont à nouveau tenté d'observer la production de vsiARN dans des cellules humaines infectées par différents virus [15, 16]. Dans une première étude [15], les auteurs ont étudié l'accumulation de vsiARN du DENV et du WNV dans des cellules HEK. L'analyse des sARN issus du DENV et du WNV a révélé l'existence d'une population de petits ARN, allant de 17 à 29 nt, non négligeable dans le cas du WNV (1,2 % des petits ARN totaux à 72 heures d'infection). Cependant, aucun enrichissement pour des ARN de 22 nt de long n'a pu être observé. Au contraire, dans le cas du WNV, les auteurs ont remarqué un enrichissement en sARN de 18 nt de long. En examinant plus en détail l'origine de ces sARN, les auteurs ont remarqué, qu'en grande majorité, ils dérivent du brin génomique, connu pour s'accumuler à des niveaux très supérieurs par rapport au brin antigénomique dans des cellules infectées par les *Flavivirus* [15]. Dans l'analyse réalisée par le second laboratoire [16], les auteurs ont infecté des cellules gliales avec le virus de la maladie de Borna, ou des MEF avec le VSV, l'IAV ou le SINV. À l'exception des cellules infectées par le VSV, présentant un enrichissement de vsiARN

de 22 nt, les cellules infectées avec les autres virus montrent une population plus ou moins homogène de vsARN de 18 à 25 nt de long. Dans le cas du VSV, il s'est avéré que la production des vsARN lors de l'infection ne semble pas être dépendante de Dicer [16]. Par la suite, le laboratoire de Bryan Cullen a réalisé plusieurs études arrivant aux mêmes conclusions dans des cellules HEK et de carcinome pulmonaire (A459) infectées avec le virus de la poliomyélite ou l'IAV [19, 20]. Enfin, en 2017, une étude sur des cellules Hela infectées avec le virus *Coxsackie B* ou le virus de la fièvre jaune (YFV) a révélé également que, pour ces virus, aucun vsiARN produit par Dicer ne pouvait être clairement détecté. De plus, les ratios entre les vsARN provenant des brins sens et des brins antisens sont, à nouveau, en désaccord avec une production de vsiARN provenant d'intermédiaires de réplication [17].

Outre cette absence de détection de siARN d'origine virale, des données génétiques semblent également indiquer que dans les cellules somatiques, le *RNA silencing* ne joue pas un rôle antiviral majeur. En effet, chez les plantes, les arthropodes et les nématodes, où le *RNA silencing* antiviral est fonctionnel, la perte de la ou des protéines Dicer et/ou AGO impliquées dans la défense antivirale conduit à une augmentation de la réplication virale [6-8]. De ce fait, si le *RNA silencing* antiviral est actif chez les mammifères, une augmentation de la réplication virale doit pouvoir être observée dans des cellules déficientes pour Dicer ou AGO2. Or, ce n'est pas le cas pour un certain nombre de virus [15, 16, 18-21]. Dans leur étude de 2014, Bogerd *et al.* [15] ont comparé la réplication de dix virus à ARN (positif ou négatif, segmenté ou non), et d'un virus à ADN, provenant de huit genres différents, dans des cellules HEK exprimant ou non la protéine Dicer (HEK-NoDice). À l'exception du *Herpes simplex virus* (HSV-1) la réplication de tous les virus testés (DENV, WNV, YFV, SINV, VEEV, MeV, IAV, VSV, HIV-1, *Reovirus*) ne semble pas être affectée dans des cellules n'exprimant plus Dicer [15]. Cette observation a également été confirmée par la suite avec l'IAV et le poliovirus [19, 20]. Enfin, l'extinction de la protéine AGO2 dans des MEF ne semble pas affecter la réplication du VSV ni du poliovirus [18].

Toutes ces données semblent indiquer que la machinerie de l'interférence par l'ARN (RNAi) n'est pas fonctionnelle dans les cellules somatiques de mammifères. Toutefois, l'absence de preuves ne constitue pas une preuve de l'absence de ce mécanisme. Plusieurs possibilités, non mutuellement exclusives, peuvent expliquer l'absence de production de vsiARN chez les mammifères. La première implique que la protéine Dicer des mammifères serait peu processive contrairement aux Dicer dédiées à l'activité antivirale présentes chez les arthropodes et les plantes, respectivement Dicer-2 et Dicer-like 2 et 4 [22-25]. En effet, il a pu être montré que le domaine hélicase de Dicer chez

l'humain (hDicer) joue un rôle inhibiteur dans le clivage des longs ARNdb [23]. La seconde explication à l'absence de vsiARN est qu'un autre mécanisme de défense antivirale ait remplacé le RNAi antiviral au cours de l'évolution, ou masque sa détection dans certains types cellulaires. Enfin, nous ne pouvons exclure que les virus aient évolué pour développer des protéines qui inhibent le *RNA silencing* antiviral comme cela est démontré dans d'autres espèces.

### Observations du *RNA silencing* chez les mammifères sous certaines conditions

Malgré tout ce qui a été dit précédemment, il est important de préciser que, chez les mammifères, la machinerie nécessaire pour le *RNA silencing* est présente et fonctionnelle (figure 1), bien que seules les protéines AGO2 [26, 27] et, dans une moindre mesure, AGO3 [28] aient conservé une activité catalytique. De ce fait, la transfection de siARN synthétiques ou de constructions permettant l'expression de petites tiges-boucles dirigées contre des virus de mammifères (RSV, SARS-CoV et HIV-1) a un effet délétère pour ces derniers [29]. Les premières évidences directes de *RNA silencing* dans des cellules de mammifères ont été obtenues dans des lignées murines de carcinome embryonnaire pluripotentes et des cellules souches embryonnaires (CSE) transfectées par de longs ARNdb synthétiques et dont la conséquence est une réduction spécifique de l'ARNm complémentaire à cet ARNdb [30, 31]. En outre, des études sur des oocytes de souris ont permis l'identification de siARN dirigés contre des transposons endogènes [32] et la mise en évidence d'une diminution séquence-spécifique induite par des transcrits dont le repliement engendre la formation d'une longue structure double-brin [33]. Une étude réalisée quelques années après ces travaux a pu mettre en évidence le fait que l'isoforme de Dicer exprimée dans les oocytes murins est tronquée au niveau de son domaine hélicase aminoterminal, ce qui semblerait lui permettre de produire des siARN [34]. Ce domaine est donc considéré comme inhibant l'activité de la protéine Dicer exprimée dans les cellules somatiques de mammifères [23]. Une hypothèse expliquant la perte du *RNA silencing* dans les cellules somatiques de mammifère serait donc que la protéine Dicer soit structurellement incapable de produire des siARN à partir de longs ARNdb *in vivo*.

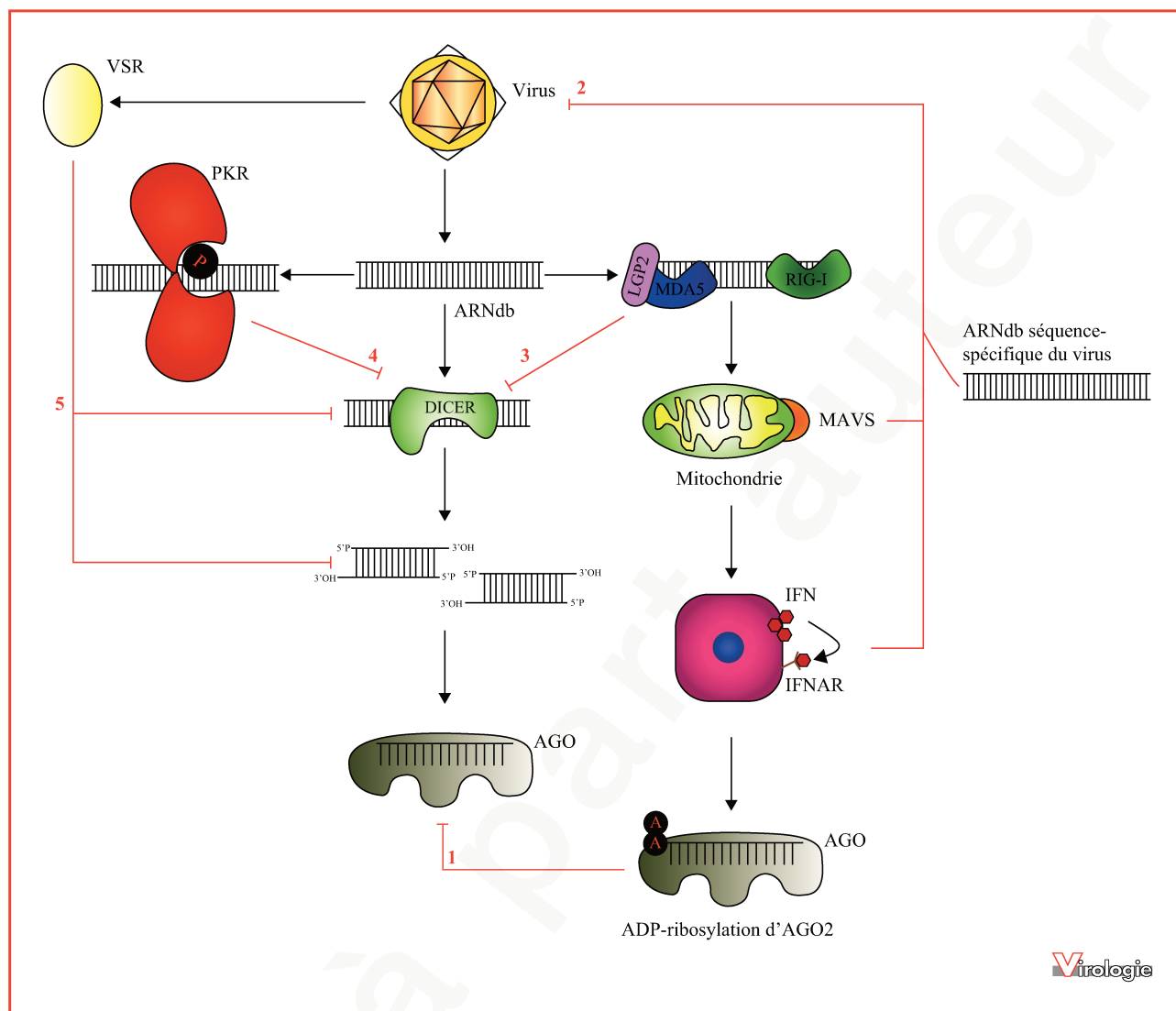
### Incompatibilité entre les réponses antivirales *RNA silencing* et réponse interféron

L'autre argument pouvant expliquer l'absence de la fonctionnalité du *RNA silencing* antiviral dans les cellules

somatiques serait son incompatibilité avec la présence d'un autre type d'immunité innée faisant intervenir l'IFN-I. En effet, l'introduction de longs ARNdb dans une cellule somatique de mammifère entraîne une diminution globale de l'expression des protéines et mène à la mort cellulaire (figure 2) [35].

Il est ainsi considéré par certains que le mécanisme de *RNA silencing* antiviral a été perdu lors de l'évolution des vertébrés, pour être remplacé par l'IFN en tant que système antiviral [36, 37]. Une des raisons avancées pour cette perte est la taille des mammifères. Pour une amplification et un transport efficace des vsiARN dans l'organisme, la présence d'une ou de plusieurs RdRp et d'un système de transport seraient requis. Bien que les mammifères possèdent un homologue de SID-1 (*Systemic RNAi Defective 1*), responsable du transport des siARN chez *Caenorhabditis elegans*, nous ne possédons pas d'homologue de RdRp [38, 39]. De plus, plusieurs études ont pu démontrer que l'expression d'une RdRp chez les mammifères induit la réponse INF-I [40, 41]. En effet, l'expression de NS5B, la réplicase du HCV dans des hépatocytes de souris ou humains, conduit à la production d'ARNdb et à l'activation de la voie IFN-I [40]. De plus, des souris transgéniques exprimant la RdRp du EMCV (*encephalomyocarditis virus*) surexpriment plus de 80 ISG par rapport aux souris sauvages, et cela sans infection virale. En particulier, des niveaux élevés d'expression de la protéine RIG-I ont été détectés, ce qui implique une activation constitutive de la voie IFN-I [41]. Les auteurs ont également établi que cette activation de la voie IFN-I était causée par l'accumulation d'ARNdb au sein de ces souris. Ces deux études vont dans le sens de ce qui peut être observé lors de la transfection dans des cellules somatiques de mammifères de longs ARNdb ou de l'acide polyinosinique-polycytidylique (Poly I-C) qui sont connus pour activer la voie IFN-I [42]. De ce fait, la présence chez les mammifères d'une RdRp endogène dans le but de produire des vsiARN afin d'immuniser l'organisme de façon systémique, à la manière des plantes [2], ne semble pas être possible.

En plus du problème posé par l'expression d'une RdRp chez les mammifères, l'équipe du Dr. Sullivan a souligné, en 2013, que la voie IFN-I et celle des miARN s'inhibaient mutuellement [43] : lors de la transfection de Poly I-C dans des cellules HEK exprimant le gène de la luciférase ciblé par la voie des miARN, la luciférase normalement réprimée est exprimée. Comme énoncé précédemment, la transfection de Poly I-C induit la réponse IFN-I indiquant que l'activation de cette voie semble inhiber celle des miARN. Les auteurs ont montré que cette inactivation est causée par l'ADP-ribosylation d'AGO2, qui a pour effet d'inhiber son activité (figure 3, voie 1). En infectant leurs cellules avec HSV-1 ou le virus Sendaï (SeV), les auteurs ont confirmé cette inhibition d'AGO2 en contexte viral lors de l'activation de la voie



**Figure 3. Éléments réprimant le RNA silencing dans les cellules somatiques de mammifères.**

(1) Lors de l'activation de la réponse IFN, l'ADP-ribosylation d'AGO2 empêche l'activité de RISC et donc inhibe le RNA silencing. (2) Les protéines MAVS et IFNAR semblent empêcher le RNA silencing antiviral. En l'absence de ces protéines, il est possible de « vacciner » les cellules en transfectant de l'ARNdb séquence-spécifique d'un virus en amont de l'infection virale. (3) La protéine LGP2 empêche le clivage de l'ARNdb par Dicer. (4) La reconnaissance de l'ARNdb cytoplasmique par PKR déclenche la mort cellulaire ; son inactivation permet de mettre en évidence l'interférence par l'ARN (RNAi). (5) Les virus codent des suppresseurs viraux du RNA silencing (VSR) qui empêchent la visualisation du RNA silencing.

IFN-I. En utilisant une approche bio-informatique, Seo *et al.* ont remarqué qu'un grand nombre d'ISG cytotoxiques sont régulés par des miARN. Ainsi, les auteurs ont émis l'hypothèse d'une inhibition réciproque de la voie IFN-I et celle des miARN : en contexte sain, les miARN régularaient l'expression des ISG néfastes à la cellule, mais en contexte viral, cette régulation serait inhibée par l'activation de la voie IFN-I permettant une réponse adaptée et rapide [43]. En 2015, notre équipe a également cherché à savoir si une réponse antivirale par le RNA silencing était

possible chez les mammifères [44]. Pour ce faire, des cellules HEK293 exprimant la protéine Dicer-2 de drosophile avec ou sans son cofacteur R2D2 (Dicer-2- ou DAR-HEK293, respectivement) ont été infectées avec SINV. Bien qu'un niveau significatif de vsiARN produits par Dicer-2 soit détectable dans les cellules DAR-HEK293 infectées, ceux-ci ne semblent pas avoir un effet délétère pour le virus. Au contraire, le titre viral dans ces cellules et dans les cellules Dicer-2-HEK293 est supérieur aux cellules contrôles suggérant une réponse compromise de la voie IFN-I dans les

cellules exprimant la protéine Dicer-2. Ainsi, l'expression de Dicer-2, la protéine antivirale présente chez la drosophile, interférerait avec la voie IFN-I suggérant encore une fois que ces deux mécanismes sont incompatibles lors d'une infection virale dans les cellules somatiques de mammifère.

### Mise en évidence du RNA silencing antiviral

La figure 3 résume les différentes approches qui ont été publiées dans le but de montrer que le RNAi antiviral peut être détecté dans les cellules somatiques de mammifères. Si la détection d'ARNdb viral par des ARN hélicases de la famille de RIG-I (RLR) empêche la mise en place d'un RNA silencing antiviral, alors on devrait pouvoir observer une réponse de type RNAi en absence de ces protéines. En effet, c'est dans des CSE non différenciées de souris, connues pour avoir une réponse interféron atténuée, qu'a été mise en évidence pour la première fois une réponse antivirale de type RNAi [45, 46]. Maillard *et al.* [45] ont démontré que l'infection de CSE murines par le picornavirus EMCV conduit à la production Dicer-dépendante de siARN qui sont chargés dans AGO2. De plus, cette publication renvoie aux travaux plus anciens en démontrant que la différenciation de ces CSE conduit à une perte de production des siARN dirigés contre le virus. Pour aller un peu plus loin, le virus de Nodamura, apparenté au virus de Flock House (FHV) codant la protéine suppresseur de RNA silencing B2 effective chez les mammifères [47], a également été utilisé dans cette étude ainsi que dans celle de Li *et al.* parue dans le même numéro de la revue *Science*. Les deux équipes ont démontré que l'infection de CSE, de cellules de reins de bébés hamsters (BHK) et de souriceaux allaités, par le virus de Nodamura dont l'expression de B2 est mutée, déclenche une réponse de type RNAi [45, 46]. En effet, des vsiARN sont produits et leur fonctionnalité a pu être démontrée par l'utilisation de cellules CSE mutées dans la machinerie du RNA silencing [45]. Enfin, l'absence de protéine B2 peut être complétée par l'expression d'un autre VSR connu, la protéine VP35 du virus Ebola [48].

Afin de mettre en évidence la notion d'incompatibilité entre réponse IFN-I et RNA silencing, l'équipe de Caetano Reis e Sousa a généré des cellules MEF dans lesquelles ils ont inactivé le gène codant la protéine MAVS, une protéine indispensable à la transmission du signal dans la réponse immunitaire dirigée contre l'ARNdb. Dans ces cellules, les auteurs ont rapporté la diminution séquence-spécifique et AGO2-dépendante de leur système rapporteur GFP uniquement lors de la transfection d'ARNdb correspondant à la séquence de la GFP. Ce RNAi a aussi été observé dans

les lignées dont l'expression des récepteurs de l'IFN-I est abolie. De plus, les auteurs ont mis en évidence la « vaccination » potentielle de cellules n'exprimant plus IFNAR ou MAVS lors de la transfection d'un ARNdb spécifique de la séquence du virus de la forêt de Semliki (SFV) dans la cellule en amont de l'infection par ce virus [49] (figure 3, voie 2). Toutefois, l'importance réelle de l'activité catalytique de la protéine AGO2 dans ce contexte n'a pu être fermement établie dans cette étude. Récemment, une nouvelle publication du même laboratoire a mis en avant le rôle de la protéine LGP2, une autre protéine appartenant aux RLR, dans l'inhibition du RNA silencing dans les cellules somatiques de mammifères [50]. La protéine LGP2 a été identifiée comme interagissant avec Dicer, et ce de manière accrue lors de la présence d'ARNdb cytoplasmique (figure 3, voie 3). Les auteurs ont produit des MEF mutantes pour LGP2 et ont révélé dans ce fond génétique la diminution séquence-spécifique de leur rapporteur GFP lors de la transfection d'ARNdb de la séquence de la GFP.

Enfin, Kennedy *et al.* [19] ont également mis en évidence une compétition entre différentes protéines reconnaissant l'ARNdb dans des cellules HEK293. Les auteurs ont obtenu des cellules inactivées à la fois dans les gènes codant Dicer et PKR, permettant ainsi la complémentation de ces cellules avec différentes isoformes de la protéine Dicer tout en s'affranchissant de la cytotoxicité de l'ARNdb induite par l'activation de PKR. Dans ce fond génétique, la transfection de Dicer est suffisante pour observer la production de siARN à partir de transcrits double-brin et lors de l'infection par IAV (figure 3, voie 4). De plus, en utilisant un mutant tronqué dans le domaine hélicase similaire à l'isoforme exprimé dans les oocytes de souris, les auteurs ont observé une production accrue de siARN [19].

Une étude récente [51] met en évidence la production Dicer-dépendante de siARN lors de l'infection de cellules HEK293T, A459 et Vero par l'IAV lorsque sa protéine NS1, préalablement caractérisée comme VSR [52] et inhibant la réponse IFN [53], est mutée. En outre, l'implication du RNA silencing antiviral a été soulignée par l'utilisation de cellules MEF exprimant une version catalytiquement inactive d'AGO2. Cette mutation entraîne une hausse du titre viral de EMCV, VSV et IAV, démontrant ainsi l'implication d'AGO2, facteur-clé du RNA silencing, en tant que facteur de restriction de ces différents virus. Le point commun entre ces différentes publications est la nécessité d'abolir la fonction hypothétique de suppression de RNA silencing des protéines virales. L'échec de la mise en évidence de la production de vsiARN lors de l'infection de cellules de mammifères par différents virus [18] et l'absence d'effet de l'ablation génétique de Dicer [15] pourraient ainsi être dus au fait qu'une majorité de virus de mammifères, de la même manière que les phytovirus [2], codent des VSR (figure 3, voie 5).



Les différentes protéines virales portant une activité de VSR décrites précédemment semblent aussi présenter une activité de suppression d'initiation de la réponse IFN du fait de leur forte affinité avec les longs ARNdb. Or, nous avons évoqué au cours de cette revue la théorie concernant l'incompatibilité entre *RNA silencing* et IFN. L'augmentation du titre viral observée en présence du VSR pourrait donc être liée uniquement à une abolition de la réponse IFN. Dans ce contexte, les travaux de Qiu *et al.* sur HEV71 apportent un début de réponse quant à l'importance réelle du *RNA silencing* dans les cellules somatiques. Ces auteurs ont identifié la protéine 3A comme possédant une activité de suppression du RNAi mais pas d'activité de suppression de la réponse IFN [54]. Ils ont pu observer par northern blot la production de siARN dirigés contre le virus lorsque la protéine 3A présente la mutation D23A, inhibant son activité de fixation à l'ARNdb. En outre, les auteurs ont démontré que le virus HEV71 déficient pour 3A a une réplication moindre qu'un virus sauvage dans des MEF et que la réplication virale peut être restaurée dans ces cellules lors de la transfection de siARN dirigés contre Dicer, et cela de manière indépendante de la perte de IFNAR. Ces résultats indiquent que, pour ce virus, le potentiel antiviral du RNAi dans des cellules somatiques de mammifères serait uniquement masqué par une activité de suppression du *RNA silencing* d'origine virale.

## Conclusion

Bien que des publications récentes aient relancé le débat sur le rôle réel du *RNA silencing* en tant que système de défense antivirale chez les mammifères, nous sommes encore loin d'avoir une réponse définitive à cette question. On peut ainsi dire qu'il est désormais admis que le RNAi est fonctionnel et actif dans des cellules pluripotentes de mammifères, comme les CSE, ou des cellules de la lignée germinale. Nous avons vu également que l'inactivation de certains gènes-clés dans la mise en place d'une réponse basée sur l'IFN peut mettre à jour une réponse séquence-spécifique basée sur la reconnaissance de l'ARNdb. Toutefois, il faut mentionner que d'autres ont cherché à inactiver des protéines RLR comme RIG-I et MDA-5, mais n'ont pas pu mettre en évidence l'apparition de siARN d'origine virale dans des cellules infectées [17]. Il reste donc à démontrer dans quelle mesure la compétition entre réponse IFN et RNAi est universelle. Enfin, on ne peut pas exclure que la production de protéines virales supprimant le RNAi puisse empêcher de détecter celui-ci dans certains cas. Cependant, la détection de siARN viraux en l'absence de telles protéines suppresseurs ne signifie pas forcément que ceux-ci vont jouer un rôle antiviral conséquent, comme l'a montré

l'équipe de Cullen récemment à propos des siARN générés en réponse au virus IAV muté dans le gène codant NS1 [20]. Enfin, il faut garder à l'esprit qu'à ce jour personne n'a pu démontrer l'importance du *RNA silencing* en réponse à une infection virale au niveau d'un organisme mammifère entier. Le *RNA silencing* en tant que système de défense antivirale chez les mammifères est un sujet qui promet de nombreuses découvertes qui, espérons-le, contribueront un jour à répondre clairement à cette question.

**Remerciements.** Les auteurs tiennent à remercier Diane Bortolamiol-Becet et Erika Girardi pour leurs commentaires et suggestions. Notre laboratoire est financé par le Conseil européen de la recherche (ERC-CoG-647455 RegulRNA) et fait partie du réseau LABEX : ANR-10-LABX-0036\_NETRINA, qui bénéficie d'un financement de l'État géré par l'Agence nationale de la recherche dans le cadre des investissements d'avenir.

O.P. bénéficie d'un contrat doctoral du ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts en rapport avec cet article.

## Références

1. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 2018 ; 173 : 20-51.
2. Ding S-W, Voinnet O. Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* 2007 ; 130 : 413-26.
3. Incarbone M, Dunoyer P. RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends in Plant Science* 2013 ; 18 : 382-92.
4. Mussabekova A, Daeffler L, Imler J-L. Innate and intrinsic antiviral immunity in Drosophila. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017 ; 74 : 2039-54.
5. Ding S-W. RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 2010 ; 10 : 632-44.
6. Lu R, Maduro M, Li F, Li HW, *et al.* Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2005 ; 436 : 1040-3.
7. Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, *et al.* Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 2006 ; 313 : 68-71.
8. Wang XH, Aliyari R, Li WX, *et al.* RNA interference directs innate immunity against viruses in adult Drosophila. *Science* 2006 ; 312 : 452-4.
9. Qi X, Bao FS, Xie Z. Small RNA Deep Sequencing Reveals Role for Arabidopsis thaliana RNA-Dependent RNA Polymerases in Viral siRNA Biogenesis. *PLoS ONE* 2009 ; 4 : e4971.
10. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, *et al.* Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2005 ; 2 : 269-76.
11. Kincaid RP, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future. *PLoS Pathog* 2012 ; 8 : e1003018.
12. Cullen BR. Viruses and microRNAs : RISCy interactions with serious consequences. *Genes Dev* 2011 ; 25 : 1881-94.

13. Donaszi-Ivanov A, Mohorianu I, Dalmay T, Powell PP. Small RNA Analysis in Sindbis Virus Infected Human HEK293 Cells. *PLoS ONE* 2013 ; 8 : e84070.
14. Girardi E, Chane-Woon-Ming B, Messmer M, Kaukinen P, Pfeffer S. Identification of RNase L-dependent, 3'-end-modified, viral small RNAs in Sindbis virus-infected mammalian cells. *MBio* 2013 ; 4 : e00698-00613.
15. Bogerd HP, Skalsky RL, Kennedy EM, *et al.* Replication of many human viruses is refractory to inhibition by endogenous cellular microRNAs. *J Virol* 2014 ; 88 : 8065-76.
16. Backes S, Langlois RA, Schmid S, *et al.* The Mammalian Response to Virus Infection Is Independent of Small RNA Silencing. *Cell Reports* 2014 ; 8 : 114-25.
17. Schuster S, Tholen LE, Overheul GJ, van Kuppeveld FJM, van Rij RP. Deletion of Cytoplasmic Double-Stranded RNA Sensors Does Not Uncover Viral Small Interfering RNA Production in Human Cells. *MSphere* 2017 ; 2 : pii : e00333-17.
18. Parameswaran P, Sklan E, Wilkins C, *et al.* Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1000764.
19. Kennedy EM, Whisnant AW, Kornepati AVR, *et al.* Production of functional small interfering RNAs by an amino-terminal deletion mutant of human Dicer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015 ; 112 : E6945-54.
20. Tsai K, Courtney DG, Kennedy EM, Cullen BR. Influenza A virus-derived siRNAs increase in the absence of NS1 yet fail to inhibit virus replication. *RNA* 2018 ; rna.066332.118.
21. Shapiro JS, Varble A, Pham AM, Tenover BR. Noncanonical cytoplasmic processing of viral microRNAs. *RNA* 2010 ; 16 : 2068-74.
22. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J* 2002 ; 21 : 5875-85.
23. Ma E, MacRae IJ, Kirsch JF, Doudna JA. Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol* 2008 ; 380 : 237-43.
24. Cenik ES, Fukunaga R, Lu G, *et al.* Phosphate and R2D2 Restrict the Substrate Specificity of Dicer-2, an ATP-Driven Ribonuclease. *Molecular Cell* 2011 ; 42 : 172-84.
25. Nagano H, Fukudome A, Hiraguri A, Moriyama H, Fukuhara T. Distinct substrate specificities of Arabidopsis DCL3 and DCL4. *Nucleic Acids Research* 2014 ; 42 : 1845-56.
26. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004 ; 305 : 1437-41.
27. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004 ; 431 : 343-9.
28. Park MS, Phan H-D, Busch F, *et al.* Human Argonaute3 has slicer activity. *Nucleic Acids Research* 2017 ; 45 : 11867-77.
29. Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 2007 ; 25 : 1435-43.
30. Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 ; 98 : 14428-33.
31. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 2000 ; 127 : 4147-56.
32. Tam OH, Aravin AA, Stein P, *et al.* Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 2008 ; 453 : 534-8.
33. Nejeplinska J, Malik R, Filkowski J, *et al.* dsRNA expression in the mouse elicits RNAi in oocytes and low adenosine deamination in somatic cells. *Nucleic Acids Res* 2012 ; 40 : 399-413.
34. Flemr M, Malik R, Franke V, *et al.* A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes. *Cell* 2013 ; 155 : 807-16.
35. Stetson DB, Medzhitov R. Type I Interferons in Host Defense. *Immunity* 2006 ; 25 : 373-81.
36. Cullen BR, Cherry S, tenOever BR. Is RNA Interference a Physiologically Relevant Innate Antiviral Immune Response in Mammals? *Cell Host & Microbe* 2013 ; 14 : 374-8.
37. tenOever BR. The Evolution of Antiviral Defense Systems. *Cell Host & Microbe* 2016 ; 19 : 142-9.
38. Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 2002 ; 295 : 2456-9.
39. Duxbury MS, Ashley SW, Whang EE. RNA interference : A mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005 ; 331 : 459-63.
40. Yu G-Y, He G, Li C-Y, *et al.* Hepatic Expression of HCV RNA-Dependent RNA Polymerase Triggers Innate Immune Signaling and Cytokine Production. *Molecular Cell* 2012 ; 48 : 313-21.
41. Painter MM, Morrison JH, Zwickle LJ, *et al.* Antiviral Protection via RdRP-Mediated Stable Activation of Innate Immunity. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1005311. doi: 10.1371/journal.ppat.1005311.
42. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 2001 ; 8 : 113-26.
43. Seo GJ, Kincaid RP, Phanaksri T, *et al.* Reciprocal inhibition between intracellular antiviral signaling and the RNAi machinery in mammalian cells. *Cell Host Microbe* 2013 ; 14 : 435-45.
44. Girardi E, Lefèvre M, Chane-Woon-Ming B, *et al.* Cross-species comparative analysis of Dicer proteins during Sindbis virus infection. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 10693.
45. Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, *et al.* Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science* 2013 ; 342 : 235-8.
46. Li Y, Lu J, Han Y, Fan X, Ding S-W. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science* 2013 ; 342 : 231-4.
47. Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J Virol* 2005 ; 79 : 7371-9.
48. Haasnoot J, de Vries W, Geutjes E-J, Prins M, de Haan P, Berkhout B. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog* 2007 ; 3 : e86.
49. Maillard PV, Van der Veen AG, Deddouche-Grass S, Rogers NC, Merits A, Reis e Sousa C. Inactivation of the type I interferon pathway reveals long double-stranded RNA-mediated RNA interference in mammalian cells. *EMBO J* 2016 ; 35 : 2505-18.
50. van der Veen AG, Maillard PV, Schmidt JM, *et al.* The RIG-I-like receptor LIG3 inhibits Dicer-dependent processing of long double-stranded RNA and blocks RNA interference in mammalian cells. *EMBO J* 2018 ; 37. pii: e97479. doi: 10.15252/embj.201797479.
51. Li Y, Basavappa M, Lu J, *et al.* Induction and suppression of antiviral RNA interference by influenza A virus in mammalian cells. *Nature Microbiology* 2016 ; 2 : 16250.
52. Li WX, Li H, Lu R, *et al.* Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 1350-5.
53. García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, *et al.* Influenza A Virus Lacking the NS1 Gene Replicates in Interferon-Deficient Systems. *Virology* 1998 ; 252 : 324-30.
54. Qiu Y, Xu Y, Zhang Y, *et al.* Human Virus-Derived Small RNAs Can Confer Antiviral Immunity in Mammals. *Immunity* 2017 ; 46 : 992-1004.e5.

## 2. Dernières publications sur la (in)compatibilité ARNi/IFN

Le sujet de la (in)compatibilité ARNi/IFN étant controversé et suscitant beaucoup d'intérêt, de nouvelles publications ont vues le jour depuis la publication de ma revue, c'est de ces éléments dont nous allons discuter dans la partie suivante.

De nombreuses études produites récemment ont mises en évidence la présence de VSR dans des virus de mammifères (Mu *et al.*, 2020; Mukhopadhyay *et al.*, 2019; Qian *et al.*, 2020; Qiu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2019). Ces VSR de virus de mammifères sont un point clé du débat IFN/ARNi chez les mammifères car ils traduisent l'importance de l'ARNi chez les mammifères et le besoin des virus d'y échapper. Le Tableau 4 ci-dessous est un récapitulatif des dernières preuves qui sont plus détaillées dans le texte qui suit.

**Tableau 4 – Récapitulatif des derniers VSR observés.**

Virus	Protéine	Activité	Preuves	Référence
SFV	Capside	Séquestration ARNdb/siARN	In cellulo (HEK293T/S2)	Qian <i>et al.</i> 2020
HCV	NS2	Séquestration ARNdb/siARN	In cellulo (HEK 293T)	Zhou <i>et al.</i> , 2019
DENV2	NS2A	Séquestration ARNdb	In cellulo (HEK293T) In vivo (MLF)	Qiu <i>et al.</i> 2020
RV-SA11	NSP1	Ubiquitylation et dégradation de AGO2 par le protéasome	In cellulo (MA104)	Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2019
SARS-CoV-2	N	Inconnue	In cellulo (HEK293T)	Mu <i>et al.</i> , 2020

Dans l'article Qian *et al.* 2020, les auteurs ont identifié une activité VSR chez les mammifères (cellules de rein d'embryon humain 293T (*human embryonic kidney 293T* - HEK293T)) et chez la drosophile (cellules S2) de la protéine de capsid du virus de la forêt de Semliki (*Semliki forest virus* – SFV). Cette protéine agirait en séquestrant l'ARNdb et les siARN. Les auteurs ont aussi produit des virus dont l'activité VSR de la protéine de capsid est abolie dans lesquels la réplication est diminuée mais peut être restaurée dans un fond cellulaire *knockout* (KO) pour Dicer, et cela de manière IFN-I indépendante. Il faut garder à l'esprit que le rôle des protéines de capsid est d'interagir avec l'ARN génomique afin de le protéger. Cette activité de séquestration des ARNdb/siARN est retrouvée chez la protéine NS2 du virus de l'hépatite C (HCV) lors de l'expression ectopique de NS2 en présence d'un système induisant l'ARNi dans des HEK293T (Zhou *et al.*, 2019). Qiu *et al.* mettent en évidence *in vitro* l'activité

VSR de la protéine NS2A du virus 2 de la dengue (*Dengue Virus-2 – DENV2*) par séquestration des ARNdb. Ils observent aussi la production Dicer-dépendante de siARN antiviraux fonctionnels dans des HEK293T infectées avec DENV2 portant une mutation dans un domaine nécessaire à l'activité VSR de NS2A. Cette infection résulte en une diminution de l'accumulation de l'ARN viral et de la formation de particule virales par rapport au virus sauvage. Il faut noter l'augmentation de la production de siARN dans des cellules HEK293T KO IFNAR infectées par DENV2, suggérant une potentielle influence négative de l'IFN-I dans la biogenèse des siARN. De plus, les auteurs ont réitéré ces tests dans des fibroblastes pulmonaires murins isolées de souris sauvages ou KO IFNAR1 âgées de 8 semaines et infectées avec DENV2 sauvage ou avec le VSR mutant. Les auteurs remarquent des défauts de réplication/production de virions dans les deux types cellulaires lorsque les cellules sont infectées avec le virus dont le VSR est muté. Le phénotype délétère peut être restauré par *knockdown* (KD) de Dicer murin. Les auteurs de l'article (Mukhopadhyay *et al.*, 2019) présentent quant-à-eux la régulation du processus de l'ARNi lors de l'infection de cellule MA104 par le rotavirus RV-SA11. Les auteurs observent une diminution de l'expression de la protéine AGO2 dans les étapes précoces de l'infection virale (2 à 6 heures) dirigée par la protéine NSP1 via ubiquitylation et dégradation de AGO2 par le protéasome. Pour terminer, la protéine N du SARS-CoV-2 semble agir en tant que suppresseur de l'ARNi dans des cellules HEK293T dans un article présentant des données cependant très préliminaires (Mu *et al.*, 2020).

D'autres articles favorable à l'existence de l'ARNi chez les mammifères sont parus, tel que l'article (Xu *et al.*, 2019) qui présente la production abondante et Dicer-dépendante de siARN dirigés contre ZIKV dans des cellules progénitrices de neurones humains (*human neural progenitor cells – hNPC*). De plus, les auteurs ont observé une augmentation du titre viral lors du KD de AGO2 ou de Dicer mais aussi lors de la surexpression de la protéine VSR B2 du virus de Nodamura (Johnson *et al.*, 2004; Körber *et al.*, 2009). Pour terminer, les auteurs ont souligné l'importance de l'ARNi anti-ZIKV dans les hNPC et dans les organoïdes de cerveau en observant une diminution significative de l'infection et de ses conséquences lors de l'utilisation de l'enoxacine, une drogue supposée agir comme stimulateur de l'ARNi (Shan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

Une récente étude a mis en évidence le rôle d'AGO4 dans la réponse antivirale dans les cellules de mammifères (Adiliaghdam *et al.*, 2020). La protéine AGO4 n'est pas exprimée dans de nombreuses cellules somatiques mais l'est fortement dans les cellules germinales mâles. C'est par ailleurs la protéine AGO la plus exprimée dans les cellules de l'immunité innée produisant

de l'IFN (macrophages, monocytes, cellules dendritiques, granulocytes). Les auteurs montrent que les cellules macrophages dérivées de la moelle osseuse de souris déficientes pour AGO4 (mais aussi les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse et les fibroblastes embryonnaires de souris) sont plus sensibles à l'infection (augmentation du titre et de l'ARN viral) lors de l'infection par le virus de la grippe A (*Influenza A virus* – IAV), le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) et par le virus de la stomatite vésiculaire (VSV). Cette étude révèle l'importance d'AGO4 dans la réponse antivirale IFN-dépendante mais aussi IFN-indépendante. En effet la déficience d'AGO4 conduit à une diminution de la production d'IFN en réponse à l'infection par IAV. Cependant, AGO4 conserve une activité antivirale dans des cellules où la réponse IFN est abolie (KO MAVS). AGO4 n'est pas active catalytiquement mais semble être essentielle pour le chargement des siARN générés lors de l'infection par IAV. De plus, les macrophages KO AGO4 sont plus susceptibles à l'infection par un virus muté dans son potentiel VSR (NS1) lorsque IFNAR est bloqué, soulignant ainsi le caractère ARNi-dépendant d'AGO4.

Les différents articles que nous avons discutés précédemment vont tous dans le sens de l'existence de l'ARNi antiviral chez les mammifères. Cependant, ce n'est pas le cas de toutes les publications récentes. En effet, ces résultats sont contrastés par plusieurs études.

L'étude du laboratoire du Dr. Cullen (Tsai *et al.*, 2018) observe bel et bien une production de siARN dirigés contre le virus IAV lors de l'infection de HEK293T avec un virus IAV muté dans NS1. Mais il semblerait que ces siARN ne soient pas bien chargés dans le complexe RISC, ces siARN sont donc inefficaces en termes d'inhibition virale. Les travaux de Schuster *et al.* 2019 décrivent la production de lignées HeLa KO AGO2 dans lesquelles l'infection avec SINV, le virus de la fièvre jaune (*Yellow Fever virus* – YFV) ou EMCV ne conduit pas à la réduction de l'ARN/titre viral. Il faut préciser que dans cette étude, les virus utilisés sont sauvages et il est possible que le manque d'effet soit observé par l'expression d'un VSR par ces virus. Les auteurs ont aussi testé la potentielle capacité de VSR de la protéine 3A de l'entérovirus Coxsackie B n°3 (CVB3) (en reproduisant une mutation proche de la mutation abolissant la capacité VSR de la protéine 3A de l'entérovirus 71 humain HEV71 (Qiu *et al.*, 2017)) mais n'ont pas pu observer d'activité VSR dans les cellules HEK293T et HeLa.

Il est clair que le débat sur l'impact de l'ARNi antiviral chez les mammifères et son incompatibilité avec la réponse IFN n'est pas clos à ce jour. De nombreuses questions peuvent être soulevées quant aux derniers résultats. Est-ce que l'ARNi antiviral est cellule-dépendant ?

Quid de l'importance *in vivo* des VSR de virus de mammifères ? Quels sont les facteurs régulant l'activité de Dicer, jouant ainsi sur la production de siARN ?

## IV. Approche globale d'inactivation génique afin d'étudier la réponse antivirale chez les mammifères

### a. Introduction au principe du crible

Lorsqu'une question biologique est posée sur l'étude d'un phénotype, une technique couramment utilisée est la génération de mutants entraînant une perte de fonction. Cette méthode analytique peut cibler l'ADN, l'ARN et les protéines afin d'abolir la fonction d'un gène. Dans notre cas, nous souhaitons étudier la réponse aux ARNdb dans des cellules de mammifères. Cette question biologique est vaste et nécessite une approche à l'échelle du génome dans le but de récupérer le plus d'informations possible vis-à-vis de la réponse de la cellule aux ARNdb. L'utilisation d'approches systématiques telles que les cribles par inactivation génique ont permis la découverte de nombreuses voies de signalisation chez les animaux (Bassik *et al.*, 2013; Driever *et al.*, 1996; Gans *et al.*, 1975; Haffter *et al.*, 1996; Horn *et al.*, 2011; Kasarskis *et al.*, 1998; Nolan *et al.*, 2000; Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980). Ces cribles consistent en une mutagenèse du génome de l'organisme d'intérêt afin d'identifier des facteurs impliqués dans une voie de signalisation ou un processus biologique. Dans le cas des cribles par inactivation génique dans les cellules en culture, la mutation du génome est régulièrement suivie par l'application d'une pression de sélection ou d'une condition de sélection qui aboutit à un phénotype d'intérêt.

Il existe trois principaux types d'approches pour la réalisation de cribles par inactivation génique, les approches par mutagenèse aléatoire, par suppression partielle et par suppression totale.

### b. Mutagenèse aléatoire – Les agents physique/chimique et les éléments mobiles

La mutagenèse aléatoire est la première technique utilisée historiquement pour les cribles par inactivation génique, en utilisant des agents physiques ou chimiques tels que les rayons X et le méthanesulfonate d'éthyle (*ethyl methane sulfonate* – EMS) qui génèrent des mutations aléatoires dans le génome (Anderson, 1995). Les transposons sont aussi utilisés et tirent l'avantage de leur taux de mutation moins élevé (et donc la possibilité de ne muter qu'un gène lors de la transposition) ainsi que de la possibilité de cartographier par PCR inverse les gènes dans lesquelles il y a eu transposition (Kawakami *et al.*, 2017; Miskey *et al.*, 2005).

Cependant, les cribles présentés ci-dessus ont une efficacité limitée en culture cellulaire du fait de l'incapacité à générer des mutations homozygotes (réalisés via croisements lors des cribles *in vivo*). Il faut noter que des lignées haploïdes de cellules de mammifères ont été mises

en place afin de générer des mutations homozygotes en utilisant ces techniques de mutagenèse aléatoire (Bürckstümmer *et al.*, 2013; Carette *et al.*, 2009).

### c. Suppression partielle ou totale

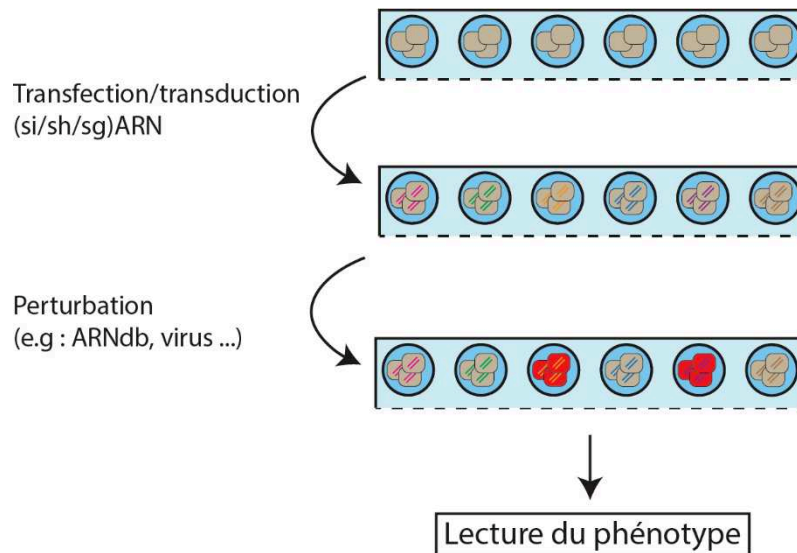
#### i. Généralités sur les cribles

Quelle que soit la technique d'inactivation génique utilisée, les cribles à l'échelle du génome sont relativement similaires dans leur mise en application. Il existe deux types d'approches de cribles actuellement utilisés, les cribles sous forme de population entière (*pooled screening*) et les cribles sous forme de plaques (*arrayed screening*).

#### 1. Les cribles sur plaque

Dans un crible sur plaque, chaque réactif ARNi (si/mi/sh)ARN ou CRISPR (sgARN) est individuellement transfecté ou transduit dans un puit d'une plaque 96 ou 384 puits, ce qui permet de remonter facilement à l'identité du gène ciblé (Figure 10). Après transfection/transduction, les cellules ayant reçu le réactif peuvent être sélectionnées si l'ajout du réactif leur offre une certaine résistance (par exemple, la transduction de (sh/sg)ARN permet d'ajouter une cassette de résistance à un antibiotique aux cellules). Les cellules sont ensuite soumises à une perturbation dont le phénotype résultant est analysé. Le crible sur plaque permet l'analyse de plusieurs paramètres dans chaque puit grâce à la lecture de ces plaques en utilisant des luminomètres, fluorimètres et des technologies d'imagerie en fonction des systèmes rapporteurs utilisés et des paramètres que l'on souhaite mesurer (König *et al.*, 2008; López *et al.*, 2020; Neumann *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2008; Whitehurst *et al.*, 2007). Le crible à haut contenu (*high-content screening* – HCS) combine la lecture de plusieurs paramètres dans une expérience (Echeverri & Perrimon, 2006; Hasson *et al.*, 2013).





**Figure 10 – Les cribles sur plaque.**

Les cribles sur plaque consistent en la transfection ou la transduction de (si/sh/sg)ARN dans des plaques afin de générer une modification différente et connue dans chaque puit de la plaque. Ensuite, une perturbation est appliquée. Cette perturbation va pouvoir modifier le phénotype (rendre la cellule rouge dans notre exemple). Alors, la lecture du phénotype d'intérêt dans le puit va déterminer quel (si/sh/sh)ARN a conduit à cette modification de phénotype en réponse à la perturbation.

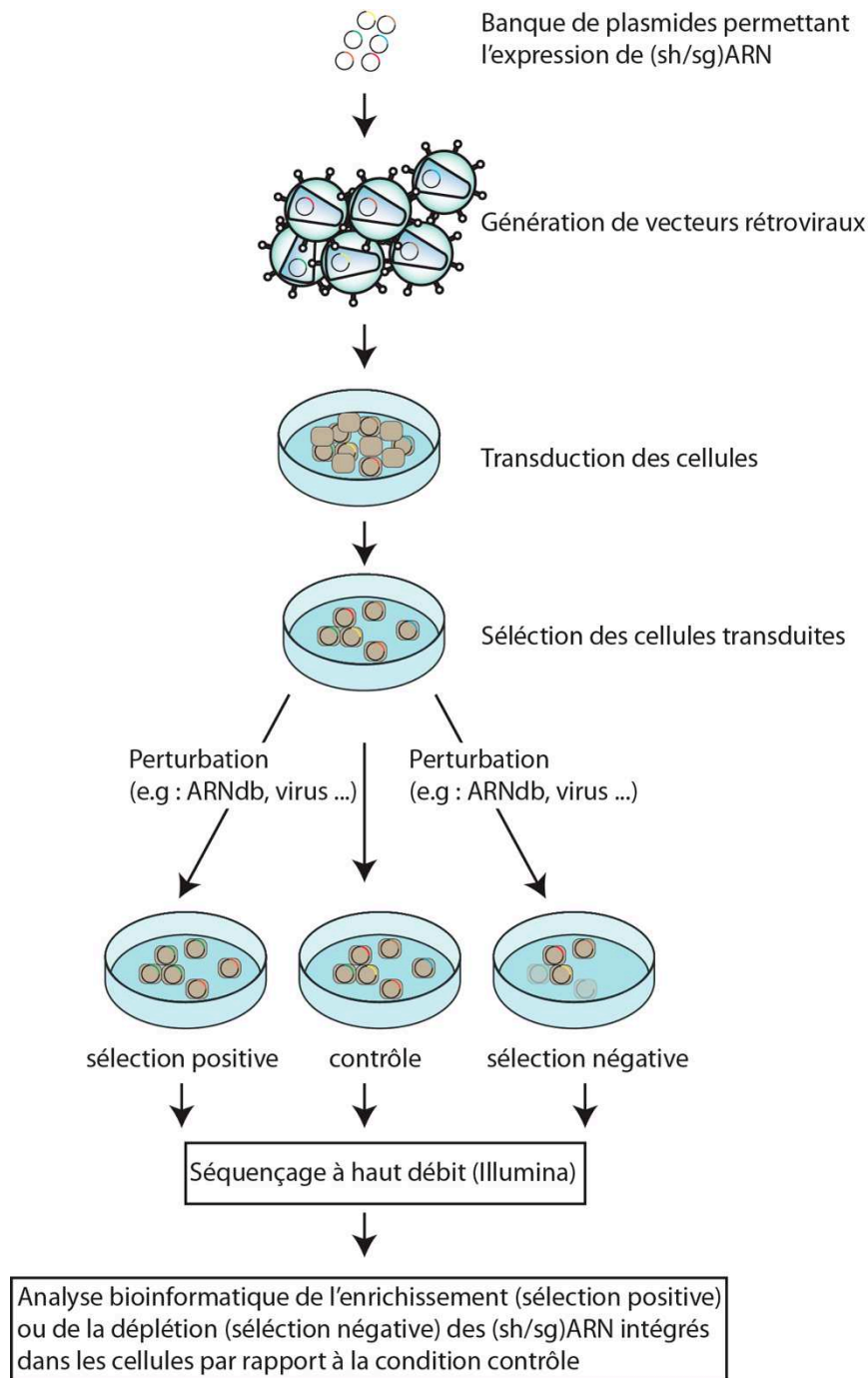
## 2. Les cribles sous forme de population

Le principe de crible sous forme de population repose sur une seule banque contenant de nombreux plasmides permettant l'expression de shARN (voir crible ARNi) ou de sgARN (voir crible CRISPR) suivi d'au moins une étape de sélection positive ou négative, ce qui est un facteur limitant si l'on souhaite réaliser un crible à haut contenu dans lesquels de nombreux paramètres cellulaires sont suivis.

Les cribles sous forme de population nécessitent la mise en place d'une banque de shARN ou de sgARN regroupant une grande quantité de molécules permettant chacune l'extinction d'un élément génomique. Dans la majorité des cas, lors d'un crible sous forme de population, on ne cherche à réaliser qu'une seule perturbation génétique par cellule et le vecteur des shARN/sgARN est un rétrovirus qui va pouvoir s'intégrer dans la cellule infectée. Il faut noter qu'il existe des cribles combinatoires, plus rares (Du *et al.*, 2017; Horlbeck *et al.*, 2018; Horn *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2017).

Les cribles sous forme de population se basent sur la séparation des cellules en sous-populations enrichies ou déplétées du phénotype d'intérêt. Cette séparation peut être réalisée sous différentes formes : par l'activité d'un gène rapporteur, l'expression d'une protéine fluorescente identifiée par tri cellulaire induit par fluorescence (*Fluorescence-activated cell sorting* – FACS), l'activité cellulaire, ou par la survie cellulaire (Doench *et al.*, 2014; Klann *et*

*al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Seo *et al.*, 2014). Une fois la sous-population d'intérêt obtenue, l'ADN génomique de cette population et d'une la population contrôle est extrait, séquencé à haut débit (*e.g* Illumina) puis l'abondance relative (la déplétion ou l'enrichissement des (sh/sg)ARN dans la condition traitée par rapport à la population contrôle) est quantifiée (Figure 11).



**Figure 11 – Les cribles sous forme de population.**

Les cribles sous forme de population consistent en la génération de vecteurs rétroviraux à partir d'une banque de plasmides qui permettent l'expression de sh/sgARN. Après transduction et sélection de cellules transduites, il suffit d'appliquer une pression de sélection afin de générer une sélection positive ou négative par rapport à une population contrôle et réaliser un séquençage à haut débit avant de faire une analyse bio-informatique pour définir les sh/sgARN qui ont été enrichis ou déplétés en fonction de la sélection.

### 3. Cribles sur plaque VS cribles sous forme de population

Les deux approches présentent chacune des avantages et des inconvénients qui sont discutés dans le Tableau 5. Afin de compléter le tableau, nous pouvons aussi ajouter que les cribles sous forme de population peuvent être appliqués *in vivo* (Beronja *et al.*, 2013; Schramek *et al.*, 2014) mais qu'il existe un risque de représentation inégale des (sg/sh)ARN dans la banque de crible sous forme de population.

**Tableau 5 - Avantages et inconvénients des approches sous forme de population ou sur plaque**

Adapté de Costa *et al.*, 2004.

	Cribles sous forme de population	Cribles sur plaque
<b>Avantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mise en place simple</li> <li>- Ne nécessitent pas d'automatisation ni d'équipement spécialisé</li> <li>- Impliquent moins de manipulations expérimentales</li> <li>- Adaptés aux tests de viabilité/prolifération</li> <li>- Faibles coûts</li> <li>- Analyse intégrale de banque ciblant le génome</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Corrélation génotype-phénotype simple</li> <li>- Adaptés aux approches HCS</li> <li>- Acquisition multiparamétrique de résultats possible</li> <li>- Adaptés aux cellules primaires/neurones</li> <li>- Des banques customisées sont disponibles</li> </ul>
<b>Inconvénients</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessitent beaucoup de cellules</li> <li>- Pas adaptés aux cellules primaires/neurones</li> <li>- Pas adaptés pour les approches HCS</li> <li>- Considérations de biosécurité quand on utilise des banques virales</li> <li>- Etape de sélection</li> <li>- Nécessitent du NGS</li> <li>- Nombre limité de mesures de l'effet</li> <li>- Les transcrits rares sont plus difficiles à identifier</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nécessitent de l'automatisation et/ou équipement spécialisé</li> <li>- Onéreux et chronophages</li> <li>- Contrôles de qualité complexes</li> <li>- Efficacité de modification du génome et de la transfection peuvent être faibles</li> <li>- Variabilité entre les plaques et les puits peut être élevée</li> </ul>

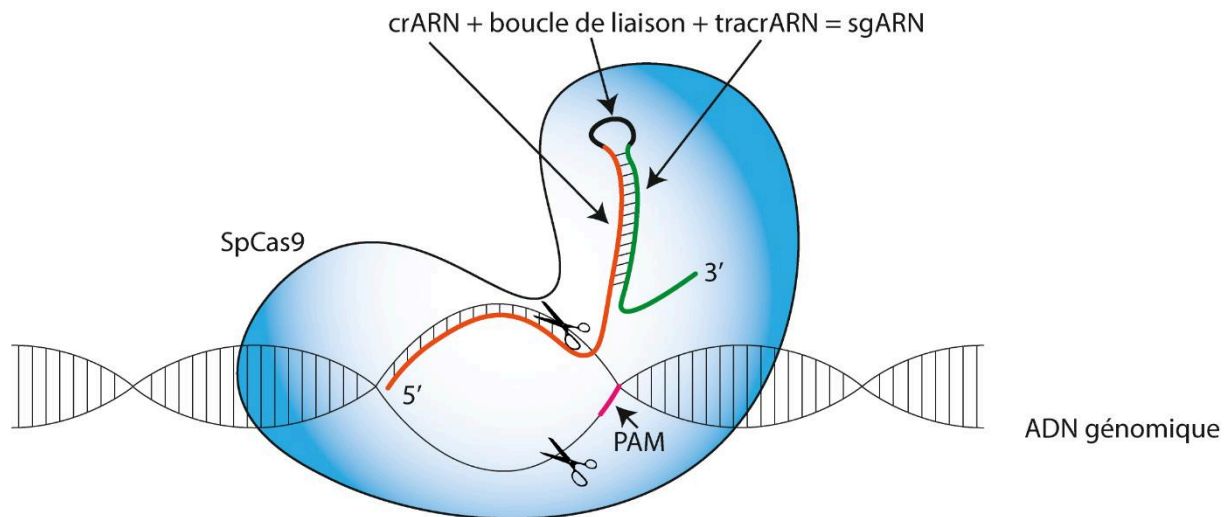
#### ii. Suppression totale – Les cribles CRISPR

La suppression totale équivaut à la modification du génome afin d'empêcher l'expression d'une région génomique (perte de la transcription de la région ciblée, cadre de lecture erroné, perte de l'expression de la protéine) La technologie CRISPR n'est pas la seule permettant la modification du génome. Les nucléases à doigt de zinc (*Zinc-finger nucleases* – ZFN) et les nucléases effectrices de type activateur de la transcription (*transcription activator-*

*like effector nucleases* – TALEN) sont des technologies applicables mais ont été supplantées par les approches de type CRISPR qui est une technique moins onéreuse et plus simple à mettre en place (Boettcher & McManus, 2015). C'est pour cette raison que nous allons uniquement nous focaliser sur la technologie CRISPR.

### 1. Historique

Décrit en 1987 dans le génome de *E. coli* par une équipe japonaise (Ishino *et al.*, 1987) puis identifié dans de nombreuses bactéries et archées (Makarova *et al.*, 2009), le locus CRISPR (*clustered regularly interspaced palindromic repeats*) contient des séquences dérivées de plasmides et de virus (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005) associées avec des protéines Cas (*CRISPR associated*) (Haft *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2002). Il s'agit d'un mécanisme de défense antiviral adaptatif des procaryotes (Barrangou *et al.*, 2007; Brouns *et al.*, 2008; Makarova *et al.*, 2006; Marraffini & Sontheimer, 2008). L'association de la nucléase Cas9 avec un ARN guide transcrit à partir du locus CRISPR permet la coupure spécifique d'ADN par appariement de l'ARN guide sur sa cible (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012). Ce mécanisme CRISPR-Cas, et plus particulièrement CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes* a été détourné en tant qu'outil de modification génétique dans les cellules de mammifères (Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). La protéine Cas9 de *S. pyogenes* (SpCas9) (Haft *et al.*, 2005) nécessite deux molécules d'ARN (l'ARN CRISPR (crARN) et le crARN *trans* activateur (tracrARN)) afin de former un complexe ARN guide/Cas9 fonctionnel (Deltcheva *et al.*, 2011). Ce système à trois composantes (tracrARN, crARN et Cas9) a par la suite été optimisé en système deux composants lors de la mise en place d'un ARN guide unique (*single guide RNA* – sgARN) afin de remplacer l'utilisation des tracrARN et crARN (Figure 12). Cas9 est impliquée dans la reconnaissance et la coupure de l'ADN exogène (aussi appelé « protospacer ») et est dirigée par le sgARN (Deltcheva *et al.*, 2011; Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012) (Figure 12). Dans le cas de SpCas9 et dans la majorité des protéines Cas, la reconnaissance du protospacer implique la présence d'un motif adjacent au protospacer (*protospacer-adjacent motif* – PAM) qui consiste en « NGG » pour SpCas9 (Hsu *et al.*, 2013) (Figure 12).



**Figure 12 - Représentation de SpCas9.**

La protéine SpCas9 est associée avec un sgARN (constitué du crARN et du tracrARN liés entre eux grâce à une boucle afin de faire une molécule d'ARN unique) est dirigée de manière séquence-spécifique par le sgARN à une région d'ADN comportant la séquence PAM (NGG pour SpCas9) et va induire une coupure double brin de l'ADN.

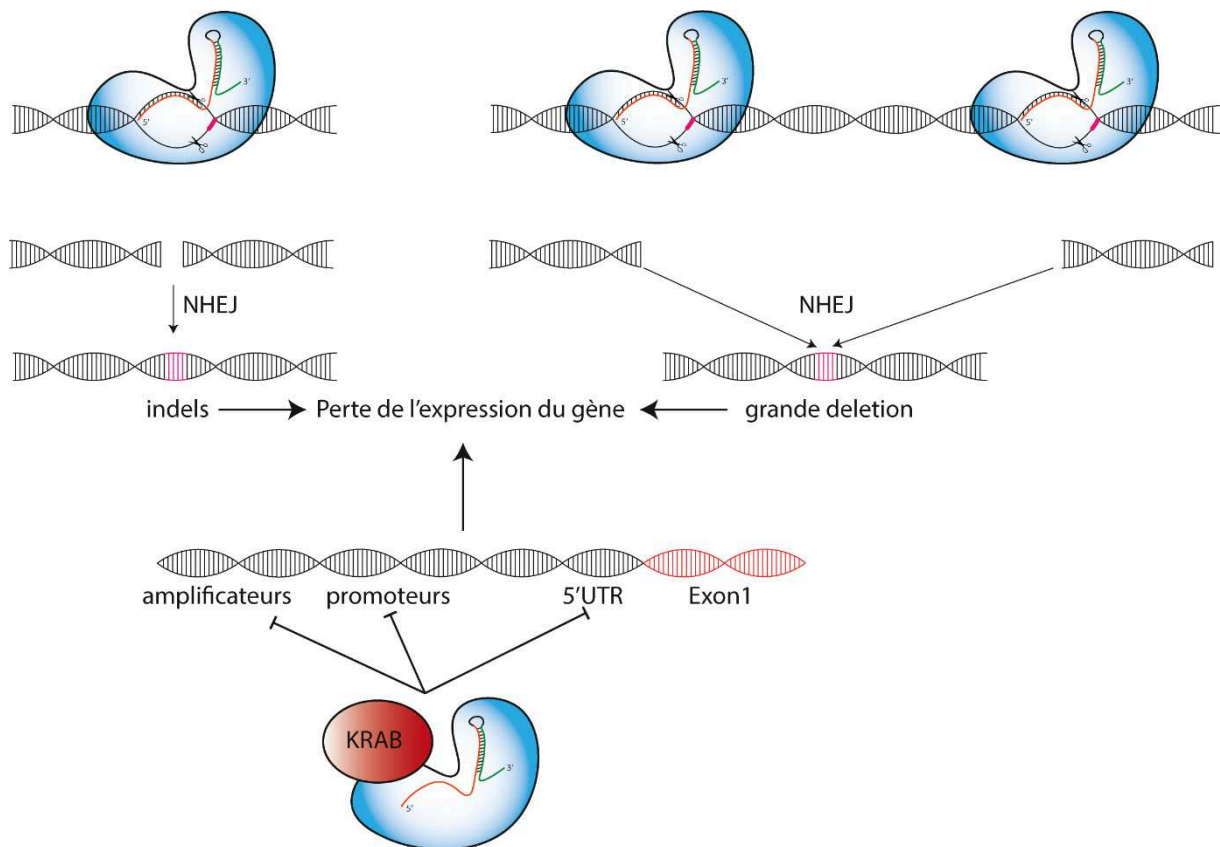
## 2. L'outil génétique

### a. Le fonctionnement

Le système CRISPR-Cas a été détourné en tant qu'outil génétique dont les applications sont nombreuses et variées (pour revues voir Komor *et al.*, 2017; Pickar-Oliver & Gersbach, 2019). Dans notre cas, nous allons nous limiter à l'utilisation du système CRISPR-Cas9 de *S. pyogenes* en tant qu'outil pour générer des mutations perte de fonction (Figure 13). La coupure double brin du protospacer par Cas9 stimule un des système de réparation du génome, la jonction d'extrémités non homologues (*Non homologous end joining* – NHEJ). Le NHEJ consiste en la reconnaissance de la cassure double brin par l'hétérodimère protéique Ku70-Ku80 qui va permettre le recrutement d'autres protéines nécessaires à la ligation des extrémités de l'ADN. Ces protéines peuvent être (i) des nucléases qui raccourcissent les extrémités de la cassure d'ADN si elles sont sortantes afin de faire des extrémités franches (ii) des polymérases pouvant incorporer des désoxynucléotides (iii) un complexe ligase liant les deux extrémités d'ADN et (iv) des protéines accessoires si l'ADN nécessite des modifications supplémentaires (pour revue Chang *et al.*, 2017). Lorsqu'un exon codant est ciblé par Cas9, le NHEJ va introduire des petites insertions/délétions (indels) lors de la réparation conduisant à une modification du cadre de lecture et potentiellement à un codon stop prématuré amenant à la perte de l'expression du gène par dégradation des ARNm non-sens (*nonsense-mediated decay* – NMD) (Cong *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013). Les exons les plus en 5' du gène sont les cibles de choix car les indels dans ces exons ont de plus fortes chances d'induire un codon stop prématuré ou un décalage du cadre de lecture plus important (Doench *et al.*, 2014).

Contrairement aux mutations aléatoires, les coupures ADNdb dirigées par Cas9 et la réparation par NHEJ se réalisent indépendamment sur chaque allèle, ainsi la diploïdie de la cellule de mammifère n'est pas un facteur qui empêche le fonctionnement de la technologie au sein des cellules de mammifères. Par ailleurs, il est possible de cibler simultanément deux sites dans un même gène afin de générer des délétions (Cong *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013) pouvant aller jusqu'à la mégabase (Essletzbichler *et al.*, 2014).

Il est aussi possible de réaliser une inactivation génique en utilisant une protéine Cas9 dont les sites catalytiques ne sont plus fonctionnels (*Cas9 endonuclease dead* – dCas9) couplée à un domaine répresseur de la transcription tel que le domaine KRAB (*Krüppel-associated box*) qui induit la formation de l'hétérochromatine et donc une répression de la transcription (Gilbert *et al.*, 2013; Kearns *et al.*, 2014). L'inactivation de la transcription par CRISPR (CRISPRi) est alors réalisée en ciblant les régions promotrices, les éléments amplificateurs (*enhancer*) proximaux et distaux et en ciblant les régions 5' non traduites des gènes (Gao *et al.*, 2014; Gilbert *et al.*, 2013; Kearns *et al.*, 2015; Thakore *et al.*, 2015). Cependant, cette inactivation requiert la connaissance et l'accessibilité du site de départ de la transcription (*Transcription start site* – TSS) (Kuscu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014) par la protéine dCas9. De plus, sa fixation pourrait inhiber la transcription des co-transcrits associés aux sites de départ de la transcription ciblés initialement, ce qui pourrait générer des résultats tronqués (He *et al.*, 2012).



**Figure 13 – Inactivation génique en utilisant CRISPR-Cas9.**

L'inactivation génique en utilisant CRISPR-Cas9 peut être réalisées de différentes façons. A. La coupure de l'ADN génomique par une protéine Cas9 recrute le mécanisme du NHEJ qui met en place des indels conduisant eux même à la perte de l'expression du gène. B. Utilisation conjointe de deux protéines Cas9 afin de générer deux coupures et ainsi une grande délétion pour perdre l'expression du gène. C. Inactivation de l'expression du gène grâce à la fusion d'une protéine Cas9 dont l'activité catalytique est abolie avec un domaine de répression de la traduction. Pour plus de détails, voir le texte ci-dessus.

#### b. Les cribles CRISPR-Cas9

La possibilité de réaliser des pertes de fonction via le système CRISPR-Cas9 combiné à la facilité de changer de cible en modifiant la séquence nucléotidique du fragment correspondant au crARN du sgARN a permis l'adaptation de ce système pour des cribles à haut débit. Les premiers cribles à haut débit ont été réalisés afin d'identifier des gènes impliqués dans la survie cellulaire lors d'un traitement par différentes drogues (Shalem *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Les résultats de ces approches ont été directement prometteurs car ils induisaient de forts effets phénotypiques et un taux de validation des résultats élevé qui a permis de visualiser l'implication de gènes clés dans des réponses à différentes drogues.

#### iii. Les cribles ARNi – Suppression partielle

Le principal type de crible par suppression partielle de l'expression génique est le crible par interférence par ARN. La découverte et la compréhension du mécanisme de l'ARNi a été une véritable révolution dans le domaine de la génomique fonctionnelle et en a fait une des

techniques les plus utilisées afin de réaliser des cribles à haut débit (Cowley *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2013). Les cribles ARNi se basent sur le détournement de la fonction de l'ARNi (voir III.b.ii) en adressant dans des cellules des vecteurs permettant la transcription d'ARN qui se replie en petit tige-boucle d'ARN (*short hairpin RNA* – shARN) qui vont produire des précurseurs de miARN ou par la transfection directe de siARN synthétiques. Les siARN vont ensuite pouvoir être incorporés dans une protéine de la famille Argonaute et diminuer l'expression d'un gène cible. Il faut noter que dans ce cas, l'expression du gène n'est pas totalement abolie car il n'y a pas de modification du génome, en effet, la molécule ARNi va inhiber l'expression du gène cible jusqu'à ce qu'elle soit diluée lors des divisions cellulaires ou dégradée.

De plus, l'utilisation des molécules ARNi peut être supplantée par l'utilisation de CRISPRi. En effet, pour un nombre équivalent d'ARN effecteurs (sgARN pour CRISPRi / siARN pour ARNi), il semblerait que le CRISPRi soit capable de produire une extinction plus robuste et plus consistante de l'expression du gène (Gilbert *et al.*, 2014, 2013),

Le Tableau 6 met en avant les caractéristiques des différentes techniques énoncées ci-dessus, mais aussi leurs avantages et inconvénients.

**Tableau 6 – Caractéristiques des principales techniques globales d'inactivation génique.**

Ce tableau est adapté des revues Boettcher & McManus, 2015; Schuster *et al.*, 2019a; Shalem *et al.*, 2015.

	<b>ARNi</b>	<b>CRISPRi</b>	<b>Cas9</b>
<b>Mécanisme</b>	Dégradation des ARNm	Répression de la transcription	Décalage du cadre de lecture / codon stop prématuré
<b>Résultat</b>	Réversible	Réversible	Irréversible
<b>Cibles</b>	ARNm, miARN, longs ARN non codants cytoplasmiques	Zones codantes et non codantes	Zones codantes et non codantes
<b>Cibler les variants de l'épissage</b>	Oui	Oui si les TSS sont différents	Oui
<b>Transgène</b>	si/shARN	dCas9-KRAB + gARN	Cas9 + gARN
<b>Information nécessaire</b>	Transcriptome	TSS annoté	Transcriptome / génome
<b>On-target</b>	En fonction de la séquence ciblée et de l'expression basale du gène ciblé	En fonction du potentiel de l'ARNg, de la qualité de l'annotation du TSS, de la structure de la chromatine	En fonction du potentiel de l'ARNg, de la ploïdie cellulaire, de la structure de la chromatine et de la spécificité de l'indel



		et de l'expression basale du gène ciblé	
<b>Off-target</b>	Élevé	Très faible	Faible
<b>Zone de l'off-target</b>	Transcriptome	Autour du TSS	Génome
<b>Spécificités</b>	Étude de l'épistasie Létalité synthétique	Étude de l'épistasie Létalité synthétique	Identification des gènes essentiels
<b>Prix</b>	siARN : Élevé shARN : Faible	Faible	Faible
<b>Références</b>	Boutros & Ahringer, 2008; Cowley <i>et al.</i> , 2014; Franceschini <i>et al.</i> , 2014; Jackson <i>et al.</i> , 2003; Jackson & Linsley, 2010; Kampmann <i>et al.</i> , 2015; Miller <i>et al.</i> , 2017; Schmidt <i>et al.</i> , 2013; Seo <i>et al.</i> , 2014	Fulco <i>et al.</i> , 2016; Gilbert <i>et al.</i> , 2014; Klann <i>et al.</i> , 2017; Liu <i>et al.</i> , 2017; Rosenbluh <i>et al.</i> , 2017	Aguirre <i>et al.</i> , 2016; Canver <i>et al.</i> , 2015; Chen <i>et al.</i> , 2015; Cowley <i>et al.</i> , 2014; Doench <i>et al.</i> , 2014; Evers <i>et al.</i> , 2016; Hart <i>et al.</i> , 2017, 2015; Koike-Yusa <i>et al.</i> , 2014; Korkmaz <i>et al.</i> , 2016; Kuscu <i>et al.</i> , 2014; Morgens <i>et al.</i> , 2016; Munoz <i>et al.</i> , 2016; Rauscher <i>et al.</i> , 2017; Shalem <i>et al.</i> , 2014; Wang <i>et al.</i> , 2014; Yuen <i>et al.</i> , 2017; Zhou <i>et al.</i> , 2014

En plus des différentes caractéristiques énumérées dans le Tableau 6, l'analyse des phénotypes obtenus lors des cribles semble démontrer un effet plus fort de Cas9 (nucléase ou dCas9) par rapport à l'utilisation de shARN pour la perte de fonction (Evers *et al.*, 2016; Gilbert *et al.*, 2014; Koike-Yusa *et al.*, 2014; Morgens *et al.*, 2016; Shalem *et al.*, 2014).

#### d. Identification des facteurs de l'hôte impliqués dans l'infection virale en utilisant des cribles à haut débit

De nombreux cribles ont été mis en place afin d'identifier des facteurs cellulaires impliqués dans l'infection virale (Flint *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2018; Karlas *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017; Kulsuptrakul *et al.*, 2019; Labeau *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020, 2019; Savidis *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020). Dans ces cribles, on remarque que lorsqu'il n'y a pas de sélection spécifique vis-à-vis d'un phénotype d'intérêt, alors on identifie majoritairement des gènes

impliqués dans les premières étapes du cycle viral (attachement, entrée, relargage du virus). En effet, le crible réalisé au cours de l'étude (Flint *et al.*, 2019) a permis l'identification du gène GNPTAB, nécessaire pour l'entrée du virus Ebola. De façon similaire, les cribles (Han *et al.*, 2018; Karlas *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017; Kulsuptrakul *et al.*, 2019; Labeau *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020, 2019; Savidis *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020) ont tous identifié des gènes impliqués dans les premières étapes du cycle. Il est possible d'identifier des gènes impliqués dans les étapes subséquentes à l'entrée du virus en ajoutant une étape de sélection phénotypique. Les auteurs de (Li *et al.*, 2020) ont trié les cellules dans lesquelles l'infection par le virus de la grippe A est bloquée précocement (identification d'un faible taux d'hémagglutinine (HA) virale exposé par la cellule) par rapport aux cellules dans lesquelles l'infection est bloquée tardivement (fort taux d'HA exposé). Ainsi, ils ont pu identifier des gènes impliqués dans l'entrée du virus mais aussi dans les étapes subséquentes.

## V. Objectifs

L'étude de la relation entre réponse antivirale et ARNdb chez les mammifères est un domaine en pleine expansion et dans lequel de nombreuses interrogations subsistent. Dans le laboratoire « ARN non codants et infections virales » dirigé par le Dr. Sébastien Pfeffer, nous nous intéressons entre autres aux bases moléculaires de la réponse antivirale chez les mammifères.

L'ARNdb est une molécule clé de l'infection virale retrouvée lors de l'infection par de nombreux virus. En effet, la majorité des virus est susceptible de produire de l'ARNdb lors de leur cycle ; les virus à ARN lors de leur réplication et les virus à ADN lors de transcriptions convergentes (Weber *et al.*, 2006). Ainsi, nous avons décidé de nous intéresser à l'identification de nouveaux facteurs qui seraient associés à cette réponse aux ARNdb, et donc identifier indirectement des facteurs associés à la réponse contre de nombreux virus. Cependant, l'utilisation de cette molécule permettant de s'affranchir de facteurs viraux pouvant interférer avec la réponse immunitaire comme des VSR ou des facteurs de restriction de la réponse IFN produits par de nombreux virus (Devasthanam, 2014) exclue les facteurs viraux qui pourraient avoir une grande importance dans la relation hôte/pathogène. C'est pourquoi, lors de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'ARNdb tout en infectant en parallèle nos cellules avec le virus de Sindbis qui produit obligatoirement de l'ARNdb lors de sa réplication.

Notre question biologique consiste alors en l'identification et la caractérisation de nouveaux facteurs impliqués dans la réponse des cellules somatiques de mammifères aux ARN double brin. Le but était d'identifier des facteurs impliqués dans la réponse IFN, dans la possible incompatibilité IFN/ARNi ou des facteurs impliqués (in)directement dans l'inhibition de l'ARNi dans les cellules somatiques de mammifères.

Afin d'identifier ces facteurs, nous avons décidé de réaliser des cribles globaux par perte de fonction dans les cellules épithéliales HCT116 qui sont sensibles à l'infection de SINV et à l'ARNdb sous les formes suivantes :

- 1) Identification des facteurs impliqués dans la survie cellulaire en réponse aux ARNdb (qu'ils soient synthétiques ou viraux)
- 2) Identification des potentiels facteurs de restriction de l'ARNi dans les cellules somatiques de mammifères

# Résultats

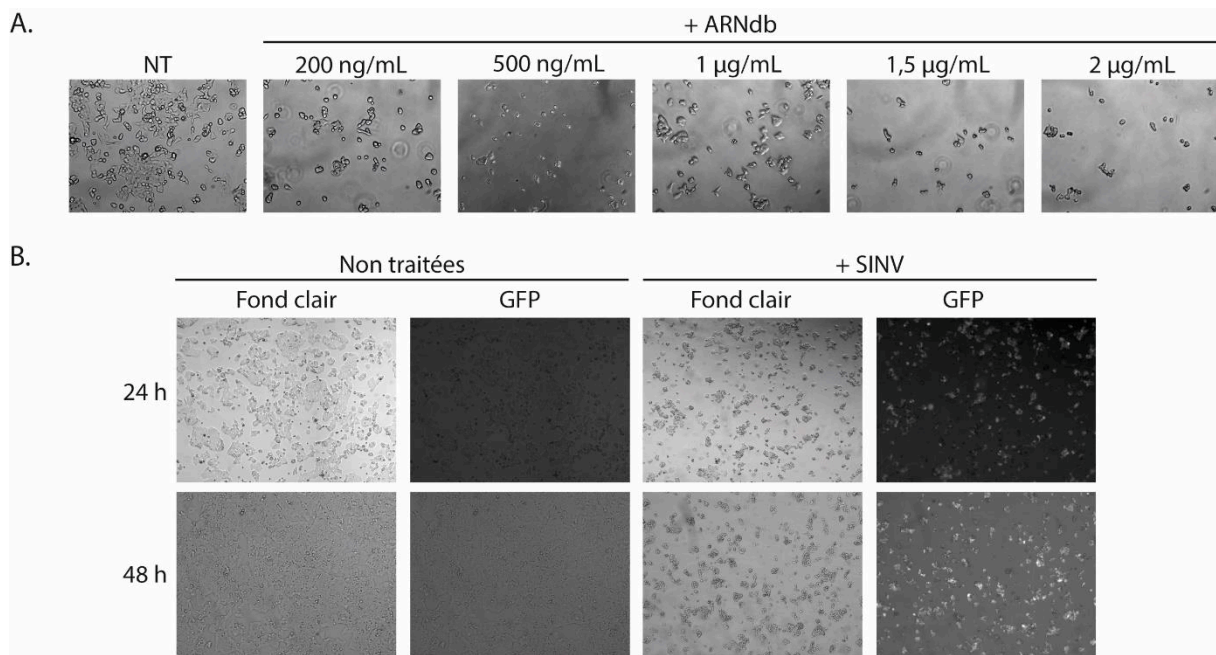
La partie résultats est constituée de deux axes principaux. Ces axes sont fractionnés en fonction des questions biologiques auxquelles nous souhaitons répondre. La première partie sera dédiée aux cribles dans lesquels le phénotype recherché consiste en la survie à une pression de sélection (ARNdb / virus de Sindbis (SINV)) La seconde partie, portera quant-à-elle sur un crible dont le phénotype escompté est la restauration de l'interférence par ARN.

## I. Identification des facteurs impliqués dans la survie cellulaire en réponse aux ARNdb (synthétiques ou viraux)

### a. La lignée HCT116 est adaptée pour notre approche CRISPR-Cas9

Nous avons réalisé notre approche dans la lignée tumorale de colon humain HCT116. Cette lignée épithéliale est quasi-diploïde (JallepTalli et al. 2001) et se divise toutes les 21 heures approximativement. Ces caractéristiques assurent une modification du génome cellulaire efficace lors d'un crible CRISPR-Cas9 (Golden *et al.*, 2017).

Afin de vérifier la sensibilité de la lignée HCT116 aux ARNdb synthétiques et viraux, nous avons déterminé l'induction de la mort cellulaire lors de la transfection de différentes concentrations d'ARNdb (Figure 14.A) ou lors de l'infection par SINV qui exprime la GFP (Figure 14.B) en visualisant leur effet cytopathogène en microscopie optique. Le génome de SINV est modifié afin de permettre l'expression de la GFP via un ARN sub-génomique viral. La visualisation de la GFP indique ainsi une étape concomitante à la production de la forme répliquative double brin de SINV. La sensibilité de nos cellules aux pressions de sélection est visualisée par observation microscopique dans le but de déterminer les concentrations idéales permettant la sélection des cellules ayant acquis une résistance.

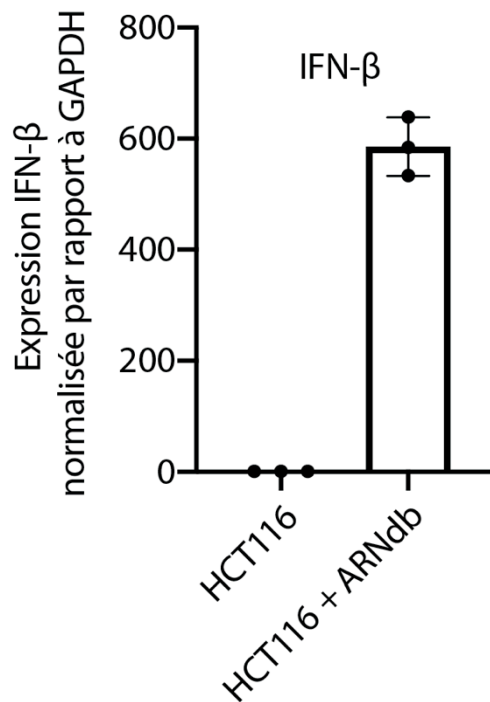


**Figure 14 – Sensibilité des cellules HCT116 aux acides nucléiques et à l’infection par SINV.**

**A. Transfection d’ARNdb.** Observation au microscope optique des cellules HCT116 24 heures après transfection d’ARNdb. 80 000 cellules – plaque 24 puits – objectif 10X. **B. Infection SINV-GFP.** Observation au microscope à épifluorescence des cellules HCT116 24 et 48 heures post infection. 80 000 cellules – plaque 24 puits – SINV-GFP – MOI 0.1 – objectif 5X.

L’observation des effets cytopathiques après transfection d’ARNdb nous indique que les cellules meurent à partir de la transfection de 500 ng/mL d’ARNdb (Figure 14.A). Nous avons décidé de travailler avec la concentration d’ARNdb de 1 µg/mL pour avoir une induction de la mort efficace. D’autre part, les cellules HCT116 peuvent être infectées par SINV-GFP en utilisant une multiplicité d’infection (*multiplicity of infection* – MOI) de 0.1 déterminée au préalable au sein du laboratoire. On remarque que la quasi-totalité des cellules est infectée dès 24 heures post inoculation et que l’infection conduit à la mort des cellules après 48 heures (Figure 14.B).

Pour s’assurer du lien de causalité entre mort cellulaire et activation de la réponse interféron lors de la transfection d’ARNdb, l’ARN messager de l’IFN-β a été dosé par PCR quantitative en temps réel (*Real-time quantitative PCR* – RT-qPCR) (Figure 15).



**Figure 15 – Dosage de l'ARNm de l'IFN-β.**

Analyse RT-qPCR sur l'ARN messenger de l'IFN-β 24 heures post transfection ou non de 1 ug/mL d'ARNdb dans des cellules HCT116. L'expression est normalisée par rapport à l'expression de l'ARN messenger de GAPDH. Les ARN totaux ont été extraits à l'aide de TRIzol.

La quantification de l'ARNm de l'IFN-β révèle une augmentation de l'expression d'un facteur 600 de ce dernier dans les cellules transfectées avec de l'ARNdb par rapport aux cellules non traitées. La transfection d'ARN induit donc bien la réponse IFN dans les cellules HCT116.

Ces différents résultats nous confortent dans le choix de la lignée HCT116 pour les expériences suivantes.

En effet, la lignée HCT116 est sensible à l'ARNdb (Figure 14.A & Figure 15) et à l'infection par SINV (Figure 14.B) en plus d'être une lignée quasi-diploïde adaptée aux approches en cribles (Golden *et al.*, 2017).

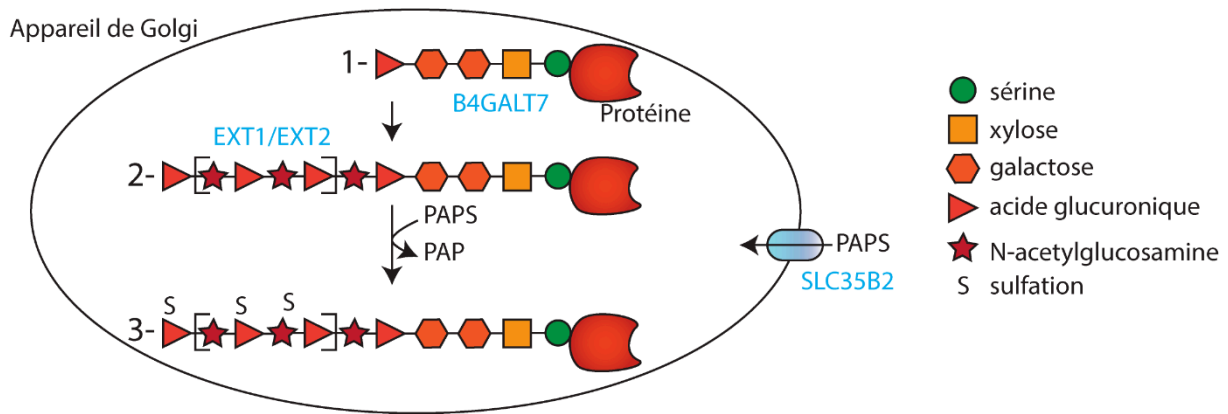
*b. "Genome-wide CRISPR-Cas9 screen reveals common factors in dsRNA and Sindbis virus-induced cell death"*

Afin de caractériser les facteurs essentiels pour la survie cellulaire lors de la transfection d'ARNdb ou lors de l'infection par SINV, j'ai mis en place deux cribles CRISPR-Cas9 par inactivation génique basés sur la survie cellulaire dans les cellules HCT116 après optimisation des conditions d'ensemencement et de transfection (Voir Matériels et Méthodes) et m'être assuré que les cellules ne soient pas contaminées par mycoplasme. Ces cribles ont été réalisés en utilisant la banque de sgARN Brunello qui est une banque constituée de 76 441 sgARN différents ciblant 19 114 gènes (en moyenne 4 sgARN/gène) en plus de 1 000 sgARN contrôle (Doench *et al.*, 2016). Chaque sgARN est optimisé pour avoir une efficacité de KO maximale. L'analyse bio-informatique a identifiée 8 gènes enrichis de façon significative (B4GALT7, SLC35B2, EXT1, EXT2, COG3, COG4, COG8, LEFTY1) et m'a conduit à l'identification de deux voies de signalisation, la voie des héparanes sulfates (B4GALT7, SLC35B2, EXT1, EXT2) et le complexe oligomérique conservé de l'appareil de Golgi (*Conserved oligomeric Golgi complex* – COG) (COG3, COG4, COG8).

1. La voie des héparanes sulfates

Les héparanes sulfates (HS) sont des polymères hautement sulfatés appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAG) (pour revue, voir Li & Kusche-Gullberg, 2016). Les HS sont majoritairement associés à des protéines, formant ainsi des glycoprotéines nommées protéoglycane à héparane sulfate (*heparan sulfate proteoglycans* – HSPG). Les HSPG sont ubiquitaires et interagissent avec de nombreux ligands (chimiokines, facteurs de croissance, récepteur viraux (Bishop *et al.*, 2007; Cagno *et al.*, 2019)). Les HSPG sont divisés en 3 groupes : les HSPG associés à la membrane plasmique (syndecans et glypicans) ; les HSPG sécrétés dans la matrice extracellulaire (agrin, perlecan, collagène XVIII) et les HSPG appartenant aux granules de stockage intracellulaire (serglycin). La synthèse des HSPG est réalisée au sein de l'appareil de Golgi par étapes successives (Figure 16) dont les principales étapes consistent en :

- 1- La formation d'une zone d'attachement du polymère sur une protéine.** La zone d'attachement est réalisée sur un résidu sérine (occasionnellement thréonine) et consiste en la formation du motif universel aux glycosaminoglycanes : xylose-galactose-galactose-acide glucuronique (GlcA). La protéine Béta-1,4-Galactosyltransferase 7 (B4GALT7) que nous avons identifiée est impliquée dans la synthèse de ce motif en réalisant l'addition du premier galactose sur le xylose (Cartault *et al.*, 2015; Faiyaz-Ul-Haque *et al.*, 2004).
- 2- La synthèse du polymère.** La spécificité des héparanes sulfates débute par l'addition d'une glucosamine (N-Acetylglucosamine - GlcNAc) sur le tétrasaccharide qui entraîne l'addition séquentielle de GlcA/GlcNAc par les Exostosin-1 et 2 (EXT1/EXT2) (Busse *et al.*, 2007).
- 3- La maturation du polymère.** Le polymère ainsi formé est mûri en subissant de nombreuses modifications dont des sulfatations par des sulfotransférases qui nécessitent des 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) en tant que donneurs de sulfate. Ces PAPS sont importés dans l'appareil de Golgi par le transporteur *Solute Carrier Family 32 Member B2* (SLC35B2).



**Figure 16 – Voie simplifiée de la biogenèse des héparanes sulfates.**

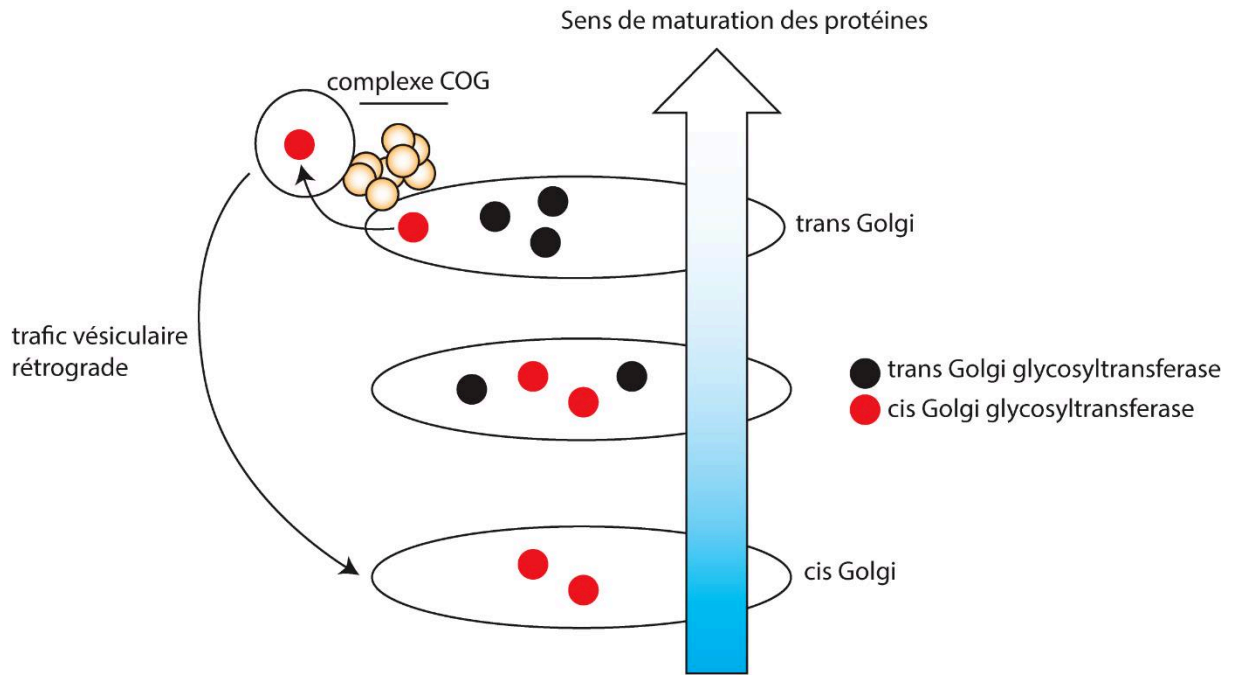
Voir le texte ci-dessus. 1-, 2- et 3- renvoient aux principales étapes de la synthèse des héparanes sulfates. Les protéines en bleu sont les protéines identifiées en tant que facteurs impliqués dans la réponse aux ARNdb lors de notre criblage CRISPR-Cas9.

De nombreuses protéines sont impliquées dans la synthèse des HSPG. Dans la Figure 16 et le texte ci-dessus, je n'ai mis en évidence que les protéines que nous avons identifiées lors du criblage.

## 2. Le complexe COG

Le complexe COG est un complexe protéique constitué de 8 sous-unités (COG1 à COG8) qui évolue à proximité de l'appareil de Golgi. Le complexe COG semble être impliqué dans le trafic vésiculaire rétrograde qui consiste au maintien de la compartimentalisation des protéines golgiennes (Figure 17) (trafic vésiculaire rétrograde) (pour revue Blackburn *et al.*, 2019). Le complexe COG interagit avec de nombreuses protéines impliquées dans le trafic membranaire intra-Golgi tel que les protéines de la famille Rab et les protéines impliquées dans le complexe SNARE (Blackburn *et al.*, 2019; Willett *et al.*, 2013).





**Figure 17 – Représentation de l’implication du complexe COG dans le trafic vésiculaire rétrograde.**

Le sens de la maturation des protéines peut engendrer des erreurs de localisation des protéines golgiennes impliquées dans la localisation/modification des protéines passant dans le Golgi. Les protéines dont la localisation est erronée, ici une glycosyltransférase appartenant au cis Golgi qui est dans un compartiment du trans Golgi est réadressée dans le cis Golgi grâce au trafic vésiculaire rétrograde.

Les résultats de ces cribles sont présentés dans l’article qui est actuellement en révision dans la revue mSphere.

## **Genome-wide CRISPR-Cas9 screen reveals common factors in dsRNA and Sindbis virus-induced cell death**

Olivier Petitjean<sup>1,\*</sup>, Erika Girardi<sup>1,\*</sup>, Richard Patryk Ngondo<sup>2</sup>, Vladimir Lupashin<sup>3</sup>, Sébastien Pfeffer<sup>1,‡</sup>

1 Université de Strasbourg, Architecture et Réactivité de l'ARN, Institut de biologie moléculaire et cellulaire du CNRS, 2 allée Konrad Roentgen, 67084 Strasbourg France

2 Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg France

3 University of Arkansas for Medical Sciences, 4301 West Markham Street, Little Rock, Arkansas 72205, United States of America

\* These authors contributed equally

‡ To whom correspondence should be addressed: [spfeffer@unistra.fr](mailto:spfeffer@unistra.fr)

**Abstract**

Double stranded RNA (dsRNA) is the hallmark of many viral infections. dsRNA is produced either by RNA viruses during replication or by DNA viruses upon convergent transcription. Synthetic dsRNA is also able to mimic viral-induced activation of innate immune response and cell death. In this study, we employed a genome-wide CRISPR-Cas9 loss of function screen based on cell survival in order to identify genes implicated in the host response to dsRNA. By challenging HCT116 human cells with either synthetic dsRNA or Sindbis virus (SINV), we identified the heparan sulfate (HS) pathway as a crucial factor for dsRNA entry and we validated SINV dependency on HS. Interestingly, we uncovered a novel role for COG4, a component of the Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex, as a factor involved in cell survival to both dsRNA and SINV. We showed that COG4 knock-out led to the depletion of extracellular HS, specifically affected dsRNA transfection efficiency and reduced viral production, explaining the increased cell survival of these mutants.

**Importance**

When facing a viral infection, the organism has to put in place a number of defense mechanisms in order to get rid of the pathogen. At the early phase of this preparation for fighting against the invader, the innate immune response is triggered by the sensing of danger signals. Among those molecular cues, double-stranded (dsRNA) is a very potent inducer of different reactions at the cellular level that can ultimately lead to cell death. Using a genome-wide screening approach, we set to identify the genes involved in dsRNA sensing and apoptosis induction in human cells. This allowed us to determine that the heparan sulfate pathway, and the Conserved Oligomeric Golgi complex, are key determinants allowing both cellular entry of dsRNA and subsequent signaling leading to cell death.

## Introduction

When a virus infects a cell, numerous mechanisms are put in place to raise the alarm and get rid of, or at least limit, the invader. One of the first barrier that the virus has to overcome to enter the cell is by taking advantage of the wide diversity of ubiquitous or cell-specific cellular receptors. In addition to protein receptors, glycosaminoglycans present at the cell surface also represent crucial factors for efficient viral attachment and entry (Bomsel and Alfsen, 2003). Glycosaminoglycans, and more precisely heparan sulfates are ubiquitously expressed in human cells. They possess a global negative charge that is able to interact electrostatically with the basic residues that are exposed by viral surface glycoproteins. This allows viruses to increase their concentration at cell surface and so the possibility to interact with their specific entry receptor (Rusnati et al., 2009). For instance, alphaviruses such as Semliki Forest virus (SFV) and Sindbis virus (SINV) are enveloped positive-strand RNA viruses that contain two glycoproteins at the envelope, the proteins E1 and E2. E2 is involved in the interaction of the virus particle to the cell surface (Byrnes and Griffin, 1998; Smith et al., 1995), while E1 serves in the fusion process (Wahlberg et al., 1992).

Once inside the cell, the replication of the viral genome represents another critical step to trigger the antiviral immune response. A ubiquitous pathogen-associated molecular pattern (PAMP) recognized by the cellular machinery is double-stranded (ds) RNA, which can arise as a replication intermediate for viruses with an RNA genome, or from convergent transcription for DNA viruses (Weber et al., 2006). In mammals, dsRNA recognition is driven by specific receptors including the cytoplasmic RIG-Like Receptors (RLRs) and endosomal Toll Like Receptors (TLRs) (Schlee and Hartmann, 2016). Sensing of dsRNA by these receptors results in the activation of a complex signaling cascade leading to the production of type I interferon (IFN), which in turn triggers the expression of IFN stimulated genes (ISG) and the establishment of the antiviral state (Stetson and Medzhitov, 2006). The ultimate outcome of this vertebrate-specific antiviral response is translation arrest and cell death by apoptosis (García et al., 2007).

The revolution brought by the discovery of the CRISPR-Cas9 technology has provided biologists with an invaluable tool to edit the genome at will and easily perform individual gene knock-out (Shalem et al., 2015). This technique is perfectly suited to perform genome-wide screens in a relatively fast and easy to implement manner, especially when the readout is based on cell survival. For this reason, numerous CRISPR-Cas9 loss of function screens have been performed based on cell survival after infection with different viruses (Han et al., 2018; Park et al., 2017; Zhang et al., 2016). These approaches allowed the identification of novel virus specific as well as common factors involved in antiviral defense mechanisms or in cellular permissivity to virus infection.

Here, we chose to take advantage of the fact that dsRNA is almost always detected in virus-infected cells (Weber et al., 2006) and is a potent inducer of apoptosis to design a genome-wide screen aiming at identifying host genes that when edited resulted in increased cell survival to dsRNA and viral challenge. To this aim, we performed a CRISPR-Cas9 screen based on cell survival in HCT116 cells after either cationic lipid-based transfection of an *in vitro* transcribed long dsRNA or infection with the model alphavirus SINV, which replicates *via* a dsRNA intermediate.

Our results indicate that genes involved in limiting attachment and therefore entry, be it of the synthetic dsRNA or SINV, are vastly over-represented after selection. We validated two genes of the heparan sulfate pathway (namely *SLC35B2* and *B4GALT7*) as required for dsRNA transfectability and SINV infectivity. We also identified and characterized COG4, a component of the conserved oligomeric golgi (COG) complex, as a novel factor involved in resistance to dsRNA and viral infection via the heparan sulfate biogenesis pathway, although not

exclusively. Altogether, these findings demonstrate that the identification of key pathways of the cellular response to RNA virus can be achieved by employing synthetic dsRNA as a tool.

## Results

### Genome-wide CRISPR/Cas9 screen based on cell survival upon dsRNA transfection identify factors of the heparan sulfate pathway

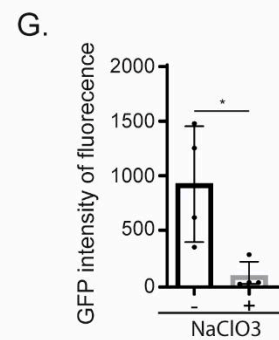
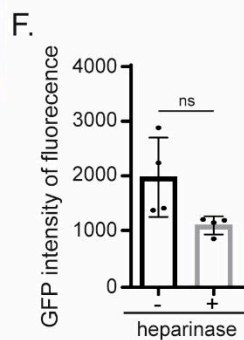
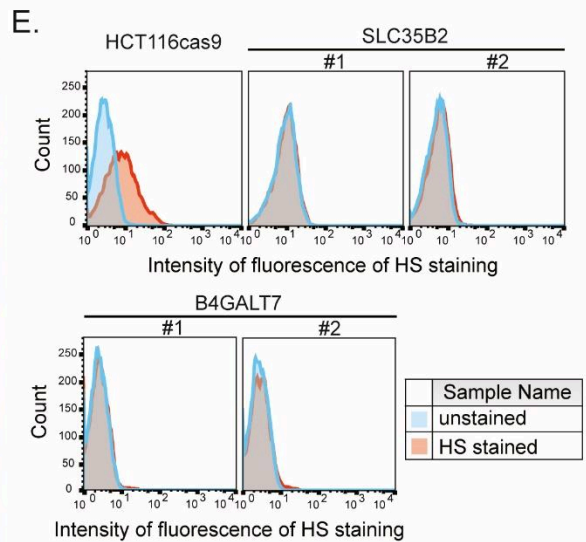
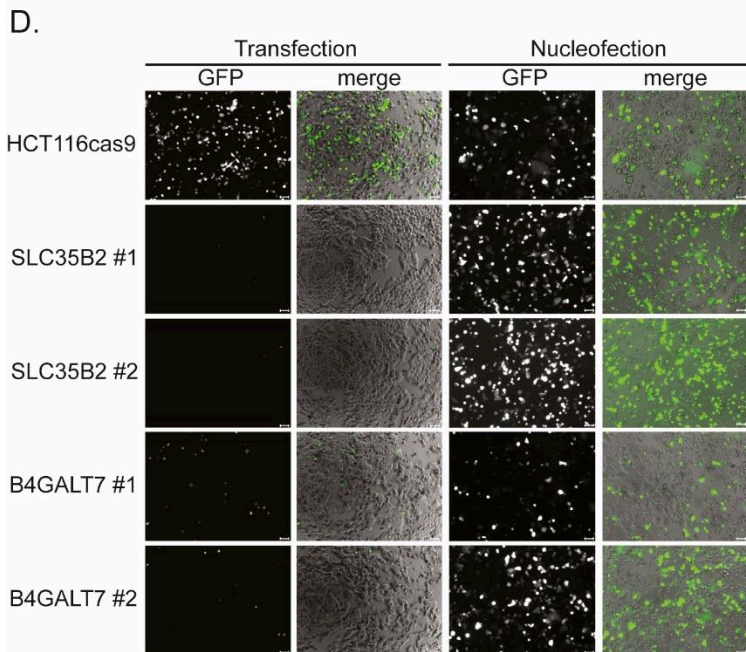
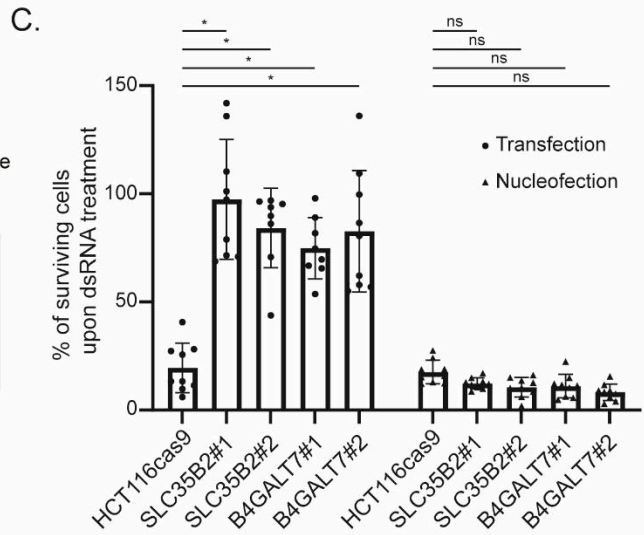
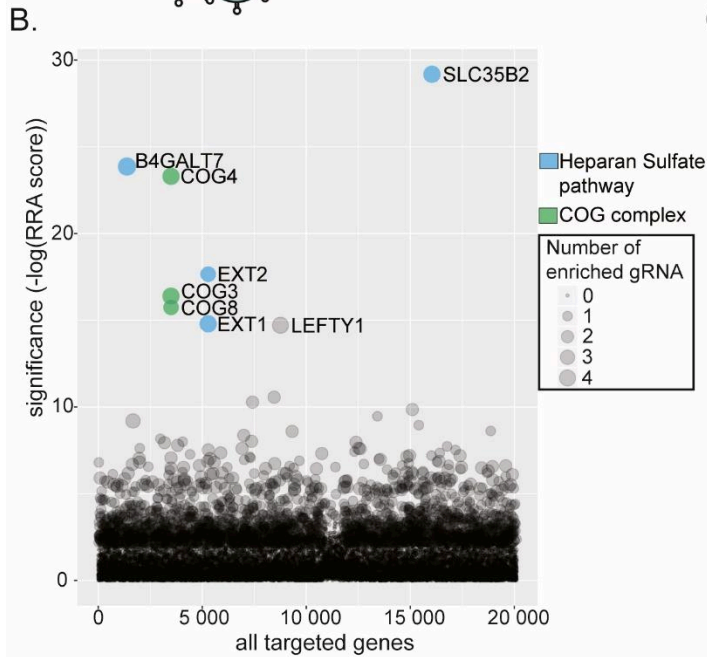
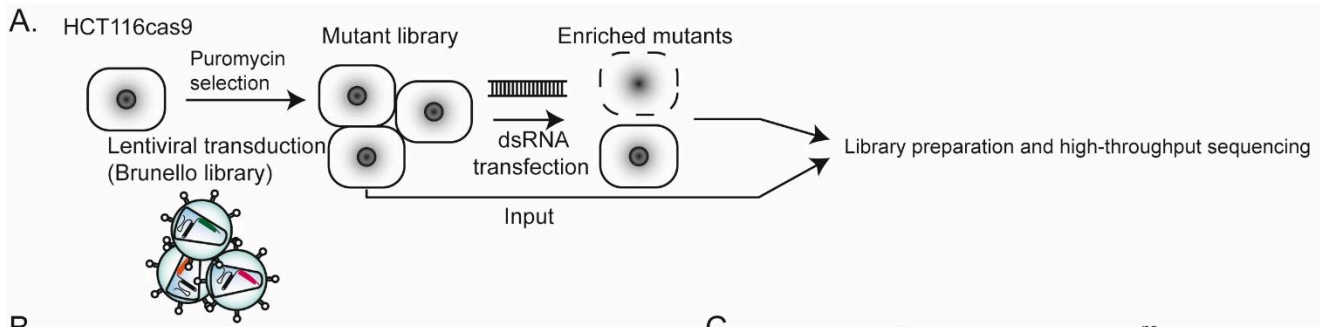
In order to identify cellular genes that are involved in the cellular response to dsRNA which culminates with cell death, we performed a CRISPR/Cas9 genome-wide loss-of-function screen in the human colon carcinoma cell line HCT116. This cell line is highly suitable for CRISPR/Cas9 genetic screening procedures (Golden et al., 2017) and can be easily infected with SINV (Fig. S1A). We also showed that complete cell death could be achieved within 48 hours in unedited HCT116 cells upon transfection of an *in vitro* transcribed long dsRNA of 231 bp by a cationic lipid-based transfection reagent (Fig. S1B).

We generated a Cas9-expressing HCT116 polyclonal cell line that we stably transduced with the human genome-wide lentiviral Brunello library composed of 76 441 gRNAs targeting 19 114 genes (Doench et al., 2016). We then applied a positive selection by lipofecting the transduced cells with the synthetic long dsRNA and surviving cells were collected 48h later. Libraries from input genomic DNA and from the surviving cells were generated and sequenced (Fig. 1A). We identified eight genes that were statistically enriched using the MAGeCK software (Li et al., 2014). Among those, four genes belonged to the heparan sulphate biosynthesis pathway (namely, *SLC35B2*, *B4GALT7*, *EXT1* and *EXT2*) and three were components of the oligomeric golgi complex (namely *COG3*, *COG4* and *COG8*) (Fig. 1B & Dataset S1).

Heparan sulphate (HS) is a linear polysaccharide that is covalently attached to core proteins in proteoglycans (PG) on the cell surface (for review, see Li and Kusche-Gullberg, 2016). Among many properties, HS play a role in binding of protein ligands and as a carrier for lipases, chemokines and growth factor (Bishop et al., 2007; Li and Kusche-Gullberg, 2016), but also as a viral receptor (Cagno et al., 2019). HS biosynthesis takes place in the Golgi, where most of the biosynthetic enzymes are anchored to the Golgi membrane (Lindahl et al., 2015).

We first validated the resistance phenotype to dsRNA of *SLC35B2* and *B4GALT7*, the two top hits identified in the screen, by generating two individual knock-out clones for each gene by CRISPR-Cas9 editing in HCT116cas9 (Fig. S2). Knock-out of both *SLC35B2* and *B4GALT7* genes abolished cell death induced by dsRNA lipofection compared to wild-type HCT116 cells, as assessed by the measurement of cell viability 48h post transfection (Fig. 1C, left panel). These results confirm our genome-wide approach based on cell survival and directly demonstrate the involvement of *SLC35B2* and *B4GALT7* in dsRNA-induced cell death. The observed resistance to dsRNA in the mutants could occur at many different steps: dsRNA liposome attachment and entry, recognition, induction of the IFN pathway or apoptosis. To test whether the first step was affected, we employed a nucleic acid delivery method that was not based on cationic lipid transfection. In particular, we used nucleofection (an electroporation-based transfection method) to introduce dsRNA into HCT116 cells and we showed that this approach totally restored cell death in *SLC35B2* and *B4GALT7* knock-out cells (Fig. 1C, right panel). We also confirmed that liposome-based transfection of nucleic acid was impaired in *SLC35B2* and *B4GALT7* KO cells, by transfecting a GFP-expressing plasmid using either Lipofectamine 2000 or nucleofection in wild type or knock-out cells. As shown in Fig. 1D, GFP could be detected in all conditions upon electroporation, but not when the plasmid was lipofected. In addition, liposome-based transfection of *in vitro* transcribed Cy5-labelled dsRNA was also abolished in *SLC35B2* and *B4GALT7* KO cells as assessed by FACS measurement of fluorescence 48 h post-transfection (Fig. S3A).

To establish whether impairment of the HS synthesis is directly linked to a defect in dsRNA entry and increased cell survival, we measured the extracellular HS levels in *SLC35B2* and *B4GALT7* KO cells. We measured a substantial reduction of the extracellular HS staining as assessed by FACS measurement of two independent *SLC35B2* and *B4GALT7* KO clones compared to HCT116 wild type cells (Fig. 1E). To confirm the importance of HS at the cell surface for liposome-based transfection, we mimicked the HS-defective phenotype by removing extracellular HS in parental HCT116cas9 cells either enzymatically (with heparinase) or chemically (with sodium chlorate NaClO<sub>3</sub>). We then tested the cell transfectability of a GFP-expressing plasmid. In agreement with our hypothesis, the heparinase treatment recapitulates the defect in lipofection observed in *SLC35B2* and *B4GALT7* KO cells (Fig. 1F) by removing extracellular HS (Fig. S3B) and formally demonstrates that extracellular HS are crucial for transfection by lipofection. Similarly, the treatment of cells with NaClO<sub>3</sub> abolished the GFP plasmid transfection (Fig. 1G). However, in the latter case, this did not correlate with a decrease in overall extracellular HS (Fig. S3C). This could be due to the fact that while a mix of heparinase I & III remove every kind of extracellular heparan sulfates, 50 mM of NaClO<sub>3</sub> only impairs the O-sulfation (Safaiyan et al., 1999). Taken together, our results show that knocking out *SLC35B2* and *B4GALT7* results in reduced levels of extracellular HS, which in turn impairs liposome-based transfectability of HCT116 cells. Moreover, the validation of these two top hits indicates that other candidates might be suitable for further analysis and may also have an impact on the dsRNA resistance phenotype



**Figure 1. CRISPR-Cas9 screen for dsRNA resistance factors identifies the extracellular heparan-sulfates as necessary for nucleic acids internalization.**

**A.** Schematic representation of the CRISPR-Cas9 approach. HCT116 cells expressing Cas9 were transduced with the lentiviral gRNA library Brunello (MOI 0.3). Transduced cells were selected with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puromycin to generate a mutant cell population. Selective pressure (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  synthetic dsRNA) was applied to induce cell death. Genomic DNA of input and cells surviving to the dsRNA treatment were extracted and CRISPR-Cas9 guides sequenced on an Illumina HiSeq400 sequencer. The data produced was processed by MAGeCK. Three independent experiments were performed. **B.** Bubble plot of candidate genes. Significance of RRA score is calculated for each gene in dsRNA treated cells condition compared to INPUT cells using MAGeCK analysis. The number of enriched gRNAs is represented by the size of the bubble and pathways associated with the top hits are indicated in blue and green. **C.** Viability assay. Cells were transfected (80 000 cells; 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or nucleofected (200 000 cells; 400 ng) with dsRNA and cell viability was quantified 24 h (nucleofection) or 48 h (transfection) post treatment using PrestoBlue reagent. Average of at least three independent biological experiments  $\pm$  SD is shown. One-way ANOVA analysis, \*  $p < 0.05$ . **D.** Representative pictures of transfectability assay. Cells were transfected (80 000 cells; 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or nucleofected (200 000 cells; 500 ng) with a plasmid coding for GFP and the GFP positive cells were observed by fluorescence microscopy at 24 h (nucleofection) or 48 h (transfection) post treatment. Pictures were taken at 10 $\times$  magnification, scale bar represents 50  $\mu\text{m}$ . One representative experiment out of three is shown. **E.** Representative quantification of extracellular heparan-sulfates. FACS analysis of HCT116 control or KO clones stained with the HS-specific antibody 10E4 (in red) compared to unstained samples (in blue). One representative experiment out of three is shown. **F and G.** Transfectability assay upon heparan-sulfates depletion. Cells were treated with 50 mM sodium chlorate (F) or with 2 units of heparinase (G) then transfected with GFP plasmid. GFP intensity of fluorescence was quantified 48 h post transfection using FACS. Data from four independent biological experiments  $\pm$  SD are shown. Unpaired t.test analysis, \*  $p < 0.05$ .

**COG4 is involved in dsRNA-induced cell death partly via the heparan sulphate pathway**

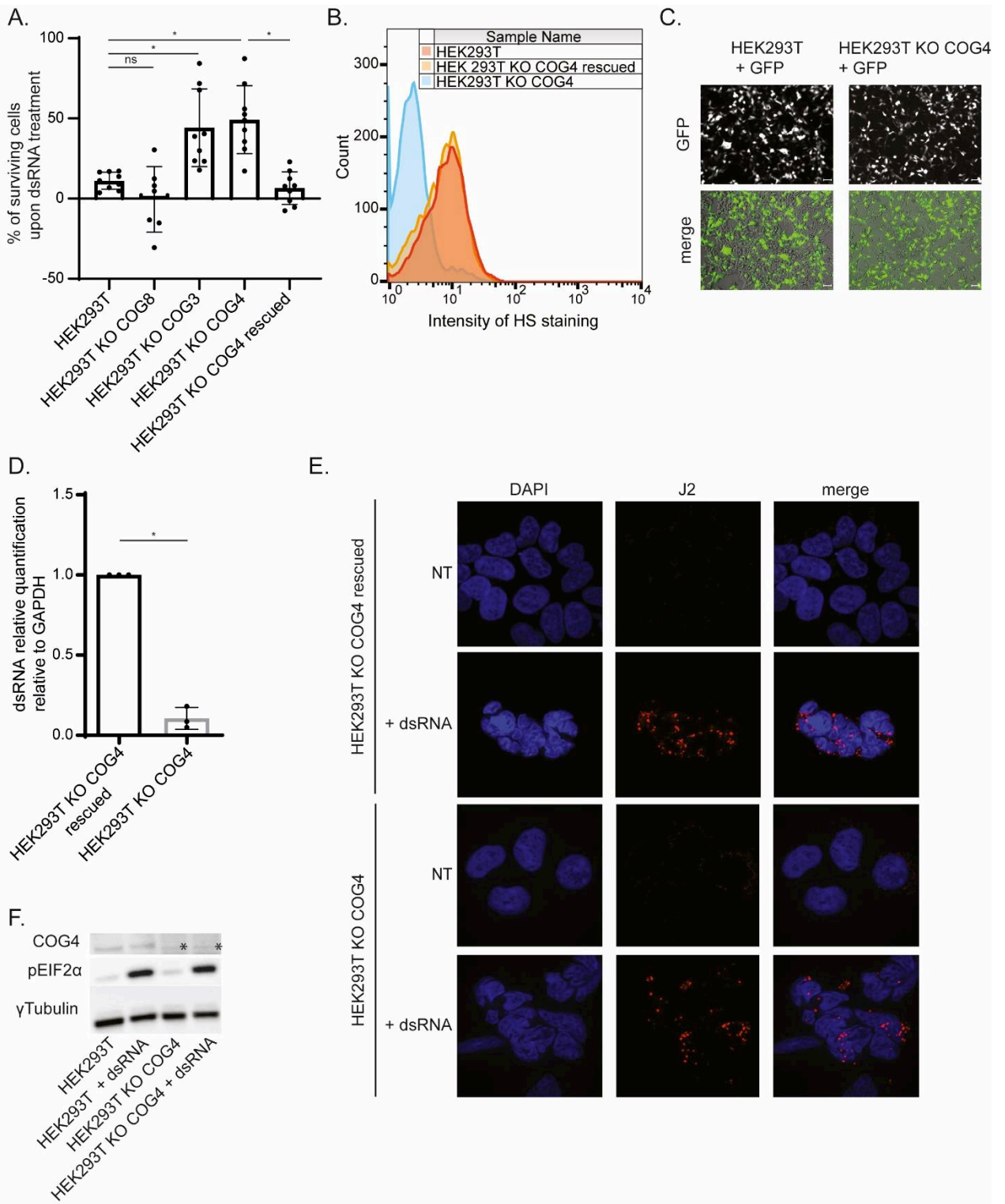
Among the first hits of our genome-wide screen were proteins related to COG complex, namely COG4, COG3 and COG8. The COG complex is a hetero-octameric complex containing 8 subunits (COG1-8) interacting with numerous proteins mainly involved in intra-Golgi membrane trafficking such as vesicular coats, Rab proteins and proteins involved in SNARE complex (Blackburn et al., 2019; Willett et al., 2013). This interaction with the trafficking machinery is crucial for the proper functionality of the Golgi apparatus and mutations in the COG complex result in severe cellular problems such as glycosylation defect (Kranz et al., 2007; Reynders et al., 2009a; Spaapen et al., 2005; Zeevaert et al., 2008), which are due to mislocalization of recycling Golgi enzymes (Shestakova et al., 2006; Zolov and Lupashin, 2005).

Since we retrieved three out of the eight COG family members in our CRISPR/Cas9 screen suggesting their importance in dsRNA-induced cell death, we tested the effect of their inactivation by CRISPR-Cas9 in previously generated HEK293T cells (Bailey Blackburn et al., 2016). In particular, loss of function *COG4* mutants displayed the most significant survival phenotype in response to dsRNA lipofection and this phenotype could be complemented by stable expression of a COG4-GFP construct (Fig 2A). In order to assess whether the *COG4* KO survival phenotype was associated with the heparan sulphate pathway defect, we stained extracellular HS and measured the HS profile by FACS analysis. We observed a decrease of extracellular HS in KO *COG4* cells compared to control cells (WT and rescued) which confirms that the COG complex is related to the HS biosynthesis pathway (Fig 2B).

We then asked if this HS reduction correlated with a decrease in transfectability due to an extracellular HS depletion in KO *COG4* cells. Surprisingly, lipofection of a GFP expressing plasmid in these cells indicated that HEK293T *COG4* KO cells are still transfectable with plasmid DNA as observed by epifluorescence microscopy (Fig 2C) and FACS analysis (Fig. S4A). On the contrary, dsRNA transfectability appeared to be significantly reduced in HEK293T KO *COG4* cells compared to control cells as determined by RT-qPCR analysis of dsRNA isolated from cells 24h after transfection (Fig 2D). In parallel, we also performed transfection of Cy5-labelled dsRNA and observed a strong reduction of Cy5 signal in KO cells compared to WT or rescued cells as measured by FACS analysis (Fig. S4B). In order to better



assess to which extent dsRNA internalization was altered in *COG4* KO cells, we performed dsRNA immunofluorescence analysis in HEK293T *COG4* KO or rescued cells 24 h after dsRNA transfection. The results indicate that dsRNA could be still detected in *COG4* KO cells suggesting that dsRNA transfectability is strongly reduced but not totally impaired in the absence of *COG4* (Fig. 2E). We confirmed these findings by transfecting rhodamine-labeled poly(I:C), a synthetic analog of dsRNA in HEK293T *COG4* KO or WT cells (Fig. S4C) and by counting the number of poly I:C foci per cell at 6, 12 and 24 h post transfection (Fig. S4D). Upon dsRNA sensing, the interferon-induced protein kinase R (PKR) phosphorylates the translation initiation factor EIF2 $\alpha$  in order to block cap-dependent translation and induce apoptosis in wild-type cells. In order to verify whether the few dsRNA molecules inside the cells were still able to activate a functional IFN pathway, we measured EIF2 $\alpha$  phosphorylation state upon dsRNA treatment and observed that this modification was still present in HEK293T *COG4* KO cells despite the reduced cell death phenotype (Fig. 3F). Altogether these findings indicate that the COG complex is involved in HS biosynthesis and that removal of *COG4* results in a lower accumulation of HS at the cell surface, which most likely translate in a reduced transfectability of dsRNA. However, as opposed to the observations in *SLC35B2* or *B4GALT7* KO cells, the cell survival phenotype in *COG4* KO cells is associated to a reduced but not completely abolished dsRNA internalization. This seems specific to RNA molecules as DNA transfection efficiency seems to be preserved. Finally, the failure of apoptosis induction upon dsRNA transfection does not correlate with an impaired type I IFN activation since EIF2 $\alpha$  phosphorylation is maintained in *COG4* KO cells.



Petitjean et al., Figure 2

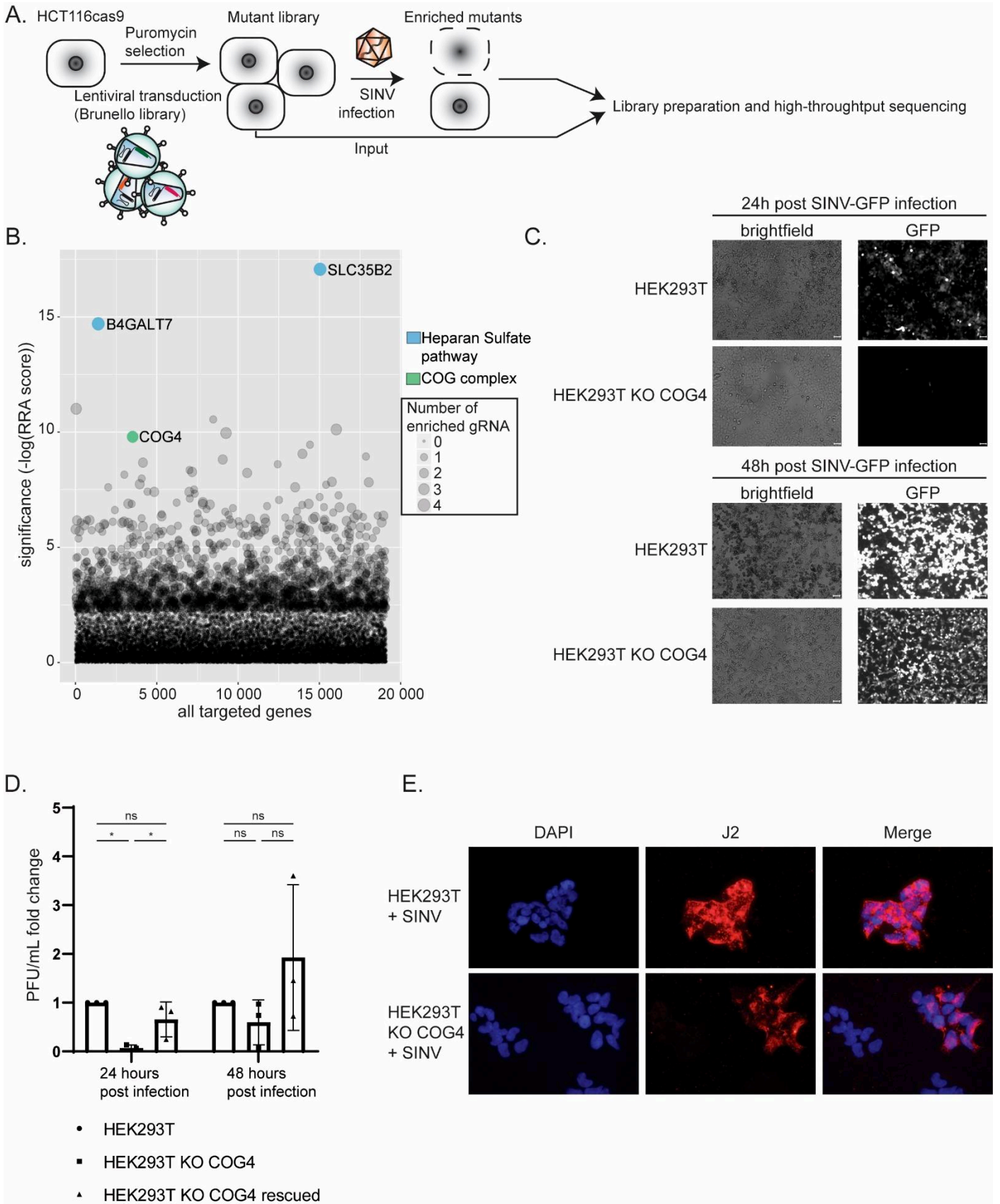
**Figure 2. COG4 is a novel dsRNA resistance factor.**

**A.** Viability assay. Cells (80 000 cells; 1 µg/mL) were transfected with dsRNA then the viability of the cells was quantified 48 h post transfection using PrestoBlue reagent. Data from at least three independent biological experiments are shown. One-way ANOVA analysis, \*  $p < 0.05$ . **B.** Representative quantification of extracellular heparan-sulfates. FACS analysis of HEK293T (in red), COG4 KO (in blue) and rescued cells (in orange) stained with the HS-specific antibody 10E4. One representative experiment out of three is shown. **C.** Representative pictures of transfectability assay. Cells were transfected (80 000 cells; 2 µg/mL) with plasmid coding for GFP and the GFP positive cells were observed by fluorescence microscopy 48 h post treatment. Pictures were taken at 10× magnification, scale bar represent 50 µm. One representative experiment out of four is shown. **D.** qPCR quantification. Cells (300 000 cells; 1 µg/mL) were transfected with dsRNA and total RNA was extracted 24 h post transfection and quantified using RT-qPCR. The histogram represents the expression fold change of dsRNA relative to GAPDH into dsRNA transfected HEK293T KO COG4 rescued compared to HEK293T KO COG4. Average of three independent biological experiments +/- SD are shown. Unpaired t.test analysis \*  $p < 0.05$ . **E.** Confocal microscopy. Cells transfected with synthetic dsRNA for 24 hours were fixed and stained with DAPI and J2 antibody (anti-dsRNA). Pictures were taken at 100× magnification using a spinning-disk confocal microscope. **F.** Western Blot. Cells (300 000 cells; 1 µg/mL) were transfected with dsRNA then proteins were extracted 24 h post transfection and analysed by Western Blot. Antibody against COG4 and p-EIF2alpha were used. \* corresponds to an aspecific band. Gamma-tubulin was used as loading control. One representative experiment out of three is shown.

**Cell survival based genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies COG4 as a permissivity factor to SINV**

SINV is a small enveloped virus with a single stranded RNA genome of positive polarity. The virus belongs to the *Togaviridae* family, alphavirus genus and is considered as the model for other medically important viruses such as chikungunya virus (CHIKV) and Semliki forest virus (SFV). During its infectious cycle, SINV produces dsRNA as a replication intermediate and induces cytopathic effects in mammalian cells, leading to cell death within 24 to 48 h post-infection (Strauss and Strauss, 1994).

In order to identify host genes that are critical for SINV infection, we performed a CRISPR/Cas9 knock-out screen in HCT116 cells, which are susceptible to this virus (Fig 3A & Dataset S2). After transduction with the CRISPR lentiviral genome-wide knockout library, puromycin-resistant HCT116 cells were infected with SINV-GFP at a MOI of 0.1. *SLC35B2* and *B4GALT7* were identified as top hits of this second screen (Fig 3B). Genes of the heparan sulphate pathway have been previously found in genome-wide CRISPR-Cas9 loss of function studies looking for factors involved in the accumulation of viruses such as Influenza, Zika and chikungunya (Han et al., 2018; Li et al., 2019; Tanaka et al., 2017). Interestingly, among the top-ranking hits, we retrieved *COG4* which was not previously associated with SINV infection. To validate the involvement of *COG4* upon SINV infection, we infected WT and *COG4* KO HEK293T cells with SINV-GFP. We observed that GFP accumulated to lower levels in *COG4* KO than in WT cells both at 24 and 48 h post-infection (hpi) (Fig. 3C). In addition, the determination of viral titer by plaque assay showed that *COG4* KO cells produced less infectious viral particles than WT or *COG4*-rescued cells both at 24 and 48 hpi (Fig. 3D). In order to test whether the reduced viral production in KO *COG4* cells was associated with a reduced accumulation of viral dsRNA in the cytoplasm, we infected WT or *COG4* KO cells with SINV-GFP and performed immunostaining with the anti-dsRNA J2 antibody 24 hpi. We observed a reduction of the J2 staining in terms of number of positive cells in the *COG4* KO condition (Fig. 3E). Overall, our results indicate that *COG4* expression is needed for an efficient SINV infection, which might be linked with its involvement in the HS biosynthesis pathway.



Petitjean et al., Figure 3

### Figure 3. CRISPR-Cas9 screen identifies *COG4* as a permissivity factor to SINV

**A.** Schematic representation of the CRISPR-Cas9 approach. HCT116 cells expressing Cas9 were transduced with the lentiviral gRNA library Brunello (MOI 0.3). Transduced cells were selected with 1 µg/mL puromycin to generate a mutant cell population. Selective pressure (SINV MOI 0,1) was applied to induce cell death. Genomic DNA of input and cells surviving the SINV infection were extracted and sequenced on an Illumina HiSeq400 sequencer. Three independent experiments were performed. The data produced was processed by MAGeCK. **B.** Bubble plot of candidate genes. Significance of RRA score is calculated for each gene in SINV infected cells compared to INPUT cells using MAGeCK analysis. The number of enriched gRNAs is underlined by the size of the bubble and pathways associated with the top hits are indicated. **C.** SINV infection. Cells were infected with SINV encoding for GFP at MOI of 0.1 and the GFP positive cells were observed by fluorescence microscopy at 24 h and 48 h post infection. Representative pictures were taken at 20x magnification One representative experiment out of three is shown. **D.** Plaque assay. WT, *COG4*KO and rescued HEK293T cells were infected with SINV-GFP for 24 h at MOI of 1 and supernatant was collected in order to measure viral production. The fold change in titer relative to HEK293T arbitrarily set to 1 is shown. Average of three independent biological experiments +/- SD is shown. ANOVA analysis \*  $p < 0.05$ . **E.** Immunofluorescence assay. Cells were infected with SINV for 24 h at MOI of 0.1 for 24 h then fixed and stained with J2 antibody and DAPI. Pictures were taken at 40x magnification with BX51 (Olympus) microscope.

### Discussion

Several CRISPR/Cas9 screens aiming at identifying factors required for infection by specific viruses have been described in the literature, but to our knowledge, none has been designed to look at the effect of the only common factor between all those viruses, *i.e.* dsRNA. Here, we used the Brunello gRNA lentiviral library to screen for genes involved in HCT116 cells survival to synthetic dsRNA transfection and to SINV infection. This allowed us to identify components of the heparan sulphate biosynthesis pathway and of the COG complex as critical host factors in the cellular response to above mentioned challenges. It has been already reported that cell-survival-based CRISPR screens for viral host factors are biased toward genes linked to the initial steps of the infection, and even more so to viral entry (Han et al., 2018; Savidis et al., 2016). Thus, in our case, HS is a well-known factor required for SINV entry due to the virus adaptation to cell culture (Klimstra et al., 1998). We also retrieved genes of the HS pathway in our dsRNA-based screen, and we confirmed the importance of extracellular HS for dsRNA-induced toxicity. This is mostly due to a decrease of transfectability of the cells when HS are missing, which is linked to the fact that the polyplexes used for transfection are positively charged and can interact electrostatically with glycosaminoglycans (Mislick and Baldeschwieler, 1996; Payne et al., 2007). This part of our work also points out to the limitations of survival-based CRISPR-Cas9 screens, *i.e.* the selection pressure is too strong to allow the identification of genes intervening after the entry step, thereby making the screen less sensitive. New strategies should be designed to overcome this problem, such as using fluorescent-based cell sorting in order to be less stringent in the selection.

In addition to the HS pathway, we identified members of the COG complex, and more specifically *COG4*, as factors involved in dsRNA transfection and SINV infection. Loss of function *COG4* mutant cells show a dsRNA-resistant phenotype as well as a reduction in extracellular HS expression, similar to previously published reports for other COG proteins (Jae et al., 2013; Tanaka et al., 2017). Surprisingly, even if the removal of *COG4* expression results in a defect in the HS pathway, we are still able to transfect the KO *COG4* cell line either with a plasmid encoding GFP or, although to a lesser extent, dsRNA. In addition, the dsRNA molecules that are able to enter into HEK293T KO *COG4* are still sufficient to lead to the phosphorylation of EIF2A, indicating that the innate immune response is not totally abrogated. Nonetheless, cell death induced by dsRNA appears to be lower in *COG4* KO cells. Our CRISPR/Cas9 screen using SINV as a challenge also identified *COG4* as a new factor involved in cell survival to SINV infection. The infection kinetic of SINV seems to be delayed, but not totally impaired, in *COG4* KO cells. However, cells again appear to survive longer to the virus infection. Future work will be needed in order to assess whether this phenotype upon SINV

infection is only correlated with a defect in HS biogenesis in *COG4* mutants. The fact that *COG4* KO cells seem to better survive to both synthetic dsRNA transfection and viral infection opens several interesting perspectives. Indeed, since the COG complex is related to glycosylation and membrane trafficking (Blackburn et al., 2018a; Reynders et al., 2009b; Ungar et al., 2002; Willett et al., 2013), deficiency in one or more of its components could lead to a glycosylation and/or subcellular localization defect of components of the innate immune response or of the apoptosis pathway. The difference of transfectability of plasmid DNA and dsRNA in *COG4* KO cells is also intriguing and could indicate that different kinds of nucleic acids do not necessarily use the exact same routes to enter the cells upon liposome-based transfection. Finally, there could be other defects linked to COG deficiencies (D'Souza et al., 2019; Blackburn et al., 2018b) that could account for our observations and elucidating those will require further work.

In conclusion, our work uncovered *COG4* as a new player in the HS production, which is required for both SINV infection and dsRNA transfection, and expanded the function of the COG to nucleic acids based innate immunity. These results also highlight that synthetic dsRNA is a powerful tool to identify novel key pathways of the cellular response to RNA virus.

## **Materials and Methods**

### **Cell culture and virus**

HCT116, HEK293T, HEK293T COG KOs, BHK21 and Vero R cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 4.5 g/L glucose (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Takara) in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. HEK293T *COG3*, *COG8* and *COG4* KO and *COG4* KO stably rescued with COG4-GFP were described previously (Climer et al., 2018; Blackburn and Lupashin, 2016). HCT116cas9 and HEK293T COG4rescued were maintained in the same medium with addition of 10 µg/mL blasticidine. HCT116 KO clones (*SLC35B2*#1 and #2, *B4GALT7*#1 and #2) were maintained in the same medium with addition of 10 µg/mL blasticidine and 1 µg/mL puromycine.

SINV wilde type (SINV) or expressing the green fluorescent protein (SINV-GFP) were produced as previously described (López et al., 2020) in BHK21 cells. Cells were infected with either SINV WT or SINV GFP at a MOI of 10<sup>-1</sup> and samples were harvested at 24 or 48 hours post-infection (hpi).

### **Standard plaque assay**

10-fold dilutions of the viral supernatant were prepared. 50 µl aliquots were inoculated onto Vero R cell monolayers in 96-well plates for 1 hour. Afterwards, the inoculum was removed and cells were cultured in 2.5% carboxymethyl cellulose for 72 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Plaques were counted manually under the microscope. For plaque visualization, the medium was removed, cells were fixed with 4% formaldehyde for 20 min and stained with 1x crystal violet solution (2% crystal violet (Sigma-Aldrich), 20% ethanol, 4% formaldehyde).

### **J2 immunostaining**

Wild-type or KO *COG4* HEK293T cells were plated on millicell EZ slide (Millipore) and were transfected with 1 µg/mL of IVT dsRNA or infected with SINV at an MOI of 0.1 for 24h. Non transfected and mock-infected cells were used as control, respectively. Cells were fixed with 4% formaldehyde diluted in PBS 1x for 10 min at room temperature, followed by incubation in blocking buffer (0.2% Tween X-100; PBS 1x; 5% normal goat serum) for 1 h. J2 antibody (Scicons) diluted in blocking buffer at 1:1000 was incubated over night at 4°C. Between each steps, cells were washed with PBS 1X-Tween 0.2%. Secondary antibody goat anti-mouse Alexa

594 (ThermoFisher) diluted at 1:1000 in PBS 1x-Tween 0.2% were incubated for 1 h at room temperature. After DAPI staining (1:5000 dilution in PBS 1x for 5 min), slides were mounted with a coverslip over anti-fading medium and observed by epifluorescence microscopy using the BX51 (Olympus) microscope with a X 40 objective.

### **Generation of HCT116cas9 line.**

The HCT116cas9 cells, expressing human codon-optimized *S. pyogenes* Cas9 protein, were obtained by transducing wild type HCT116 colorectal carcinoma cell line (ATCC® CCL-247™) with lentiCas9-Blast lentiviral vector (Addgene #52962). Briefly, wild-type HCT116 cells were cultured in standard DMEM (GIBCO) medium supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 100 U/mL of penicillin-Streptomycin (Gibco) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The cells were transduced at 80% confluency in a 10 cm tissue culture plate, using 6 mL lentiviral supernatant supplemented with 4µg/mL of polybrene (H9268, sigma) for 6 hours. The transduction medium was replaced with fresh growing medium for 24h before starting the selection. Transduced HCT116cas9 cells were selected for 10 days and maintained in growing medium supplemented with 10µL/mL of Blasticidin (Invivogen).

### **High titer lentiviral sgRNA library production.**

The production of high titer Human sgRNA Brunello lentiviral library which contains 4 sgRNA per gene (Doench et al 2018) (Addgene #73178), was performed by transfecting HEK293T cells in five 15 cm tissue culture plates using PEI (Polyethylenimin Linear, MW 25,000, 23966-1-A, Polysciences) transfection method (Boussif et al 1995). Briefly, for each 15 cm plate containing 20 mL of medium, 10µg of sgRNA library, 8µg of psPAX2 and 2µg of pVSV diluted in 500µL of NaCl 150 mM were combined with 40µL of PEI (1.25 mg/mL) dissolved in 500µL of NaCl 150 mM. The mix was incubated 30 minutes at room temperature and the formed complexes were added dropwise on the cells. After 6 hours, the medium was replaced and the viral supernatant was collected after 48 hours and after 72 hours. The supernatant was filtered through a 0.45µm PES filter and the viral particles concentrated 100 times using Lenti-X™ Concentrator (Takara) before storage at -80. The viral titer was established by counting puromycin resistant colonies formed after transducing HCT116 cells with serial dilutions of viral stock. HCT116cas9 cells were transduced with lentivirus-packaged Brunello sgRNA library at a MOI of 0.3. The lentiviral library has been sequenced to verify that all the lenti-gRNA are represented.

### **Genome-wide CRISPR/Cas9 knock-out screens.**

For each replicate (n=3), 5x10<sup>6</sup> cells/dish were seeded in 6x15cm<sup>2</sup> plate in order to keep a 300X representativity of the sgRNA library. Input samples were collected as controls. One day later, cells were either lipofected with 1 µg/mL dsRNA-Citrine or infected with SINV at MOI of 0.1 and cultured at 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Cells were washed with PBS 1X 48 hours post treatment, to remove dead cells and fresh media was added to surviving clones. Cells were expanded and collected 6 days post dsRNA transfection and 18 days post SINV infection.

Genomic DNA was isolated by resuspending the cell pellet in 5 mL of resuspension buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA), 0,25 mL of 10% SDS was added and incubated 10 mins at RT after mix. After incubation, the sample was sonicated and incubated 30 mins at RT with 10 uL of proteinase K (10mg/mL). 5 mL of Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol solution was added and followed by a spin down 60 mins at 12000g/20°C. Upper phase was transferred into a new tube and 500uL of NaAc 3M and 5 mL of isopropanol was added then incubation over night at RT and followed by a centrifuge 30 mins/20°C/12000g. Pellet was washed using EtOH and dissolve in H<sub>2</sub>O.

Illumina P5 and P7-barcoded adaptors were added by PCR on gDNA samples according to the GoTaq protocol (Promega). PCR amplicons were gel purified and sequenced on a HiSeq4000 (Illumina). Enrichment of gRNAs was analysed using MaGeCK with default parameters (Li et al., 2014). Primers used to generate the PCR products are listed in Table S1. The results of the dsRNA and SINV screen are available in Dataset S1 and S2, respectively

### **Generation of monoclonal SLC35B2 and B4GALT7 knock-out HCT116 cell lines.**

The gRNA expression vectors targeting either SLC35B2 or B4GALT7 (gRNA sequences selected were the 2 most enriched gRNA in the dsRNA screen) genes were produced by annealing the “sense” and “antisense” oligonucleotides (Table S1) at a concentration of 10  $\mu$ M in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM MgCl<sub>2</sub> in 100  $\mu$ L. The mixture was incubated at 95 ° C for 5 minutes and then allowed to cool down to room temperature. The oligonucleotide duplex thus formed was cloned into the BbsI restriction site of the plasmid pKLV-U6gRNA (BbsI)-pGKpuro2ABFP (Addgene#62348). The lentiviral supernatant from single transfer vector was produced by transfecting HEK293T cells (ATCC® CRL-3216™) with the transfer vector, psPAX2 packaging plasmid (Addgene #12260) and the pVSV envelope plasmid (Addgene #8454) in proportion 5:4:1 using Lipofectamine™ 2000 (Themofisher) reagent according to manufacturer protocol. Standard DMEM (GIBCO) medium supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 100 U/mL of penicillin-Streptomycin (Gibco) was used for growing HEK293T cells and for lentivirus production. One 10 cm plate of HEK293T cells at 70-80% confluency was used for the transfection. The medium was replaced 8 hours post-transfection. After 48 hours the medium containing viral particles was collected and filtered through a 0.45 $\mu$ m PES filter. The supernatant was directly used for transfection or stored at -80°C. A 6 well plate of HCT116cas9 cells at 80% confluency was transduced using 600  $\mu$ L of lentiviral supernatant (300  $\mu$ L of each lentivirus produced for each duplexes) supplemented with 4  $\mu$ g/mL polybrene (Sigma) for 6 hours. The transduction media was then changed with fresh DMEM for 24 hours then the transduced cells were selected using DMEM containing 10  $\mu$ g/mL Blasticidin (Invivogen) and 1  $\mu$ g/mL Puromycin (Invivogen). Genomic DNA was isolated from individual colonies and KO clones were screened by PCR (primers in Table S1). The expected WT band for SLC35B2 is 469 bp and the mutant band 132 bp. For B4GALT7, the WT band is 341 bp and mutant band 180 bp. For laboratory purposes, the SLC35B2 clones have been generated into HCT116cas9 cells that are expressing mCherry and Citrine due to integration of miReporter-PGK (Addgene#82477).

### **Nucleic acids delivery**

Transfection using lipofectamine2000 (InvitroGen – 11668019) were performed following manufacturer’s instructions. For nucleofection, cells were nucleofected using Nucleofector SE solution and reagent into Nucleocuvette following manufacturer’s instructions using 4D-Nucleofector System (Lonza). The cell number and nucleic acid amounts are indicated in each figure legends. P-EGFP-N1 (Addgene plasmid#2491) was used in transfection and nucleofection experiments as a control.

### **Viability assay**

PrestoBlue (PB) reagent (ThermoFisher – A13261) was used for viability assay according to the manufacturer’s protocol. After 24 to 48 hours post treatment (dsRNA transfection/nucleofection), cells were incubated with PB reagent and cell viability was assessed by measuring the fluorescence (excitation 570 nm; emission 590 nm) after 20 mins incubation using SAFAS spectrofluorometer (Xenius XC). Cell viability was expressed as a percentage relative to untreated cells.



### **Heparinase & sodium chlorate treatment and heparan sulfate staining**

Heparinase:  $1 \times 10^6$  cells were treated with 2U of Heparinase I and III blend from *Flavobacterium heparinum* (Merck – H3917) for 1 h at 37°C 5% CO<sub>2</sub> in DMEM and then cells were reverse transfected with 2 µg of GFP using lipofectamine2000 (Invitrogen) in 6 well plate.

Sodium chlorate: HCT116cas9 cells grow in 50 mM sodium chlorate (Merck – 1.06420) DMEM 10 % FBS for at least 48 h then 150 000 cells were reverse transfected with 500 ng of GFP using lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 24 well plate.

24 (heparinase) or 48 (sodium chlorate) hours post treatment, cells were detach using PBS 0.02% EDTA then heparan sulfate of the cells were stained using 1:30 of F58-10E4 as primary antibody (AMSBIO, cat#370255-S) in PBS 3% BSA for 30 to 40 minutes on ice then washed with PBS 1% FBS and incubated with 1:30 anti-mouse Alexa Fluor 594 (Thermo, A-11032) in PBS 3% BSA, washed twice using PBS 1% FBS then and analysed at FACS using FACS Calibur.

### **dsRNA preparation**

PCR fragments corresponding to 231 nts of the Citrine coding sequence were amplified from ES-FUCCI plasmid (Addgene plasmid#62451) using primers containing T7 promoter sequence with 2 distinct PCR fragment allowing the positive-sense or negative-sense RNA. Primers used to generate the PCR products are listed in Table S1. The PCR fragments were produced using DyNAzyme EXT DNA Polymerase (F-505S - Thermo Scientific) and purified using Monarch DNA extraction (T1020L - New England Biolab). In vitro transcription (IVT) with homemade T7 RNA polymerase was performed for 4 hours at 37°C. To label the IVT RNA, 1/10th of Cy5-CTP (Amersham CyDye Fluorescent Nucleotides Cy5-CTP, GE Healthcare Life sciences) was included in the IVT reaction. IVT RNA was digested with DNase I (EN0525 - Thermo Scientific) for 30 min at 37°C and IVT product was purified, unincorporated nucleotides removed and size checked using UV shadow (8% acrylamide-urea gel) followed by phenol-chloroform extraction the nanodrop quantification for each strand. We then mix an equal quantity of positive-strand and negative-strand RNA, heat for 5' at 95°C followed by slow cool down to RT. The integrity of dsRNA is then checked by RNases T1 (EN0541 - Thermo Scientific) and V1 (AM2275, Ambion) digestion.

### **Microscopy**

Imaging of cells treated with dsRNA/GFP plasmid was carried out on the Observer A1 (Zeiss) microscope and analyzed using Fiji (Schindelin et al., 2012). Images of cells transfected with Poly(I:C) (LMW) Rhodamine (tlrl-piwr – Invivogen)(1,8 µg/mL, 24h post plating of 76 000 cells) into Lab-Tek on glass coverslip (155411- Thermo Scientific) were acquired using a 100x Plan Apochromat oil immersion NA1.4 objective on a spinning disk system Axio Observer Z1 (Zeiss) every 20 minutes for 72 hours. All pictures were acquired under the same conditions (laser power and amplification gain) then processed with Fiji. Images of cells infected with SINV stained with J2 antibody were carried out on the BX51 (Olympus).

### **FACS analysis**

The cells intended for analysis by flow cytometry are recovered mechanically (PBS 0,5 mM EDTA) or using trypsin, washed in PBS and then suspended in PBS 1 % FBS. Each acquisition includes at least 10,000 events and is performed on the FACScalibur (BD Bioscience) device. The data produced is processed using FlowJo software (FlowJo LLC).

### **RT-qPCR analysis**

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen - 15596026) following manufacturer's instructions. 1 µg of RNA was reverse transcribed using SuperScript IV Vilo (Invitrogen – 11756050) according to manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using

SYBR Green (Applied Biosystem – 4309155) and primers listed in Table S1 at an annealing temperature of 60°C on a CFX96 thermal cycler (Biorad). Generated data were analysed using the CFX Manager Software (Biorad).

### **Western blot analysis**

Proteins were extracted using TRIzol (Invitrogen – 15596026) then precipitate using 3 volumes of 100% acetone and washed with 70% acetone and resuspended in 3% SDS, 62.3 mM Tris-HCL pH 8 10% glycerol . Proteins were quantified by the Bradford method and 20 to 30 µg of total protein extract was loaded on 4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (Biorad). After transfer onto nitrocellulose membrane, equal loading was verified by Ponceau staining. Membranes were blocked in 5% milk and probed with the following antibodies: anti-COG4 (1:300, from V. Lupashin), anti-p-eIF2a (1/1000, Ser-52 Santa Cruz sc-601670), and anti-gamma-Tubulin (1:10000, Sigma T6557). Detection was performed using Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher).

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank members of the Pfeffer laboratory for discussion, Delphine Richer for technical help, Dr. Jean-Daniel Fauny for help with the spinning disk microscope and Dr. Frédéric Gros for help with FACS analysis, Dr Carla Saleh for providing us the SINV WT and GFP clones.

This work was funded by the European Research Council (ERC-CoG-647455 RegulRNA) and was performed under the framework of the LABEX: ANR-10-LABX-0036\_NETRNA, which benefits from a funding from the state managed by the French National Research Agency as part of the Investments for the future program. This work has also received funding from the People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under REA grant agreement n° PCOFUND-GA-2013-609102, through the PRESTIGE program coordinated by Campus France (to EG), and from the French Minister for Higher Education, Research and Innovation (PhD contract to OP) . VL was supported by the National Institutes of Health (R01GM083144).

### **Authors contribution**

SP and EG conceived the project. SP, EG and OP designed the work and analysed the results. OP, EG, and RPN performed the experiments. EG and OP set up the CRISPR/Cas9 screens, RPN generated the lentivirus library and the HCT16-Cas9 cell line. OP and RPN performed the bioinformatics analysis of the screens. OP generated the SLC35B2 and B4GALT7 KO clones. OP generated IVT dsRNA and perform validation of cell survival. EG produced SINV-GFP viral stock, performed the infections and analysed viral titers. OP performed FACS analyses. EG and OP performed the immunofluorescence assays. OP analysed the live-imaging microscopy data. VL provided the COG KO cells and antibodies. OP, EG and SP wrote the manuscript with input from the other authors. SP and EG coordinated the work. SP assured funding. All authors reviewed the final manuscript.

## References

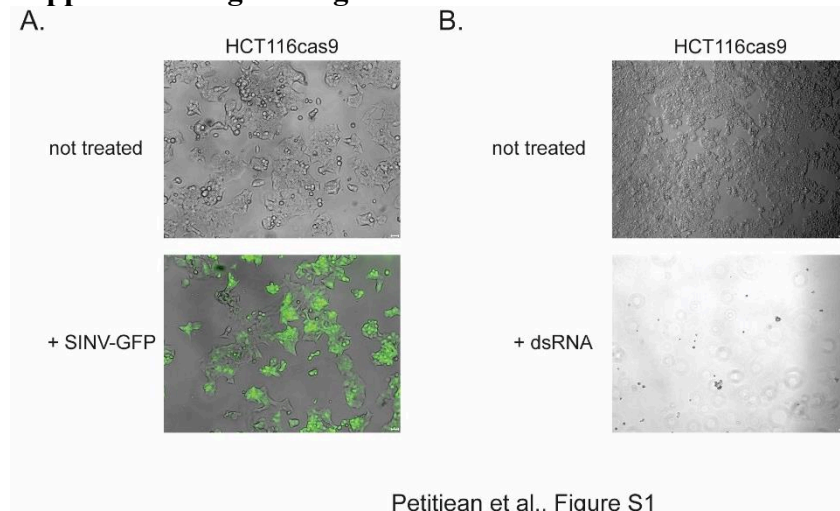
- Bailey Blackburn, J., I. Pokrovskaya, P. Fisher, D. Ungar, and V.V. Lupashin. 2016. COG Complex Complexities: Detailed Characterization of a Complete Set of HEK293T Cells Lacking Individual COG Subunits. *Front. Cell Dev. Biol.* 4. doi:10.3389/fcell.2016.00023.
- Bishop, J.R., M. Schuksz, and J.D. Esko. 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature.* 446:1030–1037. doi:10.1038/nature05817.
- Blackburn, J.B., Z. D'Souza, and V.V. Lupashin. 2019. Maintaining order: COG complex controls Golgi trafficking, processing, and sorting. *FEBS Lett.* 593:2466–2487. doi:10.1002/1873-3468.13570.
- Blackburn, J.B., T. Kudlyk, I. Pokrovskaya, and V.V. Lupashin. 2018a. More than just sugars: Conserved oligomeric Golgi complex deficiency causes glycosylation-independent cellular defects. *Traffic.* 19:463–480. doi:10.1111/tra.12564.
- Blackburn, J.B., T. Kudlyk, I. Pokrovskaya, and V.V. Lupashin. 2018b. More than just sugars: Conserved oligomeric Golgi complex deficiency causes glycosylation-independent cellular defects. *Traffic.* 19:463–480. doi:10.1111/tra.12564.
- Blackburn, J.B., and V.V. Lupashin. 2016. Creating Knockouts of Conserved Oligomeric Golgi Complex Subunits Using CRISPR-Mediated Gene Editing Paired with a Selection Strategy Based on Glycosylation Defects Associated with Impaired COG Complex Function. In *The Golgi Complex*. W.J. Brown, editor. Springer New York, New York, NY. 145–161.
- Bomsel, M., and A. Alfsen. 2003. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:57–68. doi:10.1038/nrm1005.
- Byrnes, A.P., and D.E. Griffin. 1998. Binding of Sindbis Virus to Cell Surface Heparan Sulfate. *J. VIROL.* 72:8.
- Cagno, V., E.D. Tseligka, S.T. Jones, and C. Tapparel. 2019. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *Viruses.* 11. doi:10.3390/v11070596.
- Climer, L.K., I.D. Pokrovskaya, J.B. Blackburn, and V.V. Lupashin. 2018. Membrane detachment is not essential for COG complex function. *MBoC.* 29:964–974. doi:10.1091/mbc.E17-11-0694.
- Doench, J.G., N. Fusi, M. Sullender, M. Hegde, E.W. Vaimberg, K.F. Donovan, I. Smith, Z. Tothova, C. Wilen, R. Orchard, H.W. Virgin, J. Listgarten, and D.E. Root. 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 34:184–191. doi:10.1038/nbt.3437.
- D'Souza, Z., J.B. Blackburn, T. Kudlyk, I.D. Pokrovskaya, and V.V. Lupashin. 2019. Defects in COG-Mediated Golgi Trafficking Alter Endo-Lysosomal System in Human Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 7:118. doi:10.3389/fcell.2019.00118.
- García, M.A., E.F. Meurs, and M. Esteban. 2007. The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. *Biochimie.* 89:799–811. doi:10.1016/j.biochi.2007.03.001.
- Golden, R.J., B. Chen, T. Li, J. Braun, H. Manjunath, X. Chen, J. Wu, V. Schmid, T.-C. Chang, F. Kopp, A. Ramirez-Martinez, V.S. Tagliabracci, Z.J. Chen, Y. Xie, and J.T. Mendell. 2017. An Argonaute phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature.* 542:197–202. doi:10.1038/nature21025.
- Han, J., J.T. Perez, C. Chen, Y. Li, A. Benitez, M. Kandasamy, Y. Lee, J. Andrade, B. tenOever, and B. Manicassamy. 2018. Genome-wide CRISPR/Cas9 Screen Identifies Host Factors Essential for Influenza Virus Replication. *Cell Reports.* 23:596–607. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.045.
- Jae, L.T., M. Raaben, M. Riemersma, E. van Beusekom, V.A. Blomen, A. Velds, R.M. Kerkhoven, J.E. Carette, H. Topaloglu, P. Meinecke, M.W. Wessels, D.J. Lefeber, S.P. Whelan, H. van Bokhoven, and T.R. Brummelkamp. 2013. Deciphering the Glycosylome of Dystroglycanopathies Using Haploid Screens for Lassa Virus Entry. *Science.* 340:479–483. doi:10.1126/science.1233675.
- Klimstra, W.B., K.D. Ryman, and R.E. Johnston. 1998. Adaptation of Sindbis Virus to BHK Cells Selects for Use of Heparan Sulfate as an Attachment Receptor. *Journal of Virology.* 72:7357–7366. doi:10.1128/JVI.72.9.7357-7366.1998.
- Kranz, C., B.G. Ng, L. Sun, V. Sharma, E.A. Eklund, Y. Miura, D. Ungar, V. Lupashin, R.D. Winkel, J.F. Cipollo, C.E. Costello, E. Loh, W. Hong, and H.H. Freeze. 2007. COG8 deficiency causes new congenital disorder of glycosylation type IIIh. *Human Molecular Genetics.* 16:731–741. doi:10.1093/hmg/ddm028.
- Li, J.-P., and M. Kusche-Gullberg. 2016. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. In *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier. 215–273.
- Li, W., H. Xu, T. Xiao, L. Cong, M.I. Love, F. Zhang, R.A. Irizarry, J.S. Liu, M. Brown, and X.S. Liu. 2014. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biol.* 15:554. doi:10.1186/s13059-014-0554-4.
- Li, Y., J. Muffat, A. Omer Javed, H.R. Keys, T. Lungjangwa, I. Bosch, M. Khan, M.C. Virgilio, L. Gehrke, D.M. Sabatini, and R. Jaenisch. 2019. Genome-wide CRISPR screen for Zika virus resistance in human neural cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 201900867. doi:10.1073/pnas.1900867116.

- Lindahl, U., J. Couchman, K. Kimata, and J.D. Esko. 2015. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. *In* Essentials of Glycobiology. A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, R.L. Schnaar, and P.H. Seeberger, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- López, P., E. Girardi, B.C. Mounce, A. Weiss, B. Chane-Woon-Ming, M. Messmer, P. Kaukinen, A. Kopp, D. Bortolamiol-Becet, A. Fendri, M. Vignuzzi, L. Brino, and S. Pfeffer. 2020. High-throughput fluorescence-based screen identifies the neuronal microRNA miR-124 as a positive regulator of alphavirus infection. *J Virol.* JVI.02145-19, jvi;JVI.02145-19v1. doi:10.1128/JVI.02145-19.
- Mislick, K.A., and J.D. Baldeschwieler. 1996. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 93:12349–12354. doi:10.1073/pnas.93.22.12349.
- Murakami, S., A. Takenaka-Uema, T. Kobayashi, K. Kato, M. Shimojima, M. Palmarini, and T. Horimoto. 2017. Heparan Sulfate Proteoglycan Is an Important Attachment Factor for Cell Entry of Akabane and Schmallenberg Viruses. *J. Virol.* 91:e00503-17, /jvi/91/15/e00503-17.atom. doi:10.1128/JVI.00503-17.
- Park, R.J., T. Wang, D. Koundakjian, J.F. Hultquist, P. Lamothe-Molina, B. Monel, K. Schumann, H. Yu, K.M. Krupczak, W. Garcia-Beltran, A. Piechocka-Trocha, N.J. Krogan, A. Marson, D.M. Sabatini, E.S. Lander, N. Hacohen, and B.D. Walker. 2017. A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat. Genet.* 49:193–203. doi:10.1038/ng.3741.
- Payne, C.K., S.A. Jones, C. Chen, and X. Zhuang. 2007. Internalization and Trafficking of Cell Surface Proteoglycans and Proteoglycan-Binding Ligands. *Traffic.* 8:389–401. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00540.x.
- Reynders, E., F. Foulquier, E. Leão Teles, D. Quelhas, W. Morelle, C. Rabouille, W. Annaert, and G. Matthijs. 2009a. Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Human Molecular Genetics.* 18:3244–3256. doi:10.1093/hmg/ddp262.
- Reynders, E., F. Foulquier, E. Leão Teles, D. Quelhas, W. Morelle, C. Rabouille, W. Annaert, and G. Matthijs. 2009b. Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Human Molecular Genetics.* 18:3244–3256. doi:10.1093/hmg/ddp262.
- Rusnati, M., E. Vicenzi, M. Donalisio, P. Oreste, S. Landolfo, and D. Lembo. 2009. Sulfated K5 Escherichia coli polysaccharide derivatives: A novel class of candidate antiviral microbicides. *Pharmacology & Therapeutics.* 123:310–322. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.05.001.
- Safaiyan, F., S.O. Kolset, K. Prydz, E. Gottfridsson, U. Lindahl, and M. Salmivirta. 1999. Selective Effects of Sodium Chlorate Treatment on the Sulfation of Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.* 274:36267–36273. doi:10.1074/jbc.274.51.36267.
- Savidis, G., W.M. McDougall, P. Meraner, J.M. Perreira, J.M. Portmann, G. Trincucci, S.P. John, A.M. Aker, N. Renzette, D.R. Robbins, Z. Guo, S. Green, T.F. Kowalik, and A.L. Brass. 2016. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Reports.* 16:232–246. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.028.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 9:676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.
- Schlee, M., and G. Hartmann. 2016. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol.* 16:566–580. doi:10.1038/nri.2016.78.
- Shalem, O., N.E. Sanjana, and F. Zhang. 2015. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* 16:299–311. doi:10.1038/nrg3899.
- Shestakova, A., S. Zolov, and V. Lupashin. 2006. COG Complex-Mediated Recycling of Golgi Glycosyltransferases is Essential for Normal Protein Glycosylation: COG Complex and Golgi Glycosylation. *Traffic.* 7:191–204. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00376.x.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J.D. Thompson, and D.G. Higgins. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 7:539. doi:10.1038/msb.2011.75.
- Smith, T.J., R.H. Cheng, N.H. Olson, P. Peterson, E. Chase, R.J. Kuhn, and T.S. Baker. 1995. Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 92:10648–10652. doi:10.1073/pnas.92.23.10648.
- Spaapen, L.J.M., J.A. Bakker, S.B. van der Meer, H.J. Sijstermans, R.A. Steet, R.A. Wevers, and J. Jaeken. 2005. Clinical and biochemical presentation of siblings with COG-7 deficiency, a lethal multiple O- and N-glycosylation disorder. *J Inherit Metab Dis.* 28:707–714. doi:10.1007/s10545-005-0015-z.
- Stetson, D.B., and R. Medzhitov. 2006. Type I Interferons in Host Defense. *Immunity.* 25:373–381. doi:10.1016/j.immuni.2006.08.007.

- Strauss, J.H., and E.G. Strauss. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58:491–562.
- Tanaka, A., U. Tumkosit, S. Nakamura, D. Motooka, N. Kishishita, T. Priengprom, A. Sa-ngasang, T. Kinoshita, N. Takeda, and Y. Maeda. 2017. Genome-Wide Screening Uncovers the Significance of N-Sulfation of Heparan Sulfate as a Host Cell Factor for Chikungunya Virus Infection. *J. Virol.* 91:e00432-17, /jvi/91/13/e00432-17.atom. doi:10.1128/JVI.00432-17.
- Ungar, D., T. Oka, E.E. Brittle, E. Vasile, V.V. Lupashin, J.E. Chatterton, J.E. Heuser, M. Krieger, and M.G. Waters. 2002. Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function. *The Journal of Cell Biology.* 157:405–415. doi:10.1083/jcb.200202016.
- Wahlberg, J.M., R. Bron, J. Wilschut, and H. Garoff. 1992. Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. *J. Virol.* 66:7309–7318.
- Weber, F., V. Wagner, S.B. Rasmussen, R. Hartmann, and S.R. Paludan. 2006. Double-Stranded RNA Is Produced by Positive-Strand RNA Viruses and DNA Viruses but Not in Detectable Amounts by Negative-Strand RNA Viruses. *Journal of Virology.* 80:5059–5064. doi:10.1128/JVI.80.10.5059-5064.2006.
- Willett, R., D. Ungar, and V. Lupashin. 2013. The Golgi puppet master: COG complex at center stage of membrane trafficking interactions. *Histochem Cell Biol.* 140:271–283. doi:10.1007/s00418-013-1117-6.
- Zeevaert, R., F. Foulquier, J. Jaeken, and G. Matthijs. 2008. Deficiencies in subunits of the Conserved Oligomeric Golgi (COG) complex define a novel group of Congenital Disorders of Glycosylation. *Molecular Genetics and Metabolism.* 93:15–21. doi:10.1016/j.ymgme.2007.08.118.
- Zhang, R., J.J. Miner, M.J. Gorman, K. Rausch, H. Ramage, J.P. White, A. Zuiani, P. Zhang, E. Fernandez, Q. Zhang, K.A. Dowd, T.C. Pierson, S. Cherry, and M.S. Diamond. 2016. A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses. *Nature.* 535:164–168. doi:10.1038/nature18625.
- Zolov, S.N., and V.V. Lupashin. 2005. Cog3p depletion blocks vesicle-mediated Golgi retrograde trafficking in HeLa cells. *J Cell Biol.* 168:747–759. doi:10.1083/jcb.200412003.

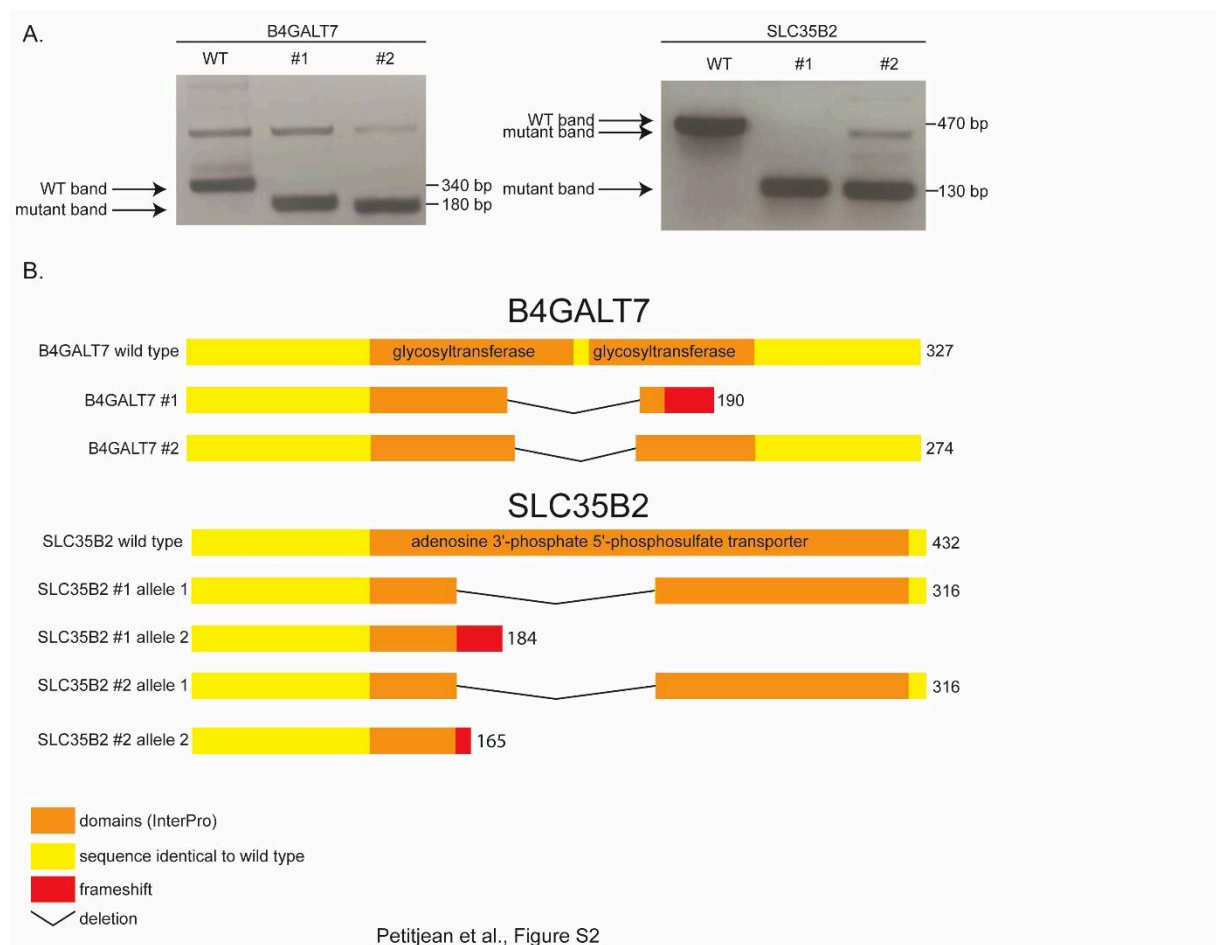
## Supplemental information

### Supplemental figures legends



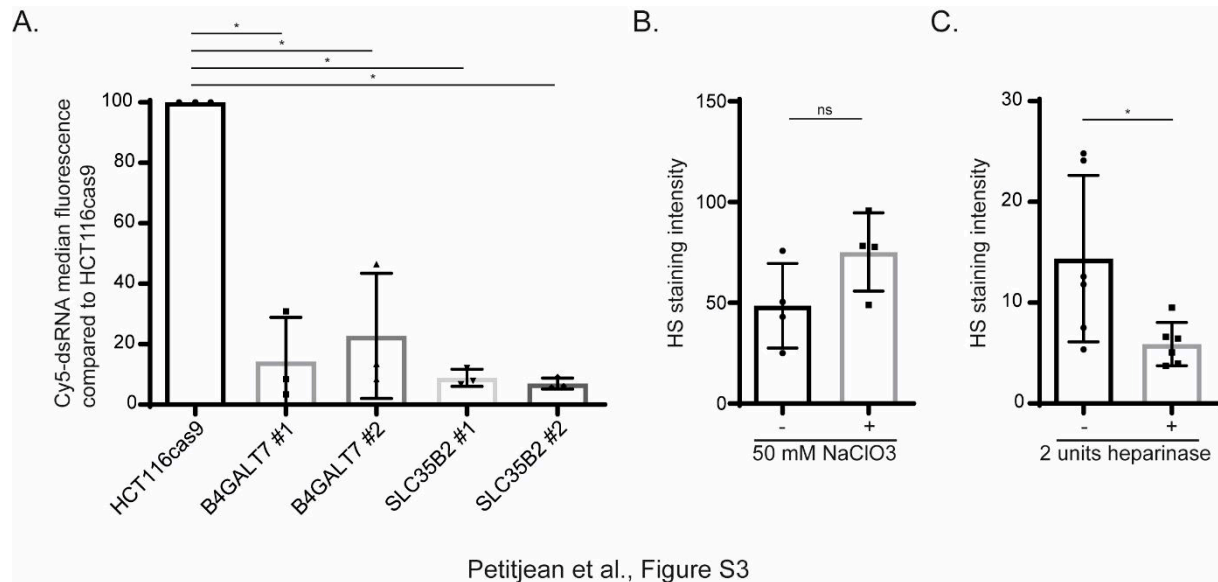
**Figure S1. HCT116 cells are infectable by SINV and are sensitive to dsRNA-induced cell death.**

**A.** Representative pictures of HCT116cas9 cells uninfected or infected with SINV-GFP MOI of 1 at 24h post infection. 20X optical microscopy. **B.** Representative pictures of HCT116cas9 cells at 48h post transfection with 1 ug/mL dsRNA compared to non transfected ones. 10X optical microscopy.



**Figure S2. Generation of SLC35B2 and B4GALT7 HCT116 CRISPR/Cas9 knock-out monoclonal cell lines.** **A.** PCR screen of SLC35B2 and B4GALT7 knock-out clones obtained by CRISPR/Cas9. The gels show the amplicons corresponding to wild type and deleted alleles that were subsequently sequenced. **B.** Clustal Omega

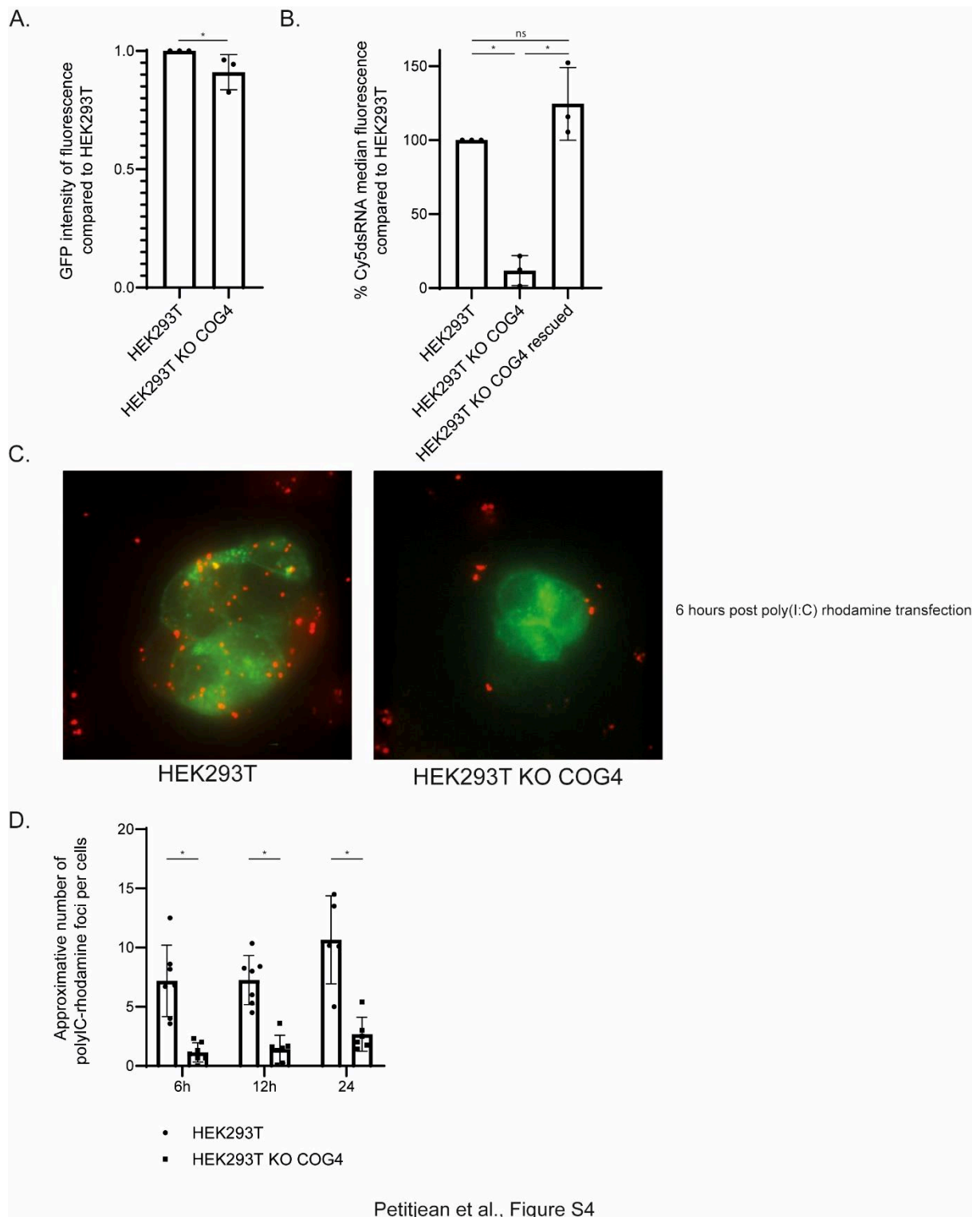
(Sievers et al., 2011) alignment of the wild type and mutated peptide sequences corresponding to the genomic deletions identified in the different clones. The reference aminoacidic sequence is represented in yellow (unknown domains - InterPro) and orange (known domains – InterPro). The peptidic sequences resulting in shorter protein due to deletions or formation of premature stop codon in the knock-out clones are represented with black bars or red rectangles, respectively.



Petitjean et al., Figure S3

**Figure S3. DsRNA delivery is impaired in the absence of extracellular heparan-sulfates.**

**A.** Cy5-labeled dsRNA (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was transfected into HCT116cas9, B4GALT7#1 and 2, SLC35B2#1 and #2 cells and Cy5 fluorescence was quantified using FACSCalibur (10 000 events). Average of three independent biological experiments  $\pm$  SD are shown. One-way ANOVA analysis, \*  $p < 0.05$ . **B and C.** HCT116cas9 cells were treated with **(B)** 50 mM sodium chlorate or **(C)** 2 units of heparinase before transfection of a GFP plasmid. HS were stained 48h post transfection using 10E4 antibody and quantified using FACSCalibur (10 000 events). Data from at least three independent biological experiments  $\pm$  SD are shown Unpaired t.test analysis \*  $p < 0.05$ .



Petitjean et al., Figure S4

**Figure S4. Plasmid DNA and dsRNA are differentially internalized in HEK293T *COG4* KO cells.**

**A.** HEK293T and HEK293T KO *COG4* cells were transfected with a GFP plasmid and fluorescence was quantified 48h post transfection using FACSCalibur. Average of three experiments +/- SD are shown. Unpaired t.test analysis \*  $p < 0.05$ .

**B.** Cy5-labeled dsRNA (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was transfected into HEK293T, HEK293T KO *COG4* cells and HEK293T KO *COG4* rescued cells. Cy5 fluorescence was quantified using FACSCalibur (10 000 events). Average of three experiments +/- SD are shown. One-way ANOVA analysis, \*  $p < 0.05$ .

**C.** HEK293T and HEK293T KO *COG4* were transfected with rhodamine-labeled poly I:C (in red) and with Rab5-GFP (in green) and images were acquired using spinning disk microscope. Representative pictures are shown. **D.** The approximate number of rhodamine-positive signal of per cells was quantified by counting 7 fields per conditions. Two-way ANOVA analysis, \*  $p < 0.05$ .



Type	Primer name	Sequence (5' -> 3')
gRNA sequences	B4GAL17 gRNA sequence 1	CACTACAAGACCTATGTCGG
	B4GAL17 gRNA sequence 2	CGGGCAGCGCTCATCAACGT
	SLC35B2 gRNA sequence 1	GCACTCGGTTCAATTAACAAC
	SLC35B2 gRNA sequence 2	TATAACCTGCCAGTAAAGATG
PCR primer to screen KO	B4GAL17 KO forward	AGTCAAGTCTGGCCAGAGG
	B4GAL17 KO reverse	CAGCCGGTAGTCTGCTTGG
	SLC35B2 KO forward	GGGGCCACAGCCATCAACC
	SLC35B2 KO reverse	AGGCAAAACAAGGCACTCTGC
CRISPR screen primers	Cispr_lib_Seq_F01	AATGATACGGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACAACCG
	Cispr_lib_Seq_F02	AATGATACGGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACAACCG
	Cispr_lib_Seq_F03	AATGATACGGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACAACCG
	Cispr_lib_Seq_F04	AATGATACGGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACAACCG
	Cispr_lib_Seq_F05	AATGATACGGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACAACCG
	Cispr_lib_Seq_F06	AATGATACGGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACAACCG
	Cispr_lib_Seq_F07	AATGATACGGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACAACCG
	Cispr_lib_Seq_F08	AATGATACGGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACAACCG
	Cispr_lib_R01	CAAGCAAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTAAAGGATGACTGGAGTTCAAGCGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
	Cispr_lib_R02	CAAGCAAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTAAAGGATGACTGGAGTTCAAGCGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
	Cispr_lib_R03	CAAGCAAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTAAAGGATGACTGGAGTTCAAGCGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
	Cispr_lib_R04	CAAGCAAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTAAAGGATGACTGGAGTTCAAGCGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
	Cispr_lib_R05	CAAGCAAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTAAAGGATGACTGGAGTTCAAGCGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
	Cispr_lib_R06	CAAGCAAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTAAAGGATGACTGGAGTTCAAGCGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
	Cispr_lib_R07	CAAGCAAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTAAAGGATGACTGGAGTTCAAGCGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
	Cispr_lib_R08	CAAGCAAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTAAAGGATGACTGGAGTTCAAGCGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT
Cispr_lib_R09	CAAGCAAGAAGACGGCATAACGAGATCAAGTAAAGGATGACTGGAGTTCAAGCGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTACTATTCTTTCCCTGCACTGT	
dsRNA production	dsRNA Positive strand	GAATTAATAACGACTCACTAAGGCCATGCCCGAAGGCTACGTC TGTCGGCCAAGATATAGACG
	dsRNA Negative strand	CCATGCCCGAAGGCTACGTC GAATTAATAACGACTCACTAAGGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
		GAATTAATAACGACTCACTAAGGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
qPCR primers	qPCR GAPDH	5'CCAAGTGAAGCTTCCCGTTCAAG3' 5'CTTTGGTATCGTGGAAAGGACT3'
	qPCR dsRNA	GAACCGCATCGAGCTGA CTACAAACAGCCACACGCTCA

**Table S1**  
List of primers used in the study.

## II. Identification des facteurs impliqués dans l'(in)compatibilité entre l'ARNi et la réponse IFN

L'importance de l'ARNi en tant que réponse antivirale chez les mammifères est encore largement débattue. Afin d'apporter de nouveaux éléments de réponse à cette problématique, nous avons décidé de mettre en place un crible CRISPR-Cas9 afin d'identifier les potentiels facteurs de restriction de l'ARNi dans des cellules somatiques de mammifères. En effet, si l'ARNi est limité dans les cellules somatiques de mammifères par certains facteurs qui sont uniquement exprimés dans les cellules différenciées, alors la perte de l'expression de ce gène (s'il n'y a pas d'autres gènes avec des fonctions redondantes) devrait permettre la restauration de l'ARNi.

### a. Mise en place d'un système rapporteur de l'ARNi

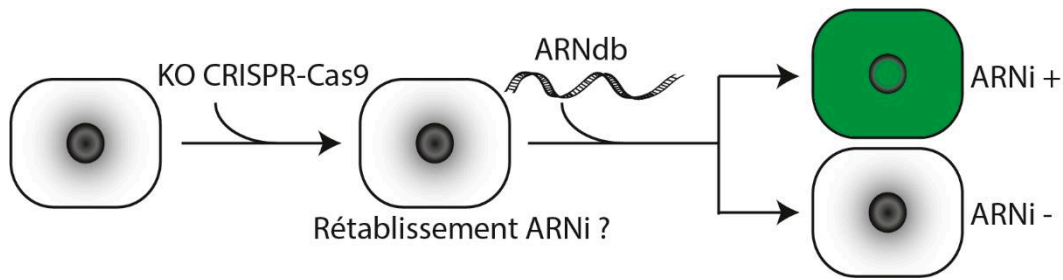
L'approche utilisée pour le premier crible n'est pas suffisante pour identifier des facteurs de restriction de l'ARNi car elle permet uniquement l'identification des gènes liés à la survie lors de l'application d'une pression de sélection. Il est donc nécessaire de mettre en place un crible plus élaboré, permettant la sélection spécifique de notre phénotype d'intérêt.

Dans notre cas, nous recherchons le rétablissement de l'interférence par ARN. C'est-à-dire la restauration de la possibilité de produire une quantité suffisante de siARN pouvant être chargés dans une protéine de la famille Argonaute dans le but de conduire à la perte de l'expression d'un ARN cible. Or, la restauration de ce phénotype n'est pas directement observable. Il est alors essentiel de mettre en place un système permettant la visualisation efficace de la restauration de ce phénotype. Visualiser indirectement la restauration d'un phénotype n'est pas chose aisée, de nombreux paramètres peuvent être mesurés tels que de la fluorescence, des modifications métaboliques, des modifications morphologiques. Cependant, la simplicité de mise en place et de suivi de systèmes fluorescents nous a naturellement incités à mettre en place un système de ce type. La fluorescence peut être lue de différentes façons mais l'apparition de la fluorescence lors de la restauration d'un mécanisme d'intérêt est plus simple à visualiser qu'une diminution qui implique de déterminer des seuils de diminution.

### i. Système TEV

#### 1. Modèle théorique du système TEV

Le phénotype le plus simple à cribler est l'apparition de la fluorescence lorsque l'ARNi est rétabli au sein de la cellule (Figure 18). Or, l'ARNi est un système qui diminue l'expression d'un ARN messager et *de facto* l'expression de la protéine associée.

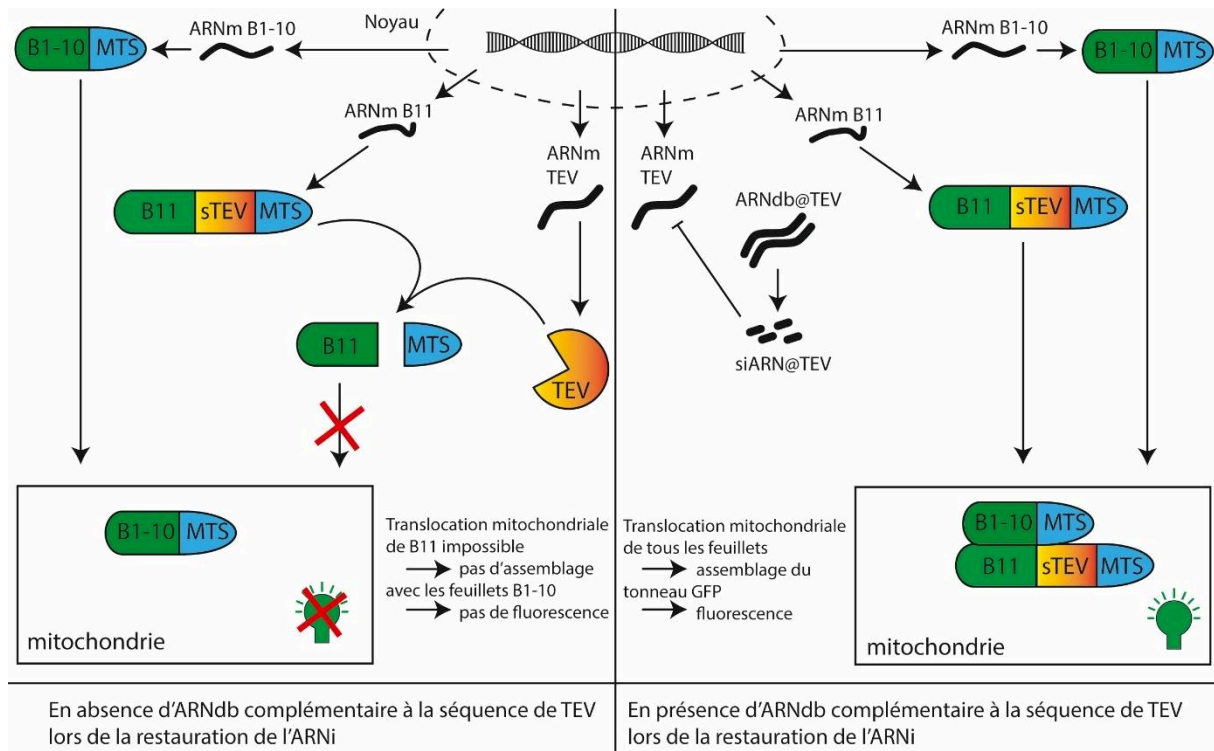


**Figure 18 - visualisation du rétablissement de l'ARNi grâce à l'apparition de fluorescence.**

Les cellules dans lesquelles l'inactivation génique (KO) a permis le rétablissement de l'ARNi deviennent fluorescentes (e.g. vertes) lors de la transfection d'un ARNdb spécifique du système rapporteur.

Afin de mettre en place un système où l'apparition de la fluorescence est liée à la restauration de l'ARNi, nous nous sommes intéressés à l'utilisation du système split-GFP (pour revue voir Yakobov *et al.*, 2018). Dans ce système, les feuillets bêta 1 à 10 (GFP<sub>1-10</sub>) de la GFP et le feuillet bêta 11 (GFP<sub>11</sub>) de la GFP sont exprimés séparément et leur réassociation permet de restaurer la fluorescence de la GFP. Ici, nous cherchons à contrôler la réassociation de la GFP afin de réaliser un système dans lequel des signaux de translocation mitochondriaux (*mitochondrial translocation signal* – MTS) sont fusionnés aux différentes constructions dans le but de réaliser une ségrégation spatiale des feuillets GFP<sub>1-10</sub> et du feuillet GFP<sub>11</sub> de la GFP. Dans les constructions ci-dessous, le feuillet GFP<sub>11</sub> est en réalité un chapelet constitué de trois feuillets GFP<sub>11</sub> à la suite pour augmenter l'intensité de fluorescence du signal (GFP<sub>11x3</sub>). L'un est localisé dans la mitochondrie (GFP<sub>1-10</sub>) alors que GFP<sub>11x3</sub> présente une séquence MTS qui peut être clivée par la protéase du virus de la gravure du tabac (*Tobacco etch virus* – TEV) (Figure 19). Cette protéase virale est couramment utilisée dans des applications biotechnologiques du fait de son efficacité et de sa spécificité de coupure (Waugh, 2011). La séquence de reconnaissance de cette protéase TEV (sTEV) est de seulement 7 acides aminés : EXXYXQ-S/G (X représente n'importe quel acide aminé) dans lesquels la protéolyse se situe entre les résidus Gln et Ser ou Gly (Dougherty & Dawn Parks, 1991).

L'idée est de transférer un ARNdb dont la séquence correspondrait à la séquence de l'ARNm de la protéase TEV, ce qui permettrait la diminution séquence-spécifique de l'ARNm de TEV et donc de la protéase afin de permettre la reconstitution de la protéine GFP. Bien sûr, cet ARNdb pourra induire l'ARNi de TEV uniquement dans des cellules où celui-ci a été restauré par inactivation génique d'un répresseur putatif (Figure 19).



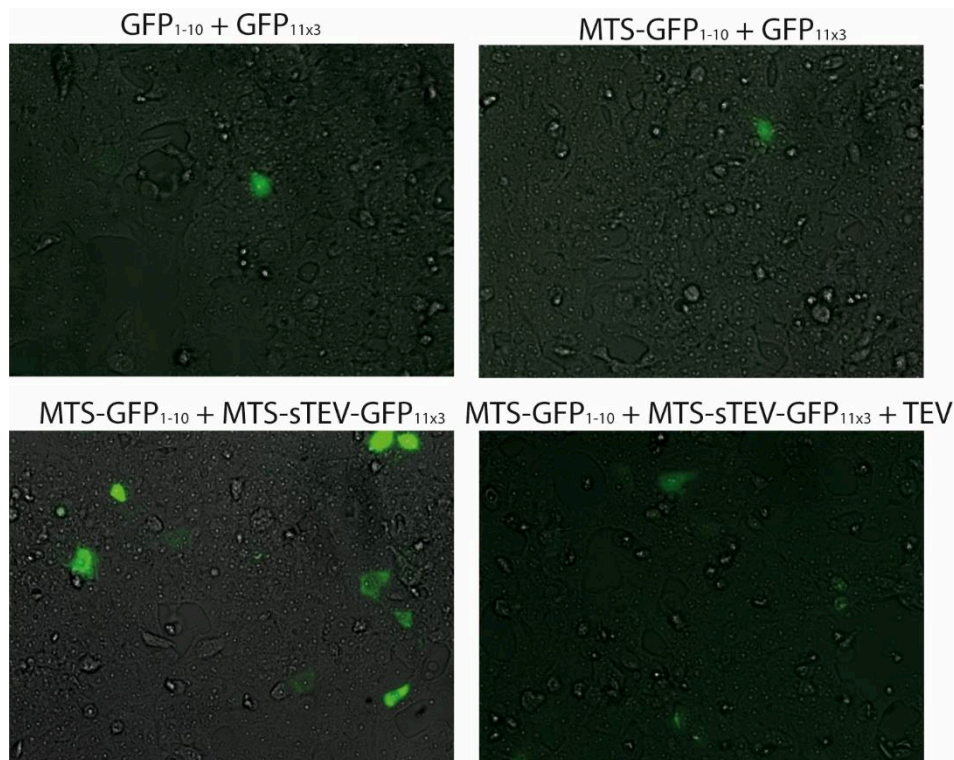
**Figure 19 – Illustration du système rapporteur split-GFP.**

Panel de gauche : en absence d'ARNdb complémentaire à la séquence de TEV lors de la restauration de l'ARNi :  
 La protéine comprenant les feuillets GFP<sub>1-10</sub> et le signal de translocation mitochondriale (MTS) et la protéine composée du feuillet GFP<sub>11-x3</sub>, la séquence de protéolyse de TEV (sTEV) et le MTS sont toutes deux exprimées via des plasmides distincts. Lors de la protéolyse de GFP<sub>11</sub>-sTEV-MTS par la protéase TEV, la protéine ne peut plus être transportée au sein de la mitochondrie ou se situe déjà le fragment GFP<sub>1-10</sub>-MTS pour permettre l'assemblage de la GFP, cela conduisant donc à la perte du signal GFP.

Panel de droite : en présence d'ARNdb complémentaire à la séquence de TEV lors de la restauration de l'ARNi :  
 La transfection d'un ARNdb complémentaire de la séquence de l'ARNm de TEV va être reconnu et mûri en siARN afin de rentrer dans la voie de l'ARNi en ayant comme finalité la perte de l'expression de l'ARNm de TEV et donc la perte de l'expression de la protéase TEV. La perte de l'expression de la protéase va empêcher le clivage de la polyprotéine GFP<sub>11</sub>-sTEV-MTS et cette dernière va pouvoir transloquer au sein de la mitochondrie et s'assembler avec GFP<sub>1-10</sub> et ainsi permettre l'apparition de la fluorescence de la GFP.

## 2. Mise en place du système TEV

Différentes constructions ont été co-transfectées dans des cellules HCT116 en présence ou non du plasmide permettant l'expression de la protéase TEV (Figure 20).

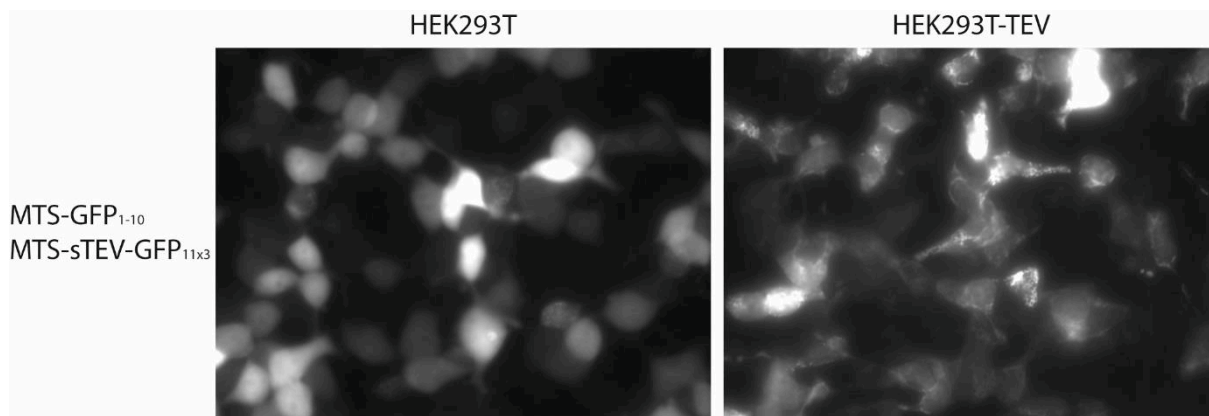


**Figure 20 - Transfection du système TEV.**

200 ng des différents plasmides ont été co-transfectés puis la fluorescence des cellules est observée en microscopie à épifluorescence 48 heures après transfection. 80 000 cellules – plaque 24 puits – grossissement 10X.

Tout d’abord, on remarque que les fragments GFP<sub>1-10</sub> et GFP<sub>11x3</sub> semblent mal s’assembler, tout comme le contrôle MTS- GFP<sub>1-10</sub> et GFP<sub>11x3</sub> qui est une mimique des fragments que l’on aurait obtenu après coupure TEV, correspondant ainsi à notre bruit de fond expérimental. Cela n’est pas surprenant car les protéines n’ont pas de signal de localisation dans un compartiment commun, ce qui faciliterait leur association. Lorsque les fragments MTS- GFP<sub>1-10</sub> et MTS-sTEV-GFP<sub>11x3</sub> sont co-transfectés, on remarque une intensité de la GFP qui semble plus forte et dans plus de cellules, validant ainsi l’hypothèse que la co-localisation des fragments dans la mitochondrie est suffisante pour la restauration de la GFP. Nous observons aussi qu’en présence de TEV, les cellules transfectées avec MTS- GFP<sub>1-10</sub> et MTS-sTEV-GFP<sub>11x3</sub> semblent être moins fluorescentes qu’en absence de TEV. Ces résultats sont prometteurs pour la mise en place de ce système, même si l’on peut souligner qu’il reste quand même de la fluorescence en présence de TEV.

Afin de ne plus travailler dans un système transitoire (qui impliquerait des contrôles de transfection des plasmides trop complexes à mettre en place) Une lignée polyclonale exprimant la protéase TEV a été générée à partir de cellules HEK293T (Voir Matériels et Méthodes b.ii). Les plasmides MTS- GFP<sub>1-10</sub> et MTS-TEV-GFP<sub>11x3</sub> ont été transfectés dans cette lignée polyclonale ou dans la lignée HEK293T parentale (Figure 21).



**Figure 21 – Comparaison de la transfection du système TEV entre HEK293T et HEK293T-TEV.**  
 Les lignées HEK293T et HEK293T-TEV ont été transfectées avec 250 ng de chaque plasmide puis observées au microscope optique à épifluorescence 48 heures après traitement. 80 000 cellules – plaque 24 puits – grossissement 20X.

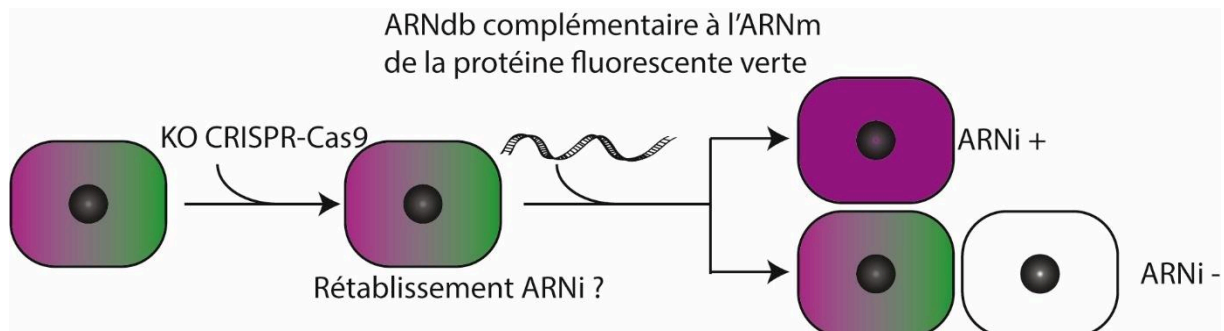
On observe que dans les cellules HEK293T transfectées avec le système rapporteur, la fluorescence de la GFP n'est pas diffuse, la cellule est fluorescente de façon homogène. Dans les lignées exprimant TEV, le signal fluorescent est plus diffus, avec de nombreux points intenses dans le cytoplasme, ce qui pourrait correspondre au réseau mitochondrial. Cependant, ce phénotype n'est pas celui escompté car nous ne souhaitons plus avoir de signal GFP lorsque la protéase TEV est exprimée en présence de notre système rapporteur, et non une réduction du signal. Ce phénotype est intéressant mais n'est pas suffisant pour réaliser notre approche dans laquelle on ne souhaite pas voir de fluorescence en amont de la restauration de l'ARNi. Ce système imposerait la mise en place d'une valeur seuil de la fluorescence de la GFP minimale qui pourrait générer des faux positifs (cellules dans lesquelles il y a déjà une fluorescence basale sans avoir de rétablissement de l'ARNi). Nous avons décidé d'adopter une autre approche de système rapporteur afin de nous assurer d'une lecture efficace du rétablissement de l'ARNi pour pouvoir réaliser le crible ARNi.

## ii. Le système PGK

### 1. Modèle théorique du système PGK

En parallèle, nous avons décidé de mettre en place un système moins complexe, où nous pouvons observer le mécanisme de l'ARNi en visualisant la diminution spécifique de l'expression d'une protéine fluorescente par rapport à une autre. L'ARNi étant un mécanisme séquence-spécifique ; si deux protéines fluorescentes sont exprimées sous le même promoteur dans une cellule, alors la transfection d'un ARNdb spécifique de la séquence d'un des deux ARNm codant pour les protéines fluorescentes ne devrait conduire qu'à la diminution de cette dernière lors de la restauration de l'ARNi (Figure 22). Encore une fois, l'activation de PKR lors

de la transfection de l'ARNdb peut être un frein à la visualisation de notre phénotype d'intérêt par l'inhibition de la traduction canonique eIF2 $\alpha$ -dépendante et l'induction de l'apoptose (Figure 22).



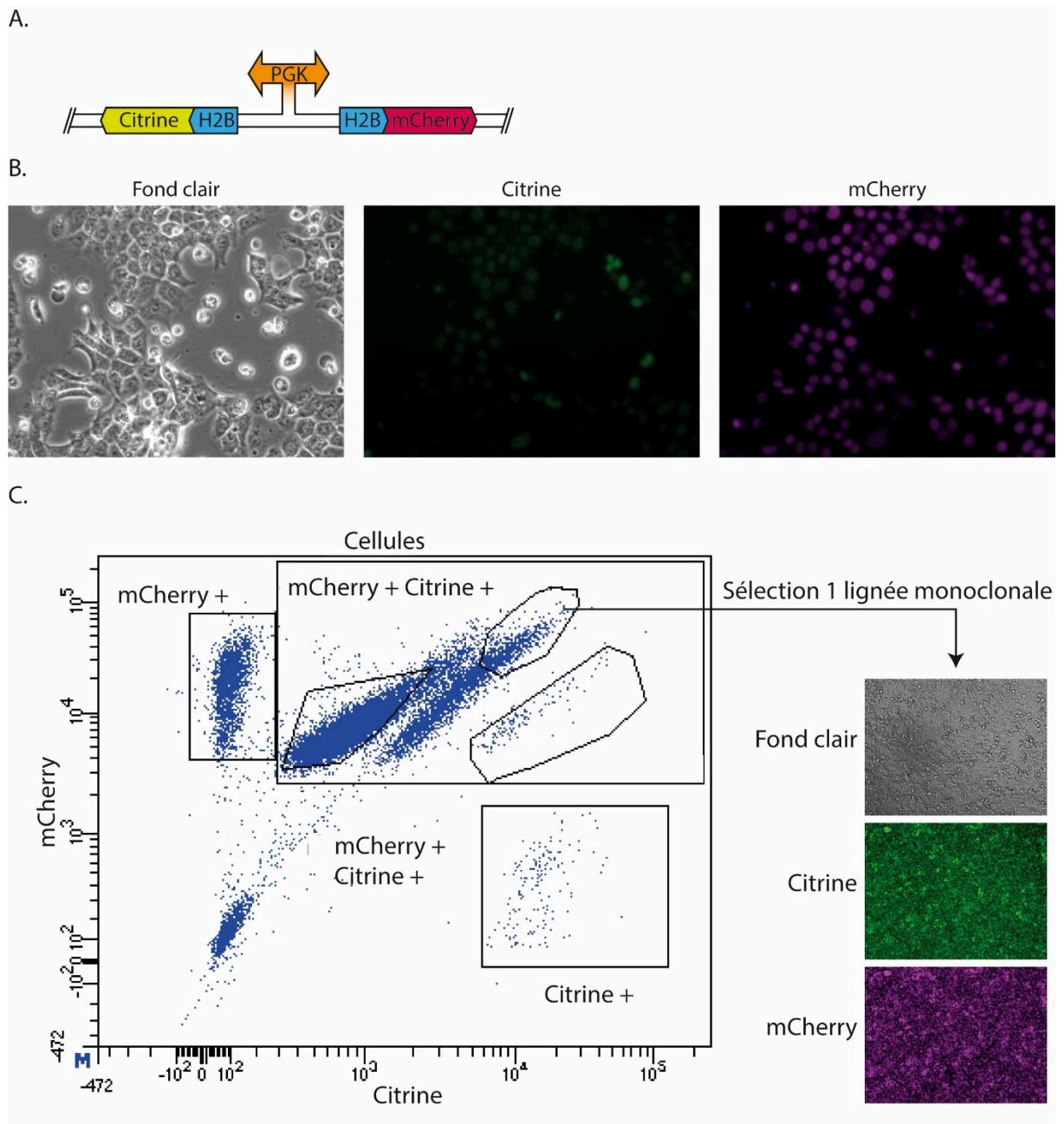
**Figure 22 – Représentation schématique du système rapporteur avec deux protéines fluorescentes.**

Dans cet exemple, les cellules expriment deux protéines fluorescentes, une qui fluoresce dans le vert, l'autre dans le violet. Dans ces cellules, après KO CRISPR-Cas9, le rétablissement potentiel de l'ARNi est visualisé lors de la transfection d'un ARNdb complémentaire à la séquence de l'ARNm d'une des protéines fluorescentes (dans cet exemple l'ARNdb est complémentaire à l'ARNm de la protéine fluorescente verte). Si l'ARNi est rétabli, alors la diminution spécifique de la fluorescence de la protéine verte par rapport à la protéine violette sera observée. Dans le cas contraire, il n'y aura pas de diminution spécifique de la fluorescence d'une protéine par rapport à une autre, voire, une perte de la fluorescence des deux protéines du fait de l'activation de la réponse IFN.

Le plasmide miReporter-PGK (pPGK) permet l'expression simultanée des protéines fluorescentes Citrine et mCherry grâce au promoteur constitutif murin phosphoglycerate-kinase (PGK) modifié pour être bidirectionnel (Sladitschek & Neveu, 2016) (Figure 23.A). Les protéines Citrine et mCherry sont deux protéines qui présentent une résistance élevée au photoblanchiment, des spectres d'excitation et d'émission distincts (Citrine = 516/529 ; mCherry = 587/610). Ces protéines sont fusionnées à la protéine constitutive d'histone H2B, ce qui permet un adressage nucléaire des protéines afin d'améliorer la visualisation du signal fluorescent en plus de leur conférer une stabilité accrue pour optimiser le signal par rapport au bruit de fond.

## 2. Mise en place du système PGK

Après avoir constaté l'expression simultanée des deux protéines fluorescentes après transfection de pPGK, nous avons généré une lignée polyclonale qui exprime constitutivement les protéines Citrine et mCherry (Figure 23.B). Ayant remarqué que la fluorescence des cellules est hétérogène, nous avons décidé de trier ces cellules au FACS afin d'obtenir des populations plus homogènes vis-à-vis de la fluorescence des deux gènes rapporteurs (Figure 23.C).



**Figure 23 – Mise en place de la lignée monoclonale HCT116-Cas9-Citrine/mCherry.**

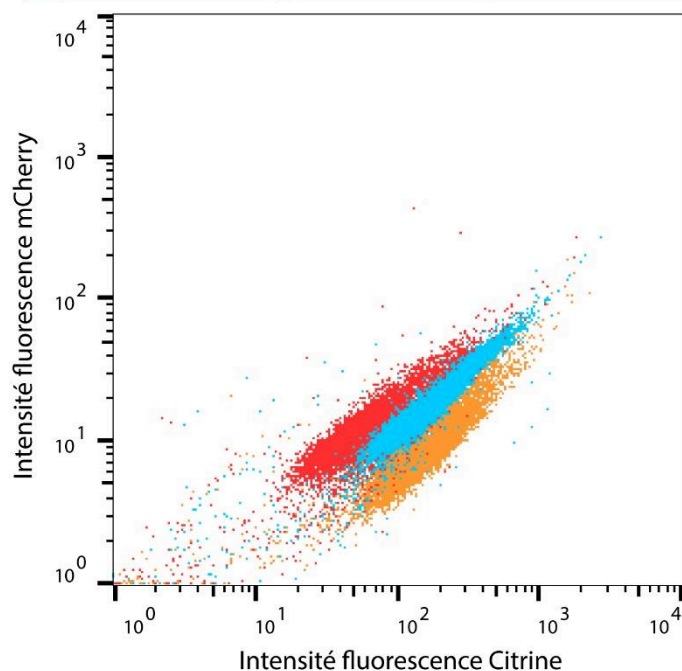
**A.** Schéma représentatif de la construction pGK-miReporter. **B.** Mise en place de la lignée polyclonale HCT116-Cas9-Citrine /mCherry. Les cellules HCT116-Cas9 sont transfectées avec 4 µg de pPGK puis sélectionnées sous hygromycine pendant 20 jours. 500 000 cellules – plaque 6 puits. **C.** Sélection de la lignée monoclonale. Les cellules de lignée polyclonale HCT116-Cas9-Citrine/mCherry sont triées en cytométrie en flux puis une lignée monoclonale exprimant fortement Citrine et mCherry est sélectionnée puis amplifiée pour faire la lignée sur laquelle nous allons réaliser le criblé.

Une fois la lignée monoclonale HCT116-Cas9-Citrine/mCherry obtenue (Figure 23.C), nous avons vérifié la fonctionnalité du mécanisme de l'ARNi en transfectant des siARN complémentaires aux ARNm des protéines fluorescentes afin de nous assurer qu'il soit possible de diminuer spécifiquement l'expression de Citrine ou de mCherry. Cela nous permet aussi



d'observer si la diminution spécifique de la fluorescence d'une protéine par rapport à l'autre pouvait être mesurée par cytométrie en flux (Figure 24).

Échantillon	Médiane Citrine	Médiane mCherry
2x 50 nM siCTR	163	16,9
2x 50 nM siCitrine	77,2	12,4
2x 50 nM simCherry	145	9,7



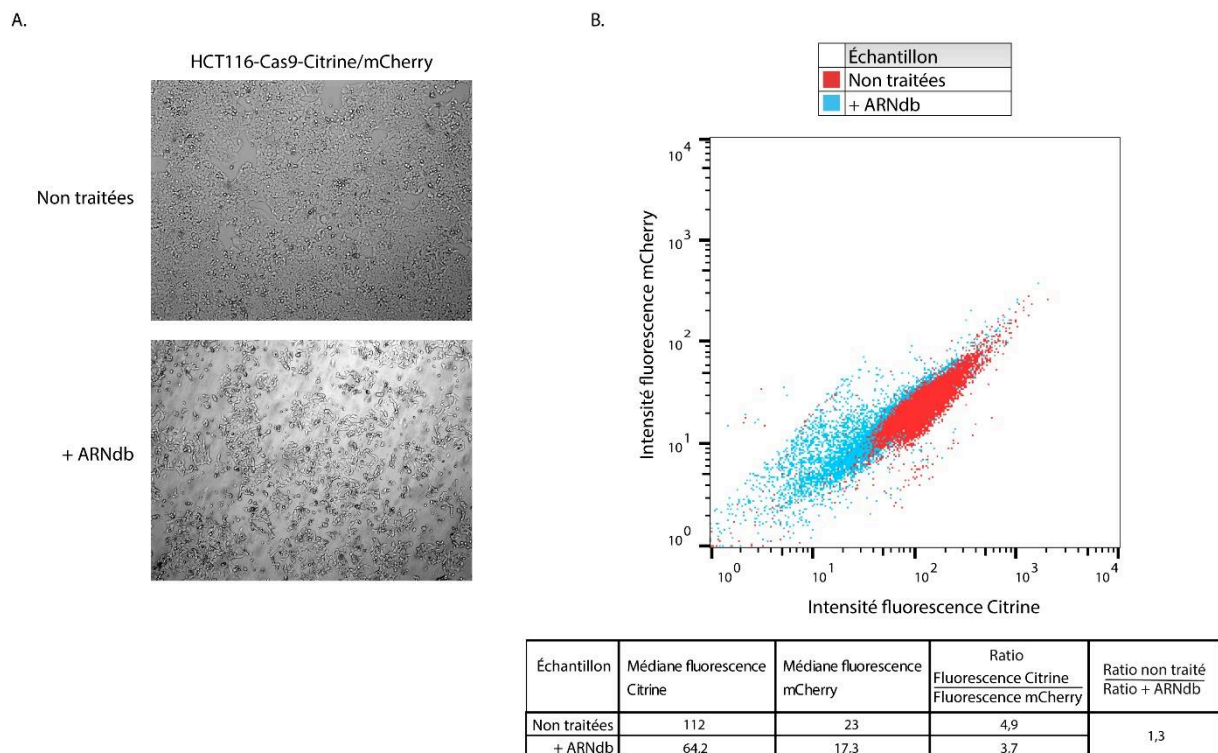
**Figure 24 – La lignée HCT116-Cas9-Citrine/mCherry est sensible aux siARNs.**

Les cellules HCT116-Cas9-Citrine/mCherry sont transfectées deux fois avec 50 nM de siCitrine, simCherry ou siCTR à 24 heures d'intervalle. Les cellules sont analysées en cytométrie en flux 24 heures après la seconde transfection. L'intensité médiane de la fluorescence de Citrine et de mCherry est indiquée. 75 000 cellules – plaque 24 puits – au minimum 10 000 évènements par conditions.

On remarque que la transfection des siCitrine diminue l'intensité de la fluorescence de la Citrine par rapport aux siContrôle et que la transfection des simCherry diminue quant-à-elle l'intensité de la fluorescence de mCherry. Cette expérience nous permet d'affirmer que la machinerie de l'ARNi

est en partie fonctionnelle dans notre lignée HCT116-Cas9-Citrine/mCherry et que la transfection de siARN dirigés contre les différentes protéines induit bien le phénotype escompté, et ce de manière séquence-spécifique.

En parallèle, nous avons transfecté de l'ARNdb dans ces cellules dans le but de visualiser si l'ARNdb est capable d'induire la cytotoxicité que nous avons observée précédemment (Figure 25.A). Etant donné que l'induction de la réponse IFN conduit à l'apoptose et réduit la traduction eIF2 $\alpha$ -dépendante, alors l'expression des protéines fluorescentes Citrine et mCherry de la lignée HCT116-Cas9-Citrine/mCherry sera diminuée aspécifiquement. L'ARNdb que nous avons transfecté est un ARNdb qui correspond à la séquence de 231 acides nucléiques du messenger de la Citrine (ARNdbCitrine) (Voir Matériels et Méthodes).



**Figure 25 – La lignée HCT116-Cas9-Citrine/mCherry est sensible aux ARNdb.**

**A. Transfection d'ARNdb.** Observation au microscope optique des cellules HCT116-Cas9-Citrine/mCherry 24 heures après transfection de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ARNdbCitrine. 300 000 cellules – plaque 6 puits – objectif 5X. **B. Analyse cytométrie en flux post-transfection d'ARNdb.** Les cellules HCT116-Cas9-Citrine/mCherry sont transfectées avec 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ARNdbCitrine puis analysées 24 heures après transfection par cytométrie en flux. 300 000 cellules – plaque 6 puits – au minimum 10 000 évènements par conditions.

On observe que comme pour les cellules HCT116, la transfection de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'ARNdb induit bel et bien un effet cytopathique qui est observable par microscopie optique après 24 heures (Figure 25.A). Cela traduit la sensibilité des cellules aux ARNdb, qui est liée à l'induction de la réponse IFN comme nous l'avons observé précédemment. On observe une diminution aspécifique de l'intensité médiane de la fluorescence de Citrine par rapport à mCherry dans la population transfectée avec l'ARNdbCitrine par rapport à la population non traitée lors de l'analyse par cytométrie en flux (ratio de 1,3 lors de la transfection d'ARNdb, Figure 25.B). Cette diminution aspécifique de l'intensité de la fluorescence des deux protéines fluorescentes lors de la transfection d'ARNdb est caractéristique de l'induction de la réponse IFN. Cette diminution est due à l'activation de PKR qui conduit à un blocage de la traduction eIF2 $\alpha$ -dépendante.

Ces différentes expériences ont révélé l'efficacité de notre système rapporteur. Néanmoins, avant de réaliser le moindre crible, nous devons nous assurer que l'utilisation d'un long ARNdb dirigé contre une des protéines fluorescentes est capable d'induire une diminution spécifique de la fluorescence de la protéine ciblée. Pour pouvoir réaliser cette expérience, nous

ne pouvons pas utiliser directement les cellules HCT116-Cas9-Citrine/mCherry car l'ARNdb active la réponse interféron et conduit à la diminution aspécifique des deux protéines rapportrices (Figure 25.B).

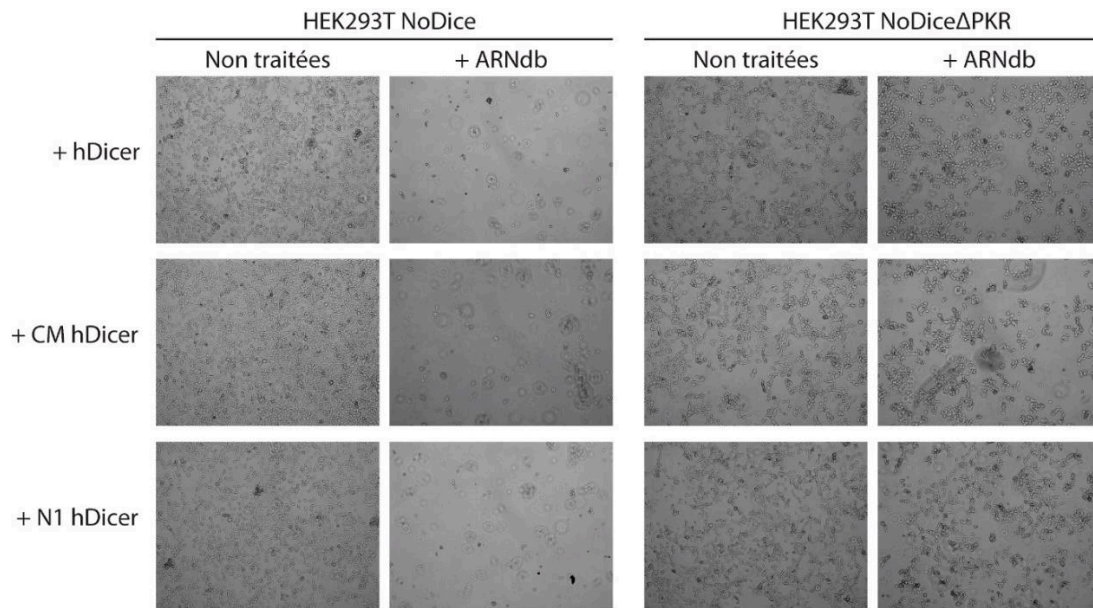
### 3. Validation fonctionnelle du système PGK en condition de restauration de l'ARNi

Afin de caractériser notre système rapporteur en condition de rétablissement de l'ARNi, ce qui nous est impossible dans les cellules HCT116 sauvages dans lesquelles la transfection d'un ARNdb induit PKR et l'apoptose, nous avons utilisé les cellules du Dr. B.R. Cullen dans lesquelles l'ARNi antiviral peut être restauré (Kennedy *et al.*, 2015). Ces cellules sont des cellules HEK293T dans lesquelles l'expression de la protéine PKR est abolie ( $\Delta$ PKR) afin d'éviter l'induction de l'apoptose en présence d'un ARNdb exogène. Les auteurs ont aussi réalisé un KO de Dicer dans ces cellules (HEK293T NoDice $\Delta$ PKR), mais également dans les cellules parentales (HEK293T NoDice). Cela permet la surexpression de différents isoformes de Dicer afin de mieux visualiser le phénotype de restauration de l'ARNi. En effet, les auteurs ont montré une restauration forte de l'ARNi dans des cellules HEK293T NoDice $\Delta$ PKR qui expriment l'isoforme N1 de hDicer. N1 hDicer est un isoforme de Dicer délété de son domaine hélicase, ce qui lui permet de devenir plus processive et donc plus efficace pour produire des siARN (Kennedy *et al.*, 2015).

A partir des cellules HEK293T NoDice et HEK293T NoDice $\Delta$ PKR, des lignées transduites avec différentes formes de hDicer ont été mises en place au laboratoire par le Dr. Thomas Montavon :

- CM hDicer : HEK293T NoDice ( $\pm$   $\Delta$ PKR) complétementée avec un mutant catalytique (*catalytic mutant* – CM) de hDicer. Cette lignée sera notre lignée contrôle dans laquelle la protéine Dicer ne peut plus produire de siARN.
- hDicer : HEK293T NoDice ( $\pm$   $\Delta$ PKR) complétementée avec la forme sauvage de hDicer.
- N1 hDicer : HEK293T NoDice ( $\pm$   $\Delta$ PKR) complétementée avec le mutant N1 de hDicer.

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'importance de la délétion de PKR en transfectant de l'ARNdb dans les différentes lignées et en observant la mortalité cellulaire 48 heures post traitement (Figure 26).

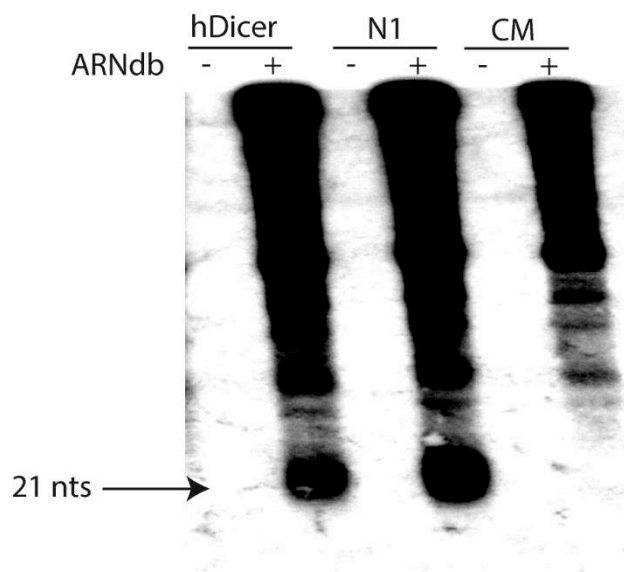


**Figure 26 – Survie à l’ARNdb des différentes lignées HEK293T.**

Les lignées sont transfectées avec 1 ug/mL d’ARNdb puis les cellules sont observées 48 heures post-transfection au microscope optique. 350 000 cellules – plaque 6 puits – grossissement 5X.

On observe que quel que soit la complémentation de Dicer dans les lignées, si la protéine PKR est exprimée dans les lignées, cela conduit à l’apoptose (panel HEK293T NoDice + ARNdb, Figure 26). Ces résultats confirment la contribution de PKR dans l’induction de la mort cellulaire induite par un ARNdb exogène et soulignent la nécessité d’un fond cellulaire dans lequel la réponse IFN est perturbée pour pouvoir s’affranchir de la mortalité cellulaire que cette réponse induit.

En parallèle, nous avons vérifié la capacité de production de siARN des différentes lignées en transfectant un ARNdb dans les cellules HEK293T NoDice $\Delta$ PKR transduites avec différentes formes de Dicer puis en réalisant une analyse par northern blot des petits ARN extraits de ces cellules à l’aide d’une sonde spécifique à la séquence de l’ARNdb utilisé (Figure 27).



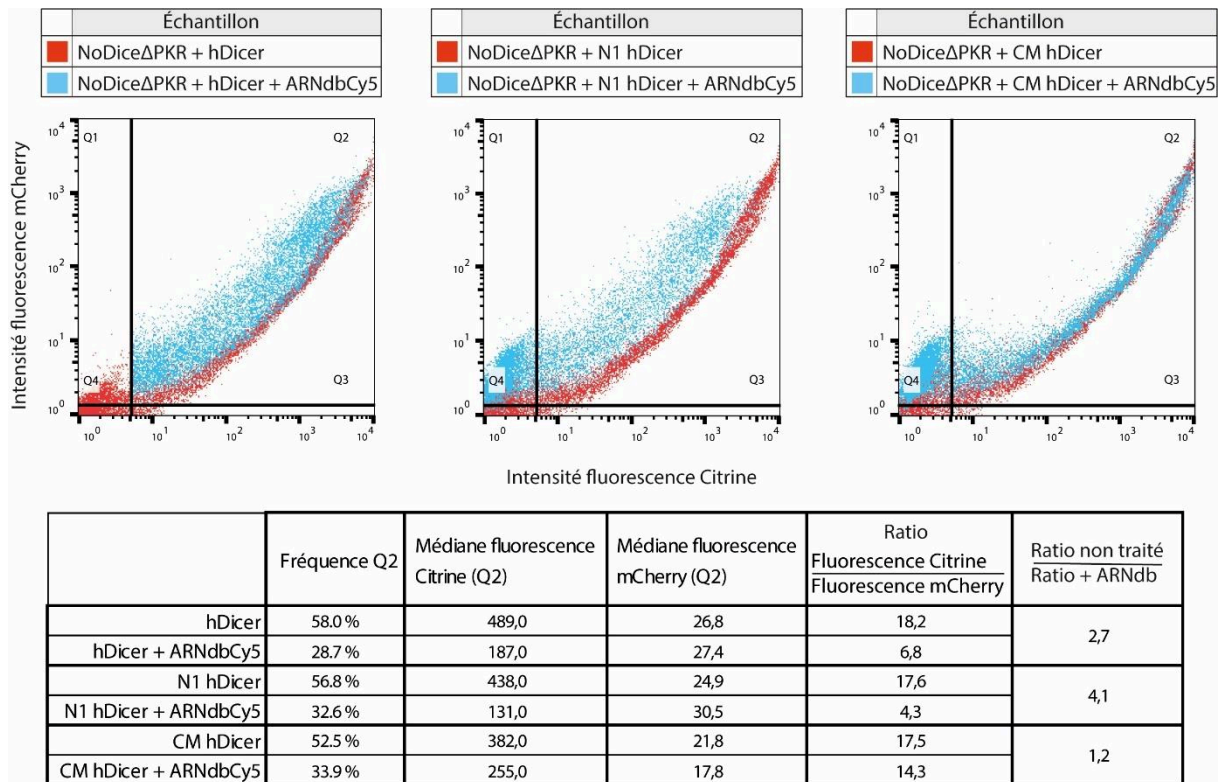
**Figure 27 – Production de siARN dans les lignées HEK293T NoDiceΔPKR complémentées.**

Les cellules sont transfectées avec 1 µg/mL d'ARNdb pendant 24 heures puis l'ARN total est extrait en utilisant du TRIzol. La sonde est dirigée contre la séquence de l'ARNdb. 300 000 cellules – plaque 6 puits.

Le northern blot sur les siARN produits dans les cellules HEK293T NoDiceΔPKR nous montre que les formes hDicer et N1 hDicer sont capables de produire des petits ARN de 22 nucléotides, contrairement à la

version catalytique mutante de hDicer. Ces petits ARN de 22 nucléotides sont probablement des siARN issus de la coupure de l'ARNdb par la protéine hDicer. On remarque aussi que la bande à 21 nucléotides semble être plus intense dans la piste N1 hDicer, ce qui peut être lié à un nombre plus abondant de siARN du fait de la processivité accrue de ce mutant.

Pour terminer, nous avons vérifié *in cellulo* l'efficacité du système rapporteur en co-transfectant les lignées HEK293T NoDiceΔPKR complémentées avec les différentes formes de Dicer avec pPGK en présence d'ARNdb dont la séquence est complémentaire à un fragment de l'ARNm de la Citrine. L'intensité de la fluorescence de la Citrine et de mCherry sont ensuite quantifiées par cytométrie en flux (Figure 27). L'ARNdb utilisé est marqué grâce à des cyanine5-CTP (Cy5-CTP) afin de pouvoir sélectionner les cellules qui ont reçues l'ARNdb.



**Figure 28 – Fonctionnalité du système pPGK.**

Les lignées HEK293T NoDiceΔPKR complémentées sont transfectées avec 1 µg/mL d'ARNdbCy5 dont la séquence est complémentaire à la séquence de la Citrine. 24 h post-transfection, les cellules sont transfectées avec 2 µg de plasmide pPGK. Les cellules sont ensuite analysées le lendemain par cytométrie en flux. 350 000 cellules – plaque 6 puits – au minimum 10 000 événements par conditions.

Nous remarquons une fluctuation de l'intensité de la fluorescence de la Citrine par rapport à l'intensité de la fluorescence de mCherry en fonction de la version de Dicer qui est exprimée dans les lignées HEK293T NoDiceΔPKR. En effet, lorsqu'on exprime N1 hDicer, on remarque une forte diminution de la fluorescence de la Citrine par rapport à mCherry d'une valeur de ratio de fluorescence médiane de 4,1. Lorsque Dicer est complétée par hDicer, ce ratio de fluorescence médiane est de 2,7. Ce ratio est de quasi 1 (1,2) lors de la complémentation par CM hDicer, indiquant ainsi que dans ce cas, il n'y a pas de diminution spécifique de la fluorescence de la Citrine par rapport à fluorescence de mCherry. Ces résultats montrent qu'il y a bien une diminution spécifique de la fluorescence de la Citrine par rapport à mCherry, et donc restauration de l'ARNi, lors de la transfection d'un ARNdb de la séquence de la Citrine uniquement lorsque la protéine hDicer est présente et fonctionnelle (Figure 28).

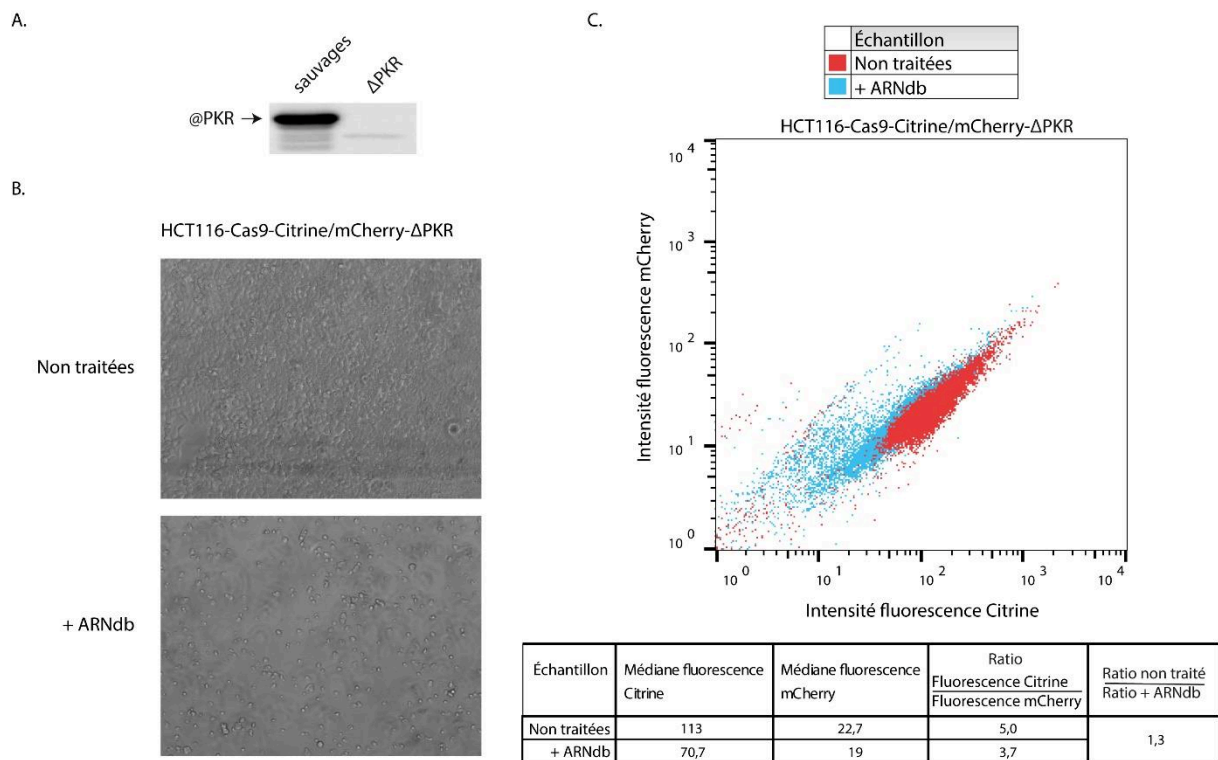
L'ensemble de ces résultats souligne la fonctionnalité du système rapporteur pPGK. La lignée HCT116-Cas9-Citrine/mCherry est une lignée monoclonale que nous avons produite (Figure 23), dans laquelle la transfection de siARN dirigés contre la Citrine ou mCherry est capable de diminuer l'expression des protéines respectives (Figure 24). La fluorescence de

mCherry et de la Citrine est affectée de manière aspécifique par l'ARNdb (Figure 25) à cause de l'activation de la protéine PKR. Afin de tester la fonctionnalité du système rapporteur, nous avons utilisé des cellules HEK293T NoDice $\Delta$ PKR dans lesquelles l'expression de PKR est abolie (Figure 26). La perte de l'expression de PKR permet aux cellules traitées avec l'ARNdb de ne plus rentrer en apoptose et nous permet ainsi de visualiser la restauration de l'ARNi lors de la complémentation de Dicer par hDicer ou Dicer N1 mais pas lors de la complémentation de Dicer par Dicer CM (Figure 27 et Figure 28). La restauration de l'ARNi est visualisée par la capacité des cellules à produire des siARN dirigés contre la protéine Citrine lors de la transfection d'un ARNdb de la séquence de la Citrine (Figure 27). De plus, la diminution spécifique de l'expression de la Citrine témoigne de la fonctionnalité de ces siARN (Figure 28).

Le système pPGK est un système prometteur pour réaliser un crible CRISPR-Cas9. Il est désormais nécessaire de mettre en place un contrôle positif tel que l'abolition de l'expression de PKR dans la lignée HCT116-Cas9-Citrine/mCherry. Cela permet de nous assurer qu'il y a une réponse identique à la lignée HEK293T NoDice $\Delta$ PKR complétementée par hDicer dans la lignée dans laquelle nous souhaitons réaliser notre crible. L'abolition de l'expression de PKR semble être suffisante pour permettre aux cellules HEK293T de survivre au traitement par l'ARNdb et ainsi nous permettre de visualiser l'ARNi.

#### b. La perte de l'expression de PKR ne restaure pas l'ARNi dans les HCT116

Les protéines MAVS (Maillard *et al.*, 2016), IFNAR1 (Maillard *et al.*, 2016), LGP2 (van der Veen *et al.*, 2018) et PKR (Kennedy *et al.*, 2015) ont été identifiées en tant que facteur de restriction de l'ARNi dans des cellules somatiques de mammifères. Afin d'obtenir un contrôle positif pour le crible ARNi, nous avons généré la lignée HCT116-Cas9-Citrine/mCherry- $\Delta$ PKR via transduction d'ARNg (Voir Matériels et Méthodes d, Figure 29.A). Si les cellules HCT116-Cas9-Citrine/mCherry- $\Delta$ PKR réagissent de la même façon que les cellules HEK293T NoDice $\Delta$ PKR complétementées avec hDicer, alors la transfection d'un long ARNdb dans ces cellules ne devrait plus induire la mort cellulaire (Figure 29.B).



**Figure 29 – Sensibilité des HCT116-Cas9-Citrine/mCherry- $\Delta$ PKR aux ARNdb.**

**A. Western blot.** Confirmation de l'absence de l'expression de PKR. **B. Microscopie optique.** Les cellules HCT116-Cas9-Citrine/mCherry- $\Delta$ PKR sont transfectées avec 1  $\mu$ g/mL d'ARNdb puis observées au microscope optique 24 heures après transfection. 80 000 cellules – plaque 24 puits – grossissement 10X. **C. Cytométrie en flux.** Les cellules sont transfectées avec 1  $\mu$ g/mL d'ARNdb puis récoltées après 24 afin d'être analysées par cytométrie en flux.

On constate ici que les lignées  $\Delta$ PKR ne résistent pas mieux à la transfection d'ARNdbCitrine que les cellules sauvages (Voir Figure 25.A), contrairement aux tests réalisés dans les lignées HEK293T (Figure 26). Nous nous sommes quand même demandé s'il était possible de voir des fluctuations de la fluorescence des protéines Citrine et mCherry lors de la transfection d'un ARNdb dans cette lignée KO PKR (Figure 29.C). On remarque que les lignées  $\Delta$ PKR réagissent de la même façon que les cellules sauvages. En effet, les cellules des deux lignées ont une fluorescence équivalente. Lors de la transfection d'ARNdbCitrine, on constate une diminution aspécifique de la fluorescence de la Citrine par rapport à mCherry (ratio de 1,3 lors de la transfection d'ARNdb).

Les résultats ci-dessus ne représentent qu'une partie des différents tests que nous avons menés pour trouver un contrôle positif de l'ARNi dans des cellules somatiques de mammifères. Cependant, à ce jour aucun de ces essais ne s'est révélé fructueux (siARN MAVS, siARN LGP2, siARN PKR).

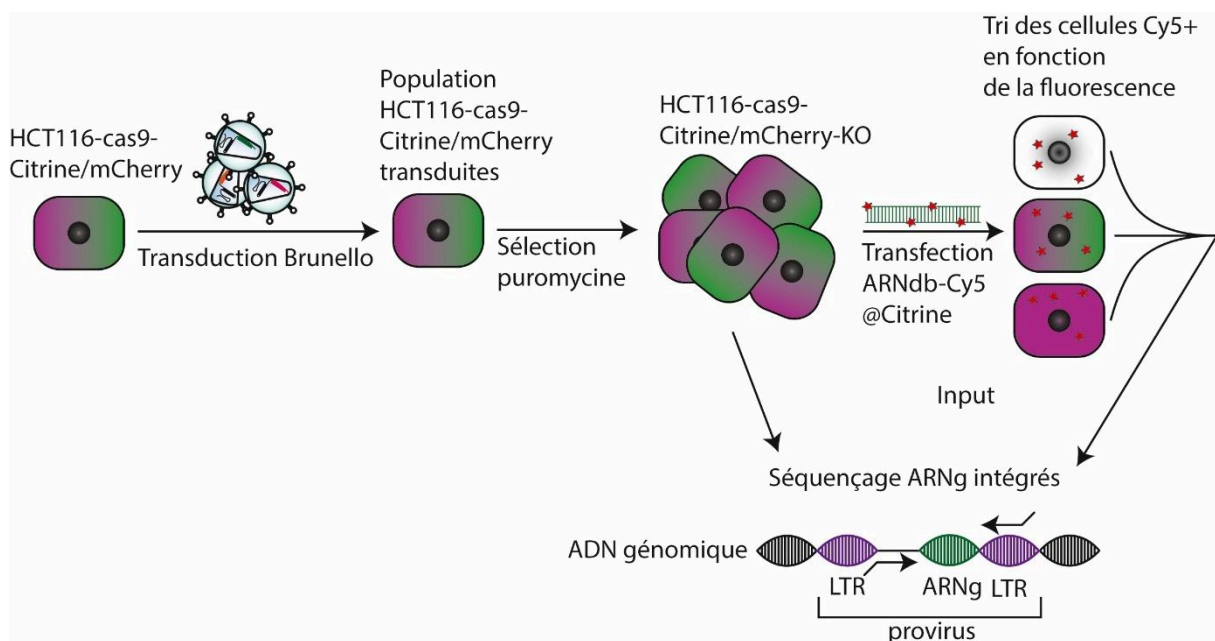
Il est légitime de se poser la question de savoir pourquoi les cellules HCT116 délétées de PKR restent sensibles à l'ARNdb et non les HEK293T. Ces dernières sont caractérisées comme étant



naturellement plus résistantes à la réponse IFN que d'autres. En effet, TLR3, facteur clé de la réponse IFN (Reynolds, 2006), n'est pas exprimé dans ces cellules (Bouteiller *et al.*, 2005). Nous pensons donc qu'il est possible que les phénotypes observés dans ces cellules HEK293T soient biaisés par rapport aux autres types cellulaires du fait d'une réponse IFN atténuée. Pour ces raisons, nous avons décidé de procéder tout de même à un crible ARNi dans les cellules HCT116. De plus, cela nous permettait d'être consistant par rapport au premier crible effectué et de pouvoir comparer les résultats obtenus.

### c. Crible CRISPR-Cas9 par perte de fonction pour identifier les facteurs de restriction de l'ARNi

La Figure 30 récapitule le crible interférence par ARN, celui-ci n'a été réalisé qu'une fois.

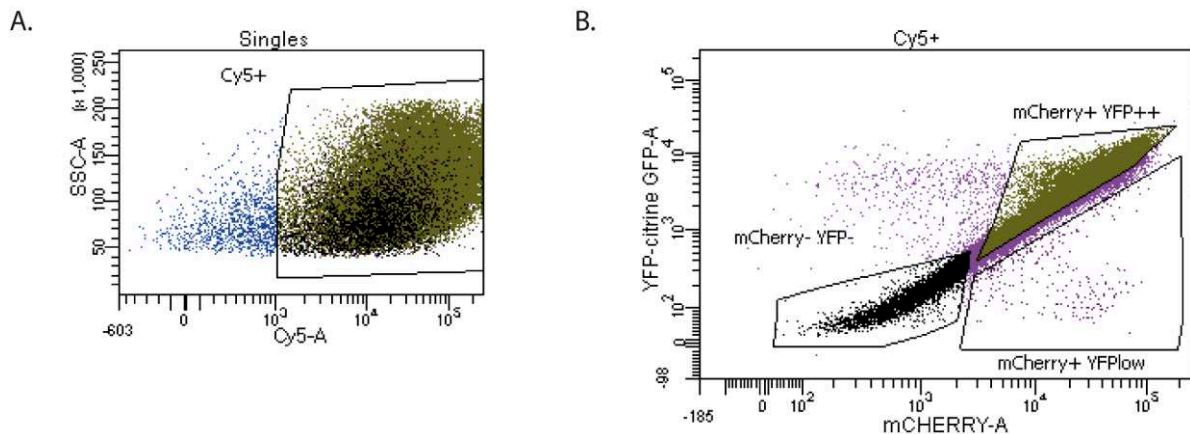


**Figure 30 – Crible CRISPR-Cas9 pour visualiser le rétablissement de l'interférence par ARN.**

Les cellules HCT116-Cas9-Citrine/mCherry sont transduites avec la banque lentivirale Brunello puis sont sélectionnées à l'aide de puromycine puis transfectées avec un ARNdb de la séquence de la Citrine marqué à la Cyanine5. Le lendemain, les cellules sont triées en fonction de leur profil de fluorescence puis l'ADN génomique est extrait et la séquence de l'ARNg proviral est séquencée.

La lignée HCT116-Cas9-Citrine/mCherry est transduite par la banque lentivirale Brunello à une MOI de 0.3 dans le but de ne pas avoir plus d'une intégration du vecteur lentiviral par cellules. Ces lentivirus intègrent la séquence de l'un des 77 441 ARNg de la banque dans la cellule (dont 1000 ARNg contrôle, qui ne ciblent aucun gène), ce qui va permettre la mise en place d'un KO dans la cellule. Le KO est réalisé pendant la sélection à la puromycine afin d'éliminer les cellules n'ayant pas été transduites. La population cellulaire

obtenue est transfectée avec un ARNdb-Cy5 dont la séquence correspond à 231 nucléotides de la séquence de l'ARNm de la Citrine. L'ARNdb-Cy5 permet la sélection des cellules transfectées dans le but de ne pas retomber sur les gènes impliqués dans l'entrée de l'acide nucléique comme lors du premier crible. De plus, sa complémentarité de séquence par rapport à l'ARNm de la Citrine permettra, s'il y a rétablissement de l'ARNi dans la cellule transfectée, de diminuer spécifiquement l'expression de la Citrine par rapport à mCherry. Vingt-quatre heures après transfection de l'ARNdb-Cy5, les cellules sont récoltées puis triées à l'aide d'un cytomètre de flux selon leur profil de fluorescence, d'abord en fonction de leur fluorescence Cy5 (Figure 31.A) puis en fonction de leur fluorescence Citrine/mCherry (Figure 31.B). L'ADN génomique des cellules triées ( $1 \times 10^6$  cellules Citrine<sup>+</sup>/mCherry<sup>+</sup>;  $1 \times 10^6$  Citrine<sup>-</sup>/mCherry<sup>+</sup>; 48 000 Citrine<sup>-</sup>/mCherry<sup>+</sup>) est extrait puis séquencé avant d'être analysé en utilisant le logiciel MAGeCK (Li *et al.*, 2014).



**Figure 31 – Instantané représentant l'étape du tri par cytométrie en flux des cellules du crible.**  
A. Dot plot représentant l'intensité de la fluorescence de la cyanine5 par rapport à la granulosité cellulaire. Les cellules « Cy5+ » sont ensuite analysées en fonction de l'intensité de la fluorescence de Citrine et mCherry. B. Dot plot représentant l'intensité de la fluorescence de la Citrine (ici nommées YFP) par rapport à l'intensité de la fluorescence de mCherry. Les sélections dessinées sur la figure représentent les cellules triées. L'instantané représente 100 000 cellules triées.

#### d. Analyse bio-informatique du crible

Après traitement des séquences avec Cutadapt pour obtenir les séquences des ARNg (Martin, 2011), celles-ci sont alignées sur les séquences de la banque Brunello en utilisant le logiciel MAGeCK puis le pourcentage de séquences alignées sur la banque Brunello est déterminé (Tableau 7).

**Tableau 7 – Alignement des séquences en utilisant MAGeCK.**

Echantillon	Séquences	Séquences alignées	Pourcentage d'alignement
input	38 189 982	26 995 295	71
Citrine+/ mCherry+	49 755 931	37 181 781	75
Citrine-/ mCherry+	57 138 368	37 182 560	65
Citrine-/ mCherry-	47 724 056	30 243 598	63

Avec au minimum 60% des séquences obtenues correspondants aux ARNg de Brunello, le recouvrement est assez satisfaisant pour réaliser la suite de l'analyse car tous les séquençages ont bien fonctionné. Ensuite, on regarde si la séquence des 77 441 ARNg de Brunello est identifiée dans chaque séquençage et nous allons compter le nombre d'ARNg qui n'ont pas été alignés une seule fois sur la banque Brunello. Dans un dernier temps le coefficient de Gini est déterminé. Le coefficient de Gini est une mesure statistique utilisée en économie pour mesurer les (in)égalités de distribution de salaire entre des individus d'une population (Kohler *et al.*, 2017; Nishi *et al.*, 2015). Dans notre cas le coefficient de Gini va permettre d'évaluer l'inégalité de distribution de séquences d'ARNg dans les différents échantillons. Plus le coefficient de Gini est élevé, plus la distribution est inégale.

**Tableau 8 – Dénombrement des ARNg et détermination de l'index Gini en utilisant MAGeCK.**

Echantillon	ARNg total	ARNg non comptés	Coefficient de Gini
input	77441	865	0,08
Citrine+/ mCherry+	77441	2950	0,31
Citrine-/ mCherry+	77441	2426	0,33
Citrine-/ mCherry-	77441	2545	0,33

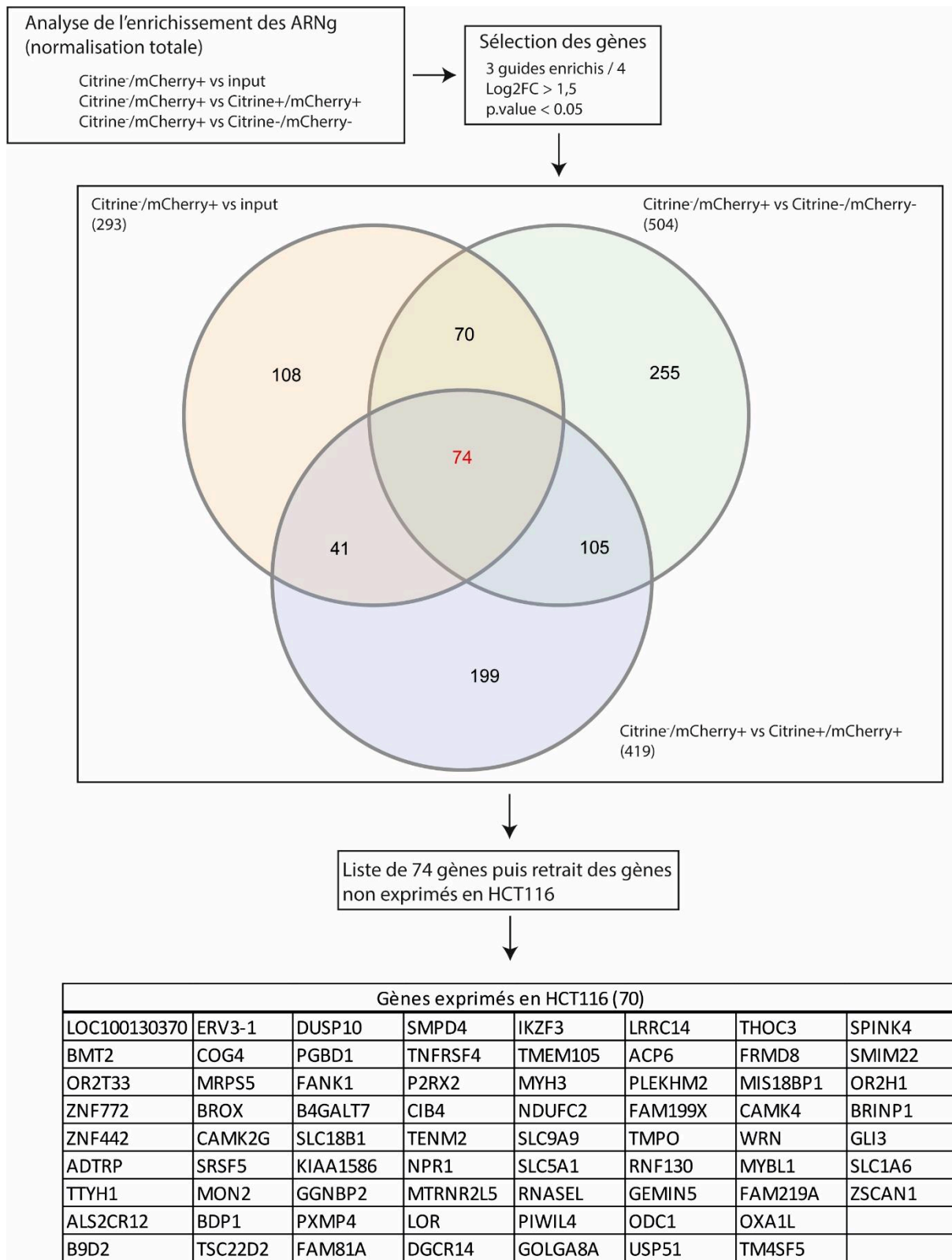
Une sélection telle que la nôtre doit amener une distribution inégale des ARNg, celle-ci est retranscrite par un coefficient de Gini élevé dans les conditions triées (Citrine<sup>(+/-)</sup>/mCherry<sup>(+/-)</sup>) par rapport à l'input. Cependant, il est intrigant de voir qu'il y a seulement 2426 ARNg non alignés dans la condition Citrine<sup>-</sup>/mCherry<sup>+</sup>. En effet, en cytométrie en flux nous avons triés 48 000 cellules de ce phénotype, donc nous escomptons un nombre d'ARNg non comptés bien plus élevé.

Nous cherchons ensuite à identifier les gènes enrichis dans les conditions triées par rapport à l'input de manière similaire au premier crible (Tableau 9). Pour cela nous regardons les gènes en fonction de leur taux de fausse découverte (*false discovery rate* – FDR). Le FDR est une méthode statistique utilisée afin de corriger les événements aléatoires qui apparaissent significatifs. Dans notre cas, le FDR est utilisé afin de corriger des gènes qui sont des faux positifs. Plus le FDR est bas, plus les protéines les plus enrichies ont des chances de l'être réellement.

**Tableau 9 – Taux de fausse découverte de gènes enrichis dans les échantillons triés.**

Comparaison	Gènes	Sélection	FDR 1%	FDR 5%	FDR 25%
mCherry <sup>+</sup> /Citrine <sup>+</sup> VS input	20107	Positive	0	0	0
mCherry <sup>+</sup> /Citrine <sup>-</sup> VS input	20106	Positive	0	1	2
mCherry <sup>-</sup> /Citrine <sup>-</sup> VS input	20106	Positive	0	0	2

Dans notre situation, le FDR est élevé car il aurait fallu tout d'abord réaliser le crible en triplicata. Cependant, afin d'obtenir une liste de gènes sur laquelle travailler, nous ne nous sommes pas basés sur le FDR mais en réalisant le protocole suivant (Figure 32) dont les détails sont dans la légende.



**Figure 32 – Protocole d'identification des gènes impliqués dans le rétablissement de l'ARNi.**

Afin d'obtenir du matériel à analyser, j'ai analysé l'enrichissement des ARNg par normalisation médiane et totale en parallèle des banques Citrine-/mCherry+ par rapport aux banques input / Citrine+/mCherry+ et Citrine-/mCherry-. Pour chaque analyse, j'ai sélectionné les gènes dans lesquels 3 ARNg/4 étaient enrichis, le Log2FC supérieure à 1,5 et dont la p.value était inférieure à 0,05. Ensuite, j'ai comparé les gènes enrichis (voir le diagramme de Venn) et j'ai sélectionné uniquement les gènes qui étaient enrichis dans la condition Citrine-/mCherry+ par rapport à toutes les autres conditions. Ainsi, j'ai pu obtenir une liste de 74 gènes dans laquelle, j'ai retiré les gènes

qui n'étaient pas exprimés en HCT116 d'après nos données de séquençage par ARN disponibles au laboratoire afin d'obtenir une liste de 70 gènes.

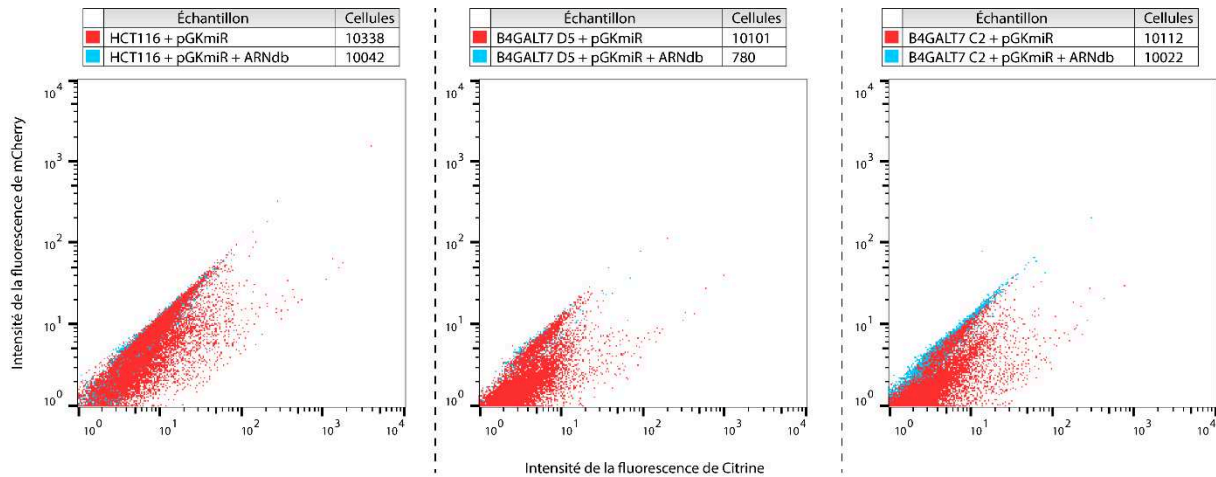
Il faut aussi noter que parmi les 70 gènes identifiés, COG4 et B4GALT7, qui sont des gènes que nous avons déjà identifiés lors de l'identification des facteurs impliqués dans la survie cellulaire lors de la transfection d'un ARNdb/infection par SINV ont été retrouvés. L'analyse de l'ontologie génique des gènes du tableau de la Figure 32 n'a pas permis d'identifier de caractéristique partagée. Cependant, en analysant les gènes un à un, nous avons identifiés plusieurs gènes potentiellement intéressants tel que les ribonucléases RNaseL et PIWIL4.

#### e. Validations des gènes du crible

Après avoir réalisé l'identification une première identification des gènes potentiellement intéressants (Figure 32), nous avons réalisé des tests préliminaires dans le but de voir si certains de ces gènes pouvaient être liés à la restriction de l'interférence par ARN. Pour cela, nous avons réalisé le test de transfection de l'ARNdbCitrine en présence du système pPGK. Dans un premier temps, nous avons testé les gènes B4GALT7 et COG4 car nous avons à disposition au laboratoire des clones KO de ces gènes mis en place lors de l'analyse des résultats du premier crible.

##### i. B4GALT7

Nos expériences précédentes nous ont révélées que la transfection d'ARNdb ne fonctionne pas dans les lignées HCT116-Cas9- $\Delta$ B4GALT7 (Petitjean *et al.*, 2020). Pour visualiser le potentiel rétablissement de l'ARNi dans ces lignées, nous avons donc décidé de co-nucléofecter un ARNdb et le plasmide pPGK pour pouvoir analyser le profil de fluorescence de la Citrine et de mCherry en cytométrie en flux.



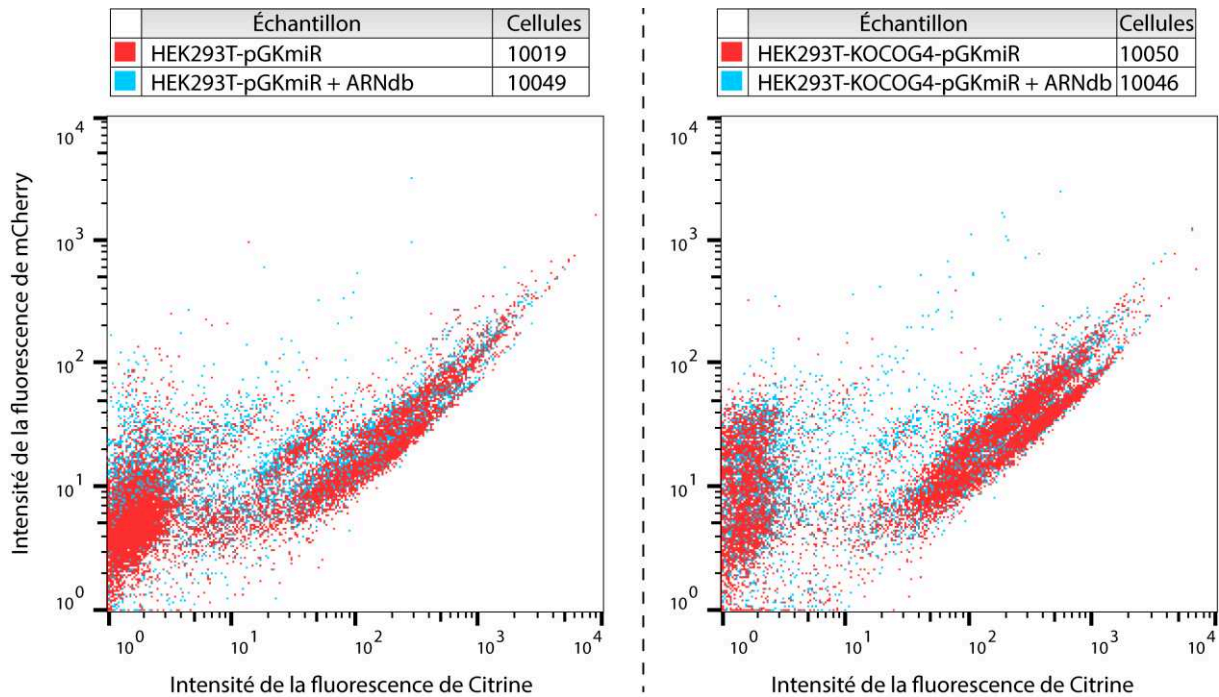
**Figure 33 – B4GALT7 et interférence par ARN.**

Les lignées HCT116-Cas9 et HCT116-Cas9 $\Delta$ B4GALT7#1 et #2 sont nucléofectées avec 200 ng d'ARNdb, puis avec 400 ng de pPGK 24 après. Les lignées sont analysées en cytométrie en flux le lendemain.

L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois mais nous pouvons remarquer qu'il n'y a aucune différence au niveau de l'intensité de l'expression de la fluorescence de la Citrine par rapport à l'intensité de la fluorescence de mCherry. De plus, la nucléofection de l'ARNdb est très toxique dans chaque condition, c'est pour cela que nous n'avons pu récupérer qu'approximativement 800 cellules pour la lignée HCT116-Cas9 $\Delta$ B4GALT7#2. Le gène B4GALT7 est possiblement un faux positif pour le rétablissement de l'ARNi mais qui nécessite plus de manipulations avant de tirer une conclusion.

#### ii. COG4

Après avoir intégré le plasmide PGK dans les lignées HEK293T et HEK293T KO COG4 (décrites dans le manuscrit présenté en partie 1 des résultats), de l'ARNdbCitrine est transfecté dans ces lignées et la fluorescence de la Citrine et de mCherry est observée en cytométrie en flux (Figure 34).



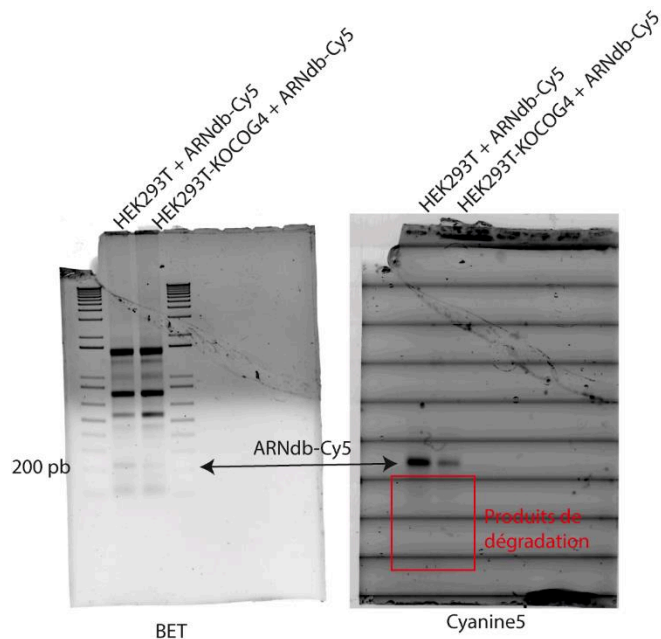
**Figure 34 – COG4 et interférence par ARN.**

Les lignées HEK293T-PGK et HEK293T-KO COG4-PGK sont transfectées avec 1  $\mu\text{g/mL}$  d'ARNdb puis analysée en cytométrie en flux 48 heures post-transfection. 80 000 cellules – plaque 24 puits – au minimum 10 000 évènements par conditions.

La transfection d'ARNdb dans les lignées HEK293T-PGK et HEK293T-KO COG4-PGK ne nous permet pas de distinguer de diminution spécifique de l'expression de la Citrine par rapport à mCherry. Nous pouvons aussi souligner que l'on n'observe pas de diminution aspécifique de l'intensité de la fluorescence de Citrine et de mCherry, quelque soit la lignée.

Nos expériences précédentes ont révélé qu'il n'était pas aussi aisé de transfecter des cellules KO COG4 que des cellules sauvages (Petitjean *et al.*, 2020). Pour nous assurer que l'ARNdb soit bien présent et intègre dans ces cellules, nous avons transfecté un ARNdb-Cyanine5 dans les cellules HEK293T et HEK293T KOCOG4, puis extrait l'ARN total des cellules avant l'analyser par électrophorèse (Figure 35).





**Figure 35 – ARN total de HEK293T ± KO COG4 transfectées avec de l'ARNdb Cy5.**

Les cellules sont transfectées avec 1 µg/mL d'ARNdb-Cy5 puis l'ARN total est extrait 24 heures post transfection et analysé par électrophorèse suivi d'un marquage au bromure d'éthidium (BET) ou d'un scan Cy5 (ETAN).

Cette expérience nous montre que l'ARNdb-Cy5 est bien transfecté dans les cellules, bien que dans une moindre mesure que dans les lignées parentales comme nous l'avons déjà démontré précédemment (Petitjean *et al.*, 2020). Cependant, nous sommes incapables d'observer la formation de produits de

dégradation de l'ARNdb-Cy5 (Figure 35). Or, si l'ARNi était rétabli dans cette lignée, la RNase Dicer devrait couper l'ARNdb en fragments de 21 à 23 nucléotides.

Les différentes expériences sur les lignées KO COG4 semblent donc indiquer que ce gène est aussi un faux positif.

# Discussion et perspectives

Lors de ma thèse, j'ai cherché à identifier des facteurs impliqués dans la survie cellulaire en réponse aux ARNdb mais aussi des facteurs impliqués dans la potentielle incompatibilité entre réponse IFN et ARNi. Afin de répondre à ces questions biologiques, j'ai mis en place deux approches distinctes basées sur des cribles CRISPR-Cas9 sous forme de population. Hormis les avantages expérimentaux (faible prix, pas de matériel spécifique, approche « simple ») ces cribles sont les plus adaptés aux expériences de viabilité cellulaire, facteur central de notre approche. Par ailleurs, l'outil CRISPR-Cas9 est idéal pour l'identification des facteurs de restriction de l'ARNi car il serait contre-intuitif de mobiliser le mécanisme de l'ARNi dans notre cas. En effet, cela consisterait à utiliser un mécanisme qui pourrait être lui-même impliqué dans la réponse aux ARNdb. De plus, l'utilisation de Cas9 permet de réaliser une perte de fonction définitive des gènes.

Les différents cribles ont tous été réalisés en utilisant la banque Brunello (Doench *et al.*, 2016) qui cible seulement les ARN codants et qui possède 4 sgARN par gène ciblé. Si ces manipulations devaient être réalisées aujourd'hui, il serait intéressant d'utiliser une banque qui contient plus de sgARN/gène pour diminuer les effets hors-cible potentiels et en utilisant une banque qui cible aussi les ARN non codants telle que le banque GeCKo V2 possédant 6 sgARN/gène et cible aussi les miARN (4 sgARN/miARN) (Sanjana *et al.*, 2014). Cependant la banque Brunello reste une banque dont le design optimisé des sgARN permet l'identification efficace de gènes (Doench *et al.*, 2016).

## 1. Identification des facteurs impliqués dans la survie cellulaire en réponse aux ARNdb (synthétiques ou viraux)

Afin d'identifier les gènes impliqués dans la survie cellulaire en réponse aux ARNdb, j'ai mis en place une approche dans laquelle les cellules traitées avec la banque Brunello sont transfectées avec un ARNdb synthétique ou infectées avec le virus de Sindbis, puis j'ai analysé les sgARN intégrés dans les cellules survivantes. Ces cribles m'ont permis d'identifier 8 gènes enrichis de façon significative par rapport à l'échantillon contrôle. En comparant aux autres cribles basés sur la survie cellulaire lors de différents traitements qui identifient de l'ordre de la dizaine jusqu'à la centaine de gènes (Kulsuptrakul *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2016), on remarque que notre nombre de gènes enrichis n'est pas aberrant, même si relativement bas.

Parmi les 8 gènes que nous avons identifiés, 7 appartiennent à deux voies de signalisation, la voie des héparanes sulfates (SLC35B2, B4GALT7, EXT1, EXT2) et le complexe COG (COG3, COG4, COG8) qui est impliqué dans le trafic vésiculaire rétrograde.

L'analyse de la voie des héparanes sulfates permet de confirmer des résultats obtenus par d'autres équipes. En effet, il est connu que les cribles basés sur la survie sont biaisés et enrichissent majoritairement des gènes qui sont impliqués dans les premières étapes de l'entrée du virus. Les héparanes sulfates sont déjà connus pour être un facteur important pour l'entrée de SINV à cause de son adaptation à la culture cellulaire (Klimstra *et al.*, 1998). Afin de s'affranchir de la sélection des gènes impliqués dans les premières étapes du cycle viral, nous aurions pu utiliser un virus exprimant une protéine fluorescente telle que SINV-GFP afin de sélectionner les cellules dans lesquelles le virus peut réaliser ses premières étapes.

En parallèle, nous avons identifié des biais identiques pour l'entrée de notre ARNdb au sein de la cellule. En effet, les HS extracellulaires sont impliqués dans la survie aux ARNdb car leur absence diminue la transfectabilité cellulaire du fait de la perte de l'interaction entre les polyplexes utilisés pour la transfection et les glycosaminoglycanes (Mislick & Baldeschwieler, 1996; Payne *et al.*, 2007). Afin d'identifier des facteurs impactant la survie à une étape subséquente de l'entrée de l'ARNdb, nous aurions pu utiliser un système dans lequel l'ARNdb est produit par la cellule.

En parallèle de la voie des héparanes sulfates, nous avons identifié des protéines appartenant au complexe COG en tant que facteur de résistance à l'ARNdb et à l'infection par SINV. L'analyse de cellules mutantes pour COG4 a révélé une réduction des héparanes sulfates extracellulaire en plus des défauts de glycosylation qui lui était déjà associé (Reynders *et al.*, 2009) ou à d'autres protéines COG (Jae *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2017). Cependant, nous avons remarqué que si la transfection d'un plasmide codant la GFP est toujours efficace dans ce fond cellulaire, la transfection d'ARNdb y est fortement diminuée, soulevant ainsi des interrogations sur une possible différence de voies de transfection en fonction de la nature des acides nucléiques. En outre, nous avons observé que les ARNdb qui pénètrent dans les cellules induisent toujours la réponse IFN mais que cette celle-ci ne semble pas conduire à l'induction de la mort cellulaire. Il serait intéressant de caractériser cette résistance, par exemple, est-ce que les cellules mutantes pour COG4 sont sensibles au traitement par des drogues pro-apoptotiques ?

Nous avons aussi pu souligner une résistance accrue des cellules mutantes pour COG4 à l'infection par SINV dans lesquelles l'infection virale semble être retardée. Il serait intéressant

de caractériser si les phénotypes associés à la perte de COG4 sont uniquement liés à des défauts de glycosylation (modification des héparanes sulfates entre autres). Ou, est-ce que les défauts de trafics vésiculaires au niveau de l'appareil de Golgi conduisent à des localisations/modifications erronées de protéines impliquées dans la maturation de protéines elles-mêmes comprises dans la réponse aux ARNdb/virus. Vis-à-vis de SINV, la mutation de COG4 pourrait avoir des répercussions sur les protéines cellulaires impliquées dans le cycle viral et/ou la modification des protéines virales directement.

Nous pouvons aussi souligner les limites directement associées à notre approche. En effet, l'observation des effets cytopathiques dès 24 heures après transfection d'une gamme d'ARNdb (Figure 14) m'a permis de définir la concentration idéale de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour induire la mort cellulaire. On remarque néanmoins que la concentration de 500  $\text{ng}/\text{mL}$  aurait été suffisante pour induire cette mort, mais j'ai pu constater lors mes différentes manipulations que si la qualité de la transfection n'est pas optimale, il subsiste parfois des îlots cellulaires résistants avec cette concentration. Cependant, au vu des résultats du crible, il est possible que la toxicité de mon traitement ait été trop élevée. Ainsi, la réduction du temps de traitement et/ou la diminution de la concentration finale d'ARNdb sont des options envisageables pour des prochaines approches afin de ne pas passer à côté de gènes permettant une survie légèrement accrue. D'autre part, il est possible que la mise en place de la réponse IFN dans des cellules lors de la transfection de l'ARNdb génère une mort cellulaire des cellules avoisinantes par stimulation paracrine et nous fasse ainsi perdre de l'information sur les gènes qui pourraient être impliqués dans la réponse à l'ARNdb (ces biais sont moins observables avec SINV car le virus bloque partiellement l'induction de la réponse IFN). Il serait par ailleurs intéressant de voir si la stimulation par l'interféron des cellules mutées dans les gènes identifiés dans notre crible n'est pas inhibée voir abolie. Cette hypothèse permettrait ainsi d'éclaircir le phénotype de survie de ces cellules ; est-ce qu'elles ne reçoivent plus l'ARNdb ? Est-ce que leur réponse IFN ne peut plus être induite de façon paracrine ? Il est déjà connu que les GAG ont un impact sur la stimulation des cellules par l'IFN- $\gamma$  (Collins & Troeberg, 2019; Yard *et al.*, 1998). À l'inverse, il a été observé que pour les macrophages, la perte des HS entraîne une sensibilité accrue à l'IFN- $\beta$  (Gordts *et al.*, 2014), ce qui indiquerait une interdépendance type cellulaire-spécifique. Pour s'affranchir de l'activation de la réponse IFN de manière paracrine, il aurait été possible de mettre en place un crible dans lequel le milieu de culture est régulièrement voire constamment renouvelé après transfection de l'ARNdb afin d'empêcher la stimulation des cellules par l'IFN extracellulaire, ou bien de réaliser cette même approche dans des cellules

dont l'expression de IFNAR est abolie ou dans lesquelles le récepteur est saturé par un anticorps.

Récemment, une prépublication semble avoir mis en évidence qu'il est possible de retrouver des glycosylations sur les ARN (Flynn *et al.*, 2019) en plus des glycosylations ponctuelles déjà identifiées sur certains ARN de transfert (Kasai *et al.*, 1975; Okada *et al.*, 1977). Ces modifications proviennent de protéines situées dans le réticulum endoplasmique rugueux /appareil de Golgi et semblent être principalement réalisées sur les guanosines des Y-ARN. Toutefois, l'utilité biologique de cette modification est à ce jour inconnue. Cependant, cette recherche ouvre tout un nouveau pan d'étude concernant la glycosylation et les ARN, ce qui pourrait être intéressant à étudier dans les cellules mutantes pour COG4.

## 2. Identification des facteurs impliqués dans l'(in)compatibilité entre l'ARNi et la réponse IFN

L'approche à mettre en place pour identifier des facteurs impliqués dans la restauration d'un mécanisme dont le phénotype n'est pas directement observable est fondamentalement plus complexe. Ainsi, afin d'identifier les facteurs impliqués dans une potentielle incompatibilité entre ARNi et réponse IFN, j'ai souhaité mettre en place un crible CRISPR-Cas9 qui n'est plus basé sur la survie mais sur l'utilisation d'un système qui permettra de suivre la restauration de l'ARNi dans les cellules. Les systèmes rapporteurs que j'ai souhaité mettre en place se basent sur la fluorescence (Figure 18 & Figure 22). La fluorescence est un phénotype simple à acquérir et les cellules fluorescentes peuvent être triées par cytométrie en flux.

Le premier système rapporteur que j'ai mis en place est un système dans lequel la fluorescence doit être induite lors de la restauration de l'interférence par ARN (Figure 18). Ce système se base sur l'utilisation du système split-GFP et de la protéase TEV (Figure 19). Nous avons rencontré de nombreuses difficultés à mettre en place ce système. Tout d'abord, nous avons utilisé 2 à 3 plasmides lors de nos expériences et la balance toxicité/efficacité de transfection était un défi dans les cellules HCT116 (Figure 20). C'est pour cela que les expériences préliminaires pour la mise en place du système TEV ont majoritairement été réalisées dans des cellules HEK293T (Figure 21). Le système présenté dans les résultats n'est pas le seul système que j'ai mis en place, cependant j'ai à chaque fois rencontré les mêmes difficultés, à savoir une perte partielle mais non totale du signal en présence de la protéine TEV. Cependant, le manque d'anticorps dirigé contre TEV ne nous a pas permis de vérifier son niveau d'expression. La perte partielle de l'expression de la GFP en présence de la protéine TEV peut s'expliquer par les jeux d'adressage que l'on a réalisé. Dans le système contenant les MTS, il est possible que

même si la coupure a eu lieu, les feuillets GFP<sub>1-10</sub> et GFP<sub>11x3</sub> peuvent s'assembler en amont de la translocation mitochondriale et transloquer en tant que complexe, expliquant ainsi la fluorescence résiduelle en présence de TEV (Figure 21). Une amélioration simple du système aurait été de rendre la protéase fluorescente afin de sélectionner dans un premier temps les cellules dans lesquelles la protéase est exprimée. De plus, cela aurait permis de suivre la diminution de l'expression de la protéase par fluorescence, mais aussi l'apparition de la fluorescence due à l'ARNi en parallèle. Ainsi, en suivant le ratio gain de la fluorescence de la GFP/perte de la fluorescence du fluorochrome lié à la protéase, nous aurions pu suivre par FACS les cellules ayant spécifiquement les deux phénotypes. Cela nous aurait permis de voir les cellules dans lesquelles l'ARNi est restauré, en excluant des faux positifs liés à une augmentation de la fluorescence du système rapporteur ARNi indépendamment de la restauration de ce dernier

Le système PGK est plus simple et se base sur la modulation de l'expression d'une protéine fluorescente ciblée par l'ARNi (Citrine) par rapport à une protéine fluorescence qui n'est pas ciblée (mCherry). Ce système rapporteur est constitué d'un plasmide rapporteur dans lequel l'expression de Citrine et mCherry sont influencées par le promoteur bidirectionnel PGK. Les protéines Citrine et mCherry sont toutes les deux exprimées dans notre lignée HCT116-Cas9, leur fluorescence peut être suivie par microscopie et par cytométrie en flux (Figure 23). De plus, les protéines sont sensibles au mécanisme de l'ARNi lors de la transfection de siARN (Figure 24). La sélection d'une lignée monoclonale a été nécessaire afin de s'affranchir de la fluorescence très hétérogène dans la lignée polyclonale. Dans ce système, les protéines Citrine et mCherry sont toutes les deux fusionnées à la séquence codant la protéine H2B afin de réaliser une localisation nucléaire et diminuer le bruit de fond (Sladitschek & Neveu, 2016). Cependant, cette localisation nucléaire n'est peut-être pas idéale car nous ne connaissons pas la durée de renouvellement de ces protéines fluorescentes dans notre contexte. En effet, dans notre cas, l'induction de la mort cellulaire par PKR lors du traitement à l'ARNdb (Figure 25) est une limitation majeure à la visualisation de l'ARNi. Or, même si nous avons pu constater de l'ARNi avec notre système rapporteur dans un fond cellulaire n'exprimant pas PKR (Figure 28), il est possible qu'en présence de PKR, la présence de H2B ne permette pas d'obtenir une fenêtre temporelle de visualisation de l'ARNi. Une stabilité trop grande des protéines fluorescentes couplée à l'induction de la mort cellulaire après plusieurs heures peut être un frein à l'efficacité du système rapporteur. Lors de mes expérimentations, j'ai essayé de mettre en place un système PGK sans la séquence H2B mais sans succès.

Nos expériences sur les lignées HEK293T NoDice $\Delta$ PKR ont permis de valider l'importance intrinsèque de Dicer sur l'efficacité de l'ARNi antiviral. En effet, on observe une différence de diminution de la fluorescence accrue de la Citrine par rapport à mCherry lors de la transfection d'un ARNdb complémentaire à la séquence de la Citrine dans les fonds cellulaires sur-exprimant N1 hDicer (Figure 28). L'isoforme N1 semble être plus efficace que hDicer dans la diminution spécifique de l'expression de la Citrine par rapport à mCherry, cela pouvant être due à une production accrue de siARN (Kennedy *et al.*, 2015) (Figure 27 et Figure 28). Il est aussi possible que cela soit dû à l'interaction du domaine hélicase (déléte dans l'isoforme N1) de hDicer avec des protéines inhibitrices de son activité.

Dans un dernier temps, PKR pourrait être liée plus étroitement à la voie de l'ARNi. Tout d'abord, Dicer et PKR interagissent toutes les deux avec de l'ARNdb et il se pourrait que PKR empêche l'interaction de Dicer avec l'ARNdb en générant un encombrement stérique. D'autre part, il a été démontré au laboratoire que PKR interagit directement avec le domaine hélicase de Dicer en contexte infectieux (Montavon *et al.*, 2020). Le domaine hélicase de Dicer était déjà caractérisé comme interagissant avec les protéines TRBP et PACT qui interagissent elles-aussi avec PKR (Daniels *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2006). Ces résultats nous permettent de penser qu'il serait possible qu'il existe des facteurs de restriction de l'ARNi inconnus qui interagissent directement avec Dicer via son domaine hélicase, ce qui expliquerait ainsi la fonctionnalité accrue de N1 hDicer.

Ces résultats nous ont confortés dans l'intérêt de mettre en place un second crible sur les facteurs de restriction de l'ARNi, pour lequel nous avons dû au préalable identifier un contrôle positif du rétablissement de l'ARNi dans les cellules HCT116. Malheureusement, je n'ai pas été en mesure d'identifier un gène dont la perte de l'expression permette la restauration de l'ARNi. Les protéines MAVS (Maillard *et al.*, 2016), IFNAR1 (Maillard *et al.*, 2016), LGP2 (van der Veen *et al.*, 2018) et PKR (Kennedy *et al.*, 2015) ont été identifiées en tant que facteur de restriction de l'ARNi dans des cellules somatiques de mammifères. Cependant, la mise en place d'une lignée HCT116 $\Delta$ PKR n'a pas engendré de restauration de l'ARNi visible par cytométrie en flux comme nous l'avons réalisé avec les lignées HEK293T NoDice $\Delta$ PKR + hDicer/N1 hDicer (Figure 28 et Figure 29). De même, la transfection de siARN dirigés contre MAVS, LGP2 et PKR n'a pas été concluante. La mise en place de KO MAVS et LGP2 dans des lignées HCT116 aurait été intéressante car il est possible que nous n'ayons pas observé de phénotype dans ces cellules du fait d'une inactivation partielle par les siARN. En parallèle, j'ai débuté la mise en place de lignées HCT116 KO IFNAR1 et TBK1. Ce dernier est un autre

candidat intéressant de par son intervention dans la réponse IFN après la reconnaissance des acides nucléiques (Miyahira *et al.*, 2009; Perry *et al.*, 2004; Pourcelot *et al.*, 2016). IFNAR1 a pour sa part déjà été identifié comme facteur de restriction de l'ARNi (Maillard *et al.*, 2016).

Les différences de réponse en fonction du type cellulaire sont intrigantes et il est possible que l'ARNi antiviral soit modulé de manière différentielle en fonction du type cellulaire. Par exemple, l'ARNi est fonctionnel dans les cellules non différenciées (Pare & Sullivan, 2014) dans lesquelles l'IFN n'est pas une réponse antivirale déclenchée, même si plusieurs protéines de la réponse IFN sont déjà exprimées en amont de toute stimulation (Wu *et al.*, 2017). L'ARNi semble fonctionner sous certaines conditions dans la lignée HEK293T qui a une réponse IFN inhibée à cause de l'absence de l'expression de TLR3. Peut-être que TLR3 a un rôle plus important que celui de récepteur impliqué dans l'IFN et serait impliqué dans les interactions IFN/ARNi. Il serait intéressant d'étudier plus en détails cette hypothèse en réalisant une expérience de surexpression de TLR3 dans les lignées HEK293T NoDice $\Delta$ PKR + hDicer/N1 hDicer afin de voir si la réponse ARNi est modulée, ou encore d'effectuer un KO de TLR3 dans la lignée HCT116 $\Delta$ PKR. Dans un dernier temps, il est possible que la redondance des gènes antiviraux soit une limite de visualisation des phénotypes que l'on souhaite observer, il est possible que cette redondance implique la mise en place de KO multiples au sein d'une même cellule afin de visualiser des phénotypes liés aux voies antivirales.

Il est nécessaire de rappeler que ce second crible n'a été réalisé qu'une fois et que les données issues de ce crible sont donc difficilement interprétables. L'analyse bio-informatique en utilisant le logiciel MAGeCK étant insuffisante pour l'identification préliminaire de gènes, nous avons généré un protocole afin d'identifier des potentiels gènes impliqués dans l'ARNi (Figure 32). Les premiers tests réalisés sur certains gènes obtenus de cette manière (B4GALT7, COG4), mais aussi des tests préliminaires de diminution de l'expression de PIWIL4 et RNaseL en transfectant des siARN ne sont pas concluants mais nécessitent de plus amples expérimentations avant d'en tirer une conclusion définitive. Il serait d'ailleurs intéressant de réaliser un « mini-crible » CRISPR-Cas9 en utilisant une banque de sgARN constituée des 70 gènes identifiés lors de ma seconde approche (Figure 32) afin de réaliser une étape de validation supplémentaire en amont de la validation gène par gène.

Plusieurs équipes ont pu visualiser de l'ARNi dans différentes lignées cellulaires. A ce jour, nous sommes la seule équipe à s'être intéressée au potentiel ARNi dans des cellules épithéliales HCT116. Il serait très intéressant de renouveler cette approche en utilisant d'autres lignées cellulaires (cellules épithéliales, cellules immunitaires, cellules embryonnaires) en



parallèle. En effet, étant donné que l'ARNi a pu être observée dans des cellules HEK293T et dans des macrophages, réaliser le crible d'identification de facteurs de restriction dans différentes lignées pourrait permettre de mettre en exergue différents facteurs impliqués dans sa potentielle restriction. En outre, il serait possible de tirer profit des caractéristiques des cellules souches embryonnaires. En effet, l'ARNi est fonctionnelle dans ces cellules non différenciées chez la souris (Li *et al.*, 2013; Maillard *et al.*, 2013). Il serait alors possible de générer une approche dans laquelle un crible serait réalisé en amont mais aussi en aval de la différenciation de ces cellules.

De plus, nous pouvons ajouter que nous nous sommes focalisés sur la réponse interféron de type I dans ce manuscrit. Or, les cellules HCT116 sont des cellules épithéliales dans lesquelles la réponse IFN-III est dominante (Bou-Hanna *et al.*, 2018). Il serait intéressant de mieux caractériser l'implication de la réponse IFN-III vis-à-vis des acides nucléiques afin de s'assurer que l'interaction IFN-III/ARNi n'a pas des particularités que la réponse IFN-I/ARNi ne possède pas (Schoggins, 2019; Zhou *et al.*, 2018).

Mes travaux dans le laboratoire du Dr. Sébastien Pfeffer sont précurseurs dans le domaine de l'étude de l'ARN double brin dans des thématiques de cribles à haut débit et soulignent les limites d'une telle approche lors d'un crible basé sur la survie cellulaire. Pour de prochaines études basées sur les ARNdb, il serait nécessaire d'utiliser un modèle cellulaire qui est moins sensible à l'ARNdb (dans lequel l'ARNdb n'induit pas l'apoptose), ou changer la manière d'adressage de l'ARNdb afin obtenir plus d'informations.

De plus, j'ai identifié de nouvelles fonctions du gène COG4 : (1) le lien entre COG4 et la production des héparanes sulfates qui n'avait été identifié que pour d'autres gènes COG ; (2) l'importance de COG4 dans l'infection par SINV dans laquelle il faudrait encore confirmer si l'effet est directement lié aux défauts d'HS ou si cela implique d'autres fonctionnalités encore inconnues ; (3) les cellules mutantes dans COG4 ont une efficacité de transfection qui diffère en fonction de la nature de l'acide nucléique ; et (4) montrent une diminution de la mort cellulaire induite par l'ARNdb..

Nous pouvons souligner à quel point la compréhension et l'adaptation du mécanisme CRISPR-Cas9 en tant qu'outil est une révolution dans l'histoire de l'ingénierie génomique dont l'extension est vertigineuse (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019). A l'heure de la rédaction de ce manuscrit, de nombreuses protéines Cas ont été identifiées avec chacune des particularités (séquence du PAM, spécificité de son acide nucléique cible, taille de la séquence cible, poids moléculaire) qui ne cessent d'étendre nos possibilités expérimentales (Cebrian-Serrano &

Davies, 2017; Makarova *et al.*, 2020) dont les applications commencent à rejoindre le domaine de la thérapie (Maeder *et al.*, 2019; Stadtmauer *et al.*, 2020).

# Matériels et méthodes

## a. Plasmides et siARN

Les différents plasmides et siARN qui ont été utilisés lors des expériences sont listés respectivement dans le Tableau 10. Les plasmides ont été amplifiés en transformant par choc thermique des bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific). Les bactéries ont été incubées pendant 30 minutes dans de la glace, 45 secondes à 42°C puis 5 minutes dans de la glace à nouveau. Les bactéries ont été ensuiteensemencées sur des plaques d'agar LB (Roth) contenant 100  $\mu$ g/mL d'ampicilline puis cultivées toute la nuit à 37°C. Les clones bactériens ont été par la suite repiqués et amplifiés dans du LB liquide (Roth) à 37°C sous agitation toute la nuit. Les plasmides ont été purifiés avec le kit *NucleoSpin Plasmid* (Machery-Nagel). Après purification, les plasmides sont systématiquement vérifiés par séquençage (Eurofins). Contrairement aux autres siRNA, les siRNA citrine et mCherry ont été conçus au laboratoire puis commandés chez Integrated DNA Technologies.

**Tableau 10 – Tableau des plasmides et siARN utilisés lors de la thèse.**

Echantillon	Nom	Référence
Plasmides	ES-FUCCI	Addgene#62451
	miReporter-pGK	Addgene#62452
	SINV	Dr. Carla Saleh, Institut Pasteur, Paris, France
	SINV-GFP	Dr. Carla Saleh, Institut Pasteur, Paris, France
	pKLV_U6gRNA(BbsI)-PGKpuro2ABFP	Addgene#50946
	banque Brunello	Addgene#73178
	lentiCas9-Blast	Addgene#52962
	pVSVg	Addgene#8454
	psPAX2	Addgene#12260
	Protéase TEV	Addgene#64276
	PUC19 - MTS-GFP <sub>11x3</sub>	Dr. Hubert Becker, GMGM, Strasbourg, France
	PUC19 - MTS-GFP <sub>1-10</sub>	Dr. Hubert Becker, GMGM, Strasbourg, France
	Dérivés du système TEV	Clonés au laboratoire à partir de PUC19 - MTS-GFP <sub>11x3</sub> et PUC19 - GFP <sub>1-10</sub> dans plasmide pcDNA 3.1
siARN	siMAVS	M-024237-02-0005
	siLGP2	L-010582-00-0005
	siPKR	L-003527-00
	siCTR	D-001810-10
	siMCherry	AAGGGCGAGAUCAGCAGA
	siCitrine	AAGGACGACGGCAACUACA

## b. Culture cellulaire

Toutes nos lignées ont été incubées *a minima* dans une atmosphère à 37 °C / 5% CO<sub>2</sub> dans du *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM – GIBCO) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS – Pan Biotech). Les différentes lignées et leurs pressions de sélections associées sont recensées dans le tableau Tableau 11 ;

**Tableau 11 – Tableau des cellules utilisés lors de la thèse.**  
Blast = Blastidicine ; Hyg = Hygromycine B ; Puro = Puromycine

Type cellulaire	Sous-type	Milieu de culture	Provenance
HCT116	Sauvages	DMEM 10% FBS	ATCC® : CRL-247™
	Cas9	DMEM 10% FBS + 10 µg/mL Blast	Dr. Patryk Ngondo, IBMP, Strasbourg, France
	Cas9-Citrine/mCherry	DMEM 10% FBS + 200 µg/mL Hyg	Notre laboratoire
	Cas9-Citrine/mCherry-ΔPKR	DMEM 10% FBS + 10 µg/mL Blast + 1 µg/mL Puro	Notre laboratoire
	Cas9-ΔB4GALT7	DMEM 10% FBS + 10 µg/mL Blast + 1 µg/mL Puro	Notre laboratoire
	Cas9-Citrine/mCherry-ΔSLC35B2	DMEM 10% FBS + 10 µg/mL Blast + 1 µg/mL Puro + 200 µg/mL Hyg	Notre laboratoire
HEK293T	Sauvages	DMEM 10% FBS	ATCC® : CRL-3246
	KO COG (COG3, COG4, COG7, COG8)	DMEM 10% FBS	Dr. Vladimir Lupashin (Blackburn <i>et al.</i> , 2016)
	KO COG4 restaurée et HEK293T KO COG7 restaurée	DMEM 10% FBS + 10 µg/mL Blast	Dr. Vladimir Lupashin (Climer <i>et al.</i> , 2018)
	HEK293T NoDice	DMEM 10% FBS	B.R. Cullen (Kennedy <i>et al.</i> , 2015)
	HEK293T NoDiceΔPKR	DMEM 10% FBS	B.R. Cullen (Kennedy <i>et al.</i> , 2015)
	HEK293T NoDiceΔPKR ± Dicer (hDicer / N1 hDicer / CM hDicer)	DMEM 10% FBS + 10 µg/mL Blast	Thomas Montavon
	HEK293T-TEV	DMEM 10% FBS + 1 mg/mL G418	Notre laboratoire
VERO R	Sauvages	DMEM 10% FBS	Sigma aldrich-88020401
BHK21	Sauvages	DMEM 10% FBS	ATCC® : CR-12072

### i. Mise en place de la lignée HCT116-Cas9-Citrine/mCherry

Des cellules HCT116-Cas9 ont été transfectées avec le plasmide miReporter-PGK puis sélectionnées pendant au moins une semaine dans du DMEM frais 10 % FBS complémenté avec 10 µg/mL de Blastidicine et 200 µg/mL d’Hygromycine B. Les cellules monoclonales ont ensuite été sélectionnées à l’aide d’un cytomètre en flux à l’IGBMC (BD FACSAria™ - BD Biosciences).

### ii. Mise en place de la lignée HEK293T-TEV

80 000 cellules HEK293T ont été transfectées avec 500 ng de plasmide TEV puis sélectionnées pendant 20 jours dans du DMEM frais 10% FBS complémenté avec 1 mg/mL de G418. La protéase n’est pas étiquetée et nous n’avons pas d’anticorps dirigé contre la protéase, nous avons donc uniquement réalisé cette pression de sélection avant de réaliser nos tests.

### c. Virus

#### i. Production

Les productions virales ont été réalisées par le Dr. Erika Girardi. Les plasmides SINV et SINV-GFP ont été linéarisés à l'aide de l'enzyme de restriction XhoI puis utilisés en tant que substrat pour une transcription *in vitro* en utilisant le kit mMMESSAGE mMACHINE (Thermo Fisher Scientific) en suivant les instructions du fabricant. Le stock viral a été ensuite préparé dans des cellules BHK21 et le titre viral mesuré via dénombrement par plaque de lyse.

#### ii. Infection

Les cellules ont été infectées avec SINV ou SINV-GFP avec une multiplicité d'infection (MOI) de 1 ou de  $10^{-1}$  puis analysées après un certain temps d'infection comme indiqué dans la légende des figures.

### d. Réalisation des lignées KO

Les différentes lignées KO ont été réalisées dans la lignée HCT116-Cas9 produite par le Dr. Patryk Ngondo (Institut de biologie moléculaire des plantes – Strasbourg). Brièvement, des cellules HCT116 ont été transduites avec le vecteur lentiviral produit à partir du plasmide lentiCas9-Blast.

#### i. Production du vecteur d'expression des ARNg

Les vecteurs d'expression des ARNg ont chacun été produits en mixant les oligonucléotides « sens » et « antisens » (Tableau 12) à une concentration de 10  $\mu$ M dans 10 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM MgCl<sub>2</sub> dans un total de 100  $\mu$ L. Le mélange a été incubé à 95°C pendant 5 minutes puis laissé redescendre à température ambiante. Le duplexe d'oligonucléotide ainsi formé a été cloné dans le site de restriction BbsI du plasmide pKLV-U6gRNA(BbsI)-pGKpuro2ABFP.

**Tableau 12 – Liste des différents guides utilisés pour réaliser les KO.**

Gène ciblé	Séquence du guide (5' -> 3')	Brin sens	Brin antisens
B4GALT7	CACTACAAGACCTATGTCGG	CACCGCACTACAAGACCTATGTCGGGT	TAAAACCCGACATAGGTCTTGTAGTGC
	CGGGCAGCGCTCATCAACGT	CACCGCGGGCAGCGCTCATCAACGTGT	TAAAACACGTTGATGAGCGCTGCCCGC
SLC35B2	GCACTCGGTTTCATTAGCACC	CACCGCACTCGGTTTCATTAGCACCGT	TAAAACGGTGCTAATGAACCGAGTGCC
	TATAACCTGCCAGTAAGATG	CACCGTATAACCTGCCAGTAAGATGGT	TAAAACCATCTTACTGGCAGGTTATAC
PKR	GTACTACTCCCTGCTTCTGA	CACCGTACTACTCCCTGCTTCTGAGT	TAAAACCTCAGAAGCAGGGAGTAGTAC
	GTTGACTCCAGAGAGAAAAG	CACCGTTGACTCCAGAGAGAAAAGGT	TAAAACCTTTTCTCTCTGGAGTCAAC

#### ii. Production de lentivirus

Les lentivirus destinés à la réalisation de KO ont été produits en transfectant des cellules HEK293T (plaque 10 cm ; confluence 70-80 %) avec les plasmides pKLV-U6gRNA(BbsI)-pGKpuro2ABFP contenant l'ARNg d'intérêt, psPAX2 et pVSV à un ration de 5:4:1 en utilisant

de la Lipofectamine™ 2000 (Thermofisher) en suivant les instructions du fabricant. Le milieu a été remplacé 8 heures post-transfection. Après 48 heures, le milieu contenant les particules virales a été collecté puis filtré dans un filtre en polyethersulfone à pores de 0,45 µm. Le surnageant a été directement utilisé pour transduction ou stocké à -80°C.

### iii. Transduction

Un puit de plaque 6 puits contenant des HCT116-Cas9 (où HCT116-Cas9-Citrine/mCherry pour les ARNg SLC35B2) à 80% de confluence est transduit en utilisant 600 µL de surnageant lentiviral (300 µL de surnageant lentiviral par duplexe produit) supplémenté avec 4 µg/mL de polybrene (Sigma) pendant 6 heures. Le milieu de transduction est ensuite remplacé avec du milieu de culture frais pendant 24 heures en amont de la sélection. Les cellules transduites ont été ensuite sélectionnées durant 10 jours et maintenues dans un milieu de culture supplémenté avec 10 µg/mL de blasticidine (Invivogen) et 1 µg/mL de puromycine (Invivogen)

### iv. Lignées monoclonales

Les lignées monoclonales sont issues de colonies individuelles provenant de lignées polyclonales après avoir subies 3 étapes de sélection à l'ARNdb pour optimiser le nombre de colonies KO. Les colonies ainsi obtenues ont été criblées par PCR (Tableau 13) et les KO potentiels validés par séquençage du génome.

**Tableau 13 – Récapitulatif des différentes amorces utilisées pour cribler les KO par PCR.**

	Amorce sens	Amorce antisens	Amplicon sans délétion	Amplicon avec délétion
SLC35B2	GGGGCCACAGCCACATCACC	AGGCAAACAGGGCATCCTGC	469 pb	132 pb
PKR	CCCACTGAACACTTCTCACC	CCGTGATTATCTGCGTGCAT	2329 pb	1744 pb
B4GALT7	AGTCAGTGTGGGCCAGAGG	CAGCCGGTAGTGTGCTTGG	341 pb	180 pb

### e. Tests de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant le réactif PrestoBlue (Thermofisher) en suivant les recommandations du fabricant. Après 24 à 48 heures de traitement, les cellules sont incubées avec le réactif PrestoBlue et la viabilité cellulaire est quantifiée en mesurant la fluorescence après 20 - 30 minutes d'incubation dans le noir à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. La fluorescence a été lue (excitation 570 nm, émission 590 nm) en utilisant le spectrofluoromètre SAFAS (Xenius XC). La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage de cellules survivantes dans la condition traitée par rapport aux cellules non traitées.

## f. Adressage d'acides nucléiques dans les cellules

### i. Transfections

Toutes les transfections ont été réalisées avec le réactif Lipofectamine™ 2000 (Thermofisher) en suivant les instructions du fabricant. Le nombre de cellules et la quantité de matériel qui a été transfecté est précisé dans la légende de chaque expérience.

### ii. Nucléofections

Les expériences de nucléofections ont été conduites à l'aide du 4D-Nucleofector System (Lonza) en utilisant les solutions Nucleofector SE (Lonza) dans des Nucleocuvettes (Lonza) en suivant les instructions du fabricant. Le nombre de cellules et la quantité de matériel transfecté est précisé dans la légende de chaque expérience.

### g. Préparation d'ARN double brin

Des fragments de PCR correspondants à 231 nucléotides de la séquence codante pour la Citrine ont été amplifiés à partir du plasmide ES-FUCCI en utilisant des amorces contenant la séquence promotrice T7 (Tableau 14) afin de permettre la transcription *in vitro* du brin sens et du brin antisens de manière indépendante. Les fragments de PCR ont été produits en utilisant l'ADN polymérase DyNAzyme EXT (Thermo Scientific) puis purifiés en utilisant le kit Monarch DNA extraction (New England Biolab). La transcription *in vitro* a été réalisée en utilisant une ARN polymérase maison pendant 4 heures à 37°C. Pour les ARNdb marqués avec de la cyanine 5, 1/10ème de Cy5-CTP (Amersham CyDye Fluorescent Nucleotides Cy5-CTP, GE Healthcare Life Science) a été ajouté à la réaction de transcription. La matrice ADN pour la transcription a été ensuite digérée avec de la DNase I (Thermo Scientific) pendant 30 minutes à 37°C puis le produit a été purifié, les nucléotides non incorporés retirés et la taille des ARN vérifiés via UV shadow (8% gel acrylamide-urée) suivi d'une extraction phénol-chloroforme et d'une quantification au nanodrop pour chaque brin. Ensuite une quantité équivalente de brin positif et négatif d'ARN a été mixée puis chauffée pour 5 minutes à 95°C suivi d'une diminution lente à température ambiante pour hybrider les deux brins. L'intégrité de l'ARNdb a été finalement vérifiée à l'aide de digestions aux RNases T1 (Thermo Scientific) et V1 (Ambion).

**Tableau 14 – Séquence des amorces utilisées pour la production de l'ARNdb.**

Couple	Nom	Séquences (5' -> 3')
Brin +	Promoteur T7 + Citrine sens	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
	Citrine antisens	TGTCGGCCATGATATAGACG
Brin -	Citrine sens	CCATGCCCGAAGGCTACGTC
	Promoteur T7 + Citrine antisens	GAAATTAATACGACTCACTATAGGTGTCGGCCATGATATAGACG

Les nucléotides en rouge représentent la séquence du promoteur T7

## h. Cribles CRISPR-Cas9

### i. Préparation de la banque lentivirale Brunello

La production de la banque lentivirale Human sgRNA Brunello (Doench *et al.*, 2016) a été réalisée par Patryk Ngondo dans des cellules HEK293T en utilisant la méthode de transfection au PEI (Boussif *et al.*, 1995) (Polyethylenimin Linear, MW 25,000, 23966-1-A, Polysciences). En bref, 5 plaques de 15 cm de diamètre contenant des cellules HEK293T avec 20 mL de DMEM ont été transfectées avec 10 µg des plasmides sgARN Brunello, 8 µg de psPAX2 et 2 µg de pVSV dilués dans 500 µL de NaCl 150 mM. Le mélange a été incubé 30 minutes à température ambiante et les complexes formés ajoutés gouttes à gouttes aux cellules. Après 6 heures, le milieu a été remplacé puis le surnageant viral a été récolté après 48 et 72 heures et filtré dans un filtre en polyethersulfone à pores de 0,45 µm. Les particules virales ont été ensuite concentrées 100 fois en utilisant le Lenti-X™ Concentrator (Takara) puis stockées à -80°C. Le titre viral a été établi en comptant les colonies résistantes à la puromycine après transductions de cellules HCT116 avec des dilutions en cascade du stock viral. La banque lentivirale a été séquencée pour vérifier que tous les lenti-gRNA soient représentés.

Les cellules HCT116-Cas9 (ou HCT116-Cas9-Citrine/mCherry en fonction de l'approche) sont transduites avec la banque Brunello.  $6 \times 10^7$  HCT116-Cas9 ont étéensemencées puis transduites avec les lenti-ARNg à une MOI de 0.3 puis ont été sélectionnées pendant une semaine dans un milieu DMEM 10% FBS 10 µg/mL blasticidine 1 µg/mL puromycine.

Pour chaque réplicat de chaque crible, nous avonsensemencé 6 boîtes de Pétri de 15 cm<sup>2</sup> avec  $5 \times 10^6$  cellules HCT116-Cas9 transduites avec la banque Brunello par boîtes dans le but d'avoir une représentation de 300 fois pour chaque sgRNA.

### ii. Crible CRISPR/Cas9 – ARNdb

Lors de l'ensemencement des lignées HCT116-Cas9 transduites par la banque Brunello pour ce crible, nous avons en parallèle récolté  $3 \times 10^7$  cellules afin de constituer l'input. 24 heures après ensemencement les cellules ont été transfectées avec 1 µg/mL d'ARNdb pendant 6 jours. 48 heures après transfection la majorité des cellules étaient mortes, les cellules survivantes ont été lavées au PBS 1X puis réincubées avec du DMEM frais. 96 heures après, les cellules ont été collectées, leur ADN extrait et préparé pour le séquençage illumina des provirus.

### iii. Crible CRISPR/Cas9 – SINV

Lors de l'ensemencement des lignées HCT116-Cas9 transduites par la banque Brunello pour ce crible, nous avons en parallèle récolté  $3 \times 10^7$  cellules afin de constituer l'input. 24 heures après ensemencement les cellules ont été infectées avec SINV à une MOI de 0.1 pendant 18



jours. 48 heures après infection, la majorité des cellules étaient mortes, les cellules survivantes ont été lavées au PBS 1X puis réincubées avec du DMEM frais. 16 jours après, les cellules ont été collectées, leur ADN extrait et préparé pour le séquençage illumina des provirus.

#### iv. Crible CRISPR/Cas9 – ARN interférence

Contrairement aux cribles précédents, le crible ARN interférence a été réalisé dans des HCT116-Cas9-Citrine/mCherry. 24 heures après ensemencement, les cellules ont été transfectées avec 1 µg/mL d'ARNdb-Cy5. 24 heures après transfection, les cellules dans le surnageant et encore attachées ont été toutes deux collectées, resuspendues dans du PBS 1X – 0,5% FCS à une concentration de  $1 \times 10^7$  cellules/mL puis les différentes populations ont été triées en fonction de leur fluorescence en cytométrie en flux. Une fois triées, l'ADN des différentes populations a été extrait et préparé pour le séquençage illumina des provirus. Lors de ce crible, les  $3 \times 10^7$  cellules de l'input ont été collectées le jour même de l'analyse des cellules transfectées.

#### v. Extraction de l'ADN génomique, séquençage et analyse des cribles

L'ADN génomique des différentes expériences de cribles a été extrait de la façon suivante. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 5 mL de milieu de resuspension (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A) puis 250 µL de SDS 10% a été ajouté suivi d'une incubation de 10 minutes à température ambiante. Après cette incubation, les échantillons ont été soniqués puis incubés 30 minutes à température ambiante avec 10 µL de protéinase K (10 mg/mL). Ensuite, 5 mL de solution Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique ont été ajoutés, suivi d'une centrifugation de 30 minutes /12 000g/20°C. La phase aqueuse a été transférée dans de nouveaux tubes dans lesquels 500 µL de NaAc 3M et 5 mL d'isopropanol ont été ajoutés. La précipitation a duré toute une nuit à température ambiante et a été suivie d'une centrifugation de 30 minutes/12 000g/20°C. Le culot ainsi obtenu a été ensuite lavé à l'EtOH puis dissous dans de l'H<sub>2</sub>O en vue du séquençage.

Le séquençage des ARNg a été réalisé par Illumina. Une PCR dirigée sur les ADNg a été réalisée pour attacher des adaptateurs et des codes-barres aux échantillons afin de permettre le séquençage Illumina. Pour chaque échantillon, la PCR a été divisée en de multiples réactions de 100 µL chacune, contenant au maximum 5 µg d'ADN génomique. Pour 20 réactions de PCR (1 échantillon), nous utilisons 100 µg d'ADN, 100 µL de d'amorces P5 à 10 µM, 10 µL d'amorce P7 à 100 µM et 1 mL de GOtaq 2X. Pour les cribles basés sur la survie aux ARNdb et SINV, les conditions de PCR ont été les suivantes : 3 minutes de dénaturation initiale à 95°C, 28 cycles alternants 30s/95°C, 30s/55°C, 30s/72°C puis une élongation finale de 10 minutes à

72°C. Pour le crible ARN interférence, les conditions de PCR ont été les suivantes : 3 minutes de dénaturation initiale à 95 °C, 23 cycles alternants 30s/95°C, 30s/55°C, 30s/72°C puis une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Les amorces P5 et P7 ont été synthétisés par Integrated DNA Technologies, les échantillons ont été purifiés sur gel puis séquencés par Illumina (HiSeq4000) et analysés en utilisant le logiciel MaGeCK (Li *et al.*, 2014). Les amorces utilisées sont listées dans le tableau ci-dessous (Tableau 15).

**Tableau 15 – Liste des amorces utilisées pour le séquençage Illumina**

Type	Séquence de l'amorce	Cribles
P5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGTGGAAAGGACGAAACACCG	Mixés ensemble
	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG	
	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG	
	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG	
	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAACTTGTGGAAAGGACGAAACACCG	
	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCACCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG	
	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGCAACTTGTGGAAAGGACGAAACACCG	
	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAAGACCCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG	
	P7	
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACACGATCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTCCCTGCACTGT		Input 2 ARNdb/SINV Citrine <sup>+</sup> /mCherry <sup>+</sup>
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGCGCGGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTCCCTGCACTGT		Input 3 ARNdb/SINV Citrine <sup>-</sup> /mCherry <sup>-</sup>
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATGATCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTCCCTGCACTGT		ARNdb 1 Input crible ARNi
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTTACCAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTCCCTGCACTGT		ARNdb 2
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCCTTGGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTCCCTGCACTGT		ARNdb 3
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACGCATTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTCCCTGCACTGT		SINV 1
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAGGTATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTCCCTGCACTGT		SINV 2
CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGTAAGGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTACTATTCTTCCCTGCACTGT		SINV 3

### i. Microscopie et cytométrie

#### i. Optique

Les différentes images de microscopie optique ont été produites à l'aide du microscope Observer A1 (Zeiss) et analysées en utilisant Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

## ii. Cytométrie en flux

Les cellules qui ont été analysées par cytométrie en flux ont été collectées de manière mécanique (PBS 0,5 mM EDTA) ou en utilisant de la trypsine. Ces cellules ont été ensuite lavées dans du PBS 1X puis resuspendues dans du PBS 1X FBS 1% pour analyse. Chaque acquisition inclus au minimum 10 000 évènements et a été réalisée à l'aide du FACScalibur (BD Bioscience). Les données produites ont été ensuite analysées à l'aide du logiciel FlowJo (FlowJo LLC).

## j. Analyse par qPCR

L'ARN total a été isolé en utilisant du TRIzol™ (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Ensuite, une transcription inverse sur 1 µg d'ARN total a été réalisée en utilisant le kit SuperScript IV Vilo (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. La PCR en temps-réel a été conduite en utilisant du SYBR Green (Applied Biosystem) et les différentes amorces utilisées sont recensées dans le Tableau X. La température d'hybridation pour toutes les réactions était de 60°C en utilisant le thermocycleur CFX96 (Biorad). Les données générées ont été analysées en utilisant le logiciel CFX Manager (Biorad).

## k. Analyse Northern Blot de la formation de siARN

80 000 cellules HEK293T NoDiceΔPKR complémentées avec hDicer, CM hDicer et N1 hDicer sont transfectées avec 1 µg/mL d'ARNdb. 24 heures post-transfection, l'ARN total est extrait en utilisant du TRIzol™. Le Northern blot a été réalisé en utilisant 10 µg d'ARN total de chaque lignée. L'ARN est ensuite déposé sur gel 12% acrylamide-urée, transféré sur une membrane Hybond-NX (GE Healthcare). Les ARN sont ensuite cross-linkés chimiquement sur la membrane pendant 90 minutes à 65°C en utilisant du 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC). Les membranes sont ensuite pré-hybridées pendant 30 minutes dans du tampon PerfectHyb™ plus (Sigma) à 50°C. La sonde est réalisée à l'aide du kit *prime-a-gene labelling* (Promega) en suivant les recommandations du fabricant. La matrice de la sonde est le produit de PCR utilisé pour réaliser la transcription *in vitro* de l'ARNdb (g) avec 25 µCi de [ $\alpha$ -32P]dCTP. La sonde est ensuite hybridée à la membrane toute la nuit à 50°C. La membrane est lavée deux fois à 50°C pendant 20 minutes dans du SSC 5X / 0.1% SDS, suivi par un lavage final dans du SSC 1X / 0.1% SDS pendant 5 minutes. Le Northern blot est exposé avec des plaques phosphorimager puis scanné en utilisant le Bioimager FLA-7000 (Fuji)

# Références

- Abbas, Y.M., Pichlmair, A., Górna, M.W., Superti-Furga, G., Nagar, B., 2013. Structural basis for viral 5'-PPP-RNA recognition by human IFIT proteins. *Nature* 494, 60–64. <https://doi.org/10.1038/nature11783>
- Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K.A., Hornung, V., 2009. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat. Immunol.* 10, 1065–1072. <https://doi.org/10.1038/ni.1779>
- Adiliaghdam, F., Basavappa, M., Saunders, T.L., Harjanto, D., Prior, J.T., Cronkite, D.A., Papavasiliou, N., Jeffrey, K.L., 2020. A Requirement for Argonaute 4 in Mammalian Antiviral Defense. *Cell Rep.* 30, 1690-1701.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.021>
- Aguirre, A.J., Meyers, R.M., Weir, B.A., Vazquez, F., Zhang, C.-Z., Ben-David, U., Cook, A., Ha, G., Harrington, W.F., Doshi, M.B., Kost-Alimova, M., Gill, S., Xu, H., Ali, L.D., Jiang, G., Pantel, S., Lee, Y., Goodale, A., Cherniack, A.D., Oh, C., Kryukov, G., Cowley, G.S., Garraway, L.A., Stegmaier, K., Roberts, C.W., Golub, T.R., Meyerson, M., Root, D.E., Tsherniak, A., Hahn, W.C., 2016. Genomic Copy Number Dictates a Gene-Independent Cell Response to CRISPR/Cas9 Targeting. *Cancer Discov.* 6, 914–929. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0154>
- Akhrymuk, I., Frolov, I., Frolova, E.I., 2016. Both RIG-I and MDA5 detect alphavirus replication in concentration-dependent mode. *Virology* 487, 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.09.023>
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>
- Anderson, P., 1995. Mutagenesis. *Methods Cell Biol.* 48, 31–58.
- Baltimore, D., 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* 35, 235–241. <https://doi.org/10.1128/MMBR.35.3.235-241.1971>
- Bar-On, Y.M., Phillips, R., Milo, R., 2018. The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 6506–6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P., 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Bartel, D.P., 2018. Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173, 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., Von Weizsacker, F., Blum, H.E., Baumert, T.F., 2003. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 278, 41003–41012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302267200>
- Bassik, M.C., Kampmann, M., Lebbink, R.J., Wang, S., Hein, M.Y., Poser, I., Weibezahn, J., Horlbeck, M.A., Chen, S., Mann, M., Hyman, A.A., Leproust, E.M., McManus, M.T., Weissman, J.S., 2013. A systematic mammalian genetic interaction map reveals pathways underlying ricin susceptibility. *Cell* 152, 909–922. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.030>
- Bellott, L., Chaïb, A., Petitjean, O., Rigo, P., Gilmer, D., 2017. Apports et enseignements de la virologie en biologie contemporaine. *Virol. Montrouge Fr.* 21, 199–210. <https://doi.org/10.1684/vir.2017.0710>

- Bellott, L., Gilmer, D., Michel, F., 2019. Hit two birds with one stone: the multiple properties of (viral) RNA silencing suppressors. *Virol. Montrouge Fr.* 23, 38–60. <https://doi.org/10.1684/vir.2019.0798>
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Beronja, S., Janki, P., Heller, E., Lien, W.-H., Keyes, B.E., Oshimori, N., Fuchs, E., 2013. RNAi screens in mice identify physiological regulators of oncogenic growth. *Nature* 501, 185–190. <https://doi.org/10.1038/nature12464>
- Bishop, J.R., Schuksz, M., Esko, J.D., 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446, 1030–1037. <https://doi.org/10.1038/nature05817>
- Blackburn, J.B., D'Souza, Z., Lupashin, V.V., 2019. Maintaining order: COG complex controls Golgi trafficking, processing, and sorting. *FEBS Lett.* 593, 2466–2487. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13570>
- Bluyssen, H.A., Levy, D.E., 1997. Stat2 is a transcriptional activator that requires sequence-specific contacts provided by stat1 and p48 for stable interaction with DNA. *J. Biol. Chem.* 272, 4600–4605. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4600>
- Boettcher, M., McManus, M.T., 2015. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN or CRISPR. *Mol. Cell* 58, 575–585. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.028>
- Bolen, C.R., Ding, S., Robek, M.D., Kleinstein, S.H., 2014. Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology* 59, 1262–1272. <https://doi.org/10.1002/hep.26657>
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiol. Read. Engl.* 151, 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Bose, S., Banerjee, A.K., 2002. Role of heparan sulfate in human parainfluenza virus type 3 infection. *Virology* 298, 73–83. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1484>
- Bou-Hanna, C., Jarry, A., Mosnier, J.-F., Bossard, C., Labois, C.L., 2018. The double stranded RNA analog poly-IC elicits both robust IFN- $\lambda$  production and oncolytic activity in human gastrointestinal cancer cells. *Oncotarget* 9, 34471–34484. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26121>
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>
- Bouteiller, O. de, Merck, E., Hasan, U.A., Hubac, S., Benguigui, B., Trinchieri, G., Bates, E.E.M., Caux, C., 2005. Recognition of Double-stranded RNA by Human Toll-like Receptor 3 and Downstream Receptor Signaling Requires Multimerization and an Acidic pH. *J. Biol. Chem.* 280, 38133–38145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507163200>
- Boutros, M., Ahringer, J., 2008. The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* 9, 554–566. <https://doi.org/10.1038/nrg2364>
- Brouns, S.J.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J.H., Snijders, A.P.L., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., van der Oost, J., 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., Kagan, J.C., 2015. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 257–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>

- Bruns, A.M., Horvath, C.M., 2015. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. *Cytokine* 74, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.010>
- Bürckstümmer, T., Banning, C., Hainzl, P., Schobesberger, R., Kerzendorfer, C., Pauler, F.M., Chen, D., Them, N., Schischlik, F., Rebsamen, M., Smida, M., Fece de la Cruz, F., Lapao, A., Liszt, M., Eizinger, B., Guenzl, P.M., Blomen, V.A., Konopka, T., Gapp, B., Parapatics, K., Maier, B., Stöckl, J., Fischl, W., Salic, S., Taba Casari, M.R., Knapp, S., Bennett, K.L., Bock, C., Colinge, J., Kralovics, R., Ammerer, G., Casari, G., Brummelkamp, T.R., Superti-Furga, G., Nijman, S.M.B., 2013. A reversible gene trap collection empowers haploid genetics in human cells. *Nat. Methods* 10, 965–971. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2609>
- Burgyán, J., Havelda, Z., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 16, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.02.010>
- Burke, C.W., Gardner, C.L., Steffan, J.J., Ryman, K.D., Klimstra, W.B., 2009. Characteristics of alpha/beta interferon induction after infection of murine fibroblasts with wild-type and mutant alphaviruses. *Virology* 395, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.08.039>
- Busse, M., Feta, A., Presto, J., Wilén, M., Grønning, M., Kjellén, L., Kusche-Gullberg, M., 2007. Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to Heparan Sulfate Chain Elongation. *J. Biol. Chem.* 282, 32802–32810. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703560200>
- Byrnes, A.P., Griffin, D.E., 2000. Large-plaque mutants of Sindbis virus show reduced binding to heparan sulfate, heightened viremia, and slower clearance from the circulation. *J. Virol.* 74, 644–651. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.2.644-651.2000>
- Byrnes, A.P., Griffin, D.E., 1998. Binding of Sindbis Virus to Cell Surface Heparan Sulfate. *J. VIROL* 72, 8.
- Cagno, V., Tseligka, E.D., Jones, S.T., Tapparel, C., 2019. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? *Viruses* 11. <https://doi.org/10.3390/v11070596>
- Campbell, C.L., Keene, K.M., Brackney, D.E., Olson, K.E., Blair, C.D., Wilusz, J., Foy, B.D., 2008. *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. *BMC Microbiol.* 8, 47. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-47>
- Canver, M.C., Smith, E.C., Sher, F., Pinello, L., Sanjana, N.E., Shalem, O., Chen, D.D., Schupp, P.G., Vinjamur, D.S., Garcia, S.P., Luc, S., Kurita, R., Nakamura, Y., Fujiwara, Y., Maeda, T., Yuan, G.-C., Zhang, F., Orkin, S.H., Bauer, D.E., 2015. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature* 527, 192–197. <https://doi.org/10.1038/nature15521>
- Carette, J.E., Guimaraes, C.P., Varadarajan, M., Park, A.S., Wuethrich, I., Godarova, A., Kotecki, M., Cochran, B.H., Spooner, E., Ploegh, H.L., Brummelkamp, T.R., 2009. Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science* 326, 1231–1235. <https://doi.org/10.1126/science.1178955>
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., Hannon, G.J., 2002. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16, 2733–2742. <https://doi.org/10.1101/gad.1026102>
- Carmichael, J.B., Provost, P., Ekwall, K., Hobman, T.C., 2004. Ago1 and Dcr1, Two Core Components of the RNA Interference Pathway, Functionally Diverge from Rdp1 in Regulating Cell Cycle Events in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* 15, 1425–1435. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-06-0433>
- Cartault, F., Munier, P., Jacquemont, M.-L., Vellayoudom, J., Doray, B., Payet, C., Randrianaivo, H., Laville, J.-M., Munnich, A., Cormier-Daire, V., 2015. Expanding the clinical spectrum of B4GALT7 deficiency: homozygous p.R270C mutation with

- founder effect causes Larsen of Reunion Island syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* EJHG 23, 49–53. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.60>
- Cebrian-Serrano, A., Davies, B., 2017. CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. *Mamm. Genome* 28, 247–261. <https://doi.org/10.1007/s00335-017-9697-4>
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., Lieber, M.R., 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Chaplin, D.D., 2010. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3–S23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>
- Chawla-Sarkar, M., Leaman, D.W., Borden, E.C., 2001. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 1821–1831.
- Chawla-Sarkar, M., Lindner, D.J., Liu, Y.-F., Williams, B.R., Sen, G.C., Silverman, R.H., Borden, E.C., 2003. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8, 237–249. <https://doi.org/10.1023/A:1023668705040>
- Chen, Q., Gong, B., Mahmoud-Ahmed, A.S., Zhou, A., Hsi, E.D., Hussein, M., Almasan, A., 2001. Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood* 98, 2183–2192.
- Chen, S., Sanjana, N.E., Zheng, K., Shalem, O., Lee, K., Shi, X., Scott, D.A., Song, J., Pan, J.Q., Weissleder, R., Lee, H., Zhang, F., Sharp, P.A., 2015. Genome-wide CRISPR Screen in a Mouse Model of Tumor Growth and Metastasis. *Cell* 160, 1246–1260. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.038>
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., Shiekhattar, R., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740–4.
- Chiu, Y.-H., Macmillan, J.B., Chen, Z.J., 2009. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576–591. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.015>
- Civril, F., Deimling, T., de Oliveira Mann, C.C., Ablasser, A., Moldt, M., Witte, G., Hornung, V., Hopfner, K.-P., 2013. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature* 498, 332–337. <https://doi.org/10.1038/nature12305>
- Collins, L.E., Troeberg, L., 2019. Heparan sulfate as a regulator of inflammation and immunity. *J. Leukoc. Biol.* 105, 81–92. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU0618-246R>
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339, 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Costa, J.R., Bejcek, B.E., McGee, J.E., Fogel, A.I., Brimacombe, K.R., Ketteler, R., 2004. Genome Editing Using Engineered Nucleases and Their Use in Genomic Screening, in: Sittampalam, G.S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, C.P., Baell, J., Bejcek, B., Caaveiro, J.M.M., Chung, T.D.Y., Coussens, N.P., Dahlin, J.L., Devanaryan, V., Foley, T.L., Glicksman, M., Hall, M.D., Haas, J.V., Hoare, S.R.J., Inglese, J., Iversen, P.W., Kahl, S.D., Kales, S.C., Kirshner, S., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Saradjian, P., Trask, O.J., Weidner, J.R., Wildey, M.J., Xia, M., Xu, X. (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- Cowley, G.S., Weir, B.A., Vazquez, F., Tamayo, P., Scott, J.A., Rusin, S., East-Seletsky, A., Ali, L.D., Gerath, W.F., Pantel, S.E., Lizotte, P.H., Jiang, G., Hsiao, J., Tsherniak, A.,

- Dwinell, E., Aoyama, S., Okamoto, M., Harrington, W., Gelfand, E., Green, T.M., Tomko, M.J., Gopal, S., Wong, Terence C., Wong, Terence C., Li, H., Howell, S., Stransky, N., Liefeld, T., Jang, D., Bistline, J., Hill Meyers, B., Armstrong, S.A., Anderson, K.C., Stegmaier, K., Reich, M., Pellman, D., Boehm, J.S., Mesirov, J.P., Golub, T.R., Root, D.E., Hahn, W.C., 2014. Parallel genome-scale loss of function screens in 216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. *Sci. Data* 1, 140035. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.35>
- Daniels, S.M., Melendez-Peña, C.E., Scarborough, R.J., Daher, A., Christensen, H.S., El Far, M., Purcell, D.F., Lainé, S., Gatignol, A., 2009. Characterization of the TRBP domain required for Dicer interaction and function in RNA interference. *BMC Mol. Biol.* 10, 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-38>
- de Faria, I.J. da S., Olmo, R.P., Silva, E.G., Marques, J.T., 2013. dsRNA Sensing During Viral Infection: Lessons from Plants, Worms, Insects, and Mammals. *J. Interferon Cytokine Res.* 33, 239–253. <https://doi.org/10.1089/jir.2013.0026>
- de Weerd, N.A., Nguyen, T., 2012. The interferons and their receptors-distribution and regulation. *Immunol. Cell Biol.* 90, 483–491. <https://doi.org/10.1038/icb.2012.9>
- del Toro Duany, Y., Wu, B., Hur, S., 2015. MDA5-filament, dynamics and disease. *Curr. Opin. Virol.* 12, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.011>
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., Charpentier, E., 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- DeTulleo, L., Kirchhausen, T., 1998. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* 17, 4585–4593. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.16.4585>
- Devasthanam, A.S., 2014. Mechanisms underlying the inhibition of interferon signaling by viruses. *Virulence* 5, 270–277. <https://doi.org/10.4161/viru.27902>
- Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C., 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529–1531. <https://doi.org/10.1126/science.1093616>
- Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H.W., Listgarten, J., Root, D.E., 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 34, 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- Doench, J.G., Hartenian, E., Graham, D.B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B.L., Xavier, R.J., Root, D.E., 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat. Biotechnol.* 32, 1262–1267. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>
- Dougherty, W.G., Dawn Parks, T., 1991. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: Identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* 183, 449–456. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90974-G](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90974-G)
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., Boggs, C., 1996. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* 123, 37–46.
- Du, D., Roguev, A., Gordon, D.E., Chen, M., Chen, S.-H., Shales, M., Shen, J.P., Ideker, T., Mali, P., Qi, L.S., Krogan, N.J., 2017. Genetic interaction mapping in mammalian cells



- using CRISPR interference. *Nat. Methods* 14, 577–580. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4286>
- Dunlap, D.S., Ng, T.F.F., Rosario, K., Barbosa, J.G., Greco, A.M., Breitbart, M., Hewson, I., 2013. Molecular and microscopic evidence of viruses in marine copepods. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 1375–1380. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216595110>
- Dupressoir, A., Lavialle, C., Heidmann, T., 2012. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: Role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* 33, 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.005>
- Echeverri, C.J., Perrimon, N., 2006. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat. Rev. Genet.* 7, 373–384. <https://doi.org/10.1038/nrg1836>
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498. <https://doi.org/10.1038/35078107>
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188–200. <https://doi.org/10.1101/gad.862301>
- Essletzbichler, P., Konopka, T., Santoro, F., Chen, D., Gapp, B.V., Kralovics, R., Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M.B., Bürckstümmer, T., 2014. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. *Genome Res.* 24, 2059–2065. <https://doi.org/10.1101/gr.177220.114>
- Evers, B., Jastrzebski, K., Heijmans, J.P.M., Grennum, W., Beijersbergen, R.L., Bernards, R., 2016. CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nat. Biotechnol.* 34, 631–633. <https://doi.org/10.1038/nbt.3536>
- Faiyaz-Ul-Haque, M., Zaidi, S.H.E., Al-Ali, M., Al-Mureikhi, M.S., Kennedy, S., Al-Thani, G., Tsui, L.-C., Teebi, A.S., 2004. A novel missense mutation in the galactosyltransferase-I (B4GALT7) gene in a family exhibiting facioskeletal anomalies and Ehlers-Danlos syndrome resembling the progeroid type. *Am. J. Med. Genet. A.* 128A, 39–45. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30005>
- Félix, M.-A., Ashe, A., Piffaretti, J., Wu, G., Nuez, I., Bélicard, T., Jiang, Y., Zhao, G., Franz, C.J., Goldstein, L.D., Sanroman, M., Miska, E.A., Wang, D., 2011. Natural and Experimental Infection of *Caenorhabditis* Nematodes by Novel Viruses Related to Nodaviruses. *PLoS Biol.* 9, e1000586. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000586>
- Fensterl, V., Chattopadhyay, S., Sen, G.C., 2015. No Love Lost Between Viruses and Interferons. *Annu. Rev. Virol.* 2, 549–572. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055249>
- Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., 2013. *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–11.
- Flint, M., Chatterjee, P., Lin, D.L., McMullan, L.K., Shrivastava-Ranjan, P., Bergeron, É., Lo, M.K., Welch, S.R., Nichol, S.T., Tai, A.W., Spiropoulou, C.F., 2019. A genome-wide CRISPR screen identifies N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase as a potential antiviral target for Ebola virus. *Nat. Commun.* 10, 285. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08135-4>
- Floyd-Smith, G., Slattery, E., Lengyel, P., 1981. Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate--dependent endonuclease. *Science* 212, 1030–1032. <https://doi.org/10.1126/science.6165080>
- Flynn, R.A., Smith, B.A.H., Johnson, A.G., Pedram, K., George, B.M., Malaker, S.A., Majzoub, K., Carette, J.E., Bertozzi, C.R., 2019. Mammalian Y RNAs are modified at

- discrete guanosine residues with N-glycans (preprint). *Molecular Biology*.  
<https://doi.org/10.1101/787614>
- Forterre, P., Prangishvili, D., 2009. The Great Billion-year War between Ribosome- and Capsid-encoding Organisms (Cells and Viruses) as the Major Source of Evolutionary Novelties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1178, 65–77. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04993.x>
- Franceschini, A., Meier, R., Casanova, A., Kreibich, S., Daga, N., Andritschke, D., Dilling, S., Rämö, P., Emmenlauer, M., Kaufmann, A., Conde-Álvarez, R., Low, S.H., Pelkmans, L., Helenius, A., Hardt, W.-D., Dehio, C., Mering, C. von, 2014. Specific inhibition of diverse pathogens in human cells by synthetic microRNA-like oligonucleotides inferred from RNAi screens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 4548–4553. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402353111>
- Froshauer, S., Kartenbeck, J., Helenius, A., 1988. Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J. Cell Biol.* 107, 2075–2086. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.6.2075>
- Fulco, C.P., Munschauer, M., Anyoha, R., Munson, G., Grossman, S.R., Perez, E.M., Kane, M., Cleary, B., Lander, E.S., Engreitz, J.M., 2016. Systematic mapping of functional enhancer–promoter connections with CRISPR interference. *Science* 354, 769–773. <https://doi.org/10.1126/science.aag2445>
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2006. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. *Nat Immunol* 7, 590–7.
- Gammon, D.B., Mello, C.C., 2015. RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Curr. Opin. Insect Sci., Ecology \* Parasites/Parasitoids/Biological control* 8, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.006>
- Gans, M., Audit, C., Masson, M., 1975. Isolation and characterization of sex-linked female-sterile mutants in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 81, 683–704.
- Gao, X., Tsang, J.C.H., Gaba, F., Wu, D., Lu, L., Liu, P., 2014. Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Nucleic Acids Res.* 42, e155. <https://doi.org/10.1093/nar/gku836>
- Garoff, H., Frischauf, A.M., Simons, K., Lehrach, H., Delius, H., 1980. Nucleotide sequence of cDNA coding for Semliki Forest virus membrane glycoproteins. *Nature* 288, 236–241. <https://doi.org/10.1038/288236a0>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksny, V., 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2579-2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- George, C.X., John, L., Samuel, C.E., 2014. An RNA editor, adenosine deaminase acting on double-stranded RNA (ADAR1). *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 34, 437–446. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0001>
- Gilbert, L.A., Horlbeck, M.A., Adamson, B., Villalta, J.E., Chen, Y., Whitehead, E.H., Guimaraes, C., Panning, B., Ploegh, H.L., Bassik, M.C., Qi, L.S., Kampmann, M., Weissman, J.S., 2014. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. *Cell* 159, 647–661. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.029>
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., Lim, W.A., Weissman, J.S., Qi, L.S., 2013. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>
- Gladyshev, E.A., Arkhipova, I.R., 2011. A widespread class of reverse transcriptase-related cellular genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 20311–20316. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100266108>

- Glomb-Reinmund, S., Kielian, M., 1998. The role of low pH and disulfide shuffling in the entry and fusion of Semliki Forest virus and Sindbis virus. *Virology* 248, 372–381. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9275>
- Golden, R.J., Chen, B., Li, T., Braun, J., Manjunath, H., Chen, X., Wu, J., Schmid, V., Chang, T.-C., Kopp, F., Ramirez-Martinez, A., Tagliabracchi, V.S., Chen, Z.J., Xie, Y., Mendell, J.T., 2017. An Argonaute phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature* 542, 197–202. <https://doi.org/10.1038/nature21025>
- Gordts, P.L.S.M., Foley, E.M., Lawrence, R., Sinha, R., Lameda-Diaz, C., Deng, L., Nock, R., Glass, C.K., Erbilgin, A., Lusic, A.J., Witztum, J.L., Esko, J.D., 2014. Reducing macrophage proteoglycan sulfation increases atherosclerosis and obesity through enhanced type I interferon signaling. *Cell Metab.* 20, 813–826. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.016>
- Goubau, D., Schlee, M., Deddouche, S., Pruijssers, A.J., Zillinger, T., Goldeck, M., Schuberth, C., Van der Veen, A.G., Fujimura, T., Rehwinkel, J., Iskarpatyoti, J.A., Barchet, W., Ludwig, J., Dermody, T.S., Hartmann, G., Reis e Sousa, C., 2014. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 514, 372–375. <https://doi.org/10.1038/nature13590>
- Goujon, C., Moncorgé, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hué, S., Barclay, W.S., Schulz, R., Malim, M.H., 2013. Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 559–562. <https://doi.org/10.1038/nature12542>
- Gross, M., Wing, M., Rundquist, C., n.d. Evidence That Phosphorylation of eIF-2(4 Prevents the eIF-2B-mediated Dissociation of eIF-Z\*GDP from the 60 S Subunit of Complete Initiation Complexes 9.
- Guo, S., Kempthues, K.J., 1995. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611–620. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90082-9)
- Habjan, M., Hubel, P., Lacerda, L., Benda, C., Holze, C., Eberl, C.H., Mann, A., Kindler, E., Gil-Cruz, C., Ziebuhr, J., Thiel, V., Pichlmair, A., 2013. Sequestration by IFIT1 Impairs Translation of 2'O-unmethylated Capped RNA. *PLoS Pathog.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003663>
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., Eeden, F.J. van, Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., Nusslein-Volhard, C., 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1–36.
- Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F., Nelson, K.E., 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* 1, e60. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* 286, 950–952. <https://doi.org/10.1126/science.286.5441.950>
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296. <https://doi.org/10.1038/35005107>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., Kim, V.N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016–3027. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>
- Han, J., Perez, J.T., Chen, C., Li, Y., Benitez, A., Kandasamy, M., Lee, Y., Andrade, J., tenOever, B., Manicassamy, B., 2018. Genome-wide CRISPR/Cas9 Screen Identifies

- Host Factors Essential for Influenza Virus Replication. *Cell Rep.* 23, 596–607. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.045>
- Hart, T., Chandrashekhar, M., Aregger, M., Steinhart, Z., Brown, K.R., MacLeod, G., Mis, M., Zimmermann, M., Fradet-Turcotte, A., Sun, S., Mero, P., Dirks, P., Sidhu, S., Roth, F.P., Rissland, O.S., Durocher, D., Angers, S., Moffat, J., 2015. High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell* 163, 1515–1526. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.015>
- Hart, T., Tong, A.H.Y., Chan, K., Leeuwen, J.V., Seetharaman, A., Aregger, M., Chandrashekhar, M., Hustedt, N., Seth, S., Noonan, A., Habsid, A., Sizova, O., Nedyalkova, L., Climie, R., Tworzyanski, L., Lawson, K., Sartori, M.A., Alibeh, S., Tieu, D., Masud, S., Mero, P., Weiss, A., Brown, K.R., Usaj, M., Billmann, M., Rahman, M., Costanzo, M., Myers, C.L., Andrews, B.J., Boone, C., Durocher, D., Moffat, J., 2017. Evaluation and Design of Genome-Wide CRISPR/SpCas9 Knockout Screens. *G3 Genes Genomes Genet.* 7, 2719–2727. <https://doi.org/10.1534/g3.117.041277>
- Hartmann, G., 2017. Nucleic Acid Immunity. *Adv. Immunol.* 133, 121–169. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.11.001>
- Hartmann, G., Krieg, A.M., 2000. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 944–953. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.2.944>
- Hasson, S.A., Kane, L.A., Yamano, K., Huang, C.-H., Sliter, D.A., Buehler, E., Wang, C., Heman-Ackah, S.M., Hessa, T., Guha, R., Martin, S.E., Youle, R.J., 2013. High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature* 504, 291–295. <https://doi.org/10.1038/nature12748>
- He, C., Li, Z., Chen, P., Huang, H., Hurst, L.D., Chen, J., 2012. Young intragenic miRNAs are less coexpressed with host genes than old ones: implications of miRNA-host gene coevolution. *Nucleic Acids Res.* 40, 4002–4012. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1312>
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526–1529. <https://doi.org/10.1126/science.1093620>
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745. <https://doi.org/10.1038/35047123>
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., Jacobsen, S.E., 2006. Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat. Genet.* 38, 721–725. <https://doi.org/10.1038/ng1804>
- Horlbeck, M.A., Xu, A., Wang, M., Bennett, N.K., Park, C.Y., Bogdanoff, D., Adamson, B., Chow, E.D., Kampmann, M., Peterson, T.R., Nakamura, K., Fischbach, M.A., Weissman, J.S., Gilbert, L.A., 2018. Mapping the Genetic Landscape of Human Cells. *Cell* 174, 953–967.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.010>
- Horn, T., Sandmann, T., Fischer, B., Axelsson, E., Huber, W., Boutros, M., 2011. Mapping of signaling networks through synthetic genetic interaction analysis by RNAi. *Nat. Methods* 8, 341–346. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1581>
- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D.R., Latz, E., Fitzgerald, K.A., 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514–518. <https://doi.org/10.1038/nature07725>

- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S., Hartmann, G., 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994–997. <https://doi.org/10.1126/science.1132505>
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S., Hartmann, G., 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- $\alpha$  by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* 11, 263–270. <https://doi.org/10.1038/nm1191>
- Hovanessian, A.G., Justesen, J., 2007. The human 2'-5' oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie* 89, 779–788. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.02.003>
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., Zhang, F., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Hunter, C., Sun, H., Poethig, R.S., 2003. The Arabidopsis Heterochronic Gene ZIPPY Is an ARGONAUTE Family Member. *Curr. Biol.* 13, 1734–1739. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.09.004>
- Isaacs, A., Cox, R.A., Rotem, Z., 1963. FOREIGN NUCLEIC ACIDS AS THE STIMULUS TO MAKE INTERFERON. *The Lancet* 282, 113–116. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(63\)92585-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(63)92585-6)
- Isaacs, A., Lindenmann, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B - Biol. Sci.* 147, 258–267. <https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048>
- Ishikawa, H., Ma, Z., Barber, G.N., 2009. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* 461, 788–792. <https://doi.org/10.1038/nature08476>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A., 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P.S., 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21, 635–637. <https://doi.org/10.1038/nbt831>
- Jackson, A.L., Linsley, P.S., 2010. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 57–67. <https://doi.org/10.1038/nrd3010>
- Jae, L.T., Raaben, M., Riemersma, M., van Beusekom, E., Blomen, V.A., Velds, A., Kerkhoven, R.M., Carette, J.E., Topaloglu, H., Meinecke, P., Wessels, M.W., Lefeber, D.J., Whelan, S.P., van Bokhoven, H., Brummelkamp, T.R., 2013. Deciphering the Glycosylome of Dystroglycanopathies Using Haploid Screens for Lassa Virus Entry. *Science* 340, 479–483. <https://doi.org/10.1126/science.1233675>
- Jallepalli, P.V., Waizenegger, I.C., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M.R., Peters, J.-M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C., 2001. Securin Is Required for Chromosomal Stability in Human Cells. *Cell* 105, 445–457. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00340-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00340-3)
- Jansen, R., Embden, J.D.A. van, Gastra, W., Schouls, L.M., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E., Doudna, J., 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife* 2, e00471. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>
- Johnson, K.L., Price, B.D., Eckerle, L.D., Ball, L.A., 2004. Nodamura Virus Nonstructural Protein B2 Can Enhance Viral RNA Accumulation in both Mammalian and Insect Cells. *J. Virol.* 78, 6698–6704. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6698-6704.2004>
- Jonas, S., Izaurralde, E., 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* 16, 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>
- Jose, J., Przybyla, L., Edwards, T.J., Perera, R., Burgner, J.W., Kuhn, R.J., 2012. Interactions of the cytoplasmic domain of Sindbis virus E2 with nucleocapsid cores promote alphavirus budding. *J. Virol.* 86, 2585–2599. <https://doi.org/10.1128/JVI.05860-11>
- Judge, A.D., Sood, V., Shaw, J.R., Fang, D., McClintock, K., MacLachlan, I., 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat. Biotechnol.* 23, 457–462. <https://doi.org/10.1038/nbt1081>
- Kampmann, M., Horlbeck, M.A., Chen, Y., Tsai, J.C., Bassik, M.C., Gilbert, L.A., Villalta, J.E., Kwon, S.C., Chang, H., Kim, V.N., Weissman, J.S., 2015. Next-generation libraries for robust RNA interference-based genome-wide screens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E3384–E3391. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508821112>
- Kane, M., Yadav, S.S., Bitzegeio, J., Kutluay, S.B., Zang, T., Wilson, S.J., Schoggins, J.W., Rice, C.M., Yamashita, M., Hatzioannou, T., Bieniasz, P.D., 2013. MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 563–566. <https://doi.org/10.1038/nature12653>
- Karlas, A., Berre, S., Couderc, T., Varjak, M., Braun, P., Meyer, M., Gangneux, N., Karo-Astover, L., Weege, F., Raftery, M., Schönrich, G., Klemm, U., Wurzlbauer, A., Bracher, F., Merits, A., Meyer, T.F., Lecuit, M., 2016. A human genome-wide loss-of-function screen identifies effective chikungunya antiviral drugs. *Nat. Commun.* 7, 11320. <https://doi.org/10.1038/ncomms11320>
- Kasai, H., Oashi, Z., Harada, F., Nishimura, S., Oppenheimer, N.J., Crain, P.F., Liehr, J.G., von Minden, D.L., McCloskey, J.A., 1975. Structure of the modified nucleoside Q isolated from *Escherichia coli* transfer ribonucleic acid. 7-(4,5-cis-Dihydroxy-1-cyclopenten-3-ylaminomethyl)-7-deazaguanosine. *Biochemistry* 14, 4198–4208. <https://doi.org/10.1021/bi00690a008>
- Kasarskis, A., Manova, K., Anderson, K.V., 1998. A phenotype-based screen for embryonic lethal mutations in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7485–7490.
- Kawakami, K., Largaespada, D.A., Ivics, Z., 2017. Transposons As Tools for Functional Genomics in Vertebrate Models. *Trends Genet.* 33, 784–801. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.07.006>
- Kearns, N.A., Genga, R.M.J., Enuameh, M.S., Garber, M., Wolfe, S.A., Maehr, R., 2014. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 141, 219–223. <https://doi.org/10.1242/dev.103341>
- Kearns, N.A., Pham, H., Tabak, B., Genga, R.M., Silverstein, N.J., Garber, M., Maehr, R., 2015. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat. Methods* 12, 401–403. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3325>
- Kennedy, E.M., Whisnant, A.W., Kornepati, A.V.R., Marshall, J.B., Bogerd, H.P., Cullen, B.R., 2015. Production of functional small interfering RNAs by an amino-terminal deletion mutant of human Dicer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E6945–E6954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513421112>

- Ketting, R.F., Fischer, S.E.J., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., Plasterk, R.H.A., 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654–2659. <https://doi.org/10.1101/gad.927801>
- Khoo, C.C.H., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K.E., Franz, A.W.E., 2010. The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol.* 10, 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-130>
- Kim, H.S., Lee, K., Bae, S., Park, J., Lee, C.-K., Kim, Meehyein, Kim, E., Kim, Minju, Kim, S., Kim, C., Kim, J.-S., 2017. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout screens and target identification via whole-genome sequencing uncover host genes required for picornavirus infection. *J. Biol. Chem.* 292, 10664–10671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.782425>
- King, A.M.Q. (Ed.), 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, London ; Waltham, MA.
- Klann, T.S., Black, J.B., Chellappan, M., Safi, A., Song, L., Hilton, I.B., Crawford, G.E., Reddy, T.E., Gersbach, C.A., 2017. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat. Biotechnol.* 35, 561–568. <https://doi.org/10.1038/nbt.3853>
- Kleinman, M.E., Kaneko, H., Cho, W.G., Dridi, S., Fowler, B.J., Blandford, A.D., Albuquerque, R.J.C., Hirano, Y., Terasaki, H., Kondo, M., Fujita, T., Ambati, B.K., Tarallo, V., Gelfand, B.D., Bogdanovich, S., Baffi, J.Z., Ambati, J., 2012. Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 101–108. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.212>
- Klimstra, W.B., Ryman, K.D., Johnston, R.E., 1998. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *J. Virol.* 72, 7357–7366.
- Kobayashi, I., 2001. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res.* 29, 3742–3756. <https://doi.org/10.1093/nar/29.18.3742>
- Kohler, T.A., Smith, M.E., Bogaard, A., Feinman, G.M., Peterson, C.E., Betzenhauser, A., Pailles, M., Stone, E.C., Marie Prentiss, A., Dennehy, T.J., Ellyson, L.J., Nicholas, L.M., Faulseit, R.K., Styring, A., Whitlam, J., Fochesato, M., Foor, T.A., Bowles, S., 2017. Greater post-Neolithic wealth disparities in Eurasia than in North America and Mesoamerica. *Nature* 551, 619–622. <https://doi.org/10.1038/nature24646>
- Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.-P., Velasco-Herrera, M.D.C., Yusa, K., 2014. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat. Biotechnol.* 32, 267–273. <https://doi.org/10.1038/nbt.2800>
- Komor, A.C., Badran, A.H., Liu, D.R., 2017. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* 168, 20–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.044>
- König, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M.C., Irelan, J.T., Chiang, C.-Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., Seidel, S., Opaluch, A.M., Caldwell, J.S., Weitzman, M.D., Kuhlen, K.L., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Orth, A.P., Miraglia, L.J., Bushman, F.D., Young, J.A., Chanda, S.K., 2008. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.032>
- Koonin, E.V., 2009. On the Origin of Cells and Viruses: Primordial Virus World Scenario. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1178, 47–64. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04992.x>
- Koonin, E.V., Dolja, V.V., 2013. A virocentric perspective on the evolution of life. *Curr. Opin. Virol.* 3, 546–557. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.06.008>

- Koonin, E.V., Dolja, V.V., Krupovic, M., 2015. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology* 479–480, 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039>
- Körber, S., Shaik Syed Ali, P., Chen, J.C.-H., 2009. Structure of the RNA-binding domain of Nodamura virus protein B2, a suppressor of RNA interference. *Biochemistry* 48, 2307–2309. <https://doi.org/10.1021/bi900126s>
- Korkmaz, G., Lopes, R., Ugalde, A.P., Nevedomskaya, E., Han, R., Myacheva, K., Zwart, W., Elkon, R., Agami, R., 2016. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 34, 192–198. <https://doi.org/10.1038/nbt.3450>
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., Klinman, D.M., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546–549. <https://doi.org/10.1038/374546a0>
- Kulsuptrakul, J., Wang, R., Meyers, N.L., Ott, M., Puschnik, A.S., 2019. A CRISPR screen identifies UFMylation and TRAMP-like complexes required for hepatitis A virus infection (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2019.12.15.877100>
- Kumar, P., Sweeney, T.R., Skabkin, M.A., Skabkina, O.V., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2014. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 42, 3228–3245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1321>
- Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J., Adli, M., 2014. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 32, 677–683. <https://doi.org/10.1038/nbt.2916>
- Labeau, A., Simon-Loriere, E., Hafirassou, M.-L., Bonnet-Madin, L., Tessier, S., Zamborlini, A., Dupré, T., Seta, N., Schwartz, O., Chaix, M.-L., Delaugerre, C., Amara, A., Meertens, L., 2020. A Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies the Dolichol-Phosphate Mannose Synthase Complex as a Host Dependency Factor for Dengue Virus Infection. *J. Virol.* 94. <https://doi.org/10.1128/JVI.01751-19>
- Lau, P.-W., Guiley, K.Z., De, N., Potter, C.S., Carragher, B., MacRae, I.J., 2012. The Molecular Architecture of Human Dicer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 436–440. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2268>
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R., Kim, V.N., 2006. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *Embo J* 25, 522–32.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., Kim, V.N., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J* 21, 4663–70.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051–60.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., Carthew, R.W., 2004. Distinct Roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA Silencing Pathways. *Cell* 117, 69–81. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00261-2)
- Li, B., Clohisey, S.M., Chia, B.S., Wang, B., Cui, A., Eisenhaure, T., Schweitzer, L.D., Hoover, P., Parkinson, N.J., Nachshon, A., Smith, N., Regan, T., Farr, D., Gutmann, M.U., Bukhari, S.I., Law, A., Sangesland, M., Gat-Viks, I., Digard, P., Vasudevan, S., Lingwood, D., Dockrell, D.H., Doench, J.G., Baillie, J.K., Hacohen, N., 2020. Genome-



- wide CRISPR screen identifies host dependency factors for influenza A virus infection. *Nat. Commun.* 11, 164. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13965-x>
- Li, J.-P., Kusche-Gullberg, M., 2016. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 215–273. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.02.009>
- Li, W., Xu, H., Xiao, T., Cong, L., Love, M.I., Zhang, F., Irizarry, R.A., Liu, J.S., Brown, M., Liu, X.S., 2014. MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biol.* 15, 554. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0554-4>
- Li, Y., Lu, J., Han, Y., Fan, X., Ding, S.-W., 2013. RNA Interference Functions as an Antiviral Immunity Mechanism in Mammals. *Science* 342, 231–234. <https://doi.org/10.1126/science.1241911>
- Li, Y., Muffat, J., Omer Javed, A., Keys, H.R., Lungjangwa, T., Bosch, I., Khan, M., Virgilio, M.C., Gehrke, L., Sabatini, D.M., Jaenisch, R., 2019. Genome-wide CRISPR screen for Zika virus resistance in human neural cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201900867. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900867116>
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., Hannon, G.J., 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–41.
- Liu, S.J., Horlbeck, M.A., Cho, S.W., Birk, H.S., Malatesta, M., He, D., Attenello, F.J., Villalta, J.E., Cho, M.Y., Chen, Y., Mandegar, M.A., Olvera, M.P., Gilbert, L.A., Conklin, B.R., Chang, H.Y., Weissman, J.S., Lim, D.A., 2017. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science* 355. <https://doi.org/10.1126/science.aah7111>
- López, P., Girardi, E., Mounce, B.C., Weiss, A., Chane-Woon-Ming, B., Messmer, M., Kaukinen, P., Kopp, A., Bortolamiol-Becet, D., Fendri, A., Vignuzzi, M., Brino, L., Pfeffer, S., 2020. High-Throughput Fluorescence-Based Screen Identifies the Neuronal MicroRNA miR-124 as a Positive Regulator of Alphavirus Infection. *J. Virol.* 94. <https://doi.org/10.1128/JVI.02145-19>
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U., 2004. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303, 95–98. <https://doi.org/10.1126/science.1090599>
- Maeder, M.L., Stefanidakis, M., Wilson, C.J., Baral, R., Barrera, L.A., Bounoutas, G.S., Bumcrot, D., Chao, H., Ciulla, D.M., DaSilva, J.A., Dass, A., Dhanapal, V., Fennell, T.J., Friedland, A.E., Giannoukos, G., Gloskowski, S.W., Glucksmann, A., Gotta, G.M., Jayaram, H., Haskett, S.J., Hopkins, B., Horng, J.E., Joshi, S., Marco, E., Mepani, R., Reyon, D., Ta, T., Tabbaa, D.G., Samuelsson, S.J., Shen, S., Skor, M.N., Stetkiewicz, P., Wang, T., Yudkoff, C., Myer, V.E., Albright, C.F., Jiang, H., 2019. Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nat. Med.* 25, 229–233. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0327-9>
- Maillard, P.V., Ciaudo, C., Marchais, A., Li, Y., Jay, F., Ding, S.W., Voinnet, O., 2013. Antiviral RNA Interference in Mammalian Cells. *Science* 342, 235–238. <https://doi.org/10.1126/science.1241930>
- Maillard, P.V., Van der Veen, A.G., Deddouche-Grass, S., Rogers, N.C., Merits, A., Reis e Sousa, C., 2016. Inactivation of the type I interferon pathway reveals long double-stranded RNA-mediated RNA interference in mammalian cells. *EMBO J.* 35, 2505–2518. <https://doi.org/10.15252/embj.201695086>
- Majoros, A., Platanitis, E., Kernbauer-Hölzl, E., Rosebrock, F., Müller, M., Decker, T., 2017. Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK–STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00029>

- Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., 2006. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* 1, 7. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Scott, D., Shah, S.A., Siksnyš, V., Terns, M.P., Venclovas, Č., White, M.F., Yakunin, A.F., Yan, W., Zhang, F., Garrett, R.A., Backofen, R., van der Oost, J., Barrangou, R., Koonin, E.V., 2020. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., van der Oost, J., Koonin, E.V., 2009. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol. Direct* 4, 29. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-29>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Church, G.M., 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339, 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Mankan, A.K., Schmidt, T., Chauhan, D., Goldeck, M., Höning, K., Gaidt, M., Kubarenko, A.V., Andreeva, L., Hopfner, K.-P., Hornung, V., 2014. Cytosolic RNA:DNA hybrids activate the cGAS–STING axis. *EMBO J.* 33, 2937–2946. <https://doi.org/10.15252/embj.201488726>
- Mannion, N.M., Greenwood, S.M., Young, R., Cox, S., Brindle, J., Read, D., Nellåker, C., Vesely, C., Ponting, C.P., McLaughlin, P.J., Jantsch, M.F., Dorin, J., Adams, I.R., Scadden, A.D.J., Ohman, M., Keegan, L.P., O’Connell, M.A., 2014. The RNA-editing enzyme ADAR1 controls innate immune responses to RNA. *Cell Rep.* 9, 1482–1494. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.041>
- Marcello, T., Grakoui, A., Barba–Spaeth, G., Machlin, E.S., Kotenko, S.V., Macdonald, M.R., Rice, C.M., 2006. Interferons  $\alpha$  and  $\lambda$  Inhibit Hepatitis C Virus Replication With Distinct Signal Transduction and Gene Regulation Kinetics. *Gastroenterology* 131, 1887–1898. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.09.052>
- Marq, J.-B., Hausmann, S., Veillard, N., Kolakofsky, D., Garcin, D., 2011. Short Double-stranded RNAs with an Overhanging 5' ppp-Nucleotide, as Found in Arenavirus Genomes, Act as RIG-I Decoys. *J. Biol. Chem.* 286, 6108–6116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186262>
- Marraffini, L.A., 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* 526, 55–61. <https://doi.org/10.1038/nature15386>
- Marraffini, L.A., Sontheimer, E.J., 2008. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322, 1843–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* 17, 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., Tuschl, T., 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563–574. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00908-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00908-x)
- Meister, G., 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* 14, 447–459. <https://doi.org/10.1038/nrg3462>
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R., Hovanessian, A.G., 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded

- RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62, 379–390. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90374-n](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90374-n)
- Miller, T.E., Liao, B.B., Wallace, L.C., Morton, A.R., Xie, Q., Dixit, D., Factor, D.C., Kim, L.J.Y., Morrow, J.J., Wu, Q., Mack, S.C., Hubert, C.G., Gillespie, S.M., Flavahan, W.A., Hoffmann, T., Thummalapalli, R., Hemann, M.T., Paddison, P.J., Horbinski, C.M., Zuber, J., Scacheri, P.C., Bernstein, B.E., Tesar, P.J., Rich, J.N., 2017. Transcription elongation factors represent in vivo cancer dependencies in glioblastoma. *Nature* 547, 355–359. <https://doi.org/10.1038/nature23000>
- Miskey, C., Izsvák, Z., Kawakami, K., Ivics, Z., 2005. DNA transposons in vertebrate functional genomics. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 629–641. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4232-7>
- Mislick, K.A., Baldeschwieler, J.D., 1996. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12349–12354. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12349>
- Miyahira, A.K., Shahangian, A., Hwang, S., Sun, R., Cheng, G., 2009. TANK-Binding Kinase-1 Plays an Important Role during In Vitro and In Vivo Type I IFN Responses to DNA Virus Infections. *J. Immunol.* 182, 2248–2257. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802466>
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E., 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Molnar, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, E., Lacomme, C., Burgyán, J., 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.* 79, 7812–7818. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7812-7818.2005>
- Montavon, T.C., Lefevre, M., Baldaccini, M., Girardi, E., Chane-Woon-Ming, B., Messmer, M., Hammann, P., Chicher, J., Pfeffer, S., 2020. Human Dicer helicase domain acts as an interaction platform to recruit PKR and dsRNA binding proteins during viral infection. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.095356>
- Morgens, D.W., Deans, R.M., Li, A., Bassik, M.C., 2016. Systematic comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi screens for essential genes. *Nat. Biotechnol.* 34, 634–636. <https://doi.org/10.1038/nbt.3567>
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A., Vaucheret, H., 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533–42.
- Mu, J., Xu, J., Zhang, L., Shu, T., Wu, D., Huang, M., Ren, Y., Li, X., Geng, Q., Xu, Y., Qiu, Y., Zhou, X., 2020. SARS-CoV-2-encoded nucleocapsid protein acts as a viral suppressor of RNA interference in cells. *Sci. China Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1692-1>
- Mukhopadhyay, U., Chanda, S., Patra, U., Mukherjee, A., Komoto, S., Chawla-Sarkar, M., 2019. Biphasic regulation of RNA interference during rotavirus infection by modulation of Argonaute2. *Cell. Microbiol.* 21, e13101. <https://doi.org/10.1111/cmi.13101>
- Munoz, D.M., Cassiani, P.J., Li, L., Billy, E., Korn, J.M., Jones, M.D., Golji, J., Ruddy, D.A., Yu, K., McAllister, G., DeWeck, A., Abramowski, D., Wan, J., Shirley, M.D., Neshat, S.Y., Rakiec, D., Beaumont, R. de, Weber, O., Kauffmann, A., McDonald, E.R., Keen, N., Hofmann, F., Sellers, W.R., Schmelzle, T., Stegmeier, F., Schlabach, M.R., 2016. CRISPR Screens Provide a Comprehensive Assessment of Cancer Vulnerabilities but Generate False-Positive Hits for Highly Amplified Genomic Regions. *Cancer Discov.* 6, 900–913. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0178>

- Mushegian, A.R., 2020. Are there  $10^{31}$  virus particles on Earth, or more, or less? *J. Bacteriol.* JB.00052-20, jb;JB.00052-20v1. <https://doi.org/10.1128/JB.00052-20>
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279–289. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279>
- Neumann, B., Held, M., Liebel, U., Erfle, H., Rogers, P., Pepperkok, R., Ellenberg, J., 2006. High-throughput RNAi screening by time-lapse imaging of live human cells. *Nat. Methods* 3, 385–390. <https://doi.org/10.1038/nmeth876>
- Nishi, A., Shirado, H., Rand, D.G., Christakis, N.A., 2015. Inequality and visibility of wealth in experimental social networks. *Nature* 526, 426–429. <https://doi.org/10.1038/nature15392>
- Nolan, P.M., Peters, J., Strivens, M., Rogers, D., Hagan, J., Spurr, N., Gray, I.C., Vizer, L., Brooker, D., Whitehill, E., Washbourne, R., Hough, T., Greenaway, S., Hewitt, M., Liu, X., McCormack, S., Pickford, K., Selley, R., Wells, C., Tymowska-Lalanne, Z., Roby, P., Glenister, P., Thornton, C., Thaug, C., Stevenson, J.A., Arkell, R., Mburu, P., Hardisty, R., Kiernan, A., Erven, A., Steel, K.P., Voegelings, S., Guenet, J.L., Nickols, C., Sadri, R., Nasse, M., Isaacs, A., Davies, K., Browne, M., Fisher, E.M., Martin, J., Rastan, S., Brown, S.D., Hunter, J., 2000. A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nat. Genet.* 25, 440–443. <https://doi.org/10.1038/78140>
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801. <https://doi.org/10.1038/287795a0>
- Obbard, D.J., Jiggins, F.M., Halligan, D.L., Little, T.J., 2006. Natural Selection Drives Extremely Rapid Evolution in Antiviral RNAi Genes. *Curr. Biol.* 16, 580–585. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.065>
- Okada, N., Shindo-Okada, N., Nishimura, S., 1977. Isolation of mammalian tRNA<sup>Asp</sup> and tRNA<sup>Tyr</sup> by lectin-Sepharose affinity column chromatography. *Nucleic Acids Res.* 4, 415–423. <https://doi.org/10.1093/nar/4.2.415>
- Omar, A., Koblet, H., 1988. Semliki Forest virus particles containing only the E1 envelope glycoprotein are infectious and can induce cell-cell fusion. *Virology* 166, 17–23. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90141-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90141-9)
- Palmer, W.H., Hadfield, J.D., Obbard, D.J., 2018. RNA-Interference Pathways Display High Rates of Adaptive Protein Evolution in Multiple Invertebrates. *Genetics* 208, 1585–1599. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300567>
- Pare, J.M., Sullivan, C.S., 2014. Distinct Antiviral Responses in Pluripotent versus Differentiated Cells. *PLoS Pathog.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003865>
- Paredes, A.M., Brown, D.T., Rothnagel, R., Chiu, W., Schoepp, R.J., Johnston, R.E., Prasad, B.V., 1993. Three-dimensional structure of a membrane-containing virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 9095–9099. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.9095>
- Paredes, A.M., Heidner, H., Thuman-Commike, P., Venkataram Prasad, B.V., Johnston, R.E., Chiu, W., 1998. Structural Localization of the E3 Glycoprotein in Attenuated Sindbis Virus Mutants. *J. Virol.* 72, 1534–1541. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.2.1534-1541.1998>
- Park, M.S., Phan, H.-D., Busch, F., Hinckley, S.H., Brackbill, J.A., Wysocki, V.H., Nakanishi, K., 2017. Human Argonaute3 has slicer activity. *Nucleic Acids Res.* 45, 11867–11877. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx916>
- Park, S.E., 2020. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *J. Korean Pediatr. Soc.* <https://doi.org/10.0000>

- Payne, C.K., Jones, S.A., Chen, C., Zhuang, X., 2007. Internalization and Trafficking of Cell Surface Proteoglycans and Proteoglycan-Binding Ligands. *Traffic* 8, 389–401. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00540.x>
- Perry, A.K., Chow, E.K., Goodnough, J.B., Yeh, W.-C., Cheng, G., 2004. Differential Requirement for TANK-binding Kinase-1 in Type I Interferon Responses to Toll-like Receptor Activation and Viral Infection. *J. Exp. Med.* 199, 1651–1658. <https://doi.org/10.1084/jem.20040528>
- Petitjean, O., Girardi, E., Ngondo, R.P., Lupashin, V., Pfeffer, S., 2020. Genome-wide CRISPR-Cas9 screen reveals common factors in dsRNA and Sindbis virus-induced cell death (preprint). *Microbiology*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.105528>
- Petitjean, O., Montavon, T., Pfeffer, S., 2018. En avoir ou pas, l'interférence par l'ARN comme défense antivirale chez les mammifères. *Virol. Montrouge Fr.* 22, 251–260. <https://doi.org/10.1684/vir.2018.0748>
- Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C.-A., Górna, M.W., Baumann, C.L., Burkard, T.R., Bürckstümmer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K.L., Rüllicke, T., Weber, F., Colinge, J., Müller, M., Superti-Furga, G., 2011. IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat. Immunol.* 12, 624–630. <https://doi.org/10.1038/ni.2048>
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.-P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., Reis e Sousa, C., 2009. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J. Virol.* 83, 10761–10769. <https://doi.org/10.1128/JVI.00770-09>
- Pickar-Oliver, A., Gersbach, C.A., 2019. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 490–507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>
- Poeck, H., Bscheider, M., Gross, O., Finger, K., Roth, S., Rebsamen, M., Hanneschläger, N., Schlee, M., Rothenfusser, S., Barchet, W., Kato, H., Akira, S., Inoue, S., Endres, S., Peschel, C., Hartmann, G., Hornung, V., Ruland, J., 2010. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 $\beta$  production. *Nat. Immunol.* 11, 63–69. <https://doi.org/10.1038/ni.1824>
- Pourcel, C., Salvignol, G., Vergnaud, G., 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiol. Read. Engl.* 151, 653–663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
- Pourcelot, M., Zemirli, N., Silva Da Costa, L., Loyant, R., Garcin, D., Vitour, D., Munitic, I., Vazquez, A., Arnoult, D., 2016. The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing. *BMC Biol.* 14, 69. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0292-z>
- Pratt, A.J., MacRae, I.J., 2009. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J. Biol. Chem.* 284, 17897–17901. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900012200>
- Qian, Q., Zhou, H., Shu, T., Mu, J., Fang, Y., Xu, J., Li, T., Kong, J., Qiu, Y., Zhou, X., 2020. The Capsid Protein of Semliki Forest Virus Antagonizes RNA Interference in Mammalian Cells. *J. Virol.* 94. <https://doi.org/10.1128/JVI.01233-19>
- Qiu, Y., Xu, Y., Zhang, Y., Zhou, H., Deng, Y.-Q., Li, X.-F., Miao, M., Zhang, Q., Zhong, B., Hu, Y., Zhang, F.-C., Wu, L., Qin, C.-F., Zhou, X., 2017. Human Virus-Derived Small RNAs Can Confer Antiviral Immunity in Mammals. *Immunity* 46, 992-1004.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.006>
- Qiu, Y., Xu, Y.-P., Wang, M., Miao, M., Zhou, H., Xu, J., Kong, J., Zheng, D., Li, R.-T., Zhang, R.-R., Guo, Y., Li, X.-F., Cui, J., Qin, C.-F., Zhou, X., 2020. Flavivirus induces and

- antagonizes antiviral RNA interference in both mammals and mosquitoes. *Sci. Adv.* 6. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7989>
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rauscher, B., Heigwer, F., Breinig, M., Winter, J., Boutros, M., 2017. GenomeCRISPR - a database for high-throughput CRISPR/Cas9 screens. *Nucleic Acids Res.* 45, D679–D686. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw997>
- Reynders, E., Foulquier, F., Leão Teles, E., Quelhas, D., Morelle, W., Rabouille, C., Annaert, W., Matthijs, G., 2009. Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3244–3256. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp262>
- Reynolds, A., 2006. Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA* 12, 988–993. <https://doi.org/10.1261/rna.2340906>
- Rigby, R.E., Webb, L.M., Mackenzie, K.J., Li, Y., Leitch, A., Reijns, M.A.M., Lundie, R.J., Revuelta, A., Davidson, D.J., Diebold, S., Modis, Y., MacDonald, A.S., Jackson, A.P., 2014. RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9. *EMBO J.* 33, 542–558. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386117>
- Romano, N., Macino, G., 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6, 3343–3353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x>
- Rose, P.P., Hanna, S.L., Spiridigliozzi, A., Wannissorn, N., Beiting, D.P., Ross, S.R., Hardy, R.W., Bambina, S.A., Heise, M.T., Cherry, S., 2011. Natural Resistance-Associated Macrophage Protein Is a Cellular Receptor for Sindbis Virus in Both Insect and Mammalian Hosts. *Cell Host Microbe* 10, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.06.009>
- Rosenbluh, J., Xu, H., Harrington, W., Gill, S., Wang, X., Vazquez, F., Root, D.E., Tsherniak, A., Hahn, W.C., 2017. Complementary information derived from CRISPR Cas9 mediated gene deletion and suppression. *Nat. Commun.* 8, 15403. <https://doi.org/10.1038/ncomms15403>
- Rusnati, M., Vicenzi, E., Donalisio, M., Oreste, P., Landolfo, S., Lembo, D., 2009. Sulfated K5 *Escherichia coli* polysaccharide derivatives: A novel class of candidate antiviral microbicides. *Pharmacol. Ther.* 123, 310–322. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.05.001>
- Ryazansky, S., Kulbachinskiy, A., Aravin, A.A., 2018. The Expanded Universe of Prokaryotic Argonaute Proteins. *mBio* 9, e01935-18, [/mbio/9/6/mBio.01935-18.atom](https://doi.org/10.1128/mBio.01935-18). <https://doi.org/10.1128/mBio.01935-18>
- Ryman, K.D., Klimstra, W.B., Nguyen, K.B., Biron, C.A., Johnston, R.E., 2000. Alpha/beta interferon protects adult mice from fatal Sindbis virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism. *J. Virol.* 74, 3366–3378. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3366-3378.2000>
- Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., Gale, M., 2008. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 454, 523–527. <https://doi.org/10.1038/nature07106>
- Samuel, C.E., 2011. Adenosine Deaminases Acting on RNA (ADARs) are both Antiviral and Proviral Dependent upon the Virus. *Virology* 411, 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.004>
- Sanjana, N.E., Shalem, O., Zhang, F., 2014. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* 11, 783–784. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3047>

- Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., Shimizu, N., 2003. Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 82, 323–330. [https://doi.org/10.1016/s0888-7543\(03\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0888-7543(03)00129-0)
- Savidis, G., McDougall, W.M., Meraner, P., Perreira, J.M., Portmann, J.M., Trincucci, G., John, S.P., Aker, A.M., Renzette, N., Robbins, D.R., Guo, Z., Green, S., Kowalik, T.F., Brass, A.L., 2016. Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Rep.* 16, 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.028>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlee, M., Hartmann, G., 2016. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 566–580. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.78>
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C.A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juranek, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K.A., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., Ludwig, J., Hartmann, G., 2009. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 31, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.008>
- Schmidt, E.E., Pelz, O., Buhlmann, S., Kerr, G., Horn, T., Boutros, M., 2013. GenomeRNAi: a database for cell-based and in vivo RNAi phenotypes, 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 41, D1021-1026. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1170>
- Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., Rice, C.M., 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schoggins, J.W., 2019. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu. Rev. Virol.* 6, 567–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>
- Schott, D.H., Cureton, D.K., Whelan, S.P., Hunter, C.P., 2005. An antiviral role for the RNA interference machinery in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18420–4.
- Schramek, D., Sendoel, A., Segal, J.P., Beronja, S., Heller, E., Oristian, D., Reva, B., Fuchs, E., 2014. Direct in vivo RNAi screen unveils myosin IIa as a tumor suppressor of squamous cell carcinomas. *Science* 343, 309–313. <https://doi.org/10.1126/science.1248627>
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A., 2004. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
- Schuberth-Wagner, C., Ludwig, J., Bruder, A.K., Herzner, A.-M., Zillinger, T., Goldeck, M., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J.L., Kerber, R., Wolter, S., Stümpel, J.-P., Roth, A., Bartok, E., Drost, C., Coch, C., Hornung, V., Barchet, W., Kümmerer, B.M., Hartmann, G., Schlee, M., 2015. A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'O-Methylated Self RNA. *Immunity* 43, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.015>
- Schuster, A., Erasimus, H., Fritah, S., Nazarov, P.V., van Dyck, E., Niclou, S.P., Golebiewska, A., 2019. RNAi/CRISPR Screens: from a Pool to a Valid Hit. *Trends Biotechnol.* 37, 38–55. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.002>

- Schuster, S., Overheul, G.J., Bauer, L., Kuppeveld, F.J.M. van, Rij, R.P. van, 2019. No evidence for viral small RNA production and antiviral function of Argonaute 2 in human cells. *Sci. Rep.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50287-w>
- Seo, M., Lee, S., Kim, J.-H., Lee, W.-H., Hu, G., Elledge, S.J., Suk, K., 2014. RNAi-based functional selection identifies novel cell migration determinants dependent on PI3K and AKT pathways. *Nat. Commun.* 5, 5217. <https://doi.org/10.1038/ncomms6217>
- Shabalina, S.A., Koonin, E.V., 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol. Evol.* 23, 578–587. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>
- Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T.S., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., Zhang, F., 2014. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* 343, 84–87. <https://doi.org/10.1126/science.1247005>
- Shalem, O., Sanjana, N.E., Zhang, F., 2015. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat. Rev. Genet.* 16, 299–311. <https://doi.org/10.1038/nrg3899>
- Shan, G., Li, Y., Zhang, J., Li, W., Szulwach, K.E., Duan, R., Faghihi, M.A., Khalil, A.M., Lu, L., Paroo, Z., Chan, A.W.S., Shi, Z., Liu, Q., Wahlestedt, C., He, C., Jin, P., 2008. A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat. Biotechnol.* 26, 933–940. <https://doi.org/10.1038/nbt.1481>
- Shapiro, J.S., Varble, A., Pham, A.M., Tenoever, B.R., 2010. Noncanonical cytoplasmic processing of viral microRNAs. *RNA N. Y. N* 16, 2068–2074. <https://doi.org/10.1261/rna.2303610>
- Shen, J.P., Zhao, D., Sasik, R., Luebeck, J., Birmingham, A., Bojorquez-Gomez, A., Licon, K., Klepper, K., Pekin, D., Beckett, A.N., Sanchez, K.S., Thomas, A., Kuo, C.-C., Du, D., Roguev, A., Lewis, N.E., Chang, A.N., Kreisberg, J.F., Krogan, N., Qi, L., Ideker, T., Mali, P., 2017. Combinatorial CRISPR-Cas9 screens for de novo mapping of genetic interactions. *Nat. Methods* 14, 573–576. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4225>
- Silhavy, D., Molnar, A., Luciola, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyan, J., 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *Embo J* 21, 3070–80.
- Sladitschek, H.L., Neveu, P.A., 2016. Bidirectional Promoter Engineering for Single Cell MicroRNA Sensors in Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE* 11, e0155177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155177>
- Solyom, S., Kazazian, H.H., 2012. Mobile elements in the human genome: implications for disease. *Genome Med.* 4, 12. <https://doi.org/10.1186/gm311>
- Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P., Michiels, T., 2008. IFN-Lambda (IFN- $\lambda$ ) Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells In Vivo. *PLoS Pathog.* 4, e1000017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000017>
- Stadtmauer, E.A., Fraietta, J.A., Davis, M.M., Cohen, A.D., Weber, K.L., Lancaster, E., Mangan, P.A., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Chen, F., Tian, L., Gonzalez, V.E., Xu, J., Jung, I., Melenhorst, J.J., Plesa, G., Shea, J., Matlawski, T., Cervini, A., Gaymon, A.L., Desjardins, S., Lamontagne, A., Salas-Mckee, J., Fesnak, A., Siegel, D.L., Levine, B.L., Jadowsky, J.K., Young, R.M., Chew, A., Hwang, W.-T., Hexner, E.O., Carreno, B.M., Nobles, C.L., Bushman, F.D., Parker, K.R., Qi, Y., Satpathy, A.T., Chang, H.Y., Zhao, Y., Lacey, S.F., June, C.H., 2020. CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* 367. <https://doi.org/10.1126/science.aba7365>
- Sudhakar, A., Ramachandran, A., Ghosh, S., Hasnain, S.E., Kaufman, R.J., Ramaiah, K.V.A., 2000. Phosphorylation of Serine 51 in Initiation Factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) Promotes Complex Formation between eIF2 $\alpha$ (P) and eIF2B and Causes Inhibition in the Guanine Nucleotide Exchange Activity of eIF2B. *Biochemistry* 39, 12929–12938. <https://doi.org/10.1021/bi0008682>



- Suttle, C.A., 2013. Viruses: unlocking the greatest biodiversity on Earth. *Genome* 56, 542–544. <https://doi.org/10.1139/gen-2013-0152>
- Szittyá, G., Burguyán, J., 2013. RNA interference-mediated intrinsic antiviral immunity in plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 371, 153–181. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-37765-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-37765-5_6)
- Tanaka, A., Tumkosit, U., Nakamura, S., Motooka, D., Kishishita, N., Priengprom, T., Sa-Ngasang, A., Kinoshita, T., Takeda, N., Maeda, Y., 2017. Genome-Wide Screening Uncovers the Significance of N-Sulfation of Heparan Sulfate as a Host Cell Factor for Chikungunya Virus Infection. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00432-17>
- Tang, W., Dodge, M., Gundapaneni, D., Michnoff, C., Roth, M., Lum, L., 2008. A genome-wide RNAi screen for Wnt/beta-catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9697–9702. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804709105>
- Tatematsu, M., Nishikawa, F., Seya, T., Matsumoto, M., 2013. Toll-like receptor 3 recognizes incomplete stem structures in single-stranded viral RNA. *Nat. Commun.* 4, 1833. <https://doi.org/10.1038/ncomms2857>
- tenOever, B.R., 2016. The Evolution of Antiviral Defense Systems. *Cell Host Microbe* 19, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.006>
- Thakore, P.I., D’Ippolito, A.M., Song, L., Safi, A., Shivakumar, N.K., Kabadi, A.M., Reddy, T.E., Crawford, G.E., Gersbach, C.A., 2015. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. *Nat. Methods* 12, 1143–1149. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3630>
- Tock, M.R., Dryden, D.T., 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.003>
- Tough, D.F., 2004. Type I Interferon as a Link Between Innate and Adaptive Immunity through Dendritic Cell Stimulation. *Leuk. Lymphoma* 45, 257–264. <https://doi.org/10.1080/1042819031000149368>
- Tsai, K., Courtney, D.G., Kennedy, E.M., Cullen, B.R., 2018. Influenza A virus-derived siRNAs increase in the absence of NS1 yet fail to inhibit virus replication. *RNA* rna.066332.118. <https://doi.org/10.1261/rna.066332.118>
- Valente, G., Ozmen, L., Novelli, F., Geuna, M., Palestro, G., Forni, G., Garotta, G., 1992. Distribution of interferon- $\gamma$  receptor in human tissues. *Eur. J. Immunol.* 22, 2403–2412. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220933>
- van der Veen, A.G., Maillard, P.V., Schmidt, J.M., Lee, S.A., Deddouche-Grass, S., Borg, A., Kjær, S., Snijders, A.P., Reis e Sousa, C., 2018. The RIG-I-like receptor LGP2 inhibits Dicer-dependent processing of long double-stranded RNA and blocks RNA interference in mammalian cells. *EMBO J.* 37, e97479. <https://doi.org/10.15252/embj.201797479>
- van Rij, R.P., Saleh, M.-C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., Andino, R., 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 20, 2985–2995. <https://doi.org/10.1101/gad.1482006>
- Villarino, A.V., Kanno, Y., Ferdinand, J.R., O’Shea, J.J., 2015. Mechanisms of Jak/STAT Signaling in Immunity and Disease. *J. Immunol.* 194, 21–27. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401867>
- Vlasak, M., Goesler, I., Blaas, D., 2005. Human rhinovirus type 89 variants use heparan sulfate proteoglycan for cell attachment. *J. Virol.* 79, 5963–5970. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.5963-5970.2005>
- Wagner, E., Altuvia, S., Romby, P., 2002. 12 Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements, in: *Advances in Genetics*. Elsevier, pp. 361–398. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(02\)46013-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(02)46013-0)

- Wahlberg, J.M., Garoff, H., 1992. Membrane fusion process of Semliki Forest virus. I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. *J. Cell Biol.* 116, 339–348. <https://doi.org/10.1083/jcb.116.2.339>
- Wang, S., Zhang, Q., Tiwari, S.K., Lichinchi, G., Yau, E.H., Hui, H., Li, W., Furnari, F., Rana, T.M., 2020. Integrin  $\alpha\beta 5$  Internalizes Zika Virus during Neural Stem Cells Infection and Provides a Promising Target for Antiviral Therapy. *Cell Rep.* 30, 969–983.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.020>
- Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., Lander, E.S., 2014. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343, 80–84. <https://doi.org/10.1126/science.1246981>
- Wassenegger, M., Krczal, G., 2006. Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci.* 11, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.003>
- Waugh, D.S., 2011. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr. Purif.* 80, 283–293. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.08.005>
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S.B., Hartmann, R., Paludan, S.R., 2006. Double-Stranded RNA Is Produced by Positive-Strand RNA Viruses and DNA Viruses but Not in Detectable Amounts by Negative-Strand RNA Viruses. *J. Virol.* 80, 5059–5064. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.5059-5064.2006>
- Wei, L., Lee, D., Law, C.-T., Zhang, M.S., Shen, J., Chin, D.W.-C., Zhang, A., Tsang, F.H.-C., Wong, C.L.-S., Ng, I.O.-L., Wong, C.C.-L., Wong, C.-M., 2019. Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified PHGDH as a critical driver for Sorafenib resistance in HCC. *Nat. Commun.* 10, 4681. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12606-7>
- Wengler, G., Wengler, G., 1984. Identification of a transfer of viral core protein to cellular ribosomes during the early stages of alphavirus infection. *Virology* 134, 435–442. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90310-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90310-6)
- Wengler, Gerd, Wengler, Gisela, 2002. In vitro analysis of factors involved in the disassembly of Sindbis virus cores by 60S ribosomal subunits identifies a possible role of low pH. *J. Gen. Virol.* 83, 2417–2426. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2417>
- Whitehurst, A.W., Bodemann, B.O., Cardenas, J., Ferguson, D., Girard, L., Peyton, M., Minna, J.D., Michnoff, C., Hao, W., Roth, M.G., Xie, X.-J., White, M.A., 2007. Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. *Nature* 446, 815–819. <https://doi.org/10.1038/nature05697>
- Willett, R., Ungar, D., Lupashin, V., 2013. The Golgi puppet master: COG complex at center stage of membrane trafficking interactions. *Histochem. Cell Biol.* 140, 271–283. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1117-6>
- Williams, R.W., Rubin, G.M., 2002. ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6889–6894. <https://doi.org/10.1073/pnas.072190799>
- Wilson, R.C., Doudna, J.A., 2013. Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu. Rev. Biophys.* 42, 217–239. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
- Wreschner, D.H., McCauley, J.W., Skehel, J.J., Kerr, I.M., 1981. Interferon action--sequence specificity of the ppp(A2'p)nA-dependent ribonuclease. *Nature* 289, 414–417. <https://doi.org/10.1038/289414a0>
- Wu, X., Dao Thi, V.L., Huang, Y., Billerbeck, E., Saha, D., Hoffmann, H.-H., Wang, Y., Silva, L.A.V., Sarbanes, S., Sun, T., Andrus, L., Yu, Y., Quirk, C., Li, M., MacDonald, M.R., Schneider, W.M., An, X., Rosenberg, B.R., Rice, C.M., 2017. Intrinsic Immunity Shapes Viral Resistance of Stem Cells. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.018>

- Wu, X., Scott, D.A., Kriz, A.J., Chiu, A.C., Hsu, P.D., Dadon, D.B., Cheng, A.W., Trevino, A.E., Konermann, S., Chen, S., Jaenisch, R., Zhang, F., Sharp, P.A., 2014. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 32, 670–676. <https://doi.org/10.1038/nbt.2889>
- Xu, Y.-P., Qiu, Y., Zhang, B., Chen, G., Chen, Q., Wang, M., Mo, F., Xu, J., Wu, J., Zhang, R.-R., Cheng, M.-L., Zhang, N.-N., Lyu, B., Zhu, W.-L., Wu, M.-H., Ye, Q., Zhang, D., Man, J.-H., Li, X.-F., Cui, J., Xu, Z., Hu, B., Zhou, X., Qin, C.-F., 2019. Zika virus infection induces RNAi-mediated antiviral immunity in human neural progenitors and brain organoids. *Cell Res.* 29, 265–273. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0152-9>
- Yakovov, N., Debard, S., Fischer, F., Senger, B., Becker, H.D., 2018. Cytosolic aminoacyl-tRNA synthetases: Unanticipated relocations for unexpected functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1861, 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.11.004>
- Yard, B.A., Lorentz, C.P., Herr, D., van der Woude, F.J., 1998. Sulfation-dependent down-regulation of interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class I and II and intercellular adhesion molecule-1 expression on tubular and endothelial cells by glycosaminoglycans. *Transplantation* 66, 1244–1250. <https://doi.org/10.1097/00007890-199811150-00021>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
- Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.-C.G., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J., Mello, C.C., 2006. Analysis of the *C. elegans* Argonaute Family Reveals that Distinct Argonautes Act Sequentially during RNAi. *Cell* 127, 747–757. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.033>
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T., 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5, 730–737. <https://doi.org/10.1038/ni1087>
- Yuen, G., Khan, F.J., Gao, S., Stommel, J.M., Batchelor, E., Wu, X., Luo, J., 2017. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout is insensitive to target copy number but is dependent on guide RNA potency and Cas9/sgRNA threshold expression level. *Nucleic Acids Res.* 45, 12039–12053. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx843>
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80620-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80620-0)
- Zhang, Q., Zhang, C., Xi, Z., 2008. Enhancement of RNAi by a small molecule antibiotic enoxacin. *Cell Res.* 18, 1077–1079. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.287>
- Zhang, R., Miner, J.J., Gorman, M.J., Rausch, K., Ramage, H., White, J.P., Zuiani, A., Zhang, P., Fernandez, E., Zhang, Q., Dowd, K.A., Pierson, T.C., Cherry, S., Diamond, M.S., 2016. A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses. *Nature* 535, 164–168. <https://doi.org/10.1038/nature18625>
- Zhang, X., Fugère, M., Day, R., Kielian, M., 2003. Furin processing and proteolytic activation of Semliki Forest virus. *J. Virol.* 77, 2981–2989. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.2981-2989.2003>
- Zhang, X., Yuan, Y.-R., Pei, Y., Lin, S.-S., Tuschl, T., Patel, D.J., Chua, N.-H., 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20, 3255–3268. <https://doi.org/10.1101/gad.1495506>

- Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.-Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P., Shu, H.-B., 2008. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29, 538–550. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.003>
- Zhou, H., Qian, Q., Shu, T., Xu, J., Kong, J., Mu, J., Qiu, Y., Zhou, X., 2019. Hepatitis C Virus NS2 Protein Suppresses RNA Interference in Cells. *Virol. Sin.* 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00182-5>
- Zhou, J., Wang, Y., Chang, Q., Ma, P., Hu, Y., Cao, X., 2018. Type III Interferons in Viral Infection and Antiviral Immunity. *Cell. Physiol. Biochem.* 51, 173–185. <https://doi.org/10.1159/000495172>
- Zhou, R., Rana, T.M., 2013. RNA-based mechanisms regulating host-virus interactions. *Immunol. Rev.* 253, 97–111. <https://doi.org/10.1111/imr.12053>
- Zhou, Y., Zhu, S., Cai, C., Yuan, P., Li, C., Huang, Y., Wei, W., 2014. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature* 509, 487–491. <https://doi.org/10.1038/nature13166>

# Annexes

# Apports et enseignements de la virologie en biologie contemporaine

Lucie Bellott<sup>1,a</sup>  
 Amel Chaïb<sup>1,a</sup>  
 Olivier Petitjean<sup>1,a</sup>  
 Pauline Rigo<sup>1,a</sup>  
 David Gilmer<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Master de biologie  
 des micro-organismes-  
 parcours virologies, promotion Jules  
 Hoffmann,  
 Faculté des sciences de la vie,  
 Université de Strasbourg,  
 67000 Strasbourg, France  
<sup>2</sup> Université de Strasbourg,  
 CNRS, IBMP UPR 2357,  
 67000 Strasbourg, France  
 <david.gilmer@ibmp-cnrs.unistra.fr>

**Résumé.** La virologie est une science jeune et à l'origine de nombreuses découvertes qui ont révolutionné notre vision de la biologie. Souvent associée à l'étude de pathologies, cette science répond à des questions beaucoup plus fondamentales où elle apporte les outils moléculaires nécessaires à la manipulation cellulaire. Si les virus sont considérés comme des ennemis ils sont utilisés, parfois en dernier recours, contre des bactéries résistantes aux antibiotiques ou pour le traitement de certains cancers.

**Mots clés :** virologie, histoire des sciences, enseignement, master

**Abstract.** Virology is a young discipline at the origin of discoveries that revolutionized our vision of biology. Often associated to pathological studies, this science raises more fundamental questions and brings molecular tools required for cellular manipulation. If viruses are considered as our enemies, they are used, sometimes as a last attempt, against multidrug resistant bacteria or to treat cancer.

**Key words:** Virology, history of science, teaching, master degree

## Introduction

L'heure est aux questionnements multiples sur l'édition de génomes et l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés. La mise en œuvre de l'édition de gènes est facilitée par des outils de plus en plus performants et de moins en moins coûteux. L'origine de ces outils est liée à la découverte de Lederberg et Tatum de la transduction généralisée par les bactériophages lytiques [1, 2], puis à l'émergence d'idées visant à utiliser des virus, vecteurs de gènes pour des protocoles de thérapie génique [3] ; de nos jours les virus sont utilisés dans la quasi-totalité des protocoles de thérapie génique [4-6].

La rétrospective de grandes découvertes en biologie contemporaine (nous) amène à placer la virologie sur un piédestal, première marche d'un podium largement passée sous silence. Exception faite des émois médiatiques (parfois dignes de ceux de romans de science-fiction et films de série Z) liés à des épidémies virales, qui a réellement conscience des apports de la virologie en biologie moderne ? Notre considération pour cette discipline n'est pas partagée par tous, même au sein de la communauté scientifique « mère » de la virologie, la microbiologie.

**Tirés à part :** D. Gilmer

<sup>a</sup> Tous ces étudiants ont contribué de façon égale à l'élaboration du point de vue.

Les virus ne possèdent pas en propre de système de traduction. Ils usent et abusent de celui de leur hôte, ce qui fait d'eux des parasites intracellulaires obligatoires, comme l'indique avec précision la définition donnée par A. Lwoff [7] dans laquelle les virus sont, entre autres, des entités ultrafiltrables ne renfermant qu'un seul type d'acide nucléique comme génome. Cette définition est devenue obsolète depuis la découverte, entre autres, des virus géants non ultrafiltrables. Cela implique une révision de la définition des virus comme le suggèrent J.-M. Claverie et C. Abergel [8]. Toutefois une telle révision n'empêche pas la classification des virus selon les règles édictées par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses, <http://www.ictvonline.org/>) en dehors du vivant puisque les séquences codant les ARNr 16S ou 18S sont absentes des génomes viraux.

Cependant l'émergence du concept de *virocell*, définissant la cellule parasitée comme l'entité virale à part entière [9], apporte une nouvelle dimension à cette discipline née quelques années après Jeanne Calment<sup>1</sup>. Nos capacités à envoyer des engins dans l'espace repoussent les limites de l'exploration aux confins du système solaire, mais sachons que non loin de nous se cache un nombre incalculable de

<sup>1</sup> [https://fr.wikipedia.org/wiki/Jeanne\\_Calment](https://fr.wikipedia.org/wiki/Jeanne_Calment) ; liberation.fr/evnement/1997/08/05/la-doyenne-de-l-humanite-est-decedee-hier-a-122-ansjeanne-s-en-est-allee-calmement-nee-en-1875-a-arl\_213690 (consulté le 02/10/17)

virus qui défie l'entendement. À l'échelle de la planète, la taille cumulée des virus infectant bactéries et archées avoisine 1700 fois le diamètre de notre galaxie<sup>2</sup>. Par conséquent notre monde est aussi celui des virus, eux-mêmes en constante évolution. La majorité d'entre eux reste à caractériser et pourrait apporter comme leurs aïeux lambda, T4, T7, ØX174, M13, MS2, Qβ, de nouveaux outils pour aborder le futur désert thérapeutique lié aux résistances croissantes des pathogènes vis-à-vis des chimiothérapies conventionnelles. D'Herelle l'avait bien compris : quelle que soit la bactérie pathogène il y aura toujours un phage (virus infectant les bactéries) pour la détruire [10]. Malheureusement l'usage des antibiotiques a globalement étouffé cette approche thérapeutique, exception faite de pays de l'Europe de l'Est où l'institut Eliava (Géorgie) a pérennisé l'utilisation de cocktails de virus pour lutter contre des infections bactériennes. Un recours à la phagothérapie (thérapie à l'aide de bactériophages) pourrait peut-être endiguer les populations de bactéries multirésistantes aux antibiotiques [11]. Une approche comparable a été initiée pour rechercher des virus capables de lutter efficacement contre des cellules tumorales. Cet aspect plus contemporain de la biologie ne peut pas être développé sans un bilan historique des grandes découvertes effectuées grâce à l'étude des virus et sans savoir comment celles-ci sont perçues, en particulier dans l'enseignement supérieur.

Après un aperçu chronologique illustré par les frises de la *figure 1* incluant des contributions majeures apportées par la virologie, nous avons établi une liste non exhaustive de l'apport des découvertes récentes en virologie dans la biologie actuelle et tenté de lister certaines formations de master en virologie proposées dans les universités françaises. Parmi ces offres nous avons recherché s'il existait une formation universitaire dispensant des enseignements non orientés vers la biomédecine et par conséquent traitant de l'ensemble de la discipline. Les résultats de notre enquête sont décrits dans la seconde partie de cet article.

## Historique

Le lecteur est invité à consulter la version pdf du livre de Frederick A. Murphy *The Foundations of Virology* (accessible sur <https://www.utmb.edu/virusimages>) [12].

### Découverte des virus

Hippocrate (400 av. J.-C.) avait établi certaines corrélations entre les maladies infectieuses et contagieuses et leurs symptômes, l'hygiène ou les cycles saisonniers.

Beaucoup plus tard, les observations d'un champignon microscopique<sup>3</sup> par Robert Hooke en 1665, puis celle de bactéries par Antonie van Leeuwenhoek trois ans après, n'ont cependant pas permis d'établir de lien entre micro-organismes et pathologies (*figure 1A*). Il faudra attendre les travaux de Koch sur *Bacillus anthracis* publiés en 1876 (*figure 1A*, pour revue voir [24]) et de Pasteur pour identifier les agents étiologiques de nombreuses maladies liées aux infections bactériennes et fongiques ; ces découvertes sont à l'origine des postulats de Koch (1884) reliant sans ambiguïté un pathogène et une maladie. L'existence des virus a scientifiquement été démontrée grâce aux travaux de Martinus W. Beijerinck (1898) qui a défini le terme *contagium vivum fluidum* en travaillant sur la mosaïque du tabac et ceux de Friedrich Loeffler & Paul Frosch concernant l'étiologie de la fièvre aphteuse (*foot-and-mouth disease virus*). Ce n'est qu'en 1938 que des particules virales sont observées pour la première fois par Von Borries, Ruska & Knoll grâce à l'invention du microscope électronique à transmission (*figure 1B*) [25].

La présence ancienne des virus ou de leurs effets est attestée par diverses gravures, écrits, peintures, voire ADN anciens (momies. . .). Des pratiques vaccinales empiriques mais efficaces ont apporté les fondements de l'immunologie (variolisation, *figure 1A*). La fin du second millénaire voit l'essor des descriptions de maladies d'origine virale et d'un lien entre certaines de ces infections et le développement de cancers. Un dogme apparaît : tout être vivant est cible d'au moins un virus, même certains virus. En effet la description du virophage Spoutnik par La Scola [20] étaye la notion que les virus (les *virocells*) sont « vivants » (*figure 1C*). L'existence de virophages est à rapprocher de la description des virus satellites et ARN satellites décrits chez certains virus animaux (AAV, HDV<sup>4</sup>) et chez les virus de plantes [26] voire chez les bactériophages [27]. Ces satellites nécessitent l'aide d'un virus assistant pour leur encapsidation ou leur réplication. Une telle relation affecte nécessairement la biologie du virus assistant, à l'instar de Spoutnik et du virus géant mamavirus.

Les virus peuvent être considérés par certains comme étant à l'origine de la vie, directeurs de l'évolution [28-30] ou, de façon plus conventionnelle, comme des agents infectieux et pathogènes. Quelle que soit l'opinion, la contribution des virus dans les équilibres biologiques est indéniable tout comme l'apport de la virologie dans la biologie contemporaine. En effet les virus, dont le matériel génétique est constitué soit d'acide désoxyribonucléique soit d'acide ribonucléique, sont rapidement apparus comme des outils de choix pour l'investigation des processus biologiques.

<sup>2</sup> Microbiology by numbers. *Nat Rev Microbiol* 2011 ; 9 : 628. (Éditorial)

<sup>3</sup> *Mucor* de la classe des Zygomycètes.

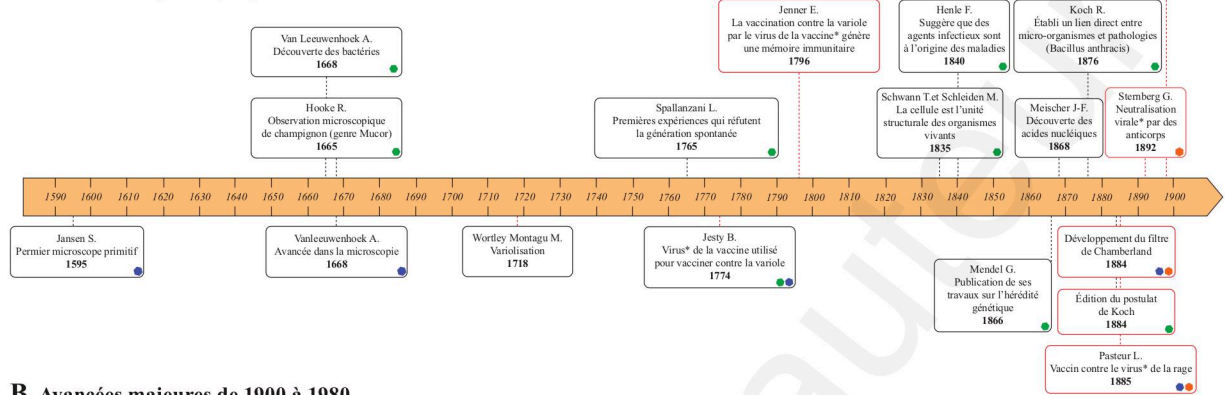
<sup>4</sup> AAV : *adeno associated virus* ; HDV : *hepatitis delta virus*.

Découvertes liées aux virus

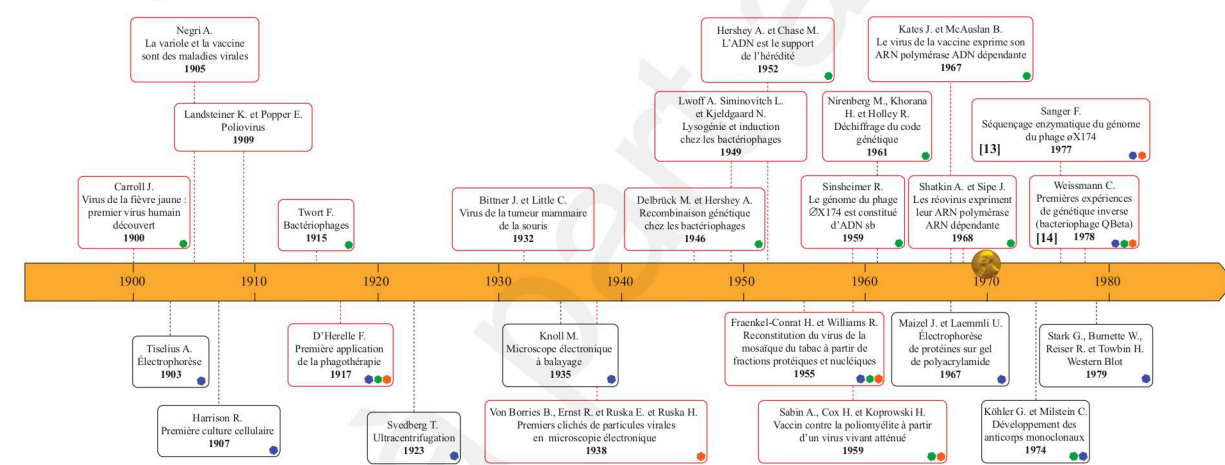
Méthodes nées de la virologie  
Apports cognitifs

Avancées techniques fondamentales

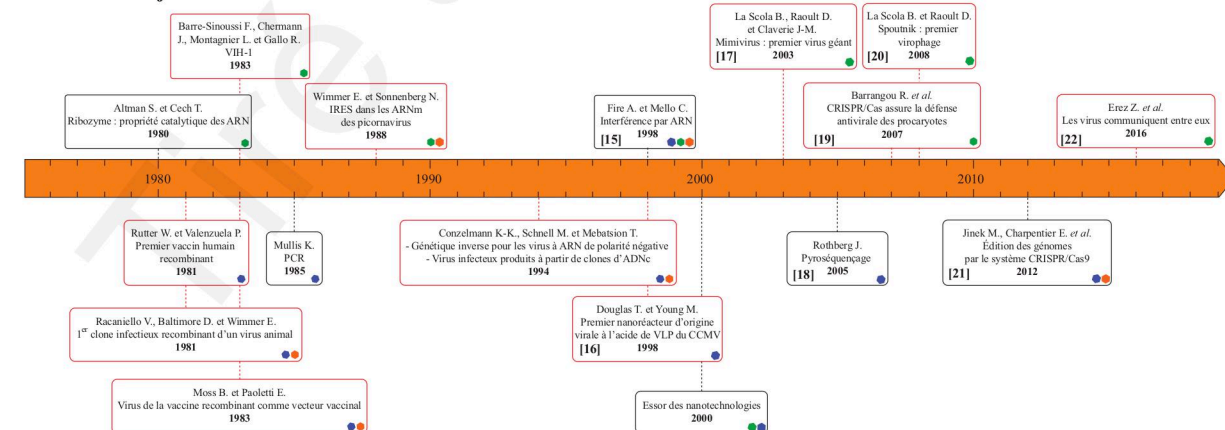
A. Avancées majeures jusqu'en 1900



B. Avancées majeures de 1900 à 1980



C. Avancées majeures de 1980 à 2017





**Figure 1.** Représentation chronologique des découvertes et techniques ayant contribué à l'essor de la biologie (A) avant 1900, (B) entre 1900 et 1980 et (C) de 1980 à nos jours. Les éléments associés à la virologie sont encadrés en rouge, les avancées techniques (indiquées par des hexagones bleus), liées à la virologie (hexagones orange) ayant enrichi nos connaissances (hexagones verts) sont indiquées. Le terme « virus » du panneau A (indiqué par des astérisques) est utilisé dans une description actualisée des découvertes et ne se réfère en rien à son utilisation à la date considérée. Seules les dernières références bibliographiques sont indiquées [13–22]. L'icône du prix Nobel (1970) illustre la découverte de la transcriptase inverse par David Baltimore [23]. Les frises ont été créées à l'aide de l'outil en ligne frisechronos.fr/.

### *La virologie et sa contribution à l'essor de la biologie (moléculaire)*

#### **De la virologie à la science actuelle**

La virologie a fortement contribué et contribue encore à l'essor d'une meilleure compréhension de la biologie de la cellule. La description des principaux mécanismes constituant le « dogme de la biologie moléculaire » (réplication, transcription et traduction) a été rendue possible grâce à des outils biologiques dont le génome est de taille limitée et qui se multiplient rapidement : les virus. L'établissement d'une liste exhaustive de l'ensemble de ces découvertes induirait certainement un effet opposé à celui escompté. Aussi nous avons décidé de présenter les découvertes ayant conduit à des réorientations majeures en biologie, laissant au lecteur le libre choix d'explorer d'autres aspects non développés ici et, pourquoi pas, de les décrire dans un prochain volet de ce type de revue.

Par leur forte diversité génomique (ADN ou ARN), leurs stratégies d'expression variées, et les mécanismes utilisés pour détourner la machinerie cellulaire (traduction cellulaire limitée au profit de l'ARN génomique ou des messagers viraux, induction du cycle cellulaire, etc.) les virus constituent des outils de choix pour l'étude de chacune des étapes du dogme de la biologie moléculaire. Ces caractéristiques ont permis de décrypter le code génétique, de détailler les mécanismes de la réplication de l'ADN, de la recombinaison, de la transcription et de sa régulation, de découvrir la transcription inverse... La compréhension (parfois partielle) des cycles viraux a également permis de détourner des fonctions virales à des fins biotechnologiques, de créer des outils moléculaires (vecteurs d'expression) ou thérapeutiques (comme par exemple des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique) ou encore d'immortaliser des lignées cellulaires grâce à des protéines virales à action mitogène comme par exemple l'antigène T du virus simien n° 40 (SV40).

### *La virologie, la génétique et l'ADN*

Dès 1944 les expériences d'Avery, MacLeod & McCarty [31] suggèrent que l'ADN est le support de l'information génétique. Cette démonstration ne convainquit pas immédiatement la communauté scientifique pour laquelle la complexité de la structure des protéines semblait suffisante pour rejeter toute implication de l'ADN comme support de l'hérédité. Ce n'est qu'en 1952 qu'Alfred Hershey et

Martha Chase [32] démontrent que l'ADN est le support de l'information génétique (*figure 1B*) en utilisant le bactériophage T2 et *Escherichia coli*. Leur approche prouve sans ambiguïté que le virus injecte son acide nucléique dans la bactérie et que ce transfert est suffisant pour assurer la réplication virale. Le déchiffrement du code génétique est commencé dès 1961 par Marshall Nirenberg et Heinrich J. Matthaei [33] (*figure 1B*). Le premier génome entièrement séquencé est celui du bactériophage  $\Phi$ X174, grâce à la méthode de Sanger [13] (*figure 1B*). En étudiant les séquences virales furent découverts les gènes chevauchants et des variations dans la fréquence d'utilisation des codons en fonction des organismes [13, 34–36]. Par ailleurs, les travaux de J. Monod sur la régulation de l'expression des systèmes inductibles (*i.e.* à l'aide de la bêta-galactosidase) ont montré qu'une substance endogène, soit inductrice soit répressive, doit être présente [37]. La combinaison de ces résultats avec ceux de F. Jacob sur la régulation du cycle du bactériophage lambda [38] mène à partir de la fin des années 50 à la notion d'opéron [39, 40]. L'utilisation des bactériophages a aussi largement contribué à la compréhension des mécanismes de la recombinaison génétique mis en évidence dès 1946 grâce à l'étude des *Myoviridae* (*i.e.* phages T2, T4, *figure 1B*) [41, 42]. Une telle découverte a d'ailleurs été récompensée par le prix Nobel de physiologie et de médecine attribué à Max Delbrück, Alfred D. Hershey et Salvador Luria en 1969. Les études réalisées sur le phage T4 mettent en avant la notion de cistron et de gènes *cis* et *trans* actifs [43, 44].

### *La virologie et l'ARN (ARN support d'hérédité et ARN messagers)*

En 1949, Markham & Smith [45] démontrent que l'ARN viral est nécessaire pour assurer l'infectiosité du *turnip yellow mosaic virus* (TYMV) en présentant deux particules virales différentes : une infectieuse et une non infectieuse, se différenciant uniquement par la présence ou non d'ARN génomique. En 1956, Gierer & Schramm [46] complètent ces travaux en démontrant que de l'ARN du TMV frotté sur une feuille végétale suffit à déclencher l'infection virale, indiquant que les ARN (viraux) sont également support d'information génétique, une propriété jusqu'alors réservée à l'ADN.

Les ARNm ont eux aussi été découverts et largement étudiés à l'aide de virus. Sydney Brenner, François Jacob and Matthew Meselson illustrent l'existence de cet

intermédiaire entre l'ADN et la synthèse protéique en infectant *E. coli* par le phage T4 [47]. Peu après, Joseph Kates met en évidence la présence d'une queue polyadénylée (polyA) sur les ARN messagers produits par le virus de la vaccine, ce qui donne l'essor aux études sur le système traductionnel. Plusieurs équipes dont celle de James Darnell effectuent des observations identiques pour les ARNm eucaryotes. Ce n'est qu'en 1975 que la présence d'une coiffe est découverte sur des ARN messagers là encore d'origine virale (virus de la vaccine) [48, 49].

En 1964, le principe de colinéarité entre un gène (les triplets nucléotidiques de la phase codante) et la chaîne polypeptidique est établi en étudiant la tryptophane synthase d'*E. coli* et une protéine constitutive de la tête du bactériophage T4 [50, 51]. Bien que la colinéarité entre l'ADN et les protéines fût admise au sein du monde procaryote elle restait à confirmer chez les eucaryotes et semblait moins conservée. C'est en analysant les complémentarités de séquences entre les ARNm viraux et l'ADN viral de l'adénovirus que Phillip Sharp et Richard Roberts ont découvert en 1977 le mécanisme d'épissage par élimination d'introns confirmant ainsi l'universalité de la colinéarité entre ADN codant et protéine [52-54]. Durant la même période des agents subviraux constitués d'ARN simple brin circulaire de 246 à 401 nucléotides et appelés viroïdes sont découverts par Theodore Diener [55]. Les viroïdes infectent exclusivement les plantes et ont la particularité de ne pas coder de protéine. Ces ARN détournent la machinerie transcriptionnelle de leurs hôtes pour se multiplier selon un mécanisme particulier [56]. Les intermédiaires réplicatifs de la famille *Avsunviroidae* forment des oligomères qui se structurent localement pour former des sites autocatalytiques impliquant une fonction ribozyme (voir *infra*, § « Des ARN autocatalytiques ou chefs d'orchestre de la traduction »).

Les premiers systèmes de transcription *in vitro* ont été mis au point par R.G. Roeder et son équipe en 1979 [57]. Quelques temps après avoir réalisé la première transcription *in vitro* de gènes de classe III tels que de l'ARN 5S ou les ARN VA de l'adénovirus 2, ils réalisent celle de gènes de l'Ad 2 sous le contrôle d'un promoteur de classe II [58]. La découverte de la liaison des facteurs de transcription à leur séquence d'ADN cible est liée aux études menées sur l'antigène T de SV40 par Tjian et son équipe [59] et à celles menées sur les récepteurs aux glucocorticoïdes, dont le domaine est aujourd'hui appelé HRE (*hormone response element*), qui sont présents dans le promoteur du virus des tumeurs mammaires de la souris ou MMTV [60]. Le dogme de la biologie moléculaire se précise et prend une tournure cyclique, où les gènes sont transcrits en ARN non codants (voir plus bas) ou en ARN messagers traduits en protéines pouvant réguler l'expression des gènes.

### Des ARN autocatalytiques ou chefs d'orchestre de la traduction

Les pré-ARN ribosomiques du protiste *Tetrahymena* sont maturés par autocatalyse [61, 62] où la structure de l'ARN assure la fonction enzymatique nécessaire au clivage, cette structure est appelée ribozyme (*figure 1C*). Un mécanisme similaire intervient dans la maturation de la sous-unité ribonucléique des ribonucléases P qui effectuent la maturation des ARN de transfert [63]. Ces découvertes ont été récompensées par le prix Nobel de chimie de 1989. Des activités ribozymes distinctes de celles décrites sont par la suite découvertes sur l'ARN satellite du *tobacco ringspot virus* [64] et de l'*avocado sunblotch viroid* [65].

Si les mécanismes de traduction canoniques sont précisés par de nombreuses équipes, ce n'est qu'en 1988 que l'équipe de Sonenberg décrit la présence d'un site interne d'entrée du ribosome (*internal ribosome entry sites*, IRES, *figure 1C*) présent sur l'extrémité 5' non traduite du génome du poliovirus [66]. Cette séquence d'ARN très structurée assure l'initiation de la synthèse de la polyprotéine virale de manière indépendante de la coiffe. Ce mécanisme de traduction, différent de celui connu jusqu'alors (dépendant de la coiffe), n'est pas uniquement inféodé aux virus bien qu'un grand nombre d'entre eux l'utilisent. Des ARN cellulaires dépourvus de coiffe sont également traduits suite à la fixation des ribosomes sur des structures IRES comme par exemple le messenger de la protéine Bip (*immunoglobulin heavy-chain binding protein*) [67].

### La virologie change le dogme : quand l'ARN sert de matrice à l'ADN

Le mécanisme de transcription inverse conduisant à la synthèse d'ADN à partir d'ARN a été décrit simultanément par Baltimore et Temin & Mizutani [23, 68] en étudiant différents rétrovirus tels que *Rous sarcoma virus*. Très rapidement cette découverte a renversé le dogme classique et est à la base de la création des premières banques d'ADNc et d'applications de génétique inverse [14]. De nos jours la transcriptase inverse reste une protéine clé couramment utilisée en biologie moléculaire (pour revue, voir [69]).

À la fin des années 1960, la découverte de rétrovirus endogènes (ERV) a mené à des avancées majeures sur les fonctions biologiques comme la reproduction vivipare. Les rétrovirus endogènes pourraient dériver de rétrovirus ayant infecté il y a des millions d'années les cellules germinales d'un ancêtre commun des espèces vivipares et avoir perdu leur virulence. Les ERV ont été longtemps considérés comme de l'ADN « poubelle » en raison de l'absence d'expression de leur génome majoritairement réprimé par des modifications épigénétiques. Les ERV semblent pourtant avoir dirigé l'évolution des mammifères grâce à l'expression de la syncytine, une protéine

d'enveloppe rétrovirale. La syncytine est exprimée dans le syncytiotrophoblaste, elle permet la formation du placenta et assure une fonction dans l'échange de nutriments de la mère au fœtus. Ce type d'intégration de rétrovirus (HERV-W, HERV-FRD et ERV-3 chez l'homme) pourrait constituer un tournant majeur de l'évolution [70].

### Défenses antivirales au service de la biologie actuelle

#### Interférence par ARN

La découverte de l'interférence par ARN (ARNi ou extinction post transcriptionnelle des gènes) reste l'une des révolutions scientifiques de la fin du xx<sup>e</sup> siècle (figure 1C). Andrew Fire et Craig Mello ont publié en 1998 leurs travaux dans lesquels ils présentent ce nouveau mécanisme de régulation [15]. Dès lors, un engouement international s'installe dans l'étude de ce processus qui apparaît comme un mécanisme d'immunité innée et impliqué dans le développement chez les métazoaires. Les petits ARN (miARN, siARN. . .) sont des effecteurs nécessaires à l'extinction post-transcriptionnelle des gènes. Chez les plantes et les invertébrés, l'interférence par l'ARN constitue une voie de défense antivirale majeure. Les virus contournent cette voie grâce à l'expression de protéines appelées suppresseur d'ARNi (VSR, *viral suppressor of RNA silencing*) (pour revue, voir [71]), voire d'ARN non codants qui interfèrent sur l'action de ce mécanisme antiviral [72]. L'action des VSR affecte souvent la voie de régulation des gènes par les miARN ce qui contribue à la modification de l'homéostasie cellulaire. Certains virus expriment leur propre répertoire de petits ARN (miARN) pour réguler l'expression de leurs gènes ou moduler les défenses cellulaires.

#### Des enzymes de restriction à CRISPR/Cas9

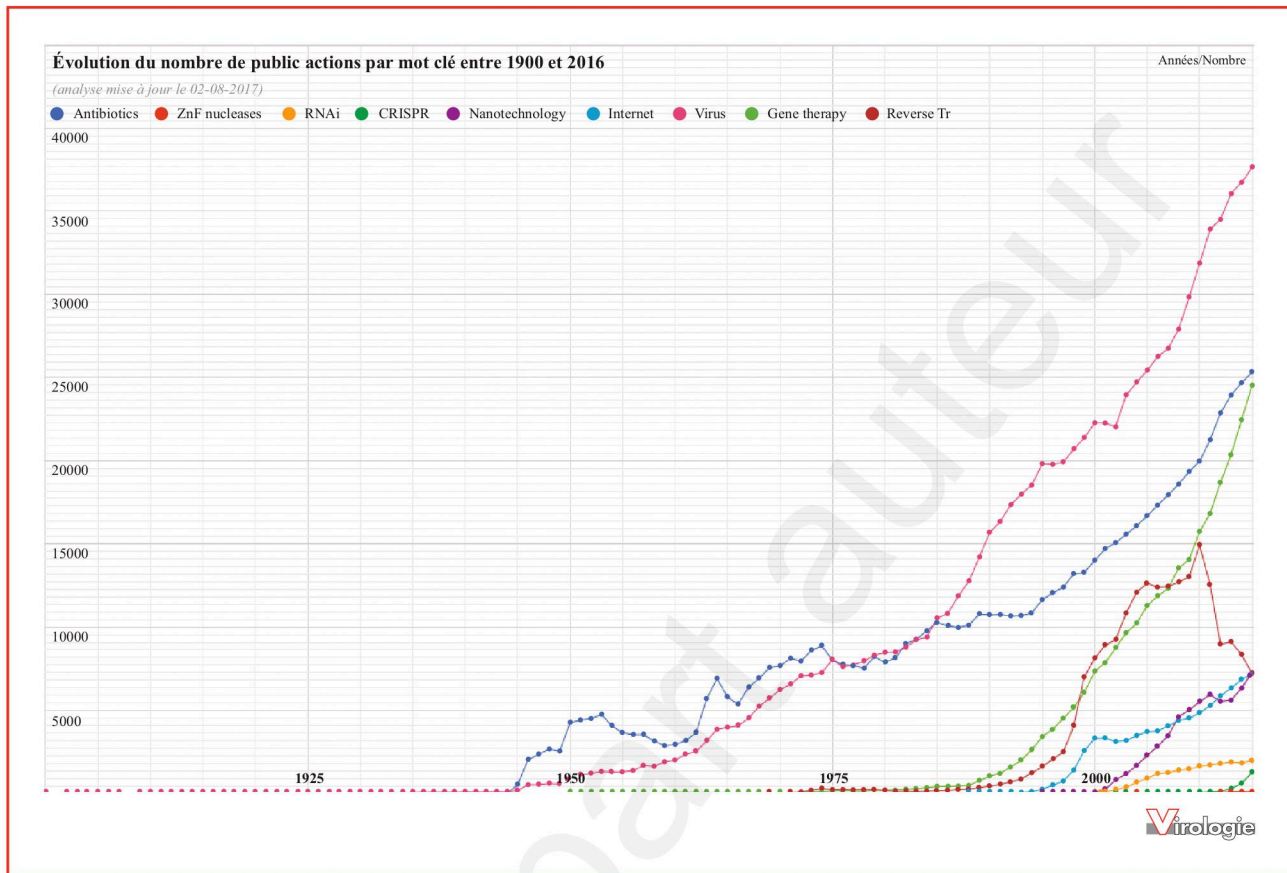
Le système de restriction-modification présent chez les bactéries permet de lutter contre l'invasion d'ADN étranger (viral, entre autres) grâce au clivage de l'ADN par des enzymes qui sont devenus les ciseaux moléculaires nécessaires à la manipulation de l'ADN *in vitro*. Bien que cette technologie soit de plus en plus remplacée par l'utilisation de recombinases de bactériophage actives *in vitro* (e.g. *gateway cloning*) ou de recombinase virale (*infusion cloning*) la modification « à façon » de certains génomes est très vite apparue complexe, peu efficace, voire inefficace. L'ingénierie d'outils comme les nucléases à doigts de zinc ou TALENs a fourni de nouveaux outils moléculaires intéressants pour l'édition de gènes mais leur conception reste laborieuse, coûteuse et leur utilisation restreinte. Ces approches ont été récemment remplacées par l'outil CRISPR/Cas9 désormais utilisé dans la quasi-totalité des laboratoires de recherche. Ce nouvel outil d'édition de gènes dérive de la découverte des systèmes CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein*), identifiés chez

les eubactéries et les archées où ils constituent un système immunitaire adaptatif contre les bactériophages et les acides nucléiques invasifs. Le séquençage du génome de *H. mediterranei* a révélé la présence d'un *locus* composé de régions répétées, séparées par des séquences uniques de longueur invariable appelées *spacers* [73]. Le terme « CRISPR » est né en 2002 [74]. L'origine extrachromosomique des *spacers* apparaît en 2005 [75, 76] et le lien entre la séquence d'un *spacer* et une immunité vis-à-vis de l'infection par un phage possédant cette séquence (appelée *protospacer*) est établi dans le laboratoire industriel du Dr. P. Horvath (figure 1C) [19]. Le mécanisme d'acquisition, d'expression et d'action de cette voie de restriction est largement étudié et met en œuvre plusieurs types de nucléases guidées par de courtes séquences d'ARN (*crRNA*) dérivées du locus CRISPR/Cas. Actuellement six types de CRISPR/Cas sont recensés selon la nucléase requise et le ciblage de l'acide nucléique invasif [77] et certains coexistent au sein d'une même espèce. Si l'ADN est la cible majeure des systèmes de type I, II, IV et V, les types III et VI sont capables de cibler l'ARN et représentent donc un nouveau système de manipulation directe de l'ARN [78-80]. Le système de type II utilise une seule protéine effectrice, l'endonuclease CAS9 guidée par deux ARN effecteurs appelés *crRNA* (*CRISPR RNA*) et *tracrRNA* (*transacting crRNA*). La protéine CAS9 charge un hybride imparfait des deux ARN effecteurs et la séquence du *crRNA* (correspondant à un des *spacer*) guide le clivage séquence spécifique de l'ADN cible [81-83]. Ce système de type II est dérivé en outil d'édition de gènes grâce à un ARN chimérique (*gRNA*, *guide RNA*) mimant l'hybride entre *crRNA* et *tracrRNA* qui reste fonctionnel. Ainsi l'expression de CAS9 étiquetée par une séquence d'adressage subcellulaire (nucléaire, mitochondriale. . .) et d'un ou plusieurs ARN guide permet de provoquer des coupures à façon dans l'ADN [21, 84]. Les enzymes de réparation de l'ADN réparent les cassures et peuvent conduire à une recombinaison homologue si un ADN est apporté conjointement au système [85-87]. La simplicité de mise en œuvre de cette technologie l'a très vite rendue disponible pour tout un chacun, pour le meilleur [88] et pour le pire [89]. À l'instar de l'interférence par l'ARN, les phages peuvent porter leur propre système CRISPR/Cas [90] ou coder des protéines qui inhibent cette défense adaptative [91]. Il y a fort à parier que l'utilisation de telles protéines virales permettra d'affiner l'action de ce nouveau type de nucléase pour limiter les effets hors cible constatés dans de nombreuses études.

### Virologie, (nano)technologie et thérapie

#### Nanotechnologie

Les nanotechnologies sont à l'heure actuelle en plein essor comme en témoigne l'augmentation exponentielle du nombre de publications relatives à ce domaine



**Figure 2.** L'évolution temporelle de 1900 à 2016 du nombre de citations par l'outil PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=motcle>) illustre l'envolée des articles relatifs aux virus et à leurs outils dérivés. Les mots clés utilisés au sein de l'URL sont indiqués par des codes couleur.

technologique depuis les années 2000 (figure 1C, figure 2, courbe violette). Les nanotechnologies se définissent par l'utilisation et l'étude de systèmes de 1 à 100 nm et se retrouvent à l'interface de nombreuses disciplines qui décrivent l'assemblage de composés de diverses natures, tant chimiques que biologiques. Par leur taille les virus entrent dans la catégorie des nano-objets. Bien que les structures virales divergent, les propriétés d'auto-assemblage de certaines protéines structurales et les possibilités de modification à la carte de leur génome ont immédiatement propulsé les virus comme des matériaux et des outils de choix. Cependant ces applications technologiques restent restreintes à l'utilisation de virus que l'on peut produire en grandes quantités, à coût réduit et sans risque pour la santé publique ; ainsi sont majoritairement concernés les virus infectant les plantes et les bactéries. L'utilisation des bactériophages en nanotechnologie voit son origine dans les travaux de Georges Smith [92-94] avec la modification du génome du bactériophage filamentueux M13 pour fusionner une séquence peptidique avec l'une des

protéines structurales du virion de manière orientée à la surface de la capsid. Cette technique connue sous le nom de *phage display* permet, entre autres, l'étude moléculaire d'interaction entre protéines, la caractérisation de peptides reconnus par des anticorps, l'évolution dirigée de protéines ou la conception d'outils de diagnostic [95]. Des banques de peptides exposés en surface des particules phagiques ont permis la description de capacités de fixation des phages à des métaux, des nanotubes de carbone par exemple et initié la conception de l'assemblage de nanomatériaux comparables à des pièces d'un Lego [96-98] laissant libre cours à l'imagination de l'expérimentateur pour créer des assemblages complexes aux propriétés chimiques et/ou électriques hors du commun (diodes, catalyseurs...). Toutefois la biologie reste la maîtresse de ce système car certaines modifications affectent la viabilité virale et ne sont pas réalisables. Des virus infectant les plantes sont également utilisés en nanotechnologies comme par exemple le *tobacco mosaic virus* [99-102].

### Vecteurs viraux

Les génomes viraux portent toutes les fonctions nécessaires au piratage des cellules qu'ils infectent. Cet atout est grandement apprécié en biologie moléculaire comme en témoigne l'utilisation de nombreuses séquences virales dans la construction de vecteurs d'expression et de clonage (promoteurs, terminateurs de transcriptions, origines de réplication, intégrases. . .).

La capacité de transduction des virus et leur tropisme spécifique en font des candidats de choix pour la conception de vecteurs utilisés dans des protocoles de thérapie génique. Ces virus thérapeutiques assurent principalement l'expression de gènes d'intérêt. Les virus majoritairement utilisés dans le cadre de la thérapie génique sont les rétrovirus et les adénovirus. Les vecteurs rétroviraux conservent leur capacité d'intégration dans le génome des cellules qu'ils ciblent mais ne peuvent engendrer un cycle infectieux permettant la formation de nouvelles particules virales. Ces virus sont surtout utilisés pour apporter des gènes dits « médicaments » en limitant considérablement les risques de propagation [103]. Si les premiers essais thérapeutiques n'ont pas fourni les résultats escomptés [104], plusieurs succès thérapeutiques utilisant des outils rétroviraux ont souligné le potentiel de cette technique [5]. Cependant, il est important de préciser que l'insertion de séquences rétrovirales peut s'effectuer au niveau de pro-oncogènes et ainsi activer la prolifération cellulaire [105] pouvant conduire à une oncogenèse redoutée.

L'essor de la thérapie génique est en partie lié aux caractérisations moléculaires des déficiences génétiques et de régulation de l'expression des gènes ; ces avancées ont alors mis en exergue le potentiel des rétrovirus pour l'apport de gènes dans les cellules. De plus l'utilisation de rétrovirus combinée à la protéine CAS9 (exprimée par le vecteur ou apportée en *trans*) issue du système CRISPR/Cas permettant de cibler l'intégration de segments d'ADN à des loci précis du génome est en cours de développement [106]. Ce même système CRISPR/Cas peut être utilisé avec d'autres virus et servir à l'édition de génomes. C'est par exemple le cas du *cabbage leaf curl virus* qui a permis l'édition de génomes de plantes et ainsi d'obtenir des modèles d'étude. Cette technique est nommée le *virus induced genome editing* (VIGE) [107].

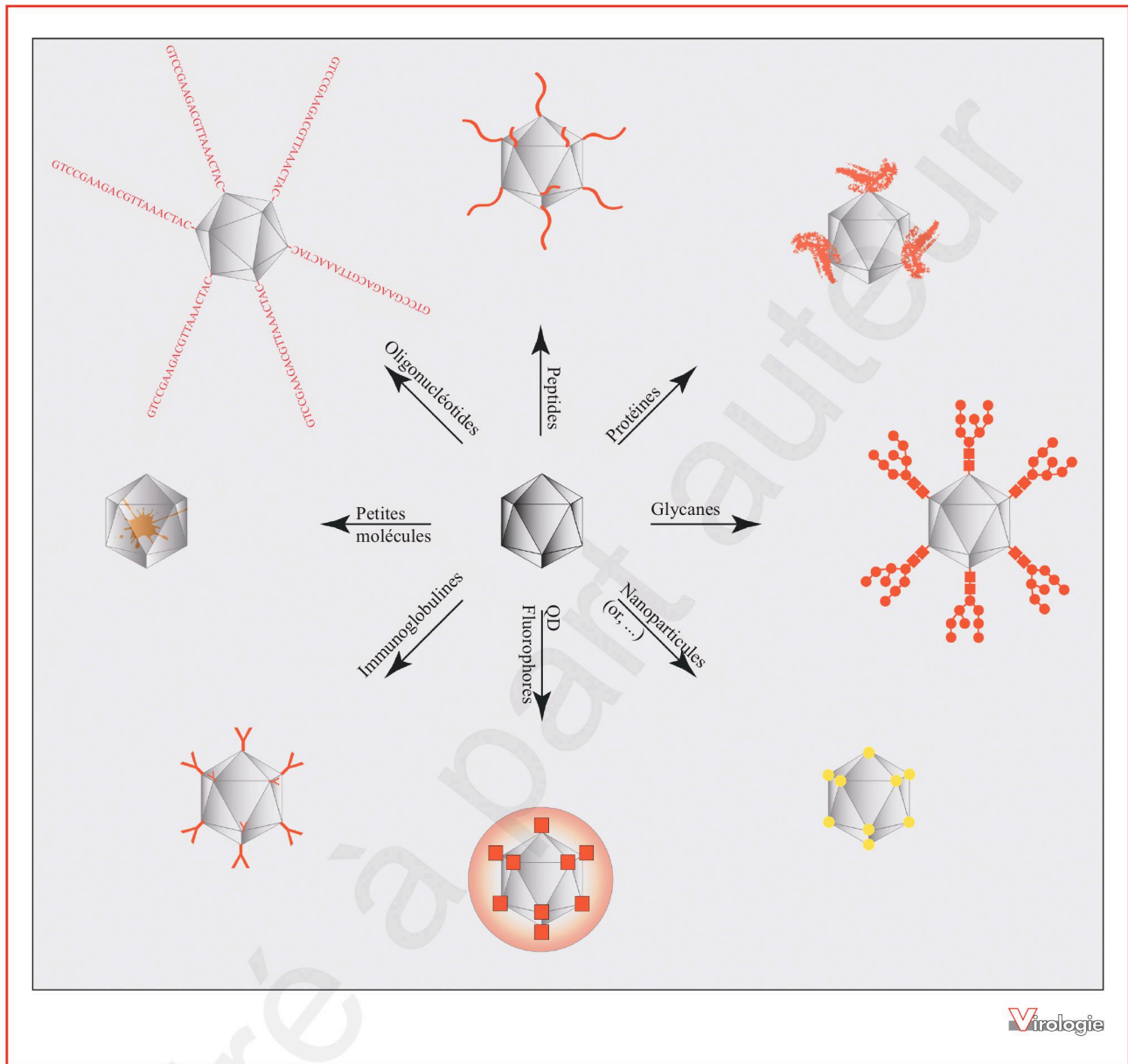
Les *virus-like particles* (VLP) sont d'autres outils pouvant être considérés comme des vecteurs viraux. Ces particules permettent à certains virus de contrer les défenses de leurs hôtes en les leurrant comme dans le cas du virus de l'hépatite B (HBV) [108]. En effet les VLP ne comportent pas d'acide nucléique viral et ne sont donc pas infectieuses. Elles sont produites par auto-assemblage des protéines de capsid. Ces particules sont en premier lieu utilisées dans l'élaboration de vaccins, contre le virus

de l'hépatite B et les papillomavirus humains notamment [109]. Cette capacité d'auto-assemblage des protéines structurales est également détournée pour encapsider puis délivrer des acides nucléiques voire des protéines à des cellules d'intérêt. Certaines modifications des protéines sont possibles tout en préservant l'intégrité des capsides, ce qui permet de présenter ou de transporter des nanomolécules [16]. Récemment l'équipe de C. Ritzenthaler a découvert qu'un phytovirus (*grapevine fanleaf virus*) pouvait subir des modifications sur les deux extrémités de la protéine de capsid sans affecter la formation de VLP. L'extrémité C-terminale se situe à l'extérieur de la particule et permet donc la présentation de protéines alors que l'extrémité N-terminale est retrouvée à l'intérieur de la particule et permet l'encapsidation de protéines d'intérêt. Ainsi il est possible de délivrer des molécules de manière ciblée [110]. Ce concept pourrait également être une piste thérapeutique en l'appliquant de manière plus large à des structures de virus animaux.

En plus des applications thérapeutiques de nombreuses avancées dans le domaine de la virologie fondamentale ont permis la caractérisation fine de ces VLP ou de ces particules virales et ainsi de mettre en exergue des modifications d'acides aminés de capsid qui permettent leur couplage chimique à des petites molécules, des fluorophores, voire la fusion des séquences protéiques à celles de peptides ou protéines conduisant alors à leur adressage à des cellules initialement hôte ou non hôte du virus. De nombreuses applications d'utilisation de ces virus vecteurs ou plateforme d'assemblage sont décrites (*figure 3*, pour revue, voir [111]) et continuent d'être développées. À titre d'exemple une étude a présenté la production de VLP en utilisant la protéine de capsid du bactériophage Q $\beta$  couplée à un peptide dérivé de l'angiotensine II pour générer des anticorps permettant une réponse dirigée contre l'angiotensine II [112].

### L'enseignement de la virologie en France

Les enseignements de biologie dispensés dans les universités s'appuient sur des concepts généraux mis en évidence grâce à l'utilisation de virus et d'outils dérivés de cycles viraux (*figure 1*). Malheureusement la (re)présentation de cette discipline reste souvent cantonnée à une description structurale des virions ou de pathologies associées à des virus très médiatisés. Souvent incluse dans sa discipline parente, la microbiologie, la virologie se retrouve parfois travestie dans des unités d'enseignement traitant d'infectiologie, de parasitologie, de pathologie voire de biotechnologies. Il est évident que de nombreux aspects



**Figure 3.** Exemples d'utilisation de virus en biologie et nanotechnologie. Les virus sont présentés comme une plate-forme permettant l'adressage d'une multitude de ligands à des cellules cibles. QD : *quantum dot*. Le positionnement des ligands sur les sommets est purement esthétique et n'est pas représentatif de la nature des objets produits qui arborent de tels groupements sur les faces. La taille des ligands n'est pas respectée (adapté de [111]).

de la virologie se trouvent occultés en raison du nombre d'heures contraint. *A contrario* l'enseignement de la virologie au sens large limite la description de la pathogenèse aux aspects moléculaires et cellulaires sans s'attarder sur un effet systémique. Aussi l'apport d'enseignements comme l'immunologie, la biochimie ou la microbiologie est sans nul doute à considérer comme complémentaire et essentiel

pour appréhender toute situation virologique quel que soit le modèle considéré.

Les résultats d'une enquête malheureusement peu fructueuse (et par conséquent à considérer avec prudence) effectuée auprès d'associations étudiantes des universités françaises indiquent que des notions de virologie sont effectivement perçues par les étudiants de licence de biologie

dans 55 % des universités. Seules les universités de certaines villes proposent un master clairement dédié à la virologie et à ses applications (par exemple : Lyon, Paris, Strasbourg, Tours... ). De nombreux enseignements de la discipline se focalisent sur certains règnes du vivant telles que virologie végétale, virologie humaine ou vétérinaire (comme par exemple Bordeaux, Montpellier, Nantes, Toulouse...) et orientent leurs enseignements principalement sur les agents étiologiques de pathologies.

## Conclusion

Les débats persistent autour des questions : « Doit-on considérer les virus comme des organismes vivants ? », « Sont-ils des alliés ou des ennemis ? ».

Quelle que soit la réponse [113] il est certain que la virologie, l'étude des cycles et des stratégies virales ont largement contribué et contribuent toujours à l'essor de la biologie comme en témoignent les données présentées dans la *figure 1* et l'évolution du nombre de publications scientifiques liées au mot clé « virus » (*figure 2*). L'intérêt ou la pertinence de l'utilisation des virus apparaît dans de nombreux domaines sans pour autant placer le virus au-devant de la scène sauf dans de rares cas [114]. Amis de l'ombre du biologiste moléculaire les virus outils sont partout. Leur présence au sein de l'ensemble des règnes du vivant en fait des outils puissants pour des applications sans limites en particulier grâce à l'intégration des mécanismes moléculaires issus de différents règnes. Une telle intégration des concepts de biologie/virologie est fondamentale pour aborder la biologie actuelle comme en témoigne l'application des nouvelles technologies d'édition de gènes ou le décryptage de mécanismes pouvant expliquer la différenciation procaryotes et eucaryotes dans laquelle les virus pourraient être à l'origine de l'invention du noyau [115].

**Remerciements.** Les auteurs remercient particulièrement Denis Gerlier, Renaud Mahieux et Benoît Kammerer pour leurs suggestions. L'ensemble des personnes ayant répondu à l'enquête, Pierre Goepfert, Lucas Hoehn et Anne-Caroline Jousset sont également remerciés pour leur aide et conseils.

**Liens d'intérêts :** les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

1. Lederberg J Genetic transduction *American Scientist* 1956 ; 44 : 264-80.
2. Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in Salmonella. *J Bacteriol* 1952 ; 64 : 679-99.
3. Tatum EL. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med* 1966 ; 10 : 19-32.
4. Wolff JA, Lederberg J. An early history of gene transfer and therapy. *Hum Gene Ther* 1994 ; 5 : 469-80.
5. Wirth T, Parker N, Yla-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene* 2013 ; 525 : 162-9.
6. Keeler AM, ElMallah MK, Flotte TR. Gene therapy 2017 : Progress and future directions. *Clin Transl Sci* 2017 ; 10 : 242-8.
7. Lwoff A. The concept of virus. *J Gen Microbiol* 1957 ; 17 : 239-53.
8. Clavier J-M, Abergel C. Les virus sont-ils vraiment des virus ? *Virologie* 2013 ; 17 : 217-28.
9. Forterre P. The virocell concept and environmental microbiology. *ISME J* 2013 ; 7 : 233-6.
10. D'Herelle F. *Préparation de bactériophage thérapeutique*. Appendix 1. Le phénomène de la guérison dans les maladies infectieuses. Paris Massons et Cie ; 1938.
11. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 2011 ; 1 : 111-4.
12. Murphy FA. *The foundations of virology*. West Conshohocken (PA) : Infinity Publishing, 2016. <https://ispace.utmb.edu/collaboration/VirusImages/webfiles/presentations/Foundations%20eBook/INDD%20FINAL%20COMBINED%20INDEXED%20SMALLEST%20FILE.pdf> (consulté le 02/10/2017).
13. Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977 ; 265 : 687-95.
14. Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. *Nature* 1978 ; 274 : 223-8.
15. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 ; 391 : 806-11.
16. Douglas T, Young M. Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature* 1998 ; 393 : 152-5.
17. La Scola B, Audic S, Robert C, et al. A giant virus in amoebae. *Science* 2003 ; 299 : 2033.
18. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005 ; 437 : 376-80.
19. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007 ; 315 : 1709-12.
20. La Scola B, Desnues C, Pagnier I, et al. The viroplasm as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* 2008 ; 455 : 100-4.
21. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012 ; 337 : 816-21.
22. Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, et al. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature* 2017 ; 541 : 488-93.
23. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970 ; 226 : 1209-11.
24. Blevins SM, Bronze MS, Robert Koch and the "golden age" of bacteriology. *Int J Infect Dis* 2010 ; 14 : e744-51.
25. Kausche GA, Pfankuch E, Ruska H. Die sichtbarmachung von pflanzlichem virus im übermikroskop. *Naturwissenschaften* 1939 ; 27 : 292-9.
26. Briddon RW, Ghabrial S, Lin N-S, et al. The subviral agents. In : King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. San Diego : Elsevier, 2012, 1211-19.
27. Christie GE, Dokland T. Pirates of the Caudovirales. *Virology* 2012 ; 434 : 210-21.
28. Forterre P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Res* 2006 ; 117 : 5-16.
29. Kostyrka G. What roles for viruses in origin of life scenarios? *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* 2016 ; 59 : 135-44.

30. Podolsky S. The role of the virus in origin-of-life theorizing. *J Hist Biol* 1996; 29: 79-126.
31. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 1944; 79: 137-58.
32. Hershey AD, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 1952; 36: 39-56.
33. Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1961; 47: 1588-602.
34. Air GM. Amino acid sequences from the gene F (capsid) protein of bacteriophage phiX174. *J Mol Biol* 1976; 107: 433-43.
35. Air GM, Blackburn EH, Coulson AR, Galibert F, Sanger F, Sedat JW, et al. Gene F of bacteriophage phiX174. Correlation of nucleotide sequences from the DNA and amino acid sequences from the gene product. *J Mol Biol* 1976; 107: 445-58.
36. Air GM, Sanger F, Coulson AR. Nucleotide and amino acid sequences of gene G of omegaX174. *J Mol Biol* 1976; 108: 519-33.
37. Monod J, Pardee AB, Jacob F. Sur l'expression et le rôle des allèles inductible et constitutif dans la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase chez des zygotes d'*Escherichia coli*. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1958; 246: 3125-8.
38. Jacob F, Wollman E. Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez *Escherichia coli*. I. L'induction par conjugaison ou induction zygotique. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1956; 91: 486-510.
39. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 1961; 3: 318-56.
40. Jacob F, Perrin D, Sanchez C, Monod J. [Operon : a group of genes with the expression coordinated by an operator]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1960; 250: 1727-9.
41. Delbrück M, Bailey WT. Induced mutations in bacterial viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1946; 11: 33-7.
42. Hershey AD, Rotman R. Genetic recombination between host-range and plaque-type mutants of bacteriophage in single bacterial cells. *Genetics* 1949; 34: 44-71.
43. Benzer S. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1955; 41: 344-54.
44. Benzer S. The elementary units of heredity. In : McElroy WD, Glass B, eds. *The chemical basis of heredity*. Baltimore (Md) : The Johns Hopkins Press, 1957, pp. 70-93.
45. Markham R, Smith KM. Studies on the virus of turnip yellow mosaic. *Parasitology* 1949; 39: 330-42.
46. Gierer A, Schramm G. Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature* 1956; 177: 702-3.
47. Brenner S. RNA, ribosomes, and protein synthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1961; 26: 101-10.
48. Furuichi Y, Morgan M, Muthukrishnan S, Shatkin AJ. Reovirus messenger RNA contains a methylated, blocked 5'-terminal structure : m-7G(5')ppp(5')G-MpCp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 362-6.
49. Wei CM, Moss B. Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 318-22.
50. Sarabhai AS, Stretton AO, Brenner S, Bolle A. Co-linearity of the gene with the polypeptide chain. *Nature* 1964; 201: 13-7.
51. Yanofsky C, Carlton BC, Guest JR, Helinski DR, Henning U. On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964; 51: 266-72.
52. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 3171-5.
53. Chow LT, Gelinis RE, Broker TR, Roberts RJ. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 1977; 12: 1-8.
54. Chow LT, Roberts JM, Lewis JB, Broker TR. A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA :DNA hybrids. *Cell* 1977; 11: 819-36.
55. Diener TO. Viroids. *Adv Virus Res* 1972; 17: 295-313.
56. Gago-Zachert S. Viroids, infectious long non-coding RNAs with autonomous replication. *Virus Res* 2016; 212: 12-24.
57. Weil PA, Segall J, Harris B, Ng SY, Roeder RG. Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. *J Biol Chem* 1979; 254: 6163-73.
58. Weil PA, Luse DS, Segall J, Roeder RG. Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 1979; 18: 469-84.
59. Tjian R, Fey G, Graessmann A. Biological activity of purified simian virus 40 T antigen proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75: 1279-83.
60. Payvar F, Wrangé O, Carlstedt-Duke J, Okret S, Gustafsson JA, Yamamoto KR. Purified glucocorticoid receptors bind selectively in vitro to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6628-32.
61. Cech TR, Brehm SL. Replication of the extrachromosomal ribosomal RNA genes of *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res* 1981; 9: 3531-43.
62. Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena* : involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 1981; 27: 487-96.
63. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 1983; 35: 849-57.
64. Prody GA, Bakos JT, Buzayan JM, Schneider IR, Bruening G. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 1986; 231: 1577-80.
65. Hutchins CJ, Rathjen PD, Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 3627-40.
66. Pelletier J, Kaplan G, Racaniello VR, Sonenberg N. Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 1103-12.
67. Yang Q, Sarnow P. Location of the internal ribosome entry site in the 5' non-coding region of the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BIP) mRNA : evidence for specific RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2800-7.
68. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226: 1211-3.
69. Coffin JM, Fan H. The discovery of reverse transcriptase. *Annu Rev Virol* 2016; 3: 29-51.
70. Black SG, Arnaud F, Palmarini M, Spencer TE. Endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Am J Reprod Immunol* 2010; 64: 255-64.
71. Burgyan J, Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* 2011; 16: 265-72.
72. Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjarvi G. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 2005; 79: 9556-65.
73. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodriguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloflex mediterranei* and *Haloflex volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol* 1995; 17: 85-93.
74. Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1565-75.
75. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005; 60: 174-82.



76. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR G elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 2005 ; 151 : 653-63.
77. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2015 : 13.
78. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 2008 ; 322 : 1843-5.
79. Barrangou R, Gersbach CA. Expanding the CRISPR toolbox : Targeting RNA with Cas13b. *Molecular Cell* 2017 ; 65 : 582-4.
80. Smargon AA, Cox DB, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, *et al.* Cas13b is a type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell* 2017 ; 65 : 618-30 e7.
81. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 2008 ; 321 : 960-4.
82. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011 ; 471 : 602-7.
83. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010 ; 468 : 67-71.
84. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 ; 109 : E2579-86.
85. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013 ; 339 : 819-23.
86. Mali P, Yang L, Esvelt KM, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013 ; 339 : 823-6.
87. Shmakov S, Smargon A, Scott D, *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2017 ; 15 : 169-82.
88. Huang Z, Tomitaka A, Raymond A, Nair M. Current application of CRISPR/Cas9 gene-editing technique to eradication of HIV/AIDS. *Gene Ther* 2017 ; 24 : 377-84.
89. Shapiro B. Mammoth 2.0 : will genome engineering resurrect extinct species? *Genome Biol* 2015 ; 16 : 228.
90. Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB, Camilli A. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature* 2013 ; 494 : 489-91.
91. Maxwell KL. Phages fight back : inactivation of the CRISPR-Cas bacterial immune system by anti-CRISPR proteins. *PLoS Pathog* 2016 ; 12 : e1005282.
92. Parmley SF, Smith GP. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv Exp Med Biol* 1989 ; 251 : 215-8.
93. Smith GP. Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985 ; 228 : 1315-7.
94. Smith GP. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Curr Opin Biotechnol* 1991 ; 2 : 668-73.
95. Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M. Filamentous bacteriophage : biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol* 2011 ; 13 : 51-76.
96. Lee SW, Mao C, Flynn CE, Belcher AM. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science* 2002 ; 296 : 892-5.
97. Wong IY, Bhatia SN, Toner M. Nanotechnology : emerging tools for biology and medicine. *Genes Dev* 2013 ; 27 : 2397-408.
98. Farr R, Choi DS, Lee SW. Phage-based nanomaterials for biomedical applications. *Acta Biomater* 2014 ; 10 : 1741-50.
99. Kadri A, Wege C, Jeske H. In vivo self-assembly of TMV-like particles in yeast and bacteria for nanotechnological applications. *J Virol Methods* 2013 ; 189 : 328-40.
100. Peyret H, Gehin A, Thuenemann EC, Blond D, El Turabi A, Beales L, *et al.* Tandem fusion of hepatitis B core antigen allows assembly of virus-like particles in bacteria and plants with enhanced capacity to accommodate foreign proteins. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0120751.
101. Sainsbury F, Canizares MC, Lomonosoff GP. Cowpea mosaic virus : the plant virus-based biotechnology workhorse. *Annu Rev Phytopathol* 2010 ; 48 : 437-55.
102. Schneider A, Eber FJ, Wenz NL, Altintoprak K, Jeske H, Eiben S, *et al.* Dynamic DNA-controlled "stop-and-go" assembly of well-defined protein domains on RNA-scaffolded TMV-like nanotubes. *Nanoscale* 2016 ; 8 : 19853-66.
103. Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors : a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol* 2013 ; 36 : 1-22.
104. Terheggen HG, Lowenthal A, Lavinha F, Colombo JP, Rogers S. Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. *Z Kinderheilkd* 1975 ; 119 : 1-3.
105. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. Thérapie génique du déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X. *Medicine sciences* 2004 ; 20 : 115-7.
106. Choi JG, Dang Y, Abraham S, Ma H, Zhang J, Guo H, *et al.* Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Ther* 2016 ; 23 : 627-33.
107. Yin K, Han T, Liu G, Chen T, Wang Y, Yu AY, *et al.* A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 14926.
108. Hu J, Liu K. Complete and incomplete hepatitis B virus particles : formation, function, and application. *Viruses* 2017 ; 9.
109. Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2010 ; 9 : 1149-76.
110. Belval L, Hemmer C, Sauter C, Reinbold C, Fauny JD, Berthold F, *et al.* Display of whole proteins on inner and outer surfaces of grapevine fanleaf virus-like particles. *Plant Biotechnol J* 2016 ; 14 : 2288-99.
111. Singh P, Gonzalez MJ, Manchester M. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Development Research* 2006 ; 67 : 23-41.
112. Ambuhl PM, Tissot AC, Fulurija A, Maurer P, Nussberger J, Sabat R, *et al.* A vaccine for hypertension based on virus-like particles : pre-clinical efficacy and phase I safety and immunogenicity. *J Hypertens* 2007 ; 25 : 63-72.
113. Forterre P. To be or not to be alive : How recent discoveries challenge the traditional definitions of viruses and life. *Studies in History and Philosophy of Science Part C : Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 2016 ; 59 : 100-8.
114. Pfeiffer JK. The importance of model systems : why we study a virus on the brink of global eradication. *PLoS Pathog* 2017 ; 13 : e1006330.
115. Forterre P, Raoult D. La transformation d'une bactérie en cellule virale à noyau relance l'hypothèse de l'eucaryogenèse virale. *Virologie* 2017 ; 21 : 157-9.

# Identification et caractérisation de facteurs impliqués dans la réponse cellulaire aux ARN double brin

## Résumé

Tous les organismes sont en permanence soumis à des attaques par des agents pathogènes dont le matériel génétique est perçu comme étranger par la cellule. Pour se protéger de ces dangers potentiels, différents mécanismes inhibiteurs permettant de percevoir et d'agir directement sur cette information génétique exogène ont été mis en place au cours de l'évolution dans les différents règnes du vivant. L'interférence par ARN et la réponse interféron appartiennent toutes deux à ces mécanismes de défense.

Les virus, parasites intracellulaires obligatoires, sont l'une des sources majeures de matériel génétique étranger et produisent la principale forme d'acide nucléique reconnue par l'interférence par ARN et la réponse interféron : l'ARN double brin.

Mon projet a pour vocation l'identification et à la caractérisation des différents facteurs pouvant être impliqués dans la réponse cellulaire à l'ARN double brin dans des cellules somatiques de mammifères.

Mots clés : ARN double brin, interférence par ARN, réponse interféron, Cas9

## Abstract

Every organisms are constantly under attack by pathogens whose genetic material is perceived as foreign by the cell. In order to protect themselves from these potential dangers, various inhibitory mechanisms have been put in place during evolution in the different kingdoms of the living world to perceive and act directly on this exogenous genetic information. The RNA interference and the interferon response both belong to these mechanisms.

Viruses are obligate intracellular parasites and are one of the major sources of foreign genetic material that produce the main form of nucleic acid recognized by RNAi and the IFN response: double-stranded RNA.

My project aims to identify and characterize the different factors that may be involved in the cellular response to double-stranded RNA in mammalian somatic cells.

Keywords : double stranded RNA, RNA interference, interferon response, Cas9