

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

THÈSE présentée par :

Olivier TRENZI

soutenue le : **19 décembre 2019**

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

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

**Caractérisation de l'importance
d'Argonaute 2 et des microARN lors de
l'infection par le cytomégalo virus murin**

THÈSE dirigée par :

M. PFEFFER Sébastien

Directeur de recherche, université de Strasbourg, IBMC, CNRS

RAPPORTEURS :

M. SEITZ Hervé

M. BETHUNE Julien

Directeur de recherche, Université de Montpellier, IGH, CNRS

Directeur de recherche, Universität Heidelberg, BZH

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Mme MEIGNIN Carine

Professeure, Université de Strasbourg, IBMC, CNRS

Table des matières

TABLE DES MATIERES.....	1
LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	6
REMERCIEMENTS.....	7
I. INTRODUCTION.....	8
1. Importance biologique des microARN.....	8
2. Biogénèse des microARN.....	8
2.1. Biogénèse canonique.....	8
2.1.1. Génération des précurseurs et export dans le cytoplasme.....	8
2.1.2. Export du pré-miARN vers le cytoplasme.....	11
2.1.3. Coupure du pré-miARN en duplexe de miARN.....	12
2.2. Biogénèse non-canonique.....	13
2.3. Chargement du complexe RISC.....	15
2.3.1. Organisation et structure d'Argonaute au sein de RISC.....	15
2.3.2. Complexe de chargement de RISC.....	16
2.3.3. Chargement de RISC.....	17
2.3.4. Choix du guide.....	17
3. Mode d'action des miARN.....	18
3.1. Reconnaissance de la cible.....	18
3.2. Répression et dégradation.....	19
3.3. Structure/fonction et partenaires de TNRC6.....	20
3.4. Mécanisme d'action.....	21
4. Régulation de l'expression des miARN.....	23
4.1. Régulation de la transcription.....	23
4.2. Régulation au niveau du microprocesseur.....	23
4.2.1. Action directe sur le microprocesseur.....	24
4.2.2. Protéines accessoires du pri-miARN.....	25
4.2.3. Action sur la structure secondaire des pri-miARN.....	25
4.3. Régulation de l'export.....	26
4.4. Régulation au niveau de Dicer.....	26
4.5. Régulation au niveau du complexe RISC.....	27
4.5.1. Régulation au niveau d'Argonaute.....	27
4.5.2. Régulation au niveau de l'ARN cible.....	28
4.6. Stabilité des miARN matures.....	29
4.6.1. Ajout de nucléotides.....	29
4.6.2. Dégradation par les exoribonucléases.....	30
4.7. Régulation de l'action des miARN par d'autres ARN.....	30
4.7.1. Phénomène d'éponge de petits ARN.....	30
4.7.2. Target Directed miRNA Degradation (TDMD).....	30
5. Les cytomégalovirus.....	34
5.1. Cytomégalovirus humain (HCMV).....	34
5.1.1. Structure et cycle du HCMV.....	34

5.1.2.	Tableau clinique	34
5.1.3.	Tropisme cellulaire du HCMV	35
5.1.4.	HCMV et Interleukine 10	36
5.2.	Cytomégalo­virus murin (MCMV)	37
5.2.1.	MCMV modèle de HCMV	37
5.2.2.	Structure et gé­né­ti­que de MCMV	37
5.2.3.	TDMD de miR-27	39
6.	Chromatographie d'affinités couplée à la spectrométrie de masse	39
6.1.	Immuno-précipitation de la protéine endogène	39
6.2.	Purification d'affinité de protéines étiquetées	39
6.3.	Proximity labelling par la biotine ligase (BioID)	40
6.4.	APEX	41
6.5.	Autres améliorations du BioID	41
6.6.	BioID2	42
OBJECTIFS DE THESE		43
II.	RÉSULTATS	44
1.	Importance d'AGO2 lors de l'infection par MCMV	44
1.1.	Effet de l'absence d'AGO2 sur l'infection par MCMV	44
1.2.	Effet de l'absence d'AGO2 sur le TDMD de miR-27 induit par MCMV	45
1.2.1.	Infection par le MCMV sur cellules adhérentes	45
1.2.2.	Infection par le MCMV sur cellules détachées	46
1.3.	Effet de l'absence d'AGO2 sur l'accumulation et le chargement des miARN viraux	47
1.3.1.	Accumulation des petits ARN dans la cellule en absence d'AGO2	47
1.3.2.	Accumulation des petits ARN chargés en absence d'AGO2	49
1.3.2.1.	Vérification de la capacité de pêche du peptide	49
1.3.2.2.	Accumulation des petits ARN chargés dans les Argonautes	50
1.4.	Caractérisation globale des profils de petits ARN	51
1.4.1.	Constitution d'une banque de petits ARN	52
1.4.1.1.	Traitement des données informatiques	52
1.4.1.2.	Analyse des données de séquençage	56
1.4.1.	Effet de l'infection sur les miR	57
1.4.2.	Effet de l'absence d'AGO2	57
1.4.2.1.	Effet de l'absence d'AGO2 sur les miARN cellulaires	57
1.4.2.2.	Effet de l'absence d'AGO2 sur les miARN viraux	58
1.4.3.	TDMD de miR-27	60
1.4.3.1.	Effet de l'infection par MCMV sur miR-27	60
1.4.3.2.	Expression et dégradation de miR-27 après infection par le MCMV	61
2.	Détermination de l'interactome d'AGO2 en réponse à l'infection	63
2.1.	Résultat du BioID (BirA*)	64
2.2.	Avantage du BioID2	65
2.3.	Génération des lignées stables	65
2.3.1.	Construction des plasmides	65
2.3.2.	Génération de lignées stables	66
2.4.	Caractérisation des lignées	68
2.4.1.	Caractérisation du TDMD de mir-27 dans les lignées B2A et B2A-L	68
2.4.2.	Fonctionnalité d'AGO2 dans B2A et B2AL	69
2.5.	Résultats de l'interactome d'AGO2 par BioID2	69
2.5.1.	Validation des chromatographies d'affinité avec la streptavidine	70
2.5.2.	Validation des résultats de spectrométrie de masse	71
2.5.2.1.	Nombre de spectre et protéines naturellement biotinylées	71
2.5.2.2.	Co-facteurs d'AGO2	72

2.5.3.	Comparaison de B2A avec B2A-L	73
2.5.4.	Comparaison de B2A avec B2A-L	74
2.5.5.	Impact de l'infection sur l'interactome d'AGO2	77
2.5.5.1.	Différence B2A mock avec B2A infecté MCMV	77
2.5.5.2.	Différence entre B2A-L MOCK et infecté par MCMV	80
2.5.5.3.	Comparaison B2A MOCK et SINV	82
2.5.5.4.	Comparaison B2A-L MOCK et SINV	84
2.5.6.	Bilan des données récoltées	86
III.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	90
1.	Matériel biologique et son maintien	90
1.1.	Lignées cellulaires et leur maintien	90
1.2.	Virus	90
1.3.	Bactéries et clonage	90
2.	Détection d'ARN	91
2.1.	Extraction d'ARN	91
2.2.	Northern blot	91
3.	Détection de protéines	92
3.1.	Préparation des échantillons	92
3.2.	Western blot	92
4.	Clonage, plasmides, transfection	93
4.1.	Clonage Gibson	93
4.2.	Gateway	93
4.3.	Plasmide psi-CHECK-2	93
4.4.	Transfection	93
5.	Fabrication des Lentivirus	94
5.1.	Production de Lentivirus	94
5.2.	Transduction des Lentivirus	94
6.	Chromatographies d'affinités	94
6.1.	Chromatographie d'affinité pour la streptavidine (BioID1)	94
6.2.	Chromatographie d'affinité pour la streptavidine (BioID2)	95
6.3.	Chromatographie d'affinité pour le peptide T6B	95
7.	Banques de petits ARN	96
7.1.	Sélection des petits ARN (18 à 25 nucléotides)	96
7.2.	Additions d'adaptateurs 3' et 5'	96
7.3.	Obtention de la banque en ADN	97
8.	Spectrométrie de masse	97
9.	Statistiques	98
IV.	DISCUSSIONS - PERSPECTIVES	99
V.	BIBLIOGRAPHIE	104

Liste des Figures

Figure 1: Biogénèse canonique des miARN.....	9
Figure 2 : Représentation schématique du positionnement du microprocesseur sur le pri-miARN.....	10
Figure 3 : Récapitulatif des séquences reconnues sur un pri-miARN canonique.....	11
Figure 4 : Structure de l'Exportine 5.....	11
Figure 5 : Structure Dicer/TRBP chargé par le pré-miRNA pre-let-7.....	12
Figure 6 : Biogénèse non canonique des miARN.....	14
Figure 7 : Structure tridimensionnelle et organisation des domaines de AGO2 et AGO1 chargées d'un miARN.....	16
Figure 8 : Modèle de chargement du complexe RISC.....	18
Figure 9 : Les différents domaines de TNRC6C.....	21
Figure 10 : RISC reconnaît une cible et induit sa répression.....	21
Figure 11 : Processus de répression/dégradation d'un ARN cible.....	22
Figure 12 : Régulation de la biogénèse des miARN au niveau du microprocesseur.....	24
Figure 13 : La phosphorylation AGO2 permet de recruter LIMD1.....	28
Figure 14 : Reconnaissance canonique d'une cible et reconnaissance induisant le TDMD. ...	31
Figure 15 : Structure d'AGO2 chargé avec un miARN prêt pour le TDMD.....	33
Figure 16 : Dissémination de HCMV de l'infection à la sécrétion.....	36
Figure 17 : Organisation génomique des miARN chez MCMV.....	37
Figure 18 : miARN codés par le MCMV.....	38
Figure 19 : Principe d'utilisation de la Biotine ligase (BirA*) en BioID.....	40
Figure 20 : Principe du double BioID.....	42
Figure 21 : Structure 3D de BirA de E.coli et A. aeolicus.....	42
Figure 22 : Titre viral de MCMV dans le milieu de culture après infection.....	45
Figure 23 : Analyse par northern blot de miR-27 dans des MEF wt ou AGO2 ^{-/-} et quantification du signal.....	45
Figure 24 : Analyse par northern blot révélant miR-27 dans les cellules MEF wt ou AGO2 ^{-/-}	47
Figure 25 : Accumulation des miARN viraux et cellulaires en présence ou absence d'AGO2 et leurs quantification.....	48
Figure 26 : Western blot de la chromatographie d'affinité avec T6B.....	50
Figure 27 : Analyse par northern blot de miARN cellulaires et viraux chargés sur Argonaute.....	51
Figure 28 : Heat map des miARN cellulaires et viraux dans la banque de petits à ARN.....	56
Figure 29 : Heat map des miARN cellulaires montrant une différence entre Input et IP.....	57
Figure 30 : Heat map des miARN viraux.....	57
Figure 31 : Les miARN cellulaires plus exprimés dans les MEF AGO2 ^{-/-}	58
Figure 32 : Analyse en composante principale des conditions avec infection et IP.....	58
Figure 33 : Appariement de miR-27a et miR-27b avec leur cible sur m169.....	60
Figure 34 : des formes normales (WT), allongées (tailing) ou dégradées (trimming) d'au moins un nucléotide de miR-27a.....	61
Figure 35 : Distribution des formes normales (WT), allongées (tailing) ou dégradées (trimming) d'au moins un nucléotide de miR-27b.....	61
Figure 36 : Pourcentage moyen de miR-27a et b parmi les miARN chargés (IP).....	62
Figure 37 : Analyse par western blot des MEF AGO2 ^{-/-} transfectées par les plasmides exprimant les protéines de fusion.....	66

Figure 38 : Analyse par western blot anti-mAGO2 des échantillons extraits des colonies résistantes à la blasticidine.	67
Figure 39 : Analyse par northern blot de l'abondance de miR-27 dans les lignées B2A et B2A-L.	68
Figure 40 : Mesure de la répression en place dans les MEF.	69
Figure 41 : Analyse par western blot des échantillons qui seront utilisés pour l'analyse MS.	70
Figure 42 : Analyse descriptive des lignées B2A et B2A-L (MOCK).	75
Figure 43 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A et B2A-L....	76
Figure 44 : Analyse descriptive de la comparaison entre les échantillons MOCK et MCMV avec B2A.	78
Figure 45 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A-MOCK ET B2A-MCMV.	79
Figure 46 : Analyse descriptive des échantillons MOCK et MCMV dans B2A-L.	80
Figure 47 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A-L-MOCK ET B2A-L-MCMV.	81
Figure 48 : Analyse descriptive des échantillons MOCK et SINV dans B2A.	82
Figure 49 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A-MOCK ET B2A-SINV.	84
Figure 50 : Analyse descriptive des échantillons MOCK et SINV dans B2A-L.	85
Figure 51 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A-L-MOCK et B2A-L-SINV.	86
Figure 52 : Diagramme de Venn des listes de protéines mises en évidence dans les conditions infectées par rapport aux conditions MOCK pour B2A et B2A-L et pour MCMV et SINV.	87
Figure 53 : Western blot des chromatographies d'affinité pour la biotine (validation).....	89

Liste des Tableaux

Tableau 1 : TDMD naturels.....	33
Tableau 2 : Protéines Argonaute identifiées par spectrométrie de masse après immunoprécipitation avec le peptide Flag-T6B.	50
Tableau 3 : Répartition des séquences après les premières étapes d'analyse des données de séquençage des petits ARN dans les différents échantillons.....	54
Tableau 4 : LFC des miARN viraux chargés dans MEF-WT et MEF-AGO2-/-	59
Tableau 5 : Les formes majoritaires de miR-27a dans les échantillons infectés.	62
Tableau 6 : Extrait des résultats de spectrométrie de masse obtenue par BioID d'AGO2.....	64
Tableau 7 : Nombre de spectres totaux identifiés et nombre de spectres dus à la présence de streptavidine introduite par les billes.....	71
Tableau 8 : compte des spectres des protéines biotinylées endogènes.	72
Tableau 9 : Nombre de spectres par échantillons des protéines connues pour être des cofacteurs de AGO2.	72
Tableau 10 : Nombre de spectres des protéines liées au complexe CCR4-NOT.....	73
Tableau 11 : Nombre de spectres d'autre protéines jouant un rôle au niveau de l'ARN.....	73
Tableau 12 : Liste des sondes.....	91
Tableau 13 : Liste des anticorps.	92
Tableau 14 : Liste des codes-barres attribués à chaque échantillon (Illumina).....	97

Remerciements

Mes remerciements chaleureux vont à Sébastien Pfeffer pour m'avoir dirigé pendant ces trois années (et même bien plus longtemps) pour les Ekidens mais surtout pour les corrections de toute dernière minute...

Merci d'avance pour mes futurs lecteurs, Dr Carine Meignin, Dr Julien Béthune et Dr Hervé Seitz pour avoir pris le temps de lire attentivement ma prose et la mansuétude dont ils ont fait preuve.

Une pensée spéciale pour Béatrice Chane-Woon-Ming pour le traitement des données de NGS et pour la configuration de MassSpec ToolKit sans quoi rien n'est possible pour le commun des mortels.

J'embrasse fort mes collègues du laboratoire - les anciens et les nouveaux - qui m'ont supporté plus ou moins bien pendant ces années : Mélanie Messmer, Paula Lopez, Erika Girardi, Thomas Montavon, Diane Bortolamiol-Bécet, Olivier Petitjean, Antoine Creugny, Monika Vilimova, Morgane Baldaccini, Semih Cetin, Mathieu Lefèvre, Pauline Boenapfel, Gabrielle Haas, Aurélie Fender, Anvita Bhargava...

De même pour toutes les belles personnalités rencontrées à l'IBMC : Sophia Lecomte, Janina Sponsel, Diane Uwanyirigira Murera, Pierre Cappy, Farah Bouhedda, Alexis Autour, Emilie Geersens, John Randall Clayton, Christine Kappeler, Eric Marois, Stéphanie Blandin, Delphine Kapps, Frédéric Gros, Nathalie Schallon, Emma Desgranges, Emma Schenkbecher...

I. INTRODUCTION

1. Importance biologique des microARN

La plupart des ARN messagers humains sont régulés par des microARN et beaucoup de ces régulations sont conservées chez d'autres animaux (Friedman et al., 2009). L'universalité de la régulation des ARNm par des miARN suggère que ceux-ci ont une influence essentielle dans tous les processus développementaux ou physiologiques. Leur dérégulation affecte souvent la viabilité embryonnaire ou post-natale et peut être associée au développement de maladies : épilepsie, surdité, infertilité, dégénérescence rétinienne, d fici nce immunitaire, cancers (Bartel, 2018). Nous nous attacherons ici à détailler leur biogénèse ainsi que leur mode d'action, avant de voir comment leur accumulation peut être régulée. Enfin, nous détaillerons leur implication au cours de l'infection par le cytomégalovirus murin.

2. Biogénèse des microARN

2.1. Biogénèse canonique

La biogénèse des micro (mi)ARN a été intensivement étudiée depuis la découverte du petit ARN lin-4 en 1993 chez *C. elegans* (Lee et al., 1993) et la généralisation de leur existence en 2001 (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). On peut donc considérer qu'à ce jour les détails de leur voie de synthèse sont connus. Je vais décrire ici la biogénèse des miARN chez les mammifères mais je mentionnerai également des travaux effectués chez la drosophile et le nématode *Caenorhabditis elegans*.

2.1.1. Génération des précurseurs et export dans le cytoplasme

Les miARN dérivent de transcrits primaires (pri-miARN) qui sont de manière canonique synthétisés par l'ARN polymérase II (Figure 1). Ces transcrits primaires présentent les mêmes caractéristiques qu'un transcrit codant normal puisqu'ils sont coiffés et polyadénylés (Cai, 2004). On peut trouver les pri-miARN dans les introns et les exons des gènes codants (Baskerville and Bartel, 2005) mais aussi sous la forme d'unités de transcription indépendantes, dans des régions intergéniques (Rodriguez et al., 2004). Le pri-miARN contient des séquences qui lui permettent de se replier en une structure secondaire en forme de tige-boucle dont la complémentarité est imparfaite, celle-ci est reconnue et coupée dans le noyau par une endonucléase de type III appelée Drosha (Lee et al., 2003). Les caractéristiques moléculaires de la tige-boucle permettant sa reconnaissance par Drosha, ainsi que le mécanisme mis en œuvre pour effectuer la coupure sont maintenant bien connus (Nguyen et al., 2015; Fang and Bartel, 2015)(Figure 2 et 3).

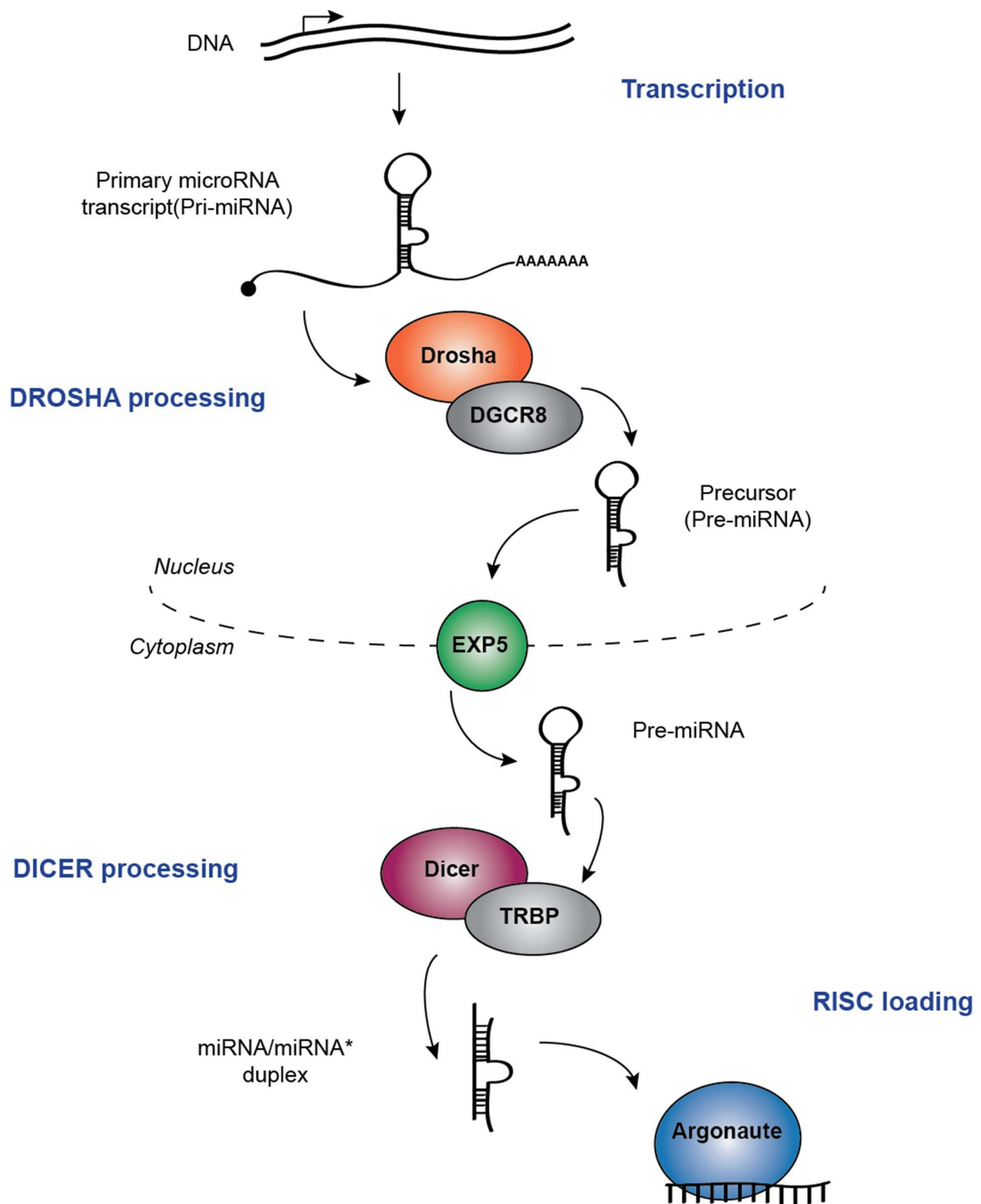


Figure 1: Biogénèse canonique des miARN.

Le transcrit primaire pri-RNA est clivé par Drosha/DGCR8 dans le noyau pour produire le pré-miARN ce dernier est exporté dans le cytoplasme par l'Exportine 5. Dans le cytoplasme le pré-miARN est clivé par Dicer/TRBP pour former un duplexe de miARN dont l'un des brins est chargé sur Argonaute. Figure fournie par Semih Cetin.

Tout d'abord Drosha n'intervient pas seule mais avec l'aide de co-facteurs dont le plus important est DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) qui est présent à raison de deux molécules pour une molécule de Drosha au sein du microprocesseur (Denli et al., 2004;

Nguyen et al., 2015). La tige de l'épingle à cheveux est longue d'environ 33 paires de bases (pb) ce qui représente trois tours de double hélice d'ARN (Han et al., 2006). Drosha agit comme une règle en mesurant 11 pb depuis la jonction entre la partie ARN simple-brin (sb) et la partie ARN double-brin (db) pour induire la coupure. Pour se placer correctement le long de la tige-boucle, Drosha et DGCR8 interagissent avec des éléments de la tige ainsi qu'avec des éléments apicaux. Ainsi, Drosha reconnaît préférentiellement au niveau basal le motif UG en position -13 (par rapport au site de coupure) et un motif CNNC en position +17. DGCR8 peut interagir avec un motif UGU au niveau de la boucle apicale (Auyeung et al., 2013). A ces motifs, on peut ajouter un mésappariement qui contient souvent le motif GHG au sein de la tige (Fang and Bartel, 2015) (Figure 3). Ces éléments ne sont pas indispensables puisque tous les pri-miARN ne les possèdent pas, mais ils semblent déterminants pour favoriser la coupure. L'étape de clivage par Drosha peut être réalisée co-transcriptionnellement puisqu'elle peut intervenir avant l'épissage (Liu et al., 2016; Morlando et al., 2008). Le précurseur de miARN (pré-miARN) formé suite à la coupure par Drosha possède une extrémité 3' sortante caractéristique des produits de nucléase de type III (Lee, 2002).

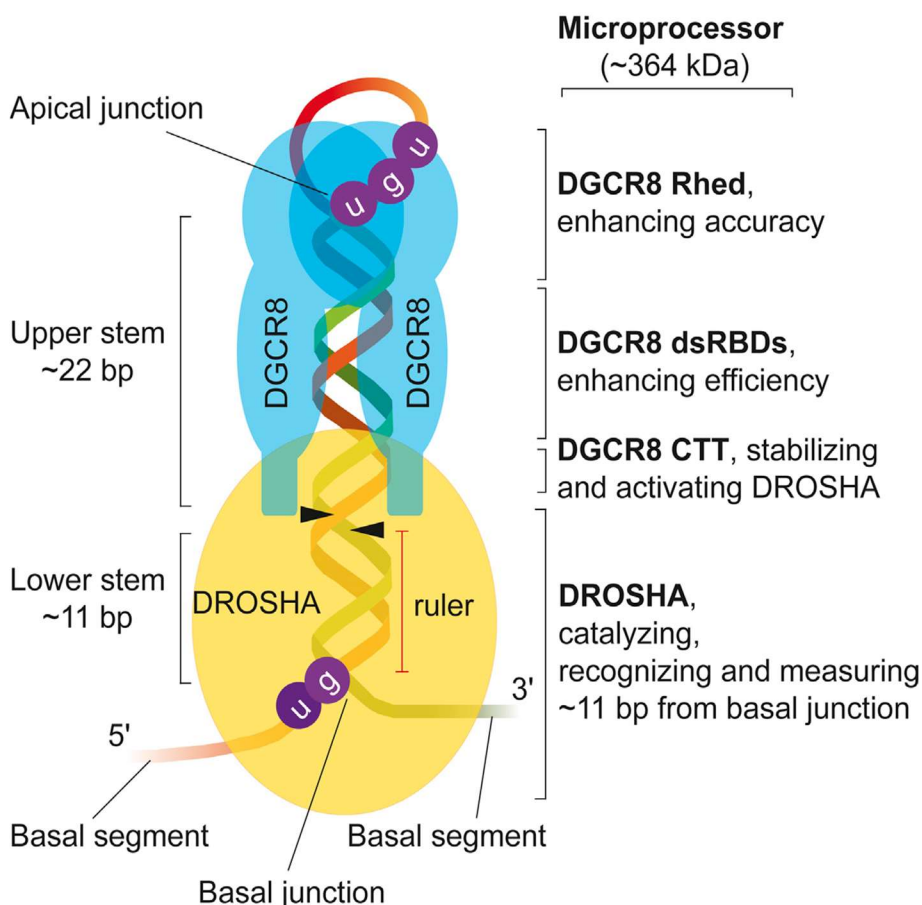


Figure 2 : Représentation schématique du positionnement du microprocesseur sur le pri-miARN.

Drosha et un dimère de DGCR8 permettent le clivage précis du pri-miARN à 11 nucléotides de la jonction basale. D'après (Nguyen et al., 2015).

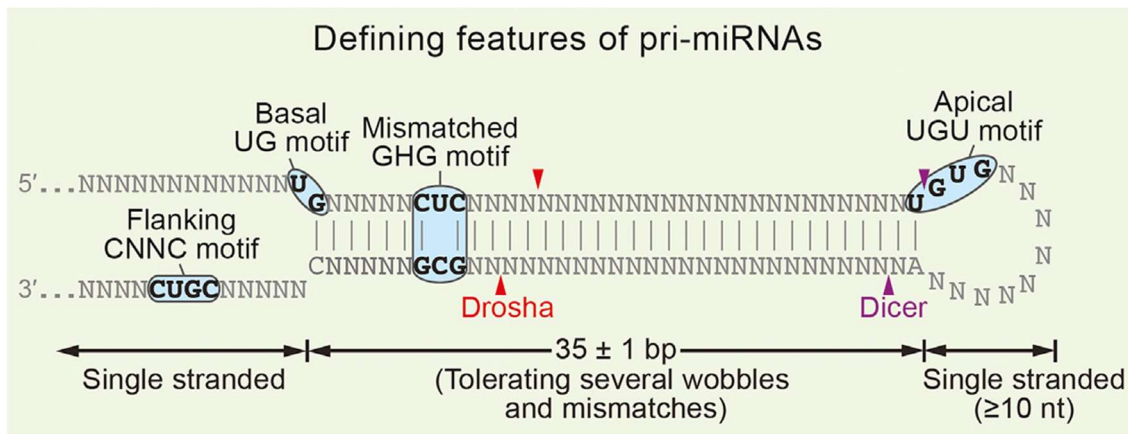


Figure 3 : Récapitulatif des séquences reconnues sur un pri-miARN canonique.

Drosha/DGCR8 reconnaît les motifs : basal UG, apical UGUG, le mesappariement GHG et la séquence flanquante CGUC. Dicer reconnaît la coupure caractéristique de Drosha au niveau des extrémités du pré-miARN. La tige-boucle est par conséquent longue d'environ 33 paires de bases. D'après (Fang and Bartel, 2015).

2.1.2. Export du pré-miARN vers le cytoplasme

Une fois le clivage du pri-miARN effectué, le pré-miARN est ensuite activement exporté du noyau vers le cytoplasme par l'Exportine 5 (XPO5) (Figure 4) en utilisant l'énergie de l'hydrolyse du Ran-GTP en Ran-GDP (Bohnsack, 2004; Lund, 2004; Yi, 2003). L'XPO5 constitue une porte de sortie du noyau importante pour les pré-miARN puisque sans elle ils s'accumulent dans le noyau (Melo et al., 2010). Cependant, il doit exister des voies de compensation puisqu'une étude plus récente montre que sa délétion impacte globalement peu l'accumulation des miARN matures (Kim et al., 2016c). L'élément principal reconnu par l'XPO5 est la présence d'une extrémité 3' sortante de deux nucléotides avec un résidu hydroxyl en 3', la séquence en ARN n'influence pas la reconnaissance (Okada et al., 2009; Yamazawa et al., 2018).

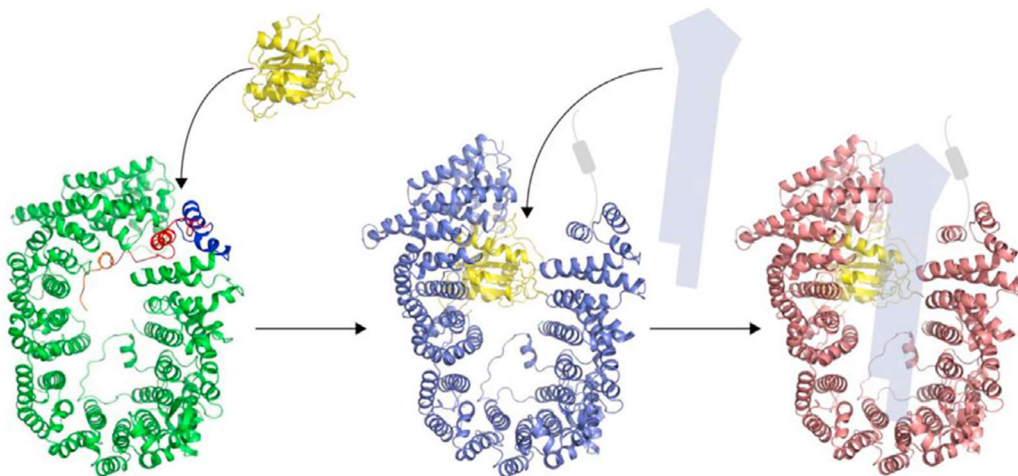


Figure 4 : Structure de l'Exportine 5.

La fixation du Ran-GTP (jaune) sur l'Exportine 5 fermée (vert) permet son ouverture (bleu) et l'entrée de la tige boucle (grise). Une fois le cargo chargé (rouge), l'hydrolyse du GTP permet l'export vers le cytoplasme. Figure tirée de (Yamazawa et al., 2018).

2.1.3. Coupure du pré-miARN en duplexe de miARN

Une fois transféré dans le cytoplasme, le pré-miARN va être clivé par une autre RNase de type III appelée Dicer produisant ainsi un duplexe de miARN (Grishok et al., 2001; Hutvagner, 2001; Ketting, 2001). La protéine Dicer reconnaît son substrat par son domaine PAZ (PIWI Argonaute Zwiille) au niveau de l'extrémité 3' sortante (Figure 4 et 5) et mesure 22 nucléotides (chez les mammifères) avant de couper (MacRae, 2006; Zhang et al., 2004). De plus, le substrat est également reconnu au niveau de l'extrémité 5' phosphate du pré-miARN, Dicer mesure 22 nucléotides sur cette extrémité également avant de réaliser la coupure (Park et al., 2011). La protéine TRBP (Tar transactivation region binding protein) (Chendrimada et al., 2005; Haase et al., 2005) et la protéine PRKRA ou PACT (Protein ACTivator of PKR) (Lee et al., 2006) sont des co-facteurs importants de Dicer. TRBP est essentiel pour assurer la précision des coupures mais pas pour la capacité ou l'efficacité de clivage de Dicer. Le rôle exact de PACT n'est pas connu à ce jour car son absence n'a pas permis de montrer une fonction similaire (Kim et al., 2014). TRBP et PACT interagissent avec Dicer par l'intermédiaire du même domaine ils s'excluent donc mutuellement (Wilson et al., 2015). Il a également été montré que la distance entre le domaine PAZ et les 2 domaines RNase III (RIIID) sont déterminants pour définir la position de coupure qui génère le duplexe de miARN (Liu et al., 2018). Après coupure du pré-miARN par Dicer, le duplexe de miARN généré est chargé sur un complexe effecteur appelé RNA Induced Silencing Complex (RISC) qui contient toujours une protéine de la famille Argonaute (Carmell et al., 2002). Je vais décrire cette étape plus loin dans ce chapitre.

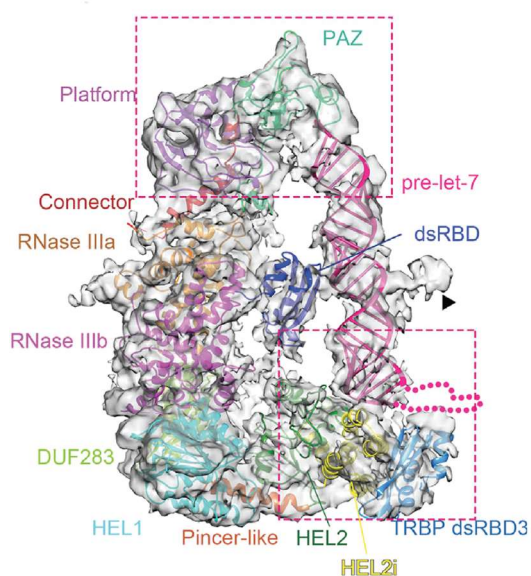


Figure 5 : Structure Dicer/TRBP chargé par le pré-miRNA pre-let-7.

Le pré-miARN est positionné aux extrémités 3' et 5' au niveau du domaine PAZ à l'aide de TRBP. La position choisie permet de placer le pré-miARN correctement par rapport aux domaines RNase III qui coupent alors aux bonnes positions. Figure tirée de (Liu et al., 2018).

2.2. Biogénèse non-canonique

La plupart des miARN sont synthétisés selon la biogénèse classique : transcription par RNAPol II, clivage par Drosha, export par XPO5, clivage par Dicer et chargement sur RISC. Il existe cependant un certain nombre d'exceptions à cette règle. Tout d'abord au niveau de la transcription puisque des ARN non-codants tels que des ARN de transfert (ARNt) ou des small nucleolar RNA (snRNA) qui sont transcrits par l'ARNpol III peuvent être la source de miARN (Babiarz et al., 2008; Ender et al., 2008). La biogénèse de ces miARN sont de plus indépendante de Drosha/DGCR8. On retrouve cette voie de synthèse de miARN chez certains herpèsvirus qui produisent leurs propres ARN non codants correspondant à un ARNt suivi d'une ou deux tige-boucles de pré-miARN qui sont coupés par la RNase Z (Pfeffer et al., 2005; Bogerd et al., 2010). L'utilisation d'une voie alternative consistant à se passer de Drosha pour synthétiser un miARN représente le cas le plus fréquent de la dérogation au canon (Figure 6). On peut différencier plusieurs voies de synthèse qui échappent à Drosha, peut-être parce que cette étape est parmi les plus régulées dans la voie de synthèse des miARN, comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre. Dans ce cas, il faut partir d'ARN qui mime directement la structure d'un pré-miARN ou qu'une autre enzyme se charge du clivage pour obtenir un pré-miARN. Le cas des mirtrons est l'un des plus connus, ils dérivent du produit d'un épissage d'un intron et ne nécessitent généralement pas d'autres étapes avant de rejoindre la voie de biogénèse canonique des miARN au niveau de l'export par XPO5 (Berezikov et al., 2007; Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Les mirtrons diffèrent des autres pré-miARN par le fait qu'ils doivent être débranchés (lariat) et qu'ils sont souvent plus long et uridylés en 3' (Wen et al., 2015). L'évolution semble favoriser l'apparition des mirtrons mais il existe chez la Drosophile un système qui contrecarre ces mirtrons en ajoutant une étape de polyuridylation ce qui inhibe leur biogénèse (Bortolamiol-Becet et al., 2015; Reimão-Pinto et al., 2015).

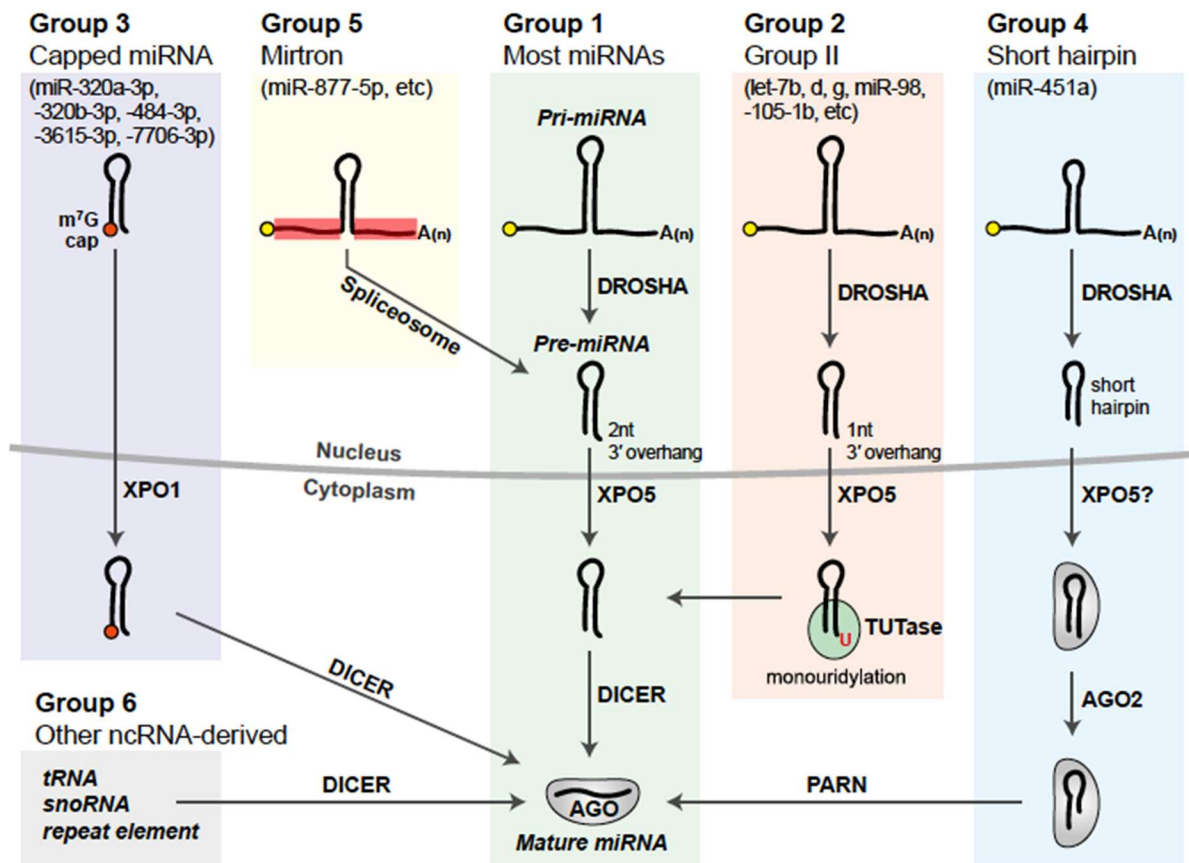


Figure 6 : Biogénèse non canonique des miARN.

Les miARN sont classés en 6 groupes basés sur leur besoin pour leur biogénèse : la biogénèse canonique (Groupe 1), la présence d'une monouridylation (Groupe 2), la présence d'une coiffe (Groupe 3), la taille de l'épingle à cheveux (Groupe 4), les mirtrons (Groupe 5) ou les miARN dérivant d'ARN non codants (Groupe 6). Figure tirée de (Kim et al., 2016c).

Un autre cas de biogénèse indépendante de Drosha est celui des pré-miARN coiffés en 5'. Ils sont évidemment produits par la RNAPol II mais, à la différence d'autres ARN produits par la RNAPol II impliqués dans la biogénèse des miARN, ils ne sont pas polyadénylés pour cause de terminaison prématurée. En raison de la présence de la coiffe, ils sont exportés par l'Exportine 1 (XPO1) qui est impliquée dans l'export vers le cytoplasme des *Cap Binding Complex* et, bien que coupés par Dicer, seul le brin 3p peut-être chargé sur AGO (Xie et al., 2013). On soupçonne également que la voie de synthèse présente dans les cellules quiescentes des mammifères et qui utilise XPO1 pour l'export de ces ARN coiffés hyperméthylés (2,2,7 trimethyl), adresse ces pré-miARN pour être clivés par un isoforme cytoplasmique de Drosha (Martinez et al., 2017; Link et al., 2016).

Il existe d'autres entorses au canon de la biogénèse des miARN lorsque la structure ou la taille de la tige-boucle n'est pas respectée. On trouve dans les érythrocytes chez les mammifères le miR-451 dont le pré-miARN est trop court pour être clivé par Dicer et qui est directement chargé sur AGO2 pour y être clivé par celle-ci au niveau du brin 3' (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010). Les nucléotides résiduels du brin 3p toujours présents en 3' du brin 5p sont ensuite éliminés par l'exoribonucléase PARN (PolyA Specific Ribonuclease) (Yoda et al., 2013). On trouve également dans les érythrocytes le miARN miR-486 qui requiert le clivage

par AGO2 du brin passager pour pouvoir être chargé sur AGO2 bien que le pré-miARN ait au préalable été clivé par Dicer. Les souris doubles ko pour miR-451 et miR-486 présentent le même phénotype d'anémie que les souris dont la fonction endonucléasique d'AGO2 a été abolie (Jee et al., 2018).

Enfin, on trouve parmi les miARN de la famille let-7 (entre autres), certains pré-miARN dont l'extrémité 3' sortante est trop courte puisqu'elle ne contient qu'un seul nucléotide au lieu de deux. Ces pré-miARN sont exportés tels quels mais doivent être monouridylés avant de pouvoir être clivés par Dicer (Heo et al., 2012).

2.3. Chargement du complexe RISC

Pour pouvoir exercer une fonction dans la cellule le miARN doit obligatoirement être chargé au sein d'un complexe RISC. Ce complexe contient au minimum une protéine Argonaute qui est la protéine qui fournit le logement final du miARN. On peut considérer qu'il y a quatre complexes contenant Argonaute qui se succèdent au cours du chargement : AGO-apo qui représente la protéine Argonaute vide, la pre-RISC qui contient le duplexe de miARN, RISC qui représente l'effecteur qui contient le guide et enfin le RISC Target complex qui contient le guide et la cible. Je vais commencer par décrire plus en détail la structure d'Argonaute chargé avant de décrire le processus de chargement lui-même.

2.3.1. Organisation et structure d'Argonaute au sein de RISC

Les protéines Argonaute et notamment AGO2 sont organisées en six domaines : N, L1, PAZ, L2, MID et PIWI. L'extrémité 5' monophosphate de l'ARN guide vient se loger au sein du domaine MID (Figure 7) au niveau d'une poche appelée poche du 5' du miARN (Ma et al., 2004; Parker et al., 2005). L'extrémité 3' du miARN vient quant à elle se loger au niveau du domaine PAZ (Lingel et al., 2004; Yan et al., 2003). C'est le domaine PIWI qui possède l'activité d'endonucléase de type RNaseH capable de cliver une cible ou bien de cliver le brin passager lors du chargement de certains précurseurs comme nous l'avons vu plus haut. C'est également au niveau du domaine PIWI que vont se positionner les quatre premiers nucléotides de la région 'seed' du miARN, c'est à dire les plus importants pour la reconnaissance des ARN cibles (Chandradoss et al., 2015; Salomon et al., 2015) (voir partie 2.1). Les linker L1 et L2 relient le domaine N au domaine PAZ et PAZ à MID respectivement et participent à la formation du canal qui accueille le brin guide.

On a longtemps cru que seule AGO2 était munie de l'activité endonucléasique chez les mammifères (Meister et al., 2004; Song et al., 2004). Mais une telle activité a pu être attribuée récemment à AGO3. Toutefois, à la différence d'AGO2, il semble que les parties 5' et 3' flanquantes de la cible jouent un rôle indispensable à la bonne activité endonucléasique d'AGO3 (Park et al., 2017).

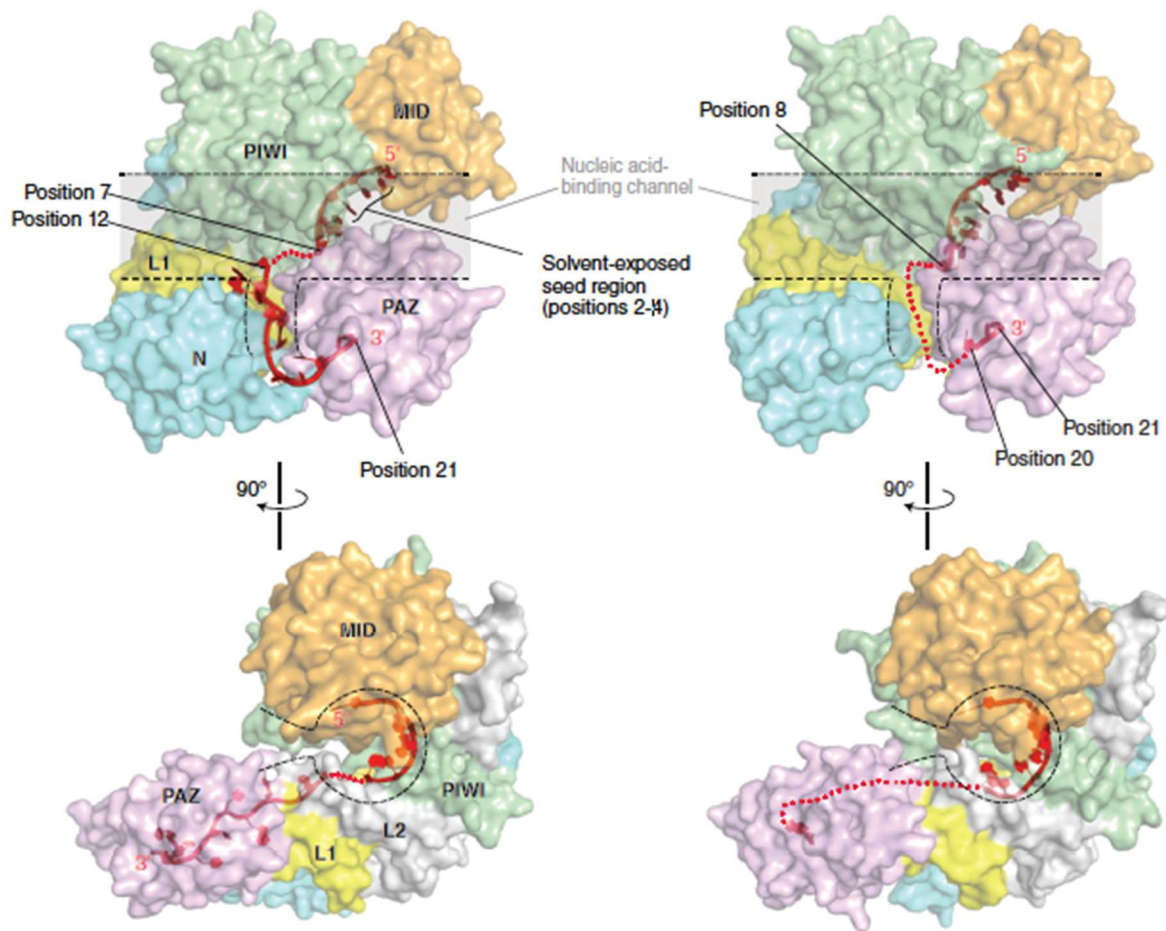


Figure 7 : Structure tridimensionnelle et organisation des domaines de AGO2 et AGO1 chargées d'un miARN.

L'extrémité 3' du miARN se loge au niveau du domaine MID alors que l'extrémité 5' est protégée par le domaine PAZ dans hAGO2 (à gauche) et hAGO1 (à droite). Tiré de (Nakanishi, 2016).

2.3.2. Complexe de chargement de RISC

Avant de pouvoir être chargé dans le protéine Argonaute, le duplexe de miARN est tout d'abord transmis de Dicer vers le complexe de chargement (miRLC : RISC loading complex) en présence de Dicer et TRBP (Chendrimada et al., 2005, Gregory et al., 2005, Maniataki and Mourelatos, 2005). Le processus de chargement des siARN chez la Drosophile fait, lui, intervenir un complexe Dicer-2 et R2D2 pour l'assemblage du complexe RISC. C'est d'ailleurs R2D2 qui reconnaît l'extrémité la plus stable du duplexe pendant que Dicer-2 se lie à la moins stable participant ainsi également au choix du brin chargé (Liu et al., 2003, Tomari et al., 2004). Chez les mammifères, TRBP et Dicer sont associés au moment de la formation du pré-RISC mais semblent intervenir de manière moins étroite et ne participent pas au choix du brin guide (Betancur and Tomari, 2012, Kim et al., 2014). Au contraire, c'est la protéine AGO seule qui est capable de faire ce choix (voir ci-après) (Suzuki et al., 2015).

2.3.3. Chargement de RISC

Le chargement du duplexe de miARN est un processus dynamique et actif qui fait intervenir de nombreux partenaires protéiques tels que les chaperonnes HSC70 et HSP90 (Iwasaki et al., 2010, Johnston et al., 2010), ainsi que leurs co-chaperonnes dont HSP40, Hop, P23 (Meacham et al., 1999, Scheufler et al., 2000, Ali et al., 2006). HSC70 et HSP90, respectivement sous forme de monomère et de dimère, travaillent ensemble au repliement de nombreuses protéines dont les Argonautes (Iwasaki et al., 2015). Le rôle de ces chaperonnes est de maintenir le repliement des protéines Argonaute dans une conformation défavorable thermodynamiquement mais favorable pour son chargement puisqu'elle lui permet d'accommoder le duplexe de miARN (Figure 8). Une fois que le duplexe est chargé, le pre-RISC gagne en stabilité (Kobayashi and Tomari, 2016). Les rôles de HSC70 et HSP90 ont été précisés chez la Drosophile où HSC70 est capable d'ouvrir AGO de manière transitoire et HSP90 prolonge l'ouverture en maintenant AGO dans cette position favorable (Tsuboyama et al., 2018).

Cette prise en charge d'Argonaute par les protéines chaperonnes est importante car lorsque la protéine libre n'est pas chargée par un petit ARN, elle subit un clivage rapide entre les domaines MID et PIWI ce qui conduit à sa dégradation (Elkayam et al., 2012). Une récente étude sur la stabilité des miARN a montré que la demi-vie d'AGO2 est en moyenne plus longue que la demi-vie des miARN suggérant que la plupart des miARN sont retirés d'AGO2 de manière à permettre le re-chargement d'AGO2 (Kingston and Bartel, 2019).

2.3.4. Choix du guide

Au sein de ce complexe de chargement, le brin guide est chargé sur AGO alors que le brin passager (miARN*) est relargué. Ce choix se fait sur des bases thermodynamiques par rapport à la stabilité des extrémités du duplexe (Khvorova et al., 2003, Schwarz et al., 2003). Le chargement doit être initié par la reconnaissance de l'extrémité 5' avant que le reste du duplexe ne rentre dans le canal accepteur de la protéine Argonaute, où le brin guide peut établir de nombreuses connexions par liaisons hydrogène par l'intermédiaire de sa chaîne sucre-phosphate (Nakanishi et al., 2012).

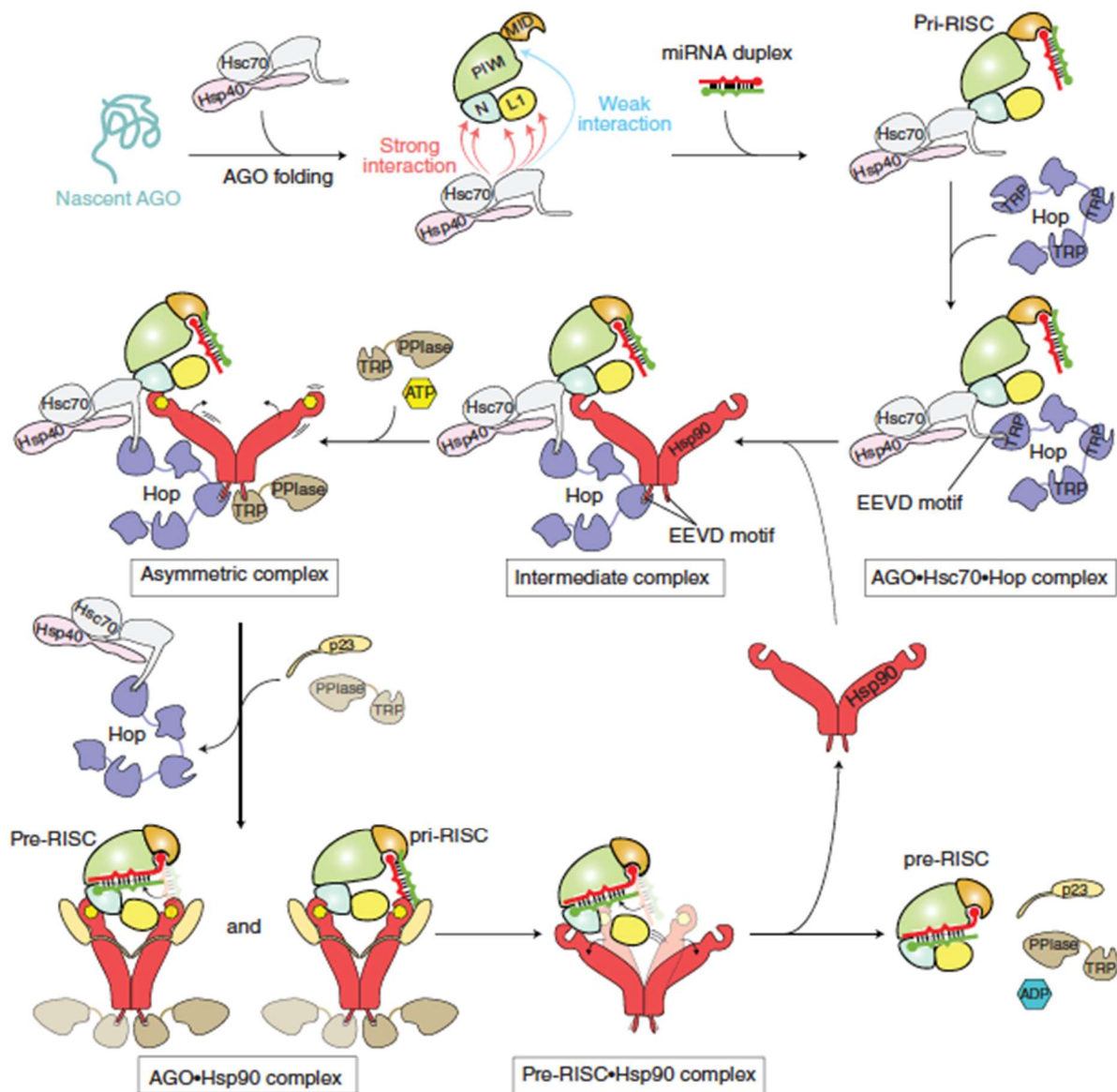


Figure 8 : Modèle de chargement du complexe RISC.

Argonaute est pris en charge par les protéines chaperonnes HSC70, HSP90, et HSP40 et leurs co-chaperonnes pour maintenir Argonaute dans une position qui empêche sa dégradation rapide mais qui permet le chargement du duplexe de miARN. (Nakanishi, 2016).

3. Mode d'action des miARN

3.1. Reconnaissance de la cible

Une fois le complexe RISC actif formé, le miARN va guider celui-ci vers l'ARN messager cible pour induire sa répression post transcriptionnelle. Chez les animaux, il existe dans de rare cas une complémentarité parfaite entre le miARN et sa cible. Dans ce cas, et lorsque le miARN est chargé sur une protéine AGO2, cela conduit au clivage de l'ARN cible (Yekta et al., 2004). Dans la vaste majorité des cas cependant, il n'y a qu'une complémentarité imparfaite entre le miARN et sa cible, ce qui fait qu'un miARN peut potentiellement avoir un nombre de cible

élevé. Le long de la séquence du miARN, tous les résidus n'ont pas la même importance. Il est essentiel d'avoir un appariement au niveau de la région 'seed' qui correspond aux nucléotides 2 à 7 ou 8 à partir de l'extrémité 5' du miARN pour que le complexe RISC reconnaisse efficacement sa cible (Lewis et al., 2003). Cette région seule est suffisante pour la reconnaissance de la cible, et ce, même si le phénomène de « wobble pairing » G-U diminue la spécificité pour la cible et par conséquent augmente encore le nombre de cibles potentielles d'un miARN, alors que la complémentarité de la partie 3' est facultative (Brennecke et al., 2005; Doench and Sharp, 2004). La structure d'AGO2 obtenue par cristallographie montre que seul le début de la région seed est exposé au solvant et donc libre de former des paires de bases avec des cibles potentielles (Elkayam et al., 2012; Schirle and MacRae, 2012; Nakanishi et al., 2012).

Toutefois, la complémentarité ne se limite pas exclusivement à l'appariement seed/seed-match et un système de compensation peut même se mettre en place en cas d'imperfection dans la complémentarité dans cette région (Bartel, 2009). La région ciblée par le miARN est généralement située dans la région 3' UTR de l'ARNm mais peut plus rarement se situer ailleurs, préférentiellement dans la région 5' UTR (Chi et al., 2009; Hafner et al., 2010; Leung et al., 2011). Il existe des exemples d'interactions entre la cible et le miARN qui montrent que le contexte de la cible est important : par exemple d'autre partie de la région 3' UTR de l'ARN Cog-1 de *C. elegans* sont importants pour avoir une répression efficace par les miARN (Didiano and Hobert, 2008). D'autres éléments du contexte permettent de moduler la possibilité pour un miARN de trouver sa cible. L'accessibilité de la cible peut être un élément déterminant, mais aussi la proximité de séquences riches en A-U qui permet d'avoir moins de structures secondaires ou avec des interactions moins fortes. La cible n'est de préférence pas à proximité immédiate du codon STOP (c'est à dire à moins de 15 nucléotides) ce qui évite les conflits avec la machinerie de traduction. Il y a aussi une préférence pour les extrémités de la région 3' UTR qui sont moins structurés que le milieu (Broderick et al., 2011; Grimson et al., 2007; Saetrom et al., 2007). D'autre part, la présence à proximité d'autres sites ciblés par le même miARN ou par d'autres miARN peut contribuer à augmenter l'efficacité de répression de la cible par effet de coopération (Gaidatzis et al., 2007). Enfin l'interaction avec d'autres protéines fixant l'ARN peut également moduler l'interaction avec les miARN. Ainsi, la protéine DND1 peut masquer des sites de fixation de miARN et empêcher ainsi la régulation du messenger (Kedde et al., 2007).

3.2. Répression et dégradation

En fonction du niveau de complémentarité entre le miARN et le messenger, l'ARN cible reconnu peut subir deux destins différents. La cible peut subir un clivage en cas de complémentarité très étendue suivie d'une dégradation par des exoribonucléases (Hutvagner et al., 2004; Liu et al., 2004; Meister et al., 2004). Mais la plupart du temps, c'est la traduction de la cible qui est réprimée ce qui implique le recrutement par Argonaute de facteurs dont le principal est la protéine adaptatrice TNRC6 (Trinucleotide Repeat Containing Protein 6) également appelée

GW182 chez la Drosophile. Chez les mammifères, il s'agit en réalité de trois protéines très proches (TNRC6A, TNRC6B et TNRC6C) (Jonas and Izaurralde, 2015).

Comme nous le verrons plus loin, l'effet de la fixation d'une protéine Argonaute chargée d'un miARN sur un ARNm induit en fait à la fois la répression de sa traduction proprement dite et l'accélération de sa dégradation. Ceci est réalisé par le recrutement par TNRC6 d'enzymes d'élimination de la coiffe en 5' (decapping), et d'enzymes de déadénylation suivie de l'induction de la dégradation 5'->3' de l'ARN cible. Ce mécanisme est parfois renforcé par l'adressage de l'ARN messenger ciblé par le complexe RISC dans des corps cytoplasmiques appelés mRNA Processing Bodies (P-bodies), ce qui réduit leur possibilité d'interaction avec la machinerie de traduction (Eulalio et al., 2007; Liu et al., 2005; Pillai et al., 2005; Sen and Blau, 2005).

3.3. Structure/fonction et partenaires de TNRC6

Les protéines TNRC6 sont constituées de plusieurs sous-domaines mais la protéine peut être grossièrement divisée en deux parties liées à leurs fonctions (Figure 9) : la partie N-terminale qui permet d'interagir avec AGO (Ago Binding Domain : ABD) et la partie C-terminale qui correspond au Silencing Domain (SD) et permet de recruter différentes protéines effectrices. Le domaine ABD est riche en résidus glycines et tryptophanes (d'où le nom de la protéine chez la Drosophile) qui sont directement impliqués dans les interactions avec les protéines Argonaute (Lian et al., 2009a). Par contre, les motifs GW présents sur le reste de la protéine ne jouent pas de rôle dans cette interaction. Les TNRC6 possèdent en réalité trois sites ABD indépendants capables de lier séparément un Argonaute chacun (Takimoto et al., 2009). De plus la région N-terminale des trois TNRC6 est capable d'interagir avec les quatre Argonautes sans réelle spécificité d'un TNRC6 pour une Argonaute en particulier (Lazzaretti et al., 2009; Zipprich et al., 2009).

Le domaine Ubiquitin-associated like (UBA) adjacent est impliqué dans des interactions avec les voies liées à l'ubiquitine tel que l'E3-ubiquitine ligase qui permet de recruter des effecteurs et au protéasome (Su et al., 2011; Huntzinger and Izaurralde, 2011). Le domaine Q-rich joue un rôle dans la localisation du complexe dans les P-bodies (Lazzaretti et al., 2009).

Le motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) a initialement été attribué à un domaine permettant de se lier à l'ARN (Eystathioy et al., 2002). Mais plus tard il a été démontré que ce domaine est impliqué dans l'interaction avec d'autres protéines et non l'ARN (Eulalio et al., 2009).

Le Silencing Domain (SD) constitué des parties MID, C-ter et RRM est suffisant pour induire la régulation d'un ARN messenger s'il est recruté sur celui-ci (Zipprich et al., 2009; Lazzaretti et al., 2009). La région MID est celle qui permet l'interaction avec les déadénylases PAN2/PAN3, tandis que le domaine C-ter permet l'interaction avec le complexe CCR4-NOT (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011). Le domaine PAM2 (PABP interacting Motif) quant à lui permet d'établir le lien avec les PABP et notamment PABPC1 (Jinek et al., 2010; Kozlov et al., 2010).

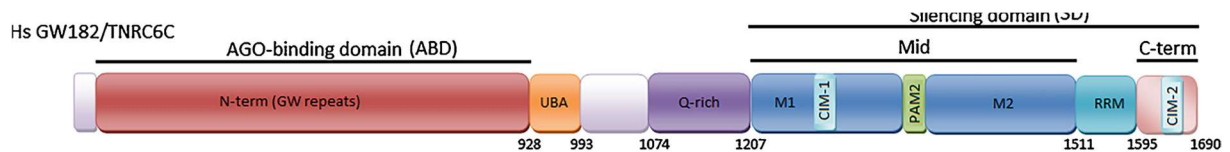


Figure 9 : Les différents domaines de TNRC6C.

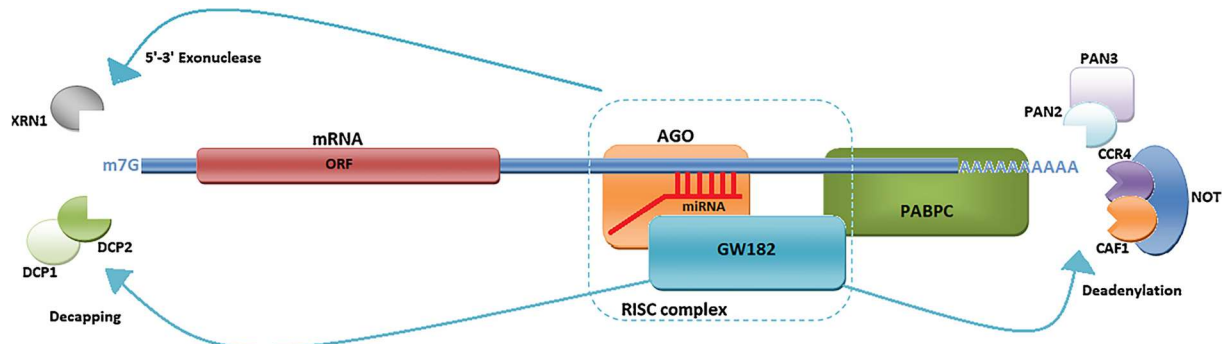


Figure 10 : RISC reconnaît une cible et induit sa répression.

Après la reconnaissance d'une cible par RISC, TNRC6 (GW182) est recruté sur le site et sert de plateforme pour interagir avec les PABPC et recrute les complexes de déadénylation PAN2-PAN3 et le complexe CCR4-NOT et enfin les enzymes de dégradation de la coiffe (DCP1-DCP2) et une exoribonucléase 5' → 3' (XRN1). (Niaz and Hussain, 2018).

3.4. Mécanisme d'action

Le phénomène de répression de la cible par un miARN requiert au minimum AGO, TNRC6, PABP et des déadénylases (Huntzinger et al., 2013). TNRC6 interagit avec le domaine PIWI d'AGO qui contient trois poches d'interaction avec les résidus tryptophanes très proches et qui ne permettent d'interagir qu'avec une seule molécule de TNRC6 (Sheu-Gruttadauria and MacRae, 2018). Le recrutement de TNRC6 au niveau de la cible va permettre la répression de la traduction et l'accélération de sa dégradation mais l'importance relative des deux phénomènes a longtemps été débattue. Il semble cependant que la majorité de l'effet dû à la voie des miARN est liée à la dégradation de l'ARN messager plutôt qu'à la répression de sa traduction (Eichhorn et al., 2014; Guo et al., 2010). Tout se passe comme si la répression de la traduction n'a d'importance que dans les toutes premières étapes suivant la reconnaissance de la cible, le temps de mettre en place la dégradation de l'ARN messager (Bazzini et al., 2012; Eichhorn et al., 2014).

Chez la drosophile, GW182 interagit avec les PABP par l'intermédiaire du motif PAM2 (Huntzinger et al., 2010). L'importance de cette interaction est démontrée par le fait que la moindre modification de ce motif empêche l'interaction entre les deux protéines, ce qui conduit à la perte de l'effet des miARN (Huntzinger et al., 2013). Cette interaction est tout aussi importante chez les mammifères. Il a été proposé que l'interaction GW182 – PABP interfère avec la circularisation de l'ARN messager ce qui conduit les extrémités 5' et 3' à être plus disponibles pour la dégradation (Zekri et al., 2009). Par ailleurs, GW182 promeut la déadénylation en fixant deux machineries de déadénylation (Figure 10) : PAN2-PAN3 d'une part et le complexe CCR4-NOT de l'autre (Braun et al., 2011; Chekulaeva et al., 2011; Fabian et al., 2011). L'analyse du transcriptome de cellules déplétée pour CCR4-CAF1, une protéine

importante du complexe CCR4-NOT, montre que les cibles des miARN sont plus exprimées ce qui montre l'importance cruciale de ce complexe (Eulalio et al., 2008). Des expériences de sur-expression des formes mutantes dominantes négatives de PAN2, CAF1 et DCP2 suggèrent que le mécanisme est le même chez les mammifères (Chen et al., 2009).

La perte de la coiffe est également une étape importante pour la dégradation d'un ARN messenger et elle est généralement rapidement induite suite à l'étape de déadénylation. L'enzyme qui permet le décoiffage est DCP2 et elle doit être assistée de plusieurs co-facteurs : DCP1, EDC4, Pat et RCK/p54, après quoi XRN1 est responsable de la dégradation de l'ARN de 5' en 3' (Huntzinger and Izaurralde, 2011) (Figure 11).

Le mécanisme d'inhibition de la traduction proposé est celui de l'inhibition de l'initiation de la traduction par l'intermédiaire de l'interaction avec le complexe eIF4F (Jonas and Izaurralde, 2015).

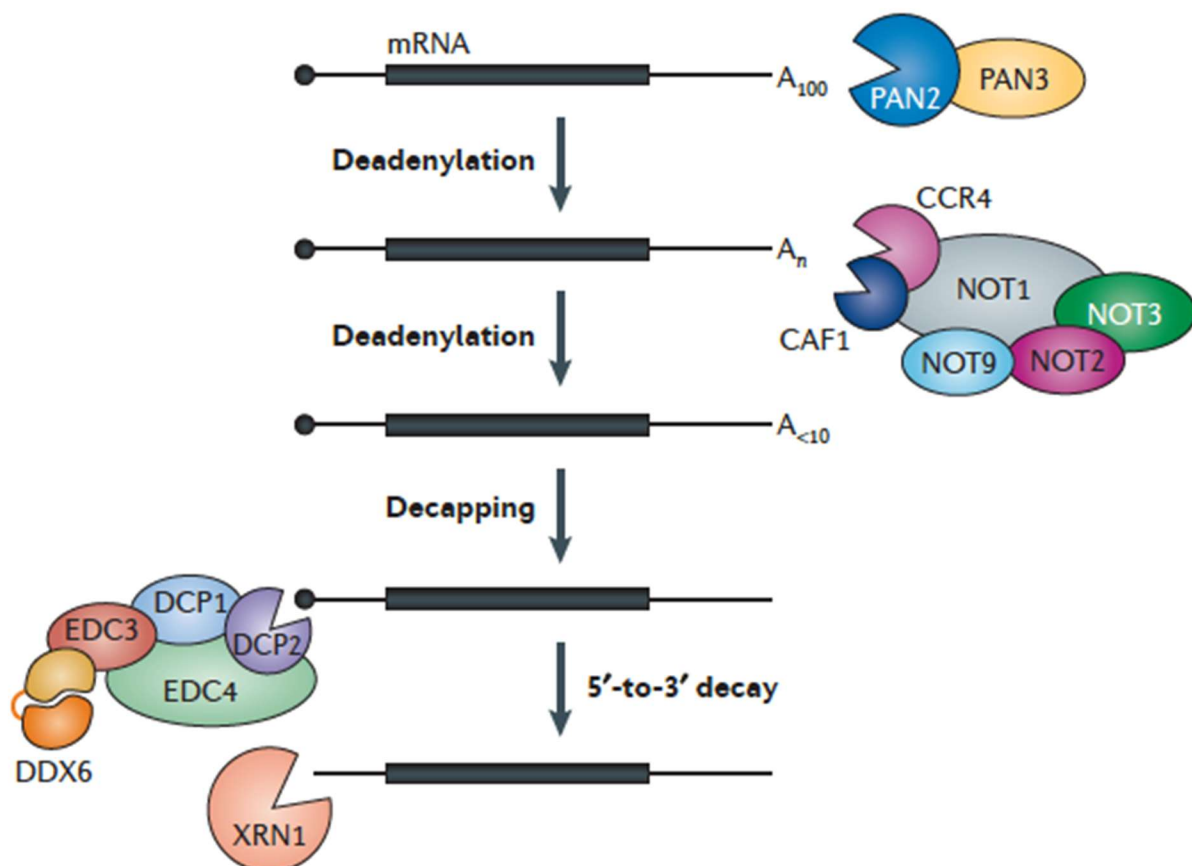


Figure 11 : Processus de répression/dégradation d'un ARN cible.

La dégradation est déclenchée par la déadénylation par PAN2-PAN3 qui est responsable de la première étape. Cette déadénylation est complétée par le complexe CCR4-NOT bien que CCR4-NOT soit capable d'agir seul. Cela conduit au décoiffage du messenger par DCP1, EDC3, EDC4 et DDX6. EDC4 permet de recruter ensuite XRN1 pour la dégradation 5'→3'. (Jonas and Izaurralde, 2015).

4. Régulation de l'expression des miARN

Étant donné l'importance de la régulation induite par les miARN, il n'est pas surprenant que leur expression soit elle-même sous le contrôle d'une régulation stricte. Il y a une combinaison de plusieurs facteurs qui module le niveau d'expression des miARN puisqu'une régulation est possible à tous les niveaux de la biogénèse des miARN. De plus il existe une régulation sur l'effet produit dans les cellules par modification de la stabilité des miARN eux-mêmes ou des acteurs de la voie des miARN ou par modulation de leur efficacité.

4.1. Régulation de la transcription

La plupart des miARN provenant d'une transcription par l'ARNpol II, ils peuvent subir toutes les régulations associées à ce mode d'expression : facteurs de transcription, enhanceurs, répresseurs ou modifications épigénétiques (Cai, 2004; Lee et al., 2004). En outre, certains miARN situés dans des introns disposent de leur propre promoteur en plus du promoteur partagé avec leur gène hôte (Monteys et al., 2010; Ozsolak et al., 2008). Comme pour n'importe quel gène, les facteurs de transcriptions peuvent moduler à la hausse ou à la baisse la transcription d'un pri-miARN en fonction du tissu ou du type cellulaire dans lequel il est exprimé de manière normale ou en lien avec une transformation cancéreuse (Choudhury et al., 2013). Par exemple miR-21 est fréquemment plus exprimé dans les tumeurs solides comme le cancer du sein ou celui de la prostate où il cible un suppresseur de tumeur PTEN (Yang et al., 2017). Chez la drosophile, la phosphorylation du domaine C-terminal de la RNAPol II par la kinase Cdk9 conduit à augmenter l'activité de Drosha sur des substrats des pri-miARN qui ne possèdent pas de motif UGU sur leur boucle apicale (Church et al., 2017). Les pri-miARN sont clivés de manière co-transcriptionnelle et le microprocesseur semble avoir de l'affinité pour les protéines associées aux histones. Ainsi, la protéine histone H1-like Chromatin Protein (HPIBP3) est capable de recruter et retenir Drosha au niveau de loci actifs pour la production de pri-miARN et donc d'augmenter le niveau de miARN produits (Figure 12A) (Liu et al., 2016).

4.2. Régulation au niveau du microprocesseur

Au niveau de la biogénèse des miARN, l'étape la plus abondamment régulée est celle qui dicte l'action du microprocesseur. Un grand nombre de protéines accessoires peuvent agir spécifiquement avec une sous-population de pri-miARN en interagissant directement avec les structures secondaires ou la séquence du pri-miARN ou encore en modulant l'effet des protéines impliquées dans le traitement par le microprocesseur (Michlewski and Cáceres, 2010; Moy et al., 2014).

Il y a différents modes d'action des protéines qui modulent l'action du microprocesseur. On peut distinguer les protéines qui vont faire des modifications post-traductionnelles sur les acteurs du microprocesseur (Figure 12B) et les protéines qui entrent en compétition avec

celui-ci (Figure 12C) (Cheng et al., 2014). Les protéines qui interagissent directement avec le pri-miARN peuvent réguler positivement ou négativement sa disponibilité pour le microprocesseur ou induire des modifications post-transcriptionnelles de l'ARN (Figure 12D) (Alarcón et al., 2015).

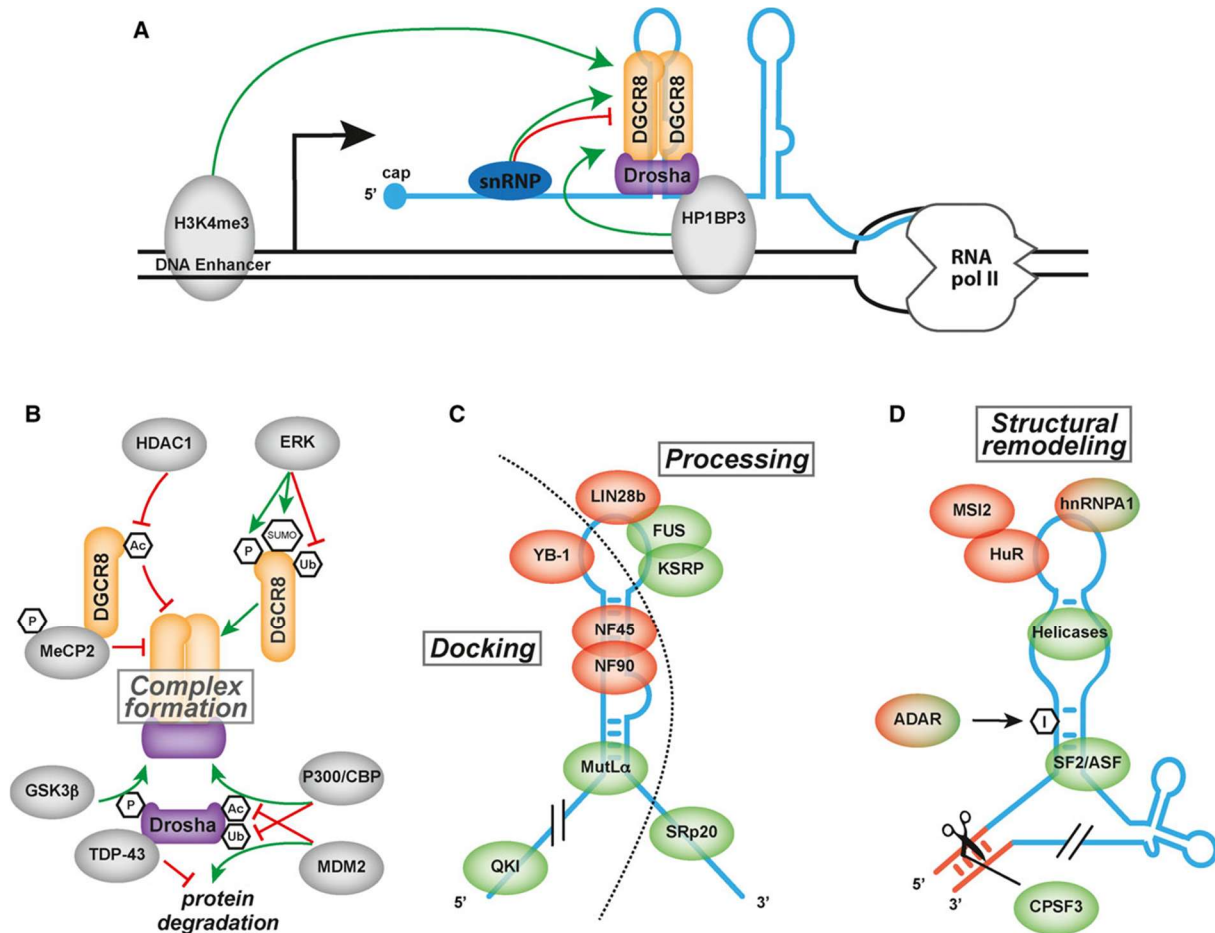


Figure 12 : Régulation de la biogénèse des miARN au niveau du microprocesseur.

A Le clivage du pri-miARN est co-transcriptionnel. A ce niveau le microprocesseur peut être modulé par des marqueurs épigénétiques (H3K4me3), des protéines histones (HP1BP3) ou des protéines liées à l'ARN (snRNP). **B** Les modifications post-transcriptionnelles des protéines du microprocesseurs vont moduler son action : phosphorylation, acétylation, ubiquitination et SUMOylation. **C** Les protéines accessoires du microprocesseur vont moduler son action en empêchant l'accès du microprocesseur ou au contraire en promouvant son recrutement. **D** Les protéines de remodelage de l'ARN permettent de changer la structure secondaire de l'ARN et d'en moduler la qualité en tant que substrat du microprocesseur. Figure tirée de (Creugny et al., 2018).

4.2.1. Action directe sur le microprocesseur

Drosha et DGCR8 sont la cible de modifications post-traductionnelles qui peuvent impacter positivement ou négativement le niveau d'expression des miARN (Figure 12 B). Drosha peut ainsi être acétylé par plusieurs acétyltransférases (P300, CBP et GCN5) au niveau de lysines sur le domaine N-terminal ce qui conduit à réduire les possibilités d'ubiquitination et donc de dégradation par le protéasome (Tang et al., 2013). Au contraire, la déacétylation du domaine

de reconnaissance de double brin d'ARN de DGCR8 par l'histone déacétylase 1 conduit à augmenter son affinité pour un sous-groupe de pri-miARN et donc à en augmenter le clivage par Drosha (Wada et al., 2012).

La phosphorylation de DGCR8 peut intervenir sur 23 résidus par des kinases (ERK1, ERK2 ou MAPK) ce qui augmente la stabilité de la protéine sans affecter sa localisation cellulaire ou l'interaction avec Drosha (Herbert et al., 2013).

La sumoylation de la lysine K707 de DGCR8 par la protéine SUMO 1 empêche son ubiquitination et par conséquent sa dégradation par le protéasome (Zhu et al., 2015).

TDP-43 est capable de stabiliser Drosha en inhibant sa dégradation par le protéasome, cette protéine reconnaît une structure spécifique au niveau de la boucle du pri-miARN (Chen et al., 2018).

4.2.2. Protéines accessoires du pri-miARN

Des protéines peuvent interagir avec le pri-miARN au niveau des régions ARN simple brin adjacentes, de la boucle ou encore avec la tige double brin (Figure 12 C). La tige-boucle du pri-miARN peut être considérée comme une plate-forme de recrutement de protéines accessoires qui vont réguler positivement ou négativement la biogénèse des miARN (Michlewski et al., 2008).

Les protéines Nuclear Factor 45 et 90 (NF45 et NF90) agissent sous la forme d'un complexe qui se lie au pri-miARN avec une affinité supérieure à DGCR8 et entre en compétition avec le microprocesseur pour sa fixation (Sakamoto et al., 2009). De la même manière, la protéine Y Box-Binding Protein (YB-1) qui reconnaît la séquence consensus UYAUC et se retrouve de ce fait liée à la plupart des ARNm et des pri-miARN, entre en compétition avec Drosha dans le cas de pri-miARN-29b-2 qui possède une telle séquence dans sa boucle apicale, contribuant ainsi à réduire le clivage des pri-miARN concernés (Wu et al., 2015). On peut encore citer LIN28b qui entre en compétition avec le microprocesseur pour le substrat pri-let-7 chez *C. elegans* (Van Wynsberghe et al., 2011).

Au contraire, TDP43 reconnaît la boucle apicale de pri-miARN tels que pri-miR-132, pri-miR-143 ou pri-miR-558 pour favoriser le recrutement de Drosha (Chen et al., 2018). De la même manière KH-type Splicing Regulatory Protein (KSRP) est recrutée au niveau de la boucle apicale de certains pri-miARN et conduit à favoriser leur clivage par le microprocesseur (Michlewski and Cáceres, 2010).

4.2.3. Action sur la structure secondaire des pri-miARN

L'interaction et la fixation de protéines sur la structure secondaire des pri-miARN est susceptible de modifier cette structure en favorisant des interactions entre acides nucléiques ou en empêchant l'interaction de certains acides nucléiques ce qui peut avoir des répercussions sur la structure de l'ARN à longue distance (Figure 12 D). Les protéines ayant des domaines hélicases figurent au premier rang des protéines pouvant avoir un tel effet. Par

exemple, les hélicases DDX5 et DDX17 ont pu être liées favorablement à l'expression d'un grand nombre de miARN en modifiant la forme de pri-miARN pour en faire de meilleurs substrat pour le microprocesseur (Hong et al., 2013; Suzuki et al., 2009). De la même manière DDX1, DDX23 et DDX3X ont pu être associées à la modulation de l'expression de certains miARN (Han et al., 2014; Chu et al., 2016; Zhao et al., 2016).

Les protéines Musashi homologue 2 (MSI2) et Hu Antigen R (HuR) reconnaissent des séquences riches en A-U au niveau de la boucle apicale de pri-miR-7 et ce de façon tissu-spécifique ce qui conduit le pri-miARN à avoir une structure secondaire plus rigide et à être un moins bon substrat pour Drosha/DGCR8 (Choudhury et al., 2013).

L'effet contraire est obtenu par la protéine Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 (hnRNPA-1) qui change la conformation de pri-miR-18a après avoir reconnu la séquence consensus UAGGGA/U, conduisant ainsi à l'augmentation de son traitement par le microprocesseur (Michlewski et al., 2008).

4.3. Régulation de l'export

La disponibilité du facteur XPO5 qui est la principale voie d'export des pré-miARN peut varier en fonction des étapes du cycle cellulaire. Or, plus le niveau d'expression de l'XPO5 est élevé, plus l'export de pré-miARN augmente, ce qui conduit à une augmentation globale du niveau des miARN matures (Iwasaki et al., 2013). A l'inverse, dans certaines tumeurs une version tronquée de XPO5 est produite, ce qui conduit à la diminution du niveau global des miARN (Melo et al., 2010).

Il a également été rapporté que les adénovirus expriment en quantité très abondante un ARN non-codant structuré en tige-boucle, appelé VA1, qui sature XPO5 ce qui conduit à la diminution de l'export des pré-miARN et donc à une diminution globale de l'expression des miARN cellulaires (Cullen, 2009).

Une autre raison de l'importance de l'XPO5 sur la voie des miARN est qu'il a été montré qu'elle est également responsable de l'export dans le cytoplasme de l'ARN messager codant pour Dicer (Bennasser et al., 2011). Il existe donc un phénomène de boucle de régulation de Dicer par un autre facteur impliqué dans la biogenèse des miARN, ce que l'on peut rapprocher de la régulation de DGCR8 par Drosha de manière indépendante des miARN (Han et al., 2009).

4.4. Régulation au niveau de Dicer

De la même manière que pour le microprocesseur, Dicer et TRBP se régulent de sorte qu'une diminution de TRBP se traduit par une diminution de Dicer et donc une diminution du traitement des pré-miARN (Chendrimada et al., 2005; Paroo et al., 2009). Dicer est lui-même la cible de let-7 dans sa région codante ce qui produit une boucle de régulation par ce miARN (Forman et al., 2008). Par ailleurs, dans les cellules indifférenciées, la protéine LIN28A est capable de se lier à pre-Let-7 dans le cytoplasme et recruter la nucleotidyltransférase Terminal Uridylyl Transferase 4 (TUT-4) ou TUT-7 qui vont ajouter une courte queue de poly-U au pré-

miARN ce qui en fait un moins bon substrat pour Dicer. Par la suite, le pre-Let-7 poly-uridylé est éliminé par l'exoribonucléase Dis3L2 (Chang et al., 2013; Faehnle et al., 2014; Ustianenko et al., 2013). A l'inverse, dans les cellules différenciées, TUT-4, TUT-7 voire TUT-2 peuvent ajouter un seul résidu uridyle en 3' du pre-Let-7 en faisant ainsi un très bon substrat pour Dicer (Thornton et al., 2015; Heo et al., 2012).

De récentes études utilisant une approche de protéomique visant à identifier les protéines se liant à des pré-miARN synthétiques, ont permis d'identifier environ 180 RNA Binding Protein (RBP) qui interagissent chacune avec une sous-classe spécifique de précurseurs et qui peuvent moduler positivement ou négativement leur clivage (Treiber et al., 2017; Treiber et al., 2018). Enfin, Dicer ou ses co-facteurs peuvent être la cible de modifications post-traductionnelles. Ainsi la sumoylation de TRBP augmente l'interaction avec AGO2 et donc le chargement de RISC (Chen et al., 2015).

4.5. Régulation au niveau du complexe RISC

4.5.1. Régulation au niveau d'Argonaute

Nous l'avons vu plus haut les protéines Argonaute non-chargées par des petits ARN sont instables et rapidement dégradées surtout si elles ne sont pas prises en charge par les protéines chaperonnes HSC70 et HSP90 et leurs co-chaperonnes (Martinez and Gregory, 2013; Smibert et al., 2013). A l'inverse, une surexpression de AGO conduit à une augmentation de l'abondance des miARN, ce qui indique que la quantité d'Argonaute disponible est directement liée à la quantité de miARN matures (Diederichs and Haber, 2007). Par conséquent, la stabilisation des protéines AGO par les protéines chaperonnes décrite plus haut a une influence sur le niveau général des miARN (Johnston et al., 2010).

Chez la souris, LIN41 induit l'ubiquitination de AGO et donc son marquage pour dégradation par le protéasome (Rybak et al., 2009). L'autophagie a également un impact fort sur le niveau général des miARN, car elle module la stabilité des protéines Argonaute. En effet, une diminution de l'autophagie produit une augmentation de protéines Argonaute et Dicer laissés libres et au bout du compte une diminution des miARN (Gibbins et al., 2012).

Différentes modifications post-traductionnelles peuvent également affecter AGO2. AGO2 peut être modifiée avec une fonction prolyl 4-hydroxyl ce qui va avoir un impact sur la localisation cellulaire en dirigeant ces AGO2 vers les P-bodies et augmenter leur stabilité (Qi et al., 2008; Wu et al., 2011). Il existe une autre modification qui va contribuer à engager AGO2 dans les P-bodies, il s'agit de la phosphorylation d'un résidu sérine en position 387 (Horman et al., 2013)(Figure 13). Cette phosphorylation se révèle être fondamentale pour l'activité de RISC puisqu'elle permet le recrutement LIMD1 qui lui-même est fondamental pour recruter TNRC6. LIMD1 interagit à la fois avec AGO activé par phosphorylation et TNRC6 et cette interaction est conservée avec AGO1 et AGO4 (Bridge et al., 2017).

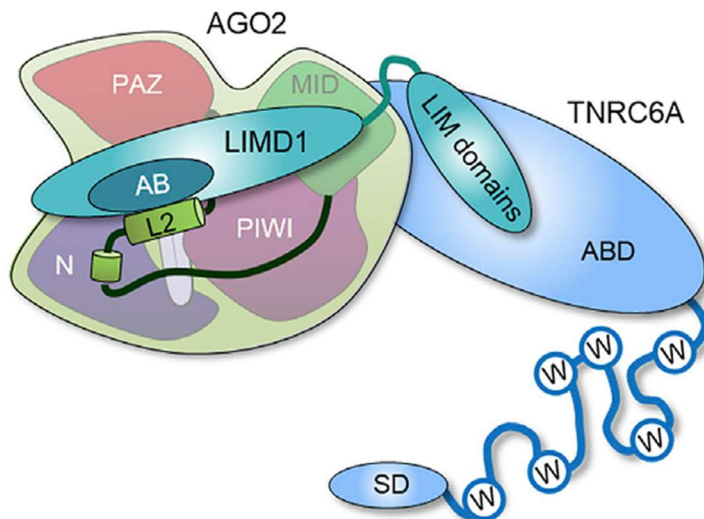


Figure 13 : La phosphorylation AGO2 permet de recruter LIMD1.

La phosphorylation du résidu S387 d'AGO2 permet de recruter la protéine LIMD1 cruciale pour recruter TNRC6 et produire un effet de répression. (Bridge et al., 2017).

En utilisant la spectrométrie de masse, il a été possible de mettre en évidence l'existence d'un cluster de 5 sérine/thréonine du côté C-terminal des AGO2 chez l'humain et *Caenorhabditis elegans*. L'hyper-phosphorylation de ce cluster n'interfère pas pour le chargement des miARN, la localisation d'AGO2 ou sa capacité de clivage mais change considérablement la capacité d'AGO2 de se lier à l'ARN cible (Quévillon Huberdeau et al., 2017). C'est un cycle de phosphorylations suivi de déphosphorylations qui est indispensable au fonctionnement d'AGO2 : CNSK1A1 phosphoryle les résidus S824 et S834 d'AGO2 puis le complexe phosphatase ANKARD52-PPP6C les déphosphoryle (Golden et al., 2017).

4.5.2. Régulation au niveau de l'ARN cible

Le phénomène est semblable à ce qui a été décrit pour la régulation du microprocesseur par l'action directe de protéines sur le pri-miARN sauf que dans ce cas l'action des protéines modifie la structure de l'ARN ciblé par le complexe RISC. Il existe ainsi des protéines qui vont réguler positivement ou négativement l'action de RISC en se fixant sur la cible. Par exemple, les protéines HuR ou Pumillo interagissent également avec les ARN messager qui sont les cibles de nombreux miARN (Galgano et al., 2008; Mukherjee et al., 2011). HuR que l'on avait déjà cité pour son action de régulation au niveau de l'interaction du pri-miARN avec le microprocesseur, est une protéine que l'on trouve souvent au niveau des ARN messager qui contiennent des séquences riches en AU et son action sur le 3' UTR de CAT1 abolit l'action des miARN sur ce transcrite en favorisant la dissociation de RISC de l'ARN messager (Kundu et al., 2012). A l'inverse, la protéine HuR peut également faciliter l'accès de RISC à certains ARN cibles. Ainsi, son association avec l'ARNm de Myc permet sa répression par la famille de miARN Let-7 (Kim et al., 2009).

4.6. Stabilité des miARN matures

Une étude menée dans des Fibroblastes embryonnaire de souris (Mouse Embryonic Fibroblast : MEF) a permis d'estimer la demi-vie moyenne des miARN à 119h, ce qui est 10 fois supérieur à celle des ARN messagers (Gantier et al., 2011). D'autres études ont identifié des miARN comme miR-503 ou miR-29b dont l'abondance varie au cours du cycle cellulaire ce qui est lié au changement de leur temps de demi-vie (Rissland et al., 2011; Hwang et al., 2007). De manière assez logique, la demi-vie des miARN est plus courte dans les cellules dont l'activité demande une adaptation rapide à des changements environnementaux. Ainsi, dans les neurones rétiniens, le cluster miR-183/96/182, ainsi que les miARN miR-204 et miR-211 sont dégradés en 3h pour permettre l'adaptation de la cellule suite au passage de la lumière à l'obscurité (Krol et al., 2010).

Il existe également des séquences qui affectent directement la stabilité des miARN. Par exemple, on peut citer les éléments riches en AU/UA, déjà connus pour être impliqué dans la dégradation des ARN messagers (Chen and Shyu, 1995), et qui sont également liés à une demi-vie courte dans les miARN où ils sont présents (Sethi and Lukiw, 2009). Il en va de même de l'instabilité de miR-503 dans les MEF qui est dépendant de la région de la seed et de l'extrémité 3' (Rissland et al., 2011) ainsi que la stabilité de miR-382 dans les cellules HEK293 qui est contrôlée par une séquence spécifique aux positions 16-22 du miARN (Bail et al., 2010). Une récente étude chez les mouches a montré que les miARN chargés sur AGO2 ont un temps de demi-vie long alors qu'il existe un mécanisme de régulation de la dégradation des miARN chargés sur AGO1 qui peut raccourcir cette demi-vie (Reichholf et al., 2019). Chez les mammifères, bien que la corrélation entre le temps de demi-vie et l'abondance soit faible, les résultats montrent que les différences de stabilité des miARN impactent leur accumulation (Kingston and Bartel, 2019).

4.6.1. Ajout de nucléotides

Un facteur important contribuant à la stabilité des miARN matures est l'ajout de nucléotides en 3' du miARN. Ces modifications ne produisent pas toujours le même effet. miR-122 est stabilisé par l'ajout d'une seule adénosine dans le foie par TUT2 (GLD2) (Kato et al., 2009). En revanche l'addition d'une adénosine en 3' de miR-26a et miR-27 dans des cellules Huh7 toujours par TUT2 n'a pas d'effet sur leur stabilité mais sur l'efficacité de ces miARN (Burroughs et al., 2010). Outre l'adénylation, de nombreux exemples d'uridylation des miARN ont été observées. L'uridylation d'ARN a été récemment identifiée comme une marque permettant d'induire la dégradation d'un ARN (Mullen and Marzluff, 2008). Il y a cependant des exceptions à cette règle puisque l'addition d'une uridine sur le miARN miR-26 par TUT4 (Zcchc11) inhibe l'activité de ce miARN (Jones et al., 2009). De même, l'addition d'une uridine sur miR-126-5p et miR-379 par TUT4 conduit à la baisse de leur activité de régulation de la cible IGF-1 (Jones et al., 2012).

D'autres TUTase ont été décrites pour leur action sur les miARN comme Mitochondrial PolyA Polymerase (MTPAP), PolyA Polymerase Gamma (PAPLOG), TUT1 ou TUT7 (ZCCHC6) (Wyman et al., 2011; Katoh et al., 2009; Burroughs et al., 2010; Thornton et al., 2015).

4.6.2. Dégradation par les exoribonucléases

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, l'uridylation des ARN est une marque pour induire leur dégradation qui peut être faite par plusieurs acteurs dans la cellule. Toutefois, la dégradation des miARN par les exoribonucléases n'est pas toujours associée à cette modification. Ainsi, chez *C. elegans* la protéine XRN2 est impliquée dans la dégradation des miARN matures lorsque ceux-ci ne possèdent pas de cibles dans la cellule (Chatterjee and Grosshans, 2009). Il a aussi été montré que la déplétion de la protéine RNA-Processing Protein 41 (RRP41) conduit à un allongement de la demi-vie du miR-382 d'un facteur 1,5 et d'un allongement de 1,3 après déplétion de XRN1 (Bail et al., 2010). D'autres exonucléases ont été impliquées dans la régulation des miARN, en effet, la Polynucleotide Phosphorylase (PNPase) dégrade les miARN matures tels que miR-221 miR-222 et miR-106b *in vitro* alors que les autres miARN présents restent intacts montrant ainsi la spécificité de séquence de ce phénomène (Das et al., 2010).

Le miARN miR-21 possède normalement une taille de 22 nucléotides de long, mais peut-être allongé à 23 nucléotides grâce à l'action de TUT3 (PAPD5) qui ajoute une adénosine ce qui induit sa dégradation par l'exoribonucléase 3' -> 5' PARN (Boele et al., 2014).

Au laboratoire, l'endoribonucléase Dis3L2 a été identifiée comme étant responsable de la dégradation de miARN chargés après addition de plusieurs nucléotides sur le miARN dans un cas particulier de complémentarité étendue entre le miARN et sa cible (Haas et al., 2016) (voir plus loin).

4.7. Régulation de l'action des miARN par d'autres ARN

4.7.1. Phénomène d'éponge de petits ARN

Les miARN ont pour cibles naturelles des ARN messagers mais ils peuvent parfois se fixer sur des ARN non-codants qui jouent alors le rôle d'éponges naturelles, séquestrant spécifiquement des miARN et réduisant ainsi leur disponibilité pour leurs cibles réelles (Ebert and Sharp, 2010). On a ainsi mis en évidence des ARN circulaires contenant de multiples sites de fixation pour miR-7 et un autre qui pourrait être une éponge pour miR-138 (Hansen et al., 2013; Memczak et al., 2013).

4.7.2. Target Directed miRNA Degradation (TDMD)

La découverte que les ARN cibles peuvent eux-mêmes induire la dégradation spécifique de miARN chez les animaux grâce au processus du TDMD a été décrite dans les cellules de

Drosophiles et de mammifères (Ameres et al., 2010). Ce phénomène n'implique pas la baisse de la transcription du pri-miARN ni une régulation du processus de biogénèse des précurseurs mais uniquement la dégradation du miARN mature après son chargement sur AGO (Cazalla et al., 2010; de la Mata et al., 2015; Marcinowski et al., 2012). Le TDMD n'apparaît qu'après la reconnaissance de la cible par le miARN, qui dans ce cas ne conduit pas à la répression et la dégradation de l'ARN cible mais à celle du miARN (Ameres et al., 2010). La déstabilisation du miARN s'accompagne de l'apparition d'une queue formée de nombreux nucléotide (A ou U) et également de formes raccourcies du miARN (Ameres et al., 2010; Haas et al., 2016). Les caractéristiques de l'interaction miARN/cible qui va conduire au TDMD plutôt qu'à la régulation de la cible indiquent que l'interaction du 3' du miARN avec l'ARN cible est importante. En effet, la reconnaissance par la 'seed' renforcée de quelques interactions supplémentaires conduit à la répression de l'ARN messenger mais une complémentarité étendue, notamment du côté 3' du petit ARN régulateur entre les deux brins d'ARN conduit au TDMD et donc à la dégradation du miARN (Figure 14) (Bartel, 2018).

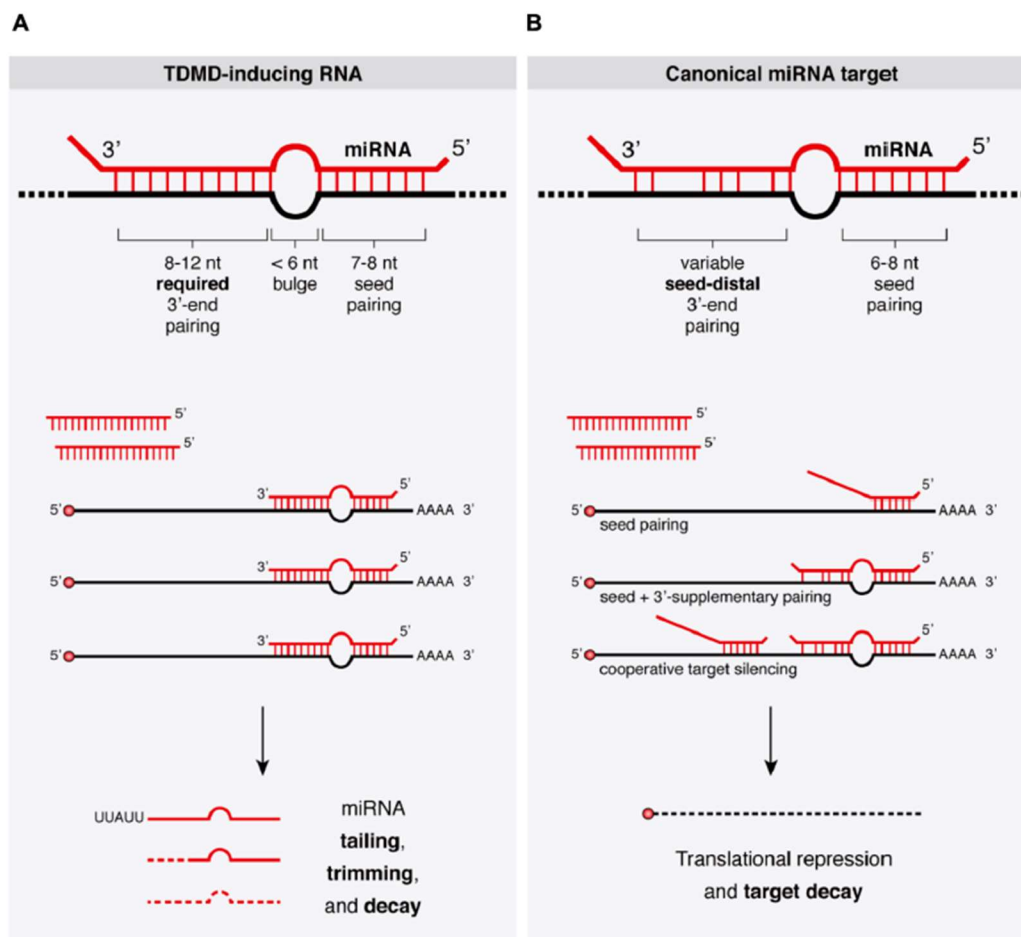


Figure 14 : Reconnaissance canonique d'une cible et reconnaissance induisant le TDMD.

A La reconnaissance avec complémentarité étendue entre le miARN et la cible conduit à la polymérisation du miARN (tailing) puis dépolymérisation (trimming) et enfin sa dégradation complète. Cette disparition s'accompagne ou pas de la dégradation partielle de la cible. **B** Lorsque les propriétés canoniques de la stabilité du duplex miR/cible sont respectées, la répression de la cible puis sa dégradation sont déclenchées. Tirée de (Fuchs Wightman et al., 2018).

Il est maintenant admis que le miARN impliqué dans le TDMD subit une addition de nucléotides de manière matrice-indépendante, ce qui peut être fait par l'une des sept TUT existantes. Toutefois, à ce jour, l'identité précise de l'enzyme impliquée n'a pu être caractérisée, mis à part une suspicion pour TUT1 identifiée par spectrométrie de masse (Haas et al., 2016). En revanche, Dis3L2 a bien été identifiée comme étant une des exoribonucléases responsable de la dégradation des miARN suite au TDMD (Haas et al., 2016).

Après avoir été étudié avec des ARN artificiels et des oligonucléotides antisens, plusieurs cas de TDMD naturels ont été mis à jour (Tableau 1), bien que ce mécanisme conservé ne semble pas être couramment utilisé chez les animaux. Parmi les quelques mécanismes décrits, la plupart concernent des virus, notamment des herpèsvirus, et de manière intéressante miR-27 apparaît plusieurs fois également. Le premier TDMD naturel a été mis à jour dans les cellules infectées par l'*Herpesvirus saimiri* qui exprime un ARN non-codant HSUR1 (Herpesvirus saimiri U-rich RNA 1) qui montre une complémentarité pour des miARN dont miR-27 avec une complémentarité étendue qui déclenche le TDMD et la destruction de miR-27 (Cazalla et al., 2010). La deuxième observation de ce phénomène implique encore miR-27 et un autre herpèsvirus, le cytomégalovirus murin (MCMV), qui exprime un ARN codant appelé m169 qui possède également un site à complémentarité étendue pour miR-27 (Buck et al., 2010; Libri et al., 2012). Il a été montré dans ce cas que miR-27 est alors la cible d'extension de nucléotides induisant la dégradation et que ce phénomène n'est dépendant que de la présence de la cible m169 (Marcinowski et al., 2012). La régulation de miR-27 n'est pas conservé chez le cytomégalovirus humain (HCMV), toutefois celui-ci exprime également un transcrit, UL144-145, possédant une séquence capable de déstabiliser les miARN miR-17 et miR-20a (Lee et al., 2013).

Récemment, un TDMD endogène a été découvert chez le poisson zèbre qui exprime un long ARN non-codant (lncRNA) qui conduit à la dégradation de miR-29b provoquant des troubles du comportement chez le poisson. Ce lncRNA correspond à un ARN codant pour NREP chez les mammifères où miR-29 est également présent et contrôle également le comportement (Bitetti et al., 2018). Au même moment, il a été établi que dans les cerveaux des souris le lncRNA Cyrano possède une complémentarité étendue pour miR-7 et induit sa destruction par TDMD. Ce système permet l'accumulation d'une cible de miR-7, Cdr1as, qui est un ARN circulaire qui régule l'activité neuronale (Kleaveland et al., 2018). Enfin, chez la souris l'ARNm qui code pour la Serpine 1 induit la dégradation de miR-30b-5p et miR-30c-5p par TDMD ce qui permet de contrôler le cycle cellulaire (Ghini et al., 2018).

miRNA and TDMD target	Predicted base-pairing schematic
miR-27a-HSUR1	<p>5' -UUCACAGUGGCUAAGUCCG-3'</p> <pre> ...AAUAGUGUCUAA-AUUCAAGGUCAUU... </pre>
miR-27a-CMV m169	<p>5' -UUCACAGUGGCUAAGUCCG-3'</p> <pre> : : ...AAAAGUGUCGAAUA-UAAGGCUCUA... </pre>
miR-17-HCMV ncRNA	<p>5' -CAAAGUGCUAC-----AGUGCAGGUACG-3'</p> <pre> ...AUUCACGAAGAAAAAUCAGUCCU... </pre>
miR20a-HCMV ncRNA	<p>5' -CAAAGUGCUA-----UAGUGCAGGUACG-3'</p> <pre> ...AUUCACGAAGAAAAAUCAGUCCU... </pre>
miR-29b-NREP 3' UTR	<p>5' -UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGU-3'</p> <pre> : : ...UUAUCGUGGUAAGU---AGUCACAGAU... </pre>
miR-7-Cyano ncRNA	<p>5' -UGGAAGAC-UA-GUGAUUUUGUUGUU-3'</p> <pre> ...ACCUUCUGUAACCACUAAAACAACAA... </pre>
miR30b-Serpine1	<p>5' -UGUAAACA----UCCUACACUCAGCU-3'</p> <pre> ...ACAUUUGUUCAGUGGAUGUGAGACUUUAU... </pre>
miR30b-Serpine1	<p>5' -UGUAAACA----UCCUACACUCAGC-3'</p> <pre> : : ...ACAUUUGUUCAGUGGAUGUGAGACUUUAU... </pre>

Tableau 1 : TDMD naturels.

Le tableau représente l'interaction ARN / cible dans les différentes occurrences de TDMD mis à jour dans la nature. (Sheu-Gruttadauria et al., 2019).

Récemment, l'équipe de Ian J. MacRae a modélisé par cristallographie hAGO2 chargé par des duos miARN/ARN cible comme miR-27/HSUR1 ou des duplex artificiels impliquant miR-122. Ils ont pu montrer qu'à chaque fois l'extrémité 3' du miARN chargé sur hAGO2 est sorti de son placement normal au sein du domaine PAZ d'hAGO2, le rendant ainsi libre pour une éventuelle polyuridylation et/ou dégradation par une exoribonucléase (Figure 15) (Sheu-Gruttadauria et al., 2019).

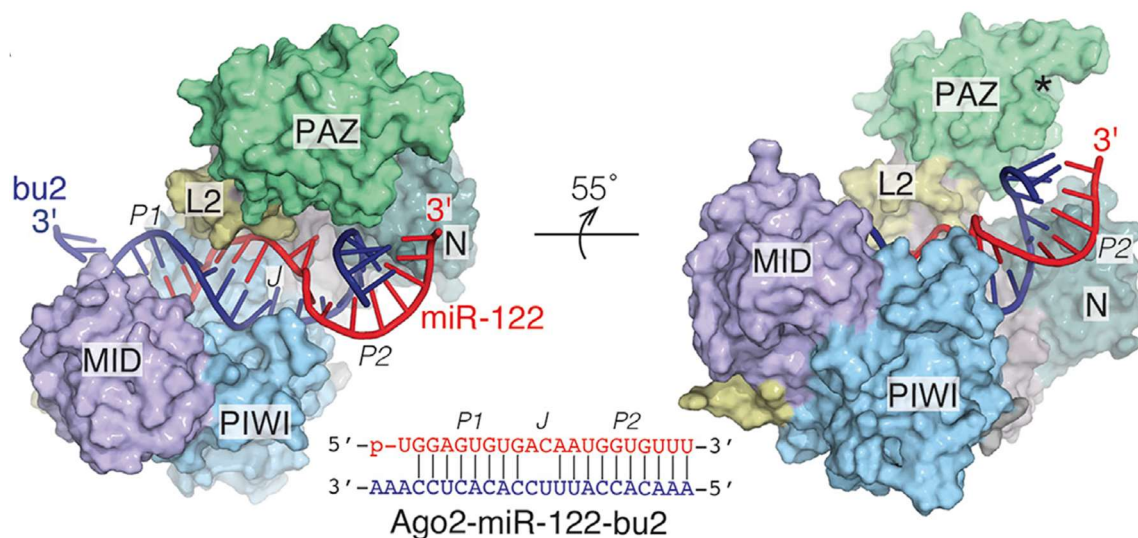


Figure 15 : Structure d'AGO2 chargé avec un miARN prêt pour le TDMD.

hAGO2 est représentée chargée par miR-122 et une cible artificielle présentant une complémentarité étendue avec le miARN. L'extrémité 3' de miR-122 (en rouge) est libre et non-protégée au sein du domaine PAZ. (Sheu-Gruttadauria et al., 2019).

5. Les cytomégalovirus

Les virus détournent les voies de synthèses et les mécanismes en place dans les cellules hôtes et la voie des miARN ne fait pas exception. C'est notamment le cas de nombreux herpèsvirus comme le cytomegalovirus.

5.1. Cytomégalovirus humain (HCMV)

5.1.1. Structure et cycle du HCMV

Le CMV humain (HCMV, *Human Herpesvirus 5*) est membre de la sous-famille des β -*Herpesvirus* qui ont un génome ADN double brin d'environ 230 kbp (Davison, 2007). Il se présente sous la forme d'une capsidie icosaédrique enveloppée de 200 nm de diamètre. Le cycle viral comprend : l'adsorption au niveau de la membrane cellulaire, l'entrée du virus, le largage de la nucléocapsidie, la réplication et la formation de nouveaux virions. L'enveloppe du virus comprend des protéines virales qui sont importantes pour engendrer un nouveau cycle et sont très spécifiques vis à vis de l'espèce hôte (Roizman and Pellet, 2001). Au moment de l'infection, les premiers gènes transcrits sont les gènes IE (immediate early) qui ne nécessitent que des gènes cellulaires pour leur expression. Suivent les gènes E (early) qui sont dépendant de l'expression fonctionnelle des gènes IE. Enfin les gènes tardifs sont exprimés après la réplication de l'ADN (Knipe and Howley, 2013).

Les modes de transmission principaux du HCMV sont le contact direct avec les sécrétions d'une personne infectée et la transmission transplacentaire. Les virions sont ainsi trouvés dans la salive, l'urine, le lait maternel ce qui cause un risque supplémentaire de transmission au bébé et enfin le sperme et les glaires cervicales ce qui permet la transmission sexuelle du virus (Knipe and Howley, 2013).

5.1.2. Tableau clinique

Comme beaucoup d'herpèsvirus la séroprévalence est élevée (de 40 à 100 %) et le plus souvent ignorée par le patient car la primo-infection est généralement sans effet clinique chez les adultes sains. Cependant, le système immunitaire n'est pas capable d'éliminer totalement le virus qui se met dans un état dormant non-productif appelé latence. Pendant la latence le virus est maintenu indéfiniment au sein de l'hôte jusqu'à sa prochaine réactivation (Roizman and Pellet, 2001). Toute altération de l'immunité de l'hôte peut conduire à la réactivation du virus, à la fabrication de nouveaux virions et à la manifestation de symptômes. Les personnes les plus à risques sont donc les patients qui bénéficient d'un traitement immuno-suppresseur dans le cadre de la prévention d'un rejet de greffe solide, les bénéficiaires d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques, les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine et les nouveau-nés infectés dans les premiers mois de la vie.

Dans les pays développés, l'infection congénitale par le HCMV est la cause principale de dommages neurologiques permanents induisant des surdités et des retards mentaux (Rawlinson et al., 2017). De manière générale il existe un très grand nombre de symptômes différents qui peuvent être attribués au HCMV : hépatite, entérocolite, rétinite, pneumonite et séquelles neurologiques et ceci est expliqué par le fait que le HCMV est capable de pénétrer et d'infecter un large spectre de cellules (Rawlinson et al., 2017; Nguyen and Kamil, 2018). Il apparaît de plus en plus clairement une conséquence longtemps sous-estimée de l'infection du HCMV : le virus a été associé à un certain nombre de tumeurs ainsi que leurs métastases (Cobbs, 2019) comme le glioblastome (Cobbs et al., 2002), le cancer colorectal (Harkins et al., 2002) ou encore le cancer du sein (Harkins et al., 2010).

5.1.3. Tropisme cellulaire du HCMV

Le HCMV est un virus capable d'infecter un large spectre de cellules, tissus et organes. Ceci est dû au fait que le virus est capable d'interagir avec un grand nombre de récepteurs par le biais des glycoprotéines de l'enveloppe. Les gènes viraux codants les constituants de chaque complexe de glycoprotéines sont maintenant identifiés (Nguyen and Kamil, 2018). Le premier complexe est constitué d'un homotrimère de glycoprotéines B (gB) dont on ne connaît pas les récepteurs mais il a été suggéré que gB est capable d'induire une fusion de l'enveloppe virale sans reconnaître de protéines membranaires (Wille et al., 2013). Le deuxième complexe viral impliqué est constitué de deux glycoprotéines virales gM et gN reliées entre elles par un pont disulfure (Kropff et al., 2012). Ce complexe gM/gN est le plus abondant sur les virions. Un troisième complexe appelé le trimère et constitué des glycoprotéines gH, gL et gO est présent à la surface des virions, sa présence semble très importante pour la capacité d'infection des virions (Zhou et al., 2015). Enfin, un dernier complexe appelé le pentamère constitué des glycoprotéines virales gH et gL et de trois petites glycoprotéines a été mis à jour récemment. De manière intéressante, sa présence au sein du virion semble dépendre de l'absence de décalage du cadre de lecture lors de la synthèse d'une des petites glycoprotéines (Ciferri et al., 2015). La présence du pentamère est requis pour l'infection des leucocytes, des cellules dendritiques, des cellules épithéliales et endothéliales (Adler, 2006).

Un grand nombre de récepteurs membranaires a été identifié comme étant la porte d'entrée du HCMV dans les cellules : Heparan Sulfate Proteoglycan (HSPG), Platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR α), Neuropilin-2 (Nrp2), Epidermal growth factor (EGFR), de nombreuses intégrines, complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I), CD13, CD90, CD147 et CD151 (pour revue voir Nguyen and Kamil, 2018). Cette grande diversité de récepteurs reflète bien le nombre de cellules différentes qui peuvent être infectées par ce virus. La nature des cellules infectées, en particulier les globules blancs ou les cellules endothéliales, procurent une voie royale de dissémination dans le corps par le biais de la circulation sanguine, ce qui permet au virus d'atteindre des organes comme le foie, les poumons ou la rate (Knipe and Howley, 2013).

L'infection du HCMV commence souvent par l'infection des voies aériennes supérieures qui vont libérer leur progéniture virale et induire la réponse immunitaire innée. L'invasion des cellules immunitaire est une étape clé car elle permet de disséminer le virus dans l'organisme entier : soit directement en se disséminant dans des organes permettant d'envahir les sécrétions comme les glandes salivaires, les reins ou les glandes mammaires, soit en se disséminant dans des organes filtrants comme le foie ou la rate pour se répliquer et augmenter le titre viral pour finalement finir par envahir les organes permettant la sécrétion des virions (Figure 16) (Jackson and Sparer, 2018).

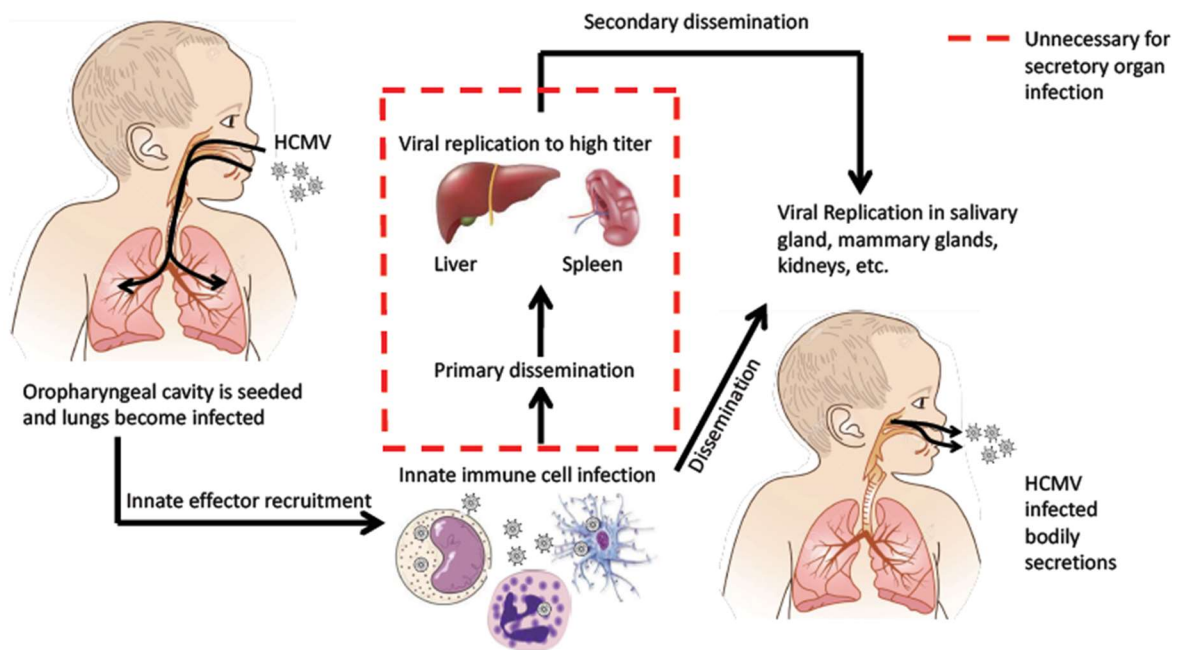


Figure 16 : Dissémination de HCMV de l'infection à la sécrétion.

L'invasion des cellules immunitaires est une étape clé car elle permet de disséminer le virus dans l'organisme entier. Voir le corps du texte. Figure tirée de (Jackson and Sparer, 2018).

5.1.4. HCMV et Interleukine 10

L'interleukine 10 (IL-10) est une cytokine sécrétée qui inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, IL-3, TNF α ...) par les cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T Helper 1 (TH1) (Fiorentino, 1989) mais aussi les cellules dendritiques, les Natural Killer (NK), les neutrophiles et les macrophages (Saraiva and O'Garra, 2010). Le contrôle de la réponse inflammatoire par les cellules immunitaires circulantes, notamment pendant la phase de propagation du virus, semble important pour un grand nombre d'herpesvirus dont le HCMV puisqu'ils produisent leur propre IL-10 (Kotenko et al., 2000). Il a été montré que ces pseudos IL-10 sont capables d'être efficace sur le système immunitaire et permettent au virus d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Hsu et al., 1990).

5.2. Cytomégalo­virus murin (MCMV)

5.2.1. MCMV modèle de HCMV

MCMV sert de modèle pour HCMV depuis longtemps car la nature de leurs symptômes sont les mêmes et il semble que l'interaction avec le système immunitaire soit également comparable. Les tropismes cellulaires de MCMV et HCMV sont proches et centrés sur les cellules du système immunitaire pendant la phase de colonisation. Le MCMV ne possède pas de gènes capables de produire son propre IL-10 mais le contrôle de cette cytokine semble important pour les deux virus puisque MCMV utilise un autre moyen d'agir sur le niveau d'expression d'IL-10 (Xie et al., 2014). Pour l'instant on ignore cependant quel est le réservoir de ces virus pendant la phase de latence et il n'est pour l'instant pas exclu que ce réservoir ne soit pas le même : les cellules souches hématopoïétiques (HSC) pour le HCMV et les cellules endothéliales pour le MCMV (Reddehase and Lemmermann, 2019).

5.2.2. Structure et génétique de MCMV

MCMV ou MuHV-1 (Murid herpesvirus 1) appartient également à la sous-famille des β -*Herpesvirus*. Son génome ADN double brin de 230 kbp code pour 161 protéines virales et 21 miARN (Figure 17) (Buck et al., 2007; Dolken et al., 2007). Les miARN viraux sont synthétisés à partir des deux brins et certains sont regroupés en cluster (cluster M01-1/2/3/4, cluster M21/M22/M23 et cluster M107-1/M108-1/2) (Tuddenham and Pfeffer, 2011).

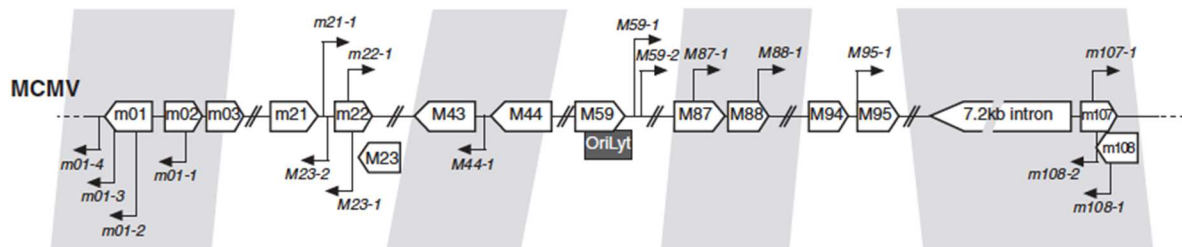


Figure 17 : Organisation génomique des miARN chez MCMV.

Les miARN viraux sont indiqués par une flèche noire. Le sens de la flèche montre le brin à partir duquel ils sont synthétisés (Adapté de Tuddenham and Pfeffer, 2011).

Les miARN viraux peuvent être synthétisés parmi les gènes précoces immédiats, précoces ou tardifs mais la plus grande partie de ces miARN sont précocement exprimés et s'accumulent dans les cellules infectées (Figure 18) (Dolken et al., 2007). Une analyse faite au laboratoire et non-publiée montre que ces miARN sont efficacement chargés sur AGO2.

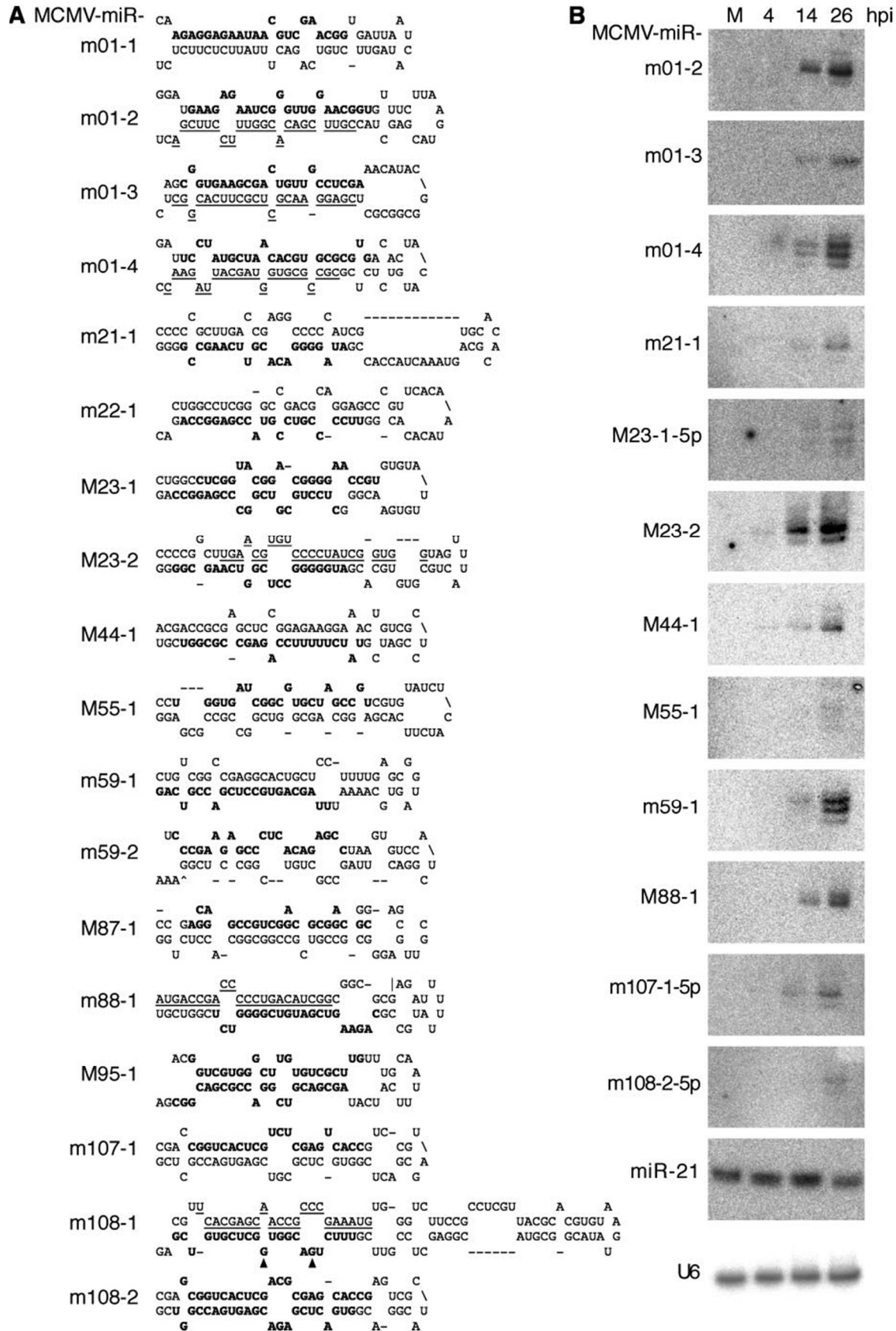


Figure 18 : miARN codés par le MCMV.

A Structure en tige-boucle prédite de plusieurs pré-miARN viraux. **B** Analyse par northern blot de l'accumulation des miARN viraux dans des cellules 3T3 mock ou infectées par MCMV (MOI = 10) à 4, 14 et 26 heures post-infection (hpi) (Dolken et al., 2007).

5.2.3. TDMD de miR-27

J'ai déjà parlé plus haut du TDMD induit sur miR-27 (a et b) lors de l'infection par le MCMV par un ARN codant appelé m169 qui possède un site à complémentarité étendue pour ce miARN (Buck et al., 2010; Libri et al., 2012). Il a été montré que miR-27 est alors la cible d'une polymérisation de nucléotide induisant sa dégradation (Marcinowski et al., 2012). Or il a été également montré que miR-27a régule la réponse inflammatoire en régulant l'expression d'IL-10 dans les macrophages (Xie et al., 2014). Si le HCMV code pour un orthologue viral d'IL-10, ce n'est pas le cas de MCMV qui bénéficie alors de la dégradation de miR-27a pour promouvoir la stabilité de l'ARN messager de l'IL-10 et ainsi profiter de son action immunosuppressive (Guo and Steitz, 2014). Le phénomène de TDMD de miR-27 par sa cible virale m169 s'est révélé avoir une influence déterminante pour l'accumulation du virus *in vivo* (Marcinowski et al., 2012).

6. Chromatographie d'affinités couplée à la spectrométrie de masse

Dans le but de chercher des nouveaux facteurs cellulaires impliqués dans l'infection par le MCMV nous avons utilisés plusieurs techniques de chromatographie d'affinités couplée à de la spectrométrie de masse. Je vais décrire quelques techniques en présentant leurs avantages et désavantages qui ont guidé notre choix.

6.1. Immuno-précipitation de la protéine endogène

L'immuno-précipitation couplée à de la spectrométrie de masse (IP-MS) est la plus directe des mises en évidence d'interaction protéine-protéine *in vivo* : elle ne nécessite pas de surexpression ni de modification de l'expression des protéines. En revanche, il est nécessaire d'avoir un anticorps très spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt. C'est un des désavantages de cette technique puisqu'il faut mettre au point un anticorps et affiner la technique de pêche pour toutes les protéines dont on veut l'interactome. Il y a de grands risques d'avoir des faux positifs qui doivent être limités en faisant des lavages plus ou moins stringents dont la mise au point doit être finement évaluée. Une autre limitation de cette technique est qu'elle ne permet pas de mettre en évidence une interaction transitoire mais uniquement des interactions stables dans le temps.

6.2. Purification d'affinité de protéines étiquetées

La purification d'affinité de protéines étiquetées couplée à de la spectrométrie de masse (AP-MS) est toujours une technique très utilisée (Varjosalo et al., 2013) qui implique d'exprimer une version étiquetée de la protéine d'intérêt qui sert d'appât pour pêcher les protéines qui interagissent avec elle. La protéine d'intérêt doit être exprimée en fusion avec une étiquette

(les plus classiques : HA, GFP, Flag, Myc ou twin-strep) de manière exogène par transfection ou en établissant une lignée stable. L'avantage ici est l'efficacité et la reproductibilité de la pêche si on la compare à la technique d'IP-MS. Cette méthode peut conduire à des faux positifs, pour en diminuer le nombre, on peut opter pour la purification d'affinité en tandem (tandem affinity purification : TAP) où l'étiquette est en fait constituée de deux étiquettes séparées par un site de clivage (Puig et al., 2001). Les autres limitations sont sensiblement les mêmes que pour l'IP-MS.

6.3. Proximity labelling par la biotine ligase (BioID)

Cette approche s'appuie sur la capacité d'une protéine d'origine procaryotique à liquer la biotine sur un substrat : la biotine ligase BirA d'*Escherichia coli*. On utilise en réalité une version modifiée de cette protéine BirA* mutée en son site actif R118G (Roux et al., 2012a) qui conserve sa capacité à lier et à activer la biotine mais a perdu la capacité à retenir la biotine activée. Le rayon d'action de cette enzyme reste cependant limité à un rayon d'environ 10 nm. BirA dans sa version sauvage n'est capable de biotinyler qu'un ensemble restreint de protéines au niveau d'une lysine appartenant à une séquence minimale particulière de 14 acides aminés (Beckett et al., 1999). BirA* est capable de biotinyler les protéines en complexe avec la protéine d'intérêt mais également de marquer les protéines interagissant de manière transitoire en marquant leurs lysines de manière aspécifique. Les protéines ainsi marquées peuvent être pêchées aisément grâce à la forte interaction qui existe entre la biotine et la streptavidine. Il n'est donc pas nécessaire de contrôler finement la lyse et les lavages avec cette méthode, on peut utiliser des lavages très stringents sans avoir peur de casser les interactions.

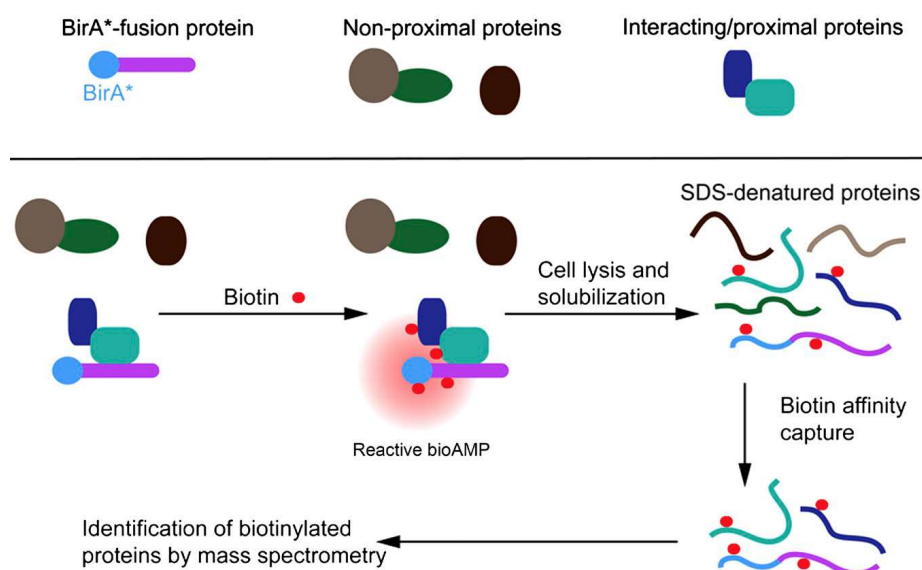


Figure 19 : Principe d'utilisation de la Biotine ligase (BirA*) en BioID.

La biotine ligase est exprimée en fusion de la protéine d'intérêt dans des cellules cultivées avec addition de biotine dans le milieu. BirA* est capable de marquer avec la biotine les protéines en proximité directe avec la protéine d'intérêt. Les protéines biotinylées sont ensuite capturées grâce à la forte interaction existante avec la streptavidine. (Roux et al., 2012b)

6.4. APEX

L'ascorbate peroxidase (APEX) est une protéine issue du soja (*Glycine max*) qui peut être active dans n'importe quel compartiment cellulaire. Elle permet une autre technique de marquage de protéines de proximité. Cette enzyme catalyse la formation H_2O_2 dépendante de radicaux libre phenoxy à partir de nombreux résidus phénoliques. D'une durée de vie de moins de 1 ms les radicaux libres phenoxy réagissent avec les acides aminés possédant des électrons disponibles (de préférence Tyr, Trp, His et Cys) les plus proches dans un rayon de moins de 20 nm. Cette méthode est utilisée pour cibler un compartiment en particulier dans lequel on adresse l'APEX de manière spécifique. Le marquage intervient après un pulse de phenol-biotine et d' H_2O_2 d'une minute. Il a ainsi été possible de marquer spécifiquement des protéines de la matrice mitochondriale en exprimant l'APEX taguée pour un adressage mitochondrial (Rhee et al., 2013).

6.5. Autres améliorations du BioID

Un des reproches qui a été fait au BioID est le temps de biotinylation nécessaire (16 à 24 h) pour obtenir une quantité de matériel biotinylé suffisant pour une analyse en protéomique. L'équipe d'Alice Y Ting s'était donné pour mission de faire évoluer la Biotine ligase (R118S) en introduisant des mutations par PCR successives et en sélectionnant la biotine ligase mutée la plus efficace : la TurboID (35 kDa). La partie N-ter de la protéine obtenue ne comportant aucune mutation sélectionnée, elle a été éliminée pour laisser place à la miniTurbo de 28 kDa annoncée comme au moins 20 fois plus rapide que la BirA* (Branon et al., 2018).

L'autre reproche qui peut être formulé au BioID est la possibilité pour la biotine ligase mutée de biotinyler n'importe quelle protéine de passage qui n'interagit pas avec la protéine d'intérêt même transitoirement. Il est évident que c'est un risque que l'on est prêt à prendre lorsqu'on utilise cette méthode en misant cibler un plus grand nombre de protéines qui interagissent réellement. Pour parer ce problème l'équipe de Julien Béthune propose d'utiliser une biotine ligase dissociée en deux domaines : NBirA* et CBirA* non fonctionnels. Chacun des deux domaines est lié à une protéine d'intérêt qui rétablissent la fonction de BirA* en interagissant entre elles (Schopp et al., 2017).

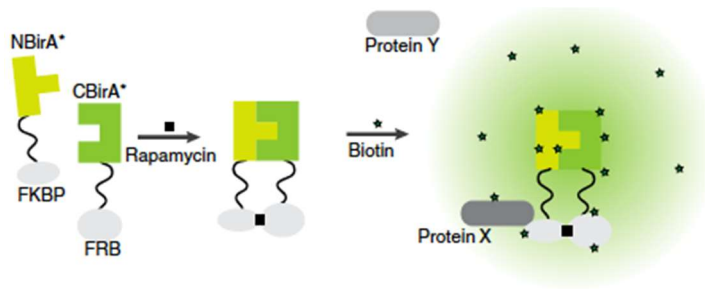


Figure 20 : Principe du double BioID.

Afin de limiter la biotinylation non-spécifique, BirA* est séparée en deux domaines indépendamment non fonctionnels qui sont liés dans cet exemple à des domaines FKBP et FRB qui sont capable de se lier à la Rapamycine. La fonction de BirA* est alors complétée. (Schopp et al., 2017).

6.6. BioID2

Tout comme le BioID et APEX, le bioID2 est une technique qui permet de mettre à jour des interactions protéine-protéine à grande échelle en s'affranchissant des problèmes de stringence des lavages. En effet la plupart des techniques qui permettent l'étude d'interaction protéine-protéine réclament de contrôler finement la stringence des lavages afin d'éliminer un maximum d'aspécificité sans pour autant détruire les interactions spécifiques. Le principe du BioID2 est le même mais la protéine ligase qui est utilisée est celle d'*Aquifex aeolicus* mutée en position R40G. (Kim et al., 2016a). Cette biotine ligase présente l'avantage d'être plus petite, l'encombrement stérique du peptide est donc sensiblement réduit, le poids moléculaire passant de 35,1 kDa à 26,4 kDa (Figure 21). Un deuxième avantage du BioID2 est que la protéine semble biotinyler un peu plus de protéine par unité de temps.

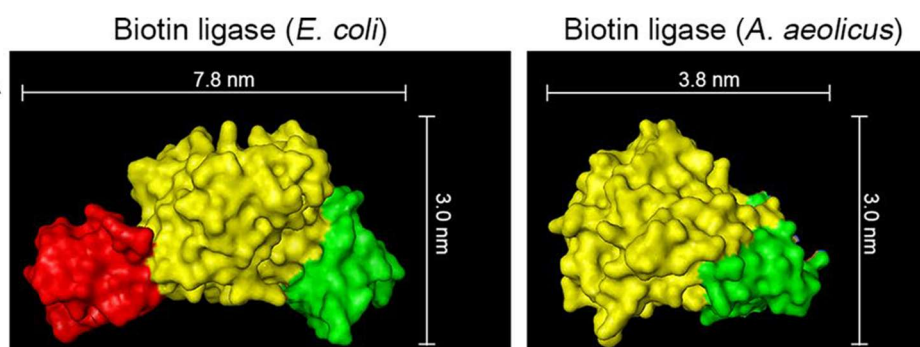


Figure 21 : Structure 3D de BirA de *E.coli* et *A. aeolicus*.

L'utilisation de birA de *A. aeolicus* pour le BioID2 permet d'utiliser une biotine ligase moins lourde de 9 kDa et presque deux fois moins longue que celle du BioID (Kim et al., 2016a).

Objectifs de Thèse

Le MCMV est un herpèsvirus qui produit son propre jeu de miARN essentiels pour l'établissement de l'infection. En outre il induit le TDMD du miARN cellulaire miR-27 et là encore le phénomène semble nécessaire à l'infection.

Les miARN viraux sont efficacement chargés sur Argonaute. Un tel renouvellement des miARN chargés sur Argonaute pourrait nous permettre de mettre en évidence des facteurs impliqués dans le chargement ou le recyclage des protéines Argonaute. Nous voulons savoir comment la cellule gère cet afflux massif de miARN viraux.

Il a également été établi que dans certaines conditions, la fixation du complexe RISC sur l'ARN cible pouvait entraîner non pas une régulation de la cible mais au contraire celle du miARN. Pour ce faire, il faut qu'il y ait un appariement parfait ou quasi-parfait entre le miARN et l'ARN cible, ainsi qu'une quantité importante de l'ARN cible. A ce jour, peu de facteurs cellulaires impliqués dans ce phénomène ont été identifiés puisque seule l'implication de Dis3L2 a été clairement établie. Nous voudrions savoir s'il est possible de trouver de nouveaux facteurs qui jouent un rôle auprès d'Argonaute dans ce phénomène.

AGO2 est un facteur incontournable dans les deux mécanismes évoqués. Mon travail de thèse s'articule en deux aspects principaux : pour étudier le chargement des miARN mais aussi pour décrypter le TDMD de miR-27 des banques des petits ARN chargés au sein des protéines Argonaute doivent être produites et pour trouver des nouveaux facteurs importants pour le MCMV l'interactome d'AGO2 dans le cadre de l'infection par le MCMV doit être mis à jour.

II. RÉSULTATS

1. Importance d'AGO2 lors de l'infection par MCMV

Avant d'entreprendre l'étude détaillée du rôle de la protéine AGO2 au cours de l'infection par MCMV, nous avons dans un premier temps confirmé l'importance de cette protéine dans l'accumulation du virus. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules inactivées pour AGO2. L'objectif dans cette partie est donc ici d'étudier l'influence de AGO2 sur l'infection par le MCMV. D'une part le MCMV est un virus qui produit ses propres miARN qui sont déterminants pour la mise en place de l'infection et on peut supposer que l'absence d'AGO2 peut impacter l'efficacité de chargement des miARN viraux sur les autres Argonautes. D'autre part, le virus induit également la dégradation du miARN cellulaire miR-27 et à ce jour on ne sait pas si l'identité de la protéine Argonaute chargée par ce miARN a une importance dans ce phénomène. La construction de banques de petits ARN à partir d'ARN total ou après immunoprécipitation des protéines Argonaute nous permettra d'étudier en détail ces deux aspects dans des cellules sauvages ou mutées pour AGO2.

Pour toute la suite de cette partie décrivant les résultats obtenus, le terme miR-27 sera utilisé pour décrire de manière indifférenciée miR-27a et miR-27b. Lorsqu'il sera fait référence spécifiquement à l'un ou l'autre isoforme de ce miARN, cela sera précisé.

1.1. Effet de l'absence d'AGO2 sur l'infection par MCMV

Dans le but de tester l'impact de AGO2, nous disposons au laboratoire de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) isolées à partir de souris sauvage (wt) ou mutées dans le gène *Ago2* (*AGO2*^{-/-}). Afin de comparer l'évolution du titre viral en présence ou absence de AGO2, nous avons infecté des cellules MEF wt ou *AGO2*^{-/-} par MCMV à une multiplicité d'infection de 1 particule virale par cellule (Multiplicity of infection (MOI) = 1). Le milieu de culture a été ensuite prélevé après 24, 48 ou 72 hpi et analysé par la production virale qui a été quantifiée par plage de lyse sur des cellules MEF wt. On peut voir qu'en l'absence d'AGO2, le MCMV s'accumule en quantité plus faible, ce qui suggère qu'AGO2 joue un rôle positif pour MCMV dans ces conditions expérimentales (Figure 22).

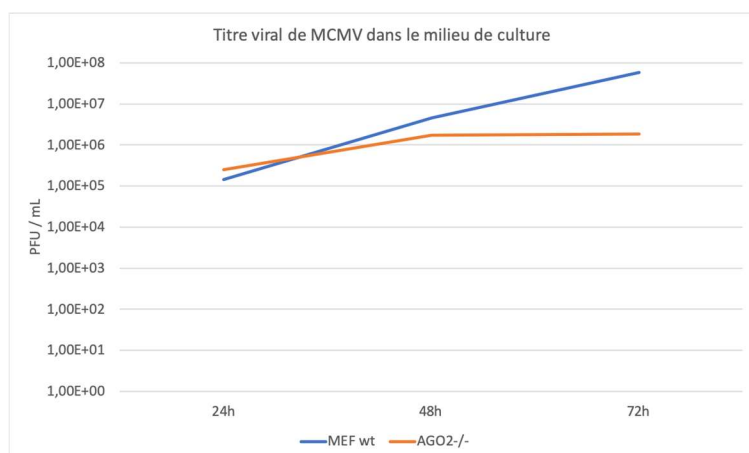


Figure 22 : Titre viral de MCMV dans le milieu de culture après infection.

Des cellules MEF wt et MEF AGO2^{-/-} ont été infectées à MOI = 1 pendant 24, 48 ou 72 hpi. PFU, particle forming unit.

1.2. Effet de l'absence d'AGO2 sur le TDMD de miR-27 induit par MCMV

1.2.1. Infection par le MCMV sur cellules adhérentes

Nous voulons mettre en évidence le profil d'accumulation de miR-27 en présence et absence d'AGO2 après 0 et 48 h d'infection par MCMV. Pour ce faire, j'ai infecté à une MOI de 1 des cellules MEF wt ou AGO2^{-/-} avec du MCMV sauvage ou un mutant appelé MCMVmut168 qui est muté au niveau du site viral ciblé par miR-27.

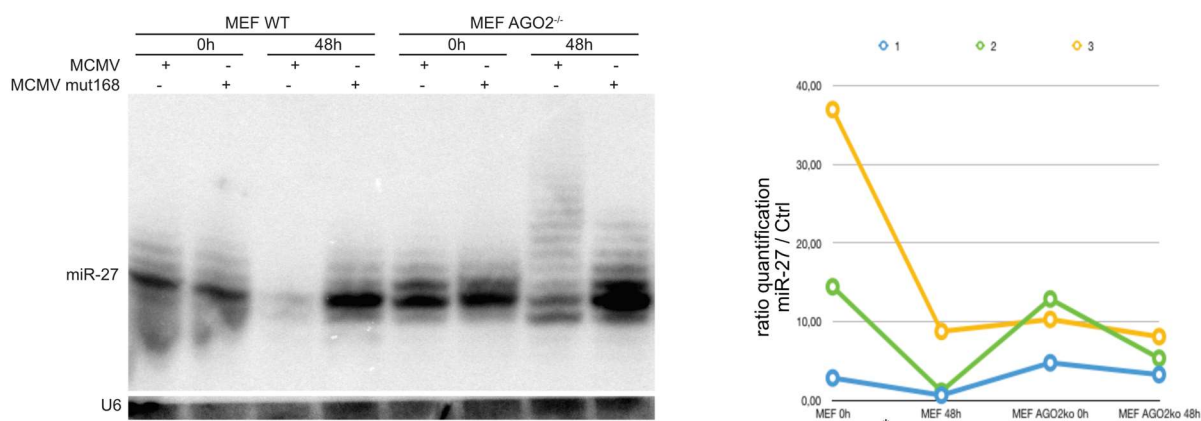


Figure 23 : Analyse par northern blot de miR-27 dans des MEF wt ou AGO2^{-/-} et quantification du signal.

MEF wt ou AGO2^{-/-} infectées par le MCMV sauvage ou muté dans le gène m168. U6 a été utilisé comme contrôle de charge sur le northern blot (panneau de gauche). Le graphique de droite représente le ratio miR-27 / contrôle (U6 ou bande aspécifique) après quantification des différentes bandes issues de 3 expériences différentes de MEF wt ou AGO2^{-/-} infectées par le MCMV sauvage à 0hpi ou 48hpi. Le jaune correspond au Northern du panneau de gauche. La significativité du ratio entre 2 conditions est vérifiée par un t-test $p < 0,05$ (astérisque).

L'analyse par northern blot de l'ARN extrait de cellules MEF wt révèle qu'au bout de 48 h d'infection par MCMV miR-27 a quasiment disparu. En revanche, et comme attendu,

l'infection de ces cellules par le virus muté m168 n'a aucun impact sur miR-27. La situation est différente dans les cellules MEF AGO2^{-/-} où on peut voir qu'après 48 h d'infection, le niveau de miR-27 a baissé, mais qu'il est encore détectable. Par ailleurs, on peut voir l'accumulation de formes plus longues de ce miARN. Dans les cellules AGO2^{-/-} infectées par le virus mut168, on ne voit pas d'effet significatif sur l'accumulation de miR-27 (Figure 23). La présence d'AGO2 semble donc également requise pour que le TDMD de miR-27 ait lieu durant l'infection par MCMV. Cela peut refléter le retard d'accumulation du virus, ou peut indiquer une contribution différente des Argonautes au phénomène de TDMD.

La dégradation de miR-27 par MCMV est utilisée pour avoir une idée de l'infection qui est déterminée par analyse par northern blot de l'accumulation de ce miARN. La technique d'infection par le MCMV des cellules en culture au laboratoire est la suivante : le virus est introduit dans le milieu de culture des cellules adhérentes et la plaque subit une centrifugation de 30 min à 800 g (c'est le temps 0 h) suivi d'une heure d'incubation à 37°C avant que le milieu ne soit remplacé. Cette technique permet d'augmenter d'au moins un facteur 10 la MOI par rapport à ce qu'elle serait avec une infection sans centrifugation (Osborn and Walker, 1968).

1.2.2. Infection par le MCMV sur cellules détachées

Comme nous le verrons plus loin, j'ai également utilisé une autre technique d'infection afin d'être capable d'infecter un très grand nombre de cellules de manière coordonnée. Il s'agit de la spinoculation sur cellules détachées qui est une technique généralement utilisée pour infecter des cellules avec des rétrovirus (Forestell et al., 1996). Dans la spinoculation, les cellules à infecter sont tout d'abord détachées puis mélangées avec le virus pendant 30 min avant d'être centrifugées 2 h à 350 g, enfin elles sont remises en plaque de culture. Pour comparer l'efficacité d'infection de cette technique par rapport à la technique classique décrite plus haut, j'ai réalisé des cinétiques d'infection par spinoculation par le MCMV (MOI = 1) de cellules MEF WT ou AGO2^{-/-} avant de déterminer l'efficacité de TDMD de miR-27 par northern blot.

La spinoculation permet d'infecter de manière efficace les cellules MEF wt comme le met en évidence la diminution de l'accumulation de miR-27 à 36h d'infection. Par ailleurs, on peut à nouveau observer que l'infection des cellules MEF AGO2^{-/-} et le TDMD de miR-27 est moins efficace. On note également l'accumulation de formes plus longues de miR-27 dans ces cellules (Figure 24). Cependant, à MOI égale, il semblerait que cette technique d'infection est un peu moins efficace que la technique classique. Lorsque cela sera nécessaire j'utiliserai donc cette technique d'infection en utilisant des MOI plus élevées (de 2 à 5).

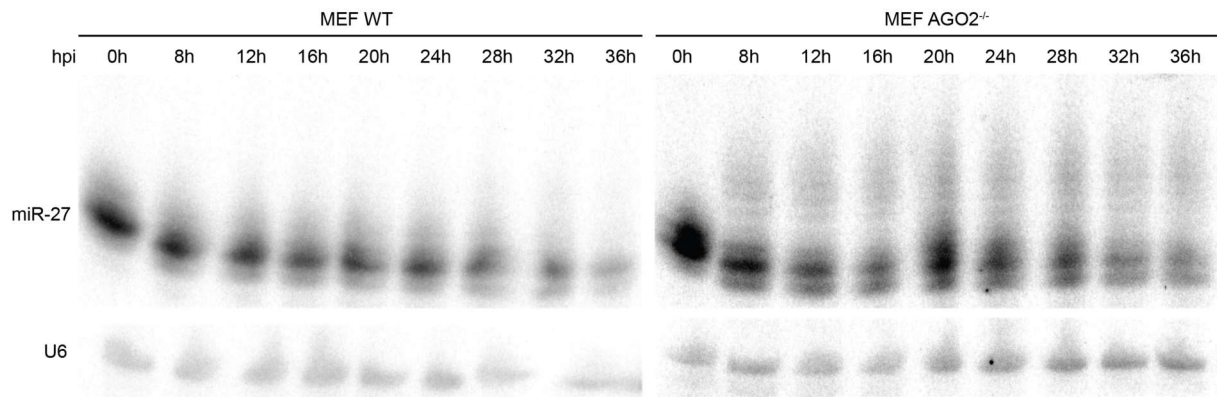


Figure 24 : Analyse par northern blot révélant miR-27 dans les cellules MEF wt ou AGO2^{-/-}.

Les cellules ont été infectées avec une MOI de 1 par spinoculation. U6 sert de contrôle de charge.

1.3. Effet de l'absence d'AGO2 sur l'accumulation et le chargement des miARN viraux

1.3.1. Accumulation des petits ARN dans la cellule en absence d'AGO2

Pour comparer l'accumulation de certains miARN cellulaires et viraux nous avons infecté des MEF wt ou AGO2^{-/-} par MCMV (MOI = 1) pendant 24 h avant d'en extraire les ARN que nous avons analysés par northern blot (Figure 24). Les résultats confirment les observations précédentes concernant le TDMD de miR-27 qui est bien induit dans les cellules MEF wt, mais pas dans les MEF AGO2^{-/-}. Les miARN cellulaires miR-23 (qui est exprimé à partir du même cluster que miR-27) et miR-16, utilisés comme contrôles ne semblent pas impactés par la présence du virus. Par contre le niveau de ces miARN est beaucoup plus faible dans les MEF AGO2^{-/-}. Cela n'est pas dû à un défaut de biogenèse car le précurseur pre-miR-16 n'est pas moins présent dans les MEF AGO2^{-/-} que dans les MEF wt. Les miARN viraux M01.1, M01.2 et M55.1 s'accumulent tous à un niveau beaucoup plus faible dans les cellules dépourvues d'AGO2. Là encore, l'accumulation équivalente, voire plus forte, du précurseur pre-miR-M01.2 montre que ce n'est pas un problème d'expression du miARN ou de défaut d'infection.

Les miARN cellulaires et viraux peuvent donc être plus ou moins impactés par l'absence d'AGO2. Il semble logique que la plupart des miARN soient moins présents en absence de l'Argonaute la plus importante chez les mammifères, puisque l'on sait que les miARN non-chargés sont moins stables et inversement. On sait aussi cependant que l'absence d'AGO2 conduit à une régulation à la hausse de AGO1 (Matsui et al., 2015). Le niveau de miR-27 par contre est comparable dans les cellules non-infectées avec ou sans AGO2.

Il faut à présent déterminer si les miARN que nous détectons par northern blot sont chargés sur une protéine Argonaute ou libre dans la cellule.

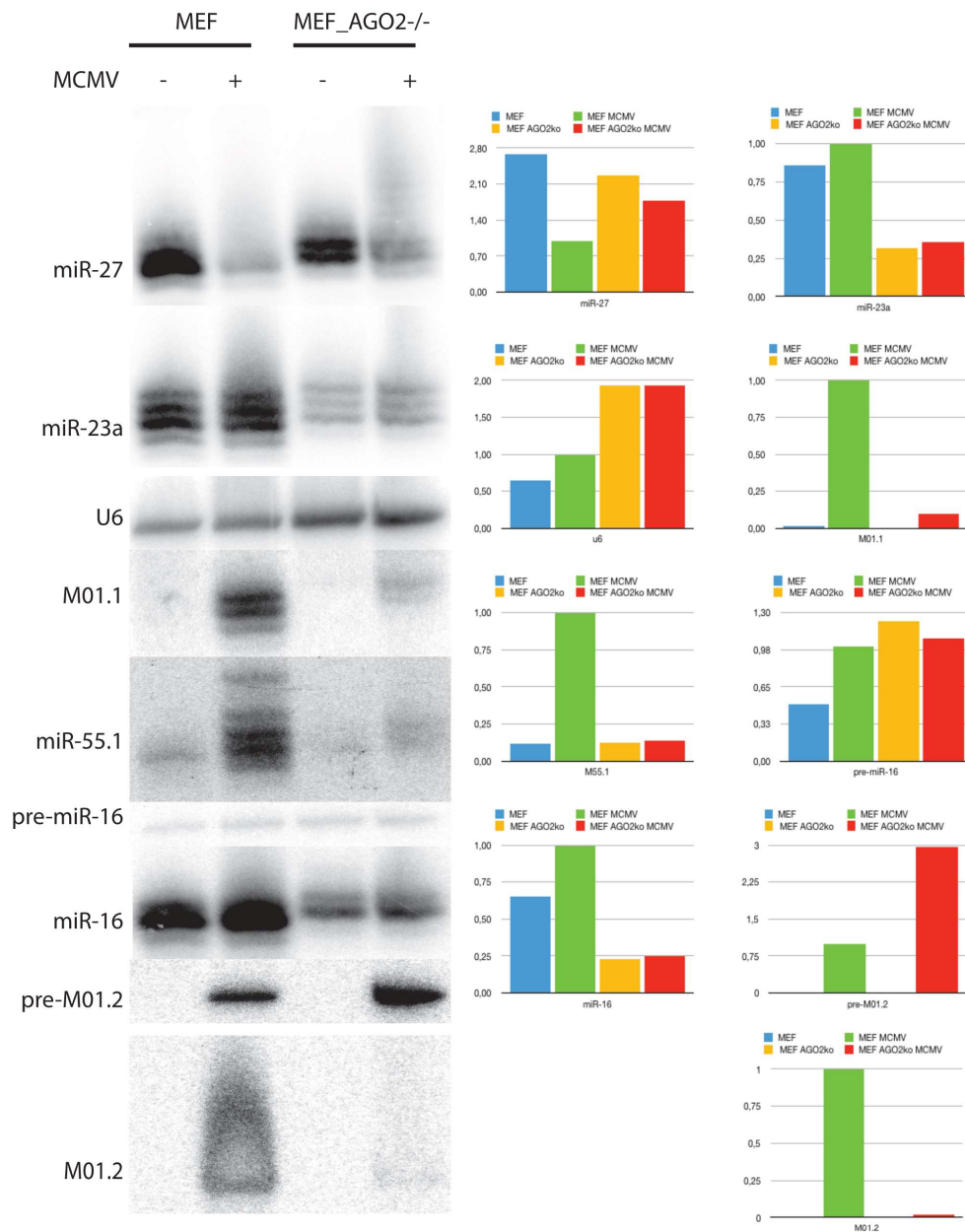


Figure 25 : Accumulation des miARN viraux et cellulaires en présence ou absence d'AGO2 et leurs quantification.

Des cellules MEF wt ou AGO2^{-/-}, infectées ou non par MCMV (MOI = 1), ont été cultivées pendant 24h. L'ARN a été extrait et analysé par northern blot pour révéler les miARN indiqués (Panneau de gauche). Représentation de la quantification des

bandes spécifiques de chaque northern blot du panneau de gauche, pour chaque ARN la condition MEF wt infectée par le MCMV (en vert) sert à définir l'unité en fonction de laquelle la quantification des autres conditions sont exprimées (Panneau de droite).

1.3.2. Accumulation des petits ARN chargés en absence d'AGO2

Pour caractériser les petits ARN chargés dans les protéines Argonautes en présence et absence d'AGO2 nous avons choisi une technique de chromatographie d'affinité basée sur un peptide dérivé de TNRC6B humain et étiqueté Flag (Flag-T6Bwt). TNRC6B est un partenaire bien connu des protéines Argonautes, et l'équipe de G. Meister a déterminé la séquence minimale d'interaction avec les protéines Argonautes (Hauptmann et al., 2015). La protéine TNRC6B possède 3 sites d'interactions riche en résidus tryptophane disponibles pour les Argonautes mais ces derniers ne possèdent qu'un seul site disponible pour TNRC6 (Elkayam et al., 2017). Le peptide utilisé lui ne contient qu'un seul site interagissant avec les Argonautes. Une version du peptide muté (remplacement des résidus W par des A) au niveau du site d'interaction avec les Argonautes (Flag-T6Bmut) sert de contrôle de pêche.

1.3.2.1. Vérification de la capacité de pêche du peptide

Pour vérifier que le peptide T6Bwt permet la pêche des Argonautes dans les cellules MEF, nous avons réalisé cette chromatographie d'affinité sur des cellules MEF wt ou AGO2^{-/-} en utilisant le peptide wt ou muté. L'analyse par western blot indique que AGO2 est bien retrouvé dans la pêche faite avec le peptide T6Bwt, les bandes situées à 40 kDa sont aspécifiques (Figure 26). Nous ne disposons malheureusement pas d'anticorps efficaces pour reconnaître les autres Argonautes de souris AGO1, AGO3 ou AGO4.

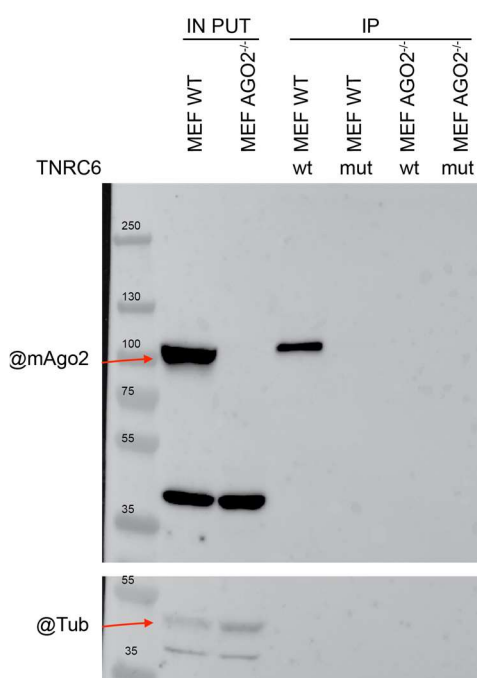


Figure 26 : Western blot de la chromatographie d'affinité avec T6B.

Des cellules MEF wt ou AGO2^{-/-} ont été lysées et une pêche d'affinité a été effectuée avec le peptide T6Bwt ou T6Bmut avant de réaliser une immunoprécipitation avec un anticorps anti-FLAG. Panneau du haut : révélation avec un anticorps anti-mAGO2. Panneau du bas : révélation avec un anticorps anti-tubuline.

La validité de la pêche ne pouvant être déterminée par western blot que pour AGO2, nous avons néanmoins réalisé la même chromatographie d'affinité en triplicat sur des cellules MEF wt dans le but de réaliser une analyse des protéines par spectrométrie de masse. Bien que l'expérience n'ait pas fonctionné de manière optimale et qu'un très faible nombre de protéines ait été identifié, nous avons identifié des peptides pour AGO1, AGO2 et AGO3 (Tableau 2). L'absence d'AGO4 peut s'expliquer que cette dernière n'est que très faiblement ou pas exprimée dans les cellules somatiques de mammifères (Valdmanis et al., 2012). Le peptide T6Bwt permet donc bien l'interaction avec les trois protéines Argonaute présentes dans les cellules MEF.

		MEF wt		
accession		1	2	3
TOTAL NUMBER OF PROTEINS		17	38	34
		SPECTRAL COUNT		
		MEF wt		
accession	protein_set_score	1	2	3
AGO2_MOUSE	341,95	1	9	2
AGO3_MOUSE	303,06		3	2
AGO1_MOUSE	174,47		5	2

Tableau 2 : Protéines Argonautes identifiées par spectrométrie de masse après immunoprécipitation avec le peptide Flag-T6B.

1.3.2.2. Accumulation des petits ARN chargés dans les Argonautes

Pour vérifier l'abondance des miARN endogènes et viraux chargés en présence et absence d'AGO2, nous avons réalisé une pêche des protéines Argonautes avec la technique décrite précédemment dans des cellules MEF wt ou AGO2^{-/-} infectées ou non par le MCMV (MOI = 2, 24 hpi). J'ai réalisé l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-Flag sur une quantité équivalente de protéines totales. Ensuite, j'ai extrait l'ARN du lysat de départ (input) ou après immunoprécipitation, et les ARN ont été analysés par northern blot. On peut voir figure 27 que miR-27 est bien dégradé lors de l'infection dans les cellules wt infectées. Dans cette expérience, il semble qu'il soit également légèrement dégradé dans les cellules AGO2^{-/-}, bien que de manière moins prononcée. Dans l'IP, il apparaît que miR-27 est moins associé aux protéines Argonautes dans les cellules wt infectées, ce qui indique qu'il est bien relargué après induction du TDMD. Dans les cellules AGO2^{-/-}, on peut toujours détecter le miR-27, ce qui pourrait potentiellement expliquer le TDMD moins efficace. Dans l'input et les IP, miR-16 est moins exprimé dans les MEF AGO2^{-/-} mais cela est vrai que les cellules soient infectées ou non. Le miARN viral miR-M01.2 est quant à lui beaucoup moins présent dans l'input et dans l'IP lorsque AGO2 est absent.

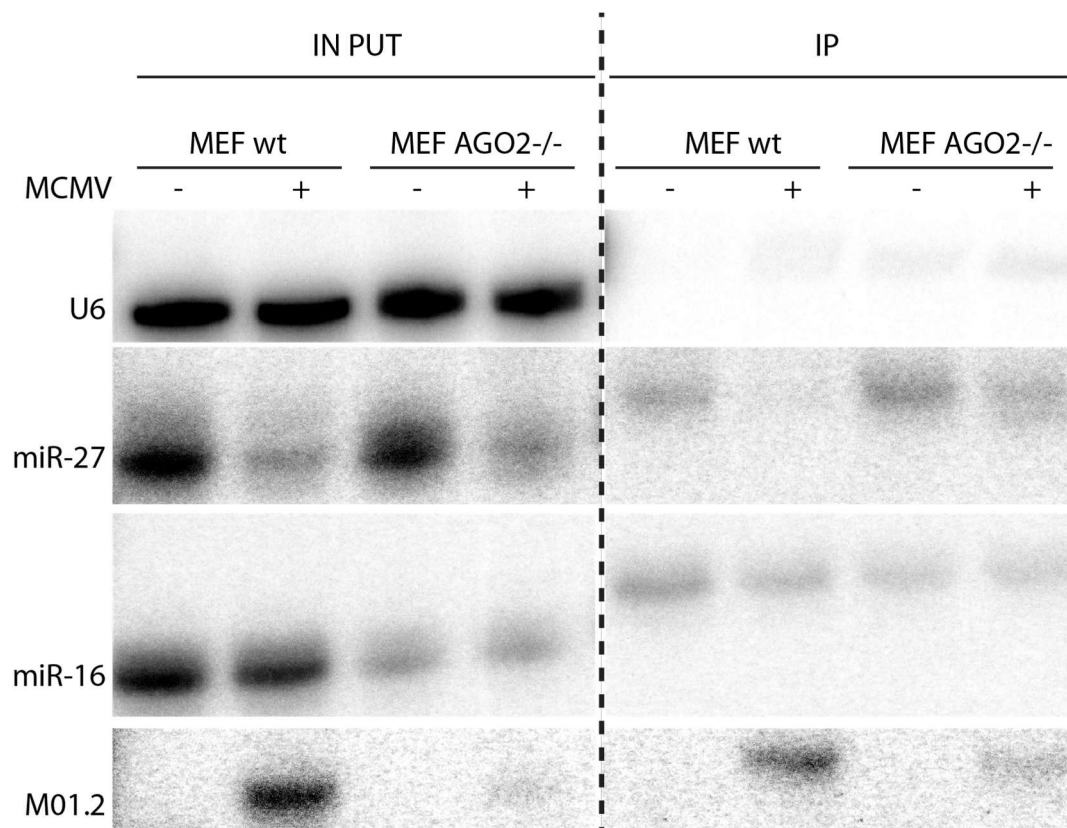


Figure 27 : Analyse par northern blot de miARN cellulaires et viraux chargés sur Argonaute.

Des MEF wt ou AGO2^{-/-} ont été infectées ou non avec MCMV, après lyse cellulaire (INPUT) une chromatographie d'affinité avec T6B a été réalisée (IP).

Globalement ces résultats montrent que l'absence d'AGO2 ne produit pas le même effet sur le chargement des tous les miARN et que le TDMD de miR-27 est perturbé en absence d'AGO2. Le MCMV est un virus qui produit son propre contingent de miARN qui jouent un rôle important pour l'infection. Il est important à ce stade d'obtenir une vue d'ensemble des perturbations induites par l'absence d'AGO2, afin de savoir si la diminution de l'efficacité d'infection par MCMV dans ce contexte est plutôt associée au défaut d'accumulation de miARN viraux ou à l'absence de TDMD. Le meilleur moyen de répondre à ces questions est de générer des données de séquençage à haut-débit des petits ARN à partir de cellules wt ou AGO2^{-/-} et sur des ARN totaux ou après immunoprécipitation des protéines Argonautes.

1.4. Caractérisation globale des profils de petits ARN

Pour caractériser le chargement des miARN cellulaires et viraux en présence ou absence d'AGO2 nous avons séquencé l'ensemble des petits ARN totaux ou chargés en construisant des banques de petits ARN. Celles-ci ont été produites dans les 4 conditions suivantes : MEF wt ou AGO2^{-/-} en condition saines ou d'infection par le MCMV. Pour sélectionner les petits ARN chargés nous avons pêchés les protéines Argonautes, chaque pêche ayant été faite en triplicat à partir d'un lysat cellulaire unique en utilisant un peptide T6Bwt. Pour l'extrait de

départ, nous avons effectué un fractionnement de taille pour sélectionner uniquement les ARN d'une taille comprise entre 18 et 30 nucléotides.

Au final, nous avons donc 16 échantillons identifiés comme suit : le contexte cellulaire par : MEF-WT ou MEF-AGO2^{-/-}, le traitement subi par les cellules : MOCK ou MCMV et s'il s'agit des petits ARN chargés sur Argonaute ou totaux : IP1, IP2, IP3 ou Input.

1.4.1. Constitution d'une banque de petits ARN

Les cellules MEF WT et MEF AGO2^{-/-} qui ont été cultivées en présence ou non de MCMV (MOI = 2, 24 hpi) sont lysées et une partie de l'extrait cellulaire est directement utilisé pour en extraire les ARN (Input). La partie majoritaire du lysat est utilisée pour faire une chromatographie d'affinité à l'aide du peptide Flag-T6Bwt retenu sur des billes anti-Flag (Hauptmann et al., 2015). Les billes sont finalement plongées dans le TRIzol pour en extraire l'ARN. Afin d'éliminer toute autre source d'ARN que les petits ARN tous les échantillons sont sélectionnés par passage sur gel de polyacrylamide. Les petits ARN sont découpés sur le gel et resolubilisés pour pouvoir y ajouter un adaptateur en 3' et purifiés à nouveau sur gel de polyacrylamide. La même manipulation est effectuée après ajout d'un adaptateur en 5'. Après transcription inverse, un code-barre est ajouté en 3' par PCR. Enfin les banques sont purifiées par passage sur un gel de polyacrylamide une dernière fois. Tous les échantillons peuvent être mélangés pour un séquençage sur un séquenceur Illumina HiSeq4000. C'est le traitement informatique des données qui permet de réattribuer les séquences au bon échantillon grâce au code-barre.

1.4.1.1. Traitement des données informatiques

Le traitement informatique des données de séquençage obtenues a été réalisé par Béatrice Chane-Woon-Ming, bio-informaticienne au CNRS. La première étape consiste à séparer les millions de séquences en 16 fichiers distincts en fonction des codes-barres identifiés sur la séquence, cette étape est réalisée par la plate-forme de séquençage. La deuxième étape est d'éliminer totalement les séquences difficilement traitables qui ne contiennent pas les séquences correspondantes aux adaptateurs 3' et 5' ligués pendant la fabrication de la banque. Il subsiste les séquences qui contiennent les séquences des petits ARN présents dans les différents échantillons dont on ne conserve que celles dont la longueur est comprise entre 18 et 32 nucléotides. Le tableau 3 récapitule le nombre de séquences totales et le nombre de séquences éliminées à chaque étape. Seules 4-5 % des lectures sont éliminées à ce moment du traitement des données.

Les séquences obtenues sont ensuite alignées sur les génomes de référence de *Mus musculus* et de MuHV-1 afin d'éliminer les séquences que l'on ne peut pas attribuer ce qui représente encore 1 à 6 % des lectures.

Pour vérifier la qualité des banques de petits ARN il a fallu vérifier le pourcentage des séquences identifiées et alignées sur les génomes de références qui correspondent à un

miARN connu dans les différents échantillons, inputs et IP. Dans les inputs, de 43 à 85 % des lectures attribuées correspondent à un miARN mais dans les échantillons issus des IP qui doivent contenir les séquences chargées sur les Argonautes, plus de 96% des séquences correspondent à une séquence de miARN existant dans la base de données miRBase (Griffiths-Jones, 2010; Griffiths-Jones et al., 2006, 2008; Kozomara and Griffiths-Jones, 2011, 2014; Kozomara et al., 2019) ce qui valide également la technique de la pêche et la qualité des banques.

En ce qui concerne la présence de miARN viraux, les échantillons réalisés à partir de cellules non-infectées n'en contiennent qu'une fraction infinitésimale (due à des erreurs d'attribution de code-barres ainsi qu'à une éventuelle contamination pendant les manipulations d'échantillons). En revanche, en condition d'infection on retrouve environ 2 % de miARN viraux dans les MEF wt et 1,2 % dans les MEF AGO2^{-/-}. Ces pourcentages sont faibles par rapport à ce qui était attendu après 24 h d'infection (25 %) (selon des données non-publiées), il est donc probable que l'infection initiale du MCMV a tout simplement été moins forte que celle qui avait été effectuée dans l'expérience de référence. Il faut toutefois garder à l'esprit que les données précédentes et non-publiées avaient été réalisées sur des cellules 3T3 qui s'infectent globalement mieux que les MEF.

Tableau 3 : Répartition des séquences après les premières étapes d'analyse des données de séquençage des petits ARN dans les différents échantillons.

	MEF-WT-MOCK-input		MEF-WT-MOCK-IP1		MEF-WT-MOCK-IP2		MEF-WT-MOCK-IP3	
	Read #	Read %	Read #	Read %	Read #	Read %	Read #	Read %
Données brutes	18466670		25598489		21874267		18549647	
Filtre (3' et 5' adaptateur)	705581		696175		806346		986563	
Filtre taille (taille < 18 ou > 32 nt)	293204		77127		65125		427678	
Après pré-traitement	17467885		24825187		21002796		17135406	
Séquences non-alignées	572264		346036		314731		1035351	
Séquences alignées	16895621	100	24479151	100	20688065	100	16100055	100
mmu+mcmv miRs	14384103	85,135	23627421	96,521	19897703	96,180	12573013	78,093
mmu+mcmv miRs	14384103	100	23627421	100	19897703	100	12573013	100
mmu miRs	14383490	99,996	23626866	99,998	19897157	99,997	12572618	99,997
mcmv miRs	613	0,004	555	0,002	546	0,003	395	0,003

	MEF-WT-MCMV-input		MEF-WT-MCMV-IP1		MEF-WT-MCMV-IP2		MEF-WT-MCMV-IP3	
	Read #	Read %	Read #	Read %	Read #	Read %	Read #	Read %
Données brutes	21156599		18231816		17228154		18548829	
Filtre (3' et 5' adaptateur)	2299939		836621		975435		878129	
Filtre taille (taille < 18 ou > 32 nt)	115389		51305		14334		15525	
Après pré-traitement	18741271		17343890		16238385		17655175	
Séquences non-alignées	980698		309662		173773		178908	
Séquences alignées	17760573	100	17034228	100	16064612	100	17476267	100
mmu+mcmv miRs	13537868	76,224	16473219	96,707	15600105	97,109	16991749	97,228
mmu+mcmv miRs	13537868	100	16473219	100	15600105	100	16991749	100
mmu miRs	13281981	98,110	16167411	98,1436	15257062	97,801	16578450	97,568
mcmv miRs	255887	1,890	305808	1,8564	343043	2,199	413299	2,432

	MEF-AGO2KO-MOCK-input		MEF-AGO2KO-MOCK-IP1		MEF-AGO2KO-MOCK-IP2		MEF-AGO2KO-MOCK-IP3	
	Read #	Read %	Read #	Read %	Read #	Read %	Read #	Read %
Données brutes	19942472		20978413		23830212		22739714	
Filtre (3' et 5' adaptateur)	790521		594598		688609		746415	
Filtre taille (taille < 18 ou > 32 nt)	685715		91230		78024		103438	
Après pré-traitement	18466236		20292585		23063579		21889861	
Séquences non-alignées	1123551		171411		192493		185865	
Séquences alignées	17342685	100	20121174	100	22871086	100	21703996	100
mmu+mcmv miRs	12553418	72,385	19454076	96,685	22144006	96,821	21013698	96,819
mmu+mcmv miRs	12553418	100	19454076	100	22144006	100	21013698	100
mmu miRs	12552901	99,996	19453582	99,997	22143454	99,998	21013260	99,998
mcmv miRs	517	0,004	494	0,003	552	0,002	438	0,002

	MEF-AGO2KO-MCMV-input		MEF-AGO2KO-MCMV-IP1		MEF-AGO2KO-MCMV-IP2		MEF-AGO2KO-MCMV-IP3	
	Read #	Read %	Read #	Read %	Read #	Read %	Read #	Read %
Données brutes	17513093		23975423		27528602		17824455	
Filtre (3' et 5' adaptateur)	610278		945268		1419048		1007012	
Filtre taille (taille < 18 ou > 32 nt)	62963		30934		19619		14832	
Après pré-traitement	16839852		22999221		26089935		16802611	
Séquences non-alignées	1239030		169452		195618		132028	
Séquences alignées	15600822	100	22829769	100	25894317	100	16670583	100
mmu+mcmv miRs	6753144	43,287	22030081	96,497	25023466	96,637	16077730	96,444
mmu+mcmv miRs	6753144	100	22030081	100	25023466	100	16077730	100
mmu miRs	6659355	98,6112	21772649	98,831	24737186	98,856	15887566	98,817
mcmv miRs	93789	1,3888	257432	1,169	286280	1,144	190164	1,183

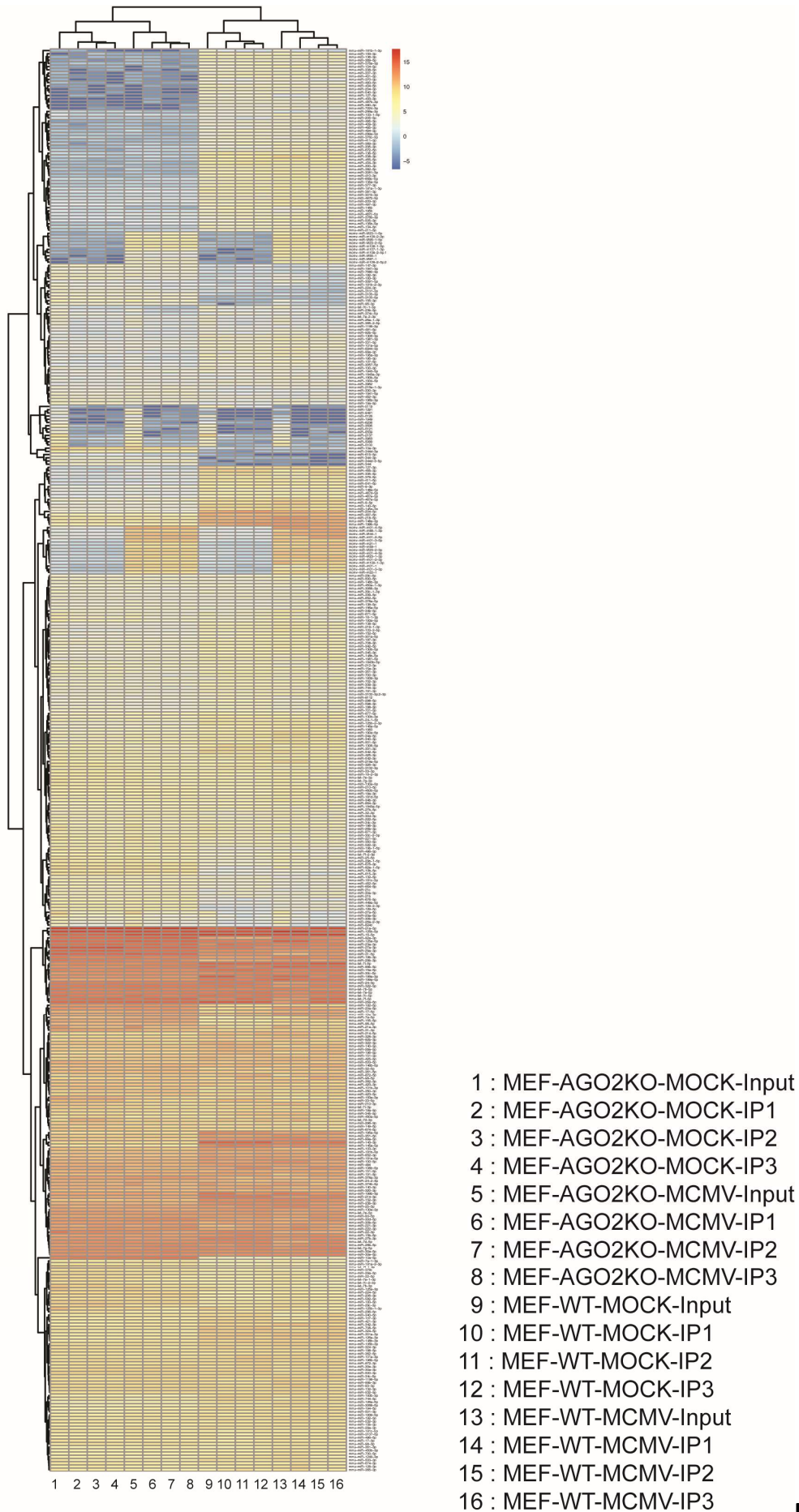


Figure 28

Figure 28 : Heat map des miARN cellulaires et viraux dans la banque de petits à ARN.

Le nombre de lectures par millions est exprimé avec une échelle logarithmique de base 2. Est représentée ici l'union des miARN présents avec au moins 10 lectures par million dans l'input dans chaque échantillon. (Une version plus grande se trouve en annexe 1)

1.4.1.2. Analyse des données de séquençage

Une fois que la banque de petits ARN est débarrassée des séquences que l'on ne peut attribuer aux miARN, le nombre de séquences obtenues pour chaque miARN ne peut être utilisé de manière brute. Le nombre de lectures obtenues pour un miARN donné à l'intérieur d'un échantillon doit être normalisé si on veut pouvoir le comparer aux lectures obtenues dans les autres échantillons. En effet, la dernière étape qui est réalisée lors de la fabrication de la banque de petits ARN est une PCR dont le nombre de cycle est adapté à la quantité d'ADNc obtenue après l'étape de transcription inverse, il se peut donc qu'il y ait une différence entre les échantillons. Pour ce faire, on compare le nombre de lectures par millions de séquences identifiées à l'intérieur de l'échantillon.

Ces résultats sont utilisés pour constituer un *Heat map* (ou carte de fréquentation) (Figure 28) qui permet de faire apparaître avec un code couleur le nombre de lectures par millions avec une échelle logarithmique de base 2. Seuls les miARN qui ont au moins 10 séquences dans au moins un input sont sélectionnés. Avant de m'intéresser aux miARN cellulaires et viraux dont l'expression est influencée par le virus ou l'absence d'AGO2, je vais faire une observation globale sur les échantillons Inputs et leurs IP correspondantes.

De manière intéressante, on n'observe pas de miARN qui sont plus présents dans l'IP que dans l'Input. La figure 29 montre les miARN dont les niveaux sont le plus différents entre Input et IP et tous ces miARN sont moins présents dans les IP. Par ailleurs, l'abondance de ces miARN est globalement faible et la plupart dont miR-5119, miR-6481, miR-5126, miR-6236, miR-3535, miR-5121, miR-2137 et miR-5099 n'ont à ce jour pas de fonction associée. miR-1291 a été associé à l'inhibition du développement de cancer de la prostate en favorisant la phase S plutôt que la transition vers la mitose (Cai et al., 2019). miR-1949 a été associé à des dysfonctions rénales (Fay et al., 2018) et au cancer de la vessie (Wang et al., 2015). miR-6539 est inversement lié DNMT3B (une DNA methyl-transférase) qui permet la reprogrammation cellulaire en ciblant une séquence codante (Wu et al., 2017). miR-3963 a été lié à la différenciation des myoblastes (Katase et al., 2015). Enfin miR-5100 sert de biomarqueur pour le diagnostic de récurrence certains cancers tels que celui du colon (Jacob et al., 2018) ou des poumons (Wang et al., 2017).

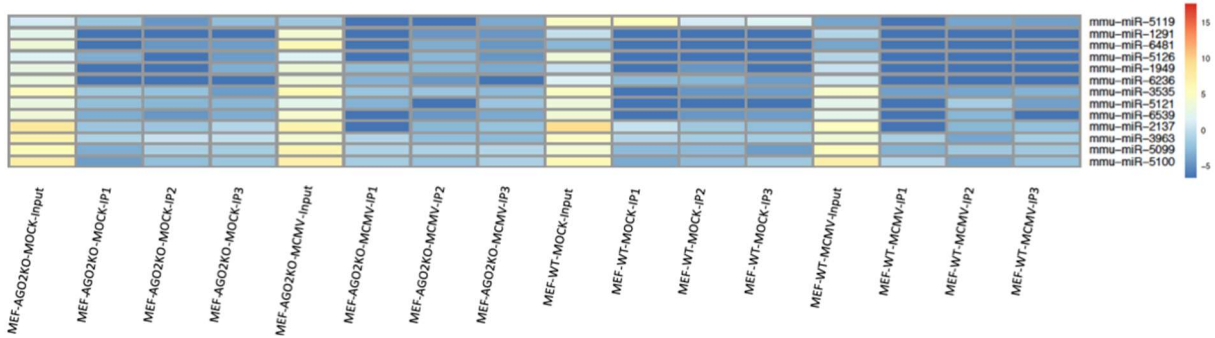


Figure 29 : Heat map des miARN cellulaires montrant une différence entre Input et IP.

1.4.1. Effet de l'infection sur les miR

Si on recherche les miARN qui sont différemment exprimés pendant l'infection par le MCMV on retrouve les miARN viraux. On peut constater que l'infection est clairement établie dans tous les échantillons concernés (Figure 30).

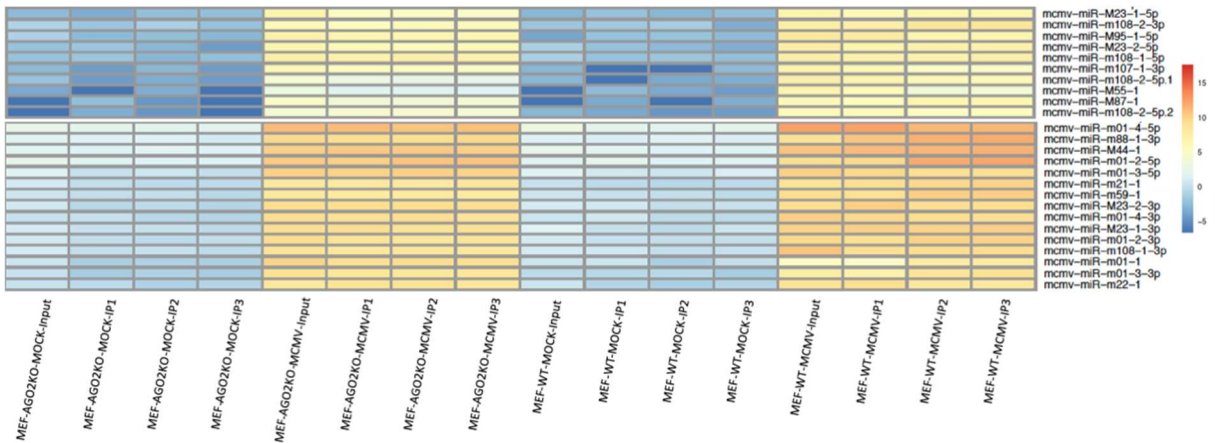


Figure 30 : Heat map des miARN viraux.

1.4.2. Effet de l'absence d'AGO2

1.4.2.1. Effet de l'absence d'AGO2 sur les miARN cellulaires

L'immense majorité des miARN sont soit peu impactés soit impactés négativement par l'absence d'AGO2. Mais certains miARN sont plus présents en absence d'AGO2 (Figure 31). Parmi les plus exprimés sans AGO2, on trouve les miR-344d-3p, miR-344-3p, miR-334d-3-5p, miR-344i dont les gènes sont proches sur le chromosome 7 et parmi lesquels le miR-344-3p a été associé à l'inhibition de la différenciation cellulaire dans les adipocytes (Chen et al., 2014). Le miR-615-5p est également légèrement enrichi dans les cellules AGO2^{-/-}, et celui-ci est considéré comme suppresseur de tumeur car il inhibe la prolifération cellulaire (Dong et al., 2018). Il a également été associé à la régulation de l'angiogénèse en ciblant AKT (Protéine kinase B). Enfin, les deux bras du miR-10a, -3p et -5p, sont tous les deux plus exprimés dans les cellules AGO2^{-/-}. miR-10a-5p est même le miRNA dont l'abondance est la plus augmentée

(environ 1000 fois). Ce dernier a été impliqué dans la régulation de l'apoptose en ciblant les gènes de la Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) et l'AKT (Zhang et al., 2019).

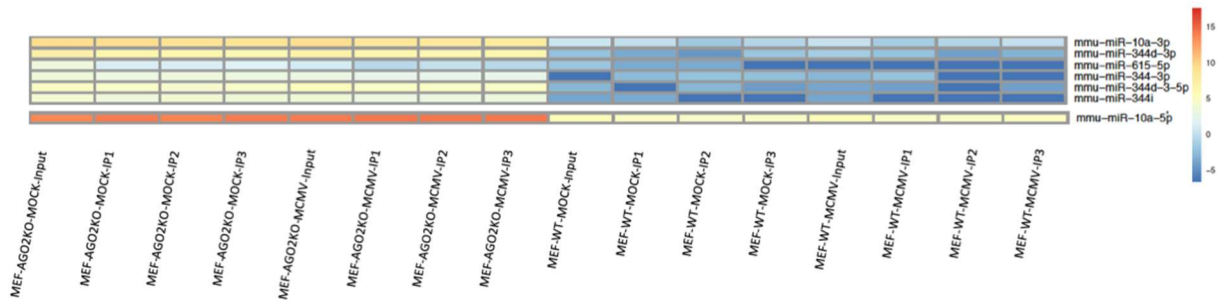


Figure 31 : Les miARN cellulaires plus exprimés dans les MEF AGO2^{-/-}.

1.4.2.2. Effet de l'absence d'AGO2 sur les miARN viraux

Le but est de voir s'il existe des disparités dans le chargement des petits ARN viraux en fonction de la présence ou de l'absence de AGO2. Pour cela nous avons comparé les échantillons qui recèlent les miARN chargés en condition infectée uniquement c'est à dire IP1 IP2 et IP3 de MEF-WT-MCMV comparés à IP2, IP2 et IP3 de MEF-AGO2KO-MCMV. L'analyse en composante principale des échantillons montre que les conditions AGO2KO-MCMV et WT-MCMV sont regroupées entre elles à l'exception de WT-IP1 (Figure 32). La méthode d'analyse en composante principale permet d'analyser des données pour identifier les origines de différence entre objets suivant deux (ou plus) dimensions.

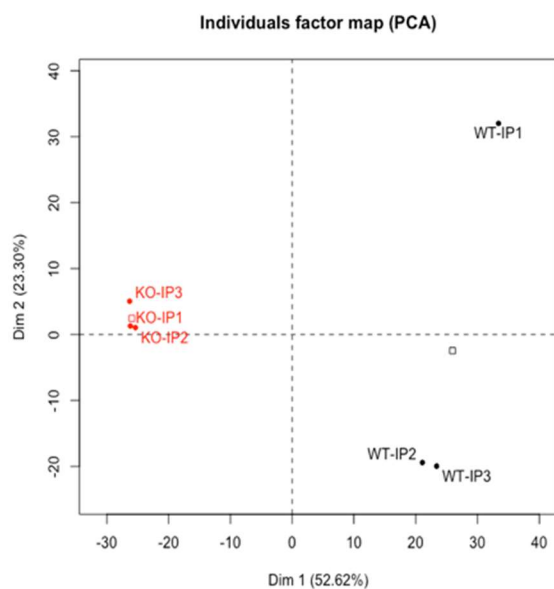


Figure 32 : Analyse en composante principale des conditions avec infection et IP.

Le carré rouge et le carré noir symbolisent les points moyens des triplicats.

miR	log2FoldChange	lfcSE	padj
mcmv-miR-m108-2-5p.1	-3,14	0,30	1,69E-24
mcmv-miR-M55-1	-2,53	0,54	1,33E-05
mcmv-miR-m108-2-3p	-1,94	0,39	2,36E-06
mcmv-miR-M87-1	-1,71	0,35	4,30E-06
mcmv-miR-m88-1-3p	-1,48	0,39	5,25E-04
mcmv-miR-m59-1	-1,32	0,38	1,41E-03
mcmv-miR-m21-1	-0,90	0,30	7,89E-03
mcmv-miR-m108-2-5p.2	-0,86	0,23	7,22E-04
mcmv-miR-M23-1-5p	-0,81	0,29	1,20E-02
mcmv-miR-M23-1-3p	-0,71	0,19	4,37E-04
mcmv-miR-m107-1-5p	-0,70	0,50	2,67E-01
mcmv-miR-m01-2-5p	-0,58	0,57	4,24E-01
mcmv-miR-M23-2-5p	-0,55	0,21	2,25E-02
mcmv-miR-m108-1-3p	-0,53	0,22	3,70E-02
mcmv-miR-M44-1	-0,49	0,23	6,81E-02
mcmv-miR-m01-2-3p	-0,46	0,31	2,26E-01
mcmv-miR-M95-1-3p	-0,44	0,51	5,15E-01
mcmv-miR-m01-4-5p	-0,34	0,26	2,88E-01
mcmv-miR-M95-1-5p	-0,24	0,33	5,85E-01
mcmv-miR-m59-2	-0,15	0,61	8,77E-01
mcmv-miR-m01-4-3p	0,04	0,22	9,01E-01
mcmv-miR-M23-2-3p	0,26	0,25	4,30E-01
mcmv-miR-m107-1-3p	0,32	0,34	4,54E-01
mcmv-miR-m108-1-5p	0,47	0,20	4,50E-02
mcmv-miR-m22-1	0,53	0,33	1,83E-01
mcmv-miR-m01-3-3p	0,58	0,47	3,32E-01
mcmv-miR-m01-3-5p	1,26	0,21	2,10E-08
mcmv-miR-m88-1-5p	2,28	0,60	4,73E-04
mcmv-miR-m01-1	2,55	0,64	2,54E-04

Tableau 4 : LFC des miARN viraux chargés dans MEF-WT et MEF-AGO2^{-/-}.

Le facteur d'enrichissement des miARN viraux entre les deux conditions infectées comparées est exprimé en facteur multiplicateur en Log2 (Log2 Fold Change : LFC). lfcSE est la valeur de l'erreur moyenne et les miARN sont classés en fonction de la valeur des p-valeurs ajustées. En rouge apparaissent les miARN significativement plus chargés en présence d'AGO2 et en bleu apparaissent les miARN significativement plus chargés en absence d'AGO2 ($p < 0,05$).

La comparaison des taux d'enrichissement entre les échantillons MEF AGO2^{-/-} et MEF WT pour les miARN viraux montrent une grande disparité entre les miARN (Tableau 4). miR-m108-2-5p.1, miR-M55-1, miR-m108-2-3p, miR-M87-1, miR-m88-1-3p, miR-m59-1, miR-m21.1, miR-m108-2-5p.2, miR-M23-1-5p, miR-M23-1-3p, miR-M23-2-5p et miR-m108-1-3p sont significativement plus exprimés en présence d'AGO2. S'il n'est pas surprenant que la plupart des miARN viraux se retrouvent significativement en plus grand pourcentage dans les MEF WT (LFC négatif et en rouge si la p-value est significative) il en existe néanmoins qui sont plus chargés dans les MEF AGO2^{-/-} (LFC positif et en bleu si la p-value est significative). Il y en a quatre, miR-m108-1-5p, miR-m01-3-5p, miR-m88-1-5p et miR-m01-1 qui sont significativement plus chargés en absence d'AGO2.

Il y a donc 12 miARN viraux que l'on retrouve significativement plus chargés dans les protéines Argonaute lorsque AGO2 est présent ce qui montre que AGO2 doit être responsable du chargement des miARN nouvellement générés lors de l'infection du MCMV. Il est vrai que lors de la constitution de cette banque de petits ARN seulement 2 % des miARN sont des miARN viraux dans les conditions infectées. Mais d'autres infections plus fortes au laboratoire ont montré que ce pourcentage peut monter jusqu'à 25 % au bout de 24 h d'infection. Il a déjà été montré que les miARN viraux ont une grande importance pour la mise en place de l'infection *in vivo*, par exemple miR-M23-2 (Dölken et al., 2010). Il est donc possible qu'outre l'absence d'AGO2 qui est l'Argonaute la plus importante, les miARN viraux soient

défavorablement chargés dans les autres Argonautes. Globalement l'absence d'AGO2 porterait atteinte à la mise en place de l'infection par le MCMV en nuisant à la quantité des miARN viraux chargés.

1.4.3. TDMD de miR-27

Outre l'analyse de l'importance d'AGO2 pour l'accumulation des miARN viraux, nous avons également analysé l'impact de son absence sur la mise en place du TDMD de miR-27. Comme nous l'avons mentionné plus haut, il existe deux isoformes de miR-27, miR-27a et miR-27b. Les deux variants ne diffèrent que par un nucléotide à l'antépénultième position en 3' du miARN ce qui induit un wobble G:U supplémentaire par rapport à miR-27a dans l'interaction faite avec la cible m169 (Figure 33).

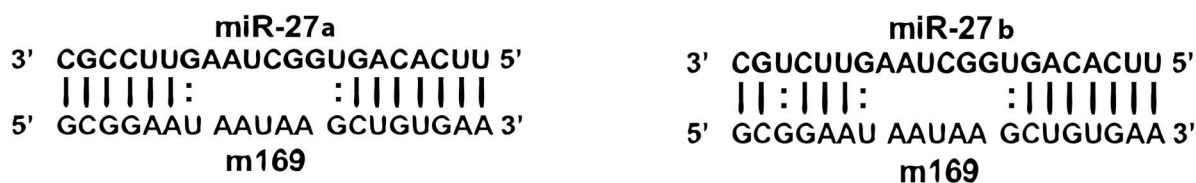


Figure 33 : Appariement de miR-27a et miR-27b avec leur cible sur m169.

L'analyse des banques de petits ARN en condition d'infection pas le MCMV nous permettra de décortiquer de manière fine le TDMD de miR-27a et b ainsi que le rôle joué par AGO2 dans ce processus.

1.4.3.1. Effect de l'infection par MCMV sur miR-27

Les figures 34 et 35 compilent les pourcentages de miR-27a et b respectivement en fonction de leur taille par échantillon en faisant la moyenne dans les échantillons IP. On peut observer une tendance se dégager pour miR-27a : il semble que miR-27a soit plus allongé d'un ou plusieurs nucléotides lorsqu'il y a infection par le MCMV que ce soit dans les MEF-WT (36,3 % contre 24,5 %) ou dans les MEF-AGO2^{-/-} (49,1 % contre 42,3 %) (Figure 34). La tendance est moins marquée pour miR-27b : dans les MEF-WT, miR-27b apparaît un peu plus souvent allongé en cas d'infection (12,6 % contre 6,4 %) mais dans les MEF-AGO2^{-/-} il y a plus de formes normales et moins de formes raccourcies (Figure 35). Il est bien sûr possible que le niveau d'infection étant assez bas il est plus difficile de détecter des différences nettes. En revanche, il n'y a pas de différences importantes entre les miR-27 chargés et les mi-27 totaux (Inputs) sauf pour miR-27a dans les MEF sauvages non-infectées qui sont majoritairement raccourcies (trimmed) dans les Inputs.

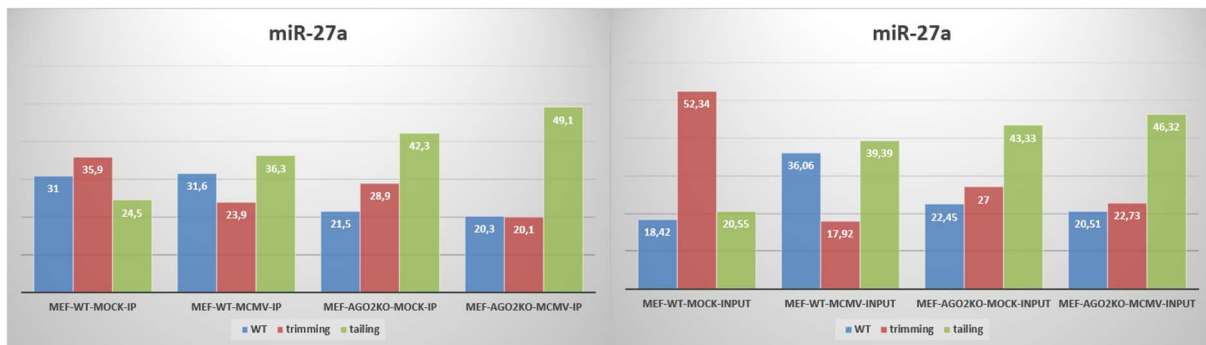


Figure 34 : des formes normales (WT), allongées (tailing) ou dégradées (trimming) d'au moins un nucléotide de miR-27a.

Graphique de gauche : IP et graphique de droite : Inputs.

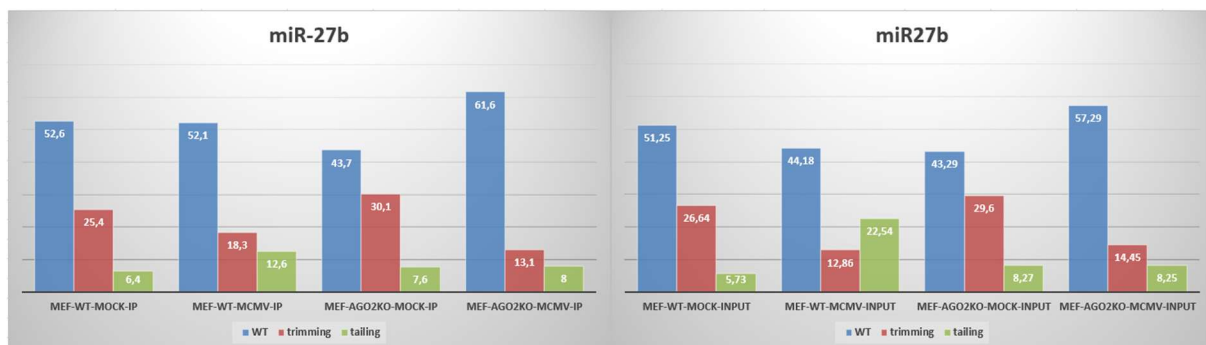


Figure 35 : Distribution des formes normales (WT), allongées (tailing) ou dégradées (trimming) d'au moins un nucléotide de miR-27b.

Graphique de gauche : IP et graphique de droite : Inputs.

1.4.3.2. Expression et dégradation de miR-27 après infection par le MCMV

L'analyse du pourcentage de miARN que représentent miR-27 a et b en totalité dans les échantillons IP en moyenne révèle une différence intéressante (Figure 36). En effet, miR27a en condition MOCK représente 1,78 % des miARN totaux dans les MEF wt, mais cette valeur monte à 5,91 % dans les MEF_AGO2^{-/-}. Cela explique certainement que sur les northern blots miR-27 apparaisse autant exprimé en absence d'AGO2 alors que la plupart des autres miARN analysés semblent moins exprimés. Puis, dans les deux lignées et pour les deux isoformes de miR-27, on constate une diminution de leur accumulation dans les cellules infectées. Curieusement, miR-27b ne suit pas la même tendance, et semble même globalement moins exprimé dans les cellules AGO2^{-/-}. On peut également observer que contrairement aux observations effectuées lors des analyses par northern blot, les niveaux de miR-27 a et b diminuent beaucoup lors de l'infection même dans les lignées AGO2^{-/-}. miR-27a est transcrit dans un cluster avec miR-23a et miR-24 or ces trois miARN ne réagissent pas de la même manière lorsque nous comparons les 2 lignées lors de l'infection dans les IP.

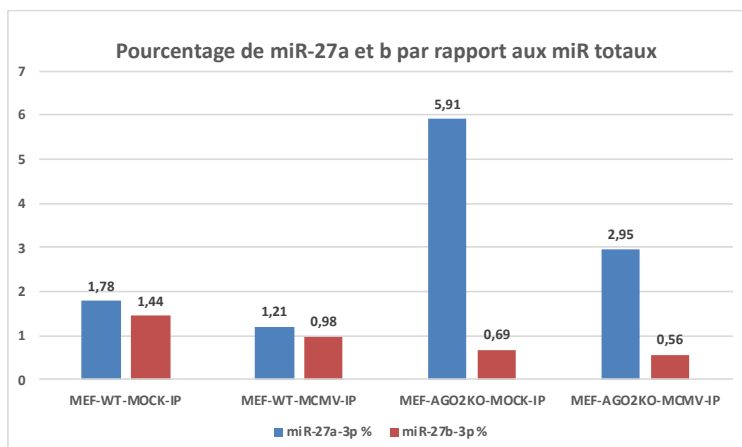


Figure 36 : Pourcentage moyen de miR-27a et b parmi les miARN chargés (IP).

Si on considère que l'augmentation du nombre de forme rallongées est le signe de la mise en place du TDMD on peut également faire la constatation que la forme majoritaire de miR-27 a et b, dans tous les triplicats infectés, est la forme wt (21 nucléotides) sauf dans les AGO2^{-/-} pour miR-27a où c'est la forme mono-uridyliée (22 nucléotides) (voir tableau 5).

Sample	miR	Read#	Sequence	Length	Category	MM#	MMdesc
MEF-WT-MCMV-input	mmu-miR-27a-3p	55036	TTCACAGTGGCTAAGTCCGC		21 fl_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	40595	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT		22 3add_iso	1	22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	25054	TTCACAGTGGCTAAGTCCG		20 3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	11348	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCA		22 3add_iso	1	22:C>A
	mmu-miR-27a-3p	2705	TTCACAGTGGCTAAGTCCGA		21 fl_iso	1	21:C>A
	mmu-miR-27a-3p	2312	TTCACAGTGGCTAAGTCCGTT		22 3add_iso	2	21:C>T,22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	2190	TTCACAGTGGCTAAGTCC		19 3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	2047	TTCACAGTGGCTAAGTCCGT		21 fl_iso	1	21:C>T
	mmu-miR-27a-3p	1472	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCAA		23 3add_iso	2	22:C>A,23:C>A
	mmu-miR-27a-3p	1063	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCTA		23 3add_iso	2	22:C>T,23:C>A
	mmu-miR-27a-3p	91203	TTCACAGTGGCTAAGTCCGC		21 fl_id	0	nothing
MEF-WT-MCMV-IP1	mmu-miR-27a-3p	76211	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT		22 3add_iso	1	22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	33735	TTCACAGTGGCTAAGTCCG		20 3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	16668	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCA		22 3add_iso	1	22:C>A
	mmu-miR-27a-3p	4259	TTCACAGTGGCTAAGTCCGA		21 fl_iso	1	21:C>A
	mmu-miR-27a-3p	3247	TTCACAGTGGCTAAGTCCGTT		22 3add_iso	2	21:C>T,22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	3134	TTCACAGTGGCTAAGTCCGT		21 fl_iso	1	21:C>T
	mmu-miR-27a-3p	2625	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCAA		23 3add_iso	2	22:C>A,23:C>A
	mmu-miR-27a-3p	2403	TTCACAGTGGCTAAGTCC		19 3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	1735	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCTA		23 3add_iso	2	22:C>T,23:C>A
	mmu-miR-27a-3p	46764	TTCACAGTGGCTAAGTCCGC		21 fl_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	34478	TTCACAGTGGCTAAGTCCG		20 3trim_id	0	nothing
MEF-WT-MCMV-IP2	mmu-miR-27a-3p	34092	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT		22 3add_iso	1	22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	16013	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCA		22 3add_iso	1	22:C>A
	mmu-miR-27a-3p	4283	TTCACAGTGGCTAAGTCCGA		21 fl_iso	1	21:C>A
	mmu-miR-27a-3p	4153	TTCACAGTGGCTAAGTCCGT		21 fl_iso	1	21:C>T
	mmu-miR-27a-3p	2208	TTCACAGTGGCTAAGTCCGTT		22 3add_iso	2	21:C>T,22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	1927	TTCACAGTGGCTAAGTCC		19 3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	1355	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCAA		23 3add_iso	2	22:C>A,23:C>A
	mmu-miR-27a-3p	950	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCG		22 3add_iso	1	22:C>G
	mmu-miR-27a-3p	54280	TTCACAGTGGCTAAGTCCG		20 3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	48132	TTCACAGTGGCTAAGTCCGC		21 fl_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	30968	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT		22 3add_iso	1	22:C>T
MEF-WT-MCMV-IP3	mmu-miR-27a-3p	15166	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCA		22 3add_iso	1	22:C>A
	mmu-miR-27a-3p	5518	TTCACAGTGGCTAAGTCCGT		21 fl_iso	1	21:C>T
	mmu-miR-27a-3p	4488	TTCACAGTGGCTAAGTCCGA		21 fl_iso	1	21:C>A
	mmu-miR-27a-3p	3519	TTCACAGTGGCTAAGTCC		19 3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	2067	TTCACAGTGGCTAAGTCCGTT		22 3add_iso	2	21:C>T,22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	1067	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCG		22 3add_iso	1	22:C>G
	mmu-miR-27a-3p	949	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCAA		23 3add_iso	2	22:C>A,23:C>A

Tableau 5 : Les formes majoritaires de miR-27a dans les échantillons infectés.

Sample	miR	Read#	Sequence	Length	Category	MM#	MMdesc
MEF-AGO2KO-MCMV-input	mmu-miR-27a-3p	62751	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT	22	3add_iso	1	22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	40223	TTCACAGTGGCTAAGTCCG	20	3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	38019	TTCACAGTGGCTAAGTCCGC	21	fl_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	17330	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCA	22	3add_iso	1	22:C>A
	mmu-miR-27a-3p	4849	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT	21	fl_iso	1	21:C>T
	mmu-miR-27a-3p	4586	TTCACAGTGGCTAAGTCCGA	21	fl_iso	1	21:C>A
	mmu-miR-27a-3p	4247	TTCACAGTGGCTAAGTCCGTT	22	3add_iso	2	21:C>T,22:C>
	mmu-miR-27a-3p	1826	TTCACAGTGGCTAAGTCC	19	3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	1572	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCC	22	3add_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	1063	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCG	22	3add_iso	1	22:C>G
MEF-AGO2KO-MCMV-IP1	mmu-miR-27a-3p	227079	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT	22	3add_iso	1	22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	114736	TTCACAGTGGCTAAGTCCGC	21	fl_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	95727	TTCACAGTGGCTAAGTCCG	20	3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	62721	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCA	22	3add_iso	1	22:C>A
	mmu-miR-27a-3p	16531	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT	21	fl_iso	1	21:C>T
	mmu-miR-27a-3p	15410	TTCACAGTGGCTAAGTCCGTT	22	3add_iso	2	21:C>T,22:C>
	mmu-miR-27a-3p	10421	TTCACAGTGGCTAAGTCCGA	21	fl_iso	1	21:C>A
	mmu-miR-27a-3p	6631	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCC	22	3add_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	4053	TTCACAGTGGCTAAGTCC	19	3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	3986	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCG	22	3add_iso	1	22:C>G
MEF-AGO2KO-MCMV-IP2	mmu-miR-27a-3p	252606	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT	22	3add_iso	1	22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	140157	TTCACAGTGGCTAAGTCCG	20	3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	131260	TTCACAGTGGCTAAGTCCGC	21	fl_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	72574	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCA	22	3add_iso	1	22:C>A
	mmu-miR-27a-3p	19027	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT	21	fl_iso	1	21:C>T
	mmu-miR-27a-3p	17218	TTCACAGTGGCTAAGTCCGTT	22	3add_iso	2	21:C>T,22:C>
	mmu-miR-27a-3p	14956	TTCACAGTGGCTAAGTCCGA	21	fl_iso	1	21:C>A
	mmu-miR-27a-3p	6811	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCC	22	3add_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	5865	TTCACAGTGGCTAAGTCC	19	3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	4252	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCG	22	3add_iso	1	22:C>G
MEF-AGO2KO-MCMV-IP3	mmu-miR-27a-3p	164084	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT	22	3add_iso	1	22:C>T
	mmu-miR-27a-3p	115673	TTCACAGTGGCTAAGTCCGC	21	fl_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	108636	TTCACAGTGGCTAAGTCCG	20	3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	46915	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCA	22	3add_iso	1	22:C>A
	mmu-miR-27a-3p	14988	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCT	21	fl_iso	1	21:C>T
	mmu-miR-27a-3p	10496	TTCACAGTGGCTAAGTCCGTT	22	3add_iso	2	21:C>T,22:C>
	mmu-miR-27a-3p	10322	TTCACAGTGGCTAAGTCCGA	21	fl_iso	1	21:C>A
	mmu-miR-27a-3p	5517	TTCACAGTGGCTAAGTCC	19	3trim_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	4409	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCC	22	3add_id	0	nothing
	mmu-miR-27a-3p	2786	TTCACAGTGGCTAAGTCCGCG	22	3add_iso	1	22:C>G

2. Détermination de l'interactome d'AGO2 en réponse à l'infection

Nous avons établi qu'AGO2 joue un rôle particulièrement important pour l'établissement de l'infection par le MCMV d'abord pour le chargement des miARN viraux mais aussi parce qu'il est impliqué dans le TDMD de miR-27 même si cette fonction peut certainement être complétée dans les autres AGO. Nous voulons par conséquent étudier l'interactome d'AGO2 pour trouver des nouveaux facteurs importants pour le virus et jouant un rôle au niveau de d'AGO2.

Le but principal de cette expérience est de mettre à jour l'interactome d'AGO2 en condition de culture normale et en condition d'infection par le MCMV. En parallèle, nous avons également utilisé un autre virus, le virus de sindbis (SINV). Pour cela j'ai utilisé une technique d'identification des interactions protéine-protéine (PPI) couplée à de la spectrométrie de masse : le '*proximity labelling*' BioID2. La comparaison statistique des résultats obtenus dans les différentes conditions doit nous permettre de dresser une liste de facteurs candidats

impliqués dans la l'établissement de l'infection du MCMV au niveau de AGO2. Je commencerai par montrer les résultats de la mise au point de cette approche.

2.1. Résultat du BioID (BirA*)

Une première tentative de biotinylation de l'interactome d'AGO2 a été faite en utilisant la technique de BioID grâce à une lignée cellulaire générée préalablement au laboratoire par un précédent doctorant, Dr Semih Cetin. Cette lignée exprime la biotine ligase de *E. coli* BirA* en fusion avec mAGO2 dans des cellules MEF AGO2^{-/-}. Pour cette expérience, les cellules non-infectées (MOCK) ou infectées par le MCMV (MOI = 2) sont traitées avec de la biotine 50 µM pendant 24 h. Puis les cellules sont lysées, les protéines biotinylées sont pêchées par affinité à l'aide de billes streptavidine et le résultat est analysé par spectrométrie de masse.

accession	TOTAL PROTEIN					
	BirA			BirA-MCMV		
	1	2	3	1	2	3
TOTAL PROTEIN	65	67	67	70	65	73
accession	BASIC Spectral Count (#spectra)					
	BirA			BirA-MCMV		
	1	2	3	1	2	3
TOTAL SPECTRA	3690	3761	4198	3599	4080	4502
Streptavidin	1890	1896	1931	1881	1927	1985
PYC_MOUSE	421	412	499	336	417	473
PCCA_MOUSE	330	307	349	311	383	428
MCCA_MOUSE	184	193	206	169	192	228
ACACA_MOUSE	73	62	65	42	70	98
TNR6B_MOUSE	21	17	23	23	38	38
AGO2_MOUSE	8	4	7	9	13	17
P06709 BIRA_ECOLI_SCetin_9002-IBMC	4	5	4	6	5	5
H590B_MOUSE					2	1
H590A_MOUSE					2	1
TNR6C_MOUSE						2

Tableau 6 : Extrait des résultats de spectrométrie de masse obtenue par BioID d'AGO2.

Le Tableau 6 résume les principaux résultats obtenus dans cette expérience. Le nombre total de protéines identifiées est relativement faible (environ 70). De plus, sur environ 4000 spectres obtenus par échantillons, la moitié provient de la streptavidine des billes. De plus, il existe 4 protéines majeures naturellement biotinylées chez la souris et plus généralement chez les mammifères : l'acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha (ACACA), la pyruvate carboxylase (PYC), la méthylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (MCCA) et la propionyl-Coenzyme A carboxylase alpha polypeptide (PCCA) (Bramwell, 1987). Ces quatre protéines sont relativement abondantes et représentent un nombre de spectre significatif (environ 25 % dans chaque échantillon) qui empêche la détection de protéines d'intérêt. Il est donc nécessaire de marquer et pêcher un grand nombre de protéines pour diminuer la part que représente les protéines naturellement biotinylées dans les échantillons. On peut le constater, même le nombre de spectre de BirA*-mAGO2 qui s'étale sur les lignes AGO2 et BIRA_ECOLI ne représente que 9 à 22 spectres alors que cette protéine doit s'autobiotinyle. Et seulement 4 protéines parmi celle bien connues pour interagir avec AGO2 ont pu être identifiées avec un nombre réduit de spectres : TNR6B et C et HSP90B et A.

2.2. Avantage du BioID2

On cherche à obtenir des partenaires de AGO2 plus particulièrement impliqués durant l'infection par le MCMV et notamment ceux qui peuvent l'être dans le recyclage des miARN ou dans le TDMD de miR-27. Dans ce cas, du fait de la durée d'infection qui sera utilisée (24 à 48h), le phénomène que nous voulons étudier ne nécessite pas spécialement d'utiliser une version de biotine ligase particulièrement rapide, et l'utilisation de TurboID / MiniTurbo ne nous aurait donc été d'aucune aide. En outre, l'ajout d'une étiquette sur une protéine n'est jamais anodin et la position de cette étiquette est également cruciale. Ainsi, AGO2 ne semble pas apprécier d'être modifiée par des tags en C-terminal. Il ne paraît pas pertinent de toucher à cette partie qui est formée du domaine PIWI, important pour le recrutement de GW182 grâce à deux tryptophanes et dont le carboxyl terminal est lui-même impliqué dans l'interaction avec le 5' phosphate du miARN chargé (Schirle and MacRae, 2012). La partie N-terminale semble un peu moins sensible, et l'utilisation de constructions d'AGO2 marquées en N-ter (HA ou c-myc) ont été décrites (Riley et al., 2012). Afin de limiter la taille de l'étiquette, j'ai choisi de travailler avec une version plus petite de BirA ligase, BioID2 qui a une masse théorique de 26,4 kDa. Dans le but d'obtenir plus de résultats, j'ai également entrepris d'augmenter la flexibilité de la fusion BioID2-AGO2 en écartant un peu la BirA ligase d'AGO2 tout en lui donnant un rayon d'action plus important. J'ai donc construit une protéine de fusion munie d'un linker constitué de répétitions de glycines et de sérines (13 fois GGGGS) qui a été introduit entre le tag BioID2 et AGO2. Ce linker est constitué uniquement des acides aminés parmi les plus légers et les plus mobiles (Glycine), l'intérêt de la sérine est le permettre à cette longue chaîne de faire des liaisons hydrogènes et d'en augmenter la solubilité (Chen et al., 2013). J'ai donc généré deux lignées stables exprimant ces protéines de fusion.

2.3. Génération des lignées stables

2.3.1. Construction des plasmides

Dans le but d'exprimer les protéines de fusion BioID2-AGO2 dans des cellules MEF, j'ai utilisé les cellules MEF AGO2^{-/-} décrites précédemment dans lesquelles j'ai intégré par transduction lentivirales les séquences des protéines d'intérêt. Nous disposions au laboratoire d'un vecteur lentiviral permettant l'expression de transgènes sous contrôle du promoteur CMV. Étant donné que notre étude porte sur le cytomégalovirus murin, l'utilisation d'un promoteur issu du cytomégalovirus humain ne semblait pas appropriée. En effet, il peut se mettre en place un phénomène de compétition des facteurs utilisés par ce promoteur et les promoteurs du MCMV qui peut entraîner le silencing de la construction sous promoteur CMV. Ce dernier a donc été remplacé dans le vecteur lentiviral par un autre promoteur universel : le promoteur du facteur d'élongation de la traduction eEF-1 α humain. J'ai au final obtenu des vecteurs d'expression de la protéine AGO2 étiquetée en N-ter par une séquence Flag-HA-BioID2 avec ou sans linker et sous contrôle du promoteur eEF-1 α .

Avant de passer à la fabrication des lentivirus et de transduire des lignées de cellules, j'ai vérifié la fonctionnalité des plasmides par transfection transitoire de cellules MEF AGO2^{-/-} (Figure 37). Dans la même expérience, j'ai testé l'effet de l'incubation des cellules avec de la biotine. Les résultats indiquent que les protéines de fusion s'expriment bien à la taille attendue et que l'ajout de biotine dans le milieu de culture n'a pas d'impact sur leur expression.

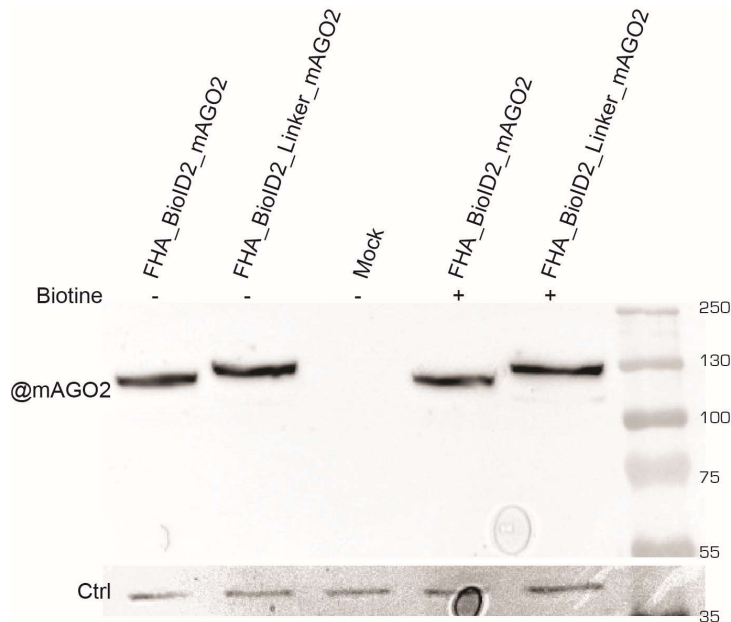


Figure 37 : Analyse par western blot des MEF AGO2^{-/-} transfectées par les plasmides exprimant les protéines de fusion.

Les protéines ont été extraites de MEF_AGO2^{-/-} transfectées par les plasmides d'expression de FHA_BioID2_mAGO2 (128 kDa) FHA_BioID2_Linkers_mAGO2 (132 kDa) ou le vecteur vide (mock) et le western blot a été révélé avec un anticorps monoclonal anti-AGO2. Le contrôle de charge est une bande aspécifique.

2.3.2. Génération de lignées stables

Les plasmides générés précédemment ont ensuite été utilisés pour construire des particules lentivirales qui ont ensuite été utilisées pour infecter des cellules MEF AGO2^{-/-}. Les colonies résistantes à la blasticidine sont celles qui ont potentiellement intégré la séquence d'intérêt. Après mise sous sélection blasticidine des cellules, 44 colonies résistantes ont pu être isolées et caractérisées. 24 colonies concernent la séquence sans linker et 20 colonies concernent la séquence avec linker. La caractérisation de ces lignées qui doit conduire au choix de deux colonies débute par la vérification de l'expression de la protéine d'intérêt par western blot. Par la suite, les lignées exprimant Flag-HA-BioID2-mAGO2 seront appelées B2A et les lignées exprimant Flag-HA-BioID2-Linkers-mAGO2 seront appelées B2A-L.

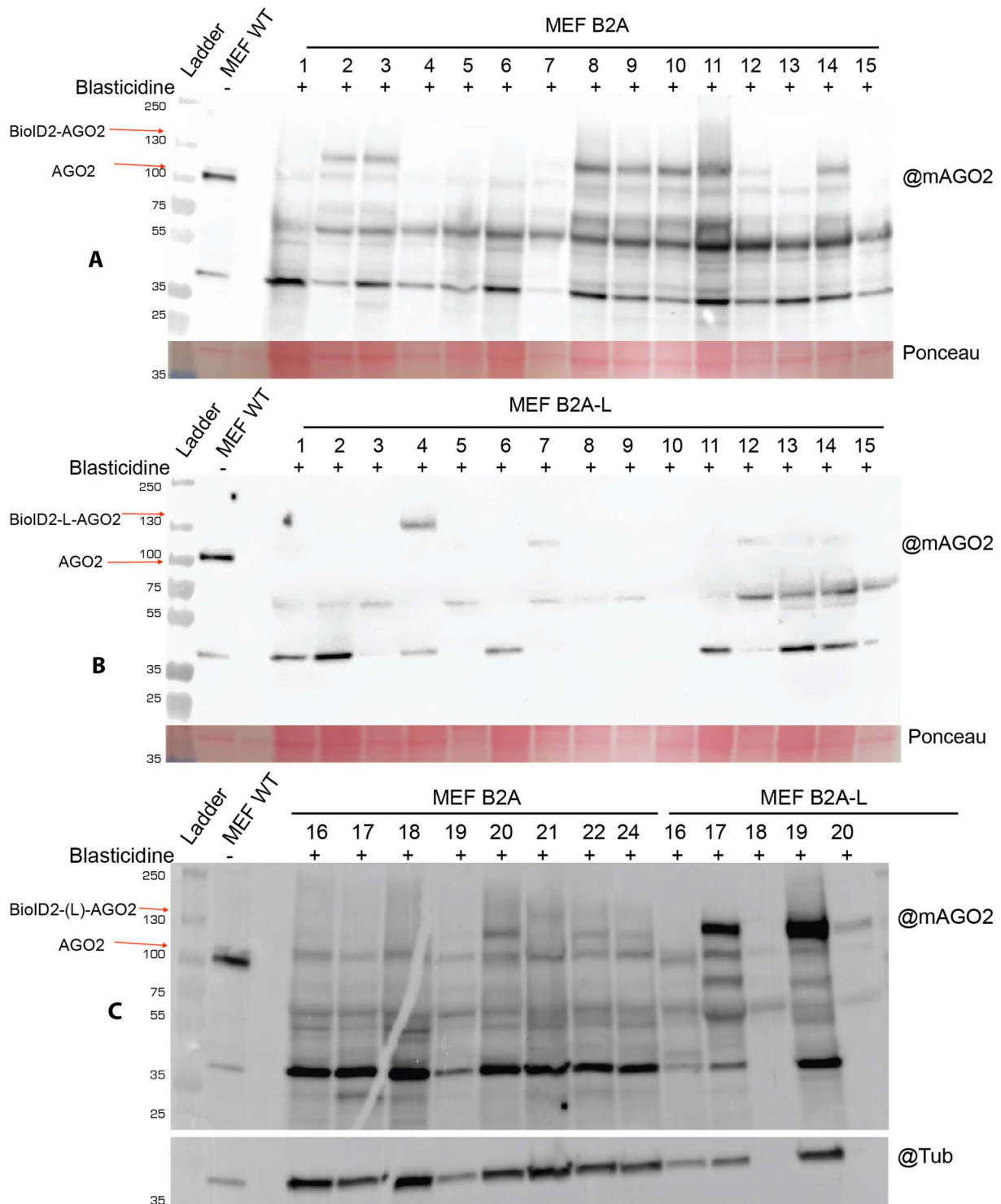


Figure 38 : Analyse par western blot anti-mAGO2 des échantillons extraits des colonies résistantes à la blasticidine.

Le ponceau sert de contrôle de charge pour les blots A et B et la tubuline pour le Blot C. MEF WT sert de contrôle positif. Blot A : colonies B2A, Blot B : colonies B2A-L et Blot C : colonies B2A et B2A-L. Les flèches rouges signalent AGO2 endogène à 100 kDa et BioID2-AGO2 à environ 130 kDa.

La protéine de fusion est exprimée dans les colonies MEF-B2A n° 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 20, 23 et 24 et la protéine de fusion avec linker est exprimées par les colonies MEF-B2A-L n° 4, 17 et 19.

2.4. Caractérisation des lignées

2.4.1. Caractérisation du TDMD de miR-27 dans les lignées B2A et B2A-L

Pour caractériser les nouvelles lignées créées, nous avons testé la fonctionnalité des protéines AGO2 en fusion. D'abord en mettant en évidence la qualité du TDMD puis en utilisant un rapporteur basé sur la luciférase. J'ai estimé la fonctionnalité des nouvelles lignées ainsi que la lignée parentale et les MEF WT vis à vis de l'induction du TDMD par infection du MCMV et en révélant miR-27 par northern blot.

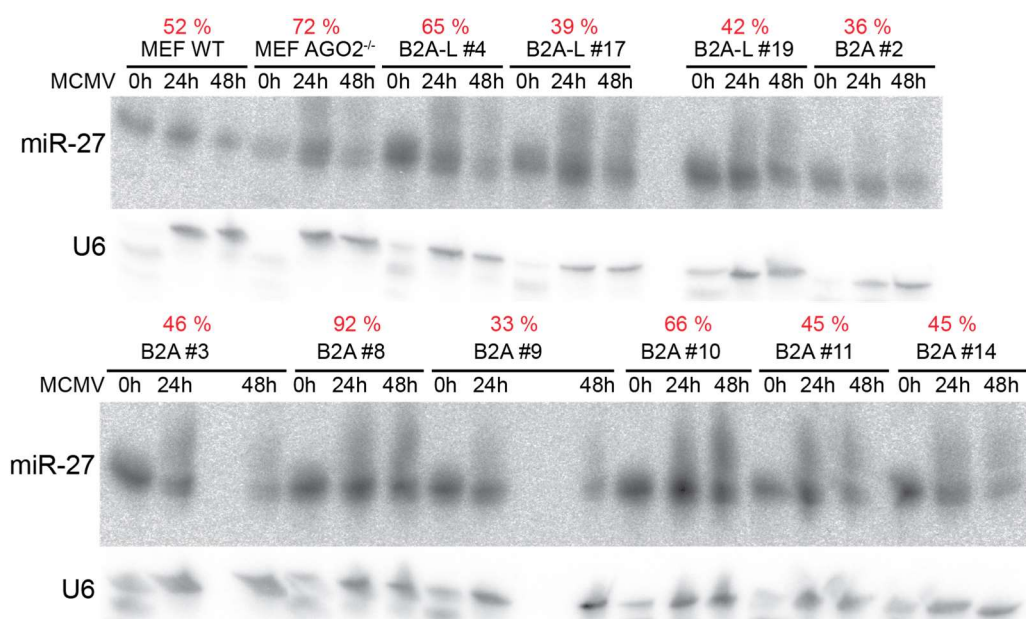


Figure 39 : Analyse par northern blot de l'abondance de miR-27 dans les lignées B2A et B2A-L.

Les lignées pré-sélectionnées B2A et B2A-L ont été infectées par MCMV et les cultures stoppées 0, 24 ou 48 hpi. Le pourcentage indiqué en rouge représente la fraction de miR-27 détectée à 48 hpi par rapport à 24 hpi, après normalisation par le signal U6.

L'analyse du northern blot (figure 39) confirme les résultats décrits dans la première partie, à savoir une différence dans l'induction du TDMD de miR-27 entre les cellules MEF WT et les MEF AGO2^{-/-}. En effet, on observe une baisse du niveau de miR-27 plus forte dans les MEF WT que dans les MEF AGO2^{-/-} (respectivement 52 % et 72 % entre 24 et 48 hpi). Le même calcul montre de grandes différences entre les lignées stables générées (entre 33 % et 92 %) sans doute en fonction de la quantité de protéine AGO2 en fusion produite au sein de chaque lignée ce qui dépend en partie du locus d'insertion de la séquence d'ADN au sein du génome des cellules. D'autre part il faut noter que la complémentation de la fonction d'AGO2 doit être imparfaite si on regarde le profil de miR-27 dans les nouvelles lignées qui montrent plus de formes longues à 24 et 48 hpi que dans les MEF WT.

Parmi les lignées à disposition, les clones B2A #2 et B2A-L #19 sont ceux qui semblent être les plus proches des MEF WT. Je ferai donc mes expériences suivantes avec ces deux clones que je nommerai simplement B2A et B2A-L pour faciliter la lecture.

2.4.2. Fonctionnalité d'AGO2 dans B2A et B2AL

La capacité des 2 lignées choisies à faire du RNAi est mesurée à l'aide d'un rapporteur luciférase Renilla (R-LUC) dont l'extrémité 3'UTR du transcrit contient trois séquences parfaitement complémentaires au miR-27a endogène. On sait que dans les cellules AGO2^{-/-} la capacité à réprimer un ARN messenger est plus faible et peut être mesurée à l'aide d'un tel rapporteur. Nous voulons vérifier que les nouvelles lignées sélectionnées B2A et B2A-L permettent de compléter la fonction de AGO2 endogène. La luciférase Firefly (F-LUC), sans site pour un miARN sert de contrôle de transfection. Le rapport R-LUC / F-LUC mesuré est normalisé par le même rapport dans les cellules correspondantes où est exprimé R-LUC sans séquences cibles de miARN (Figure 40).

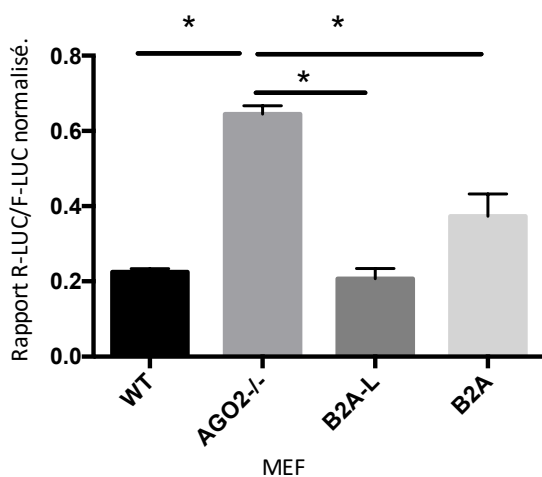


Figure 40 : Mesure de la répression en place dans les MEF.

Mesure de l'activité de la Renilla et de la Firefly luciférase dans des cellules transfectées par le rapporteur avec 3 séquences complémentaires de miR-27a. Le même rapport dans des cellules transfectées par le rapporteur « vide » sert de normalisateur. * $p < 0,01$ (ANOVA).

La répression de l'expression de la Renilla est significativement plus faible dans la lignée MEF AGO2^{-/-} que dans les MEF WT. Les lignées B2A et B2A-L sélectionnées semblent compléter cette fonction, avec une meilleure efficacité pour B2A-L. Nous avons donc utilisé ces lignées pour établir l'interactome d'AGO2 en condition d'infection par MCMV.

2.5. Résultats de l'interactome d'AGO2 par BioID2

Nous avons choisi B2A et B2A-L pour identifier les partenaires de AGO2 par spectrométrie de masse. La présence d'une protéine dans les 2 lignées apporterait du poids à cette identification. Cependant, le linker présent dans B2A-L rend les protéines de fusion différentes et il est possible que l'on identifie des partenaires différents pour les deux protéines. Lors de cette expérience, nous avons inclus une condition où les cellules étaient infectées par le SINV

de la famille des Togaviridae et de la sous-famille des alphavirus. Ce virus est un virus à ARN simple brin positif qui ne produit pas de miARN. La condition SINV nous servira donc à la fois de contrôle pour les résultats obtenus avec MCMV et nous permettra d'identifier des interactants potentiels d'AGO2 en réponse à l'infection par un virus à ARN.

2.5.1. Validation des chromatographies d'affinité avec la streptavidine

Les cellules non infectées ou infectées par le MCMV (MOI = 5) ou le SINV (MOI = 0,001) ont été récoltées et lysées ; avec une MOI de 5 pour le MCMV on se place dans la situation où le TDMD de miR-27 a été très actif sans que miR-27 ne soit complètement dégradé au bout de 24 h et une MOI de 0,001 pour SINV permet de conserver les cellules vivantes mais néanmoins proches de 100 % d'infection après 24 h d'infection. Chaque lysat pour chacune des pêches (chaque triplicat) est traité séparément. Nous voulons vérifier que le pull-down des protéines biotinylées a bien été effectué, pour cela, nous avons vérifié la présence de la protéine de fusion qui doit s'autobiotinyle dans l'éluat de pêche par western blot avec un anticorps anti-AGO2 et nous avons aussi recherché la présence des protéines biotinylées en général en utilisant une construction commerciale Streptavidin-HRP (Figure 41).

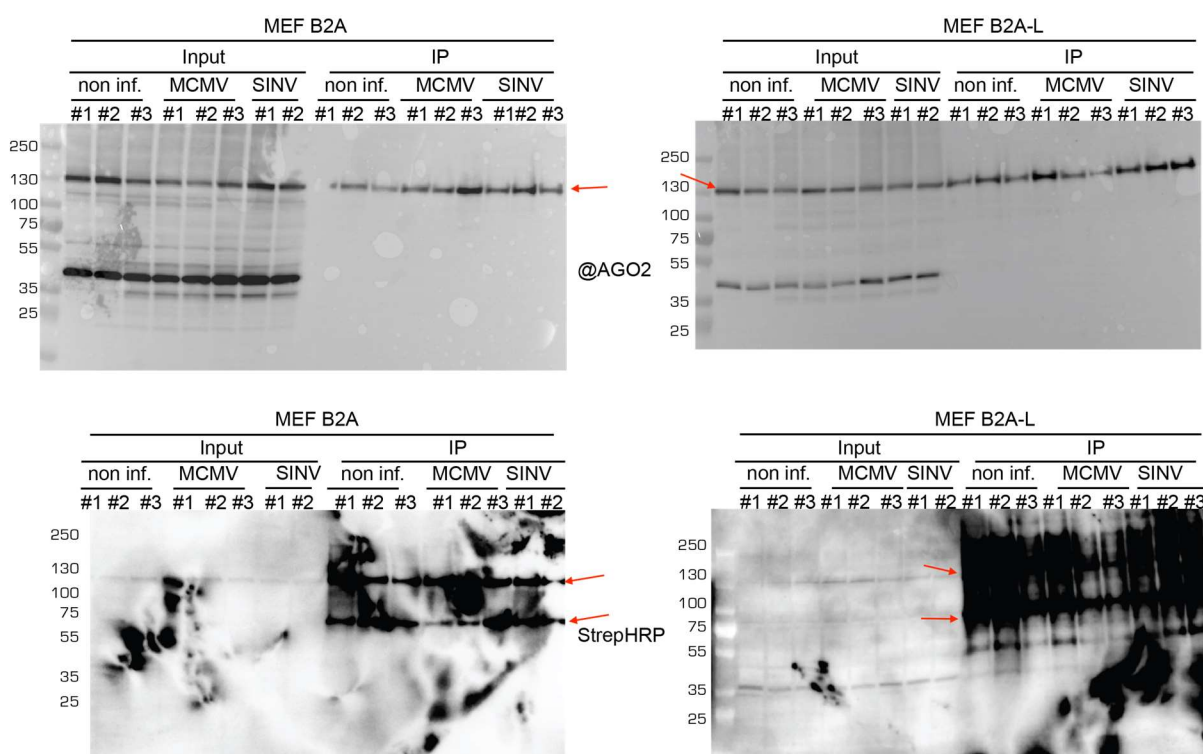


Figure 41 : Analyse par western blot des échantillons qui seront utilisés pour l'analyse MS.

Les échantillons mock (non inf.), infectés par le MCMV ou infectés par SINV ont été analysés par. Panneaux du haut : mise en évidence de mAGO2 dans les B2A (à gauche) et B2A-L (à droite), la flèche indique la protéine de fusion à environ 130 kDa. Panneaux du bas : mise en évidence par Strep_HRP des protéines biotinylées dans B2A et B2A-L : les flèches montrent les principales protéines naturellement biotinylées au nombre de quatre mais visibles sur deux bandes.

On constate que toutes les pêches avec billes de streptavidine contiennent la protéine de fusion avec AGO2 qui est donc bien autobiotinylée et efficacement pêchée par les billes streptavidine. La mise en évidence de toutes les protéines biotinylées montre de multiples bandes de protéines avec notamment les deux bandes principales qui correspondent aux quatre protéines naturellement biotinylées. Sur le western blot streptavidine-HRP de B2A-L on distingue un plus grand nombre de bandes qui démontrent la présence d'une multitude de protéines biotinylées dans les échantillons. C'est le résultat attendu qui confirme que la pêche a fonctionné et que les échantillons peuvent être envoyés en spectrométrie de masse.

2.5.2. Validation des résultats de spectrométrie de masse

2.5.2.1. Nombre de spectre et protéines naturellement biotinylées

Le nombre de spectres totaux identifiés est donné dans le tableau 7. Entre 15000 et 18500 spectres ont été attribués pour chaque échantillon ce qui est quatre fois plus élevé que ce qui avait été obtenu avec la construction BirA*. La streptavidine qui provient des billes ayant servies à la chromatographie d'affinité ne représente qu'environ 500 spectres ce qui est moins élevé que pour l'expérience BirA* et laisse une marge confortable pour identifier des protéines biotinylées interagissant avec AGO2.

		BASIC Spectral Count (#spectra)																	
		MEF B2A									MEF B2A-L								
		MOCK			MCMV			SINV			MOCK			MCMV			SINV		
accession		1	2	3	7	8	9	13	14	15	4	5	6	10	11	12	16	17	18
Total basic spectral count		17134	17653	16883	17865	14885	17205	15949	17565	8703	18585	18339	17966	17906	18331	16864	13373	18506	18099
P22629 SAV_STRAV_Streptavidin		576	535	565	611	554	621	253	526	95	512	513	236	310	662	520	38	583	348
		Number of Protein Identified																	
		MEF B2A									MEF B2A-L								
		MOCK			MCMV			SINV			MOCK			MCMV			SINV		
accession		1	2	3	7	8	9	13	14	15	4	5	6	10	11	12	16	17	18
Total number of proteins identified by Mascot		608	647	692	590	646	563	615	616	264	862	847	775	739	895	915	507	854	827

Tableau 7 : Nombre de spectres totaux identifiés et nombre de spectres dus à la présence de streptavidine introduite par les billes.

Effectivement, le rendement de la spectrométrie de masse est intéressant puisque plusieurs centaines de protéines sont retrouvées dans chaque échantillon (entre 600 et 900 protéines). Seuls 2 échantillons sont différents des autres : l'un des triplicatas des cellules B2A et l'un des cellules B2A-L infectés par SINV qui portent les n° 15 et n° 16 (Tableau 6). Ces 2 échantillons ont été signalés par la plate-forme de protéomique car produisant un signal qui peut être attribué à la présence d'un polymère ce qui se produit lorsqu'il subsiste du détergent dans l'échantillon. Les résultats des échantillons contaminés ne seront pas pris en compte pour l'analyse statistique des résultats mais continueront d'apparaître dans les tableaux de résultats.

Le nombre de spectres dû aux protéines naturellement biotinylées peut également être un facteur limitant de cette technique. Le tableau 8 reprend les résultats pour ces quatre

protéines : ACACA, PYC, MCCA et PCCA. Au total, le nombre de spectre de ces protéines représente entre 15 et 25 % des spectres à l'intérieur d'un échantillon.

accession	BASIC Spectral Count (#spectra)																	
	MEF B2A									MEF B2A-L								
	MOCK			MCMV			SINV			MOCK			MCMV			SINV		
	1	2	3	7	8	9	13	14	15	4	5	6	10	11	12	16	17	18
ACACA_MOUSE	225	246	213	156	172	169	208	289	72	182	167	187	209	198	227	109	278	262
PYC_MOUSE	1561	1690	1605	1755	1360	1853	1028	1426	409	1023	1164	1194	1290	1437	964	561	1362	1263
MCCA_MOUSE	735	801	719	672	569	676	468	602	177	694	765	597	489	677	491	214	656	612
PCCA_MOUSE	1557	1522	1384	1251	1048	1249	810	1023	264	1117	1433	654	619	991	723	284	886	719

Tableau 8 : compte des spectres des protéines biotinylées endogènes.

2.5.2.2. Co-facteurs d'AGO2

Un certain nombre de protéine du complexe d'AGO2 ou interagissant avec AGO2 sont connues (Tableau 9). Nous avons ainsi pu retrouver les principaux partenaires d'AGO2 connus : TNRC6_{A/B/C} (Lian et al., 2009b) qui sont important pour la mise en place de la répression post-transcriptionnelle des ARN messagers. HSP90 (HS90_{A/B}) et HSC70 (HSP7C) (Iwasaki et al., 2010) sont des protéines chaperonnes et co-chaperonnes importantes pour le chargement des argonautes. De même PABP joue un rôle pour induire la dégradation de la cible (Zekri et al., 2009). GGYF2 a été identifié comme étant un régulateur de la répression de la traduction (Schopp et al., 2017). EDC4 et PATL1 sont des co-facteurs qui favorisent le décappage (Jonas and Izaurralde, 2013). PUM2 pourrait réguler la cible de la voie des miARN (Galgano et al., 2008). RENT1 (UPF1) est un régulateur à la baisse de la voie des miARN (Jin et al., 2009). IF2B1 (CRD-BP) est capable de protéger certains ARN de l'action de RISC (Elcheva et al., 2009). FXR1 est impliqué dans l'augmentation de la traduction en lien avec les éléments riches en AU (Vasudevan and Steitz, 2007). Dicer se trouve à proximité d'AGO2 au moment du chargement de RISC (Kobayashi and Tomari, 2016).

L'identification de toutes ces protéines avec un grand nombre de spectres et surtout l'attribution de centaines de spectres pour les co-facteurs TNRC6 confirment la validité des pêches.

accession	BASIC Spectral Count (#spectra)																	
	MEF B2A									MEF B2A-L								
	MOCK			MCMV			SINV			MOCK			MCMV			SINV		
	1	2	3	7	8	9	13	14	15	4	5	6	10	11	12	16	17	18
TNRC6A_MOUSE	557	735	514	422	310	407	753	482	458	409	414	566	491	377	315	430	328	475
TNRC6B_MOUSE	742	935	645	448	362	483	893	541	510	856	962	1307	1036	722	496	780	712	912
TNRC6C_MOUSE	363	422	302	315	242	293	360	297	166	521	546	612	550	498	389	330	471	573
HS90A_MOUSE	14	21	18	11	13	12	10	16	10	43	51	66	51	45	40	51	44	51
HS90B_MOUSE	39	47	38	28	34	28	21	37	16	103	109	132	101	101	97	77	100	103
HSP7C_MOUSE	26	23	23	24	28	21	13	21	1	40	29	28	49	43	63	9	44	44
PABP1_MOUSE	26	18	19	15	20	14	4	15		23	20	8	15	18	34	4	19	14
GGYF2_MOUSE	104	101	109	66	81	73	80	96	58	130	130	135	118	92	114	76	112	140
EDC4_MOUSE	34	24	29	28	32	23	12	27	4	39	38	13	20	21	35	10	41	26
PATL1_MOUSE		3		3	7	3	2	6	3				1	3	2			1
PUM2_MOUSE	31	26	23	22	26	18	23	20	22	31	26	27	23	17	28	58	21	31
RENT1_MOUSE	38	36	37	23	34	22	20	27		43	45	29	19	32	48	13	38	33
IF2B1_MOUSE	6	11	13	15	17	11	12	7	3	11	11	13	21	17	20	23	17	16
FXR1_MOUSE		1	1	3	2	1	3	1		3	4	4	3	3	7	1	3	6
DICER_MOUSE										2	2	1	3	2	4	1	4	5

Tableau 9 : Nombre de spectres par échantillons des protéines connues pour être des co-facteurs de AGO2.

De la même manière, un certain nombre de protéines liées au complexe CCR4-NOT ont été identifiées (Tableau 10) avec dans certains cas plus de 100 spectres. Ce complexe est impliqué dans la déadenylation des ARN messagers et la répression de la traduction.

accession	BASIC Spectral Count (#spectra)																	
	MEF B2A									MEF B2A-L								
	MOCK			MCMV			SINV			MOCK			MCMV			SINV		
	1	2	3	7	8	9	13	14	15	4	5	6	10	11	12	16	17	18
CNOT1_MOUSE	63	63	66	177	134	151	114	118	57	61	55	29	39	54	58	69	76	62
CNOT2_MOUSE	46	51	52	53	62	68	121	69	79	49	55	45	64	65	71	121	69	80
CNOT3_MOUSE	13	15	11	12	11	14	11	11		18	23	15	13	11	13	4	16	16
CNOT4_MOUSE	8	4	8	4	6	3	2	6	1	7	8	2	2	2	4	2	6	3
CNOT8_MOUSE	8	6	10	8	10	8	8	9		6	6	4	4	9	5		7	6
CNO11_MOUSE	2	1	4	3	1		1	1		3	2	2	3	1	4		2	4

Tableau 10 : Nombre de spectres des protéines liées au complexe CCR4-NOT.

On retrouve également des protéines liées à l'ARN de type DEAD-box hélicase (DDX6 et DDX17) (Tableau 11). Ainsi que des protéines liées à la dégradation de l'ARN messager (DCP1A) voire à la dégradation des miARN (XRN1). Un grand nombre de spectre de AGO1 sont identifiés ce qui confirme une proximité de AGO1 avec AGO2 soit au niveau subcellulaire ou même directement sur la même cible.

accession	BASIC Spectral Count (#spectra)																	
	MEF B2A									MEF B2A-L								
	MOCK			MCMV			SINV			MOCK			MCMV			SINV		
	1	2	3	7	8	9	13	14	15	4	5	6	10	11	12	16	17	18
DDX6_MOUSE	8	8	9	8	6	7	9	8	3	7	6	6	6	10	12	5	9	12
DDX17_MOUSE	1	5	3	6	9	7	5	1		4	2	1	6	6	6		3	5
XRN1_MOUSE		6	4	14	13	12	3	15		7	4	3	5	11	10		16	6
DCP1A_MOUSE	1	3	2	2	5	2	2	1	2	5	6	4	7	4	5	3	4	7
AGO1_MOUSE	28	25	34	48	33	52	54	51	19	48	38	140	143	72	42	57	53	136

Tableau 11 : Nombre de spectres d'autre protéines jouant un rôle au niveau de l'ARN.

2.5.3. Comparaison de B2A avec B2A-L

Le but est de comparer les interactomes obtenus par spectrométrie de masse entre les différentes conditions. La présence de triplicat pour chaque condition nous permet de faire une étude statistique qui met en évidence les différences significatives entre les différentes conditions mais qui est évidemment plus fiable lorsque l'on compare des triplicats.

Avant de comparer les quantités de spectres obtenus de chaque protéine, il faut s'assurer que les pêches que l'on veut comparer ont donnés des résultats homogènes. Pour cela il faut que le nombre de spectre identifiés dans chaque échantillon soit le moins possible différent des autres mais également que la distribution du nombre de spectre soit semblable entre les différents échantillons. L'analyse en composante principale des éléments qui composent l'échantillon permet de calculer l'éloignement des échantillons les uns par rapport aux autres et de vérifier que les échantillons d'une même condition sont plus proches les uns des autres que ceux des autres conditions.

2.5.4. Comparaison de B2A avec B2A-L

L'objectif ici est de comparer l'interactome d'AGO2 dans les deux lignées non-infectées et de déterminer si des différences notables sont mises en évidence. En effet, la présence du linker peut augmenter le rayon d'action de la BirA ligase et contribuer ainsi à ce que les protéines biotinylées ne soient pas strictement identiques pour les deux constructions. Avant de comparer les quantités de spectres obtenus pour chaque protéine, il faut s'assurer que les pêches que l'on veut comparer ont donné des résultats homogènes. Pour cela il faut que le nombre de spectres identifiés dans chaque échantillon soit le moins différent possible des autres (Figure 42 panneau du haut). L'idéal est que la distribution du nombre de spectre soit semblable entre les différents échantillons, ce qui est le cas pour notre analyse comme on peut le voir dans les deux panneaux suivants de la Figure 42 : les boîtes à moustaches et les courbes de densité. L'analyse en composante principale des éléments qui composent l'échantillon permet de calculer l'éloignement des échantillons les uns par rapport aux autres et de vérifier que les échantillons d'une même condition sont plus proches entre eux qu'avec les autres conditions. Une autre représentation de cette proximité est donnée dans le panneau du bas grâce au classement hiérarchique.

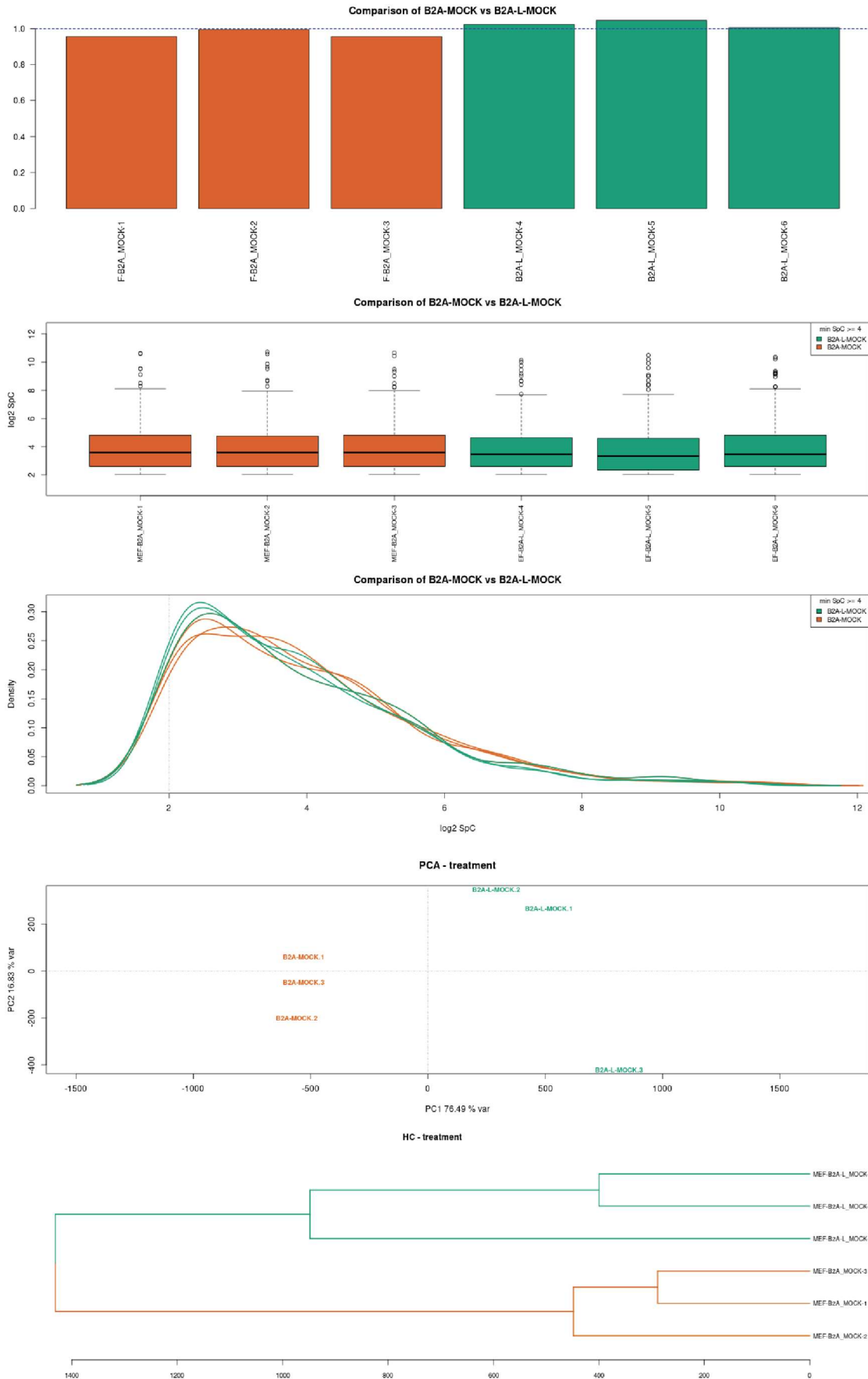


Figure 42 : Analyse descriptive des lignées B2A et B2A-L (MOCK).

De haut en bas. Panneau 1 : nombre de spectres totaux par échantillon par rapport à la médiane. Panneau 2 : Les boîtes à moustaches montrent la distribution des spectres en log2 pour un nombre de spectre supérieur à 4. Panneau 3 : Superposition des densités des échantillons. Panneau 4 : Analyse en composante principale des échantillons. Panneau 5 : Classement hiérarchique qui montre comment les échantillons sont liés entre eux.

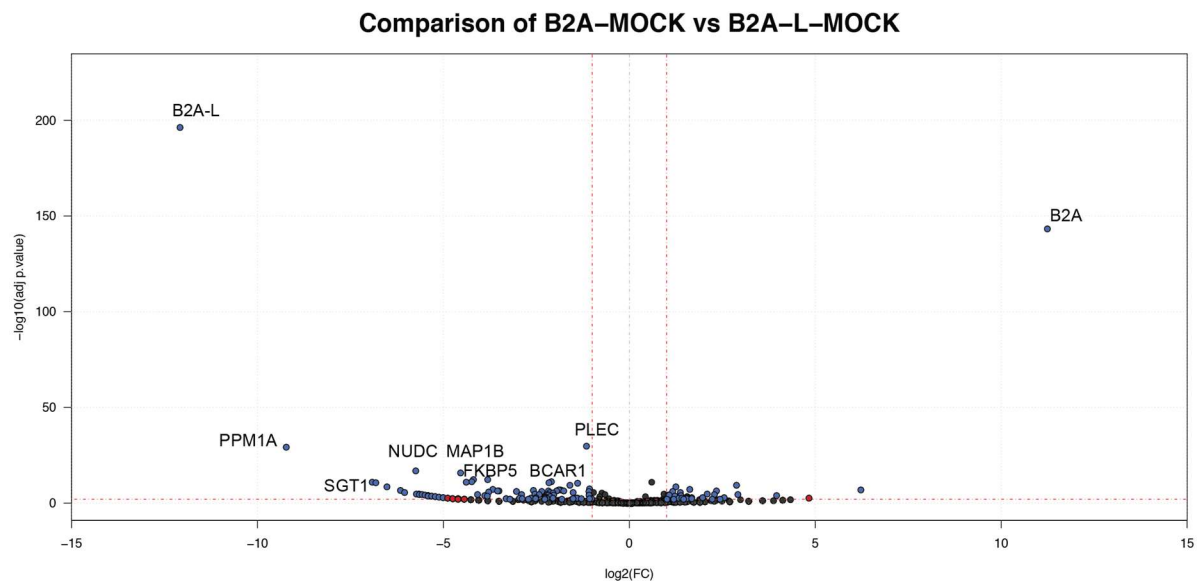


Figure 43 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A et B2A-L.

On peut constater que les protéines les plus différemment identifiées sont évidemment les protéines de fusion B2A et B2A-L (Figure 43). On remarque par ailleurs, et comme c'était attendu, qu'il y a plus de protéines représentées du côté de B2A-L que du côté B2A puisque le linker est là pour donner un rayon d'action plus grand à BioID2. Parmi ces protéines plus enrichies avec la construction B2A-L on retrouve NUDC qui est connue pour son implication dans de multiple voies (cycle cellulaire, division cellulaire, repliement de protéines, processus développementaux...) (Fu et al., 2016). On observe également un enrichissement pour plusieurs protéines qui ont un rôle de co-chaperonnes ou qui ont été associées à la fonction de HSP90 : FKBP5 est une protéine qui sert de chaperonne et est capable d'interagir avec HSP90 (Hähle et al., 2019; Zgajnar et al., 2019), MAP1B est une protéine associée aux microtubules et à HSP90 (Wu et al., 2019), SGT1 est une co-chaperonne de HSP90 (Mayor et al., 2007). On connaît l'importance de HSP90 et co-chaperonnes pour la stabilité d'AGO2 avant son chargement (Nakanishi, 2016), il n'est donc pas surprenant d'identifier ces protéines. Enfin PPM1A est une phosphatase métal-dépendante qui est capable de réguler la phosphorylation de plusieurs protéines kinases (Li et al., 2013) et pourquoi pas directement AGO2 qui est également la cible de phosphorylations (Bridge et al., 2017). On peut enfin noter que Dicer est spécifiquement retrouvé avec B2A-L (Tableau 9), mais que le nombre de spectres est trop faible pour que la différence soit considérée comme significative. La liste complète des protéines enrichies de manière significative dans l'IP B2A-L par rapport à l'IP B2A est disponible en Annexe 2.

2.5.5. Impact de l'infection sur l'interactome d'AGO2

Le but est de comparer les interactomes obtenus par spectrométrie de masse dans les différentes conditions infectées ou non. Les triplicats obtenus pour chaque condition nous permettent de faire une étude statistique qui met en évidence les différences significatives. Cependant, pour les échantillons infectés par SINV la fiabilité des comparaisons statistiques sera remise en cause de par la mauvaise qualité des données pour un réplicat obtenu avec chaque lignée.

2.5.5.1. Différence B2A mock avec B2A infecté MCMV

L'analyse descriptive des échantillons des échantillons comparés est représentée Figure 44. Les échantillons sont comparables en taille (nombre de spectres panneau de haut) et la densité d'échantillons en nombre de spectres est proche (courbes panneau du milieu). Enfin l'analyse en composante principale et le classement hiérarchique montrent que les échantillons d'une même condition sont bien regroupés entre eux.

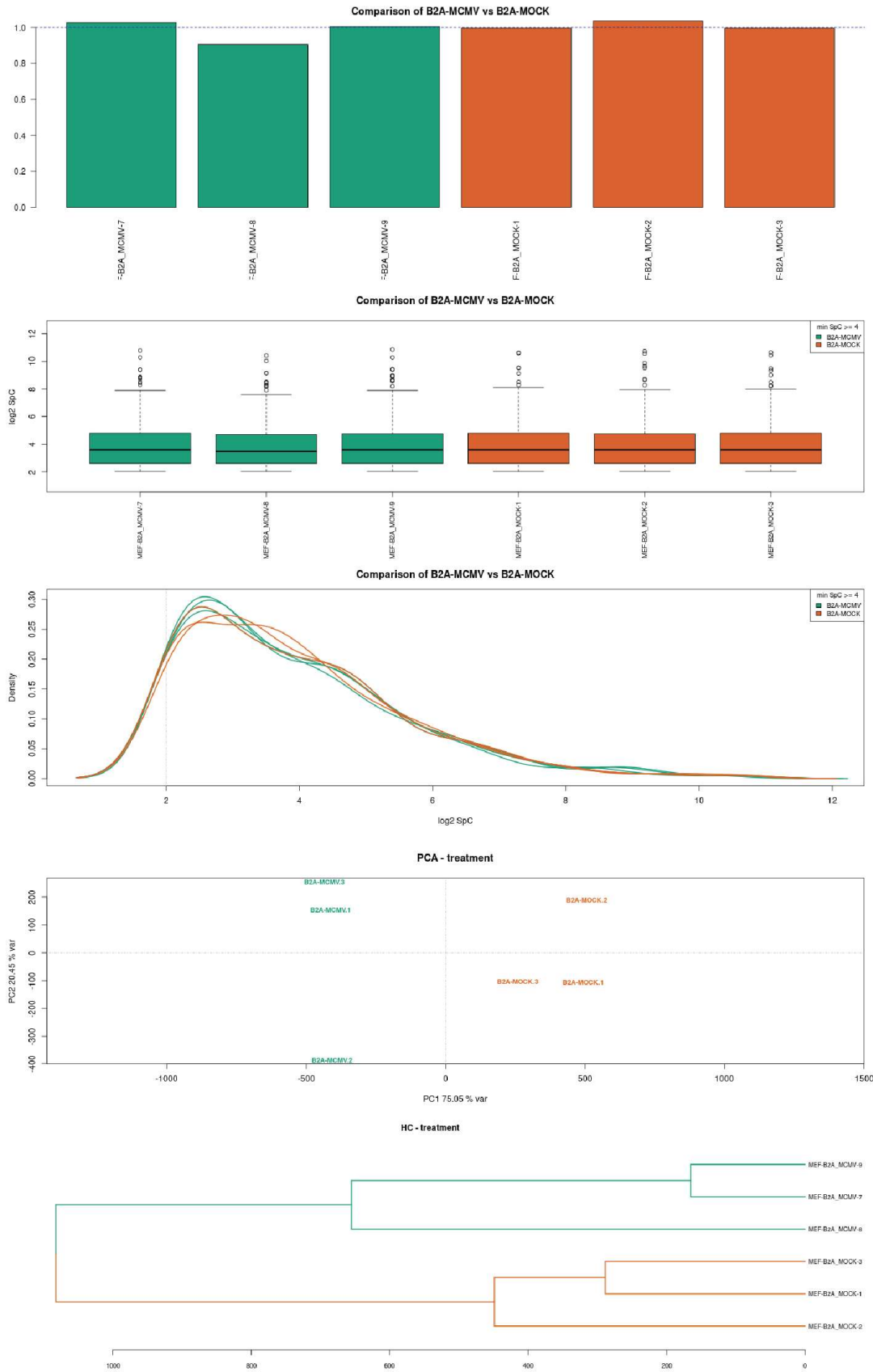


Figure 44 : Analyse descriptive de la comparaison entre les échantillons MOCK et MCMV avec B2A.

De haut en bas. Panneau 1 : nombre de spectres totaux par échantillons par rapport à la médiane. Les échantillons sont de taille comparable. Panneau 2 : Les boîtes à moustaches montrent la distribution des spectres en log2 pour un nombre de spectre supérieur à 4. Panneau 3 : Superposition des densités des échantillons. Les courbes superposées indiquent que les échantillons sont structurés de la même manière. Panneau 4 : Analyse en composante principale des échantillons. Panneau 5 : Classement hiérarchique qui montre le lien des échantillons entre eux.

L'analyse des protéines s'accumulant différemment entre conditions (Figure 45) révèle quelques protéines qui sont significativement plus présentes dans les échantillons MOCK : RCC2 qui est liée à l'apoptose (Wu et al., 2018), FINC est encore une protéine qui est capable d'interagir avec HSP90 (Armstrong et al., 2018) et TB182 est une protéine impliqué dans la réparation de l'ADN (Zou et al., 2015). Parmi les protéines enrichies durant l'infection on trouve également un membre de CCR4-NOT : CNOT1. Il existe 3 protéines plus biotinylées dans B2A-MCMV : LUC7L, LC7L2 et LC7L3 dont on ne connaît pas grand-chose à la fonction biologique mais par homologie elles ont été associées à l'épissage. RSRC1 est également un facteur lié à l'épissage (Perez et al., 2018). Les protéines Dead Box sont également significativement impactées par MCMV : DDX46 qui inhibe l'immunité innée (Zheng et al., 2017), DDX3X codée sur le chromosome X qui joue un rôle dans la gestion du stress lié à l'infection virale en régulant l'inflammasome (Samir et al., 2019) et DDX3Y son équivalent codé sur le chromosome Y. WASC5 qui a été associée à des maladies génétiques (Jahic et al., 2014) et liée à l'endolysosome (Song et al., 2018). BICC1 est une protéine qui a un profil intéressant puisqu'elle contient trois domaines KH, est capable de promouvoir la répression de PKi par miR-27a (Piazzon et al., 2012) et chez *C. elegans* on a montré son interaction avec TUT2 et TUT3 (Schmid et al., 2009). DCLK1 est une protéine kinase et ACON une isocitrate aconitase (mitochondriale). La liste des protéines que l'on retrouve différemment enrichies de manière significative entre les échantillons B2A-MOCK et B2A-MCMV est disponible en annexe 3.

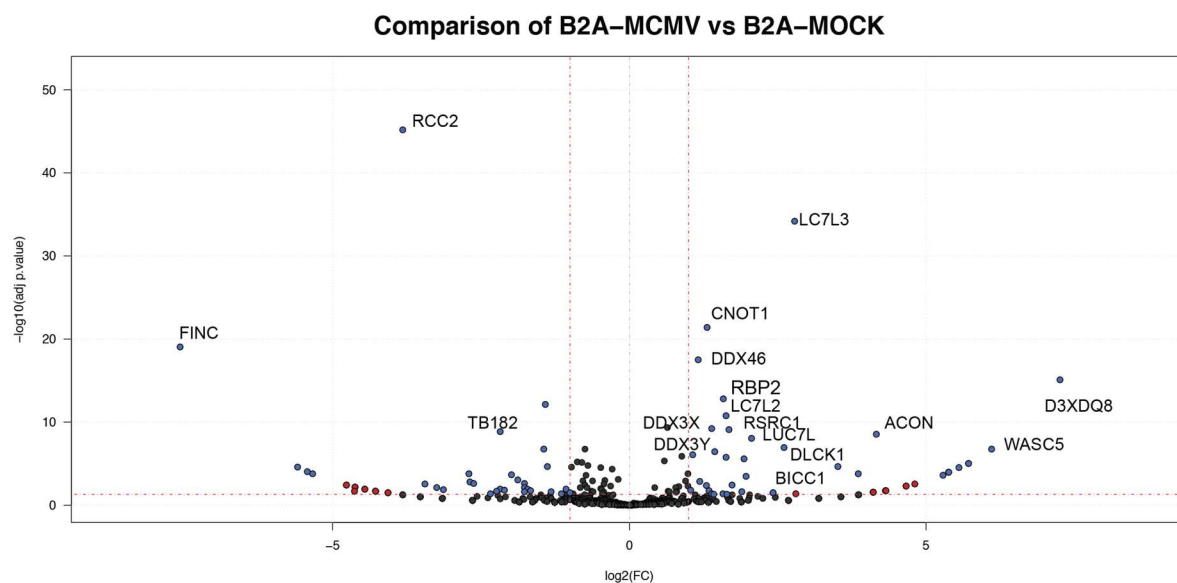


Figure 45 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A-MOCK ET B2A-MCMV.

2.5.5.2. Différence entre B2A-L MOCK et infecté par MCMV

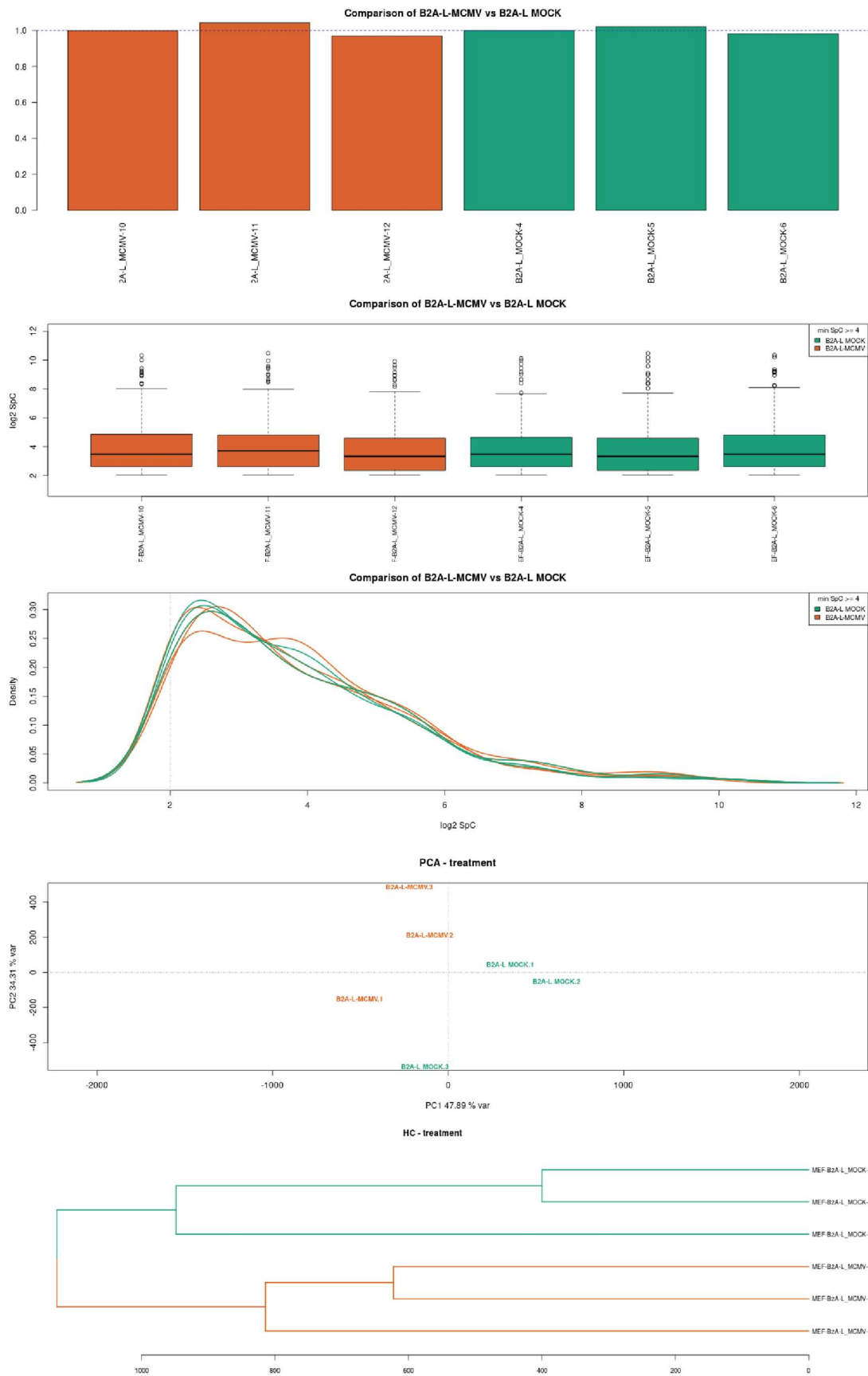


Figure 46 : Analyse descriptive des échantillons MOCK et MCMV dans B2A-L.

De haut en bas. Panneau 1 : nombre de spectres totaux par échantillons par rapport à la médiane. Les échantillons sont de taille comparable. Panneau 2 : Les boîtes à moustaches montrent la distribution des spectres en log2 pour un nombre de spectre supérieur à 4. Panneau 3 : Superposition des densités des échantillons. Les courbes superposées indiquent que les échantillons sont structurés de la même manière. Panneau 4 : Analyse en composante principale des échantillons. Panneau 5 : Classement hiérarchique qui montre le lien des échantillons entre eux.

L'analyse descriptive des échantillons comparé dans B2A-L-MOCK et B2A-L-MCMV est visualisable sur la Figure 46. On peut y voir que le nombre de spectre est comparable entre échantillons (panneau du haut), la densité des protéines par nombre de spectres suit des courbes semblables (panneau du milieu) et les réplicats d'un échantillon sont groupés entre eux dans le classement hiérarchique (panneau du bas).

L'analyse des protéines spécifiquement enrichies entre conditions (Figure 47) montre que TCP4 (aussi appelée SUB1) fait partie des protéines plus souvent biotinylées dans les conditions sans infection, il s'agit d'un facteur de transcription associé à l'ARN polymérase II de l'initiation à la terminaison (Calvo, 2018) et cette protéine a déjà été trouvée dans les B2A. De même ZRAB2 (aussi appelée ZNF265) est un facteur d'épissage qui régule l'épissage de SRS10 et TRA2B (Li et al., 2008; Ji et al., 2014). SRS10 et TRA2B quant à elles sont plus biotinylées dans la condition infectée par MCMV. SRS10 est liée à l'épissage pendant certains stress (Shkreta et al., 2016) et agit avec TRA2B pour promouvoir la prolifération cellulaire (Ji et al., 2014). Bien sûr des protéines virales D3XDT5 et D3XDQ8 sont identifiées dans la condition infectée. On identifie également plusieurs facteurs qui avaient déjà été identifiés avec la lignée B2A : LUC7L, LC7L2, LC7L3, FFX3X, DDX3Y, DDX46, RSRC1, BICC1 et RBP2 qui est une histone déméthylase (Tu et al., 2008). La liste des protéines que l'on retrouve différemment dans B2A-L-MOCK et B2A-L-MCMV est disponible en annexe 4.

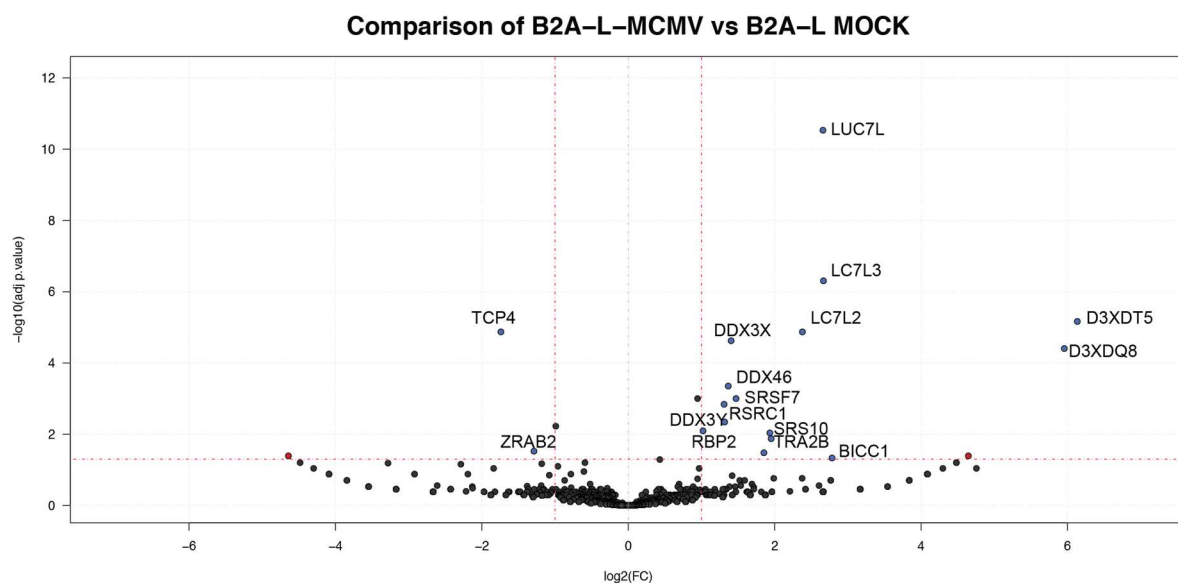


Figure 47 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A-L-MOCK ET B2A-L-MCMV.

2.5.5.3. Comparaison B2A MOCK et SINV

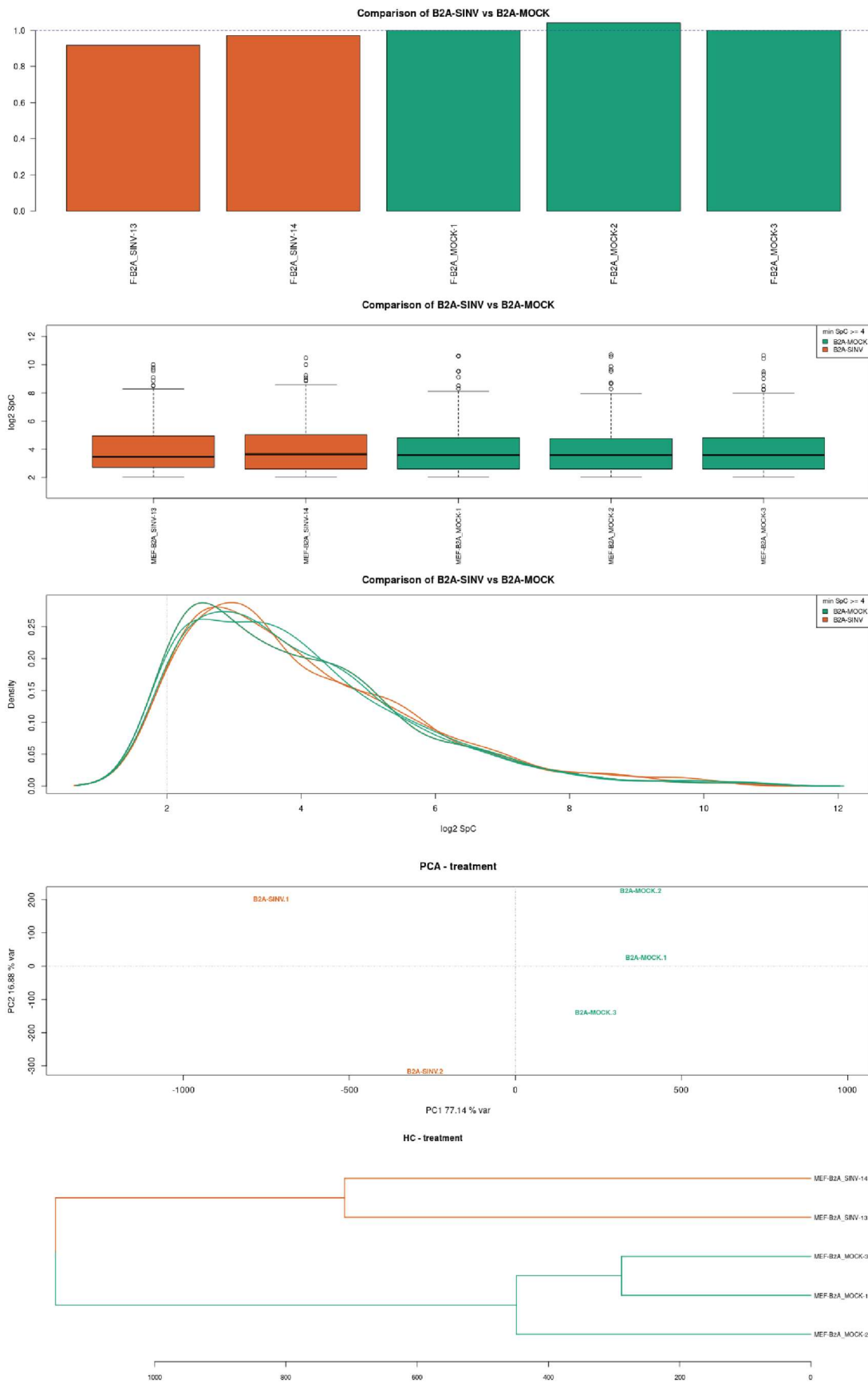


Figure 48 : Analyse descriptive des échantillons MOCK et SINV dans B2A.

Outre l'interactome d'AGO2 en lui-même, l'étude de l'interactome d'AGO2 en infection de SINV peut nous servir de contrôle pour l'infection par un virus à ARN qui ne possède pas de microARN. Cette comparaison ne s'est pas faite dans les mêmes conditions statistiques que celles qui concernent MCMV puisqu'un échantillon de B2A-SINV a dû être ignoré.

L'analyse descriptive des échantillons comparé dans B2A-MOCK et B2A-SINV est visualisable sur la Figure 48. On peut y voir que le nombre de spectre est comparable entre échantillons (panneau du haut), la densité des protéines par nombre de spectres suit des courbes semblables (panneau du milieu) et les échantillons du triplicat et du duplicat sont groupés entre eux dans le classement hiérarchique (panneau du bas).

On peut voir sur la Figure 49 que l'on retrouve quelques protéines plus souvent biotinylées dans la condition MOCK qui avaient déjà été mises en évidence avec le virus MCMV dans les mêmes lignées : FINC et TCOF, cette dernière interagit dans le noyau avec l'ARN polymérase I et joue un rôle de méthyltransférase (Gonzales et al., 2005). Parmi les protéines plus présentes dans les échantillons MOCK : CO1A1 est une protéine du collagène, UBA1 est une protéine impliquée dans l'ubiquitination et qui marque donc les protéines pour dégradation (Yang et al., 2012) et RNPS1 est impliquée dans l'épissage (Deka and Singh, 2019). Du côté des protéines plus représentées dans les échantillons infectés on retrouve des protéines déjà identifiées dans les comparaisons avec le MCMV : LUC7L, LC7L2, LC7L3, DDX46, DDX3Y (non-indiqué sur le volcano plot), SRSF7, RSRC1 et DCLK1. Apparaissent également les protéines virales qui confirment a minima que les cellules sont bien infectées : E1, E2, nsp3 et capsid. PKP4 est une plakophiline (protéine des jonctions membranaires), LUZP1 est une protéine dont le déficit affecte la mise en place du tube neural chez l'embryon (Hsu et al., 2008), ROA2 (aussi appelée HNRNPA2B1) migre dans le noyau où elle est capable de guider une activité antivirale dirigée contre des virus à ADN (*Herpesvirus*) en agissant sur l'épissage (Humphries and Fitzgerald, 2019), ROA1 (hnRNPA1) est une autre protéine impliquée dans l'épissage, et enfin, U2AF1 elle aussi impliquée dans l'épissage (Loerch and Kielkopf, 2016). La liste des protéines que l'on retrouve différemment dans B2A-MOCK et B2A-SINV est disponible en annexe 5.

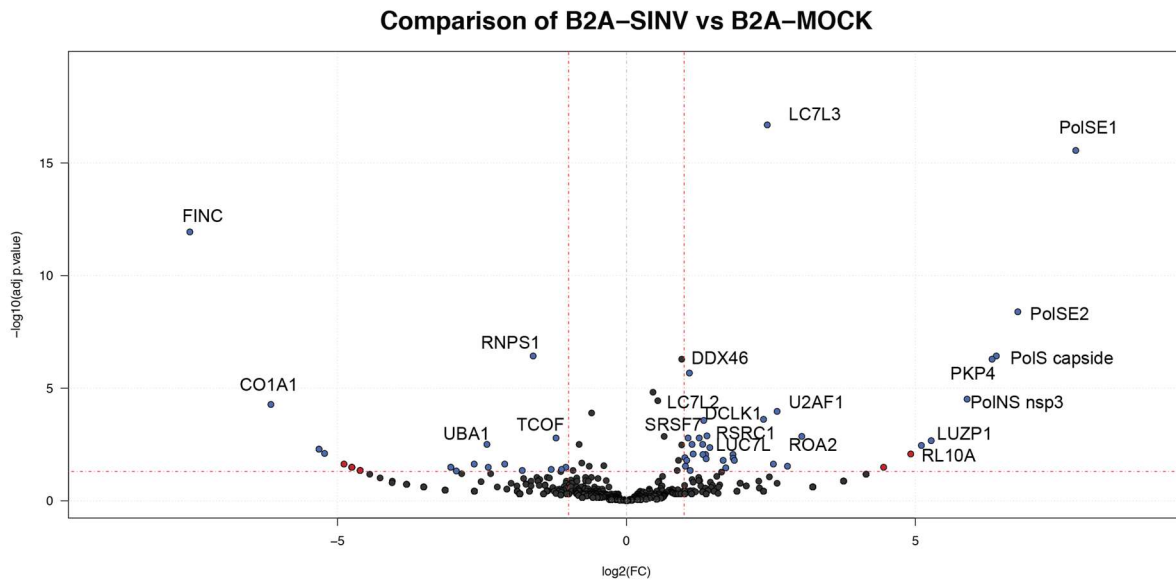


Figure 49 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A-MOCK ET B2A-SINV.

2.5.5.4. Comparaison B2A-L MOCK et SINV

L'analyse descriptive des données obtenues à partir des échantillons B2A-L-MOCK et B2A-L-SINV sont visualisables sur la figure 50. On peut y voir que le nombre de spectre est comparable entre échantillons (panneau du haut), la densité des protéines par nombre de spectres suit des courbes semblables (panneau du milieu) et les échantillons du triplicat et du duplicat sont groupés entre eux dans le classement hiérarchique (panneau du bas).

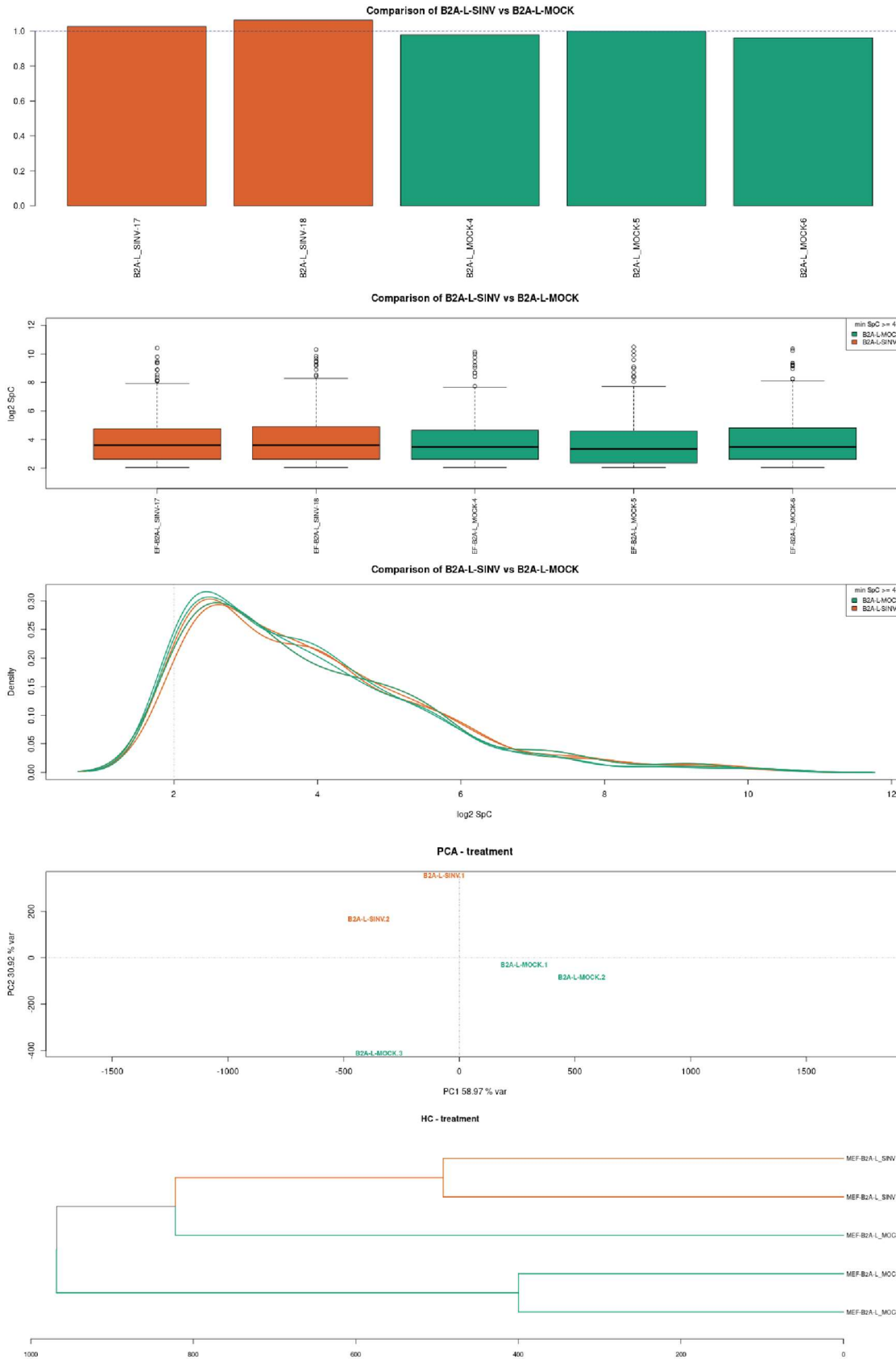


Figure 50 : Analyse descriptive des échantillons MOCK et SINV dans B2A-L.

De haut en bas. Panneau 1 : nombre de spectres totaux par échantillons par rapport à la médiane. Panneau 2 : Les boîtes à moustaches montrent la distribution des spectres pour un nombre de spectre supérieur à 4. Panneau 3 : superposition des

densités des échantillons. Panneau 4 : Analyse en composante principale des échantillons. Panneau 5 : Classement hiérarchique des échantillons.

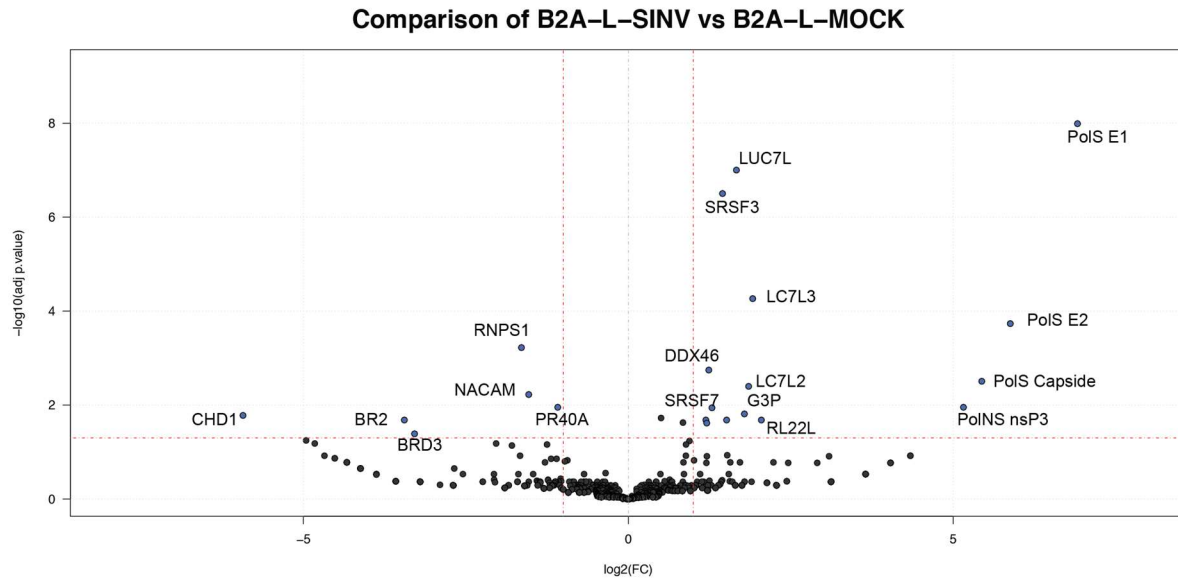


Figure 51 : Volcano plot de la comparaison des interactomes d'AGO2 dans B2A-L-MOCK et B2A-L-SINV.

Parmi les protéines plus biotinylées dans les échantillons infectés nous retrouvons (Figure 51) : les protéines virales E1, E2, nsP3 et capside ; des protéines que nous avons systématiquement retrouvées enrichies dans tous les échantillons infectés : LUC7L, LC7L2, LC7L3 et DDX46 ainsi que des protéines déjà mises en évidence dans la lignée B2A-L en condition infectée : RL22L et SRSF7 avec en plus cette fois-ci une protéine de la même famille SRSF3 (Liu et al., 2012). Nous pouvons également voir apparaître G3P (GADPH : Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase) qui est une protéine multifonction associée à l'autophagie, l'apoptose et est capable de lier des ARN riche en AU (White and Garcin, 2017). Du côté des protéines que l'on pêche moins après infection par SINV nous retrouvons RNPS1 et nous trouvons CHD1 qui est une protéine hélicase capable de remodeler la chromatine chez les eukaryotes (Persson and Ekwall, 2010), BRD2 et BRD3 (bromodomain containing) qui sont aussi liées au remodelage de la chromatine et à la régulation de la transcription en ciblant des lysine acétylées au niveau des histones (Taniguchi, 2016), NACAM est un facteur de transcription (Akhouayri et al., 2005) et enfin PR40A a été identifié in vitro comme un facteur de transcription (Díaz Casas et al., 2017). La liste des protéines que l'on retrouve différemment dans B2A-L-MOCK et B2A-L-SINV est disponible en annexe 6.

2.5.6. Bilan des données récoltées

Le recouplement des listes obtenues entre elles permet de faire ressortir des protéines candidates plus intéressantes (Figure 52). Les listes complètes des différentes catégories du diagramme de Venn est disponible en annexe 7.

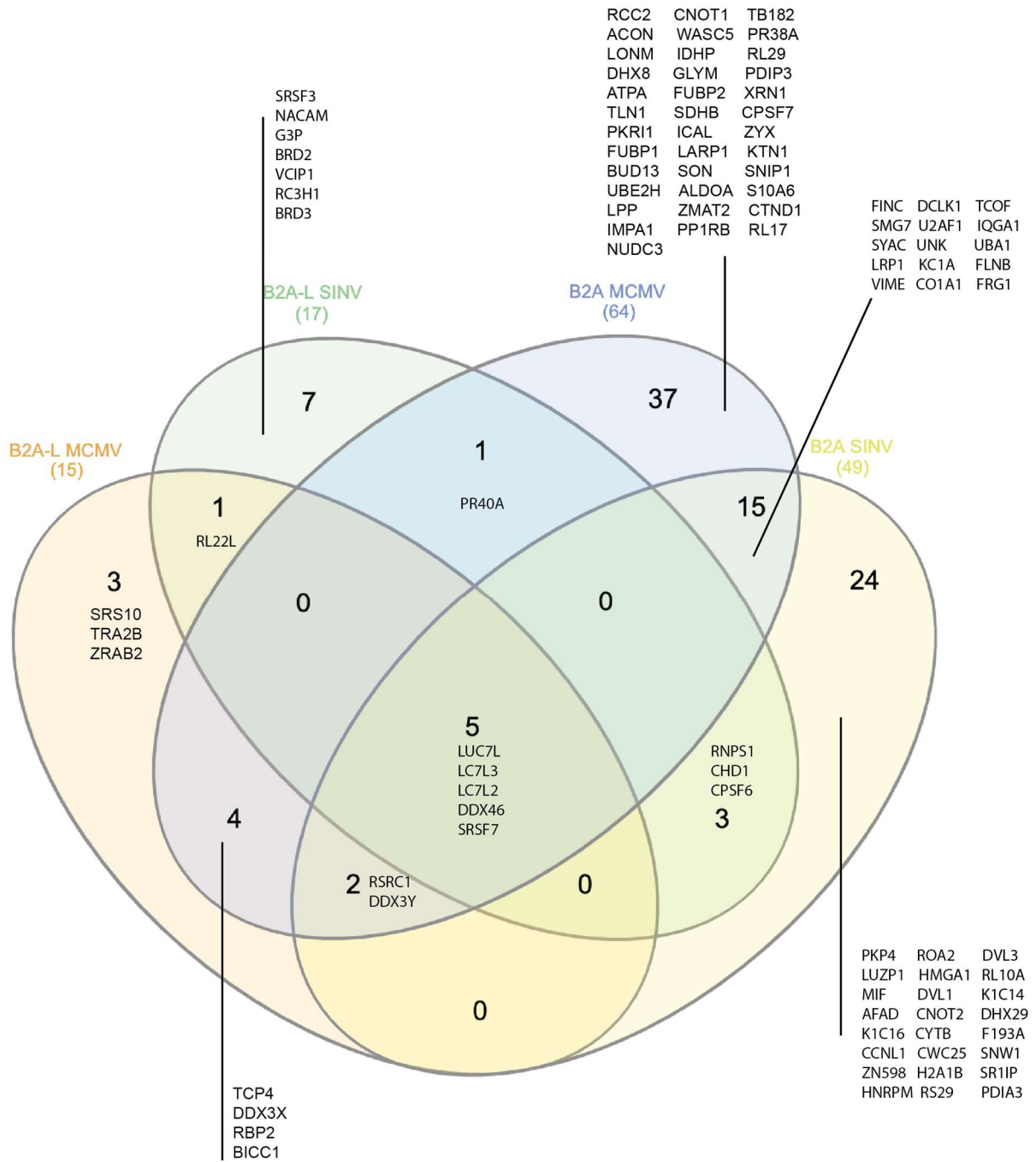


Figure 52 : Diagramme de Venn des listes de protéines mises en évidence dans les conditions infectées par rapport aux conditions MOCK pour B2A et B2A-L et pour MCMV et SINV.

Tout d'abord il y a 5 protéines qui sont enrichies dans tous les cas avec les 2 infections : LUC7L, LC7L2, LC7L3 DDX46 et SRSF7. En dehors de ces protéines une seule se retrouve dans un champ qui ne partage ni infection ni lignée : PR40A (B2A-L-SINV, B2A-MCMV et seulement deux se retrouvent dans trois listes à la fois : RSRC1 et DDX3Y (B2A-SINV, B2A-MCMV et B2A-L-MCMV). Ces constatations nous suggèrent que ces protéomes d'AGO2 sont fiables car dans le même temps : 16 protéines mises en évidences dépendent de la lignée (B2A-L (1) et B2A

(15)) et 7 protéines dépendent du virus (MCMV (4) et SINV (3)). De plus 61 protéines n'ont été identifiées une seule fois (B2A-L-MCMV (3), B2A-MCMV (37), B2A-L-SINV (7) et B2A-SINV (24)).

En ce qui concerne la modification de l'interactome de AGO2 pendant l'infection par le MCMV, nous voyons émerger quatre protéines trouvées à la fois dans les lignées B2A et B2A-L: TCP4, DDX3X, RBP2 et BICC1. Le fait que ces protéines soient détectées dans les deux lignées indépendamment donne du crédit à leur mise en évidence. Mais cela ne doit pas conduire à négliger les protéines détectées uniquement dans l'une ou l'autre des lignées car la présence du linker dans la construction B2A-L est capable d'induire la biotinylation de protéines différentes dans un même complexe (Kim et al., 2016a).

A partir de ces 3 listes une partie des protéines doivent être validées et faire l'objet d'une étude pour leur intérêt pour MCMV. Les protéines qui apparaissent dans les conditions infectées par SINV sont moins intéressantes pour le moment puisque nous nous focalisons sur l'interactome pendant l'infection par le MCMV et le risque est qu'elles soient liées à la présence d'une infection sans être spécifiquement liées au MCMV. Mais d'autres études sur le rôle d'AGO2 pendant l'infection par un virus à ARN pourraient être basées sur ces données.

Pour vérifier la validité des protéines identifiées par spectrométrie de masse, une nouvelle chromatographie d'affinité pour la biotine a été faite en cellules B2A-L avec des billes streptavidine dans les mêmes conditions que celles utilisées pour obtenir les données de spectrométrie de masse. Les protéines que l'on voulait tester en priorité sont les quatre qui sont dans la liste commune des conditions infectées par le MCMV puis les trois protéines uniquement observées dans B2A-L-MCMV (SRS10, TRA2B et ZRAB2) et enfin une sélection de la liste de B2A-MCMV. J'ajoute que peu de données sont publiées concernant la fonction des protéines LUC7L, LC7L2 et LC7L3, il aurait été intéressant de mettre en évidence une interaction avec notre protéine d'intérêt. Malheureusement il n'a pas été possible de tester toutes ces protéines pour des problèmes de disponibilité d'anticorps. Notre choix s'est porté sur les protéines pour lesquelles un anticorps commercial était disponible et nous avons tenté de les révéler par une analyse par western blot sur les échantillons décrits ci-dessus. En priorité nous voulions valider les protéines mises en évidence dans les comparaisons MCMV avec MOCK dans les 2 lignées : TCP4, DDX3X RBP2 et BICC1. TCP4 est moins présente en condition d'infection et nous avons donné la priorité aux protéines qui étaient favorisées par l'infection. RBP2 a été testé mais n'a pu être mise en évidence (non-montré), certainement que le poids moléculaire (341 kDa) de cette protéine a posé problème lors du transfert du western blot et une mise au point serait nécessaire si nous voulons la valider. Parmi SRS10, TRA2B et ZRAB2 une seule a été testée par western blot : TRA2B. Parmi les protéines mises en évidence dans la lignée B2A nous avons sélectionné celles dont le qui se distinguaient le plus et dont nous avons la possibilité de tester l'anticorps : WASC5 en priorité mais aussi ATPA, SON, FUBP2 et IDHP.

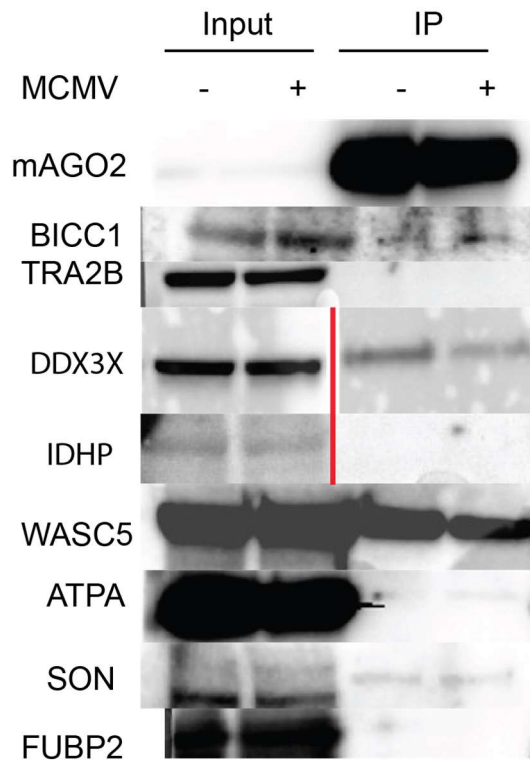


Figure 53 : Western blot des chromatographies d'affinité pour la biotine (validation).

Ces protéines ont été mises en évidence sur plusieurs blot différents.

AGO2 est efficacement pêchée par les billes streptavidine, BICC1 DDX3X et surtout WASC5 ont été révélées. Dans une moindre mesure ATPA et SON ont également été révélées. Par contre TRA2B IDHP et FUBP2 ne sont pas du tout visibles.

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériel biologique et son maintien

1.1. Lignées cellulaires et leur maintien

Les cellules MEF sont des fibroblastes de souris qui dérivent de l'embryon. La lignée mutée MEF AGO2^{-/-} a été obtenue à partir d'un nouvel embryon de souris muté au niveau d'AGO2 (Diederichs and Haber, 2007). Les cellules M210B4 (ATCC CRL-1972) sont des fibroblastes issus de la moelle osseuse de souris et ont été utilisées pour produire le virus MCMV uniquement. Les cellules sont cultivées en milieu DMEM Glutamax de Gibco (Dulbecco's modified Eagle's medium) complété par 10 % (v/v) de sérum de bovin fœtal (Panbiotech) sans addition d'antibiotique à 37 °C dans une atmosphère humide avec 5 % de CO₂. Seules les lignées transformées stables sont maintenues avec de la blasticidine (10 µg.ml⁻¹) dans le milieu de culture. Les cellules sont diluées deux fois par semaine pour réensemencer de nouvelles flasques de culture. Pour cela les cellules sont décrochées par de la Trypsin-EDTA 0,25 % (Gibco).

1.2. Virus

Le MCMV wt et le mutant (m168) dérivent de la souche C3X Smith Strain dont le numéro d'accession est NC_004065 (Smith Strain). Le virus est produit dans les cellules M210B4 en récoltant le surnageant de culture après 8 à 9 jours d'infection, au moment où les cellules commencent à se lyser. Le titre du virus est déterminé par un test de plages de lyse avec des cellules MEF wt infectées avec ce surnageant sans étape de centrifugation.

Le virus SINV utilisé dérive de la souche TE12 modifié pour exprimer GFP (Lustig and Strauss', 1988).

1.3. Bactéries et clonage

Pour cloner les plasmides pDEST contenant la séquence cccb, des bactéries commerciales dérivant de *Escherichia coli* TOP10 : One Shot cccb Survival 2 T1 (Invitrogen) ont été utilisées (F⁻mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG fhuA::IS2).

Le clonage des plasmides d'expression Lenti6 pEXPR a été fait dans des bactéries *Escherichia coli* STBL3 (F⁻mcrB mrrhsdS20(r_B⁻, m_B⁻) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^R) xyl-5 λ⁻leumtl-1) qui sont recommandées pour permettre le clonage des séquences de Lentivirus.

Les autres clonages ont été fait avec des bactéries *Escherichia coli* DH5 α (F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ ⁻).

2. Détection d'ARN

2.1. Extraction d'ARN

L'ARN est extrait en utilisant le Trizol Reagent (Ambion) suivant le protocole du fabricant à une exception près : la précipitation de l'ARN est effectuée en ajoutant 3 vol d'éthanol 100 %, 0,1 vol d'acétate de sodium 4 M et 2 μ l de Glycogène (Glycoblu) à -80 °C plus de 3 h. La quantification de l'ARN est faite avec un spectrophotomètre Nanodrop2000 à la densité optique de 260 nm.

2.2. Northern blot

Chaque échantillon est préparé avec quantité d'ARN total identique (en général entre 3 et 20 μ g). Ils sont dilués par un volume équivalent de tampon de charge (urée 8 M et 50 mM EDTA avec du bleu de bromophénol et du xylène cyanol). Les petits ARN sont résolus sur un gel de 17,5 % d'acrylamide (TBE 1 X, 8 M urée sur un gel de 20 cm de long). Le transfert des ARN est fait sur une membrane Hybond-NX (GE Healthcare) dans un tampon 0,5 X TBE. Les petits ARN sont ensuite fixés par cross-linking chimique avec de l'EDC (1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Sigma Aldrich) pendant 1 h 30 min à 65 °C. Les membranes sont pré-hybridées pendant 1 h dans le PerfectHyb Plus (Sigma) à 50 °C. Les sondes sont marquées avec du phosphate radioactif en utilisant la T4 Polynucléotide Kinase (T4 PNK, Fermentas) avec 25 μ Ci de γ -³²P-dATP suivit d'une étape de purification par chromatographie d'exclusion en utilisant une colonne Illustra MicroSpin G-25 (GE Healthcare). Les sondes sont hybridées sur la nuit à 50 °C dans le tampon PerfectHyb. Les membranes sont lavées 2 fois 10 min à 50 °C avec le tampon : 5 X SSC ; 0,1 % SDS. Enfin les membranes sont exposées avec des plaques de phosphorimager (fujifilm BAS-MS 2040) qui sont scannées avec un Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

Cible	Nature	Séquence
miR-16	LNA	CGCC+AAATATT+TACGTG+CTGCTA
miR-23a	DNA	GGAAATCCCTGGCAATGTGAT
miR-27	LNA	GCG+GAACTTA+GCC+ACTGTG+AA
miR-M01.1	DNA	AGAGGAGAAUAACGUCGAACGG
miR-M01.2	DNA	TCGAAGGAAACCGTGTCGAACG
miR-M55.1	DNA	ACGGCTAGCACGCCGATCACCA
U6	DNA	GCAGGGGCCATGCTAATCTTCTCTGTATCG

Tableau 12 : Liste des sondes.

3. Détection de protéines

3.1. Préparation des échantillons

Dans le cas des chromatographies d'affinités réalisées les protéines peuvent être utilisées directement en prenant un échantillon de lysat ou d'éluat. Dans toutes les autres expériences les protéines sont extraites en utilisant du tampon RIPA (150 mM NaCl, 0,1 % TritonX-100, 0,5 % deoxycholate de sodium ; 0,1 % SDS ; 50 mM Tris HCl pH = 8). Les échantillons préparés pour une analyses par western blot sont mélangés avec du Laemmli 2 X (4 % SDS, 20 % glycerol, 120 mM Tris HCl pH = 6,8 et bleu de bromophénol) puis chauffés à 95 °C pendant 5 min.

3.2. Western blot

Les échantillons sont chargés sur gel SDS-PAGE et les protéines sont résolues par migration à travers ce gel. Après la migration les protéines sont transférées sur membrane Polyvinylidene difluoride (PVDF, GE Healthcare). La qualité du transfert est vérifiée par une coloration de rouge ponceau (0,1 % rouge de Ponceau, 5 % acide acétique). Les membranes sont bloquées dans une solution de 1 X PBS ; 0,2 % Tween-20 ; 5 % lait pendant 1 h. Les anticorps primaires et les secondaires couplés à la peroxydase de radis (HRP) sont incubés dans une solution 1 X PBS ; 0, % Tween-20 ; 1 % lait pendant une nuit à 4 °C ou 1 h à température ambiante. Les membranes sont lavées trois fois avec une solution de 1 X PBS, 0,2 % Tween-20 et enfin trois fois avec 1 X PBS. Les protéines sont ensuite révélées en ajoutant du luminol (Supersignal West Femto, Thermo Fischer) et les membranes sont analysées avec un appareil fusionFX (Vilber Smart Imaging).

Cible	Dilution	hôte	Fournisseur
mAGO2	50	Rat	Gunter Meister (Sérum)
ATPA	200	Souris	Santa Cruz sc 136178
BICC1	200	Souris	Santa Cruz sc 514846
DDX3X	200	Souris	Santa Cruz sc 365768
FUBP2 (FBP2)	200	Souris	Santa Cruz sc 293476
IDHP	200	Souris	Santa Cruz sc 373816
SON (NREBP)	200	Souris	Santa Cruz sc 398508
TRA2-beta	200	Souris	Santa Cruz sc 166829
Tubuline	10000	Souris	Sigma T6557
WASC5	200	Souris	Santa Cruz sc 514850
Anti-souris	10000	Mouton	Amersham NXA931
Anti-rat	10000	Chèvre	Amersham NA935

Tableau 13 : Liste des anticorps.

4. Clonage, plasmides, transfection

4.1. Clonage Gibson

Le clonage de nouveaux plasmides Gateway pDEST permettant placer Flag-HA-BioID2 avec et sans linker sous promoteur EF-1 alpha humain (EEF1A1) en amont d'une séquence d'intérêt a été fait par clonage Gibson à l'aide du kit Gibson Assembly cloning Kit (New England Biolabs) en suivant le protocole du fabricant. Dans ces plasmides dits vides les séquences d'intérêts sont remplacées par la séquence ccdB flanquée des sites de recombinaison du système Gateway att-R. Les différentes séquences à rassembler pour la ligation Gibson (quatre pour le plasmide sans linker et cinq pour le plasmide avec linker) ont été amplifiées par PCR en utilisant la Phusion High Fidelity DNA polymérase (Thermo Scientific) et en utilisant les amorces adéquates.

4.2. Gateway

Le clonage Gateway est une technologie basée sur la recombinaison séquence-spécifique du bactériophage Lambda. La séquence à cloner est amplifiée par PCR avec des amorces flanquées des sites att-B. La séquence obtenue est introduite par recombinaison spécifique dans un plasmide contenant des sites att-P (pDONR) grâce à une réaction catalysée par la BP Clonase (Invitrogen) pour obtenir un plasmide d'entrée (pENTR) qui contient des sites de recombinaison att-L. Une réaction de recombinaison spécifique entre le plasmide d'entrée att-L et le plasmide de destination (att-R) catalysée par le LR Clonase (Invitrogen) est encore nécessaire pour obtenir le vecteur final d'expression (pEXPR) qui contient des sites att-B à nouveau.

4.3. Plasmide psi-CHECK-2

Le plasmide psi-CHECK-2 (Promega) est un plasmide qui permet d'exprimer deux luciférases : la Renilla et la Firefly. Ce vecteur permet de cloner des sites en 3' UTR de leurs séquences. Le clonage de sites ciblés par des microARN permet de mesurer l'activité de répression mise en place dans des cellules et la deuxième luciférase permet de normaliser pour s'affranchir de différences dues à la transfection. Ce plasmide a été utilisé pour cloner trois sites complémentaires à miR-27a après la Renilla.

4.4. Transfection

Les cellules sont transfectées avec la Lipofectamine2000 (Thermo Fischer) suivant le protocole du fabricant.

5. Fabrication des Lentivirus

5.1. Production de Lentivirus

Les Lentivirus qui permettent de fabriquer les cellules stables sont générés avec les plasmides d'expression Lenti6 fabriqués par Gateway (pLenti6-FHA-BioID2-mAGO2 (10 µg) ou pLenti6-FHA-BioID2-Linker-mAGO2 (10 µg)). Ces plasmides sont utilisés par co-transfection avec trois plasmides helper nécessaires dans ce système : pVSV-G (2,5 µg), pMDLg/pRRE (5 µg) et pRSV-Rev (2,5 µg). Les quantités de plasmide indiquées sont celles nécessaires pour une transfecter des cellules platées dans une boîte de Petri de 10 cm de diamètre en culture. Après 48 h, le surnageant est récolté et concentré dans 1 ml grâce à Lenti-X Concentrator (TakaraBio) en suivant le protocole du fabricant.

5.2. Transduction des Lentivirus

Les cellules MEF à 90 % de confluence sont infectées par les Lentivirus à raison de 100 µl de Lentivirus concentré complété par 0,5 µl de polybrene (8 ng.µl⁻¹) pour un puits d'une plaque de culture de 10 cm². La transduction est réalisée avec une centrifugation de 600 g pendant 2 h à 32 °C. Le lendemain le milieu est rafraîchit.

6. Chromatographies d'affinités

6.1. Chromatographie d'affinité pour la streptavidine (BioID1)

Le protocole est basé sur le protocole de Kyle J. Roux (Roux et al., 2013). Les cellules sont soumises à une supplémentation de biotine à raison de 50 µM final dans le milieu de culture 24 h avant récolte. Pour chaque condition (un triplicat) il est nécessaire de récolter 40 millions de cellules. Les cellules adhérentes sont lavées deux fois avec du PBS 1 X. Les cellules sont récoltées mécaniquement après ajout de 2,4 ml de tampon de lyse (50 mM Tris HCl pH = 7,4, 500 mM NaCl, 0,2 % SDS, 1 nM DTT 1 X Complete Protease Inhibitor (Roche)) pour la totalité de la condition. 240 µl de TritonX-100 à 20 % sont ajoutés et la lyse mécanique se fait par une série de pipetage aller-retour. Le mélange subit une première sonication de 30 fois 2 s à 80 % de la puissance à 0 °C avant ajout de 5,4 ml de tampon 50 mM Tris HCl pH = 7,4 puis de subir une seconde sonication identique à la première. Le lysat est centrifugé 10 min à 4 °C à 16000 g. A ce moment les échantillons appelés Inputs peuvent être prélevés et le lysat est divisé en trois pour réaliser les chromatographies en triplicat. Dans chaque chromatographie d'affinité, 200 µl de Streptavidin Magnetic Beads (Pierce) bien équilibrés dans un mélange moitié tampon de lyse et moitié 50 mM Tris HCl pH = 7,4, sont ajoutés et mis en agitation sur la nuit à 4 °C. Les billes magnétiques sont collectées à l'aide d'un support aimanté et lavées deux fois 8 min en agitation, à température ambiante, avec le tampon de lavage 1 (2 % SDS)

puis une fois avec le tampon de lavage 2 (0,1 % deoxycholate de sodium, 1 % TritonX-100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA et 50 mM Hepes pH = 7,4) un lavage avec le tampon de lavage 3 (250 mM LiCl, 0,5 % NP-40, 0,5 % deoxycholate de sodium, 1 mM EDTA et 10 mM Tris HCl pH = 7,4) et enfin un lavage avec le tampon 50 mM Tris HCl pH = 7,4. 5 % de chaque échantillon sont prélevés pour évaluer et valider la chromatographie d'affinité par western blot. La majeure partie de l'échantillon est envoyée en spectrométrie après chauffage des billes pendant 5 min à 95 °C dans du Laemmli 2 X.

6.2. Chromatographie d'affinité pour la streptavidine (BioID2)

Le protocole est basé sur le protocole de Kyle J. Roux (Kim et al., 2016b). Les cellules sont soumises à une supplémentation de biotine à raison de 50 µM final dans le milieu de culture 24 h avant récolte. Pour chaque condition (un triplicat) il est nécessaire de récolter 120 millions de cellules. Les cellules adhérentes sont lavées deux fois avec du PBS 1 X. Les cellules sont récoltées mécaniquement avec du PBS 1 X et centrifugées 5 min à 240 g à température ambiante puis divisées en 3 lots de 40 millions de cellules et 2,4 mL de tampon de lyse (50 mM Tris HCl pH = 7,5, 500 mM NaCl, 0,4 % SDS, 2,5 nM DTT 1 X Complete Protease Inhibitor (Roche)) sont ajoutés sur le culot cellulaire. 240 µl de TritonX-100 à 20 % sont alors ajoutés et la lyse est soumise à un traitement mécanique d'aspiration-refoulement. Le mélange subit une première sonication de 30 fois 2 s à 80 % la puissance à 0 °C avant ajout de 5,4 ml de tampon 50 mM Tris HCl pH = 7,5 puis de subir une seconde sonication identique à la première. Le lysat est centrifugé 10 min à 4 °C à 16000 g. A ce moment les échantillons appelés Inputs peuvent être prélevés. Dans chaque pêche, 200 µl de streptavidin mag sepharose (GE Healthcare) parfaitement équilibrés dans un mélange moitié tampon de lyse et moitié 50 mM Tris HCl pH = 7,5, sont ajoutés et mis en agitation sur la nuit à 4 °C. Les billes sont collectées à l'aide d'un support aimanté et lavées deux fois 8 min en agitation et à température ambiante avec le tampon de lavage 1 (2 % SDS) puis une fois avec le tampon de lavage 2 (0,1 % deoxycholate de sodium, 1 % TritonX-100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA et 50 mM Hepes pH = 7,5) un lavage avec le tampon de lavage 3 (250 mM LiCl, 0,5 % NP-40, 0,5 % deoxycholate de sodium, 1 mM EDTA et 10 mM Tris HCl pH = 8) puis un lavage avec le tampon 50 mM Tris HCl pH = 8. 5 % de chaque échantillon est prélevée pour évaluer et valider la chromatographie d'affinité par western blots. Les billes sont ensuite lavées quatre fois avec un tampon de 50 mM de bicarbonate d'ammonium et envoyés en spectrométrie de masse dans le même tampon utilisé pour la pêche. Les protéines sont digérées avec de la trypsine directement sur les billes sans aucun chauffage.

6.3. Chromatographie d'affinité pour le peptide T6B

Chaque triplicat de pêche nécessite 150 millions de cellules (pour l'élaboration des banques de petits ARN). Les cellules sont récoltées avec du PBS 1 X et centrifugées 5 min à température ambiante à 240 g puis le culot obtenu est mélangé avec 4,5 ml de tampon de lyse (50 mM de

Tris HCl pH = 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5 mM DTT, 1X Complete Protease Inhibitor (Roche) et 0,1 U ribolock par μ l) et maintenu dans la glace pendant 30 min. Une centrifugation 10000 g pendant 10 min à 4 °C permet de se débarrasser d'inclusions qui restent dans la phase liquide. L'échantillon Input peut être prélevé à ce moment-là et chaque lysat est divisée en trois. Les billes sont préparées en même temps que la lyse ou avant la lyse mais une seule préparation à lieu pour tous les échantillons : pour une pêche unique on utilise 120 μ l de billes Dynabeads Protéine G (Invitrogen) que l'on mélange avec 24 μ l (24 μ g) d'anticorps Monoclonal Anti-Flag M2 (Sigma) pendant 20 min en agitation, les billes sont lavées deux fois avec du tampon de lyse puis 24 μ g de peptide Flag-T6B sont ajoutés aux billes pendant 1 h puis les billes sont lavées deux fois avec du tampon de lyse. La fraction de billes qui est nécessaire à une pêche est ajoutée dans le lysat et mise en agitation pendant 1 h. Enfin trois lavages avec du tampon de lyse sont effectués et le dernier lavage est transféré dans un nouveau tube. Les billes peuvent être utilisées pour une analyse en spectrométrie de masse ou resuspendues dans le Trizol pour une extraction d'ARN.

7. Banques de petits ARN

Le principe est d'extraire l'ARN total (voir extraction Trizol), sélectionner les petits ARN et fixer des adaptateurs en 3' et 5' des ARN, en obtenir l'ADN complémentaire et enfin de l'ADN double brin.

7.1. Sélection des petits ARN (18 à 25 nucléotides)

Les petits ARN sont sélectionnés à partir de l'ARN total par passage dans un gel résolutif acrylamide 17,5 % / urée. Les petits ARN sont récupérés directement en découpant le gel en se repérant à une échelle de taille radioactive constituée de trois oligonucléotides de 19, 24 et 33 nucléotides marquées avec du phosphore 32. Le morceau de gel contenant l'ARN de la taille voulue est découpé puis le gel est broyé et immergé dans 400 μ l de NaCl 0,4 M et incubé à 4 °C sur la nuit avec agitation. L'ARN est précipité en ajoutant 2 volumes d'éthanol 100 % et 2 μ l de glycoblué suivi d'une incubation à -80 °C pendant une heure et d'une centrifugation 16000 g à 4 °C de 30 min. Un lavage à l'éthanol 70 % est réalisé.

7.2. Additions d'adaptateurs 3' et 5'

L'ARN est dissout dans 4 μ l d'eau et l'adaptateur 3' dégénéré préalablement adénylé est fixé en 5' de l'ARN (5Phos-NNNNUGGAAUUCUCGGUGCCAAGG(AmC7)) grâce à la réaction : 0,5 μ l d'adaptateur 20 μ M, 1,5 μ l de RNA ligase tronquée K227Q, 3 μ l de 50 % PEG et 1 μ l de tampon T4 ligase. L'incubation a lieu à 16 °C pendant 16 h. La purification se fait par passage dans un gel résolutif acrylamide 12 % / urée. L'extraction du gel est effectuée comme précédemment.

L'ARN est dissout dans 3,5 µl d'eau et l'adaptateur 5' dégénéré est fixé en 3' de l'ARN (GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUCNNNN) grâce à la réaction : 0,5 µl d'adaptateur 20 µM, 1 µl de RNA ligase 1, 3 µl de 50 % PEG, 1 µl de tampon T4 ligase et 1 µl d'ATP 10 mM. L'incubation a lieu à 37 °C pendant 1 h. La purification se fait par passage dans un gel résolutif acrylamide 8 % / urée. L'extraction du gel est effectuée comme précédemment.

7.3. Obtention de la banque en ADN

L'ARN est repris dans 13,5 µl d'eau afin de réaliser une transcription réverse, pour cela 1 µl d'oligonucléotide RT1 (GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA) est ajouté et 5 min d'incubation à 65 °C sont effectuées avant transfert sur glace. La réaction de réverse transcription est réalisée en ajoutant 6 µl de tampon, 2 µl de dNTP mix 10 mM, 3 µl de DTT 100 mM, 1,5 µl de Ribolock (Thermo Fischer) et 3 µl de Superscript IV (Thermo Fischer). L'incubation 10 min à 52 °C et 10 min à 80 °C. 10 µl d'ADN complémentaire obtenu sont utilisés pour réaliser une PCR phusion 50 µl (Thermo Scientific) en utilisant le protocole du fabricant mais le nombre de cycles est adapté en fonction de chaque échantillons (entre 10 et 12 cycles) à 61 °C de température hybridation et 20 s d'élongation. Les oligonucléotides utilisés sont RPI et RPI_x (Illumina), RPI_x étant différent pour chaque échantillon puisque cet oligonucléotide porte le code barre spécifique de chaque échantillon (tableau 11). Enfin les PCR sont purifiés par passage dans un gel résolutif d'acrylamide 8 % non-dénaturant et les ADN sont récupérés et précipités de la même manière qu'aux étapes précédente en utilisant le glycogène à la place du glycoblue pour ne pas interférer avec le séquençage.

Echantillon	Oligonucléotide
MEF-WT-MOCK-Input	RPI1
MEF-WT-MOCK-IP1	RPI2
MEF-WT-MOCK-IP2	RPI3
MEF-WT-MOCK-IP3	RPI4
MEF-WT-MCMV-Input	RPI5
MEF-WT-MCMV-IP1	RPI18
MEF-WT-MCMV-IP2	RPI23
MEF-WT-MCMV-IP3	RPI28
MEF-AGO2KO-MOCK-Input	RPI29
MEF-AGO2KO-MOCK-IP1	RPI30
MEF-AGO2KO-MOCK-IP2	RPI31
MEF-AGO2KO-MOCK-IP3	RPI32
MEF-AGO2KO-MCMV-Input	RPI38
MEF-AGO2KO-MCMV-IP1	RPI40
MEF-AGO2KO-MCMV-IP2	RPI44
MEF-AGO2KO-MCMV-IP3	RPI48

Tableau 14 : Liste des codes-barres attribués à chaque échantillon (Illumina).

8. Spectrométrie de masse

Après digestion par la trypsine, les peptides sont analysés sur un nano HPLC Easy nLC 1000 system (Thermo Scientific) couplé à un Plus mass spectrometer (Thermo scientific). Les pré-

colonnes utilisées sont des colonnes analytiques C-18 (75 μm ID x 15 cm Pepmap 100, Thermo Scientific). Les peptides sont élués en utilisant un mélange de 5 à 40 % de solution B (0,1 % acide formique dans l'acétonitrile) dans du solvant A (0,1 % acide formique).

9. Statistiques

Les données récoltées sont exprimées en nombre de spectres (spectral count) et les spectres qui peuvent être attribués à plusieurs protéines sont attribués à toutes ces protéines en suivant les lignes directrices de A. Nesvizhskii et R. Aebersold. Les statistiques comparatives employées suivent le modèle de la loi binomiale négative et les p-values sont ajustées par la méthode de Benjamini-Hochberg. Le traitement des données de spectrométrie de masse a été fait à l'aide du logiciel MassSpec Toolkit qui est géré par Béatrice Chane-Woon-Ming en se référant à la nomenclature UniProt. Le seuil pour tenir compte d'une protéine a été fixé à 4 spectres minimum dans au moins un des échantillons et le seuil à partir duquel on considère les protéines comme différentes dans une comparaison est fixé à une unité de \log_2 avec une p-value $< 0,05$.

IV. DISCUSSIONS - PERSPECTIVES

Parmi de multiples facteurs participant à la mise en place efficace de l'infection par le MCMV, les miARN représentent des éléments importants. L'implication de ces petits ARN non codants se fait à deux niveaux distincts. D'une part, la production par le virus d'un nombre conséquent de miARN viraux s'accumulant en quantité importante et d'autre part la dégradation du miARN cellulaire miR-27. Dans les deux cas, on retrouve un facteur essentiel pour l'action des miARN qui est une protéine Argonaute, et dont AGO2 est le représentant le plus important chez les mammifères. Nous avons donc entrepris d'étudier l'importance de cette protéine au cours de l'infection par le MCMV et plus particulièrement son implication dans la stabilisation des miARN viraux ainsi que dans la mise en place du TDMD de miR-27. Pour ce faire, nous avons établi des banques de petits ARN pour comprendre comment les miARN viraux et cellulaires sont chargés en présence et absence d'AGO2 et nous avons mis à jour l'interactome d'AGO2 pendant l'infection par le MCMV dans le but de trouver des facteurs importants pour le virus. Par ces approches, nous voulions déterminer si et comment la cellule met en place un mécanisme particulier pour faire face à l'afflux d'un nombre élevé de miARN exogènes et également profiter de ces expériences pour identifier de nouveaux facteurs impliqués dans le TDMD.

Dans l'introduction j'ai parlé de l'importance du TDMD de miR-27 dans l'établissement de l'infection *in vivo* par le MCMV (Marcinowski et al., 2012). Il est communément admis que les herpèsvirus ont besoin de contrôler la production de l'IL 10 pour moduler le système immunitaire. En effet, certains codent pour un orthologue d'IL-10 (Kotenko et al., 2000). Il a également été montré que l'ARNm d'IL-10 est une des cibles de miR-27 (Xie et al., 2014), ce qui indiquerait que la dégradation de ce miARN pourrait participer à la régulation d'IL-10 durant l'infection par MCMV. Par ailleurs, l'élimination de miR-27 par MCMV est également importante lors de l'infection. En effet, la surexpression de ce miARN dans des cellules en culture conduit à un effet antiviral et une diminution du titre infectieux (Buck et al., 2010). Cette observation valide donc la pertinence de l'utilisation d'un modèle cellulaire tel que les cellules MEF pour étudier ce phénomène.

Pour comprendre l'effet du virus sur les miARN cellulaires, j'ai constitué des banques de petits ARN à partir de MEF provenant de souris sauvages ou inactivées génétiquement pour AGO2 et infectées par MCMV. Cependant, ces banques ont montré quelques limites. La première est le niveau relativement bas d'infection observé dans les deux lignées. En effet, l'analyse des miARN d'origine virale révèle que ceux-ci s'accumulent à un pourcentage plus faible que celui observé par le passé au laboratoire dans des fibroblastes 3T3. En moyenne, nous avons identifié moins de 2 % de miARN viraux 24 hpi dans tous les échantillons infectés, ce qui est très inférieur aux résultats obtenus dans les cellules 3T3 (25 %). L'idéal aurait été d'avoir des banques réalisées sur des cellules présentant une infection plus forte pour pouvoir y déceler le maximum d'effet dû au virus. La deuxième limite est d'ordre technique puisque l'expérience n'a été faite qu'une seule fois, même si la pêche des protéines Argonaute a été réalisée sous

forme de triplicat. Malgré ces limitations, il a cependant été possible de faire des observations intéressantes à partir des données de séquençage obtenues. Nous avons ainsi pu constater par exemple que les échantillons issus de la chromatographie d'affinité par le peptide T6B (IP) qui contiennent donc uniquement les petits ARN chargés dans les protéines Argonaute sont constitués à plus de 96 % de séquences de miARN. Cette observation est de nature à augmenter la confiance que l'on peut avoir dans notre méthode de pêche. En revanche, dans les Input ce pourcentage diminue entre 43 et 85 % ce qui est compréhensible puisque nous nous retrouvons avec des petits ARN issus de la dégradation d'ARN plus longs comme les ARNm, ARN ribosomiques ou ARN de transfert. Cela confirme que les Argonautes ne sont pas chargés avec n'importe quel petits ARN dans des conditions normales mais bien avec les miARN. Cette dernière observation constitue la seule différence notable entre les inputs et les IP car seuls quelques miARN ont montré un niveau très différent entre inputs et IP d'une même condition. Pour la plupart des miARN, on ne note pas d'enrichissement notable dans l'IP. Ce résultat indique donc que dans l'extrait de départ, la vaste majorité des miARN identifiés sont déjà chargés et n'existent que très peu sous forme libre, ou alors sous une forme ne permettant pas leur ligation aux adaptateurs.

Les banques générées ont permis de mettre en évidence sept miARN qui s'accumulent plus fortement en absence d'AGO2. Parmi ceux-ci, on trouve quatre miARN de la famille miR-344 qui sont tous codés au même locus sur le chromosome 7, il est donc tentant de penser qu'un phénomène de régulation de la transcription est en cause pour cette famille. Mais le plus touché par ce phénomène est le miR-10a dont les deux brins sont plus exprimés (à la fois dans l'input et dans l'IP) en absence d'AGO2, avec une tendance plus marquée pour miR-10a-5p. Il est intéressant de noter que miR-10a-5p serait capable de contribuer à déclencher la cascade de l'apoptose. Toutefois, nous n'avons pas constaté de différence majeure concernant la survie des cellules *Ago2*^{-/-}. Ces dernières sont certes un peu plus petites que les sauvages, mais ne présentent pas de défaut de multiplication ou d'une augmentation de la mort cellulaire. La surexpression de miR-10a représente donc peut-être un mécanisme de contrôle qui se met en place lorsqu'AGO2 n'est plus exprimé.

Par ailleurs, l'analyse des données de ces banques a mis en évidence que l'absence d'AGO2 a une influence sur le chargement des miARN néo-synthétisés. En effet l'étude sur le pourcentage des miARN viraux chargés dans les cellules wt ou *Ago2*^{-/-} montre que les miARN viraux peuvent être significativement plus ou moins chargés selon qu'AGO2 est présent ou non. La plupart de ceux qui montrent une différence significative sont plus présents lorsque AGO2 est exprimé (12 miARN), même si l'inverse est vrai pour 4 miARN. Cette observation met clairement AGO2 au centre du jeu pour ce qui est de charger et d'exploiter les miARN viraux. Je précise ici que les analyses par northern blot des miARN viraux (Résultats 1.3.1) avaient montrés une diminution du miR-M01.2 par exemple mais pas du pré-miR-M01.2. On peut donc supposer que l'infection par le MCMV de ces cellules est retardée, ce qui permettrait d'expliquer cette différence. Les observations concernant le chargement différentiel des miARN viraux contrastent avec ce qui est généralement admis concernant les

AGO de mammifères : AGO1 et AGO2 sont exprimés à des niveaux différents et l'un a tendance à compenser l'absence de l'autre (Matsui et al., 2015) mais ils sont censés être chargés indifféremment avec les mêmes populations de miARN même si des publications ont déjà montré des chargement préférentiels pour certain miARN en étudiant des structures en épingle à cheveux (Gu et al., 2011). Nos données indiquent que la différence de chargement s'applique également aux miARN cellulaires. Par ailleurs, les différences observées ne résultent pas tout simplement d'un changement au niveau du choix brin guide / passager.

Concernant le TDMD de miR-27, l'étude de l'abondance de miR-27 dans les MEF sauvages et les KO montre que miR-27a est nettement plus exprimé en absence d'AGO2 mais que dans le même temps miR-27b semble moins présent. Cela suggère qu'effectivement les miARN ne sont pas chargés à l'identique sur toutes les AGO. Cette observation ne reflète pas forcément les résultats obtenus par northern blot où il apparaît que le niveau d'abondance de miR-27 est semblable dans les deux lignées de MEF avant infection par le MCMV. Toutefois, on ne peut très certainement pas distinguer entre miR-27a et b par cette technique, ce qui explique sans doute ce résultat. Nous avons également pu observer qu'à la fois miR-27 a et b sont affectés par le TDMD dans les MEF sauvages même si l'élimination n'est pas totale sûrement dû à la faiblesse de l'infection. Il a été plus surprenant de voir que miR-27 a et b sont également affectés par le TDMD dans les MEF en absence d'AGO2 notamment miR-27a (Résultats 1.4.3.2), alors que les données obtenues par northern blot laissaient penser à un délai dans la mise en place du TDMD en l'absence d'AGO2. Cependant, il faut modérer ce résultat par la différence du niveau d'infection dans les cellules utilisées pour la construction des banques. La quantification de la diminution du niveau de miR-27 entre les cellules infectées ou non indique une diminution d'un facteur 2, ce qui indique que le TDMD n'a pas encore eu complètement lieu. Au final, nos observations indiquent que le TDMD de miR-27a peut se produire en absence d'AGO2 et qu'il peut être initié sur les miARN chargés dans les autres AGO. Il est envisageable que le chargement efficace de miR-27a dans les autres AGO contribue à sa stabilité en compensant la destruction due au TDMD.

Pour trouver des nouveaux facteurs interagissant avec AGO2 au cours de l'infection par le MCMV, j'ai réalisé un étiquetage en cellules par la biotine des protéines à proximité de celle-ci à l'aide de la technique BioID2. L'analyse des protéines biotinylées par spectrométrie de masse réalisée en triplicat nous a permis de comparer les interactomes de cellules MEF non-infectées ou infectées par MCMV ou SINV et de mettre en évidence un certain nombre de protéines candidates.

Pour commencer la technique utilisée avec les deux constructions B2A et B2A-L nous a donné satisfaction puisque contrairement aux autres techniques précédemment utilisées au laboratoire le rendement en nombre de spectre et nombre de protéines identifiées dans chaque échantillon a été très élevé. Il y a plusieurs raisons qui peuvent être évoquées pour expliquer cela. D'abord il se peut que les constructions fusionnées avec le BioID2 soient plus fonctionnelles qu'avec BirA* car la protéine est plus petite. De plus, l'addition d'un linker

permet d'augmenter le rayon d'action de la biotine ligase. Il est également probable que BioID2 ait une capacité de biotinylation supérieure car la quantité et le temps de biotinylation sont restés les mêmes dans mes différentes tentatives. J'ai aussi utilisé des billes différentes qui semblent moins enclines à relarguer leur streptavidine dans le tampon d'éluion. Enfin, c'est surtout la méthode utilisée pour décrocher les protéines des billes qui peut être mise en avant puisque l'utilisation de chaleur a été proscrite et la digestion trypsique des protéines s'est faite directement sur les billes.

Notre analyse a permis l'identification de 563 à 895 protéines dans chaque échantillon en mettant de côté les deux échantillons qui contenaient des restes de détergent ce qui ne permettait pas de les comparer aux autres. Nous avons été capables d'identifier de nombreux spectres appartenant à des partenaires connus d'AGO2 : TNRC6A/B/C, HSP90A/B, HSP70, PABP, GGYF2, EDC4 et des protéines du complexe CCR4-NOT. L'identification de ces cofacteurs dans tous les échantillons nous a rassuré quant à la fiabilité de la technique utilisée. Nous avons également identifié de nombreux spectres pour AGO1 ce qui peut s'expliquer par la localisation subcellulaire des AGO, en effet sous certaines circonstances les Argonautes peuvent être adressées dans les p-bodies (Qi et al., 2008; Wu et al., 2011). Par ailleurs nous avons également identifié des protéines Dead Box (DDX6 et DDX17 par exemple) qui sont connues pour guider la localisation subcellulaire de certains ARN (Hondele et al., 2019), ces protéines doivent participer à la constitution d'une compartimentalisation cellulaire en séparation de phase (sans organelle) dont font partie le p-bodies. Cette compartimentalisation est rapide et doit faire partie d'une réponse à l'infection.

La comparaison statistique des interactomes a permis de mettre en évidence des différences entre les conditions mais également entre les deux constructions B2A et B2A-L. La comparaison des interactomes des deux lignées MOCK a mis en évidence 114 protéines biotinyliées à des niveaux différents sans tenir compte des protéines de fusion elles-mêmes. Il est tout à fait normal que la construction avec et sans linker soient en contact avec les partenaires d'AGO2 de manière différente. On peut noter d'ailleurs que dans cette liste figure HSP90A/B mais aussi d'autres co-chaperonnes : SGT1 qui est une co-chaperonne de HSP90 (Mayor et al., 2007), FKBP5 (Hähle et al., 2019), MAP1B (Wu et al., 2019). PPM1A est une phosphatase métal-dépendante qui est capable de réguler la phosphorylation de plusieurs protéines kinase (Li et al., 2013), cette protéine pourrait faire l'objet d'une étude sur son interaction avec AGO2 et son complexe car on sait que le fonctionnement d'AGO2 est dépendant d'un certain nombre de modification et notamment des phosphorylations. Nous voyons également apparaître des protéines qui seront mises en évidence dans nos autres comparaisons en présence de virus : FINC, RCC2, CO1A1, VIME, SRS10, TRA2B, SRSF7, DDX46, NACAM, LUC7L, et LC7L2. Il est assez logique de constater que plus de protéines sont taguées par B2A-L que par B2A car le linker confère un rayon d'action plus grand à B2A-L.

Les interactomes d'AGO2 pendant l'infection par le MCMV se distinguent des conditions MOCK par 15 et 64 protéines chez B2A-L et B2A respectivement sans compter les protéines virales. Ici c'est la construction B2A-L qui a le moins bon rendement peut être causé par la dispersion plus grande due au linker. Parmi ces protéines un grand nombre font partie des

protéines identifiées comme facteurs d'épissage ou facteurs de transcription. Mais il est intéressant de constater que celles qui sont les plus différentes de la condition MOCK et en faveur des conditions infectées se trouve une protéine liée aux chaperonnes FINC dans B2A. FINC fait partie des protéines qui seraient susceptibles de contribuer au chargement de AGO2 par des miARN d'origine virale pendant l'infection.

Nous avons également pu identifier un phénomène intéressant dans B2A-L infecté par le MCMV, trois protéines qui sont liées par leur régulation et fonction ont été identifiées : TRA2B et SRS10 dans l'interactome d'AGO2 en condition infectée et ZRAB2 dans l'interactome d'AGO2 en condition MOCK, comme si un facteur d'épissage en remplaçait un autre. De nombreuses protéines liées à la localisation subcellulaire ont également été identifiées : DDX3X, DDX3Y et DDX46 (Hondele et al., 2019), cela est peut-être le signe d'un changement de localisation d'AGO2 pendant l'infection par le MCMV.

Les interactomes d'AGO2 en condition d'infection par le SINV mettent en évidence, en plus des nombreuses protéines liées à l'épissage, un grand nombre de protéines lié à l'ADN, remodelage de la chromatine ou facteurs de transcription : RNPS1, CHD1, BRD2, BRD3, NACAM et PR40A. Nous pouvons constater que tous ces facteurs sont moins présents dans la condition infectée par SINV, Il est possible que ces facteurs doivent être relocalisés ailleurs dans la cellule.

Les interactomes de SINV nous ont permis de voir quels sont les partenaires d'AGO2 qui se mettent en évidence dans tous les cas d'infections et il y en a cinq : LUC7L, LC7L2, LC7L3 dont on sait très peu mais qui sont probablement des facteurs d'épissages, DDX46 qui peut avoir une influence sur la localisation des complexes RISC et SRSF7 qui est également un facteur d'épissage. De plus en plus de facteurs d'épissage sont décrits avec d'autres compétences avec notamment l'idée qu'il est possible que l'ARN régule la protéine autant que le contraire, il y a aussi un lien avec la localisation cellulaire puisque les paraspekles sont riches en ces facteurs d'épissage (Hentze et al., 2018). De plus, AGO2 est de plus en plus décrit comme un partenaire dans l'épissage et nos données ne le contredisent pas (Tarallo et al., 2017) même si encore une fois ce ne soit que des résultats préliminaires.

Le résultat le plus intrigant est l'identification de BICC1 à la fois dans les B2A et B2A-L infectés par le MCMV sachant que cette protéine est déjà liée à miR-27 (Piazzon et al., 2012) mais aussi aux TUTase chez *C. elegans* (Schmid et al., 2009). Cela en fait un candidat qui pourrait avoir un impact réel sur le MCMV et peut être même par le mécanisme de TDMD. Cette protéine a été identifiée par western blot très faiblement mais il serait intéressant d'en diminuer transitoirement l'expression en condition d'infection et de voir l'effet produit sur le MCMV et le TDMD de miR-27. En plus de BICC1, cette étude a tout de même permis d'identifier WASC5, SON et ATPA comme facteurs candidats pour influencer sur l'infection par le MCMV.

V. BIBLIOGRAPHIE

Adler, B. (2006). Role of human cytomegalovirus UL131A in cell type-specific virus entry and release. *J. Gen. Virol.* *87*, 2451–2460.

Akhouayri, O., Quelo, I., and St-Arnaud, R. (2005). Sequence-Specific DNA Binding by the NAC Coactivator Is Required for Potentiation of c-Jun-Dependent Transcription of the Osteocalcin Gene. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 3452–3460.

Alarcón, C.R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., and Tavazoie, S.F. (2015). N6-methyl-adenosine (m6A) marks primary microRNAs for processing. *Nature* *519*, 482–485.

Ali, M.M.U., Roe, S.M., Vaughan, C.K., Meyer, P., Panaretou, B., Piper, P.W., Prodromou, C., and Pearl, L.H. (2006). Crystal structure of an Hsp90–nucleotide–p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* *440*, 1013–1017.

Ameres, S.L., Horwich, M.D., Hung, J.H., Xu, J., Ghildiyal, M., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science* *328*, 1534–1539.

Armstrong, H.K., Gillis, J.L., Johnson, I.R.D., Nassar, Z.D., Moldovan, M., Levrier, C., Sadowski, M.C., Chin, M.Y., Tomlinson Guns, E.S., Tarulli, G., et al. (2018). Dysregulated fibronectin trafficking by Hsp90 inhibition restricts prostate cancer cell invasion. *Sci. Rep.* *8*.

Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., and Bartel, D.P. (2013). Beyond Secondary Structure: Primary-Sequence Determinants License Pri-miRNA Hairpins for Processing. *Cell* *152*, 844–858.

Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* *22*, 2773–2785.

Bail, S., Swerdel, M., Liu, H., Jiao, X., Goff, L.A., Hart, R.P., and Kiledjian, M. (2010). Differential regulation of microRNA stability. *RNA N. Y. N* *16*, 1032–1039.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215–233.

Bartel, D.P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell* *173*, 20–51.

Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* *11*, 241–247.

Bazzini, A.A., Lee, M.T., and Giraldez, A.J. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* *336*, 233–237.

Beckett, D., Kovaleva, E., and Schatz, P.J. (1999). A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.* *8*, 921–929.

Bennasser, Y., Chable-Bessia, C., Triboulet, R., Gibbings, D., Gwizdek, C., Dargemont, C., Kremer, E.J., Voinnet, O., and Benkirane, M. (2011). Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 323–327.

Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* *28*, 328–336.

Betancur, J.G., and Tomari, Y. (2012). Dicer is dispensable for asymmetric RISC loading in mammals. *RNA N. Y. N* *18*, 24–30.

Bitetti, A., Mallory, A.C., Golini, E., Carrieri, C., Carreño Gutiérrez, H., Perlas, E., Pérez-Rico, Y.A., Tocchini-Valentini, G.P., Enright, A.J., Norton, W.H.J., et al. (2018). MicroRNA degradation by a conserved target RNA regulates animal behavior. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *25*, 244–251.

Boele, J., Persson, H., Shin, J.W., Ishizu, Y., Newie, I.S., Søkilde, R., Hawkins, S.M., Coarfa, C., Ikeda, K., Takayama, K., et al. (2014). PAPD5-mediated 3' adenylation and subsequent degradation of miR-21 is disrupted in proliferative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 11467–11472.

Bogerd, H.P., Karnowski, H.W., Cai, X., Shin, J., Pohlers, M., and Cullen, B.R. (2010). A Mammalian Herpesvirus Uses Noncanonical Expression and Processing Mechanisms to Generate Viral MicroRNAs. *Mol. Cell* *37*, 135–142.

Bohnsack, M.T. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* *10*, 185–191.

Bortolamiol-Becet, D., Hu, F., Jee, D., Wen, J., Okamura, K., Lin, C.-J., Ameres, S.L., and Lai, E.C. (2015). Selective Suppression of the Splicing-Mediated MicroRNA Pathway by the Terminal Uridyltransferase Tailor. *Mol. Cell* *59*, 217–228.

Bramwell, M.E. (1987). Characterization of biotinylated proteins in mammalian cells using 125I-streptavidin. *J. Biochem. Biophys. Methods* *15*, 125–132.

Branon, T.C., Bosch, J.A., Sanchez, A.D., Udeshi, N.D., Svinkina, T., Carr, S.A., Feldman, J.L., Perrimon, N., and Ting, A.Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat. Biotechnol.* *36*, 880–887.

Braun, J.E., Huntzinger, E., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol. Cell* *44*, 120–133.

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

Bridge, K.S., Shah, K.M., Li, Y., Foxler, D.E., Wong, S.C.K., Miller, D.C., Davidson, K.M., Foster, J.G., Rose, R., Hodgkinson, M.R., et al. (2017). Argonaute Utilization for miRNA Silencing Is Determined by Phosphorylation-Dependent Recruitment of LIM-Domain-Containing Proteins. *Cell Rep.* *20*, 173–187.

- Broderick, J.A., Salomon, W.E., Ryder, S.P., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2011). Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing. *RNA* *17*, 1858–1869.
- Buck, A.H., Santoyo-Lopez, J., Robertson, K.A., Kumar, D.S., Reczko, M., and Ghazal, P. (2007). Discrete clusters of virus-encoded micrornas are associated with complementary strands of the genome and the 7.2-kilobase stable intron in murine cytomegalovirus. *J. Virol.* *81*, 13761–13770.
- Buck, A.H., Perot, J., Chisholm, M.A., Kumar, D.S., Tuddenham, L., Cognat, V., Marcinowski, L., Dolken, L., and Pfeffer, S. (2010). Post-transcriptional regulation of miR-27 in murine cytomegalovirus infection. *RNA* *16*, 307–315.
- Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J.L., Tomaru, Y., Nishibu, T., Ukekawa, R., Funakoshi, T., Kurokawa, T., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., et al. (2010). A comprehensive survey of 3' animal miRNA modification events and a possible role for 3' adenylation in modulating miRNA targeting effectiveness. *Genome Res.* *20*, 1398–1410.
- Cai, X. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* *10*, 1957–1966.
- Cai, Q., Zhao, A., Ren, L., Chen, J., Liao, K., Wang, Z., and Zhang, W. (2019). MicroRNA-1291 mediates cell proliferation and tumorigenesis by downregulating MED1 in prostate cancer. *Oncol. Lett.*
- Calvo, O. (2018). Sub1 and RNAPII, until termination does them part. *Transcription* *9*, 52–60.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., and Hannon, G.J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* *16*, 2733–2742.
- Cazalla, D., Yario, T., Steitz, J.A., and Steitz, J. (2010). Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. *Science* *328*, 1563–1566.
- Chandradoss, S.D., Schirle, N.T., Szczepaniak, M., MacRae, I.J., and Joo, C. (2015). A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting. *Cell* *162*, 96–107.
- Chang, H.-M., Triboulet, R., Thornton, J.E., and Gregory, R.I. (2013). A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway. *Nature* *497*, 244–248.
- Chatterjee, S., and Grosshans, H. (2009). Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *461*, 546–549.
- Chekulaeva, M., Mathys, H., Zipprich, J.T., Attig, J., Colic, M., Parker, R., and Filipowicz, W. (2011). miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4–NOT through conserved W-containing motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1218–1226.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* *465*, 584–589.

- Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20, 465–470.
- Chen, C., Zhu, C., Huang, J., Zhao, X., Deng, R., Zhang, H., Dou, J., Chen, Q., Xu, M., Yuan, H., et al. (2015). SUMOylation of TARBP2 regulates miRNA/siRNA efficiency. *Nat. Commun.* 6.
- Chen, C.-Y.A., Zheng, D., Xia, Z., and Shyu, A.-B. (2009). Ago–TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1160–1166.
- Chen, H., Wang, S., Chen, L., Chen, Y., Wu, M., Zhang, Y., Yu, K., Huang, Z., Qin, L., and Mo, D. (2014). MicroRNA-344 inhibits 3T3-L1 cell differentiation via targeting GSK3 β of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *FEBS Lett.* 588, 429–435.
- Chen, X., Zaro, J.L., and Shen, W.-C. (2013). Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1357–1369.
- Chen, X., Fan, Z., McGee, W., Chen, M., Kong, R., Wen, P., Xiao, T., Chen, X., Liu, J., Zhu, L., et al. (2018). TDP-43 regulates cancer-associated microRNAs. *Protein Cell* 9, 848–866.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740–744.
- Cheng, T.-L., Wang, Z., Liao, Q., Zhu, Y., Zhou, W.-H., Xu, W., and Qiu, Z. (2014). MeCP2 Suppresses Nuclear MicroRNA Processing and Dendritic Growth by Regulating the DGCR8/Drosha Complex. *Dev. Cell* 28, 547–560.
- Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., and Darnell, R.B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA–mRNA interaction maps. *Nature* 460, 479–486.
- Choudhury, N.R., de Lima Alves, F., de Andres-Aguayo, L., Graf, T., Caceres, J.F., Rappsilber, J., and Michlewski, G. (2013). Tissue-specific control of brain-enriched miR-7 biogenesis. *Genes Dev.* 27, 24–38.
- Chu, Y.-D., Chen, H.-K., Huang, T., and Chan, S.-P. (2016). A novel function for the DEAD-box RNA helicase DDX-23 in primary microRNA processing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 409, 459–472.
- Church, V.A., Pressman, S., Isaji, M., Truscott, M., Cizmecioglu, N.T., Buratowski, S., Frolov, M.V., and Carthew, R.W. (2017). Microprocessor Recruitment to Elongating RNA Polymerase II Is Required for Differential Expression of MicroRNAs. *Cell Rep.* 20, 3123–3134.
- Ciferri, C., Chandramouli, S., Donnarumma, D., Nikitin, P.A., Cianfrocco, M.A., Gerrein, R., Feire, A.L., Barnett, S.W., Lilja, A.E., Rappuoli, R., et al. (2015). Structural and biochemical studies of HCMV gH/gL/gO and Pentamer reveal mutually exclusive cell entry complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 1767–1772.

- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., et al. (2010). A Novel miRNA Processing Pathway Independent of Dicer Requires Argonaute2 Catalytic Activity. *Science* 328, 1694–1698.
- Cobbs, C. (2019). Cytomegalovirus is a tumor-associated virus: armed and dangerous. *Curr. Opin. Virol.* 39, 49–59.
- Cobbs, C.S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G.Y., Bharara, S., King, P.H., Nabors, L.B., Cobbs, C.G., and Britt, W.J. Human Cytomegalovirus Infection and Expression in Human Malignant Glioma. 5.
- Creugny, A., Fender, A., and Pfeffer, S. (2018). Regulation of primary microRNA processing. *FEBS Lett.* 592, 1980–1996.
- Cullen, B.R. (2009). Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature* 457, 421–425.
- Das, T., Jaffar-Bandjee, M.C., Hoarau, J.J., Krejbich Trotot, P., Denizot, M., Lee-Pat-Yuen, G., Sahoo, R., Guiraud, P., Ramful, D., and Robin, S. (2010). Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus. *Prog. Neurobiol.* 91, 121–129.
- Davison, A.J. (2007). Overview of classification. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.
- Deka, B., and Singh, K. (2019). The arginine and serine-rich domains of Acinus modulate splicing. *Cell Biol. Int.* 43, 954–959.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235.
- Díaz Casas, A., Chazin, W.J., and Pastrana-Ríos, B. (2017). Prp40 Homolog A Is a Novel Centrin Target. *Biophys. J.* 112, 2529–2539.
- Didiano, D., and Hobert, O. (2008). Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. *RNA* 14, 1297–1317.
- Diederichs, S., and Haber, D.A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 1097–1108.
- Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18, 504–511.
- Dolken, L., Perot, J., Cognat, V., Alioua, A., John, M., Soutschek, J., Ruzsics, Z., Koszinowski, U., Voinnet, O., and Pfeffer, S. (2007). Mouse Cytomegalovirus MicroRNAs Dominate the Cellular Small RNA Profile during Lytic Infection and Show Features of Posttranscriptional Regulation. *J. Virol.* 81, 13771–13782.

- Dölken, L., Krmpotic, A., Kothe, S., Tuddenham, L., Tanguy, M., Marcinowski, L., Ruzsics, Z., Elefant, N., Altuvia, Y., Margalit, H., et al. (2010). Cytomegalovirus microRNAs Facilitate Persistent Virus Infection in Salivary Glands. *PLoS Pathog* 6, e1001150.
- Dong, Y., Huo, X., Sun, R., Liu, Z., Huang, M., and Yang, S. (2018). lncRNA Gm15290 promotes cell proliferation and invasion in lung cancer through directly interacting with and suppressing the tumor suppressor miR-615-5p. *Biosci. Rep.* 38.
- Ebert, M.S., and Sharp, P.A. (2010). Emerging roles for natural microRNA sponges. *Curr. Biol.* 20, R858-861.
- Eichhorn, S.W., Guo, H., McGearry, S.E., Rodriguez-Mias, R.A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S., Ghoshal, K., Villén, J., and Bartel, D.P. (2014). mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues. *Mol. Cell* 56, 104–115.
- Elcheva, I., Goswami, S., Noubissi, F.K., and Spiegelman, V.S. (2009). CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Mol. Cell* 35, 240–246.
- Elkayam, E., Kuhn, C.-D., Tocilj, A., Haase, A.D., Greene, E.M., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2012). The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell* 150, 100–110.
- Elkayam, E., Faehnle, C.R., Morales, M., Sun, J., Li, H., and Joshua-Tor, L. (2017). Multivalent Recruitment of Human Argonaute by GW182. *Mol. Cell* 67, 646-658.e3.
- Ender, C., Krek, A., Friedländer, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., and Meister, G. (2008). A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. *Mol. Cell* 32, 519–528.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 27, 3970–3981.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2008). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15, 21–32.
- Eulalio, A., Tritschler, F., Büttner, R., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., and Truffault, V. (2009). The RRM domain in GW182 proteins contributes to miRNA-mediated gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 37, 2974–2983.
- Eystathioy, T., Chan, E.K.L., Tenenbaum, S.A., Keene, J.D., Griffith, K., and Fritzler, M.J. (2002). A Phosphorylated Cytoplasmic Autoantigen, GW182, Associates with a Unique Population of Human mRNAs within Novel Cytoplasmic Speckles. *Mol. Biol. Cell* 13, 1338–1351.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., et al. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1211–1217.

- Faehnle, C.R., Walleshauser, J., and Joshua-Tor, L. (2014). Mechanism of Dis3l2 substrate recognition in the Lin28-let-7 pathway. *Nature* 514, 252–256.
- Fang, W., and Bartel, D.P. (2015). The Menu of Features that Define Primary MicroRNAs and Enable De Novo Design of MicroRNA Genes. *Mol. Cell* 60, 131–145.
- Fay, M., Alt, L., Ryba, D., Salamah, R., Peach, R., Papaeliou, A., Zawadzka, S., Weiss, A., Patel, N., Rahman, A., et al. (2018). Cadmium Nephrotoxicity Is Associated with Altered MicroRNA Expression in the Rat Renal Cortex. *Toxics* 6, 16.
- Fiorentino, D.F. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170, 2081–2095.
- Forestell, S.P., Dando, J.S., Böhnlein, E., and Rigg, R.J. (1996). Improved detection of replication-competent retrovirus. *J. Virol. Methods* 60, 171–178.
- Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Coller, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14879–14884.
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19, 92–105.
- Fu, Q., Wang, W., Zhou, T., and Yang, Y. (2016). Emerging roles of NudC family: from molecular regulation to clinical implications. *Sci. China Life Sci.* 59, 455–462.
- Fuchs Wightman, F., Giono, L.E., Fededa, J.P., and de la Mata, M. (2018). Target RNAs Strike Back on MicroRNAs. *Front. Genet.* 9.
- Gaidatzis, D., van Nimwegen, E., Hausser, J., and Zavolan, M. (2007). Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics* 8, 69.
- Galgano, A., Forrer, M., Jaskiewicz, L., Kanitz, A., Zavolan, M., and Gerber, A.P. (2008). Comparative Analysis of mRNA Targets for Human PUF-Family Proteins Suggests Extensive Interaction with the miRNA Regulatory System. *PLoS ONE* 3, e3164.
- Gantier, M.P., McCoy, C.E., Rusinova, I., Saulep, D., Wang, D., Xu, D., Irving, A.T., Behlke, M.A., Hertzog, P.J., Mackay, F., et al. (2011). Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* 39, 5692–5703.
- Ghini, F., Rubolino, C., Climent, M., Simeone, I., Marzi, M.J., and Nicassio, F. (2018). Endogenous transcripts control miRNA levels and activity in mammalian cells by target-directed miRNA degradation. *Nat. Commun.* 9.
- Gibbins, D., Mostowy, S., Jay, F., Schwab, Y., Cossart, P., and Voinnet, O. (2012). Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity. *Nat. Cell Biol.* 14, 1314–1321.

- Golden, R.J., Chen, B., Li, T., Braun, J., Manjunath, H., Chen, X., Wu, J., Schmid, V., Chang, T.-C., Kopp, F., et al. (2017). An Argonaute phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature* *542*, 197–202.
- Gonzales, B., Henning, D., So, R.B., Dixon, J., Dixon, M.J., and Valdez, B.C. (2005). The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in pre-rRNA methylation. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 2035–2043.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* *123*, 631–640.
- Griffiths-Jones, S. (2010). miRBase: microRNA sequences and annotation. *Curr Protoc Bioinforma. Chapter 12*, Unit 12 9 1-10.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* *34*, D140-4.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* *36*, D154-8.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* *27*, 91–105.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* *106*, 23–34.
- Gu, S., Jin, L., Zhang, F., Huang, Y., Grimm, D., Rossi, J.J., and Kay, M.A. (2011). Thermodynamic stability of small hairpin RNAs highly influences the loading process of different mammalian Argonautes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 9208–9213.
- Guo, Y.E., and Steitz, J.A. (2014). Virus meets host microRNA: the destroyer, the booster, the hijacker. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 3780–3787.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* *466*, 835–840.
- Haas, G., Cetin, S., Messmer, M., Chane-Woon-Ming, B., Terenzi, O., Chicher, J., Kuhn, L., Hammann, P., and Pfeffer, S. (2016). Identification of factors involved in target RNA-directed microRNA degradation. *Nucleic Acids Res.* *44*, 2873–2887.
- Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* *6*, 961–967.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jungkamp, A.-C., Munschauer, M., et al. (2010). Transcriptome-wide

- Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129–141.
- Hähle, A., Merz, S., Meyners, C., and Hausch, F. (2019). The Many Faces of FKBP51. *Biomolecules* **9**, 35.
- Han, C., Liu, Y., Wan, G., Choi, H.J., Zhao, L., Ivan, C., He, X., Sood, A.K., Zhang, X., and Lu, X. (2014). The RNA-Binding Protein DDX1 Promotes Primary MicroRNA Maturation and Inhibits Ovarian Tumor Progression. *Cell Rep.* **8**, 1447–1460.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* **125**, 887–901.
- Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.-K., Yeom, K.-H., Yang, W.-Y., Haussler, D., Blelloch, R., and Kim, V.N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* **136**, 75–84.
- Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **495**, 384–388.
- Harkins, L., Volk, A.L., Samanta, M., Mikolaenko, I., Britt, W.J., Bland, K.I., and Cobbs, C.S. (2002). Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *THE LANCET* **360**, 7.
- Harkins, L.E., Matlaf, L.A., Soroceanu, L., Klemm, K., Britt, W.J., Wang, W., Bland, K.I., and Cobbs, C.S. (2010). Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium. *Herpesviridae* **1**, 8.
- Hauptmann, J., Schraivogel, D., Bruckmann, A., Manickavel, S., Jakob, L., Eichner, N., Pfaff, J., Urban, M., Sprunck, S., Hafner, M., et al. (2015). Biochemical isolation of Argonaute protein complexes by Ago-APP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 11841–11845.
- Hentze, M.W., Castello, A., Schwarzl, T., and Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 327–341.
- Heo, I., Ha, M., Lim, J., Yoon, M.-J., Park, J.-E., Kwon, S.C., Chang, H., and Kim, V.N. (2012). Mono-Uridylation of Pre-MicroRNA as a Key Step in the Biogenesis of Group II let-7 MicroRNAs. *Cell* **151**, 521–532.
- Herbert, K.M., Pimienta, G., DeGregorio, S.J., Alexandrov, A., and Steitz, J.A. (2013). Phosphorylation of DGCR8 Increases Its Intracellular Stability and Induces a Progrowth miRNA Profile. *Cell Rep.* **5**, 1070–1081.
- Hondele, M., Sachdev, R., Heinrich, S., Wang, J., Vallotton, P., Fontoura, B.M.A., and Weis, K. (2019). DEAD-box ATPases are global regulators of phase-separated organelles. *Nature* **573**, 144–148.

- Hong, S., Noh, H., Chen, H., Padia, R., Pan, Z.K., Su, S.-B., Jing, Q., Ding, H.-F., and Huang, S. (2013). Signaling by p38 MAPK Stimulates Nuclear Localization of the Microprocessor Component p68 for Processing of Selected Primary MicroRNAs. *Sci. Signal.* *6*, ra16–ra16.
- Horman, S.R., Janas, M.M., Litterst, C., Wang, B., MacRae, I.J., Sever, M.J., Morrissey, D.V., Graves, P., Luo, B., Umesalma, S., et al. (2013). Akt-Mediated Phosphorylation of Argonaute 2 Downregulates Cleavage and Upregulates Translational Repression of MicroRNA Targets. *Mol. Cell* *50*, 356–367.
- Hsu, C.-Y., Chang, N.-C., Lee, M.W.-Y., Lee, K.-H., Sun, D.-S., Lai, C., and Chang, A.C. (2008). LUZP deficiency affects neural tube closure during brain development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *376*, 466–471.
- Hsu, D.-H., Malefyt, R.D.W., Fiorentino, D.F., Dang, M.-N., Vieira, P., Devries, J., Spits, H., Mosmann, T.R., and MOOREt, K.W. (1990). Expression of Interleukin-10 Activity by Epstein-Barr Virus Protein BCRJFI. *Science* *250*, 830–832.
- Humphries, F., and Fitzgerald, K.A. (2019). hnRNPA2B1: Fueling Antiviral Immunity from the Nucleus. *Mol. Cell* *76*, 8–10.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 99–110.
- Huntzinger, E., Braun, J.E., Heimstädt, S., Zekri, L., and Izaurralde, E. (2010). Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J.* *29*, 4146–4160.
- Huntzinger, E., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Braun, J.E., Eulalio, A., Wohlbold, L., and Izaurralde, E. (2013). The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res.* *41*, 978–994.
- Hutvagner, G. (2001). A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science* *293*, 834–838.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol* *2*, E98.
- Hwang, H.-W., Wentzel, E.A., and Mendell, J.T. (2007). A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* *315*, 97–100.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., and Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Mol. Cell* *39*, 292–299.
- Iwasaki, S., Sasaki, H.M., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Tadakuma, H., and Tomari, Y. (2015). Defining fundamental steps in the assembly of the Drosophila RNAi enzyme complex. *Nature*.

- Iwasaki, Y.W., Kiga, K., Kayo, H., Fukuda-Yuzawa, Y., Weise, J., Inada, T., Tomita, M., Ishihama, Y., and Fukao, T. (2013). Global microRNA elevation by inducible Exportin 5 regulates cell cycle entry. *RNA* *19*, 490–497.
- Jackson, J., and Sparer, T. (2018). There Is Always Another Way! Cytomegalovirus' Multifaceted Dissemination Schemes. *Viruses* *10*, 383.
- Jacob, H., Stanisavljevic, L., Storli, K.E., Hestetun, K.E., Dahl, O., and Myklebust, M.P. (2018). A four-microRNA classifier as a novel prognostic marker for tumor recurrence in stage II colon cancer. *Sci. Rep.* *8*.
- Jahic, A., Kreuz, F., Zacher, P., Fiedler, J., Bier, A., Reif, S., Rieger, M., Krüger, S., Beetz, C., and Plaschke, J. (2014). A novel strumpellin mutation and potential pitfalls in the molecular diagnosis of hereditary spastic paraplegia type SPG8. *J. Neurol. Sci.* *347*, 372–374.
- Jee, D., Yang, J.-S., Park, S.-M., Farmer, D.T., Wen, J., Chou, T., Chow, A., McManus, M.T., Kharas, M.G., and Lai, E.C. (2018). Dual Strategies for Argonaute2-Mediated Biogenesis of Erythroid miRNAs Underlie Conserved Requirements for Slicing in Mammals. *Mol. Cell* *69*, 265-278.e6.
- Ji, L., Ni, T., Shen, Y., Xue, Q., Liu, Y., Chen, B., Cui, X., Lv, L., Yu, X., Cui, Y., et al. (2014). Transformer 2 β (Tra2 β /SFRS10) positively regulates the progression of NSCLC via promoting cell proliferation. *J. Mol. Histol.* *45*, 573–582.
- Jin, H., Suh, M.R., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, Y., Heo, I., Ha, M., Hyun, S., and Kim, V.N. (2009). Human UPF1 Participates in Small RNA-Induced mRNA Downregulation. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 5789–5799.
- Jinek, M., Fabian, M.R., Coyle, S.M., Sonenberg, N., and Doudna, J.A. (2010). Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 238–240.
- Johnston, M., Geoffroy, M.-C., Sobala, A., Hay, R., and Hutvagner, G. (2010). HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol. Biol. Cell* *21*, 1462–1469.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2013). The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev.* *27*, 2628–2641.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* *16*, 421–433.
- Jones, M.R., Quinton, L.J., Blahna, M.T., Neilson, J.R., Fu, S., Ivanov, A.R., Wolf, D.A., and Mizgerd, J.P. (2009). Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1157–1163.
- Jones, M.R., Blahna, M.T., Kozlowski, E., Matsuura, K.Y., Ferrari, J.D., Morris, S.A., Powers, J.T., Daley, G.Q., Quinton, L.J., and Mizgerd, J.P. (2012). Zcchc11 uridylates mature miRNAs to enhance neonatal IGF-1 expression, growth, and survival. *PLoS Genet.* *8*, e1003105.

- Katase, N., Terada, K., Suzuki, T., Nishimatsu, S., and Nohno, T. (2015). miR-487b, miR-3963 and miR-6412 delay myogenic differentiation in mouse myoblast-derived C2C12 cells. *BMC Cell Biol.* *16*.
- Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T., and Suzuki, T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev.* *23*, 433–438.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Vrielink, J.A.F.O., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Ørom, U.A., et al. (2007). RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. *Cell* *131*, 1273–1286.
- Ketting, R.F. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* *15*, 2654–2659.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209–16.
- Kim, D.I., Jensen, S.C., Noble, K.A., Kc, B., Roux, K.H., Motamedchaboki, K., and Roux, K.J. (2016a). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* *27*, 1188–1196.
- Kim, D.I., Jensen, S.C., Noble, K.A., Kc, B., Roux, K.H., Motamedchaboki, K., and Roux, K.J. (2016b). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* *27*, 1188–1196.
- Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev.* *23*, 1743–1748.
- Kim, Y., Yeo, J., Lee, J.H., Cho, J., Seo, D., Kim, J.-S., and Kim, V.N. (2014). Deletion of Human tarbp2 Reveals Cellular MicroRNA Targets and Cell-Cycle Function of TRBP. *Cell Rep.* *9*, 1061–1074.
- Kim, Y.-K., Kim, B., and Kim, V.N. (2016c). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E1881-1889.
- Kingston, E.R., and Bartel, D.P. (2019). Global analyses of the dynamics of mammalian microRNA metabolism. *Genome Res.* *29*, 1777–1790.
- Kleaveland, B., Shi, C.Y., Stefano, J., and Bartel, D.P. (2018). A Network of Noncoding Regulatory RNAs Acts in the Mammalian Brain. *Cell* *174*, 350-362.e17.
- Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2013). *Fields Virology*, 6th Ed. In *Fields Virology*, 6th Ed, p.
- Kobayashi, H., and Tomari, Y. (2016). RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* *1859*, 71–81.
- Kotenko, S.V., Sacconi, S., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., and Pestka, S. (2000). Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 1695–1700.

- Kozlov, G., Safaee, N., Rosenauer, A., and Gehring, K. (2010). Structural Basis of Binding of P-body-associated Proteins GW182 and Ataxin-2 by the MLE Domain of Poly(A)-binding Protein. *J. Biol. Chem.* *285*, 13599–13606.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* *39*, D152-157.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* *42*, D68-73.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* *47*, D155–D162.
- Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M.B., Ribi, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H.J., Schubeler, D., et al. (2010). Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell* *141*, 618–631.
- Kropff, B., Burkhardt, C., Schott, J., Nentwich, J., Fisch, T., Britt, W., and Mach, M. (2012). Glycoprotein N of Human Cytomegalovirus Protects the Virus from Neutralizing Antibodies. *PLoS Pathog.* *8*, e1002999.
- Kundu, P., Fabian, M.R., Sonenberg, N., Bhattacharyya, S.N., and Filipowicz, W. (2012). HuR protein attenuates miRNA-mediated repression by promoting miRISC dissociation from the target RNA. *Nucleic Acids Res.* *40*, 5088–5100.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* *294*, 853–858.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 858–862.
- Lazaretti, D., Tournier, I., and Izaurralde, E. (2009). The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA* *15*, 1059–1066.
- Lee, Y. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* *21*, 4663–4670.
- Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 862–864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843-54.
- Lee, S., Song, J., Kim, S., Kim, J., Hong, Y., Kim, Y., Kim, D., Baek, D., and Ahn, K. (2013). Selective degradation of host MicroRNAs by an intergenic HCMV noncoding RNA accelerates virus production. *Cell Host Microbe* *13*, 678–690.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415–419.

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051–4060.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522–532.
- Leung, A.K.L., Young, A.G., Bhutkar, A., Zheng, G.X., Bosson, A.D., Nielsen, C.B., and Sharp, P.A. (2011). Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 237–244.
- Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* 115, 787–798.
- Li, J., Chen, X., Xiao, P., Li, L., Lin, W., Huang, J., and Xu, P. (2008). Expression Pattern and Splicing Function of Mouse ZNF265. *Neurochem. Res.* 33, 483–489.
- Li, R., Gong, Z., Pan, C., Xie, D.-D., Tang, J.-Y., Cui, M., Xu, Y.-F., Yao, W., Pang, Q., Xu, Z., et al. (2013). Metal-dependent protein phosphatase 1A functions as an extracellular signal-regulated kinase phosphatase. *FEBS J.* 280, 2700–2711.
- Lian, S.L., Li, S., Abadal, G.X., Pauley, B.A., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2009a). The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *RNA* 15, 804–813.
- Lian, S.L., Li, S., Abadal, G.X., Pauley, B.A., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2009b). The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *RNA* 15, 804–813.
- Libri, V., Helwak, A., Miesen, P., Santhakumar, D., Borger, J.G., Kudla, G., Grey, F., Tollervey, D., and Buck, A.H. (2012). Murine cytomegalovirus encodes a miR-27 inhibitor disguised as a target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 279–284.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol* 11, 576–577.
- Link, S., Grund, S.E., and Diederichs, S. (2016). Alternative splicing affects the subcellular localization of Drosha. *Nucleic Acids Res.* 44, 5330–5343.
- Liu, H., Liang, C., Kollipara, R.K., Matsui, M., Ke, X., Jeong, B.-C., Wang, Z., Yoo, K.S., Yadav, G.P., Kinch, L.N., et al. (2016). HP1BP3, a Chromatin Retention Factor for Co-transcriptional MicroRNA Processing. *Mol. Cell* 63, 420–432.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.*

- Liu, J., Huang, B., Xiao, Y., Xiong, H.-M., Li, J., Feng, D.-Q., Chen, X.-M., Zhang, H.-B., and Wang, X.-Z. (2012). Aberrant Expression of Splicing Factors in Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia. *Onkologie* 35, 335–340.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P., and Wang, X. (2003). R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* 301, 1921–1925.
- Liu, Z., Wang, J., Cheng, H., Ke, X., Sun, L., Zhang, Q.C., and Wang, H.-W. (2018). Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate. *Cell* 173, 1191-1203.e12.
- Loerch, S., and Kielkopf, C.L. (2016). Unmasking the U2AF homology motif family: a bona fide protein–protein interaction motif in disguise. *RNA* 22, 1795–1807.
- Lund, E. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303, 95–98.
- Lustig, S., and Strauss', J.H. (1988). Molecular Basis of Sindbis Virus Neurovirulence in Mice. *J VIROL* 62, 8.
- Ma, J.B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318–322.
- MacRae, I.J. (2006). Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* 311, 195–198.
- Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 19, 2979–2990.
- Marcinowski, L., Tanguy, M., Krmpotic, A., Rädle, B., Lisnić, V.J., Tuddenham, L., Chane-Woon-Ming, B., Ruzsics, Z., Erhard, F., Benkartek, C., et al. (2012). Degradation of cellular mir-27 by a novel, highly abundant viral transcript is important for efficient virus replication in vivo. *PLoS Pathog.* 8, e1002510.
- Martinez, N.J., and Gregory, R.I. (2013). Argonaute2 expression is post-transcriptionally coupled to microRNA abundance. *RNA* 19, 605–612.
- Martinez, I., Hayes, K.E., Barr, J.A., Harold, A.D., Xie, M., Bukhari, S.I.A., Vasudevan, S., Steitz, J.A., and DiMaio, D. (2017). An Exportin-1–dependent microRNA biogenesis pathway during human cell quiescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, E4961–E4970.
- de la Mata, M., Gaidatzis, D., Vitanescu, M., Stadler, M.B., Wentzel, C., Scheiffele, P., Filipowicz, W., and Großhans, H. (2015). Potent degradation of neuronal miRNAs induced by highly complementary targets. *EMBO Rep.* 16, 500–511.
- Matsui, M., Li, L., Janowski, B.A., and Corey, D.R. (2015). Reduced Expression of Argonaute 1, Argonaute 2 and TRBP Changes Levels and Intracellular Distribution of RNAi Factors. *Sci. Rep.* 5.

- Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Pétrilli, V., and Tschopp, J. (2007). A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat. Immunol.* *8*, 497–503.
- Meacham, G.C. (1999). The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J.* *18*, 1492–1505.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* *15*, 185–197.
- Melo, S.A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., et al. (2010). A Genetic Defect in Exportin-5 Traps Precursor MicroRNAs in the Nucleus of Cancer Cells. *Cancer Cell* *18*, 303–315.
- Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S.D., Gregersen, L.H., Munschauer, M., et al. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* *495*, 333–338.
- Michlewski, G., and Cáceres, J.F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1011–1018.
- Michlewski, G., Guil, S., Semple, C.A., and Cáceres, J.F. (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol. Cell* *32*, 383–393.
- Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* *16*, 495–505.
- Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I., and Proudfoot, N.J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 902–909.
- Moy, R.H., Cole, B.S., Yasunaga, A., Gold, B., Shankarling, G., Varble, A., Molleston, J.M., tenOever, B.R., Lynch, K.W., and Cherry, S. (2014). Stem-Loop Recognition by DDX17 Facilitates miRNA Processing and Antiviral Defense. *Cell* *158*, 764–777.
- Mukherjee, N., Corcoran, D.L., Nusbaum, J.D., Reid, D.W., Georgiev, S., Hafner, M., Ascano Jr., M., Tuschl, T., Ohler, U., and Keene, J.D. (2011). Integrative Regulatory Mapping Indicates that the RNA-Binding Protein HuR Couples Pre-mRNA Processing and mRNA Stability. *Mol. Cell* *43*, 327–339.
- Mullen, T.E., and Marzluff, W.F. (2008). Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. *Genes Dev.* *22*, 50–65.
- Nakanishi, K. (2016). Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins?: Anatomy of RISC. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *7*, 637–660.
- Nakanishi, K., Weinberg, D.E., Bartel, D.P., and Patel, D.J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* *486*, 368–374.

- Nguyen, C.C., and Kamil, J.P. (2018). Pathogen at the Gates: Human Cytomegalovirus Entry and Cell Tropism.
- Nguyen, T.A., Jo, M.H., Choi, Y.-G., Park, J., Kwon, S.C., Hohng, S., Kim, V.N., and Woo, J.-S. (2015). Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* *161*, 1374–1387.
- Niaz, S., and Hussain, M.U. (2018). Role of GW182 protein in the cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *101*, 29–38.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* *326*, 1275–1279.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* *130*, 89–100.
- Osborn, J.E., and Walker, D.L. (1968). Enhancement of infectivity of Murine Cytomegalovirus in vitro by centrifugal inoculation. *J. Virol.* *2*, 853–858.
- Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* *22*, 3172–3183.
- Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D.K., Chang, H., Jee, D., Patel, D.J., and Kim, V.N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* *475*, 201–205.
- Park, M.S., Phan, H.-D., Busch, F., Hinckley, S.H., Brackbill, J.A., Wysocki, V.H., and Nakanishi, K. (2017). Human Argonaute3 has slicer activity. *Nucleic Acids Res.* *45*, 11867–11877.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* *434*, 663–666.
- Paroo, Z., Ye, X., Chen, S., and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the Human MicroRNA-Generating Complex Mediates MAPK/Erk Signaling. *Cell* *139*, 112–122.
- Perez, Y., Menascu, S., Cohen, I., Kadir, R., Basha, O., Shorer, Z., Romi, H., Meiri, G., Rabinski, T., Ofir, R., et al. (2018). RSRC1 mutation affects intellect and behaviour through aberrant splicing and transcription, downregulating IGFBP3. *Brain* *141*, 961–970.
- Persson, J., and Ekwall, K. (2010). Chd1 remodelers maintain open chromatin and regulate the epigenetics of differentiation. *Exp. Cell Res.* *316*, 1316–1323.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., et al. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* *2*, 269–276.
- Piazzon, N., Maisonneuve, C., Guilleret, I., Rotman, S., and Constam, D.B. (2012). Bicc1 links the regulation of cAMP signaling in polycystic kidneys to microRNA-induced gene silencing. *J. Mol. Cell Biol.* *4*, 398–408.

Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573–1576.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-29.

Qi, H.H., Ongusaha, P.P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S.W., Peng, J., and Shi, Y. (2008). Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature* 455, 421–424.

Quévillon Huberdeau, M., Zeitler, D.M., Hauptmann, J., Bruckmann, A., Fressigné, L., Danner, J., Piquet, S., Strieder, N., Engelmann, J.C., Jannot, G., et al. (2017). Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for micro RNA -guided gene silencing *in vivo*. *EMBO J.* 36, 2088–2106.

Rawlinson, W.D., Boppana, S.B., Fowler, K.B., Kimberlin, D.W., Lazzarotto, T., Alain, S., Daly, K., Doutré, S., Gibson, L., Giles, M.L., et al. (2017). Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect. Dis.* 17, e177–e188.

Reddehase, M.J., and Lemmermann, N.A.W. (2019). Cellular reservoirs of latent cytomegaloviruses. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 208, 391–403.

Reichholf, B., Herzog, V.A., Fasching, N., Manzenreither, R.A., Sowemimo, I., and Ameres, S.L. (2019). Time-Resolved Small RNA Sequencing Unravels the Molecular Principles of MicroRNA Homeostasis. *Mol. Cell* 75, 756-768.e7.

Reimão-Pinto, M.M., Ignatova, V., Burkard, T.R., Hung, J.-H., Manzenreither, R.A., Sowemimo, I., Herzog, V.A., Reichholf, B., Fariña-Lopez, S., and Ameres, S.L. (2015). Uridylation of RNA Hairpins by Tailor Confines the Emergence of MicroRNAs in *Drosophila*. *Mol. Cell* 59, 203–216.

Rhee, H.-W., Zou, P., Udeshi, N.D., Martell, J.D., Mootha, V.K., Carr, S.A., and Ting, A.Y. (2013). Proteomic Mapping of Mitochondria in Living Cells via Spatially Restricted Enzymatic Tagging. *Science* 339, 1328–1331.

Riley, K.J., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2012). Association of Argonaute proteins and microRNAs can occur after cell lysis. *RNA* 18, 1581–1585.

Rissland, O.S., Hong, S.-J., and Bartel, D.P. (2011). MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes. *Mol. Cell* 43, 993–1004.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 1902–1910.

Roizman, B., and Pellet, P.E. (2001). The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In *Fields Virology*, B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 2381–2396.

Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012a). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *196*, 801–810.

Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012b). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *196*, 801–810.

Roux, K.J., Kim, D.I., and Burke, B. (2013). BioID: a screen for protein-protein interactions. *Curr. Protoc. Protein Sci.* Editor. Board John E Coligan AI 74, Unit 19.23.

Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* *448*, 83–86.

Rybak, A., Fuchs, H., Hadian, K., Smirnova, L., Wulczyn, E.A., Michel, G., Nitsch, R., Krappmann, D., and Wulczyn, F.G. (2009). The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1411–1420.

Saetrom, P., Heale, B.S.E., Snøve, O., Aagaard, L., Alluin, J., and Rossi, J.J. (2007). Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res.* *35*, 2333–2342.

Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., Hatano, E., Fukushima, A., Taniguchi, T., and Agata, Y. (2009). The NF90-NF45 Complex Functions as a Negative Regulator in the MicroRNA Processing Pathway. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3754–3769.

Salomon, W.E., Jolly, S.M., Moore, M.J., Zamore, P.D., and Serebrov, V. (2015). Single-Molecule Imaging Reveals that Argonaute Reshapes the Binding Properties of Its Nucleic Acid Guides. *Cell* *162*, 84–95.

Samir, P., Kesavardhana, S., Patmore, D.M., Gingras, S., Malireddi, R.K.S., Karki, R., Guy, C.S., Briard, B., Place, D.E., Bhattacharya, A., et al. (2019). DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome. *Nature* *573*, 590–594.

Saraiva, M., and O’Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 170–181.

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., and Moarefi, I. Structure of TPR Domain–Peptide Complexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70–Hsp90 Multichaperone Machine. *12*.

Schirle, N.T., and MacRae, I.J. (2012). The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science* *336*, 1037–1040.

- Schmid, M., Kuchler, B., and Eckmann, C.R. (2009). Two conserved regulatory cytoplasmic poly(A) polymerases, GLD-4 and GLD-2, regulate meiotic progression in *C. elegans*. *Genes Dev.* *23*, 824–836.
- Schopp, I.M., Amaya Ramirez, C.C., Debeljak, J., Kreibich, E., Skribbe, M., Wild, K., and Béthune, J. (2017). Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nat. Commun.* *8*.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.
- Schwarz, D.S., Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2004). The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. *Curr Biol* *14*, 787–791.
- Sen, G.L., and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 633–636.
- Sethi, P., and Lukiw, W.J. (2009). Micro-RNA abundance and stability in human brain: specific alterations in Alzheimer’s disease temporal lobe neocortex. *Neurosci. Lett.* *459*, 100–104.
- Sheu-Gruttadauria, J., and MacRae, I.J. (2018). Phase Transitions in the Assembly and Function of Human miRISC. *Cell* *173*, 946-957.e16.
- Sheu-Gruttadauria, J., Pawlica, P., Klum, S.M., Wang, S., Yario, T.A., Oakdale, N.T.S., Steitz, J.A., and MacRae, I.J. (2019). Structural Basis for Target-Directed MicroRNA Degradation. *SSRN Electron. J.*
- Shkreta, L., Toutant, J., Durand, M., Manley, J.L., and Chabot, B. (2016). SRSF10 Connects DNA Damage to the Alternative Splicing of Transcripts Encoding Apoptosis, Cell-Cycle Control, and DNA Repair Factors. *Cell Rep.* *17*, 1990–2003.
- Smibert, P., Yang, J.-S., Azzam, G., Liu, J.-L., and Lai, E.C. (2013). Homeostatic control of Argonaute stability by microRNA availability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 789–795.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434–1437.
- Song, L., Rijal, R., Karow, M., Stumpf, M., Hahn, O., Park, L., Insall, R., Schröder, R., Hofmann, A., Clemen, C.S., et al. (2018). Expression of N471D strumpellin leads to defects in the endolysosomal system. *Dis. Model. Mech.* *11*, dmm033449.
- Su, H., Meng, S., Lu, Y., Trombly, M.I., Chen, J., Lin, C., Turk, A., and Wang, X. (2011). Mammalian hyperplastic discs Homolog EDD Regulates miRNA-Mediated Gene Silencing. *Mol. Cell* *43*, 97–109.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* *460*, 529–533.

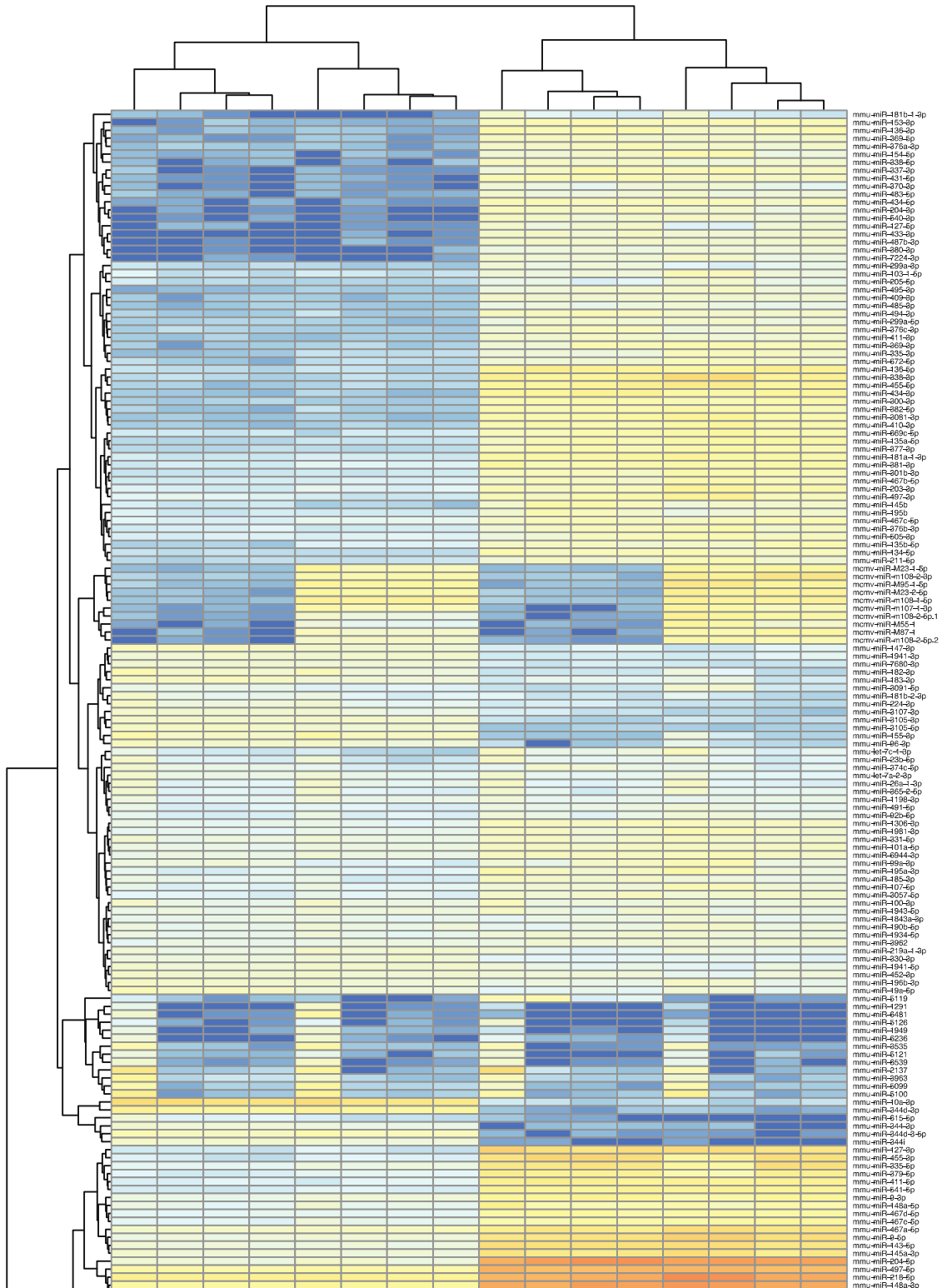
- Suzuki, H.I., Katsura, A., Yasuda, T., Ueno, T., Mano, H., Sugimoto, K., and Miyazono, K. (2015). Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 512–521.
- Takimoto, K., Wakiyama, M., and Yokoyama, S. (2009). Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA* *15*, 1078–1089.
- Tang, X., Wen, S., Zheng, D., Tucker, L., Cao, L., Pantazatos, D., Moss, S.F., and Ramratnam, B. (2013). Acetylation of Drosha on the N-Terminus Inhibits Its Degradation by Ubiquitination. *PLOS ONE* *8*, e72503.
- Taniguchi, Y. (2016). The Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Family: Functional Anatomy of BET Paralogous Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 1849.
- Tarallo, R., Giurato, G., Bruno, G., Ravo, M., Rizzo, F., Salvati, A., Ricciardi, L., Marchese, G., Cordella, A., Rocco, T., et al. (2017). The nuclear receptor ER β engages AGO2 in regulation of gene transcription, RNA splicing and RISC loading. *Genome Biol.* *18*.
- Thornton, J.E., Du, P., Jing, L., Sjekloca, L., Lin, S., Grossi, E., Sliz, P., Zon, L.I., and Gregory, R.I. (2015). Selective microRNA uridylation by Zcchc6 (TUT7) and Zcchc11 (TUT4). *Nucleic Acids Res.* *42*, 11777–11791.
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P.D. (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* *306*, 1377–1380.
- Treiber, T., Treiber, N., Plessmann, U., Harlander, S., Daiß, J.-L., Eichner, N., Lehmann, G., Schall, K., Urlaub, H., and Meister, G. (2017). A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis. *Mol. Cell* *66*, 270-284.e13.
- Treiber, T., Treiber, N., and Meister, G. (2018). Identification of microRNA Precursor-Associated Proteins. In *MiRNA Biogenesis*, U.A.V. Ørom, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 103–114.
- Tsuboyama, K., Tadakuma, H., and Tomari, Y. (2018). Conformational Activation of Argonaute by Distinct yet Coordinated Actions of the Hsp70 and Hsp90 Chaperone Systems. *Mol. Cell* *70*, 722-729.e4.
- Tu, S., Teng, Y.-C., Yuan, C., Wu, Y.-T., Chan, M.-Y., Cheng, A.-N., Lin, P.-H., Juan, L.-J., and Tsai, M.-D. (2008). The ARID domain of the H3K4 demethylase RBP2 binds to a DNA CCGCC motif. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 419–421.
- Tuddenham, L., and Pfeffer, S. (2011). Roles and regulation of microRNAs in cytomegalovirus infection. *Biochim. Biophys. Acta* *1809*, 613–622.
- Ustianenko, D., Hrossova, D., Potesil, D., Chalupnikova, K., Hrazdilova, K., Pachernik, J., Cetkovska, K., Uldrijan, S., Zdrahal, Z., and Vanacova, S. (2013). Mammalian DIS3L2 exoribonuclease targets the uridylated precursors of let-7 miRNAs. *RNA* *19*, 1632–1638.

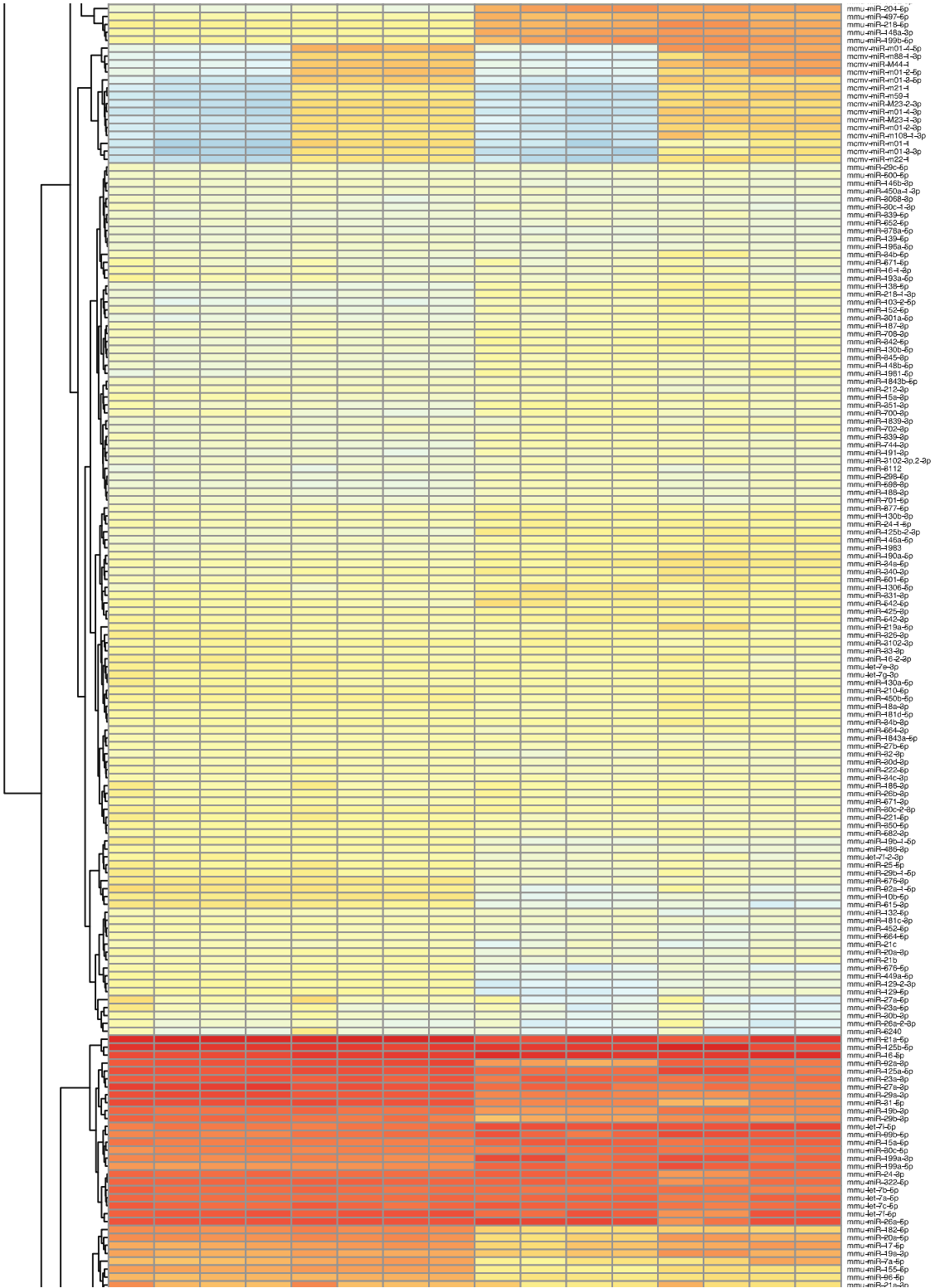
- Valdmanis, P.N., Gu, S., Schüermann, N., Sethupathy, P., Grimm, D., and Kay, M.A. (2012). Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene silencing. *Nucleic Acids Res.* *40*, 3704–3713.
- Van Wynsberghe, P.M., Kai, Z.S., Massirer, K.B., Burton, V.H., Yeo, G.W., and Pasquinelli, A.E. (2011). LIN-28 co-transcriptionally binds primary let-7 to regulate miRNA maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 302–308.
- Varjosalo, M., Sacco, R., Stukalov, A., van Drogen, A., Planyavsky, M., Hauri, S., Aebersold, R., Bennett, K.L., Colinge, J., Gstaiger, M., et al. (2013). Interlaboratory reproducibility of large-scale human protein-complex analysis by standardized AP-MS. *Nat. Methods* *10*, 307–314.
- Vasudevan, S., and Steitz, J.A. (2007). AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* *128*, 1105–1118.
- Wada, T., Kikuchi, J., and Furukawa, Y. (2012). Histone deacetylase 1 enhances microRNA processing via deacetylation of DGCR8. *EMBO Rep.* *13*, 142–149.
- Wang, T., Liu, Y., Yuan, W., Zhang, L., Zhang, Y., Wang, Z., Zhou, X., Zhou, H., Chu, T., Hao, Y., et al. (2015). Identification of microRNAs in rat bladder reveals miR-1949 as a potential inducer of bladder cancer following spinal cord injury. *Mol. Med. Rep.* *12*, 2849–2857.
- Wang, T., Liu, X., Tian, Q., Liang, T., and Chang, P. (2017) Increasing expression of miR-5100 in non-small-cell lung cancer and correlation with prognosis. *6*.
- Wen, J., Ladewig, E., Shenker, S., Mohammed, J., and Lai, E.C. (2015). Analysis of Nearly One Thousand Mammalian Mirtrons Reveals Novel Features of Dicer Substrates. *PLOS Comput. Biol.* *11*, e1004441.
- White, M.R., and Garcin, E.D. (2017). D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Structure and Function. In *Macromolecular Protein Complexes*, J.R. Harris, and J. Marles-Wright, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 413–453.
- Wille, P.T., Wisner, T.W., Ryckman, B., and Johnson, D.C. (2013). Human Cytomegalovirus (HCMV) Glycoprotein gB Promotes Virus Entry In Trans Acting as the Viral Fusion Protein Rather than as a Receptor-Binding Protein. *MBio* *4*.
- Wilson, R.C., Tambe, A., Kidwell, M.A., Noland, C.L., Schneider, C.P., and Doudna, J.A. (2015). Dicer-TRBP Complex Formation Ensures Accurate Mammalian MicroRNA Biogenesis. *Mol. Cell* *57*, 397–407.
- Wu, C., So, J., Davis-Dusenbery, B.N., Qi, H.H., Bloch, D.B., Shi, Y., Lagna, G., and Hata, A. (2011). Hypoxia Potentiates MicroRNA-Mediated Gene Silencing through Posttranslational Modification of Argonaute2. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 4760–4774.
- Wu, F., Tao, L., Gao, S., Ren, L., Wang, Z., Wang, S., Tian, J., and An, L. (2017). miR-6539 is a novel mediator of somatic cell reprogramming that represses the translation of *Dnmt3b*. *J. Reprod. Dev.* *63*, 415–423.

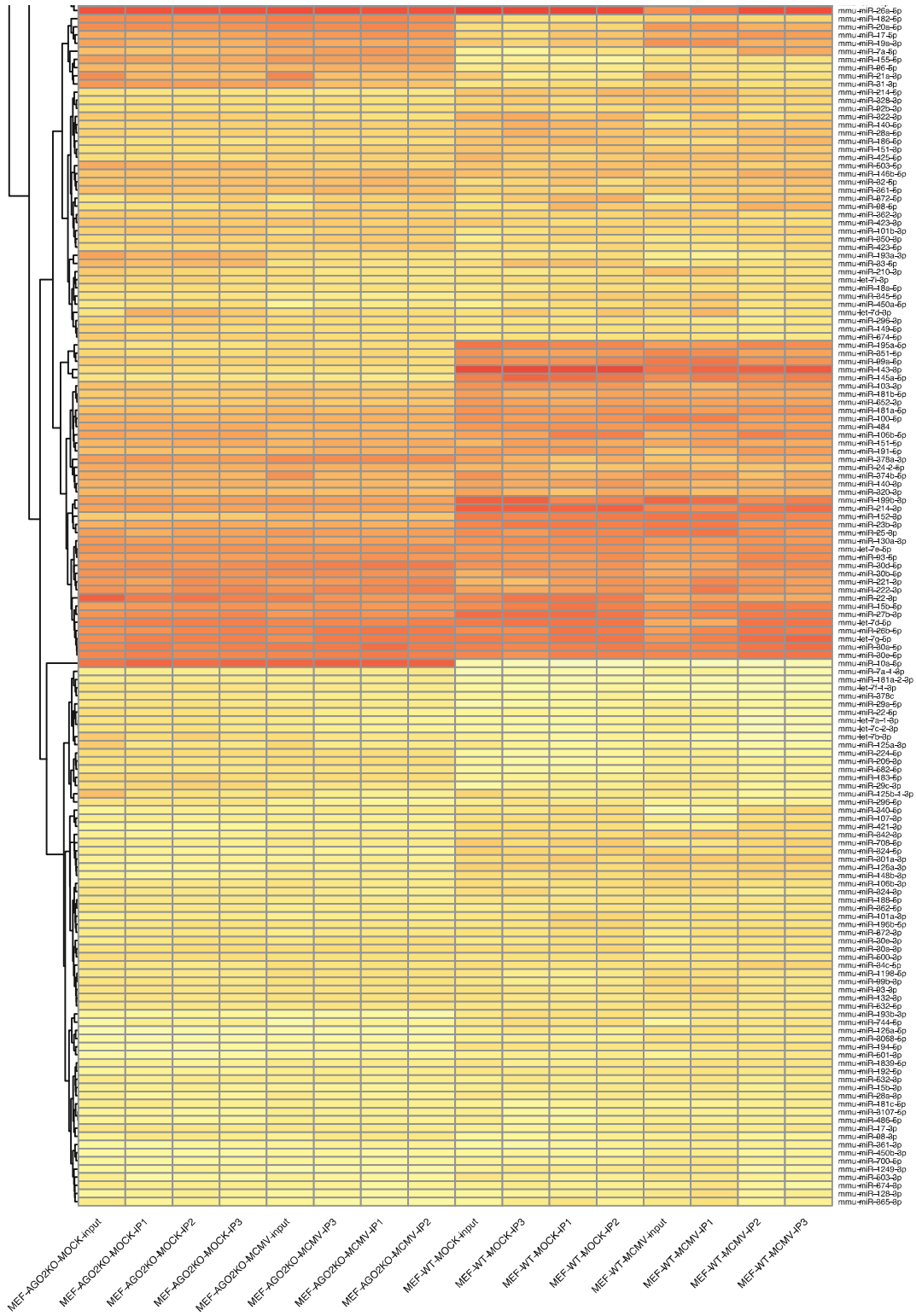
- Wu, N., Ren, D., Li, S., Ma, W., Hu, S., Jin, Y., and Xiao, S. (2018). RCC2 over-expression in tumor cells alters apoptosis and drug sensitivity by regulating Rac1 activation. *BMC Cancer* 18.
- Wu, S.-L., Fu, X., Huang, J., Jia, T.-T., Zong, F.-Y., Mu, S.-R., Zhu, H., Yan, Y., Qiu, S., Wu, Q., et al. (2015). Genome-wide analysis of YB-1-RNA interactions reveals a novel role of YB-1 in miRNA processing in glioblastoma multiforme. *Nucleic Acids Res.* 43, 8516–8528.
- Wu, Y., Zheng, X., Ding, Y., Zhou, M., Wei, Z., Liu, T., and Liao, K. (2019). The molecular chaperone Hsp90 α deficiency causes retinal degeneration by disrupting Golgi organization and vesicle transportation in photoreceptors. *J. Mol. Cell Biol.*
- Wyman, S.K., Knouf, E.C., Parkin, R.K., Fritz, B.R., Lin, D.W., Dennis, L.M., Krouse, M.A., Webster, P.J., and Tewari, M. (2011). Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Res.* 21, 1450–1461.
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.-D., Yartseva, V., Šestan, N., and Steitz, J.A. (2013). Mammalian 5'-Capped MicroRNA Precursors that Generate a Single MicroRNA. *Cell* 155, 1568–1580.
- Xie, N., Cui, H., Banerjee, S., Tan, Z., Salomao, R., Fu, M., Abraham, E., Thannickal, V.J., and Liu, G. (2014). miR-27a Regulates Inflammatory Response of Macrophages by Targeting IL-10. *J. Immunol.* 193, 327–334.
- Yamazawa, R., Jiko, C., Choi, S., Park, I.Y., Nakagawa, A., Yamashita, E., and Lee, S.J. (2018). Structural Basis for Selective Binding of Export Cargoes by Exportin-5. *Structure* 26, 1393-1398.e2.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., and Zhou, M.M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426, 468-74.
- Yang, U., Yang, H.-Y., Kim, J.-S., and Lee, T.-H. (2012). The functional role of UBA1 cysteine-278 in ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427, 587–592.
- Yang, Y., Guo, J.-X., and Shao, Z.-Q. (2017). miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 87–91.
- Yekta, S., Shih, I.H., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304, 594–596.
- Yi, R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016.
- Yoda, M., Cifuentes, D., Izumi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Giraldez, A.J., and Tomari, Y. (2013). Poly(A)-Specific Ribonuclease Mediates 3'-End Trimming of Argonaute2-Cleaved Precursor MicroRNAs. *Cell Rep.* 5, 715–726.

- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstadt, S., and Izaurralde, E. (2009). The Silencing Domain of GW182 Interacts with PABPC1 To Promote Translational Repression and Degradation of MicroRNA Targets and Is Required for Target Release. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 6220–6231.
- Zgajnar, N., De Leo, S., Lotufo, C., Erlejman, A., Piwien-Pilipuk, G., and Galigniana, M. (2019). Biological Actions of the Hsp90-binding Immunophilins FKBP51 and FKBP52. *Biomolecules* *9*, 52.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* *118*, 57–68.
- Zhang, J., Ren, L., Yu, M., Liu, X., Ma, W., Huang, L., Li, X., and Ye, X. (2019). S-equal inhibits proliferation and promotes apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via regulating miR-10a-5p and PI3K/AKT pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* *672*, 108064.
- Zhao, L., Mao, Y., Zhao, Y., and He, Y. (2016). DDX3X promotes the biogenesis of a subset of miRNAs and the potential roles they played in cancer development. *Sci. Rep.* *6*.
- Zheng, Q., Hou, J., Zhou, Y., Li, Z., and Cao, X. (2017). The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m6A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus. *Nat. Immunol.* *18*, 1094–1103.
- Zhou, M., Lanchy, J.-M., and Ryckman, B.J. (2015). Human Cytomegalovirus gH/gL/gO Promotes the Fusion Step of Entry into All Cell Types, whereas gH/gL/UL128-131 Broadens Virus Tropism through a Distinct Mechanism. *J. Virol.* *89*, 8999–9009.
- Zhu, C., Chen, C., Huang, J., Zhang, H., Zhao, X., Deng, R., Dou, J., Jin, H., Chen, R., Xu, M., et al. (2015). SUMOylation at K⁷⁰⁷ of DGCR8 controls direct function of primary microRNA. *Nucleic Acids Res.* *43*, 7945–7960.
- Zipprich, J.T., Bhattacharyya, S., Mathys, H., and Filipowicz, W. (2009). Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA N. Y.* *N 15*, 781–793.
- Zou, L.-H., Shang, Z.-F., Tan, W., Liu, X.-D., Xu, Q.-Z., Song, M., Wang, Y., Guan, H., Zhang, S.-M., Yu, L., et al. (2015). TNKS1BP1 functions in DNA double-strand break repair through facilitating DNA-PKcs autophosphorylation dependent on PARP-1. *Oncotarget* *6*.

ANNEXE 1 : Heat map des miARN cellulaires et viraux dans la banque de petits à ARN.







ANNEXE 2 : Comparaison B2A avec B2A-L (MOCK)

	B2A.MOCK	B2A.L.MOCK	deltaSC	lFC.Av	LogFC	p.value	adjp
FlagHABioID2-LINKERmAGO2	0	556.3	-556.3	-Inf	-12.08	4.756e-200	5.555e-197
FlagHABioID2mAGO2	293.7	0	293.7	Inf	11.24	1.257e-146	7.339e-144
PLEC_MOUSE	137.3	323.3	-186	-1.154	-1.154	3.403e-33	1.325e-30
PPM1A_MOUSE	0	76.7	-76.7	-Inf	-9.226	2.362e-32	6.896e-30
NUDC_MOUSE	0.3	25.7	-25.4	-6.168	-5.745	7.192e-20	1.68e-17
MAP1B_MOUSE	1	27.3	-26.3	-4.711	-4.534	8.649e-19	1.684e-16
FKBP5_MOUSE	1.3	28	-26.7	-4.301	-4.19	2.557e-15	4.267e-13
CD2AP_MOUSE	2.3	36.3	-34	-3.871	-3.808	3.612e-15	5.274e-13
BCAR1_MOUSE	12.3	56.3	-44	-2.11	-2.099	5.217e-14	6.771e-12
NEST_MOUSE	1	22.3	-21.3	-4.435	-4.243	6.165e-14	7.2e-12
SGT1_MOUSE	0	15.3	-15.3	-Inf	-6.91	8.984e-14	8.745e-12
RTN4_MOUSE	1	24.7	-23.7	-4.519	-4.383	1.034e-13	9.292e-12
PRS7_MOUSE	0	14.3	-14.3	-Inf	-6.814	2.833e-13	2.364e-11
TXNL1_MOUSE	9	43	-34	-2.178	-2.161	3.465e-13	2.698e-11
HS90B_MOUSE	41.3	114.7	-73.4	-1.396	-1.391	5.902e-13	4.308e-11
AFAD_MOUSE	18	58	-40	-1.603	-1.6	5.216e-12	3.584e-10
FINC_MOUSE	24	3.3	20.7	2.939	2.882	8.713e-12	5.654e-10
COBL1_MOUSE	0	11.7	-11.7	-Inf	-6.52	4.086e-11	2.512e-09
RCC2_MOUSE	103.7	46	57.7	1.255	1.252	4.352e-11	2.542e-09
ZO1_MOUSE	97.7	216.7	-119	-1.067	-1.067	4.837e-10	2.69e-08
RPAP3_MOUSE	1	15	-14	-3.805	-3.672	9.065e-10	4.813e-08
SRSF3_MOUSE	154	52.7	101.3	1.628	1.625	1.256e-09	6.378e-08
GPN1_MOUSE	8.7	33.3	-24.6	-1.862	-1.848	1.824e-09	8.876e-08
CO1A1_MOUSE	9	0	9	Inf	6.23	2.216e-09	1.035e-07
VIME_MOUSE	9.7	38.3	-28.6	-1.912	-1.895	2.465e-09	1.107e-07
NU214_MOUSE	3	19.7	-16.7	-2.625	-2.584	4.66e-09	2.016e-07
HS105_MOUSE	0	9	-9	-Inf	-6.151	6.842e-09	2.854e-07
PDIA3_MOUSE	21.3	4.3	17	2.384	2.347	8.359e-09	3.367e-07
LRRF1_MOUSE	1	13.3	-12.3	-3.655	-3.505	8.883e-09	3.414e-07
WASC2_MOUSE	5.3	26	-20.7	-2.189	-2.177	9.152e-09	3.414e-07
TLN1_MOUSE	13	53.7	-40.7	-1.957	-1.951	9.354e-09	3.414e-07
STRN_MOUSE	1	13.7	-12.7	-3.706	-3.539	1.229e-08	4.348e-07
TCPQ_MOUSE	9.7	35	-25.3	-1.775	-1.764	1.597e-08	5.487e-07
TB182_MOUSE	30	67.7	-37.7	-1.091	-1.089	2.285e-08	7.627e-07

RUVB2_MOUSE	2	18.3	-16.3	-3.1	-3.037	2.551e-08	7.998e-07
DAB2_MOUSE	3.7	20.3	-16.6	-2.39	-2.352	2.562e-08	7.998e-07
SR140_MOUSE	198.7	94	104.7	1.166	1.163	2.602e-08	7.998e-07
PKHG3_MOUSE	0.7	11.3	-10.6	-4.013	-3.781	4.831e-08	1.447e-06
ARGL1_MOUSE	53.3	21.7	31.6	1.374	1.372	7.403e-08	2.162e-06
F1142_MOUSE	0	8.3	-8.3	-Inf	-6.04	8.617e-08	2.396e-06
HS90A_MOUSE	17.7	53.3	-35.6	-1.519	-1.509	9.085e-08	2.468e-06
ICAL_MOUSE	4.3	20.7	-16.4	-2.161	-2.141	1.233e-07	3.272e-06
YAP1_MOUSE	5	22.3	-17.3	-2.074	-2.052	1.399e-07	3.631e-06
PLIN3_MOUSE	2.3	15	-12.7	-2.595	-2.541	6.475e-07	1.609e-05
SRS10_MOUSE	24.7	6	18.7	2.117	2.098	7.319e-07	1.781e-05
F10A1_MOUSE	0	6.3	-6.3	-Inf	-5.653	8.577e-07	2.004e-05
PPID_MOUSE	0	6.7	-6.7	-Inf	-5.723	1.003e-06	2.297e-05
CYBP_MOUSE	0	6.3	-6.3	-Inf	-5.652	1.269e-06	2.796e-05
CE170_MOUSE	1.3	11.3	-10	-3.003	-2.897	1.306e-06	2.825e-05
CAC1A_MOUSE	10.3	1.3	9	3.029	2.919	1.378e-06	2.926e-05
SC16A_MOUSE	4	23.3	-19.3	-2.457	-2.424	1.512e-06	3.153e-05
TRA2B_MOUSE	14.3	3	11.3	2.329	2.288	1.716e-06	3.516e-05
SNX1_MOUSE	0.3	8	-7.7	-4.478	-4.078	1.747e-06	3.519e-05
KTN1_MOUSE	4	20	-16	-2.234	-2.204	2.018e-06	3.976e-05
ERBIN_MOUSE	0	6	-6	-Inf	-5.575	2.042e-06	3.976e-05
DDX46_MOUSE	68.3	35	33.3	1.048	1.044	2.367e-06	4.532e-05
BICD2_MOUSE	23.3	52.3	-29	-1.085	-1.081	2.731e-06	5.124e-05
ACTC_MOUSE	54	27	27	1.075	1.075	2.764e-06	5.124e-05
FA83H_MOUSE	0	5.7	-5.7	-Inf	-5.495	3.659e-06	6.678e-05
ERC6L_MOUSE	3.7	16.3	-12.6	-2.069	-2.038	3.923e-06	6.967e-05
EF1D_MOUSE	4.7	22.7	-18	-2.208	-2.175	3.937e-06	6.967e-05
STAU2_MOUSE	6.7	0.3	6.4	4.374	3.958	4.712e-06	8.214e-05
SRSF7_MOUSE	32.3	13	19.3	1.396	1.386	5.888e-06	0.0001011
PSMD1_MOUSE	0	5.3	-5.3	-Inf	-5.409	6.527e-06	0.0001105
FKBP4_MOUSE	0.3	7	-6.7	-4.294	-3.89	7.124e-06	0.0001189
CHIP_MOUSE	0	5.3	-5.3	-Inf	-5.409	8.906e-06	0.0001465
UBP47_MOUSE	0	5.3	-5.3	-Inf	-5.411	1.149e-05	0.0001864
CKAP5_MOUSE	0.3	6.7	-6.4	-4.284	-3.821	1.335e-05	0.0002137
PRUN1_MOUSE	0	5	-5	-Inf	-5.317	1.36e-05	0.0002147
RC3H1_MOUSE	33.3	15	18.3	1.239	1.227	1.592e-05	0.000248
BAIP2_MOUSE	0	4.7	-4.7	-Inf	-5.222	2.176e-05	0.0003301
AB11_MOUSE	0	4.7	-4.7	-Inf	-5.221	2.252e-05	0.0003372

STIP1_MOUSE	3	14.3	-11.3	-2.176	-2.13	2.296e-05	0.0003394
HMGB2_MOUSE	23.3	8.3	15	1.575	1.554	3.384e-05	0.000488
CHM4B_MOUSE	2	10.7	-8.7	-2.343	-2.267	4.448e-05	0.0006336
ITPI2_MOUSE	0	4.3	-4.3	-Inf	-5.119	4.552e-05	0.0006406
LUC7L_MOUSE	109.7	39.3	70.4	1.549	1.548	6.143e-05	0.0008542
NXP20_MOUSE	1.3	8.7	-7.4	-2.629	-2.515	7.585e-05	0.001042
RL35_MOUSE	8	1.3	6.7	2.662	2.554	8.184e-05	0.001111
RL39_MOUSE	12.7	3.3	9.4	2.029	1.969	8.628e-05	0.001158
PEX1_MOUSE	0	4	-4	-Inf	-5.005	9.19e-05	0.00122
IRS1_MOUSE	0	4	-4	-Inf	-5.004	9.841e-05	0.001292
H2AV_MOUSE	15.3	5	10.3	1.708	1.674	0.0001139	0.001479
PTN23_MOUSE	2.3	10.7	-8.4	-2.104	-2.055	0.0001502	0.001928
SEPT9_MOUSE	1	7.3	-6.3	-2.792	-2.653	0.0001528	0.00194
EPN4_MOUSE	1.7	9	-7.3	-2.343	-2.271	0.0001648	0.002047
PCNP_MOUSE	0.7	6.3	-5.6	-3.151	-2.955	0.0001683	0.002055
FLNC_MOUSE	6	17.7	-11.7	-1.475	-1.459	0.0001689	0.002055
DNJB1_MOUSE	2.7	13.7	-11	-2.265	-2.222	0.000174	0.002095
PR38B_MOUSE	1.7	9	-7.3	-2.328	-2.27	0.0001879	0.002217
H2A1B_MOUSE	22.3	9.3	13	1.345	1.329	0.0002099	0.002452
LASP1_MOUSE	7	19.7	-12.7	-1.408	-1.393	0.0002279	0.002621
RBNS5_MOUSE	6.7	19	-12.3	-1.434	-1.414	0.0002288	0.002621
LC7L2_MOUSE	214.7	76.7	138	1.555	1.554	0.0002395	0.00269
NOP56_MOUSE	17	6.7	10.3	1.43	1.413	0.0002715	0.00302
RUVB1_MOUSE	0.7	6	-5.3	-3.067	-2.878	0.0003138	0.00338
MYH9_MOUSE	29.3	62.7	-33.4	-1.016	-1.012	0.0003446	0.00347
U2AF2_MOUSE	67.7	24.7	43	1.548	1.541	0.0003719	0.00359
ACINU_MOUSE	13.3	4.3	9	1.711	1.675	0.0004563	0.004368
EIF2A_MOUSE	1	6.7	-5.7	-2.651	-2.518	0.0004645	0.004411
JUPI2_MOUSE	7	18.3	-11.3	-1.305	-1.293	0.0004691	0.004418
GSTM1_MOUSE	1	6.7	-5.7	-2.649	-2.518	0.000485	0.004532
RBGPR_MOUSE	0.3	4.7	-4.4	-3.757	-3.317	0.0004968	0.004588
CASP8_MOUSE	0.3	4.7	-4.4	-3.706	-3.317	0.0004988	0.004588
NACAM_MOUSE	11.7	26	-14.3	-1.071	-1.067	0.0005692	0.005194
SYVC_MOUSE	6	18.3	-12.3	-1.531	-1.511	0.0006653	0.005932
VCIP1_MOUSE	1.3	7.3	-6	-2.37	-2.277	0.0007822	0.006818
SNAG_MOUSE	0.7	5.3	-4.6	-2.927	-2.712	0.0008735	0.007502
SC31A_MOUSE	0.3	4.3	-4	-3.599	-3.213	0.0008815	0.007515
H2A2A_MOUSE	21	9.7	11.3	1.205	1.191	0.0008923	0.007552

AIF1L_MOUSE	0.3	4.3	-4	-3.592	-3.213	0.0009071	0.007623
BUD13_MOUSE	6.3	1.3	5	2.332	2.224	0.001028	0.008516
LBR_MOUSE	12.3	4.7	7.6	1.486	1.459	0.001155	0.009431
ELOB_MOUSE	2.3	9	-6.7	-1.862	-1.814	0.001191	0.009661
PCCB_MOUSE	5.7	1	4.7	2.589	2.44	0.001244	0.009916
FIP1_MOUSE	22.3	11.7	10.6	1.02	1.01	0.001274	0.009916

ANNEXE 3 : Comparaison B2A-MCMV avec B2A-MOCK

	B2A.MCMV	B2A.MOCK	deltaSC	IFC.Av	LogFC	p.value	adjp
RCC2_MOUSE	7	103.7	-96.7	-3.842	-3.822	7.38e-49	6.982e-46
LC7L3_MOUSE	98.7	14.7	84	2.788	2.782	1.438e-37	6.803e-35
CNOT1_MOUSE	154	64	90	1.306	1.308	1.291e-24	4.07e-22
FINC_MOUSE	0	24	-24	-Inf	-7.571	3.736e-22	8.835e-20
DDX46_MOUSE	148	68.3	79.7	1.159	1.158	1.649e-20	3.119e-18
D3XDQ8_MUHV1	18.7	0	18.7	Inf	7.256	4.747e-18	7.485e-16
RBP2_MOUSE	76.7	26.3	50.4	1.588	1.581	1.164e-15	1.573e-13
TCP4_MOUSE	26.7	73.7	-47	-1.42	-1.418	6.549e-15	7.744e-13
LC7L2_MOUSE	645	214.7	430.3	1.631	1.63	1.618e-13	1.7e-11
DDX3X_MOUSE	57.7	22.7	35	1.397	1.387	6.541e-12	5.625e-10
RSRC1_MOUSE	43.7	14	29.7	1.677	1.676	9.907e-12	7.81e-10
TB182_MOUSE	6.3	30	-23.7	-2.181	-2.178	1.911e-11	1.391e-09
ACON_MOUSE	13.7	0.7	13	4.407	4.163	4.169e-11	2.817e-09
LUC7L_MOUSE	443.3	109.7	333.6	2.06	2.058	1.377e-10	8.683e-09
DCLK1_MOUSE	18.3	3	15.3	2.66	2.606	1.971e-09	1.165e-07
TCOF_MOUSE	14.7	41.3	-26.6	-1.437	-1.442	3.242e-09	1.804e-07
WASC5_MOUSE	8.3	0	8.3	Inf	6.102	3.655e-09	1.826e-07
DDX3Y_MOUSE	39.7	15	24.7	1.454	1.44	7.911e-09	3.742e-07
PR38A_MOUSE	58.3	28.7	29.6	1.066	1.066	1.774e-08	7.992e-07
SMG7_MOUSE	28.3	9.3	19	1.636	1.632	4.32e-08	1.777e-06
U2AF1_MOUSE	21.3	5.7	15.6	1.947	1.933	6.838e-08	2.695e-06
D3XD'T5_MUHV1	6.3	0	6.3	Inf	5.714	2.588e-07	8.744e-06
LONM_MOUSE	6.3	0	6.3	Inf	5.714	2.685e-07	8.76e-06
IDHP_MOUSE	8.7	0.7	8	3.722	3.513	7.243e-07	2.21e-05
PR40A_MOUSE	11.3	30.7	-19.4	-1.374	-1.382	7.812e-07	2.31e-05
RL29_MOUSE	0	6	-6	-Inf	-5.593	9.008e-07	2.506e-05
Q69183_MUHV1	5.7	0	5.7	Inf	5.556	1.054e-06	2.77e-05
IQGA1_MOUSE	0	5.3	-5.3	-Inf	-5.427	3.645e-06	9.074e-05
GLYM_MOUSE	5	0	5	Inf	5.38	4.497e-06	0.0001065
DHX8_MOUSE	5	0	5	Inf	5.379	4.505e-06	0.0001065
PDIP3_MOUSE	5	0	5	Inf	5.38	4.638e-06	0.000107
SYAC_MOUSE	0	5	-5	-Inf	-5.336	7.342e-06	0.0001597
UNK_MOUSE	1.3	9.7	-8.4	-2.793	-2.705	7.376e-06	0.0001597
ATPA_MOUSE	6.3	0.3	6	4.263	3.854	7.561e-06	0.0001597

FUBP2_MOUSE	3.3	14	-10.7	-2.035	-1.987	1.085e-05	0.0002231
A8E0M7_MUHV1	4.7	0	4.7	Inf	5.285	1.142e-05	0.0002299
XRN1_MOUSE	13	3.3	9.7	2.026	1.968	1.687e-05	0.0003257
TLN1_MOUSE	3.3	13	-9.7	-1.893	-1.881	4.965e-05	0.000921
SRSF7_MOUSE	72	32.3	39.7	1.183	1.183	8.238e-05	0.001392
SDHB_MOUSE	1	7.3	-6.3	-2.864	-2.688	8.715e-05	0.001446
CPSF7_MOUSE	1	7	-6	-2.769	-2.622	0.0001494	0.002397
UBA1_MOUSE	3.3	12	-8.7	-1.79	-1.766	0.0001495	0.002397
LRP1_MOUSE	0.3	5	-4.7	-3.931	-3.446	0.0001724	0.002718
PKR1_MOUSE	11	3.3	7.7	1.769	1.729	0.0002667	0.003853
KC1A_MOUSE	17.7	7.3	10.4	1.307	1.297	0.0002904	0.0041
FLNB_MOUSE	2.7	9.7	-7	-1.822	-1.768	0.0006203	0.007605
ICAL_MOUSE	0.3	4.3	-4	-3.705	-3.245	0.0006271	0.007605
ZYX_MOUSE	1.3	6.7	-5.4	-2.211	-2.177	0.0009434	0.01075
FUBP1_MOUSE	2.7	9.3	-6.6	-1.739	-1.717	0.0009917	0.01117
LARP1_MOUSE	9.3	20.3	-11	-1.058	-1.068	0.001107	0.0119
KTN1_MOUSE	0.3	4	-3.7	-3.429	-3.132	0.001177	0.01237
VIME_MOUSE	19.3	9.7	9.6	1.052	1.035	0.00136	0.01414
BUD13_MOUSE	1.3	6.3	-5	-2.214	-2.105	0.001568	0.01612
CO1A1_MOUSE	2.7	9	-6.3	-1.653	-1.665	0.001662	0.01679
SON_MOUSE	11.7	4.7	7	1.355	1.342	0.001922	0.01855
SNIP1_MOUSE	1	5.3	-4.3	-2.444	-2.238	0.002403	0.02066
UBE2H_MOUSE	2	7.3	-5.3	-1.812	-1.769	0.002704	0.02305
ALDOA_MOUSE	6.3	1.7	4.6	1.973	1.892	0.002748	0.02321
S10A6_MOUSE	4.3	11.3	-7	-1.354	-1.319	0.003009	0.02454
LPP_MOUSE	8.3	17.3	-9	-1	-1.001	0.003949	0.03013
BICC1_MOUSE	4	0.7	3.3	2.672	2.422	0.00433	0.03254
ZMAT2_MOUSE	4	0.7	3.3	2.614	2.422	0.004334	0.03254
CTND1_MOUSE	5.3	12.3	-7	-1.147	-1.147	0.005811	0.04165
FRG1_MOUSE	8.7	3.3	5.4	1.392	1.388	0.006037	0.04245
IMPA1_MOUSE	0.7	4	-3.3	-2.429	-2.341	0.006068	0.04245
PP1RB_MOUSE	7	2.3	4.7	1.631	1.578	0.006102	0.04245
RL17_MOUSE	8	3	5	1.469	1.422	0.006655	0.04595
NUDC3_MOUSE	6.3	2	4.3	1.681	1.645	0.006782	0.04649

ANNEXE 4 : Comparaison de B2A-L-MCMV et B2A-L-MOCK

	B2A.L.MCMV	B2A.L.MOCK	deltaSC	IFC.Av	LogFC	LR	p.value	adjp	negLog.adjp
LUC7L_MOUSE	251	39.3	211.7	2.662	2.66	58.22	2.347e-14	2.915e-11	10.53536
LC7L3_MOUSE	51.7	8	43.7	2.687	2.668	37.76	8.02e-10	4.981e-07	6.30268
D3XD15_MUHV1	8.7	0	8.7	Inf	6.136	31.87	1.65e-08	6.83e-06	5.16558
TCP4_MOUSE	24.3	81.3	-57	-1.745	-1.74	29.73	4.964e-08	1.344e-05	4.8716
LC7L2_MOUSE	403.7	76.7	327	2.381	2.38	29.56	5.41e-08	1.344e-05	4.8716
DDX3X_MOUSE	53.3	20	33.3	1.411	1.405	28.08	1.163e-07	2.407e-05	4.61852
D3XDQ8_MUHV1	7.7	0	7.7	Inf	5.956	26.83	2.227e-07	3.951e-05	4.40329
DDX46_MOUSE	90.3	35	55.3	1.37	1.366	21.94	2.815e-06	0.000437	3.35952
SRSF7_MOUSE	36.3	13	23.3	1.485	1.473	19.95	7.959e-06	0.0009885	3.00502
RSRC1_MOUSE	38.3	15.3	23	1.318	1.311	19.05	1.274e-05	0.001439	2.84194
DDX3Y_MOUSE	39.3	15.7	23.6	1.323	1.317	16.68	4.413e-05	0.004567	2.34037
RBP2_MOUSE	63.7	31.3	32.4	1.029	1.022	15.31	9.11e-05	0.008082	2.09248
SRS10_MOUSE	23.3	6	17.3	1.951	1.934	14.92	0.0001123	0.009298	2.03161
TRA2B_MOUSE	12	3	9	1.99	1.952	14.11	0.0001725	0.01339	1.87322
ZRAB2_MOUSE	8.7	21.3	-12.6	-1.293	-1.289	12.49	0.0004087	0.02986	1.52491
RL22L_MOUSE	13.7	3.7	10	1.884	1.853	12.22	0.0004725	0.0326	1.48678
BICC1_MOUSE	5.3	0.7	4.6	2.986	2.783	11.31	0.0007707	0.04558	1.34123

ANNEXE 5 : Comparaison de B2A-SINV et B2A-MOCK

	B2A.SINV	B2A.MOCK	deltaSC	IFC.Av	LogFC	LR	p.value	adjp	negLog.adjp
LC7L3_MOUSE	74.5	14.7	59.8	2.449	2.438	85.56	2.247e-20	2.076e-17	16.68277
Pol_S_SINV_E1	26	0	26	Inf	7.774	79.01	6.175e-19	2.853e-16	15.5447
FINC_MOUSE	0	24	-24	-Inf	-7.553	61.85	3.715e-15	1.144e-12	11.94157
Pol_S_SINV_E2	13	0	13	Inf	6.773	45.16	1.813e-11	4.187e-09	8.3781
Pol_S_SINV_Capside	10	0	10	Inf	6.399	35.79	2.196e-09	3.774e-07	6.4232
RNPS1_MOUSE	22	72.3	-50.3	-1.62	-1.612	35.58	2.451e-09	3.774e-07	6.4232
PKP4_MOUSE	9.5	0	9.5	Inf	6.328	34.65	3.946e-09	5.103e-07	6.29217
DDX46_MOUSE	136	68.3	67.7	1.091	1.091	31.39	2.113e-08	2.169e-06	5.66374
Pol_NS_SINV_nsP3	7	0	7	Inf	5.894	25.81	3.765e-07	3.163e-05	4.4999
CO1A1_MOUSE	0	9	-9	-Inf	-6.151	24.53	7.325e-07	5.207e-05	4.28341
U2AF1_MOUSE	32.5	5.7	26.8	2.636	2.608	22.93	1.677e-06	0.0001107	3.95585
DCLK1_MOUSE	15	3	12	2.41	2.373	21.13	4.291e-06	0.0002478	3.6059
LC7L2_MOUSE	503.5	214.7	288.8	1.339	1.338	20.82	5.057e-06	0.0002749	3.56083
RSRC1_MOUSE	34.5	14	20.5	1.392	1.391	17.66	2.641e-05	0.001356	2.86774
ROA2_MOUSE	8.5	1	7.5	3.173	3.035	17.37	3.075e-05	0.001421	2.84741
SRSF7_MOUSE	72	32.3	39.7	1.269	1.262	17.01	3.723e-05	0.001605	2.79452
TCOF_MOUSE	16.5	41.3	-24.8	-1.213	-1.216	16.96	3.82e-05	0.001605	2.79452
DVL3_MOUSE	45	23	22	1.071	1.066	16.87	3.995e-05	0.001605	2.79452
LUZP1_MOUSE	4.5	0	4.5	Inf	5.272	16.21	5.678e-05	0.002186	2.66035
CPSF6_MOUSE	60.5	26	34.5	1.324	1.319	15.19	9.734e-05	0.003238	2.48972
HMGA1_MOUSE	41	20	21	1.142	1.134	15.18	9.765e-05	0.003238	2.48972
UBA1_MOUSE	2	12	-10	-2.502	-2.415	15.17	9.813e-05	0.003238	2.48972
RL10A_MOUSE	4	0	4	Inf	5.103	14.92	0.0001123	0.003458	2.46118
LUC7L_MOUSE	276.5	109.7	166.8	1.445	1.443	14.44	0.0001445	0.004307	2.36583
SYAC_MOUSE	0	5	-5	-Inf	-5.319	14	0.0001827	0.00519	2.28483
LRP1_MOUSE	0	5	-5	-Inf	-5.319	13.97	0.0001853	0.00519	2.28483
MIF_MOUSE	0	4.7	-4.7	-Inf	-5.222	13.1	0.0002951	0.008019	2.09588
DVL1_MOUSE	28.5	13.7	14.8	1.16	1.154	12.93	0.0003238	0.00831	2.0804
K1C14_MOUSE	18	5.3	12.7	1.878	1.842	12.69	0.0003677	0.00911	2.04048
VIME_MOUSE	23.5	9.7	13.8	1.375	1.369	12.63	0.0003793	0.00911	2.04048
SMG7_MOUSE	22	9.3	12.7	1.333	1.326	12.61	0.0003845	0.00911	2.04048
AFAD_MOUSE	34	18	16	1.013	1.013	12.02	0.0005273	0.01218	1.91435
FRG1_MOUSE	11.5	3.3	8.2	1.872	1.847	11.89	0.0005653	0.01274	1.89483
KC1A_MOUSE	18	7.3	10.7	1.395	1.381	11.68	0.0006303	0.01387	1.85792
CNOT2_MOUSE	95	49.7	45.3	1.05	1.046	11.33	0.0007611	0.01577	1.80217

DHX29_MOUSE	10.5	3	7.5	1.914	1.865	11.32	0.0007682	0.01577	1.80217
K1C16_MOUSE	17	5.7	11.3	1.705	1.673	11.2	0.0008192	0.01645	1.78383
CYTB_MOUSE	1	7.3	-6.3	-2.74	-2.635	10.49	0.001198	0.02307	1.63695
UNK_MOUSE	2	9.7	-7.7	-2.174	-2.107	10.45	0.001225	0.0231	1.63639
F193A_MOUSE	6	1	5	2.694	2.542	10.36	0.00129	0.02337	1.63134
CCNL1_MOUSE	5	0.7	4.3	2.99	2.788	9.882	0.001669	0.0291	1.53611
DDX3Y_MOUSE	28.5	15	13.5	1.032	1.023	9.78	0.001764	0.03018	1.52028
CWC25_MOUSE	13.5	30	-16.5	-1.066	-1.046	9.394	0.002178	0.03308	1.48043
SNW1_MOUSE	0.5	5.3	-4.8	-3.359	-3.039	9.377	0.002197	0.03308	1.48043
CHD1_MOUSE	1.5	9	-7.5	-2.448	-2.392	9.344	0.002238	0.03308	1.48043
IQGA1_MOUSE	0.5	5.3	-4.8	-3.266	-3.037	9.329	0.002256	0.03308	1.48043
ZN598_MOUSE	9.5	3	6.5	1.761	1.722	9.181	0.002445	0.0353	1.45223
H2A1B_MOUSE	9.5	22.3	-12.8	-1.143	-1.123	8.862	0.002911	0.04089	1.38838
SR1P_MOUSE	6.5	17.3	-10.8	-1.324	-1.299	8.856	0.002921	0.04089	1.38838
HNRPM_MOUSE	19.5	9.7	9.8	1.112	1.103	8.614	0.003337	0.04459	1.35076
FLNB_MOUSE	2.5	9.7	-7.2	-1.858	-1.801	8.537	0.00348	0.04459	1.35076
RS29_MOUSE	1.5	13	-11.5	-3.072	-2.943	8.328	0.003903	0.04874	1.31211

ANNEXE 6 : Comparaison de B2A-L-SINV et B2A-L-MOCK

	B2A.L.SINV	B2A.L.MOCK	deltaSC	IFC.Av	LogFC	LR	p.value	adjp	negLog.adjp
Pol_S_SINV_E1	15.5	0	15.5	Inf	6.913	46.67	8.412e-12	1.006e-08	7.9974
LUC7L_MOUSE	133.5	39.3	94.2	1.664	1.664	40.85	1.644e-10	9.832e-08	7.00736
SRSF3_MOUSE	153	52.7	100.3	1.452	1.448	37.79	7.886e-10	3.144e-07	6.50252
LC7L3_MOUSE	32.5	8	24.5	1.929	1.914	27.25	1.792e-07	5.358e-05	4.271
Pol_S_SINV_E2	7.5	0	7.5	Inf	5.877	24.44	7.657e-07	0.0001832	3.73707
RNPS1_MOUSE	18	53	-35	-1.658	-1.647	21.82	2.999e-06	0.0005977	3.22352
DDX46_MOUSE	88	35	53	1.244	1.239	19.4	1.059e-05	0.001809	2.74256
Pol_S_SINV_Capside	5.5	0	5.5	Inf	5.44	18.1	2.095e-05	0.003132	2.50418
LC7L2_MOUSE	297	76.7	220.3	1.852	1.851	17.44	2.959e-05	0.003932	2.40539
NACAM_MOUSE	9.5	26	-16.5	-1.539	-1.531	16.44	5.01e-05	0.005992	2.22243
PR40A_MOUSE	21.5	43	-21.5	-1.09	-1.087	15.05	0.0001049	0.01099	1.959
Pol_NS_SINV_nsP3	4.5	0	4.5	Inf	5.158	14.95	0.0001102	0.01099	1.959
SRSF7_MOUSE	34	13	21	1.297	1.287	14.74	0.0001232	0.01134	1.94539
G3P_MOUSE	17.5	4.7	12.8	1.812	1.787	14.02	0.0001805	0.01542	1.81192
CHD1_MOUSE	0	7.3	-7.3	-Inf	-5.929	13.77	0.0002065	0.01647	1.78331
BRD2_MOUSE	0.5	6.3	-5.8	-3.727	-3.449	13.05	0.0003031	0.02087	1.68048
CPSF6_MOUSE	33.5	13.7	19.8	1.205	1.195	12.87	0.000333	0.02087	1.68048
RL22L_MOUSE	16.5	3.7	12.8	2.092	2.048	12.84	0.0003398	0.02087	1.68048
VCIP1_MOUSE	22.5	7.3	15.2	1.527	1.51	12.79	0.0003491	0.02087	1.68048
RC3H1_MOUSE	37	15	22	1.216	1.205	12.36	0.000439	0.02387	1.62215
BRD3_MOUSE	0.5	5.7	-5.2	-3.565	-3.291	11.3	0.0007756	0.04033	1.39437

ANNEXE 7 :

B2A SINV]:

PKP4_MOUSE
ROA2_MOUSE
DVL3_MOUSE
LUZP1_MOUSE
HMGA1_MOUSE
RL10A_MOUSE
MIF_MOUSE
DVL1_MOUSE
K1C14_MOUSE
AFAD_MOUSE
CNOT2_MOUSE
DHX29_MOUSE
K1C16_MOUSE
CYTB_MOUSE
F193A_MOUSE
CCNL1_MOUSE
CWC25_MOUSE
SNW1_MOUSE
ZN598_MOUSE
H2A1B_MOUSE
SR1IP_MOUSE
HNRPM_MOUSE
RS29_MOUSE
PDIA3_MOUSE

[B2A MCMV]:

RCC2_MOUSE
CNOT1_MOUSE
TB182_MOUSE
ACON_MOUSE
WASC5_MOUSE
PR38A_MOUSE
LONM_MOUSE
IDHP_MOUSE
RL29_MOUSE
DHX8_MOUSE
GLYM_MOUSE
PDIP3_MOUSE
ATPA_MOUSE
FUBP2_MOUSE
XRN1_MOUSE
TLN1_MOUSE
SDHB_MOUSE
CPSF7_MOUSE

PKRI1_MOUSE
ICAL_MOUSE
ZYX_MOUSE
FUBP1_MOUSE
LARP1_MOUSE
KTN1_MOUSE
BUD13_MOUSE
SON_MOUSE
SNIP1_MOUSE
UBE2H_MOUSE
ALDOA_MOUSE
S10A6_MOUSE
LPP_MOUSE
ZMAT2_MOUSE
CTND1_MOUSE
IMPA1_MOUSE
PP1RB_MOUSE
RL17_MOUSE
NUDC3_MOUSE

[B2A-L SINV]:

SRSF3_MOUSE
NACAM_MOUSE
G3P_MOUSE
BRD2_MOUSE
VCIP1_MOUSE
RC3H1_MOUSE
BRD3_MOUSE

[B2A-L MCMV]:

SRS10_MOUSE
TRA2B_MOUSE
ZRAB2_MOUSE

[B2A-L SINV] and [B2A MCMV]:

PR40A_MOUSE

[B2A MCMV] and [B2A SINV]:

FINC_MOUSE
DCLK1_MOUSE
TCOF_MOUSE
SMG7_MOUSE
U2AF1_MOUSE
IQGA1_MOUSE
SYAC_MOUSE

UNK_MOUSE
UBA1_MOUSE
LRP1_MOUSE
KC1A_MOUSE
FLNB_MOUSE
VIME_MOUSE
CO1A1_MOUSE
FRG1_MOUSE

[B2A-L MCMV] and [B2A-L SINV]:

RL22L_MOUSE

[B2A-L SINV] and [B2A SINV]:

RNPS1_MOUSE
CHD1_MOUSE
CPSF6_MOUSE

[B2A-L MCMV] and [B2A MCMV]:

TCP4_MOUSE
DDX3X_MOUSE
RBP2_MOUSE
BICC1_MOUSE

[B2A-L MCMV] and [B2A MCMV] and [B2A SINV]:

RSRC1_MOUSE
DDX3Y_MOUSE

[B2A-L MCMV] and [B2A-L SINV] and [B2A MCMV] and [B2A SINV]:

LUC7L_MOUSE
LC7L3_MOUSE
LC7L2_MOUSE
DDX46_MOUSE
SRSF7_MOUSE

Olivier TERENCEZ
**Caractérisation de
l'importance
d'Argonaute 2 et des
microARN lors de
l'infection par le
cytomégalo virus murin**

Les micro (mi)ARN sont des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression génique. Retrouvés chez la plupart des eucaryotes, ils sont impliqués dans un grand nombre de processus biologiques. Certains virus sont capables de détourner cette voie à leur avantage et expriment leurs propres miARN ou modulent l'expression de miARN cellulaires. Ce projet porte sur la caractérisation du rôle joué par la protéine effectrice Argonaute (AGO) 2 dans l'établissement de l'infection par le cytomégalo virus murin (MCMV). Outre l'expression de miARN viraux, celui-ci est capable d'induire le phénomène de dégradation du miARN cellulaire miR-27. L'importance d'AGO2 dans l'accumulation des miARN cellulaires et viraux, ainsi que la recherche de ses partenaires protéiques, ont été déterminées au cours de l'infection par le MCMV.

Mots-clés : microARN, herpès virus, Argonaute 2, TDMD, spectrométrie de masse.

Micro (mi)RNA are post-transcriptional regulators of gene expression. Found in most eukaryotes, they are involved in a wide range of biological processes. Some viruses are able to hijack this pathway for their benefit and express their own set of miRNA or regulates cellular miRNA expression. This project is focused on the characterization of the role played by the effector protein Argonaute (AGO) 2 in establishing murine cytomegalovirus (MCMV) infection. Additionally to viral miRNA expression, this virus is able to induce the phenomenon of target RNA-mediated miRNA degradation of miR-27. The key role of AGO2 in cellular and viral miRNA accumulation and the identification of his protein partners had been determined during MCMV infection.

Keywords: microRNA, herpesvirus, Argonaute 2, TDMD, mass spectrometry.