

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

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

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

<spfeffer@unistra.fr>

<sup>a</sup>Contribution équivalente

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

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

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

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

## Introduction

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

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

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

**Tirés à part :** S. Pfeffer

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

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

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

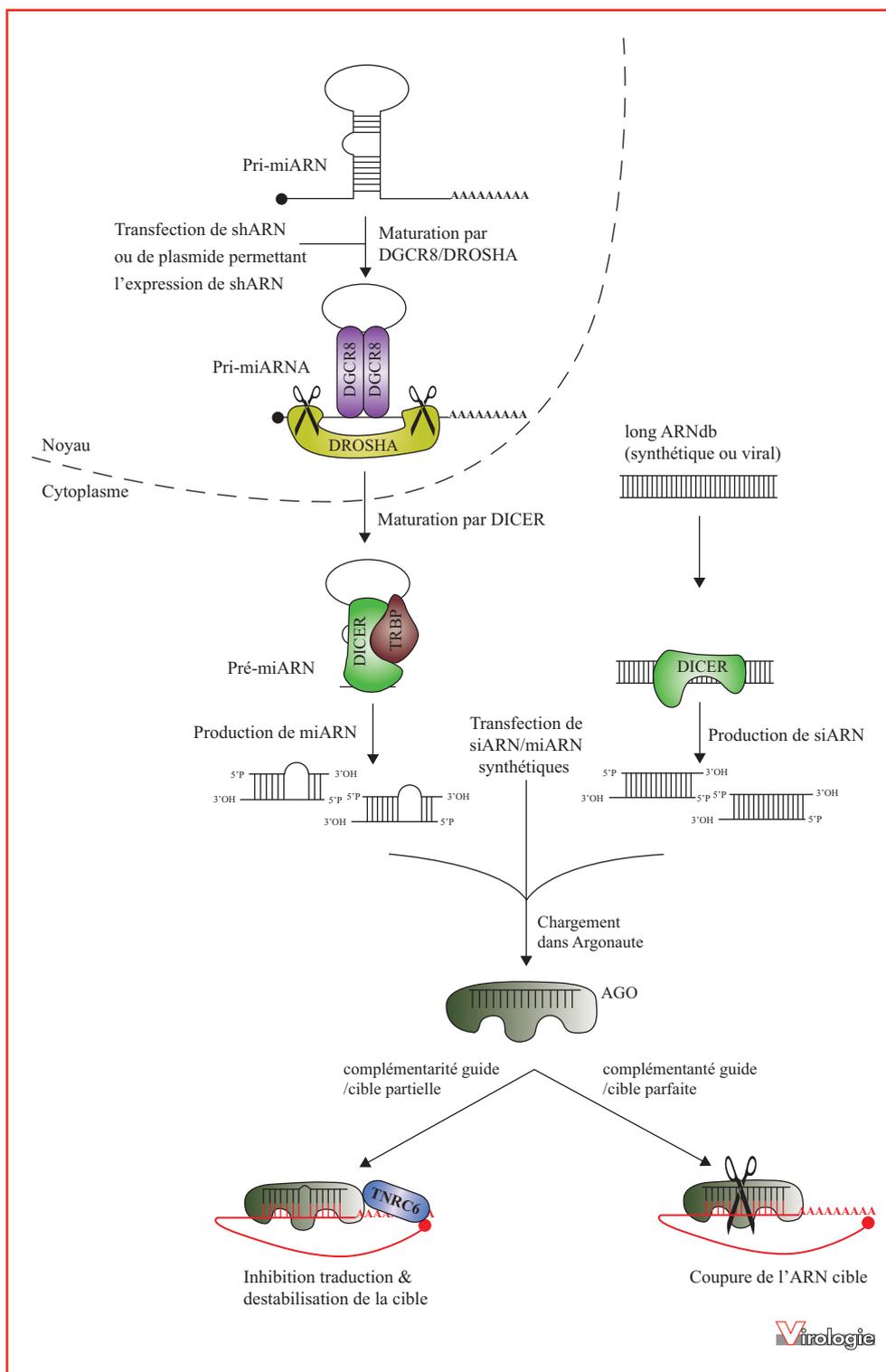
spécifiques appelés PRR (pour *Pathogen Recognition Receptors*) incluant les récepteurs cytoplasmiques RLR (*RIG-Like Receptors*) conduit à leur interaction avec la protéine MAVS (*Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein*), ce qui déclenche une voie de signalisation permettant la transcription du gène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

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

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

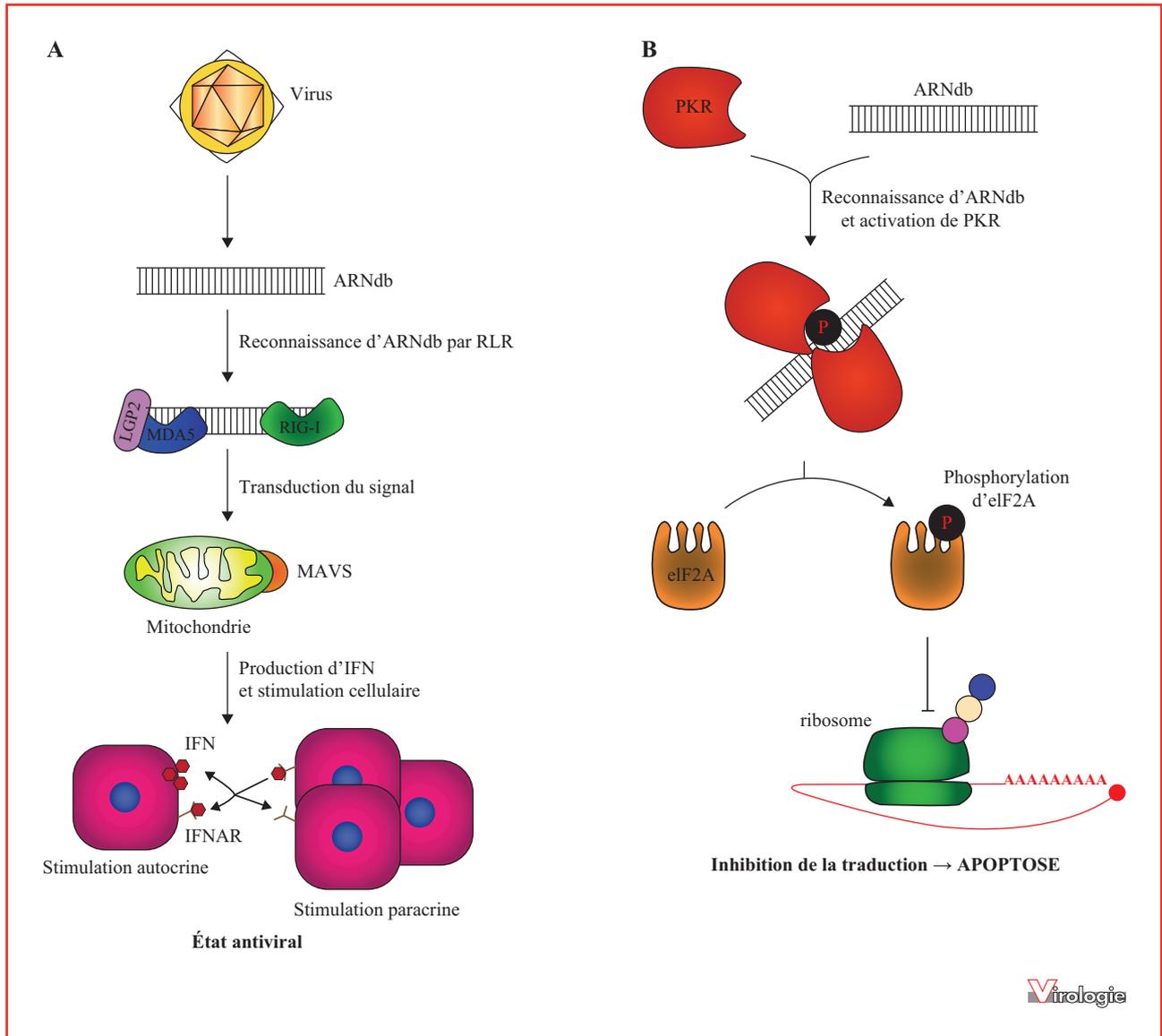
## Le *RNA silencing* ne semble pas être un mécanisme antiviral dans les cellules somatiques de mammifères

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



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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

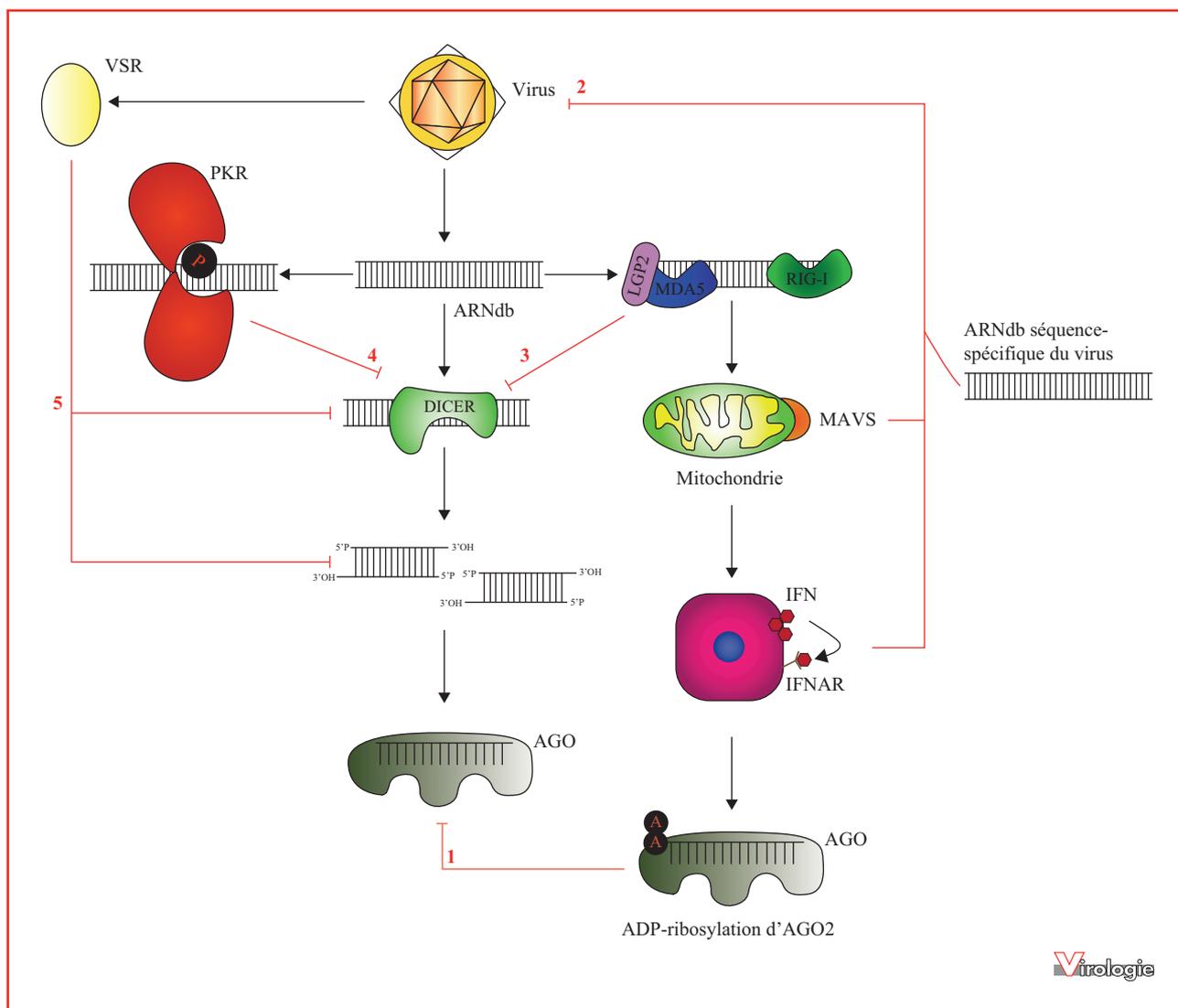
### Incompatibilité entre les réponses antivirales *RNA silencing* et réponse interféron

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

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

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

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



Virologie

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

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

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

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

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

### Mise en évidence du RNA silencing antiviral

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

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

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

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

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

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

## Conclusion

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

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

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

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

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

## Références

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

13. Donaszi-Ivanov A, Mohorianu I, Dalmay T, Powell PP. Small RNA Analysis in Sindbis Virus Infected Human HEK293 Cells. *PLoS ONE* 2013 ; 8 : e84070.
14. Girardi E, Chane-Woon-Ming B, Messmer M, Kaukinen P, Pfeffer S. Identification of RNase L-dependent, 3'-end-modified, viral small RNAs in Sindbis virus-infected mammalian cells. *MBio* 2013 ; 4 : e00698-00613.
15. Bogerd HP, Skalsky RL, Kennedy EM, *et al.* Replication of many human viruses is refractory to inhibition by endogenous cellular microRNAs. *J Virol* 2014 ; 88 : 8065-76.
16. Backes S, Langlois RA, Schmid S, *et al.* The Mammalian Response to Virus Infection Is Independent of Small RNA Silencing. *Cell Reports* 2014 ; 8 : 114-25.
17. Schuster S, Tholen LE, Overheul GJ, van Kuppeveld FJM, van Rij RP. Deletion of Cytoplasmic Double-Stranded RNA Sensors Does Not Uncover Viral Small Interfering RNA Production in Human Cells. *MSphere* 2017 ; 2 : pii : e00333-17.
18. Parameswaran P, Sklan E, Wilkins C, *et al.* Six RNA viruses and forty-one hosts: viral small RNAs and modulation of small RNA repertoires in vertebrate and invertebrate systems. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1000764.
19. Kennedy EM, Whisnant AW, Kornepati AVR, *et al.* Production of functional small interfering RNAs by an amino-terminal deletion mutant of human Dicer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015 ; 112 : E6945-54.
20. Tsai K, Courtney DG, Kennedy EM, Cullen BR. Influenza A virus-derived siRNAs increase in the absence of NS1 yet fail to inhibit virus replication. *RNA* 2018 : ma.066332.118.
21. Shapiro JS, Varble A, Pham AM, Tenover BR. Noncanonical cytoplasmic processing of viral microRNAs. *RNA* 2010 ; 16 : 2068-74.
22. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J* 2002 ; 21 : 5875-85.
23. Ma E, MacRae IJ, Kirsch JF, Doudna JA. Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain. *J Mol Biol* 2008 ; 380 : 237-43.
24. Cenik ES, Fukunaga R, Lu G, *et al.* Phosphate and R2D2 Restrict the Substrate Specificity of Dicer-2, an ATP-Driven Ribonuclease. *Molecular Cell* 2011 ; 42 : 172-84.
25. Nagano H, Fukudome A, Hiraguri A, Moriyama H, Fukuhara T. Distinct substrate specificities of Arabidopsis DCL3 and DCL4. *Nucleic Acids Research* 2014 ; 42 : 1845-56.
26. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004 ; 305 : 1437-41.
27. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004 ; 431 : 343-9.
28. Park MS, Phan H-D, Busch F, *et al.* Human Argonaute3 has slicer activity. *Nucleic Acids Research* 2017 ; 45 : 11867-77.
29. Haasnoot J, Westerhout EM, Berkhout B. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 2007 ; 25 : 1435-43.
30. Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 ; 98 : 14428-33.
31. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 2000 ; 127 : 4147-56.
32. Tam OH, Aravin AA, Stein P, *et al.* Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 2008 ; 453 : 534-8.
33. Nejezpínska J, Malik R, Filkowski J, *et al.* dsRNA expression in the mouse elicits RNAi in oocytes and low adenosine deamination in somatic cells. *Nucleic Acids Res* 2012 ; 40 : 399-413.
34. Flemr M, Malik R, Franke V, *et al.* A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes. *Cell* 2013 ; 155 : 807-16.
35. Stetson DB, Medzhitov R. Type I Interferons in Host Defense. *Immunity* 2006 ; 25 : 373-81.
36. Cullen BR, Cherry S, tenOever BR. Is RNA Interference a Physiologically Relevant Innate Antiviral Immune Response in Mammals? *Cell Host & Microbe* 2013 ; 14 : 374-8.
37. tenOever BR. The Evolution of Antiviral Defense Systems. *Cell Host & Microbe* 2016 ; 19 : 142-9.
38. Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 2002 ; 295 : 2456-9.
39. Duxbury MS, Ashley SW, Whang EE. RNA interference : A mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005 ; 331 : 459-63.
40. Yu G-Y, He G, Li C-Y, *et al.* Hepatic Expression of HCV RNA-Dependent RNA Polymerase Triggers Innate Immune Signaling and Cytokine Production. *Molecular Cell* 2012 ; 48 : 313-21.
41. Painter MM, Morrison JH, Zwickle LJ, *et al.* Antiviral Protection via RdRP-Mediated Stable Activation of Innate Immunity. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1005311. doi: 10.1371/journal.ppat.1005311.
42. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 2001 ; 8 : 113-26.
43. Seo GJ, Kincaid RP, Phanaksri T, *et al.* Reciprocal inhibition between intracellular antiviral signaling and the RNAi machinery in mammalian cells. *Cell Host Microbe* 2013 ; 14 : 435-45.
44. Girardi E, Lefèvre M, Chane-Woon-Ming B, *et al.* Cross-species comparative analysis of Dicer proteins during Sindbis virus infection. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 10693.
45. Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, *et al.* Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science* 2013 ; 342 : 235-8.
46. Li Y, Lu J, Han Y, Fan X, Ding S-W. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science* 2013 ; 342 : 231-4.
47. Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J Virol* 2005 ; 79 : 7371-9.
48. Haasnoot J, de Vries W, Geutjes E-J, Prins M, de Haan P, Berkhout B. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog* 2007 ; 3 : e86.
49. Maillard PV, Van der Veen AG, Deddouche-Grass S, Rogers NC, Merits A, Reis e Sousa C. Inactivation of the type I interferon pathway reveals long double-stranded RNA-mediated RNA interference in mammalian cells. *EMBO J* 2016 ; 35 : 2505-18.
50. van der Veen AG, Maillard PV, Schmidt JM, *et al.* The RIG-I-like receptor LGP2 inhibits Dicer-dependent processing of long double-stranded RNA and blocks RNA interference in mammalian cells. *EMBO J* 2018 ; 37. pii: e97479. doi: 10.15252/embj.201797479.
51. Li Y, Basavappa M, Lu J, *et al.* Induction and suppression of antiviral RNA interference by influenza A virus in mammalian cells. *Nature Microbiology* 2016 ; 2 : 16250.
52. Li WX, Li H, Lu R, *et al.* Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 1350-5.
53. García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, *et al.* Influenza A Virus Lacking the NS1 Gene Replicates in Interferon-Deficient Systems. *Virology* 1998 ; 252 : 324-30.
54. Qiu Y, Xu Y, Zhang Y, *et al.* Human Virus-Derived Small RNAs Can Confer Antiviral Immunity in Mammals. *Immunity* 2017 ; 46 : 992-1004.e5.