

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Régulation épigénétique d'un gène viral codant pour la sous- unité ARN de la télomérase surexprimée dans le lymphome aviaire induit par le virus de la maladie de Marek

MBOUOMBOUO MFOSSA , André Claude

Award date:
2014

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

**Régulation épigénétique d'un gène viral codant pour la sous-unité
ARN de la télomérase surexprimée dans le lymphome aviaire induit
par le virus de la maladie de Marek.**

MBOUOMBOUO MFOSSA André Claude

Résumé

Le virus de la maladie de Marek (MDV), à l'instar des autres herpèsvirus, présente 2 types d'infection alternant des phases de réplication (phase lytique) et des phases de dormance (phase latente). Durant la latence, peu de transcrits sont exprimés, ces derniers sont impliqués dans le maintien de ce type d'infection et/ou dans la tumorigénèse viro-induite. Durant la phase lytique, les transcrits associés à la latence sont réprimés alors que les autres gènes (qui constituent la majorité du génome) sont activement exprimés et concourent à la formation de nouvelles particules virales. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont montré que le profil de méthylation des promoteurs des gènes *vTR pp38* et *14 kD* était fortement méthylé (80%) pendant la latence. Ces mêmes promoteurs étaient faiblement méthylé (20%) durant la phase de réactivation. Des données publiées sur le promoteur du gène *vTR* ont montré que son activité était plus élevée que celle de son homologue *chTR* du poulet durant l'infection par le virus de la maladie de Marek. L'expression élevée de *vTR* semblait dû à la présence de sites de liaison de l'onco-protéine cellulaire *c-Myc* (Boite E) dans son promoteur. A la lecture de ces données, deux questions principales se sont posées. Le niveau de méthylation des promoteurs de *vTR*, *pp38* et *14Kda* est-il un facteur clé dans l'activation ou la répression de la transcription de ces loci ? La méthylation et la mutation des boîtes E du promoteur *vTR* auraient-elles un impact sur son expression ?

Six vecteurs ont été construits par clonage des différents promoteurs en amont du gène rapporteur (luciférase *firefly*) dans le vecteur rapporteur *pCpGL-Basic*. Ce vecteur présente l'avantage de ne contenir aucun dinucléotide 5'-CpG-3'. Les mutations des différentes boîtes E ont été réalisées par mutagenèse chevauchante. Les constructions ont été méthylées à l'aide de la méthylase *MSssI*. L'état de méthylation des différentes constructions ont été vérifiées à l'aide de l'enzyme *HpaII*. Les constructions ont été ensuite transfectées dans trois lignés cellulaires (LMH, DF1 et HeLA). La méthylation de l'ADN induit la répression de l'activité des trois promoteurs testés (*vTR*, *pp38* et *14 kD*). La Boîte E3 est l'élément de réponse le plus fonctionnel dans le du promoteur de *vTR*. La méthylation de l'ADN masque l'effet des mutations des différentes Boîtes E. Les données obtenues corroborent avec celles montrant que la méthylation de l'ADN est une stratégie clé chez différents herpèsvirus pour réguler l'expression sélective des gènes impliqués dans les différentes phases de l'infection virale.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Juin 2014

Promoteur: Benoît Muylkens

REMERCIEMENTS

Au **Seigneur Dieu Tout Puissant**, pour la vie et les grâces dont tu ne cesses de me combler.

Au professeur **Natalie Kirschvink**, de m'avoir accepté au sein de l'unité de recherche intégré en médecine vétérinaire.

Au Professeur **Benoit Muylkens**, je vous dis un grand merci de m'avoir redonné confiance et d'avoir accepté conduire mes pas dans ce chemin tortueux mais très passionnant qu'est la recherche.

Au Docteur **Damien Coupeau**, Merci d'avoir été tous les jours à mes côtés et de m'avoir fait bénéficier de ta grande expérience.

A tout le **personnel de l'URVI**, Merci pour l'ambiance à nulle autre pareille.

A tout le **personnel enseignant** Trouvez ici l'expression de la gratitude d'un étudiant reconnaissant qui s'efforcera à être à la hauteur des enseignements reçus.

Au service social et à la direction du département de biologie de l'université de Namur, pour l'aide financier dont j'ai bénéficié durant cette année.

A la famille **Wafu Tapa**, vous avez été pour moi une seconde famille merci pour de m'avoir accueilli parmi vous.

A tous mes amis de Namur : **Conrard, Jacques, Marcel, Hervé, Hortence, Anrmand, Arnaud, Marie-Paule** Merci pour la chaleureuse compagnie et pour tous les moments de convivialité.

Que toutes les personnes dont les noms ne figurent pas ici et à qui nous devons notre profonde reconnaissance, trouvent dans l'aboutissement de ce travail, la récompense des efforts consentis.

INTRODUCTION	5
I.1. Epigénétique.....	5
I.1.1. Code épigénétique des histones	5
I.1.2. La méthylation d'ADN	9
I.2. La maladie la de Marek	12
I.2.1. Historique	12
I.2.2. Classification du GAHV-2 au sein de la famille des Herpesviridae	12
I.2.3. Structure et organisation génomique du GAHV-2	13
I.2.4. Les formes cliniques	13
I.2.5. Transmission.....	17
I.2.6. Vaccination	17
I.2.7. Cycle de vie et Physiopathologie virale	18
I.3. Transcriptome et protéome de la phase lytique et de latence du cycle de GaHV-2	18
I.3.1. Protéines sécrétées et leur rôle dans la réplication lytique	18
I.3.1.1. Les gènes α	21
I.3.1.2. Les gènes β : Les phosphoprotéines pp38 et pp24.	21
I.3.1.3. Les gènes γ	21
I.3.1.4. Autres gènes impliqués dans la réplication lytique.....	21
I.3.2. Protéines et transcrits impliquées dans la latence et la tumorigenèse	23
I.3.2.1. Les LATs (Latency Associated Transcripts)	23
I.3.2.2. La protein meq	23
I.3.2.3. GAHV-2 et télomérase.....	25
I.3.2.4. Régulation Transcriptionnelle de la télomérase virale : rôle de l'onco protéine c-Myc	25
I.4. Objectifs.....	27
II. MATERIELS ET METHODES	29
II.1. Lignées cellulaires.....	29
II.2. Souches bactériennes.....	29
II.3. Les vecteurs de clonage et rapporteur.....	31
II.4. Techniques générales de biologie moléculaire	31
II.4.1. Amplification génique.....	31
II.4.2. Mutagénèse dirigé par PCR	32
II.4.3. Electrophorèse d'ADN	32
II.4.4. Digestion enzymatique d'ADN	32

II.4.5.	<i>Déphosphorylation des vecteurs de clonage</i>	34
II.4.6.	<i>Purification des acides nucléiques</i>	34
II.4.7.	<i>Ligature vecteur/insert</i>	34
II.4.8.	<i>Préparation des bactéries électro-compétentes</i>	35
II.4.9.	<i>Transformation bactérienne</i>	35
II.4.10.	<i>Criblage des bactéries contenant le plasmide recombinant</i>	35
II.4.11.	<i>Midi-préparation d'ADN plasmidique</i>	35
II.4.12.	<i>Le séquençage</i>	36
II.4.13.	<i>Méthylation de l'ADN plasmidique.</i>	36
II.4.14.	<i>Lipofection des cellules adhérentes</i>	36
II.4.15.	<i>Mesure de l'activité luciférase</i>	36
III.	Résultats	38
III.1.	Elaboration des différentes constructions	38
III.2.	Etude de l'effet de la méthylation des promoteurs sur l'expression des gènes.....	41
III.3.	Etude de l'effet de la méthylation et de la mutation des sites de liaison c-Myc sur l'expression du gène de la vTR	45
IV.	Discussion	45
	Etude de l'effet de la méthylation sur l'activité transcriptionnelle des promoteur vTR, pp38 et 14 kD	46
	Effet de la mutation des boites E sur l'activité du promoteur vTR	47
	Effet de la méthylation et de la mutation sur l'activité du promoteur vTR.....	49
V.	Perspective et conclusion	51
VI.	Bibliographie	51

I. INTRODUCTION

I.1. Epigénétique

Créé au XIXe siècle et redéfini par Conrad Waddington en 1942 dans son sens actuel, l'épigénétique réfère à un changement héritable mais réversible de l'activité du génome dû à un mécanisme autre que l'altération dans la séquence primaire de l'ADN (Jaenisch & Bird, 2003). Afin de mieux comprendre la notion de l'épigénétique, l'on peut s'appuyer sur la métaphore du professeur Thomas Jenuwein (The Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Freiburg) : « On peut sans doute comparer la distinction entre la génétique et l'épigénétique à la différence entre l'écriture d'un livre et sa lecture. Une fois que le livre est écrit, le texte (les gènes ou l'information stockée sous forme d'ADN) seront les mêmes dans tous les exemplaires distribués au public. Cependant, chaque lecteur d'un livre donné aura une interprétation légèrement différente de l'histoire, qui suscitera en lui des émotions et des projections personnelles au fil des chapitres. D'une manière très comparable, l'épigénétique permettrait plusieurs lectures d'une matrice fixe (le livre ou le code génétique), donnant lieu à diverses interprétations, selon les conditions dans lesquelles on interroge cette matrice ». L'épigénétique permet donc de comprendre les variations dans l'expression des gènes dans différentes conditions physiologiques normales, pathologiques (tumorigénèse) ou au cours du développement de l'organisme. Les mécanismes épigénétiques incluent : les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation d'ADN, la machinerie ARN non codants, les « chromatin loops ». Afin d'échapper au système immunitaire et de se multiplier dans l'hôte, les virus utilisent entre autre des modifications épigénétiques (Adhya & Basu, 2010). Nous nous limiterons ici à la description des deux premières modifications.

I.1.1. Code épigénétique des histones

L'ADN contenu dans le noyau des cellules est une longue molécule d'environ deux mètres. Pour être stocké dans le noyau cellulaire, ce dernier doit être compacté. L'unité de base permettant le compactage du matériel génétique est le nucléosome. L'ADN est enroulé autour d'un octamère protéique composé de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 permet au nucléosome de s'enrouler sur lui-même aboutissant à une fibre de chromatine plus compacte de 300 nm (figure 1). La chromatine peut se présenter sous deux formes. La première dite ouverte (euchromatine) est associée à une région transcriptionnelle active. La seconde dite fermée (hétérochromatine) réprime la transcription. Notons que le passage d'une forme à une autre est réversible et dépend des modifications subies par la région N-terminale de la queue basique des histones (Moore, Le, & Fan, 2013). Les modifications post-traductionnelles des histones forment un «code» qui dicterait l'état chromatinien local et par conséquent l'expression du gène correspondant (Jenuwein & Allis, 2001). Il existe cinq types majeurs de modifications des histones à savoir l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation et la symoylation (figure2). Dans le cadre de notre travail nous nous limiterons aux trois premières modifications décrites puisque ce sont celles qui sont exploitées par les virus.

I.1.1.1. Acétylation des histones

L'acétylation des histones consiste en un transfert d'un groupement d'acétyle à partir de l'acétyle-CoA à une lysine. Cette réaction est catalysée par une enzyme appelée histone acétyltransférase (HAT). La première HAT a été identifiée en 1996 et depuis lors, il existe de nombreuses enzymes reconnues comme ayant une activité HAT. On les classe en deux familles: les MYST (Moz, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60) et les GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) (Roth, Denu, & Allis, 2001). Ces enzymes, en catalysant le transfert du

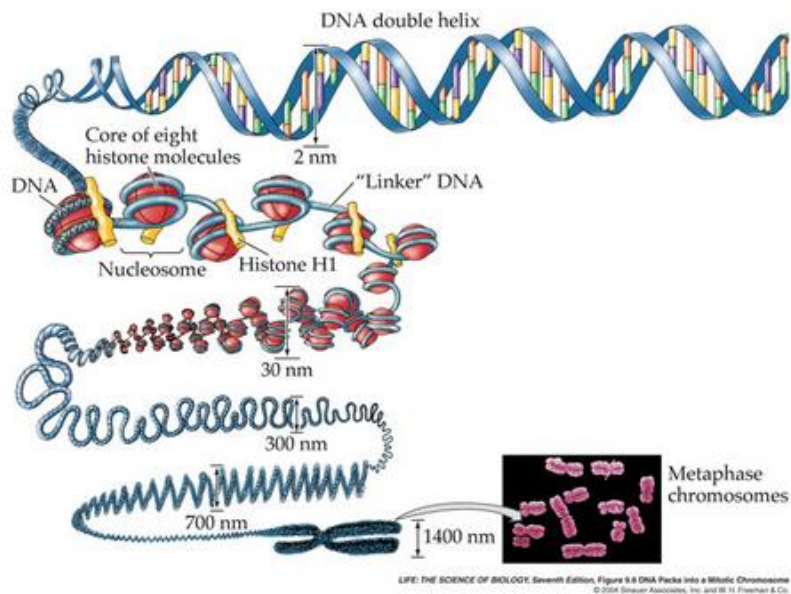


Figure 1: Différents niveaux de compaction de ADN. L'ADN est d'abord enroulé autour d'un nucléosome constitué d'un octamère d'histones. Le nucléosome et ADN sont maintenus grâce à la liaison de l'histone 1 ; L'enroulement des nucléosomes constitue un niveau de compaction supérieur aboutissant à la formation du chromosome.

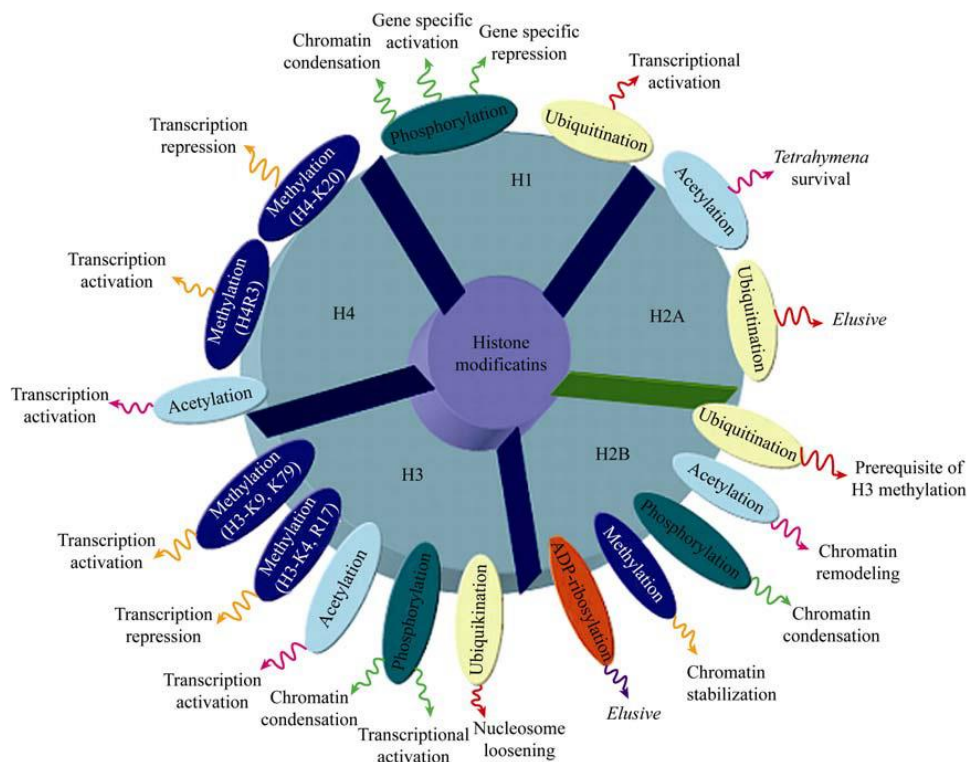


Figure 2 : Conséquences de chaque modification d'histone. Pour une même modification sur des résidus différents, les conséquences sur la chromatine, sa structure, sa régulation, peuvent être opposées.

groupement acétylé sur l'histone 4 au niveau des lysines 5 et 12, permettent le développement de l'état permmissible de la chromatine (euchromatine). A l'opposée, il existe aussi toute une famille d'enzymes capable de désacétyler les lysines des histones, les histones déacétylases (HDAC) regroupées en trois classes en fonction de leur rôle et de la similarité de séquence. Celles de la classe I (HDAC-1, -2, -3, -8 et -11) sont homologues à RPD3 de levure. Les HDAC de classe II sont homologues à HDA1 de la levure et sont en outre subdivisées en deux sous-classes à savoir la sous classe HDAC IIa regroupant les HDAC-4, -5, -7 et -9) ainsi que leur variant d'épissage MITR; et la sous classe HDAC IIb constituée de HDAC-6 et -10. Celle de la classe III HDAC sont homologues à la ySIR2 de levure et ne possède pas d'homologie avec les classe I et II (Munshi, Shafi, Aliya, & Jyothy, 2009).

Bon nombre de virus expriment des protéines pouvant interagir avec les HAT et les HDAC. C'est le cas de l'herpès simplex virus (HSV) qui durant la phase réplivative recrute des HAT au niveau de différents promoteurs (figure 3) (Adhya & Basu, 2010). Ces interactions permettent non seulement de moduler le système immunitaire de l'hôte mais également de faciliter l'expression des gènes viraux (Adhya & Basu, 2010). D'autres études ont prouvé que chez le HSV-1, les HDAC étaient impliqués dans la répression du génome viral via la déacétylation des résidus de lysine sur la queue des histones (Adhya & Basu, 2010). Cependant le virus HSV-1 a développé des mécanismes permettant d'inhiber l'activité répressive des HDAC. Le HSV-1 induit la phosphorylation des HDAC 1 et HDAC 2 via une protéine kinase (la Ser/Thr Us3) les rendant inactives (figure 3) (Poon, Gu, & Roizman, 2006). De plus, cette protéine activerait la protéine kinase A cellulaire permettant la surexpression des gènes viraux et une dissémination rapide des nouveaux virus (Benetti & Roizman, 2004). Un orthologue de la Ser/Thr Us3 kinase a également été décrit chez le virus de la varicelle (VZV : varicella zoster virus), la ORF66p kinase phosphorylant également les HDAC1 et HDAC2 (Pflum, Tong, Lane, & Schreiber, 2001).

1.1.1.2. Méthylation des histones

La méthylation est catalysée par des enzymes appelées histone méthyltransférase (HMT), le donneur du groupement méthyle est la S-adénosylmethionine (SAM). En fonction de l'acide aminé modifié, on distingue : les protéines arginine méthyltransférase (PRMT) qui méthylent les arginines et les protéines à domaine SET (Su[*var*]3-9, enhancer of zeste, trithorax) qui méthylent les lysines (Zhang & Reinberg, 2001). Les lysines et les arginines ciblées sont en majorité situées sur les extrémités amino-terminales des histones H3 et H4. Tandis que la méthylation des arginines semble avoir un effet positif sur la transcription, la méthylation des lysines joue un rôle non exclusif dans la formation de l'hétérochromatine (Zhang & Reinberg, 2001). En effet, chez les eucaryotes supérieurs, il a été prouvé que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) conduit à l'état d'hétérochromatine, alors que la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me) est liée à l'euchromatine (Jenuwein & Allis, 2001). D'autres recherches ont démontré que le nombre de groupements méthyles présents sur une même lysine peut mener à différents types de réponses, rendant ainsi le code des histones plus complexe (Santos-rosa et al., 2002).

La méthylation des histones est également exploitée par les virus pour se répliquer et échapper au système immunitaire de l'hôte. C'est le cas de VZV, un alpha-herpesvirus qui utilise la méthylation des histones pendant sa phase lytique et la phase de réactivation (Liang, Vogel, Narayanan, Peng, & Kristie, 2009). En effet, il a été observé que la phase de latence était caractérisée par un pourcentage élevé H3K9me3 et un pourcentage faible en H3K4me. Pour rentrer en phase de réactivation, le VZV induit d'une part la formation du complexe constitué du HCF-1 (host cell factor-1) du SET-1 une histone méthyl-transférase et MLL1 (mixed-lineage leukemia 1) ceci grâce à l'activateur viral, la IE-62 (Intermediately early-62).

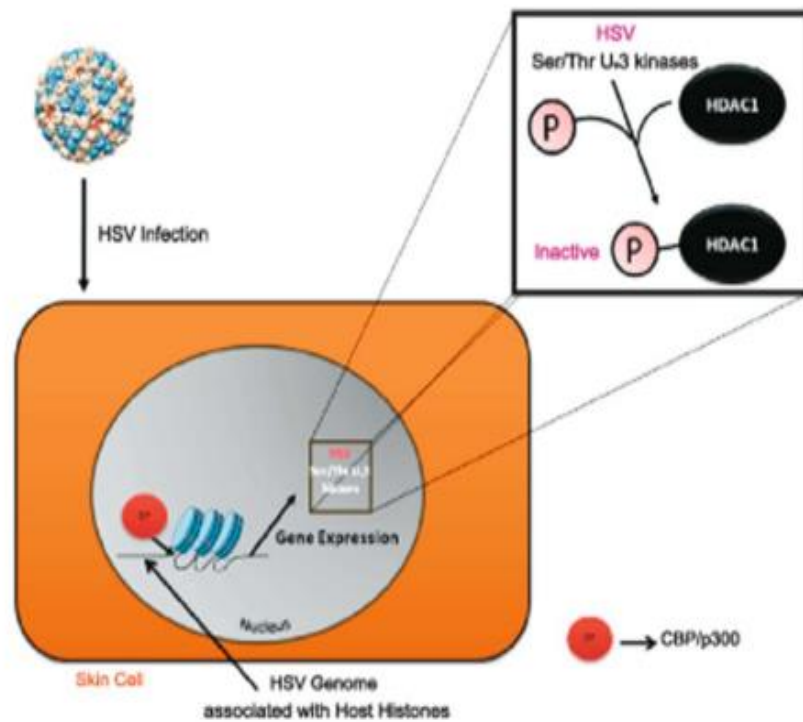


Figure 3: Acétylation-déacétylation des histones cellulaires pendant l'infection par le HSV. Le génome viral s'associe aux histones, et au complexe CBP/p300. L'activité histones acétyltransférase de la kinase virale Ser / Thr Us3 est essentiel de promouvoir la transcription. En outre, les kinases Ser / Thr Us3 sont capables d'inhiber l'activité suppresseur des HDAC par leur phosphorylation, favorisant ainsi seulement l'augmentation de l'expression du gène cible, mais également l'échappement au système immunitaire de hôte.

Cette interaction va conduire à la méthylation de l'histone 3 au niveau de la lysine 4 (H3K4me). D'autre part, l'activateur transcriptionnel HCF-1, quant à elle, va recruter une histone déméthylase, la LSD-1 qui catalyse la deméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (figure4) (Liang et al., 2009).

Chez le virus de Marek, des modifications épigénétiques ont également été décrites. En effet, les travaux de Brown et ses collaborateurs en 2011 sur les promoteurs situés dans les régions répétées du virus ont montré d'une part que le promoteur du gène pp38 surexprimé dans la phase lytique présentait les marques de l'hétérochromatine (H3K9me3, H3K23me3). D'autre part, le cluster microRNA-9/4 impliqué dans la phase de latence avait leur histone 3 méthylé au niveau de la lysine 4 (H3K4me) et acétylé au niveau de la lysine 9 (H3K9Ac) (Brown, Nair, & Allday, 2012a). Ainsi, pendant la phase de latence, les gènes impliqués dans la phase lytique sont réprimés tandis que ceux impliqués dans la phase de latence sont activés.

1.1.1.3. Phosphorylation des histones

La majorité des travaux effectués sur cette modification ont été observés sur la sérine 10 de l'histone H3. La phosphorylation de l'histone a également été décrite sur les résidus de thréonine et tyrosine. Ces modifications sont régulées par deux enzymes à activité opposée à savoir les kinases qui sont des donneurs de phosphate suite à l'hydrolyse d'ATP et les phosphatases qui sont des déphosphorylases. La phosphorylation favorise l'ouverture de la chromatine (euchromatine) facilitant l'accès des facteurs de transcription (Lacoste & Côté, 2014). La phosphorylation des histones représente aussi un bio-marqueur des cassures doubles brins de l'ADN. En effet, suite à la cassure double brin de l'ADN, l'histone 2A est phosphorylée au niveau de la sérine 139 chez les mammifère et 129 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi l'histone phosphorylée appelé gamma H2AX va induire le recrutement d' machinerie de réparation au niveau du site de la cassure double brin de l'ADN (Kuo & Yang, 2008).

Il a été montré que le gamma-herpèsvirus 68 murin (MHV-68) utilisait la phosphorylation des histones pour stimuler sa réplication (Tarakanova et al., 2007). En effet, une fois dans la cellule hôte, MHV-68 va induire la phosphorylation de l'histone 2 (H2AX) grâce à la kinase virale ORF36 retrouvée chez tous les gamma-herpèsvirus (Tarakanova et al., 2007). Cette kinase virale va interagir avec la protéine ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) résultant en l'amplification du signal H2AX propice à sa réplication (Tarakanova et al., 2007).

Chez le virus Epstein-Barr (EBV), il a été également démontré que la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 par la MSK1 (Mitogen- and stress-activated kinase 1) était essentielle à la carcinogénèse induite par LMP1 (Latent Membrane Protein-1 (LMP1)). Ces résultats prouvent que les virus exploitent les des modifications épigénétiques de la cellule hôte pour se répliquer dans l'hôte et induire la tumorigénèse (Li et al., 2013).

1.1.2. La méthylation d'ADN

La méthylation de l'ADN se produit par l'addition covalente d'un groupe méthyl (CH₃) au niveau du carbone 5 de la cytosine résultant en la 5-méthylcytosine (5-mC). Dans les cellules somatiques, la 5-mC est retrouvé presque exclusivement au niveau des cytosines précédant une guanine (CpG) et non les cytosines complémentaires à une guanine. Une exception a été reportée dans des souches embryonnaires (ES), où une quantité substantielle de 5-mC est également observée dans des contextes non- CpG (Lister et al., 2009). Les dinucléotides CpG sont répartis de façon non uniforme dans le génome avec une sous-représentation générale, mais un enrichissement dans de courtes régions, appelées îlots CpG, positionnées au niveau du promoteur et/ou du premier exon de plus de 60% des gènes humains (Bird, 2002). Il a été démontré que, la méthylation des îlots CpG dans la région

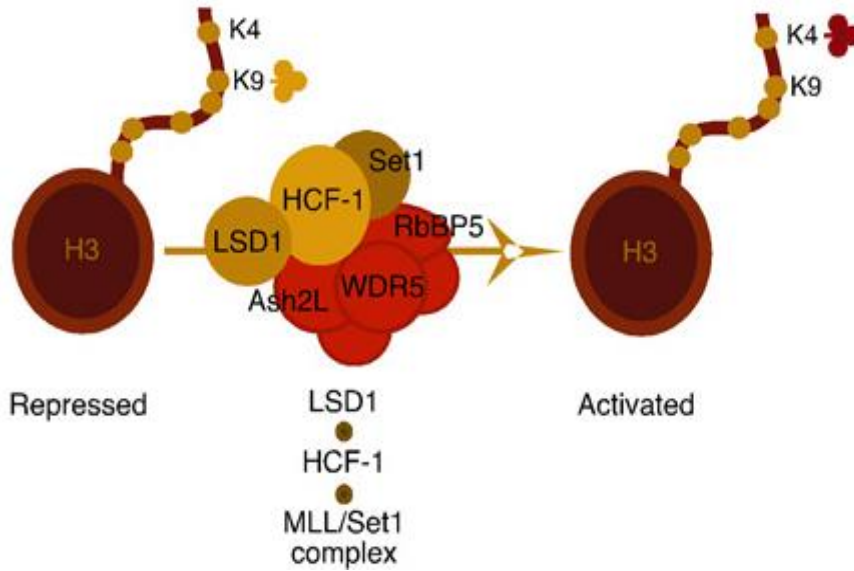


Figure 4 : Complexe de protéine impliqué dans la réplication et la réactivation du VZV. Pendant la phase de latence, on observe une hyper méthylation de la lysine 9 et une faible méthylation de la lysine 4 de l’histone H3 caractéristique de l’état d’hétérochromatine. Un activateur viral (absent sur cette figure) induit le recrutement d’un transactivateur HCF-1 et le complexe MLL/Set1 conduisant à la triméthylation de la lysine 4 de l’histone H3. Le HCF-1 induit également le recrutement de la LSD1 qui a pour rôle de déméthyle l’H3K9 conduisant à l’état d’euchromatine.

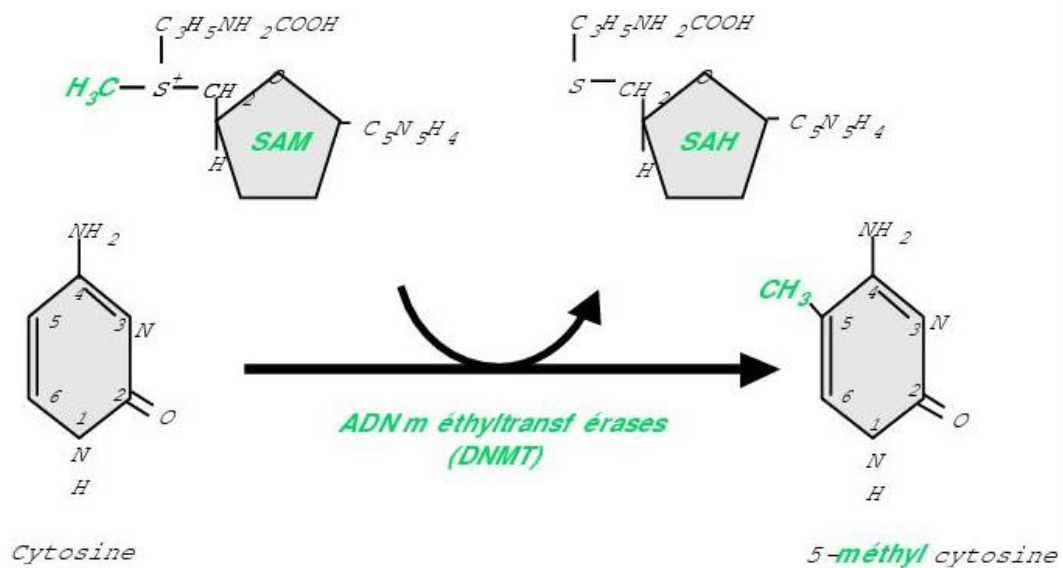


Figure 5 : La réaction chimique de méthylation de l’ADN. Des enzymes (ADN méthyltransférases ou DNMT) assurent l’addition d’un groupement méthyl-CH₃ à partir d’un donneur, la S-adenosyl-méthionine (SAM). Les produits de la réaction sont une cytosine méthylée et une molécule de S-adenosyl-homocystéine (SAH).

promotrice d'un gène réprime l'expression de ce gène(Simonetta Friso and Sang-Woon Choi, 2002). Le transfert du groupe méthyle est contrôlé à différents niveaux dans les cellules et est réalisé par une famille d'enzymes appelées ADN méthyltransférases (DNMTs), le donneur du groupement méthyl étant la S-adénosylméthionine (SAM) (figure 5). La réversibilité de cette réaction serait sous la dépendance d'une déméthylase récemment découverte. Ces groupements méthyl forment ainsi un revêtement moléculaire, variable d'un gène à l'autre, d'un type cellulaire à un autre, et confèrent un caractère unique et transmissible à l'ADN(Bhattacharya, Ramchandani, Cervoni, & Szyf, 1999). Trois DNMTs (DNMT1, DNMT3a et DNMT3b) sont nécessaires pour l'établissement (DNMT3a et b) et l'entretien (DNMT1) des modèles de méthylation de l'ADN. La DNMT1 est responsable de la reproduction sur le brin néo-synthétisé, lors de la réplication de l'ADN, des modèles établis de méthylation de l'ADN présent sur le brin matrice. DNMT3a et 3b semblent médier la mise en place de nouvelles ou de novo profils de méthylation sur les promoteurs des gènes et sur des séquences entourant les centromères respectivement (Moore et al., 2013).

1.1.2.1. La méthylation de l'ADN chez les herpesvirus

En induisant la méthylation de l'ADN, plusieurs herpesvirus pourraient activer ou réprimer l'expression de certains gènes ceci dépendant des différentes phases de son cycle de vie (Flower et al., 2011). C'est le cas par exemple du virus Epstein-Barr (EBV) et du Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) agent infectieux respectivement de la mononucléose et du cancer de Kaposi. L'EBV code pour un facteur de transcription (Zta) qui fixe les promoteurs CpG méthylés des gènes de la phase lytique. Ainsi les gènes impliqués dans la phase lytique, du virus restent exprimés malgré la méthylation des promoteurs induits par le système de défense de l'hôte (Chan et al., 2004; Flower et al., 2011). KSHV code pour un cluster de 12 micro-ARN (miARN) impliqué dans la phase de latence du virus. Lieberman, et ses collaborateurs ont montré que le KSHV codait un cluster de 12 miRNA exprimé pendant la phase de latence de son cycle. Les mutants KSHV miARN (BAC36 Δ miR) ont un comportement semblable à celui de type sauvage (wt) BAC36 dans la production virale et la transcription des gènes de latence. Cependant, ces mutants BAC36 Δ miR exprimaient constamment un niveau élevé de gènes lytiques viraux, y compris l'activateur transcriptionnel précoce immédiat Rta (ORF50). La comparaison des marques épigénétiques des génomes des mutants BAC36 Δ miR montre une diminution de la méthylation de l'histone H3K9, une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 et une perte frappante de méthylation de l'ADN dans le génome viral et cellulaire. Il y aurait donc un équilibre entre la méthylation et la déméthylation de l'ADN à l'origine de l'activation ou la répression des gènes spécifiques des différentes phases. Les mécanismes régulant le switch entre la phase de réplication précoce et la phase de latence diffèrent d'une espèce d'herpesvirus à un autre. Cependant, le passage à la phase de réactivation reste encore moins compris (Lieberman et al., 2010).

1.1.2.2. La méthylation de l'ADN chez le virus de Marek (GAHV-2)

Des données épigénétiques préliminaires ont été obtenues sur GAHV-2. Dans une première étude, il a été découvert que le génome de GaHV-2 présentait des marques de méthylation pendant la phase de latence. Cette première observation a laissé croire que, comme chez les autres herpesvirus, la méthylation pourrait jouer un rôle dans la restriction de l'expression des gènes par le contrôle transcriptionnel pendant la latence (Key, Kanamori, & Ikuta, 1987). Dans une deuxième étude, un modèle de méthylation du génome de GaHV-2 plus détaillé a été établi (Brown et al., 2012). Cette étude indique que, pendant la phase de latence, le modèle de méthylation diffère d'une région à une autre. On observe un niveau de méthylation élevé à proximité des séquences des gènes lytiques comme celui codant la

phosphoprotéine 38 tandis que les régions proches de la séquence codante d'un cluster miARN 9-4 sont non méthylées (Brown et al., 2012b). Au travers de cette description, on pourrait postuler que la méthylation de l'ADN comme chez d'autres herpesvirus joue un rôle dans la limitation de l'expression de certains gènes au cours du cycle de vie GaHV-2.

I.2. La maladie la de Marek

I.2.1. Historique

L'appellation « maladie de Marek » repose sur la première description clinique faite par J. Marek en 1907 des lésions particulières des nerfs chez le poulet. Pendant de longues années, malgré cette première publication, cette maladie n'a stimulé aucun intérêt pour la communauté scientifique. Ceci est probablement dû au fait que cette pathologie ne représentait pas un problème économique majeur. Jusqu'en 1936, la maladie de Marek fut confondue avec d'autres processus tumoraux sous le nom de leucoses aviaires. Au cours des années 1950, alors que la sévérité de la maladie de Marek augmentait régulièrement en parallèle avec l'industrialisation de la filière avicole aux Etats-Unis et en Europe, une forme aiguë de la maladie est apparue (Benton, 1957). Cette nouvelle forme, associée à un fort taux de mortalité (30-60%) chez les animaux infectés, est devenue la forme prédominante de la maladie au début des années 1960. Dès lors, les travaux de recherche portant sur la maladie de Marek se sont intensifiés. L'agent étiologique fut isolé permettant de séparer la maladie de Marek des leucoses lymphoïdes causés par des rétrovirus (Biggs, 1961 ; Campbell 1961). Cette maladie hautement contagieuse à répartition mondiale est causée par un herpèsvirus, appelé Virus de la maladie de Marek (MDV : Marek's Disease Virus et rebaptisé récemment GaHV-2 : Gallid Herpesvirus de type 2). La maladie de Marek se caractérise par une infiltration de cellules lymphocytaires au niveau des nerfs périphériques et par le développement de tumeurs lymphoïdes au niveau des organes viscéraux, des muscles et de la peau (Nazerian, 1973). Au cours années 1970, la découverte d'un vaccin élaboré à partir de la souche virulente HPRS-16 atténuée par passages successifs en culture de cellules (Churchill *et al.*, 1969) a permis de maîtriser et de stabiliser l'impact économique de la maladie. La maladie de Marek fut ainsi le premier modèle pour lequel une néoplasie a été contrôlée de manière satisfaisante par vaccination. Malheureusement, quelques années après l'élaboration du vaccin, le virus de la maladie de Marek circulant dans la population des poulet a subi d'importantes mutations conduisant à l'apparition des souches de plus en plus virulentes, dites « hyper virulentes » (vv et vv+) résistantes au vaccin. De nos jours, malgré des progrès satisfaisants, la maladie de Marek demeure un réel problème de santé publique ayant un impact économique important. La recherche de nouvelles stratégies de contrôle, de prévention et de traitement de la maladie de Marek demeure une nécessité, ce qui explique l'intérêt de la communauté scientifique.

I.2.2. Classification du GAHV-2 au sein de la famille des Herpesviridae

Le virus GaHV-2 appartient à l'ordre des *Herpesvirales*. Cet ordre comporte trois familles: la famille des *Malacoherpesviridae* ne comportant qu'une seule espèce infectant l'huître; la famille des *Alloherpesviridae* constituée de virus d'amphibiens et de poissons et la famille des *Herpesviridae* composée exclusivement des virus de mammifères et d'oiseaux. Cette dernière famille est répartie en trois sous-familles composées chacune de quatre genres (tableau 1). Il s'agit de :

La sous famille des *Alphaherpesvirinae*, caractérisée par un cycle répliatif court; une dissémination rapide en culture de cellules; une forte destruction des cellules infectées et l'établissement non exclusive des infections latentes au sein des ganglions nerveux sensoriels. C'est à cette sous-famille qu'appartiennent le virus de Marek

(GAHV-2) ; les virus humains Herpès Simplex Virus 1 et 2 (HSV-1 ou HHV-1 et HSV-2 ou HHV-2) ainsi que le virus de la varicelle et du zona (VZV ou HHV-3).

La sous famille des *Betaherpesvirinae* présente un cycle répliatif long et une infection lente en culture de cellules. Elle comprend les virus humains HHV-6, HHV-7 et le cytomégalovirus (HCMV ou HHV-5)

La sous famille des *Gammaherpesvirinae*. Elle se réplique exclusivement dans des cellules lymphoblastoïdes; infectent de manière lytique les cellules épithéliales et les fibroblastes et se retrouvent fréquemment de manière latente au sein des tissus lymphoïdes. Dans cette sous famille, on retrouve le virus d'Epstein-Barr (EBV ou HHV4) ainsi que le virus du sarcome de Kaposi (KSHV : Kaposi Sarcoma, Herpes Virus ou HHV8).

Comme mentionné ci-dessus, le virus de Marek appartient à la sous famille des *Alphaherpesvirinae* et plus précisément au genre *Mardivirus*. Dans ce genre *Mardivirus*, on distingue trois sérotypes de GaHV-2 (tableau 2) en fonction du degré de virulence et du pouvoir oncogénique. Le sérotype 1 auquel appartient le virus GaHV-2, regroupe la totalité des souches virulentes et oncogènes (RK-1, 648A, RB-1B, Md5 par exemple) mais également des souches faiblement virulentes et non oncogènes (Rispen, HPRS17 par exemple). Le sérotype 2 quant à lui est composé uniquement des souches non oncogènes et faiblement virulentes (SB-1, HPRS24). Le dernier sérotype regroupe les virus ayant pour hôte naturel la dinde (*Meleagrid herpesvirus*). Il est également constitué des souches faiblement virulentes et non oncogènes qui, à l'instar des autres souches faiblement virulentes sont utilisés dans la vaccination.

1.2.3. Structure et organisation génomique du GAHV-2

Le virus de la maladie de Marek présente la structure typique des herpesvirus. Ce sont des virus à ADN double brin linéaire contenu dans une capsidie icosaédrique composée de 162 capsomères. D'un diamètre de 85 à 100 nm, la capsidie est entourée d'un tégument qui est lui-même recouvert par une enveloppe d'origine cellulaire contenant un panel de glycoprotéines (figure 6). Au sein des herpesvirus on distingue six organisations génomiques référencées de la classe A à F (figure 7). Cependant, la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* présentent des génomes de classes D et E.

Les trois génotypes du GaHV-2 (figure 8) ont une organisation génomique de classe E identique à celle de l'herpesvirus simplex de type 1 (HHV-1). Ils sont composés d'un ADN linéaire bicaténaire d'environ 160 à 180 kpb selon le génotype considéré. Il comporte deux séquences uniques: une longue (U_L) et une courte (U_S) encadrées par des séquences répétées et inversées bordant U_L (TR_L et IR_L) et courtes bordant U_S (IR_S et TR_S). Au niveau de la jonction IR_L/IR_S et des extrémités du génome GaHV-2 l'on note la présence des séquences télomériques composées de répétitions d'hexamères GGTTAG de longueur variable (Kishi et al., 1991). Le TR_L et IR_L contiennent des gènes qui codent pour des protéines ou des structures d'ARN qui sont importants pour le tropisme cellulaire (l'interleukine 8 virale, $vIL-8$) et la tumorigénèse (Meq et vTR).

1.2.4. Les formes cliniques

Depuis la première description de la maladie de Marek par Jozsef Marek en 1907 deux formes cliniques de la maladie ont été observées. Ces différentes formes résultent de changements du tropisme et de la virulence du virus. Ainsi, on distingue: la forme neuronale décrite par Jozsef Marek dite classique, et la forme virulente lymphomateuse dite aiguë. La forme classique de la maladie suit une longue période d'incubation (3 à 9 semaines) et se manifeste dans un premier temps par des troubles de la station ou de la marche. Il s'ensuit

Tableau 1 : Classification de l'ordre des *Herpesvirales*

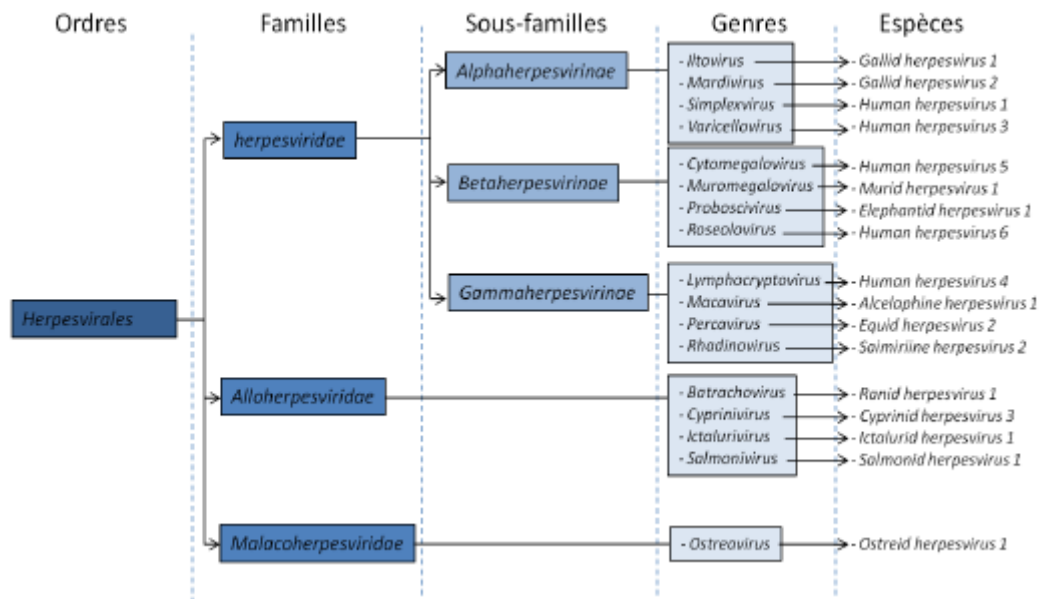


Tableau 2 : Classification du genre *Mardivirus*.

Sérotype viral	Espèce virale (hôte naturel)	Hôte naturel	Pathotype	Oncogénicité	souches
Marek's disease virus Serotype 1 (MDV-1)	Gallid herpesvirus 2 (GaHV-2) (poulet)	poulet	Hyperhypervirulente (vv+)	+++	RK1, 584A, 648A
			Hypervirulente (vv)	++	RB-1B, Md-5 Md-11
			Virulent (v)	+	GA, HPRS16, JM
			Faiblement virulente(m)	nulle	Rispens, cu-2, HPRS17
MDV-2	GaHV-3 (poulet)	poulet	Faiblement virulente(m)	nulle	SB-1, HPRS24, HN-1
MDV-3	Meleagrid herpesvirus	Dinde	Faiblement virulente(m)		

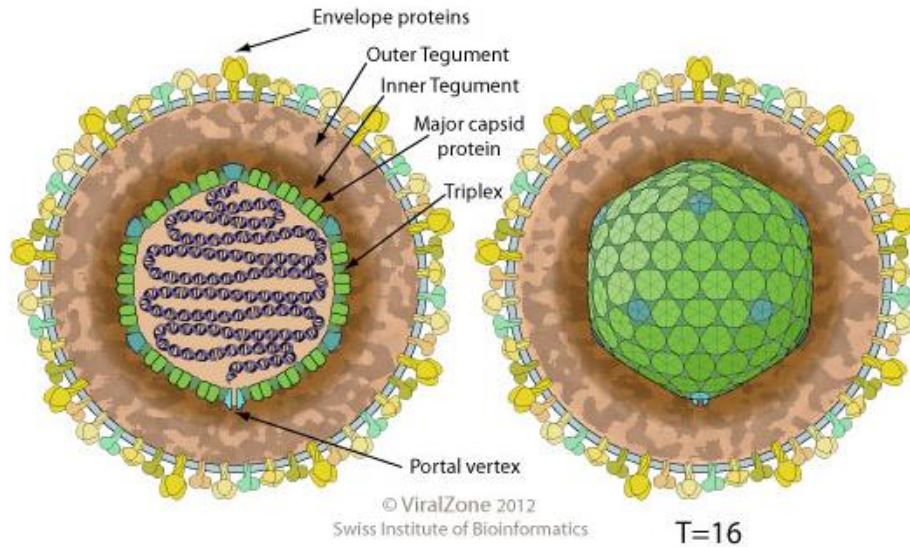


Figure 6 : Organisation structurale du virus de MDV-1. L'ADN linéaire est contenu dans une capsid e de forme icosaédrique. La capsid e est entourée par un amas de protéines formant le tégment qui lui même sont recouvert d'une enveloppe cellulaire possédant des glycoprotéines de surfaces

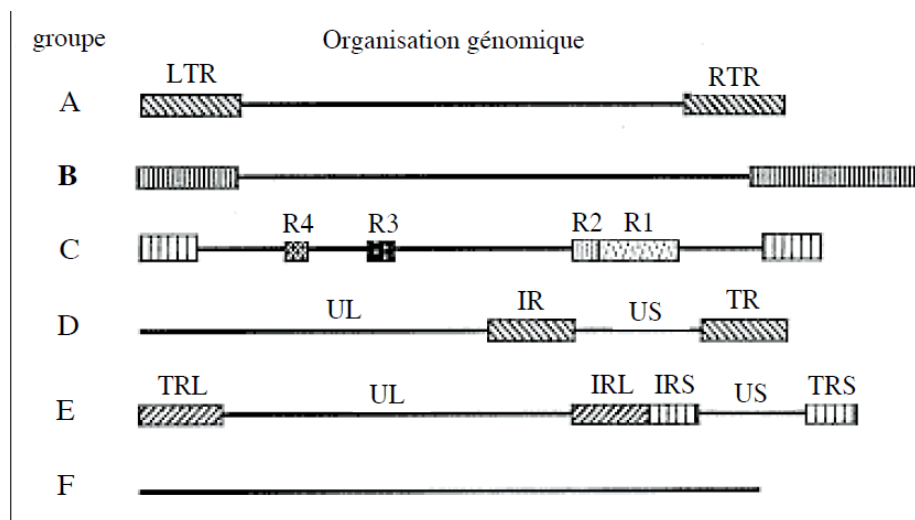


Figure 7 : Représentation schématique des structures génomiques des herpesvirus. Les lignes horizontales représentent les régions uniques. Les domaines répétés sont figurés par des rectangles et sont ainsi désignés : domaine répété gauche ou droit (LTR et RTR) pour le groupe A, domaines répétés internes R1 à R4 pour le groupe C et domaines répétés internes et terminaux (IR et TR) pour le groupe D. Les séquences terminales du groupe B sont composées de séquences répétées présentes en nombre variable à chaque extrémité du génome. Le nombre de ces séquences répétées peut varier entre les deux extrémités. Le groupe E est composé d'une séquence unique longue (UL) et d'une séquence unique courte (US) délimitées par des séquences répétées internes et externes (TRL, TRS, IRL et IRS). Aucune répétition terminale n'a été décrite pour le sous-groupe F.

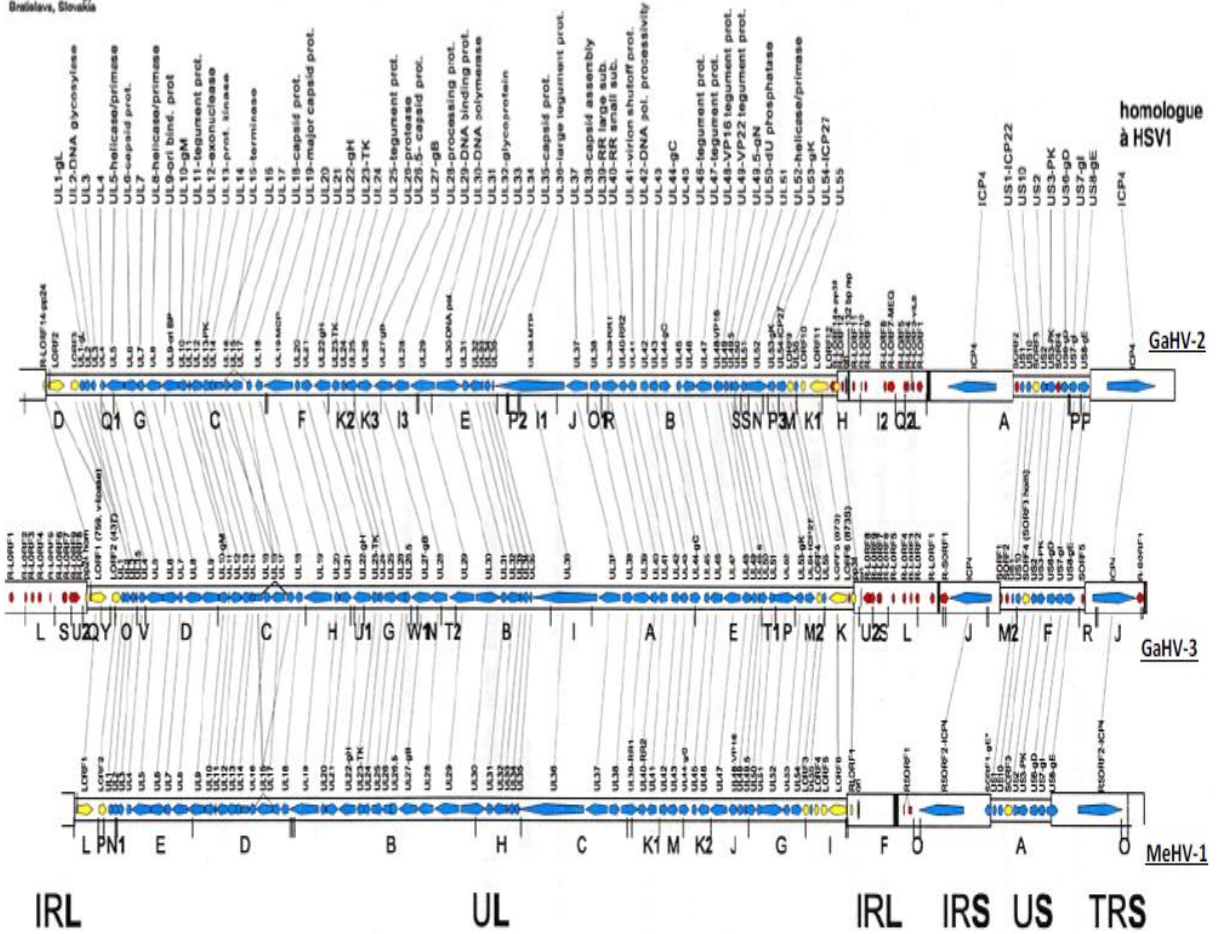


Figure 8 : Comparaison de la structure génomique des 3 génotypes de Mardivirus, GaHV-2, GaHV-3 et MeHV-1. Les gènes colorés en bleu ont des homologues chez les autres alphaherpesvirus. Les gènes en jaune sont spécifiques aux trois génotypes de MDV et les gènes en rouge sont spécifiques de l'espèce.

l'apparition de divers signes de paralysie : ailes pendantes, difficultés respiratoires, rétention fécale. La forme classique de la maladie, est également caractérisée par une atteinte oculaire pouvant conduire à une cécité partielle ou totale des poulets. La mort survient généralement lorsque la paralysie engendre une incapacité des animaux à accéder à la nourriture. La forme aiguë quant à elle se manifeste par le développement de lymphomes au niveau des viscères (glandes adrénaliques, cœur, intestins, reins, foie, poumons, ovaires, rate, thymus...). L'évolution de la maladie est plus rapide et la mort de l'animal survient environ 4 semaines après l'infection.

1.2.5. Transmission

Parmi les espèces susceptibles d'être infectées par le virus de la maladie de Marek, la poule domestique *Gallus gallus* est la plus sensible. Néanmoins, certains cas de la maladie ont été répertoriés chez des espèces telles que la caille, la dinde ou le faisan. Les follicules plumeux constituent le réservoir principal du virus. Des études en microscopie électronique ont confirmé la forte multiplication virale dans les cellules épithéliales en voie de kératinisation (Cauchy, 1970 ; Nazerian & Witter, 1970). De nos jours, les modalités de transmission de la maladie sont bien connues. Elle se transmet par voie aérienne et par contact direct ou indirect entre les poules. Pendant longtemps, on a pensé que la transmission se faisait de façon verticale des femelles aux poussins. Des études ont montré que les poussins éclos et éloignés de leurs parents sont fréquemment contaminés. Les embryons injectés expérimentalement multiplient le virus et expriment la maladie. Suite à une démonstration de la contagion par les poussières présentes dans l'élevage, l'hypothèse d'une transmission verticale a été émise. Or, il a été montré que les organes d'embryons issus de poules infectées ne contiennent pas le virus de l'Herpes. Lorsque des œufs de poules infectées sont soumis à des traitements antiseptiques précoces et puissants, les embryons qui survivent se développent et les poussins éclos sont indemnes de virus. La transmission verticale, si elle existe, serait exceptionnelle (Cauchy & Coudert, 1986).

1.2.6. Vaccination

L'efficacité du vaccin contre le GaHV-2 dépend de la souche virale utilisée. Dès la fin des années 1960 et en réponse aux pertes énormes dans la production aviaire observées aux Etats Unis et en Europe, des recherches ont abouti à l'élaboration d'un premier vaccin à partir de la souche oncogénique HPRS-16 atténuée par passages successifs en cultures de cellules (Churchill et al., 1969). Quelques années plus tard, ce vaccin a été remplacé par un autre produit à partir de la souche non oncogénique HVT. Ce dernier encore largement utilisé, avait entre autre intérêt la protection contre la dissémination horizontale du virus. Néanmoins, elle n'empêche pas la réplication et l'excrétion des particules virales chez les poules vaccinées. Les limites du vaccin HPRS-16 et HVT ont conduit en 1972, à l'utilisation de la souche faiblement pathogène GaHV2-CVI988 aussi appelée Rispens atténuée par passages successifs en cultures de cellules primaires de canard (Rispens et al., 1972 (a) ; Rispens et al., 1972 (b)). Cette souche vaccinale s'est avérée très efficace, notamment vis-à-vis de certaines souches de MD (Witter et al., 1995). Suite à l'apparition de souches hyper virulentes (vv+), de nouveaux vaccins ont vu le jour. Il a été montré que les vaccins bivalents issus des virus de sérotype différents aboutissaient à une synergie des deux souches vaccinales conférant une meilleure protection aux animaux. C'est par exemple, le cas du vaccin bivalent GaHV3-SB-1/HVT introduite aux Etats-Unis en 1983 et employé actuellement dans le reste du monde. Malgré le fait que la vaccination ne confère pas une protection totale contre les souches hypervirulentes, la maladie de Marek représente le premier exemple de cancer viro-induit pour lequel un vaccin a été développé avec succès.

1.2.7. Cycle de vie et Physiopathologie virale

Comme tous les herpesvirus, le cycle viral comporte trois phases : La phase lytique précoce qui est caractérisée par une réplication active et par la formation de nouveaux virions ; la phase de latence dans laquelle le virus met sur pied des mécanismes leur permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte et enfin la phase de lytique tardive qui consiste à une réactivation d'une sous population des cellules infectées en latence. Cette étape est principalement caractérisée par une dissémination horizontale du virus. Le mécanisme moléculaire exact à l'origine de cette réactivation cellulaire reste encore peu connu. Le déroulement de l'infection expérimentale de lignées de poules sensibles par une souche de GAHV-2 oncogénique (forme aiguë de la maladie) quant à lui peut se résumer en 4 phases : l'infection cytolitique précoce ; la latence ; l'infection cytolitique tardive et la phase tumorale (Figure 9). L'infection cytolitique précoce commence deux jours après l'arrivée du virus dans le tractus respiratoire par inhalation de la poussière. L'entrée du virus induit le recrutement des cellules phagocytaires. La phagocytose du virus par les cellules immunitaires (macrophages ou cellules dendritiques), conduit le virus vers les organes lymphoïdes (bourse de Fabricius, thymus et rate) où ils infectent majoritairement les lymphocytes B (Barrow et al., 2003, Nair, 2005). La lyse des cellules B suite au développement de nouveaux virions, induit une inflammation aiguë au cours de laquelle sont recrutés les macrophages, les lymphocytes T, les lymphocytes B ainsi que les granulocytes. Cette activation des lymphocytes T les rendant sensibles à l'infection, semble être à l'origine de leur transformation (Ross, 1999). La phase cytolitique précoce dure environ cinq jours. Elle est précédée par une phase d'infection latente qui se produit majoritairement dans les lymphocytes T de type CD4+ (Lee et al., 1999). Lors de cette phase de latence, le virus met en place des mécanismes qui permettent de détourner le système immunitaire de l'hôte à son profit. D'autre part, le virus exprime des gènes leur permettant de réprimer leur multiplication.

Deux à trois semaines après l'infection, le virus entreprend une seconde phase cytolitique dite tardive. Cette seconde infection cytolitique qui se caractérise principalement par la nécrose des lymphocytes T infectés entraîne une réaction inflammatoire suivie d'une infiltration massive des cellules immunitaires dans les organes. On assiste à une dissémination virale de cellule à cellule.

La phase tumorale est caractérisée par l'apparition de lymphomes T, issus en majorité de cellules T CD4+ transformées. Elle se manifeste tardivement après l'infection, mais elle peut apparaître dès la deuxième semaine post infection. Elle conduit le plus souvent à la mort de l'animal suite à une paralysie et au dysfonctionnement des organes atteints.

1.3. Transcriptome et protéome de la phase lytique et de latence du cycle de GaHV-2

Lors de la coévolution du GAHV-2 avec son hôte naturel, le poulet, le virus aurait développé des mécanismes leur permettant de se répliquer et de se disséminer de façon optimale dans les cellules cibles de l'hôte. Parmi ces mécanismes, l'on peut citer le détournement à leur profit de certaines protéines de l'hôte, l'expression ou la répression de certains gènes viraux ce en fonction des phases du cycle de vie.

1.3.1. Protéines sécrétées et leur rôle dans la réplication lytique

Suivant la chronologie du cycle du GAHV-2, les gènes impliqués dans la phase lytique ont été répartis en trois groupes (Tableau 3) (Schat et al., 1989)

Tableau 3 : Les principales protéines de la phase de réplication lytique du MDV

	protéines	Fonction
Protéines très précoces (α)	ICP4 ICP27	Protéines transactivatrices des gènes précoces et tardifs
	gK	Glycoprotéine impliquées dans la diffusion virale de cellule à cellule
Protéines précoces (β)	pp24 pp38 Thymidine Kinase DUTPase Ribosyl reductase ADN polymérase Hélicase-Primase Protéine de liaison à l'ADN simple brin	Facteurs de transcription Protéines impliquées dans la réplication de l'ADN et le métabolisme des acides nucléiques
Protéines tardives (γ)	gB gC gD gH gL	Glycoprotéines impliquées dans l'entrée du virus dans les cellules
	gE/gI gM/gN	Glycoprotéines impliquées dans la diffusion virale de cellule à cellule
	VP11/12 VP22 VP13/14	Protéine de tégument Protéine de tégument Protéine de tégument
	VP16	Protéine de tégument transactivatrice des gènes très précoces
	VP5 VP19c VP21-VP24 pré-VP22a VP23 VP26	Protéine majeure de capside Protéine de capside Protéines de capside Protéine d'échafaudage Protéine de capside Protéine de capside

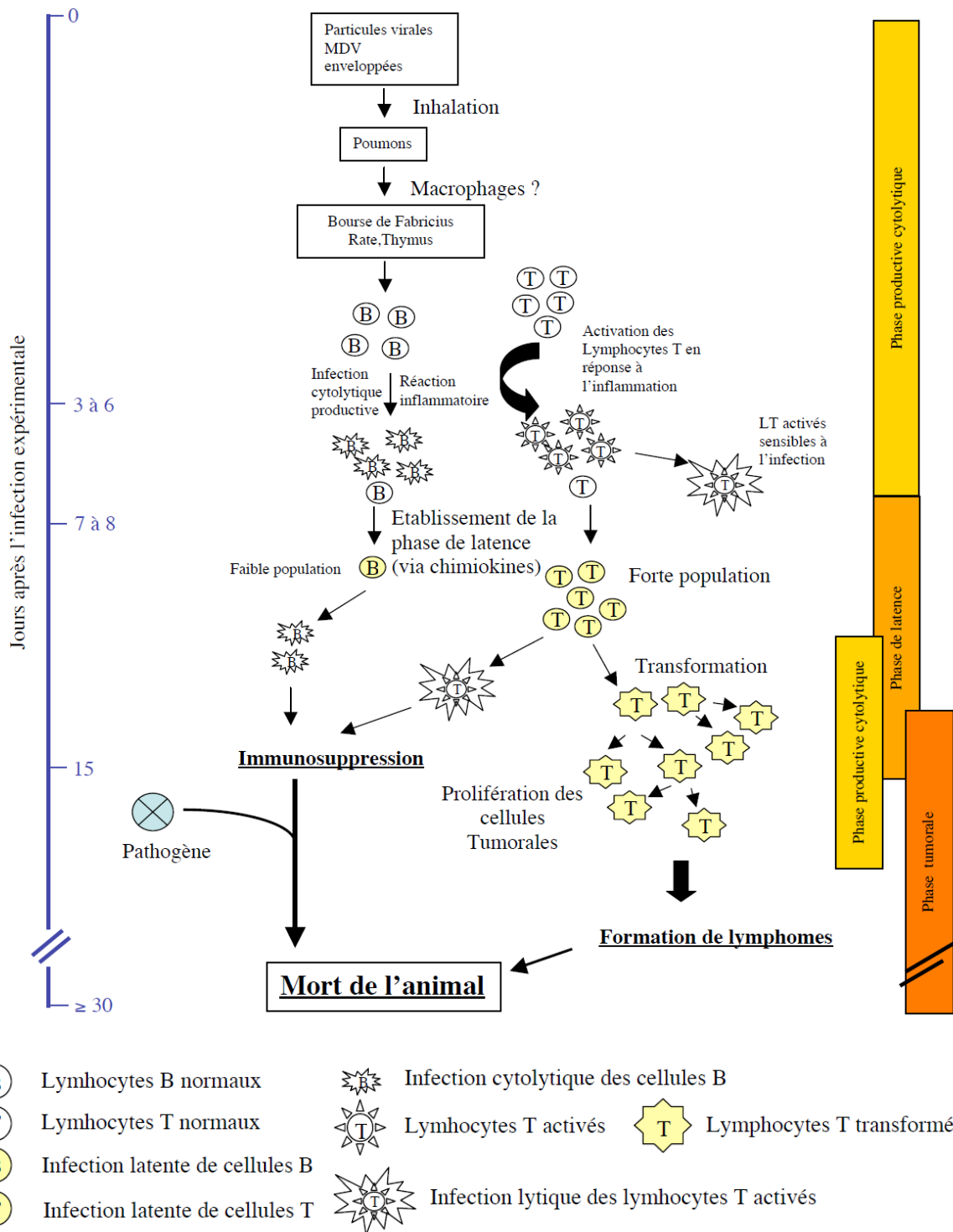


Figure 9 : Chronologie de la pathogenèse d'une souche oncogénique (GaHV2) du virus de la maladie de Marek. Les différentes étapes depuis la pénétration du virus dans les voies respiratoires de l'animal jusqu'à sa mort sont décrites. Les cellules intervenant dans le cycle viral et leur état d'activation sont représentées ainsi :

1.3.1.1. Les gènes α

Également appelés gènes très précoces ou IE (Immediate Early), ce sont des transactivateurs des gènes viraux et cellulaires. Trois protéines (ICP4, ICP22 et ICP27) ont été décrites issues de la transcription de ces gènes. La protéine ICP4 localisée respectivement dans les régions TRS et IRS et codée par les gènes MDV084 et MDV100, est considérée comme étant la principale protéine impliquée directement ou indirectement dans la régulation des gènes viraux et cellulaires exprimés lors du cycle réplcatif (Anderson et al., 1992). Il a été montré que ces protéines en s'auto-transactivant, puis induisaient la transcription des gènes précoces impliqués dans la réplication du génome viral à l'instar de la phosphoprotéine 38 kDa (pp38 et 24 kDa (PP24) (Pratt et al., 1994 ; Endoh et al., 1995).

1.3.1.2. Les gènes β : Les phosphoprotéines pp38 et pp24.

Les gènes β encore appelés gènes précoces ou E (Early) sont transactivés par les gènes α . Ce sont tous les gènes impliqués dans la réplication du génome viral et le métabolisme des acides nucléiques. Les gènes précoces *pp38* et *pp24*, spécifiques de GaHV-2, sont localisés respectivement au niveau des jonctions U_L/IR_L et TR_L/U_L . Ces protéines présentent une région NH₂ terminale identique puisque codée au niveau des régions répétées mais diffèrent l'une de l'autre dans leur partie COOH terminale. De ce fait, ces deux polypeptides possèdent un promoteur identique caractérisé par la présence de l'origine de réplication lytique du virus (figure 10) (Katsumata et al., 1998; Ding et al., 2007). Ils ont été décrits comme des antigènes exprimés dans le cytoplasme et à la surface des cellules cancéreuses (Buranathai 1997). Ces gènes sont abondamment exprimés dans les cellules infectées de manière lytique mais également dans les tumeurs et les lignées lymphoblastoïdes transformées (CUI 1990, Buranathai 1997). Leurs rôles dans la pathogénèse induite par GaHV-2 restent mal caractérisés mais il semblerait qu'ils soient majoritairement impliqués dans la réactivation de GaHV-2 et durant l'infection lytique des lymphocytes (Parcells 1999). Cependant, l'utilisation d'une souche virulente (md-5) délétée pour le gène *pp38* a permis de montrer *in vivo* le rôle crucial de ce dernier lors de l'infection cytolitique précoce des lymphocytes B et le maintien de la transformation des lymphocytes T mais son utilisation *in vitro* lors d'infection lytique ne semble pas influencer la réplication virale (Gimeno et al., 2005; Reddy et al., 2002). Par ailleurs, l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre *pp38* ont prouvées une inhibition sévère de la prolifération des cellules lymphoblastoïdes suggérant également son rôle dans le maintien du phénotype transformé. (Xie et al., 1966).

1.3.1.3. Les gènes γ

Les gènes gamma, dits tardifs ou L (Late) sont transactivés en fin de cycle par les gènes α et β lors de la réplication du génome durant la phase précoce. Ils correspondent aux protéines de structure, tels que les protéines de la capsid, du tégument ou les glycoprotéines d'enveloppe.

1.3.1.4. Autres gènes impliqués dans la réplication lytique

D'autres protéines ont été montrées comme jouant un rôle très important dans la réplication lytique du GaHV-2. C'est le cas de la chimiokine d'environ 20 kDa, référencée comme étant l'interleukine-8 virale (vIL-8) (Parcells et al., 2001). Il a été démontré que la protéine vIL-8 joue un rôle de chimiotactisme des lymphocytes B et T et les monocytes, qui sont les cellules cibles propices à sa réplication (Parcells et al., 2001). Une infection par un virus mutant *vIL-8* entraîne une perte d'efficacité au niveau de l'infection lytique virale malgré une capacité maintenue, mais faible d'entrée en phase de latence et d'induction de la tumorigénèse (Parcells et al., 2001; Cui et al., 2004).

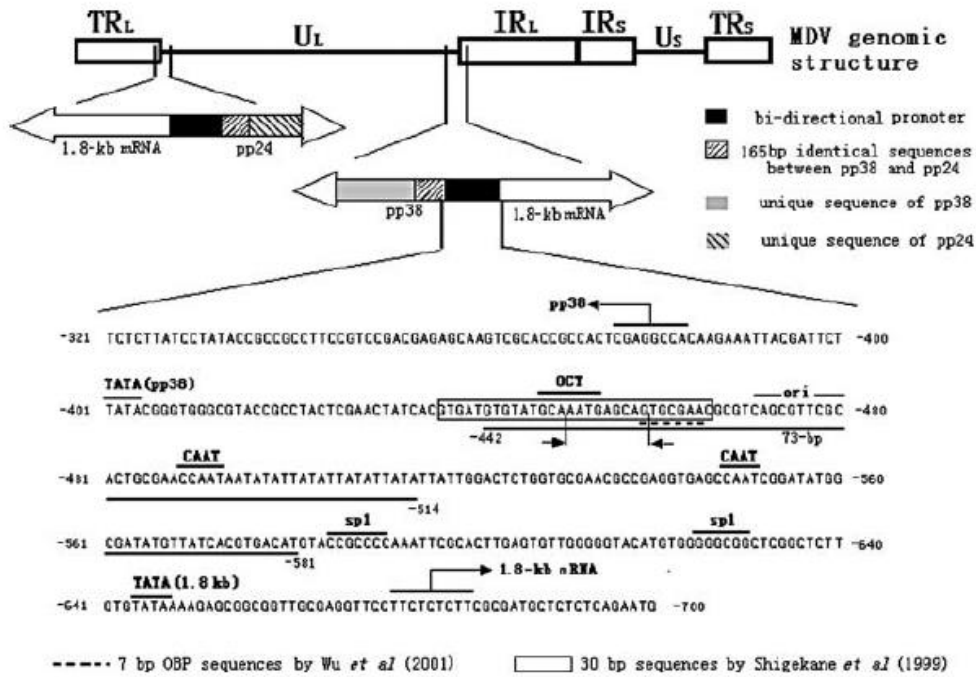


Figure 10 : Localisation schématique du promoteur bidirectionnel des gènes pp38 et pp24. Le promoteur des gènes pp38 et pp24(en noir) est présent en deux copies dans la région BamH1-H du génome de GaHV-2. Les gènes pp38 et pp24 possèdent une région identique de 165pb. Ce promoteur permet aussi la transcription d'une famille de gène regroupé sous le nom de 1,8 ko parmi lesquels le gène pp14 (14 kDa est le plus décrit). Abréviations : pp (phosphoprotéine) ; pb (paire de base).

Plus récemment, une protéine nommée vLIP (Lipase viral) a été montrée comme nécessaire pour la réplication lytique virale chez les poulets (Kamil et al., 2005). Cette protéine N-glycosylée de 120 kDa dont le gène est localisé au niveau de l'extrémité de la région U_L est ainsi appelé car il présente une homologie de séquence avec le domaine a/b hydrolase des lipases pancréatiques.

1.3.2. Protéines et transcrits impliqués dans la latence et la tumorigénèse

Il a été estimé que 10 à 30 gènes sont exprimés lors des phases de latence et de tumorigénèse (Silver et al., 1979; Maray et al., 1988). Des études ont montré que l'implication de ces gènes dans la phase de latence de l'infection virale *in vivo* pourrait être la conséquence de leur rôle prépondérant lors de la réplication virale (Reddy et al., 2002; Gimeno et al., 2005). Ainsi, la transformation des cellules T, induite par le GaHV-2, semble nécessiter une forte infection lytique. Un nombre de transcrits ont été décrits comme impliqués dans les phases de latence et de tumorigénèse.

1.3.2.1. Les LATs (Latency Associated Transcripts)

Le gène codant pour une série de transcrits associés à la latence est localisés dans les régions répétées IR_S/TR_S en orientation inverse à celui du gène *ICP4* du génome de GaHV-2 (Figure 11) (Stik et al 2010). La fonction biologique de ces LATs reste encore peu connue. Néanmoins, il a été montré que les LATs agiraient en interférant sur l'expression de la protéine très précoce ICP4. Les niveaux d'expression des LATs sont modulés via la protéine p53 qui est activé par le MDV pendant la phase de latence (Stik et al 2010). Chez HSV-1, Atanasiu et ses collaborateurs ont montré que les LATs auraient un rôle anti-apoptotique via leur capacité à favoriser l'accumulation de la protéine de choc thermique Hsp70 au sein des cellules (Atanasiu et al., 2006). Une étude a décrit l'existence de microARN au niveau des LAT (Burnside et al., 2006). Bien que les cibles de ces microARN n'aient pas encore été identifiées, miR 7-5P agit sur ICP4 et ICP27 (Strasheim 2012). Leur forte expression lors des phases de latence et de tumorigénèse suggère leur implication lors de ces stades de l'infection virale.

1.3.2.2. La protéine meq

Localisé dans les régions répétées IR_L et TR_L du génome viral, le gène *meq* code l'une des protéines les plus exprimées lors de la latence (Jones et al., 1992). La protéine virale Meq joue un rôle central dans la tumorigénèse induite par le virus de Marek (Lupiani et al., 2004). Des études ont démontré que les souches hyper virulentes invalidées pour Meq étaient capables de se répliquer *in vitro* et *in vivo* mais aucun développement tumoral n'est observé chez les animaux infectés. Des études biochimique et génétique ont montré que les propriétés oncogènes de la protéine virale Meq sont dues à sa capacité à lier l'ADN, l'ARN et à former des dimères avec des protéines cellulaires, détournant les voies de signalisation à son profit. En effet, la protéine Meq, présente un domaine bZIP (basic leucine zipper) similaire à celui des proto-oncogènes cellulaires de la famille Jun/Fos. La présence d'un domaine bZIP confère à Meq la capacité de former des homodimères, ou des hétérodimères avec les protéines c-Jun, ATF et Fos, son partenaire préférentiel étant c-Jun (Qian et al., 1995 ; Qian et al., 1996). L'interaction Meq/c-Jun stabilise l'oncoprotéine cellulaire, lui conférant les capacités transactivatrices (Levy et al., 2005). Cette activité transactivatrice de l'expression des gènes de l'hétérodimère Meq/c-Jun se fait via leur liaison aux promoteurs contenant des éléments cis-régulateurs AP-1 aussi nommés sites MERE I (Meq responsive elements I). Ainsi, les hétérodimères Meq/c-Jun activeraient l'expression de protéines anti-apoptotiques tel que Bcl-2 et c-Ski, des gènes immunorégulateurs tel que IL-2 et TGFβ (Levy et al., 2005; Levy et al., 2003; Nair and Kung, 2004). Meq est capable de se lier à différents facteurs impliqués dans le

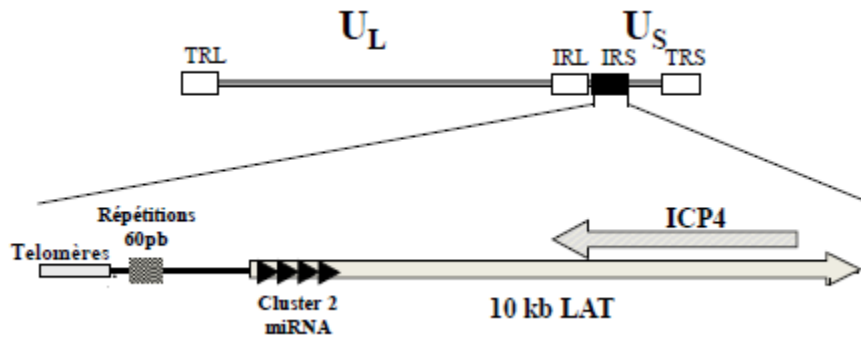


Figure 11 : La localisation du promoteur du transcrit associé à la latence. L'organisation du génome GaHV-2 est similaire à celui d'un virus de l'herpès alpha d'E. UL et US indiquent des séquences longues et courtes uniques; TRL / TRS indiquent répétitions terminales, longues et courtes, respectivement; et IRL / IRS indiquent répétitions internes, longs et courts, respectivement. (B) Lieu de groupe miRNA 2 dans les TRS et IRS. La flèche grise indique une transcription non codante et flèches noires indiquent munitions 2 miARN.

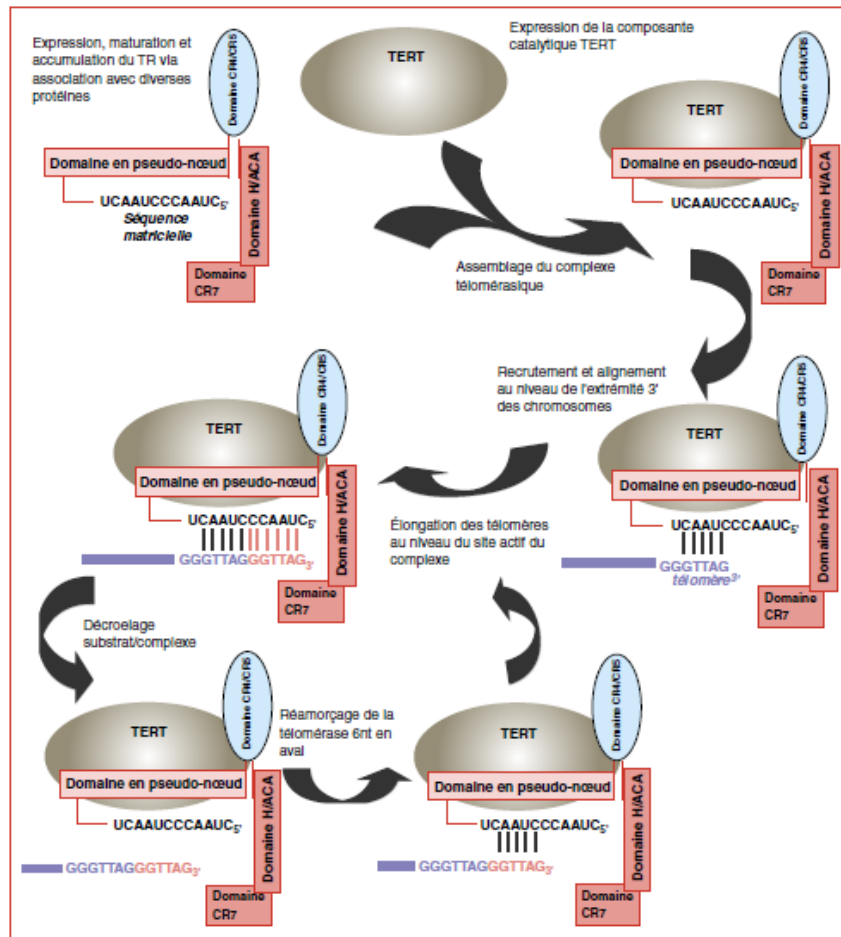


Figure 12 : Élongation des télomères par la télomérase. Suite à l'expression des deux composantes TR et TERT et à leur ciblage vers le nucléole, la sous-unité TERT s'associe au niveau des domaines en pseudo-noeud et CR4/CR5 du TR. Le complexe enzymatique est alors recruté au niveau de l'extrémité télomérique (représentée en bleu). L'alignement de la télomérase sur les motifs télomériques est réalisé grâce aux nucléotides bordant la séquence matricielle (domaine CR1) du TR. La sous-unité TERT synthétise alors par transcription inverse des motifs « GGGTTAG » (indiqué en rouge) en utilisant le domaine CR1 de TR comme matrice. Le décrochage suivi du réamorçage du complexe télomériques 6 nt en aval permet l'ajout d'un nombre variable de motifs télomériques à l'extrémité du télomère.

contrôle du cycle cellulaire, tel que les protéines pRb, p53 et CDK2 (cyclin-dependent kinase 2) (Liu et al., 1999). De plus, il a été montré que Meq est capable d'interagir avec la protéine CtBP, et oncogène c-Myc et induire l'expression de la télomérase connue comme l'un des mécanismes clés de la tumorigénèse induite par GaHV-2. (Osterrieder et al., 2006).

1.3.2.3. GAHV-2 et télomérase

Chez les vertébrés, des complexes nucléoprotéiques dynamiques appelé télomères sont retrouvés à l'extrémité des chromosomes. Ces télomères consistent en une répétition de motifs hexamériques GGTTAG de taille variable d'une espèce à un autre, d'une cellule à une autre au sein d'un même organisme. L'association de nombreuses protéines au sein de ces motifs répétitifs forme un complexe appelé télosome dont la fonction est d'assurer l'intégrité du génome lors des divisions cellulaires en empêchant les fusions inter-chromosomiques, les dégradations enzymatiques, ainsi que les recombinaisons, délétères pour les cellules (Blackburn, 2001). Le complexe télomérique est composé d'une protéine TERT (TElomerase Reverse-Transcriptase) comme son nom l'indique possède une activité transcriptase inverse, et d'un ARN (TR :Telomerase RNA) qui comporte une séquence matricielle (CUAACC) complémentaire des motifs télomériques retro-transcrits par TERT. Ainsi la TERT est une ADN polymérase de type II qui synthétise donc les fragments d'ADN télomérique ceci par des sauts successifs à l'extrémité du télomère (figure 12). En condition physiologique, la longueur des télomères diminue à chaque division cellulaire. Après un certain nombre de divisions, cette attrition télomérique devient incompatible avec la survie de la cellule rendant ainsi la réplication limitée des cellules. Par contre, en condition physiopathologique comme dans les cancers, la forte activité des télomérase permet de conserver la longueur du chromosome et par conséquent permet l'immortalisation cellulaire.

Le premier ARN fonctionnel découvert chez GaHV-2 correspond à une sous-unité ARN de la télomérase vTR, qui est le seul homologue viral de TR décrit à ce jour (Fragnet et al., 2003). Le gène qui code pour vTR se trouve à l'extrémité des répétitions TR_L et IR_L. Plus précisément, il est localisé 740 pb en amont du 3^{ème} exon de l'interleukine 8 virale (v-IL8) et 712 pb en aval des séquences télomériques qui forment la jonction entre l'IR_L et l'IR_S, faisant de vTR le gène le plus distal du génome du GAHV-2 (figure 13). vTR présente une forte homologie de séquence (88%) avec son homologue aviaire, chTR (figure 14), tout en étant plus efficace que ce dernier pour reconstituer une activité télomérase avec chTERT en cellule (Fragnet et al., 2005). Par ailleurs, il a été démontré que vTR est impliqué dans la lymphomagenèse associée au GAHV-2 (Fragnet et al., 2003). L'analyse du statut de vTR dans le génome de 7 souches de GAHV-2 a montré que tous les virus GaHV2 analysés (GaHV2-Md-5, GaHV2-RB1B, GaHV2-GA, GaHV2-HPRS16 et GaHV2-Rispens) comportaient le gène de vTR, contrairement aux 2 souches non oncogènes GaHV3-HPRS24 et HVT qui ne codent pas vTR (Figure 8).

1.3.2.4. Régulation Transcriptionnelle de la télomérase virale : rôle de l'onco protéine c-Myc

Contrairement au promoteur de chTR, l'expression de vTR était augmentée de façon concomitante avec l'activité télomérase lors de la tumorigénèse induite par le GAHV-2 La régulation transcriptionnelle de vTR semble fournir une réponse à cette activité. En effet, l'analyse bio-informatique du promoteur de vTR montre la présence de site de liaison de nombreux facteurs de transcription. Récemment, Shkreli et ses collaborateurs ont montré que la transcription de vTR semble essentiellement pilotée par le proto-oncogène cellulaire c-Myc, qui lui conférerait une efficacité de transcription quatre fois supérieure à celle de son homologue cellulaire dans les cellules transformées MSB-1 (Shkreli et al., 2007).

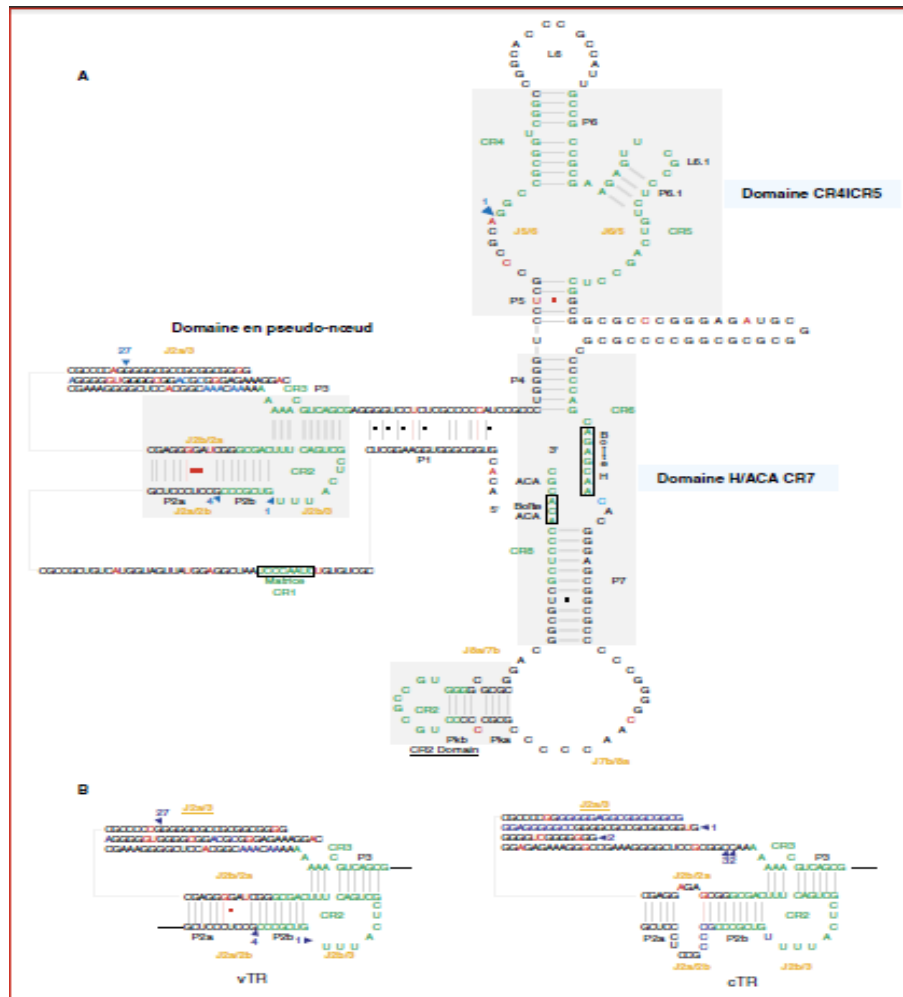


Figure 13 : Structure secondaire de vTR (d'après Fragnet et al., 2003) Les régions appariées en hélice (P1 à P8) sont numérotées à partir de l'extrémité 5' de vTR. Les régions jonctionnelles (J) entre 2 hélices sont indiquées en orange et identifiées par rapport aux régions d'appariement bordantes. Les 4 domaines conservés dans les TR de vertébrés sont encadrés. La région matricielle (CR1) et les boîtes H et ACA sont délimitées par des rectangles noirs. Les mutations et les appariements additionnels dans la séquence de vTR par rapport à chTR sont indiqués en rouge. Les nucléotides additionnels dans la séquence de vTR sont indiqués en bleu et les régions de délétion sont représentées par des triangles bleus comportant le nombre de bases délétées.

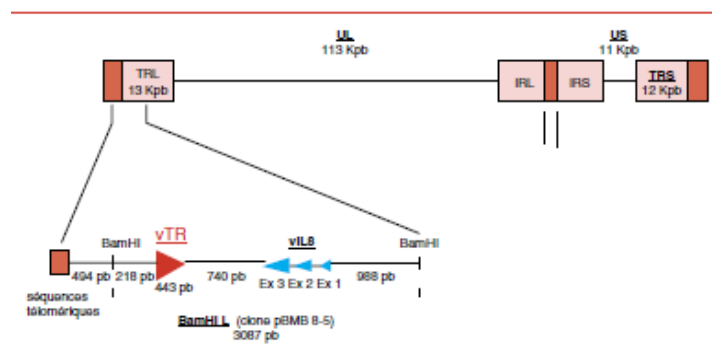


Figure 14: Localisation du gène ARN télomérase virale (vTR) au sein du génome MDV. Les séquences télomériques aux extrémités du génome et à la jonction IRL/IRS sont représentées en rouge. Le fragment BamHI L est localisé dans le TRL et en sens inverse dans l'IRL. La séquence codant la sous-unité vTR est représentée par un triangle rouge indiquant de plus l'orientation du gène. Les trois exons du gène de l'IL8 virale sont identifiés par des trois triangles bleus.

L'onco-protéine c-Myc appartient à une famille des facteurs de transcription bHLH-Zip (basic helix–loop–helix leucine zipper). Les propriétés régulatrices de c-Myc sont dues à sa capacité de lier ADN, et de recruter d'autres facteurs avec qui il forme des dimères. C'est le cas par exemple de l'hétérodimère c-myc/max impliqué dans l'activation d'un bon nombre de gène impliqué dans la croissance cellulaire, la prolifération cellulaire (Miller et al., 2012). En plus de sa fonction activatrice, Myc a également été montré pour réprimer la transcription de plusieurs gènes, comme p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1), C/EBPa (CCAT/enhancer binding protein alpha), Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage), et GAS1 (Growth arrest-specific protein 1) (Gartel et al., 2001). La protéine c-myc serait donc un facteur aux rôles divers et variés qui affecte les gènes impliqués dans divers processus cellulaires (Miller et al., 2012).

1.4. Objectifs

Le virus de la maladie de Marek, à l'instar des autres herpesvirus, présente 2 types d'infection alternant des phases de réplication (phase lytique) et des phases de dormance (phase latente). Durant la latence, peu de transcrits sont exprimés, ces derniers sont impliqués dans le maintien de ce type d'infection et/ou dans la tumorigenèse viro-induite. Durant la phase lytique, les transcrits associés à la latence sont réprimés alors que les autres gènes (qui constituent la majorité du génome) sont activement exprimés et concourent à la formation de nouvelles particules virales. Le contexte de ce mémoire se situe dans l'étude d'un mécanisme probablement associé à la transition entre ces phases lytique et latente de l'infection virale. Il s'agit de la méthylation de l'ADN, une modification épigénétique couramment rencontrée dans la régulation de l'expression génique. Quelques études ont abordé le rôle de l'épigénétique dans la régulation de l'expression des gènes durant les différentes phases de l'infection par le GaHV-2. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation sont loin d'être compris.

Des résultats préliminaires obtenus dans l'unité de recherche vétérinaire intégrée ont montré que le profil de méthylation des promoteurs différait d'un gène à un autre, d'un type cellulaire à un autre pendant le cycle viral du GaHV-2 (Carole Mignon, données non publiées). Ces études préliminaires suggèrent également une corrélation entre le niveau de méthylation observé au niveau des promoteurs étudiés et le niveau d'expression des gènes correspondant.

Parmi les gènes étudiés et les promoteurs caractérisés figurent les loci correspondant à 3 gènes investigués dans le cadre de ce mémoire. Le premier est le promoteur pilotant l'expression de vTR, la sous-unité ARN impliquée dans l'activité télomérase hautement exprimée pendant la latence et la tumorigenèse du GaHV-2. Les deux autres gènes sont sous le contrôle d'un promoteur bidirectionnel contrôlant l'expression de la phosphoprotéine de 38 KDa (pp38) et celle de la protéine 14 KDa. Ces 2 protéines sont exprimées en phase lytique. La protéine pp38 est réprimée pendant la phase latente. Les travaux poursuivis par Carole Mignon ont abouti aux observations suivantes :

- Les trois promoteurs analysés par amplification et séquençage d'ADN consécutif au traitement de l'ADN par le bisulfite montrent des niveaux de méthylation des dinucléotides CpG très élevés en latence (>80 %). Suite à une induction de la réactivation, le niveau de méthylation chute aux alentours de 20 %. Dans les conditions d'infection lytique, ces mêmes promoteurs ne sont pas du tout méthylés.

- Un traitement de déméthylation au moyen d'un inhibiteur des DNMT (la 5'-Azacytidine) a conduit à une élévation marquée de l'expression des transcrit pp38 mais en revanche à une diminution de l'activité télomérase. Le niveau d'expression des transcrits 14Kda n'a pas été investiguée.

A la lecture de ces données, une question principale s'est posée. Le niveau de méthylation des promoteurs de vTR, pp38 et 14Kda est-il un facteur clé dans l'activation ou la répression de la transcription de ces loci ? Elle comporte deux volets. D'une part, à l'instar des éléments de réponse reconnus par le facteur de transcription Zta codé par le virus EBV qui fixe exclusivement des sites CpG méthylé, le promoteur de vTR doit-il être sous une forme méthylée pour être exprimé ? D'autre part, le promoteur bidirectionnel assurant l'expression des gènes pp38 et 14 kDa présente un profil inverse, donc subit-il une extinction transcriptionnelle consécutive à la méthylation de l'ADN ?

Pour répondre à ces questions, ce travail a analysé en première partie l'effet de la méthylation de l'ADN sur le niveau d'activité des promoteurs respectifs clonés dans un système rapporteur codant pour la luciférase. Dans un second temps, la fonctionnalité des sites de liaison à l'oncoprotéine c-Myc (Boîtes E) a été testée dans le promoteur vTR. En effet, des données publiées sur le promoteur du gène vTR ont montré que son activité était plus élevée que celle de son homologue chTR du poulet durant l'infection par le virus de la maladie de Marek (Shkreli *et al.*, 2007). L'expression élevée de vTR semblait dû à la présence de sites de liaison de l'onco-protéine cellulaire c-Myc dans son promoteur. Le troisième volet a étudié l'effet de la méthylation sur les formes sauvages et mutées des boîtes E sur l'activité du promoteur de vTR.

Afin de répondre à nos différents objectifs, plusieurs étapes ont meublé notre démarche. La première étape a consisté en l'élaboration des différentes constructions plasmidiques sauvages (promoteur de vTR, pp38 et 14 kDa) et mutées (promoteur de vTR mutés au niveau des boîtes E2, E3 et E2/E3). Au cours de la deuxième étape, les différentes constructions ont été méthylées de manière ciblée avant d'être transfectées dans différents systèmes de cultures cellulaires eucaryotes (humain et aviaire). La dernière étape du travail était de mesurer et de comparer l'activité des différents promoteurs méthylés versus non méthylé, mutés ou sauvage.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1.Lignées cellulaires

Dans cette étude, trois lignées cellulaires ont été utilisées. Les cellules HeLa (Henrietta Lacks) appartenant à une lignée cellulaire humaine dérivée d'un carcinome du col utérin ; la lignée cellulaire DF1 qui sont des cellules immortalisées dérivées de fibroblastes embryonnaires primaires de poulet ; et la lignée LMH établie à partir de cellules épithéliales de carcinome hépatique de poulet (Kawaguchi et *al.*, 1987). Les cellules sont cultivées dans des boîtes de cultures stériles et, maintenues dans un incubateur à une température de 37°C sous une atmosphère de 5% CO₂. Les cellules HeLa sont cultivées dans le milieu EMEM (Eagle Minimum Essential Medium Lonza) contenant 10% de sérum de veau fœtal, 1% d'acide aminée non essentiel (10mM) et 1% de Pénicilline (50 unités/mL) et de la Streptomycine (50µg/mL). Les cellules DF1 sont cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Lonza, Belgium). A ce milieu contenant 4,5 g/L de glucose et du L-glutamate, sont ajouté de 10% de sérum de veau fœtal, 5% de sérum de poulet et 1% de Pénicilline (50 unités/mL) et de Streptomycine (50 µg/mL). Les cellules LMH sont cultivées dans des boîtes pré-incubées avec 0.2% de gélatine afin de maximiser l'adhérence des cellules. Leur milieu de culture, le DMEM/F12 (1:1) est supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 5% de sérum de poulet et 1% de Pénicilline (50 unités/mL) et de Streptomycine (50 µg/mL), de l'hepes (15 mM). Pour ces trois type cellulaire, lors du repiquage, le milieu de culture est aspiré à l'aide d'une pompe à vide, puis les cellules sont rincées avec 5mL de PBS-EDTA afin d'éliminer toute trace de sérum. Après rinçage, le PBS-EDTA est éliminé et deux mL de trypsine sont ajoutés et la boîte de culture maintenu à 37°C pendant deux minutes (min). La trypsine va permettre le détachement des cellules via des clivages protéiques et la chélation des ions calcium nécessaire aux intégrines. Une fois les cellules détachées, 5 mL de milieu complet sont ajoutés pour inhiber l'action de la trypsine. La suspension cellulaire ainsi obtenue est récupérée dans un tube de 15 mL puis centrifugée à 300 g pendant 7 min. Le surnageant est éliminé, puis le culot est dilué dans un volume de 10 mL de milieu. Les cellules sont ainsi passées au dixième trois fois semaine.

II.2.Souches bactériennes

La souche *Escherichia coli* TG1 de génotype F'traD36 lacIq Δlac(Z)M15 proA+B/supEΔ(hsdM-mcrB) 5 (rk-mk McrB-) thi Δ(lac-proAB) a été utilisé dans toutes les étapes du clonage des différents inserts dans le vecteur PGEMT-easy (Promega). Concernant le clonage des inserts dans le vecteur d'expression pCpGL-Basic, nous avons utilisé les bactéries *Escherichia coli* 100D de génotype pir-116 F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rpsL (StrR) nupG pir 116 (DHFR) fournies par une unité de recherche en biologie des microorganismes de l'université de Namur. Ces bactéries permettent la répllication des plasmides contenant une origine de répllication R6K dépendant de la protéine PIR. Ces deux souches bactériennes *Escherichia coli* sont cultivées en milieu Luria Bertani (Milieu LB) à 37 °C (Sambrook, 2001).

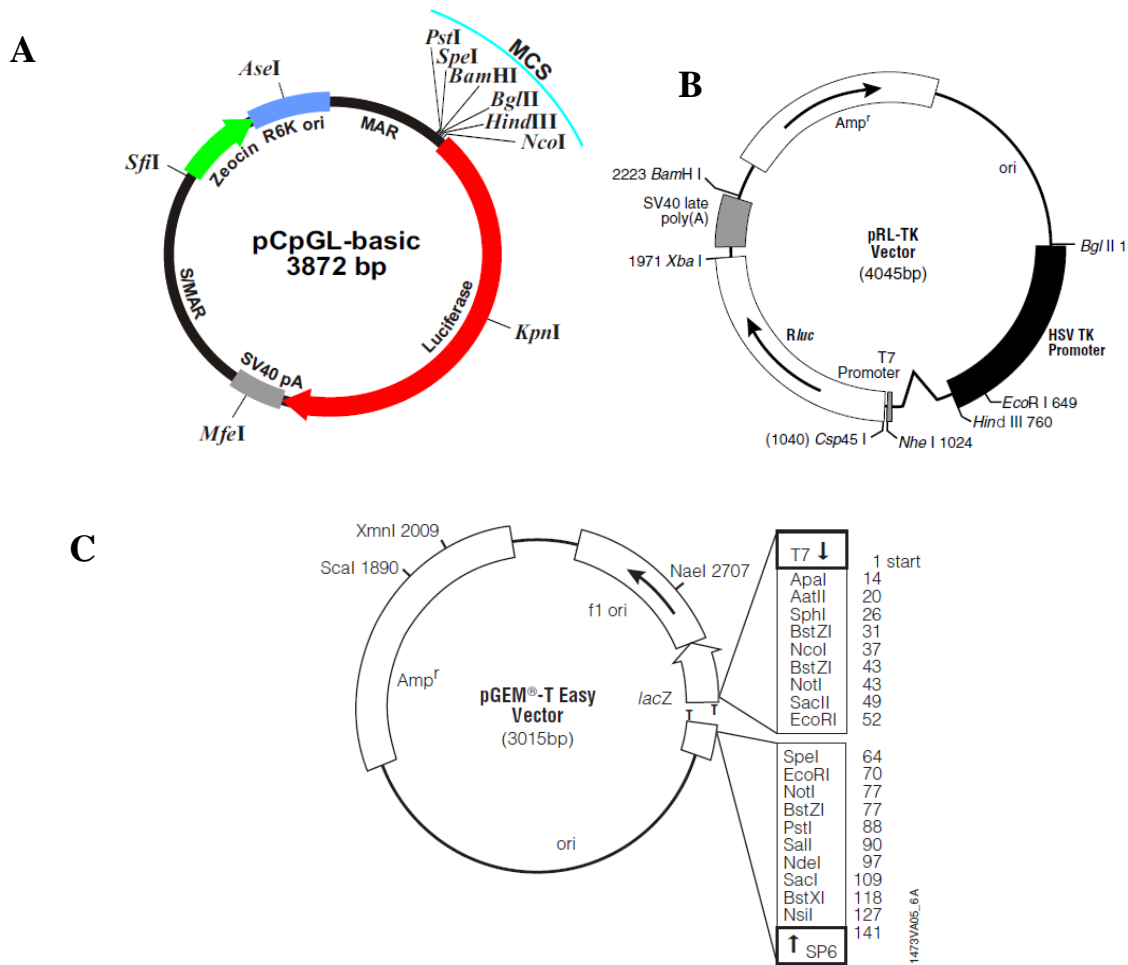


Figure 15: Carte des vecteurs pCpGLfree- Basic (A), pRL-TK (B) et pGEMT-Easy (C)

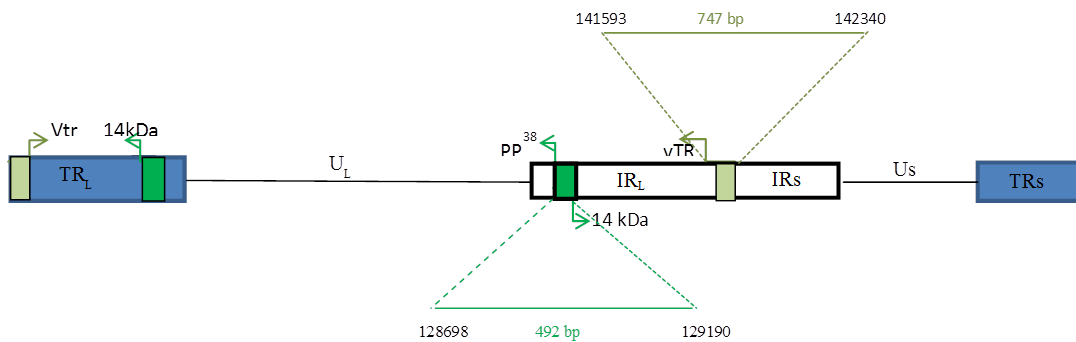


Figure 16: Génome du virus de Marek mettant en évidence la localisation des différents promoteurs étudiés. Le génome du MDV est constitué d'une séquence unique longue (UL) et d'une séquence unique courte (US) délimitées par des séquences répétées internes et externes (TRL, TRS, IRL et IRS). Les rectangles bleus représentent les séquences répétées externes longues (TRL) et courtes (TRs). Les rectangles blancs représentent les séquences répétées internes longues (IRL) et courtes (IRS). Le promoteur bidirectionnel pp38/14kDa de 492 pb se situe entre le nucléotide numéro 128698 et 129190 du génome de la souche virale RB1-B. Le promoteur vTR de 746 pb se situe entre le nucléotide numéro 141593 et 142340 du génome de la souche RB1-B.

II.3. Les vecteurs de clonage et rapporteur

Le plasmide pGEM-T Easy (figure 15) a servi de plasmide pour le clonage direct des différents produits de PCR (Polymérase Chain Reaction). Ce plasmide linéarisé par l'endonucléase EcoRV présente à ses extrémités une thymine. La ligation des produits PCR dans le vecteur se fait par appariement des thymines flottantes aux adénines ajoutées à l'extrémité 3' des amplicons par certaines Taq polymérase. D'une taille de 3015 paires de bases, le plasmide pGEM-T Easy code pour une bêta-lactamase, le gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les bactéries transformées en milieu gélosé contenant de l'ampicilline à une concentration finale de 100 µg /L. Il comporte également le gène de la sous-unité alpha de la bêta-galactosidase (cassette LacZ), dans lequel est localisé le site multiple de clonage. La présence du site de clonage dans l'opéron LacZ permet un criblage blanc-bleu des colonies possédant le plasmide recombinant dans la gélose contenant du XGal (60 g/L) et de l'IPTG (40 g/L).

Le vecteur rapporteur pCpGL-Basic (figure 15) gracieusement transmis par le Dr Michael Rehli du département d'hématologie et oncologie, de l'université de Regensburg en Allemagne a été utilisé afin d'étudier l'efficacité de transcription en cellule eucaryotes des séquences promotrices clonées au niveau du site de clonage multiple situé en amont du gène rapporteur codant pour la luciférase *firefly*. Le vecteur pCpGL-Basic comporte le gène de résistance à la zéocine qui permet de sélectionner les bactéries transformées en milieu gélosé contenant de la zéocine à une concentration finale de 25 µg/L.

Le plasmide pCpGL-EF1/CMV (figure 15) a été utilisé comme contrôle. Il possède également le gène codant la luciférase *firefly* sous contrôle du promoteur hybride EF1/CMV. Tout comme le vecteur pCpGL-Basic, il a été offert par le Dr Michael Rheli. Ces plasmides ont pour particularité le fait qu'ils sont dépourvus de dinucléotide CG.

Le plasmide pRL-TK (Promega) (figure 15), possède le gène codant la luciférase Renilla sous contrôle du promoteur de la Thymidine Kinase (TK) du virus HHV-1 (Human Herpes Virus de type I.) L'expression de ce gène rapporteur en cellules eucaryotes permet de standardiser l'activité de la luciférase *firefly*. Tout comme le vecteur pGEM-T Easy, le vecteur pRL-TK codent pour le gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet la sélection des bactéries transformées en milieu gélosé additionné d'ampicilline de concentration finale de 100 µg / L.

II.4. Techniques générales de biologie moléculaire

II.4.1. Amplification génique

Les amplifications des différents promoteurs (figure 16) s'effectuent par PCR. Chaque tube contient 5 ng d'ADN viral matriciel (source : Nacmide RB1-B purifié) auquel sont ajoutés 49 µl d'un mélange réactionnel. Pour l'amplification des promoteurs des gènes *pp38* et *14 kD* le mélange réactionnel (1x) est constitué de : 2,5 unités de Taq DNA polymérase (Promega), 0,2 µM de chaque amorce (Eurogentec), 200 µM de chaque désoxy-ribonucléotide, 1 mM de Tris-HCl pH 9, 5mM de KCl, 0,15 mM de MgCl₂ et de 0,01% de Triton X-100. La PCR commence par une étape de dénaturation qui dure 3 min à 94°C. Cette étape est suivie par 30 cycles de dénaturation (30 secondes à 94°C), d'hybridation (1 min à une température inférieure de 5°C à la température de fusion de l'amorce de plus faible T_m) et d'élongation (1 min à 72°C). Un cycle supplémentaire de 10 min à 72°C est nécessaire afin de terminer la synthèse des brins.

A cause de la structure secondaire du promoteur du gène de la vTR et de sa séquence riche en GC, l'amplification s'est faite en utilisant la Taq LA (TAKARA). Le mélange réactionnel contient 2,5 unités/ µl de Taq DNA polymérase ; 5 µl de tampon 10x (20 mM Tris-HCL pH 8, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 % Tween 20, 0,5 % Nonidet P-40, 50 % Glycerol, 25 mM Mg²⁺) ; un mélange de dNTP contenant 2.5mM de chaque désoxyribonucléotide ; une concentration finale de 0,2 µM de chaque amorce et de l'eau pour atteindre un volume réactionnelle de 50 µl. La PCR commence par une étape de dénaturation à 94°C pendant 10 secondes. Cette étape est suivie de 30 cycles de dénaturation (10 secondes à 98°C), une phase d'hybridation et une d'élongation (55 °C pendant 30 secondes puis 68°C pendant 45 secondes). Les trente cycles d'amplification sont suivis par une étape d'élongation des amplicons (7 minute à 72°C).

II.4.2. Mutagenèse dirigé par PCR

La mutagenèse dirigée est l'induction d'une ou de plusieurs mutations dans la séquence d'un gène, de façon précise et volontaire. Les mutations du promoteur vTR au niveau des sites de liaison du facteur de transcription c-Myc ont été réalisées par PCR chevauchante (figure 17). La mutation E2 (Boite E2) a été réalisée en deux étapes. Deux fragments chevauchants contenant la mutation ont été initialement produits par PCR par l'emploi de deux couples d'amorces spécifiques (tableau 4). Le premier couple est composé d'un oligonucléotide sens numéro 1 bordant l'insert et contenant l'extension PstI et d'un oligonucléotide reverse numéro 8 comportant la mutation interne. Le deuxième couple est constitué d'un oligonucléotide sens numéro 7 comportant la mutation interne et d'un oligonucléotide reverse numéro 2 bordant l'insert et contenant l'extension HindIII. Après hybridation des deux fragments comportant la mutation, la séquence mutante complète est amplifiée à l'aide des oligonucléotides bordants numéro 1 et 2.

La mutation E3 a été réalisée à l'aide d'un couple d'oligonucléotide bordants le promoteur vTR. Il s'agit de l'oligonucléotide sens numéro 1 contenant l'extension PstI et l'oligonucléotide reverse numéro 9 contenant la mutation et l'extension HindIII (tableau 4). L'ADN matriciel utilisée pour générer les mutations E2 et E3 est le plasmide pGEMT-Easy recombinant contenant le promoteur vTR sauvage.

La double mutation E2E3 a été générée en induisant la mutation E3 à partir de la mutation E2.

II.4.3. Electrophorèse d'ADN

Les amplicons d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (0.8%) en Tris-acétate-EDTA (TAE). L'ADN est visualisé sous rayonnement ultraviolet grâce à la fluorescence verte émise par le Midori Green (Nippon Genetics) ajouté au gel d'agarose. Pour faciliter le dépôt, 1/5ème de tampon de charge (0,3 % de bleu de bromophénol dans une solution de glycérol à 50 %, TAE 5X) est ajouté aux échantillons à analyser. La migration est effectuée sous un courant de 90-100 volts avec le SmartLadder (Eurogentec) comme marqueur de taille.

II.4.4. Digestion enzymatique d'ADN

Les digestions d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide d'endonucléase de restriction. Dans notre étude, les enzymes de restriction utilisées sont: BamHI, HindIII et PstI (NEB). 10 µg d'ADN plasmidique sont ajoutés dans un mélange réactionnel de 50 µl contenant 10 unités d'enzyme, 5 µl d'un tampon (10x) spécifique à chaque enzyme (NE Buffer 1.1 pour BamHI et NE Buffer 3.1 pour HindIII et PstI) contenant de la BSA. La réaction se déroule à 37°C pendant une heure.

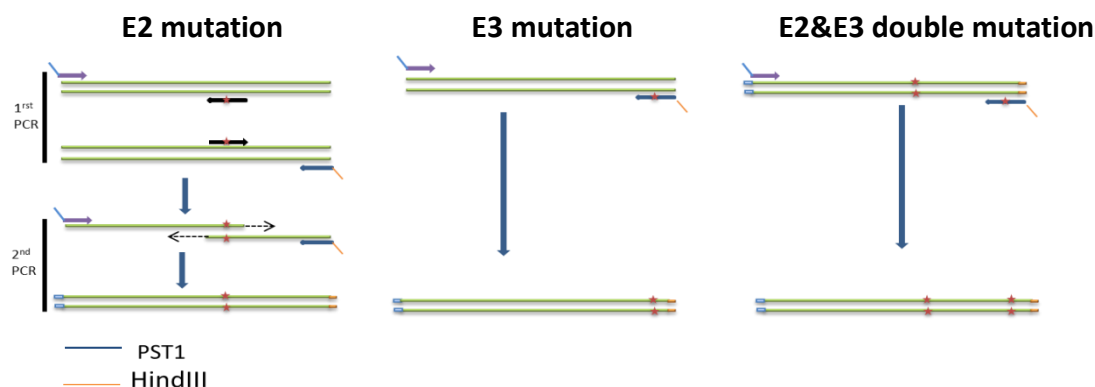


Figure 17 : Mutagénèse dirigée par PCR

Tableau 4: Liste différents oligonucléotides utilisés pour l'amplification des promoteurs (A), la mutagénèse (B) et le criblage des bactéries (C). Les nucléotides en gras représentent les sites de restriction des enzymes. Les nucléotides en italique représentent les différentes mutations des boîtes E2 et E3. Les positions des différents promoteurs sur le génome RB1-B sont indiquées en dernière colonne.

Numéro	Oligonucléotides	Séquence 5 → 3'		Position RB1-B
A. Oligonucléotides utilisés pour amplification des promoteurs (site de restriction en gras)				
1	vTR PstI-For	GTGCAGCCCTAACCCTAACCCCCAAATTT CACC		142340-142312
2	vTR HindIII Rev	AAGCTTGCCTTCCACCCGCCACGTGTG		141593-141613
3	pp38 BamhI For	GGATCCGCATCGCGAAGAGAGAAAGGAACC		129190-129168
4	pp38 Hind III Rev	AAGCTTCCGAAATGGTACATAAAAACTAA		128698-128780
5	14 kDa HindIII For	AAGCTTCCGAAATGGTACATAAAAACTAA		128698-128780
6	14 kDa BamhI Rev	GGATCCGCATCGCGAAGAGAGAAAGGAACC		129190-129168
B. Oligonucléotides utilisés pour la mutagénèse (mutation en italique)				
7	vTR E2 muté For	GGGCGGCAAAAACATGGGGCGTGGCGGGA		141780-141773
8	vTR E2 muté Rev	ACGCCCCATGTTTTGCCCCGCCCTTCCTG		141780-141810
9	vTR E3 muté HindIII Rev	AAGCTTGCTTCCACCCGCCAAAAATGCCGGGGAA CC		141593-141624
C. Oligonucléotides utilisés pour cribler les bactéries				
10	Screen pGMT-easy	Pu	TGTA AACGACGGCCADTG	
11		RPu	CAGGAAACAGCTATGACCA	
12	Screen pCpGL-Basic	For	GTTTATGTGAGCAAACAGCAG	
13		Rev	GCATAGGTGATGTCCACCTC	

II.4.5. Déphosphorylation des vecteurs de clonage

Afin d'éviter une recircularisation du vecteur linéarisé, dix µg de vecteur linéarisé sont ajoutés à un mélange réactionnel de 50 µl contenant 5 µl de tampon 10x (500mM de Tris-HCl, 1mM d'EDTA pH 8,5) et 10 unités de phosphatase alcaline (Promega). Le mélange ainsi constitué est incubé 20 min à 37°C dans un bain-marie, puis pendant 20 min à 65°C afin de dénaturer l'enzyme. Immédiatement après les 20 min de dénaturation, les tubes sont placés pendant une durée de 5 min dans la glace. Un second cycle est réalisé pendant 20 min à 37°C, puis 20 min à 65°C après un nouvel ajout de 5 unités de phosphatase alcaline. Le vecteur déphosphorylé est purifié par extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (50-49-1).

II.4.6. Purification des acides nucléiques

II.4.6.1. Purification des produits de PCR à partir d'un gel d'agarose

Les fragments d'ADN sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Extract Gel and PCR clean up (Macherey-Nagel), basé sur l'affinité de l'ADN pour la silice en présence de fortes concentrations en sel. Selon les recommandations du fournisseur, deux volumes de solution de solubilisation (NTI) contenant des sels chaotropiques sont ajoutés pour un volume d'agarose excisé. Après une incubation de 5 min à 55°C, l'agarose solubilisé contenant le fragment d'ADN d'intérêt est déposé sur une colonne de silice et centrifugé pendant 1 min à 11000 g. Cette étape est suivie par deux lavages successifs par ajout de 700 µl de solution NT3 (composé de 80% d'éthanol) sur la colonne et une centrifugation d'une minute à 11000g. Ensuite, la colonne est séchée par centrifugation à vide pendant une minute à 11000g. L'ADN retenu dans la colonne est enfin élué par 18 µl d'eau ultra pure MilliQ lors d'une centrifugation de 1 min à 11000g.

II.4.6.2. Purification phénol/chloroforme du vecteur

Un iso volume phénol-chloroforme-alcool isoamylique (50-49-1) est ajouté au volume d'ADN plasmidique à purifier. Après avoir bien mélangé et centrifugé à 12000g pendant 10 min, la phase supérieure aqueuse contenant l'ADN est récupérée. Un volume de chloroforme équivalent au volume d'ADN récupéré est ajouté et l'ensemble est porté à centrifugation pendant 10 min à 12000g. La phase aqueuse contenant l'ADN plasmidique obtenue est prélevée et ce dernier est précipité par ajout d'un iso volume d'éthanol 100% et en présence de 0,3M d'acétate de sodium (NaAC). L'ensemble est bien mélangé puis incubé une heure à -80 °C ou over night à -20°C. La fin de l'incubation est suivie d'une centrifugation de 20 min à 12000g. Le surnageant est délicatement éliminé puis le culot (ADN plasmidique) est lavé par resuspension dans de l'éthanol 70% puis centrifugé 10 min à 7000g. A la fin de la centrifugation, le surnageant est éliminé, le culot est resuspendu dans un volume approprié d'eau ultra pure MilliQ après avoir été séché pendant 5-10 min.

II.4.7. Ligature vecteur/insert

Les réactions de ligature sont réalisées suivant un rapport molaire vecteur/insert de 1/3. Le volume final de la réaction est de 10 µl. Il contient: 3 unités de T4 DNA Ligase (Promega), 10mM d'ATP, 300mM de Tris-HCl, 100mM de MgCl₂, 100mM de DTT et 50 ng de vecteur. La solution réactionnelle est incubée 16 heures à 12°C. Le clonage direct des amplicons dans le vecteur pGEM-T Easy se fait dans le gène LacZ, au niveau du site de restriction EcoRV, à extrémités franches auxquelles une thymine a été rajoutée. Lors des clonages dans le vecteur d'expression pCpGL-basic linéarisé et déphosphorylé en 5', les promoteurs purifiés sont insérés en amont du gène codant la luciférase *firefly*, au niveau des sites de restriction

PstI/HindIII (clonage du promoteur vTR) ou BamHI/HindIII (clonage des promoteurs pp38 et 14 kD).

II.4.8. Préparation des bactéries électro-compétentes

Une pré-culture en milieu LB est réalisée à 37°C pendant une nuit sous agitation. Dix mL de cette pré-culture sont ensuite utilisés pour ensemercer 1 litre de milieu 2YT et mise en culture à 37°C jusqu'à obtention d'une densité optique λ à 600nm) égale 0,5. La croissance est alors arrêtée en plaçant la culture 2h dans la glace. Après 15 min de centrifugation à 5000g à 4°C, cinq lavages sont effectués par 200 mL d'eau ultra pure à 4°C. Après un dernier lavage par 20 mL de glycérol 10% puis centrifugation 30 min à 5000g, le culot bactérien est resuspendu dans 2 mL de glycérol 10%, puis réparti en fractions de 50 μ l et conservé à -80°C.

II.4.9. Transformation bactérienne

Pour les inserts clonés en pGEM-T Easy, les bactéries Escherichia coli TG1 sont classiquement utilisées. Celles-ci permettent l' α -complémentation du gène de la β -galactosidase. Les bactéries *E.coli* 100D ont été utilisées pour la transformation du vecteur pCpGL. Ces bactéries sont utilisées car le plasmide pCpGL-Basic possède une origine de réplication RK6 dépendant de la protéine PIR. En règle générale, un microlitre de produit de ligation est ajouté à 50 μ l de bactéries rendues "compétentes". L'entrée du plasmide dans les bactéries se fait par électroporation avec l'appareil ECM399 (BTX PEP), dans les conditions standardisées pour *E.coli* (2500 V pendant 5 ms avec une impédance de 25 μ F pour une cuvette de 2 mm). Immédiatement après électroporation, 150 μ l de milieu de culture LB sont ajoutés aux bactéries. Après 30 min d'incubation à 37°C, celles-ci sont étalées sur du milieu LB/agar/ampicilline (100 μ g/L) contenant 60 mg /L de X-gal et 40 mg/L d'IPTG lors des clonages dans le vecteur pGEM-T Easy, permettant un criblage blanc/bleu ou dans sur du milieu LB/agar/zéocine (25 μ g/L) lors des clonages dans le vecteur pCpGL-Basic. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées 16 à 18 heures à 37°C.

II.4.10. Criblage des bactéries contenant le plasmide recombinant

Le criblage des colonies contenant les plasmides recombinants est réalisé par PCR. Une fraction de colonies (blanches pour celles issues des électroporation avec le vecteur pGEM-T Easy) est repiquée et mise en suspension dans 20 μ l d'un mélange (pour le criblage des colonies) contenant une unité de Taq DNA polymérase (Promega), 0,2 μ M de chaque amorce de criblage Pu et RPu (Eurogentec), 150 μ M de chaque désoxy-ribonucléotide, 10 mM de Tris-HCl pH 9, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂ et 0,1 % de Triton X-100. Trente cycles d'amplification sont réalisés (94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min). L'analyse des produits d'amplification est effectuée par électrophorèse en gel d'agarose/TAE.

II.4.11. Midi-préparation d'ADN plasmidique

Afin d'obtenir une quantité suffisante de notre ADN plasmidique d'intérêt, les bactéries comportant les clones d'intérêt sont mis en culture sous agitation dans 200 mL de milieu LB pendant 16h à 37°C. L'extraction de l'ADN s'effectue à l'aide du kit NucleoBond Midi (Macherey Nagel) par la méthode de lyse alcaline suivie d'une purification sur colonne de silice dans les conditions décrites par le fournisseur. La quantité d'ADN plasmidique extrait est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop). Le spectrophotomètre mesure l'absorbance à 260, 230 nm et 280 nm. Ces mesures permettent de s'assurer de la pureté en ADN. En effet, le rapport de la valeur d'absorbance à 230 nm sur la valeur d'absorbance à 260 nm donne une idée de la contamination en résidus phénolique. Quant au rapport de la valeur d'absorbance à 260 nm sur celle à 280nm, elle renseigne sur la contamination par les protéines et de l'acides nucléique.

II.4.12. Le séquençage

Le séquençage s'effectue par la technique de Dye Terminator (Applied Biosystem). Les amorces utilisées sont spécifiques au vecteur de clonage (Tableau 4). Dans le cas de séquençage du vecteur pGEM-T Easy, les amorces numéro 10 et 11 sont utilisées. Pour le vecteur pCpGL-Basic, il s'agit des amorces numéro 12 et 13. Les séquences ainsi obtenues sont vérifiées par BLAST et alignées à l'aide du logiciel Geneious

II.4.13. Méthylation de l'ADN plasmidique.

La méthylation des îlots CpG contenus dans les différents promoteurs se fait à l'aide d'une méthylase M.SssI et de la SAM (S-Adenosyl-L-méthionine) qui est le donneur du groupement méthyl. 1 µg de vecteur est ajouté à un mélange contenant 2 µl de tampon NE Buffer 2 (10 x), 2 µl de SAM (1600 µM), 1 unité de l'enzyme M.SssI méthylase et de H₂O pour arriver à un volume réactionnel de 20 µl. La réaction se déroule pendant 1 heure à 37 °C, puis 20 min à 65°C pour inhiber l'enzyme. Afin de comparer de manière objective l'effet de la méthylation, les vecteurs non méthylés ont été traités de la même manière à la seule différence que le mélange réactionnel ne contenait pas la méthylase M.SssI. La réaction terminée, les plasmides (méthylés et non méthylés) sont purifiés par phénol-chloroforme-alcool isoamylique (50-49-1).

II.4.14. Lipofection des cellules adhérentes

Vingt-quatre heures avant transfection, les cellules DF1, LMH et HeLa sontensemencées en plaque de 96 puits à une densité de 15 x 10³ cellules par puits pour les cellules DF1 et de 30 x 10³ cellules par puits pour les cellules LMH et HeLa. La lipofection étant optimale en milieu dépourvu de sérum, le milieu de culture est aspiré et les tapis cellulaires sont lavés 2 fois avec du milieu OptiMEM (Gibco). Dans un premier temps, deux séries de solution sont préparées. Une première solution contenant 150 nanogrammes (ng) de plasmide rapporteur (pCPGL-recombinant) de l'efficacité transcriptionnelle et 30 ng de plasmide pRL-TK (rapporteur de l'efficacité de transfection) sont dilués dans un volume total de 25 µl de milieu OptiMEM par transfection. Pour le contrôle positif, 30 ng de plasmide pCpGL-EF1/CMV ont été dilués avec 30 ng de plasmide pRL-TK dans un volume total de 25 µl de milieu OptiMEM par transfection. Une deuxième solution contenant 24 µl d'OptiMEM et 1 µl d'agent de transfection Lipofectamine 2000 (Life Technologies) par puits est réalisé. Après minimum 5 min d'incubation à température ambiante, les deux solutions sont mélangées et incubées 20 min à température ambiante. Après les 20 min d'incubation, 50 µl de cette suspension de liposomes associés aux plasmides sont déposés dans chaque puits. Après 6h d'incubation à 37°C, le milieu de transfection est retiré et 100 µl de milieu de culture de chaque type cellulaire est déposée dans chaque puits. Celles-ci sont alors remises en culture 24 heures à 37°C. Il faut noter que la transfection est réalisée en triplicat lors de chaque essai.

II.4.15. Mesure de l'activité luciférase

Vingt-quatre heures après transfection, les cellules sont lavées 2 fois en PBS 1X. Après le lavage, les cellules sont lysées par dépôt de 25 µl de tampon de lyse (Passive Lysis Buffer 1X) directement sur le tapis cellulaire sous agitation douce pendant 15 min. Les lysats cellulaires obtenus sont centrifugés 2 min à 1000g. A la fin de la centrifugation, 15 µl de surnageant est transféré dans un tube à luminométrie (Berthold Technologies). Les mesures de l'activité luciférase sont effectuées à l'aide d'un luminomètre (URBC). Pour une même transfection, deux mesures sont réalisées. Il s'agit de l'activité des luciférases *firefly* et Renilla contenues dans chaque extrait cellulaire. En effet, après dépôt de 50 µl du substrat de la

luciférase *firefly* (LAR II), et mesure de l'activité lumineuse associée à l'enzyme rapporteur, 50µl du substrat de la luciférase Renilla (Stop & Glo) sont rajouté dans le même tube. La solution Stop & Glo permet l'inhibition de l'activité luciférase *firefly* et l'évaluation de l'activité de la luciférase Renilla associée au témoin d'efficacité de transfection. L'activité luciférase *firefly* obtenue pour chaque échantillon est normalisée par l'activité luciférase Renilla correspondante. Chaque transfection a été réalisée au moins 3 fois. La détermination de la différence significative entre les différentes constructions promotrices est réalisée en utilisant le test Student au moyen du logiciel GraphPad Prism 6 Demo. Les comparaisons pour lesquelles $p \leq 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

III. Résultats

Afin d'étudier d'une part l'effet de la méthylation sur l'activité des promoteurs de certains gènes (*vTR*, *pp38* et 14 kDa) exprimés pendant le cycle viral du virus de Marek et d'autre part l'effet de la méthylation sur les mutations des sites de fixation de l'onco-protéine cellulaire c-Myc sur le promoteur *vTR*, plusieurs étapes ont meublé notre démarche. La première étape a consisté en l'élaboration des différentes constructions plasmidiques. La deuxième étape de notre démarche a consisté à méthyler les différentes constructions avant leur transfection dans différents systèmes cellulaires eucaryotes. La dernière étape du travail a été de mesurer et de comparer l'activité des différents promoteurs méthylés versus non méthylés mutés ou pas.

III.1. Elaboration des différentes constructions

Six vecteurs ont été construits par clonage des différents promoteurs en amont du gène rapporteur (luciférase *firefly*) dans le vecteur rapporteur pCpGL-Basic. Ce vecteur présente l'avantage de ne contenir aucun dinucléotide 5'-CpG-3'. Les constructions qui inséreront des promoteurs munis de sites CG pourront être étudiées de manière spécifique lorsque la méthylation des vecteurs rapporteurs sera réalisée. Seuls les promoteurs subiront l'effet de la méthylation de l'ADN.

III.1.1. Promoteurs de *vTR*

La région promotrice de *vTR* s'étendant du nucléotide numéro 141593 au nucléotide numéro 142340 correspondant à -729 à +20 par rapport au site initiateur de transcription +1 décrit par Sckreli et al, en 2007 a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche GaHV2 au moyen des oligonucléotides numéro 1 et 2 contenant les extensions PstI et HindIII respectivement (tableau 4). Les séquences promotrices obtenues ont tout d'abord été liguées dans le vecteur pGEMT-easy, puis clonés dans les bactéries *Escherichia coli* TG1. Ce premier clonage avait pour but d'éliminer les produits de PCR des promoteurs tronqués afin d'amplifier uniquement les produits de PCR des promoteurs contenant les extensions PstI et HindIII. Une fraction de colonies blanches obtenues a été criblée afin de vérifier la présence de l'insert. Après une midipréparation d'une colonie de bactéries contenant l'insert, l'ADN plasmidique a été séquencé. Le séquençage n'a montré aucune mutation par rapport à la souche de référence. L'ADN plasmidique a ensuite été digéré en utilisant les enzymes de restriction PstI et HindIII. L'insert obtenu après digestion a été purifié et ligué dans le vecteur d'expression pCpGL-basic linéarisé et purifié (figure 18). Les plasmides pCpGL recombinants obtenus ont été clonés dans les bactéries *Escherichia coli* 100 D. Afin de s'assurer de la qualité de notre vecteur linéarisé, nous avons également cloné notre plasmide linéarisé sans insert dans les bactéries *Escherichia coli* PIR (contrôle négatif). A la dilution 10^{-4} , 26 colonies dans la boîte contenant les bactéries transformées par le vecteur recombinant ont été dénombrées contre deux dans la boîte contrôle (données non montrées), preuve que le vecteur a été bien linéarisé et les extrémités 5' bien déphosphorylées. Comme pour le clonage avec les plasmides pGEMT-Easy recombinants, les bactéries *Escherichia coli* 100 D contenant le plasmide pCpGL recombinants ont été criblées afin de vérifier la

présence des inserts. Sur 8 colonies criblées, toutes les bactéries contenaient le vecteur recombinant. La figure 19 présente les résultats du crible des colonies de bactéries contenant le vecteur pCpGL recombinant. Les tailles des amplicons *vTR* sont de 947 paires de base (pb) correspondant à la taille des inserts 747 pb plus la taille du site multiple de clonage qui fait environ 200 pb.

Une des huit colonies criblées a été repiquée et mise en culture afin d'amplifier le plasmide recombinant. Après purification du plasmide recombinant, celui-ci a été séquencé et vérifié par alignement. La séquence du promoteur *vTR* du vecteur recombinant pCpGL-*vTR* sauvage obtenue ne présentait aucune mutation par rapport à la séquence de référence du génome RB1-B.

III.1.2. Promoteurs de PP38 et 14KDA

La séquence d'ADN de 493 paires de base s'étendant de la position 128697 à la position 129190 du génome de la souche RB1-B correspond au promoteur des gènes *pp38* et *14 kDa*. Ce promoteur bidirectionnel a été amplifié au moyen des oligonucléotides contenant des extensions BamHI et HindIII (tableau 4). Pour les mêmes raisons que le promoteur du gène *vTR*, les promoteurs des gènes *pp38* et *14 kDa* ont été dans un premier temps clonés en pGEMT-easy, puis, les inserts ont été digérés et purifiés avant d'être clonés en pCpGL-Basic linéarisé et purifié (figure 18). À la différence du promoteur *vTR*, les promoteurs *PP38* et *14kDa* sont clonés au niveau du site de restriction BamHI/HindIII en amont du gène de la luciférase *firefly*. A la dilution 10^{-4} le nombre de clones obtenus en condition vecteur plus insert était 5 fois supérieure au nombre de clones obtenus en condition vecteur linéarisé sans insert (données non montrées). Sur 8 clones criblés dans chaque condition, nous avons obtenu 3 et 5 clones positifs pour *pp38* et *14 kDa* respectivement. La figure 19 présente les résultats du criblage de bactéries contenant le plasmide pCPGL-recombinant. Les tailles des amplicons *pp38* et *14 kDa* sont de 693 pb correspondant à la taille des inserts 492 pb chacun plus la taille du site multiple de clonage qui fait environ 200 pb. L'ADN plasmidique a été amplifié, séquencé, puis aligné avec la séquence de référence du génome GaHV-2. Les séquences des promoteurs *pp38* et *14 kDa* des vecteurs recombinant pCpGL-*pp38* et pCpGL-*14kDA* sauvages obtenues ne présentaient aucune mutation.

III.1.3. Mutagenèse dirigée et clonage des promoteurs de vTR mutés

Il a été montré que le facteur de transcription cellulaire c-Myc jouait un rôle dans l'expression du gène *vTR* pendant la phase de latence du virus de Marek (Shkreli et al., 2007). Afin d'étudier le rôle de ce facteur de transcription, nous avons muté les sites de liaison (Boîtes E2 et E3) de ce dernier par mutagenèse dirigée. La mutation E2 (Boîte E2) a été induite par deux PCR chevauchantes, suivie d'une troisième PCR permettant d'amplifier la séquence mutante complète. Cette dernière PCR a été réalisée en utilisant comme matrice les deux premiers fragments issus des PCR chevauchantes et comme amorce, le couple d'oligonucléotides (numéro 1 et2) bordant le promoteur *vTR*.

La mutation E3 a été réalisée par un couple d'oligonucléotide bordants le promoteur *vTR*. Il s'agit de l'oligonucléotide sens contenant l'extension PstI et l'oligonucléotide reverse contenant la mutation et l'extension HindIII (tableau 4). L'ADN matriciel utilisé pour générer les mutations E2 et E3 est le plasmide pGEMT-Easy recombinant contenant le promoteur *vTR*.

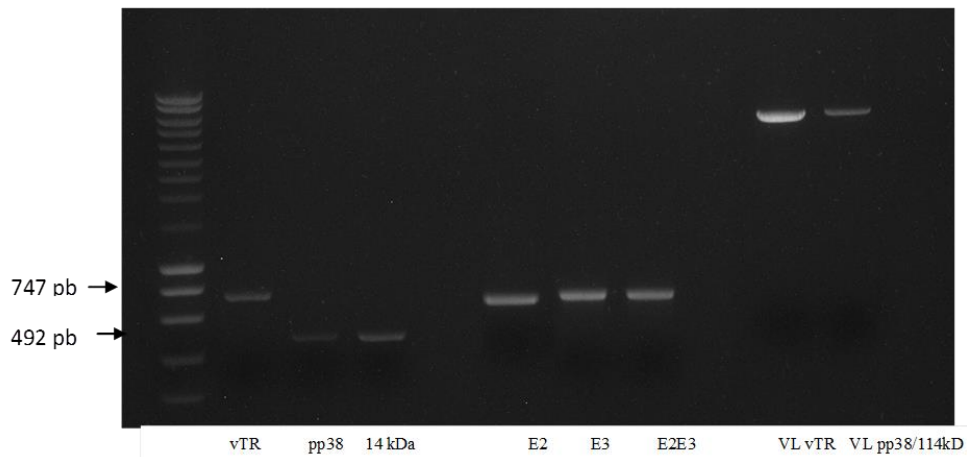


Figure 18 : Amplification moléculaire des promoteurs et préparation des vecteurs rapporteurs utilisés dans les clonages moléculaires. De la gauche à droite nous avons le promoteur vTR sauvage (747 pb) ; les promoteurs pp38 et 14 kDa (492 pb) ; les promoteurs vTR muté au niveau des boîtes E2 , E3 et double mutation E2E3 (746 pb) ; le vecteur linéarisé vTR (VL.vTR) et le vecteur linéarisé pp38/14kDa.

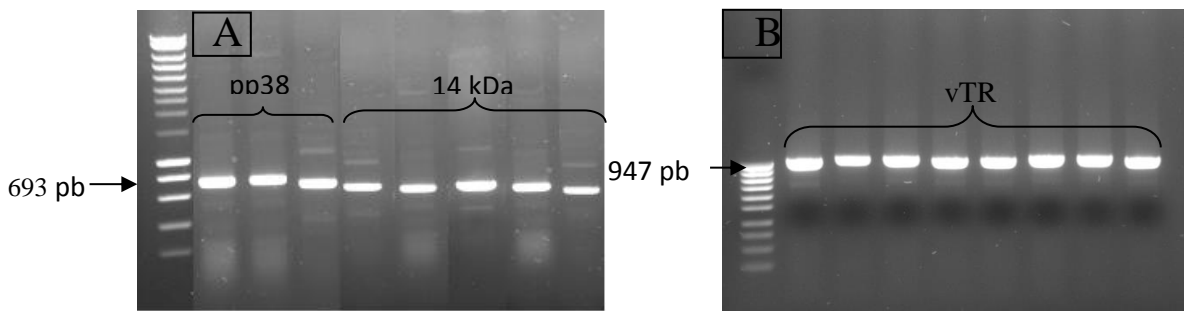


Figure 19: Criblage des clones possédant l'insert (vecteur pCpGL free + promoteur). (A) Sur 8 clones criblés, 3 et 5 clones contiennent les vecteurs recombinants pp38, 14kDa (A). La taille des amplicons pp38 et 14 kDa est de 693 pb. Elle correspond à la taille du promoteur pp38 et 14 kDa (492 pb) plus celle du site multiple de clonage qui fait environ 200 pb. (B) Sur 8 clones de bactéries criblés, 100% de clones contenant le vecteur recombinants vTR sauvage ont été obtenus. Les bande de 947 pb obtenue correspondant à la taille du promoteur vTR sauvage (746 pb) plus celle du site multiple de clonage (200 pb).

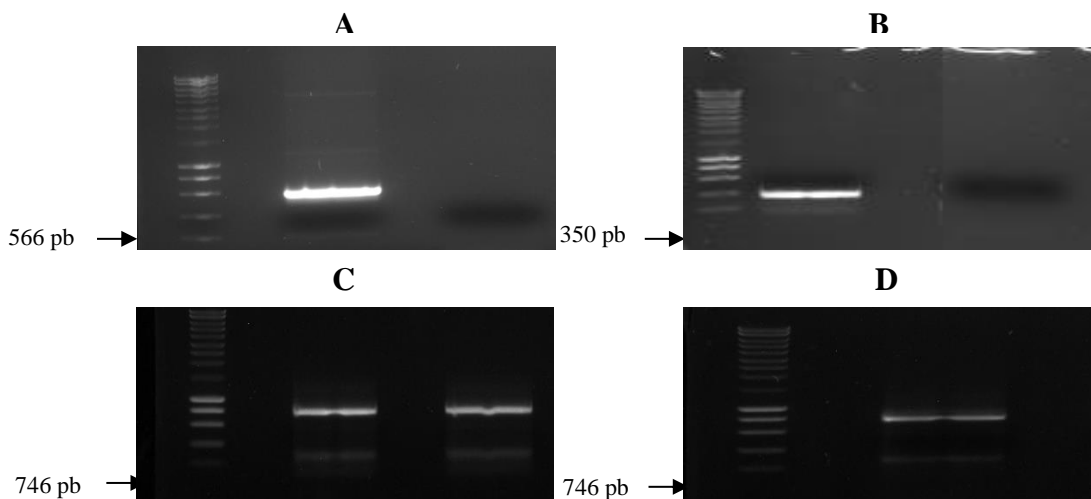


Figure 20: Induction des mutations c-Myc par mutagenèse dirigée. (A) Première PCR chevauchante (gauche) contrôle (droite) (B) Deuxième PCR chevauchante (gauche) contrôle (droite) Les contrôles (Ctrl) ont été réalisé en utilisant deux amorces sens. (C) Mutation E2 (gauche) et E2 E3 droite (D) Mutation E3.

La double mutation E2E3 a été générée en induisant la mutation E3 à partir de la mutation E2. La figure 20 présente les résultats des différents PCR effectués pour l'obtention des différentes mutations. En (A) un amplicon d'une taille de 566 pb a été obtenu, correspondant à la position du couple d'oligonucléotide numéro 1 et 8 utilisé. En (B) la taille de l'amplicon est d'environ 350. Elle correspond à la taille du deuxième fragment chevauchant de 218 pb plus celle de la portion d'ADN plasmidique de 132 pb compris entre la fin du promoteur *vTR* et l'oligonucléotide RPu (numéro11) utilisé avec l'oligonucléotide numéro 7 pour réaliser cette PCR. La taille des amplicons *vTR* complète contenant la mutation E2, la double mutation E2 et E3 (figure 20 C gauche et droite respectivement) et la mutation E3 (figure 20 D) est de 746 pb, identique à celle du promoteur *vTR* sauvage (figure 18). Tout comme le promoteur *vTR* sauvage, les promoteurs *vTR* mutés ont été sous cloné dans le plasmide pGEMT-Easy avant d'être, insérés dans le plasmide rapporteur pCpGL-Basic au niveau des sites de restriction PstI/HindIII en amont du gène de la luciférase. A la dilution 10^{-4} le nombre de clones obtenus en condition vecteur plus insert était quatre fois supérieure à celui obtenu en condition vecteur linéarisé sans insert (données non montrée). Sur 5 colonies de bactéries criblés par condition, Toutes les bactéries transformées avec le vecteur pCpGL-*vTR* muté E2 ainsi que celles transformées avec le vecteur pCpGL-*vTR* muté E2 et E3 possédaient l'insert, contre 4 chez les bactéries transformées avec le vecteur pCpGL-*vTR* muté E3. La taille des amplicons obtenus est de 974 correspondant à celle du promoteur *vTR* sauvage plus celle du site de clonage multiple dans lequel ils sont insérés (figure 21)

Afin de vérifier que les mutations désirées sont obtenues, l'ADN plasmidique de chaque condition après amplification a été séquencé, et alignés avec la séquence de référence. La figure 22 présente les différentes mutations obtenues.

III.1.4. Méthylation de l'ADN plasmidique.

Avant l'électroporation des différentes constructions dans les lignées cellulaire, il est nécessaire de vérifier l'état de méthylation de nos promoteurs traités ou non à la M.Sss1. Pour cela nous avons digéré nos différentes constructions à l'aide d'une enzyme de restriction, HpaII dont le site de restriction CCGG est bloqué par la présence des CpG méthylés. La figure 23 présente les résultats de la digestion des vecteurs non méthylés (A) et méthylés (B). En condition méthylée, on observe les trois formes de vecteur à savoir les vecteurs super enroulés, les vecteurs enroulés et les vecteurs non enroulés. Tandis qu'en condition non méthylé l'on observe une bande nette. Ceci est la preuve que les différentes constructions ont été méthylées. Les promoteurs *pp38* et *14 kDa* possède un site de restriction Hpa II (CCGG) quant au promoteur *vTR* (sauvage ou mutés) il possède 8 sites de restriction de l'enzyme HpaII produisant sept fragments de 21 ; 59 ; 64 ; 78 ; 98 ; 132 et 190. Ces fragments sont accumulés au fond du gel en réponse à leurs petites tailles. La bande obtenue représente le vecteur linéarisé plus les 106 paires de bases du promoteur *vTR* restant.

III.2. Etude de l'effet de la méthylation des promoteurs sur l'expression des gènes

Afin d'étudier l'effet de la méthylation sur l'activité des promoteurs des différents gènes (*vTR*, *pp38* et *14 kDa*) l'activité luciférase obtenue pour les promoteurs méthylés ont été comparés de manière indépendante avec celles non méthylés (figure 24). Dans toutes les lignées cellulaires étudiées, la méthylation réprime fortement l'expression des différents gènes. La méthylation du promoteur *EF1/CMV* (promoteur réputé insensible à la méthylation) n'a aucun effet sur l'expression du gène rapporteur.

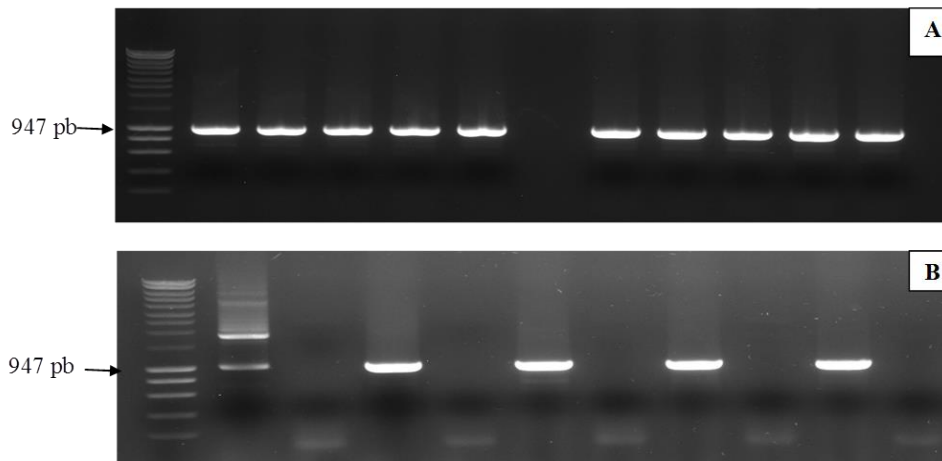


Figure 21: Criblage des clones possédant l'insert (vecteur pCpGL free + promoteur mutés). Sur 5 clones criblés, 5, et 4 positifs contenant les vecteurs recombinants E2 ((A), gauche), E2 E3 ((A), droite) et E3 (B) respectivement ont été obtenus. La taille des amplicons est de 947 pb correspondant à la taille du promoteur vTR sauvage (746 pb) plus celle du site multiple de clonage (200 pb).

Site E2

E2: AGACCCCGGCCACAGGAAGGGCGGGGCA **AAAA**CATGGGGCGTGGCGGGAGATGAATGACCGC

E2-E3: AGACCCCGGCCACAGGAAGGGCGGGGCA **AAAA**CATGGGGCGTGGCGGGAGATGAATGACCGC

E3: AGACCCCGGCCACAGGAAGGGCGGGGCACGTGCATGGGGCGTGGCGGGAGATGAATGACCGC

vTR WT: -210 AGACCCCGGCCACAGGAAGGGCGGGG CACGTGCATGGGGCGTGGCGGGAGATGAATGACCGC-146

Site E3

E2: ACAAGAGCCCCACGCGGGGTCCCCCGGCACACGTGGCGGGTGGGAAGGC

E3: ACAAGAGCCCCACGCGGGGTCCCCCGGCA **TTT**TGGCGGGTGGGAAGGC

E2-E3: ACAAGAGCCCCACGCGGGGTCCCCCGGCA **TTT**TGGCGGGTGGGAAGGC

vTR WT: -28 ACAAGAGCCCCACGCGGGGTCCCCCGG CACACGTGGCGGGTGGGAAGGC +20

--> TSS vTR

Figure 22: Séquence des différentes mutations du site de liaison c-Myc. Les éléments de réponse à c-Myc mutés sont représentés en rouge. Celui du promoteur sauvage est souligné en vert.

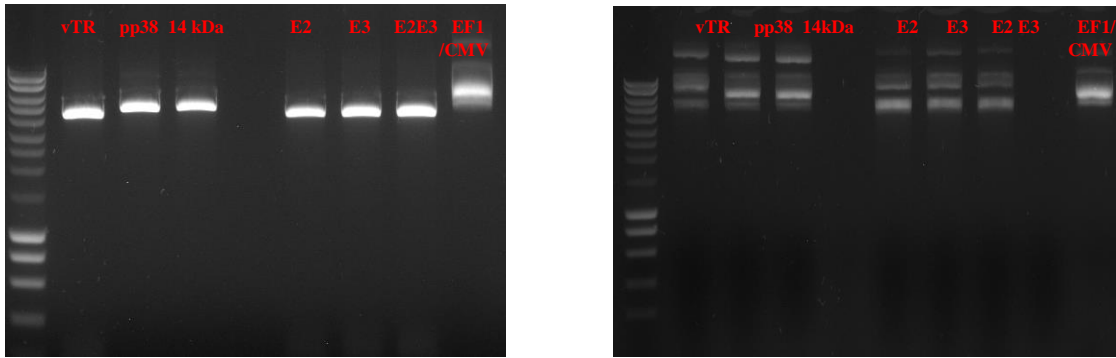


Figure 23: Démonstration de la méthylation effectuée *in vitro* par une digestion enzymatique HpaII des vecteurs non méthylés (A) et méthylés par M.SssI (B). Le promoteur vTR possède 8 sites de restriction HpaII produisant sept fragments de 98; 190; 132; 21; 78; 59 et 64 pb. Ceux-ci sont accumulés au fond du gel en réponse à leur petite taille. La bande observée représente le vecteur plus les 168 pb restantes du promoteur vTR. Les promoteurs pp38 et 14 kDa ont chacun un seul site de restriction HpaII. En condition méthylé on observe les trois formes de vecteur à savoir la forme super enroulée, enroulée et non digérée. Le promoteur hybride EF1/CMV contient pas le site de restriction HpaII et par conséquent n'est pas digéré.

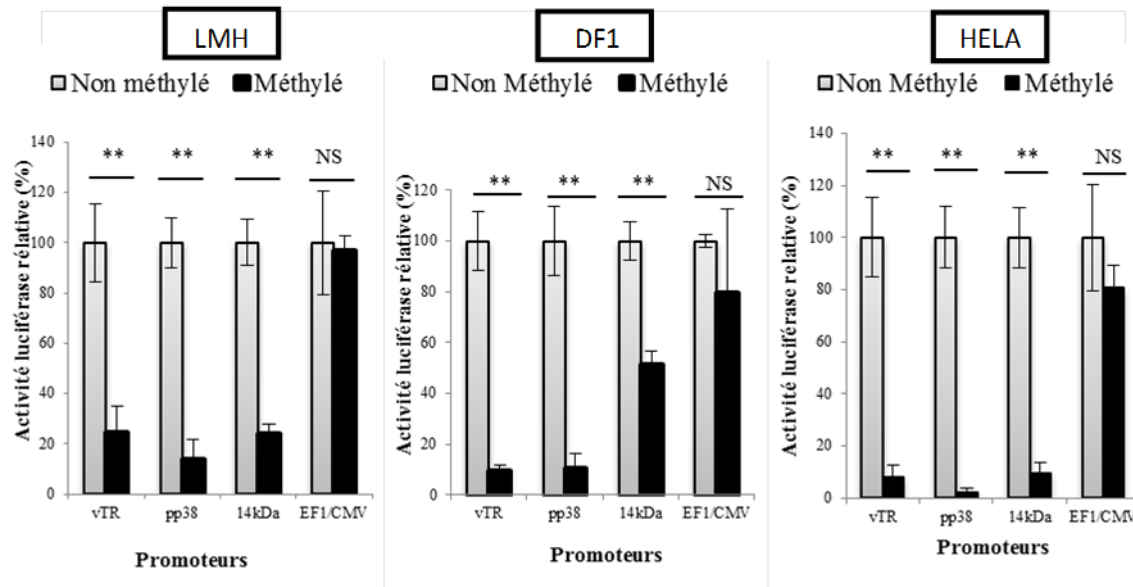


Figure 24: Effet de la méthylation sur l'activité des promoteurs vTR, pp38, 14 kDa, EF1/CMV (contrôle) dans les cellules LMH, DF1 et HELA. L'activité luciférase relative obtenue pour les promoteurs non méthylés ont été normalisée à 100%. Les valeurs significativement différentes ($p < 0,05$) de celles obtenues pour le promoteur non méthylé correspondant sont indiquées par une étoile si la valeur de $p > 0,01$ et deux étoiles si la valeur de $p < 0,01$.

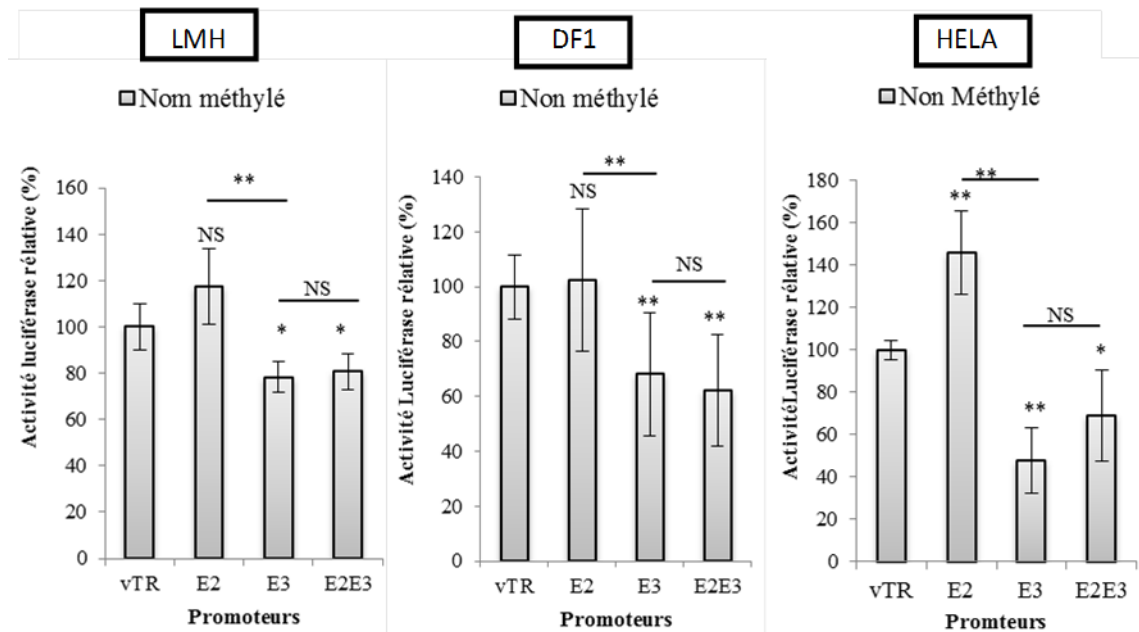


Figure 25 (A) : Effet de la mutation de c-Myc sur l'activité du promoteur vTR dans les cellules LMH, DF1 et HELA. L'activité luciférase relative obtenue pour le promoteur de vTR a été normalisée à 100%. Les valeurs significativement différentes ($p < 0,05$) de celles obtenues pour le promoteur vTR sont indiquées par une étoile si la valeur de $p > 0,01$ et deux étoiles si la valeur de $p < 0,01$.

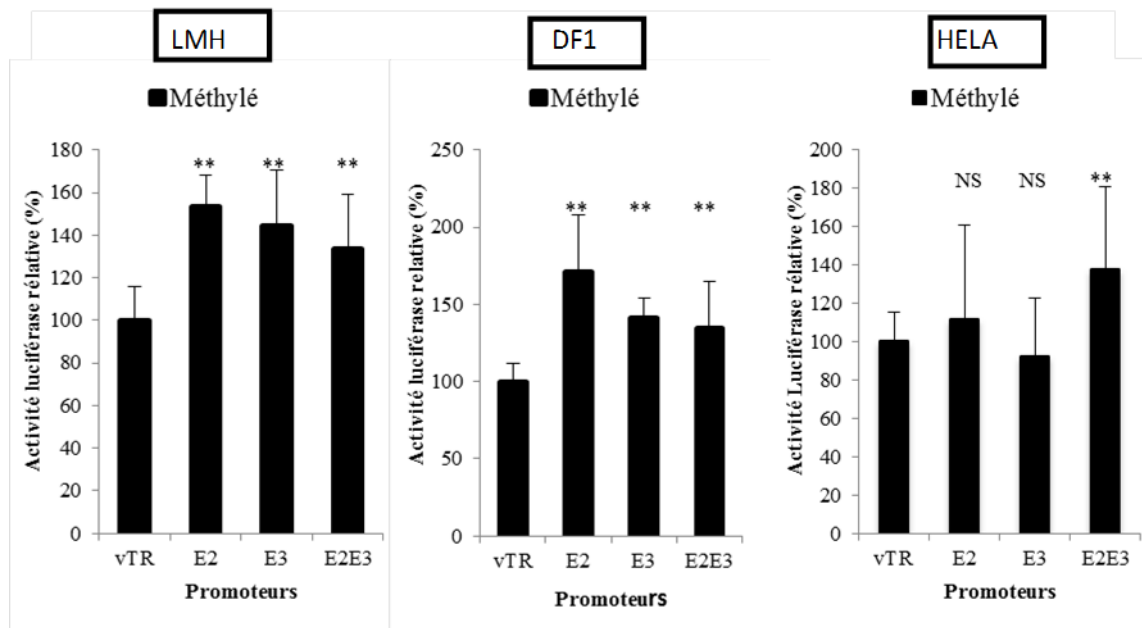


Figure 25 (B): Effet de la méthylation du promoteur vTR sur la mutation c-Myc dans les cellules LMH, DF1 et HELA. L'activité luciférase relative obtenue pour le promoteur de vTR a été normalisée à 100%. Les valeurs significativement différentes ($p < 0,05$) de celles obtenues pour le promoteur vTR sont indiquées par une étoile si la valeur de $p > 0,01$ et deux étoiles si la valeur de $p < 0,01$.

III.3. Etude de l'effet de la méthylation et de la mutation des sites de liaison c-Myc sur l'expression du gène de la *vTR*

Afin d'étudier l'effet de la méthylation et de la mutation des sites de liaison c-Myc sur l'expression du gène de la *vTR*, l'activité luciférase obtenue pour le promoteur *vTR* sauvage ont été comparés avec celles des promoteurs *vTR* mutés, méthylés (figure 25 B) ou non (figure 25 A). Dans les trois types cellulaires, en condition non méthylé (figure 25 A), l'activité luciférase montre que la mutation E2 ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de *vTR* ce qui paraît étonnant. Par contre on observe une diminution de l'activité luciférase du promoteur de *vTR* muté en E2 et doublement muté en E2 E3 par rapport à celle du gène *vTR* sauvage. On n'observe pas de différence significative entre l'activité luciférase relative du promoteur *vTR* muté en E2 et celui du promoteur *vTR* doublement muté en E2 E3. La différence significative entre l'activité luciférase relative du promoteur muté en E2 et celui du promoteur *vTR* doublement muté en E2 E3 laisse supposer que la boîte E3 serait plus fonctionnelle dans ces trois lignées cellulaires. Plus intrigant encore, l'activité luciférase des promoteurs *vTR* méthylés et mutés en E2, e E3 et doublement muté E2E3 dans en condition méthylé dans les trois types cellulaires, sont supérieures ou non significativement différent de celui de l'activité luciférase du promoteur sauvage méthylé. Ces résultats suggèrent que l'effet de la mutation serait masqué par la méthylation des promoteurs.

IV. Discussion

Les modifications épigénétiques ont été décrites comme étant des facteurs cruciaux de la régulation de l'expression des gènes associés aux différentes phases du cycle viral chez les herpesvirus. Bon nombres d'études ont montré que pendant la phase de latence, le génome des herpesvirus présentait les marques répressives au niveau des histones en regard de la séquence des gènes impliqués dans la phase de réplication lytique (Liang et al., 2009 ; Chen et al., 2013). Chez le virus de la maladie de Marek, des données épigénétiques préliminaires ont montré que le génome de GaHV-2 présentait des marques de méthylation pendant la phase de latence (Key et al., 1987). Cette première observation a laissé croire que, comme chez les autres herpesvirus, la méthylation pourrait jouer un rôle dans la restriction de l'expression génique par le contrôle transcriptionnel durant la latence (Key et al., 1987). Dans une seconde étude, un profil de méthylation plus détaillé a été établi sur les régions répétées IR_L et IR_S du génome de GaHV-2. Cette étude indique que, pendant la phase de latence, les signatures de méthylation diffèrent d'une région à une autre (Brown et al., 2012). Les auteurs ont observé un niveau de méthylation élevé à proximité des séquences des gènes lytiques comme *pp38* ou *vIL-8* tandis que les régions promotrices du cluster miRNA 9-4 ou de *vTR* sont non méthylées (Brown et al., 2012b). Ces observations n'ont pas toutes été confirmées. Une analyse par séquençage réalisé par Carole Mignon (données non publiées) ciblant le promoteur de *vTR* a montré un niveau de méthylation très élevé (80 %) dans cette région génomique. C'est dans ce contexte qu'il a été question lors de ce travail d'étudier l'effet de la méthylation des promoteurs de trois gènes exprimés lors des différentes phases de l'infection par le virus de la maladie de Marek. Il s'agit du promoteur du gène *pp38* décrit comme étant fortement exprimé en phase cytotytique, le promoteur du gène *vTR* codant la sous unité ARN de la télomérase, fortement impliqué dans la phase de tumorigénèse induite par GaHV-2 et le promoteur du gène *14 kD* dont le rôle réel n'est pas encore connu mais il serait impliqué dans les phases lytique et latente du cycle viral du GaHV-2.

Afin d'étudier l'effet de la méthylation sur l'activité promotrice des différents gènes, différentes constructions plasmidiques ont été élaborées. Pour cela l'utilisation d'un plasmide dépourvu de tout site CpG était nécessaire. Le plasmide pCpGL-Basic contenant un gène rapporteur (luciférase *firefly*) en amont duquel se trouve un site multiple de clonage a été obtenu auprès du Dr M. Rehli (département d'hématologie et oncologie, de l'université de Rogensburg en Allemagne). L'étude de la méthylation faite par l'équipe du donateur a montré que ce plasmide n'était pas sensible à la méthylation. L'effet de la méthylation d'un promoteur après son insertion dans ce plasmide peut alors être étudié de manière fiable. Ainsi, les effets de la méthylation seront spécifiques aux différents promoteurs testés.

Etude de l'effet de la méthylation sur l'activité transcriptionnelle des promoteur vTR, pp38 et 14 kD

La souche virale GaHV-2 RB1-B (vv+) utilisé dans cette étude est un modèle classiquement utilisé en laboratoire pour l'étude du lymphome induit par GaHV-2. Le promoteur de vTR ainsi que le promoteur bidirectionnel commun des gènes *pp38* et *14 kD* ont été amplifiés par PCR et clonés dans les différents vecteurs pCpGL Basic linéarisés à cet effet afin d'obtenir nos différentes constructions plasmidiques sauvages pCpGL-vTR, pCpGL-pp38 et pCpGL-14kD). Après s'être assuré que les différents promoteurs clonés ne contenaient aucune mutation par rapport à la souche de référence RB1-B, les différentes constructions ont fait l'objet de la méthylation à l'aide de la méthylase MSssI. La vérification du profil de méthylation obtenu après traitement a été faite par une enzyme de digestion *HpaII* dont l'activité est bloquée en présence d'un CpG méthylé sur son site de restriction (CCGG). Les constructions plasmidiques méthylées et non méthylées ont été par la suite transfectées par lipofection dans différents systèmes cellulaires pour la mesure de l'activité luciférase.

Les différentes constructions ont été transfectée dans trois lignées cellulaires différentes. Les cellules HeLa d'origine humaine et deux lignées cellulaires de poulet DF1 et LMH. Les résultats de la mesure de l'activité luciférase relative obtenus montrent que dans les trois types cellulaires, la méthylation de l'ADN a fortement réprimé l'activité transcriptionnelle des plasmides recombinants. La méthylation de l'ADN est décrit comme l'une des marques épigénétiques très souvent associées à la répression de l'expression des gènes. Il a été démontré que durant l'infection par les herpesvirus, le génome de ce dernier est soumis à un cycle de méthylation bi-phasique. Largement méthylé au cours de la phase de latence virale, celui-ci revient à un état non méthylé durant la réplication virale lytique. Les données obtenus corroborent avec celles montrant *in vivo* que la méthylation de l'ADN par des méthyltransférases DNMT3a et DNMT3b, réprimait la transcription du promoteur de l'ORF50 du MHV68 (Gamma Herpes Virus Murin 68) pendant la phase de latence (Gray et al., 2010). Ceci a également été observé chez EBV. Pendant la phase de latence, la méthylation du promoteur BamHI C (Cp) induisait la répression des gènes EBNA-LP, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3B et EBNA-3C (Chen et al., 2013). Les même effets ont été observé pour les gènes LMP1 et LMP2 (Latent membrane proteins 1& 2) (Chen et al., 2013).

En plus de leur propre gène, plusieurs familles de virus sont capables d'induire la méthylation de l'ADN des gènes cellulaires afin de favoriser leur réplication ou d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Citons comme exemple le cas de la répression de l'interféron gamma par le virus du de l'immunodéficience acquise sévère (SIDA, HIV ; l'inhibition des protéines P15^{INK4A} P16^{INK4A} par le polyomavirus SV40 ; la répression de la E-cadherin, Rb-E2F chez les papillomavirus humain (HPV), la répression de la protéine CDH13, TGFβRII chez le KSHV et la protéine BIM et P15^{INK4A} chez EBV (Paschos and Allday, 2010). Le mécanisme moléculaire à l'origine de cette répression implique le recrutement au niveau du

promoteur méthylé des protéines pouvant lier les résidus CpG méthylés (MeCP : methyl-CpG binding protein). Ces MeCP recrutent avec eux des histones méthyltransférases et des histones déacétylases. Ce type de modification post-traductionnelle des histones rend la fixation à l'ADN impossible aux facteurs de transcription (Bird, 2002 ; Doerfler, 2005). Par ailleurs, les éléments de réponse contenant des CG méthylés peuvent également ne plus être reconnus par les facteurs de transcription attendus. Cependant, tout n'est pas blanc ou noir. En effet, il a été montré chez certains virus que la méthylation de l'ADN pouvait avoir un effet inverse et ainsi être associé à une activation transcriptionnelle. C'est le cas lors de la réactivation du virus EBV via la surexpression de la protéine virale Zta qui se lie préférentiellement sur des sites méthylés (Flower et al., 2011).

Etude de l'effet de la mutation et/ou méthylation du site de liaison c-Myc sur l'activité du promoteur de *vTR*

Il a été montré que le facteur de transcription cellulaire c-Myc jouait un rôle dans l'expression du gène *vTR* pendant la phase de latence du virus de Marek (Shkreli et al., 2007). Afin d'étudier le rôle de ce facteur de transcription et d'observer le rôle de la méthylation sur ces sites de liaison, ces derniers ont été mutés par mutagenèse dirigée. Comme pour les constructions sauvages, nos vecteurs mutés ont été méthylés avant d'être transfectés dans différents systèmes cellulaires pour la mesure de l'activité luciférase.

Effet de la mutation des boîtes E sur l'activité du promoteur *vTR*

Le promoteur *vTR* présente trois sites de liaison à l'oncoprotéine c-Myc à savoir la boîte E1, la boîte E2, et la boîte E3 (figure 26). Shkreli et ses collaborateurs en 2007 ont montré que la boîte E1 était non fonctionnelle. Pour cette raison, l'étude de l'effet de la mutation a été faite sur les boîtes E2 et E3. Les résultats obtenus montrent que dans les trois lignées cellulaires, la mutation de la boîte E2 n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle. Par contre, la mutation E3 est associée à une diminution de l'expression du promoteur de *vTR* d'environ 20 %, 30 % et 50% respectivement dans les cellules LMH, DF1 et HeLa par rapport à celui du sauvage. Quant à la double mutation E2/E3, on observe une répression de 20 %, 40% et 30 % de l'expression du gène *vTR* muté par rapport à celui du gène sauvage dans les cellules LMH, DF1 et HELA respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par Shkreli et ses collaborateurs qui ont observés les mêmes résultats dans les cellules LMH (Shkreli et al., 2007). Par contre, dans les cellules MSB-1 (lymphocytes T transformés par le GaHV-2), la mutation E2 et E3 induisait une répression d'environ 76 % et 75 % respectivement. Ces résultats prouvent que la boîte E3 est un élément cis régulateur impliqué dans la transcription du gène *vTR*. Notons tout de même que la double mutation des sites E2 et E3 n'induit pas une inhibition totale de la transcription. Ceci suggère l'implication d'autres facteurs de transcription régulant l'activité du promoteur *vTR*. En effet, l'analyse bio-informatique du promoteur *vTR* montre une multitude de site de liaison de différents facteurs de transcription parmi lesquels le site de liaison (GGA(A/T)) du facteur de transcription Ets (E26 transformation-specific), également impliqué dans la régulation de la transcription de *vTR* dans la lignée de cellules lymphoblastoïdes MSB-1 transformées par GaHV-2 (Shkreli et al., 2007).

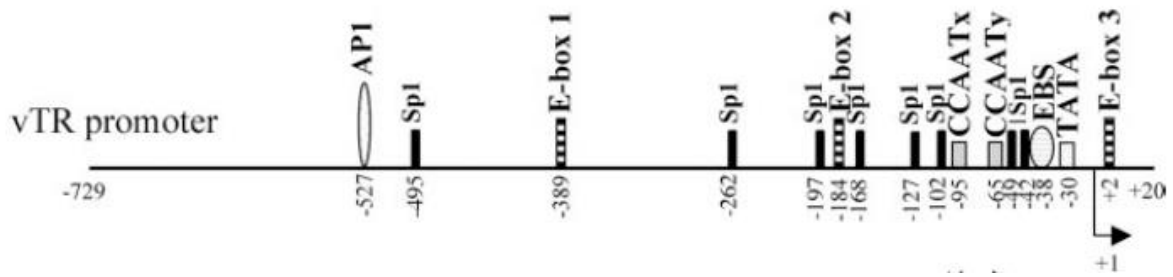


Figure 26 : Localisation des différentes boîtes E, sites de fixation du facteur de transcription c-Myc.

Le promoteur vTR présente trois sites de liaison du facteur de transcription c-Myc. Les boîtes E1 et E2 sont situées à 389 et 184 nucléotides respectivement en aval du site d'initiation de la transcription. La boîte E3 est située à deux nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription.

Effet de la méthylation et de la mutation sur l'activité du promoteur *vTR*

Dans les trois lignées cellulaires, l'activité du promoteur de *vTR* doublement muté et méthylé est significativement supérieure à celle du promoteur sauvage méthylé. Les mêmes observations sont faites pour les mutations en E2 et E3 dans les cellules LMH et DF1. Dans les cellules HeLa il n'y a pas de différence significative entre l'activité du promoteur de *vTR* méthylé et muté en E2 ou en E3 par rapport au promoteur méthylé sauvage. Ces résultats étonnants suggèrent que, contrairement aux observations faites en situation non méthylé, la méthylation aurait masqué l'effet de la mutation. L'activité des promoteurs mutés méthylés élevé pourrait s'expliquer par le fait qu'en absence de mutation des boîtes E, c-Myc serait le principal facteur de transcription à l'origine de l'activation de la transcription de *vTR*. La mutation des sites de liaison de c-Myc pourrait induire le recrutement d'autres facteurs de transcription insensibles à la méthylation à l'origine de l'activité observée. En effet, une série de facteurs a été décrit comme étant insensibles à la méthylation. On peut citer le facteur de Sp1, FCT, YY1 et C/EBPalpha (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) (Tate & Bird, 1993 ; Rishi et al., 2010 ; Flower et al., 2011; Baron, 2012). Chez le virus d'EBV, il a été décrit la présence au niveau des gènes impliqué dans la phase de latence du cycle viral, de sites de liaison d'un facteur de transcription (Zta) dont la fixation à son élément de réponse est dépendante de la méthylation (Flower et al., 2011). L'absence de ce site au niveau des gènes impliqué dans la phase lytique du cycle viral d'EBV pourrait expliquer la régulation génique entre la phase lytique et latente pendant l'infection par l'EBV (Flower et al., 2011). Selon les résultats de détermination du profil de méthylation du promoteur du gène *vTR* et des mesures de l'activité luciférase associé, on s'attendait ici à voir que l'activité du promoteur du gène *vTR* soit influencée positivement par la méthylation. L'effet contraire observé peut être expliqué par le fait qu'en situation d'infection par le GaHV-2, la régulation du promoteur de *vTR* n'est pas dictée par la seule protéine c-Myc mais résulte de l'association de plusieurs facteurs parmi lesquels la protéine virale Meq pourrait avoir un rôle important. En effet, la protéine Meq a été décrite comme ayant un rôle central dans la régulation de l'expression de nombreux gènes et au cours des différentes phases du cycle viral de GaHV-2. Par ailleurs, il a été démontré que la protéine Meq pourrait positivement réguler l'expression du gène *vTR*. En effet, la protéine virale Meq via le motif Pro-Leu-Asp-Leu-Ser (PLDLS) pourrait se lier la protéine CtBP (C-terminal-binding protein) qui est un co-répresseur connu impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de la croissance cellulaire. La liaison de Meq à CtBP va lever l'inhibition de CtBP sur la protéine E2F qui va se lier à sa séquence consensus présent sur le promoteur du gène *vTR* et induire la transcription de ce dernier (Brown et al., 2005 ; Osterrieder et al., 2006). De plus, la protéine Meq peut lier la protéine rétinoblastome RB et lever l'inhibition de E2F/DP qui est séquestré par la forme non phosphorylé de la p-RB. Le facteur de transcription E2F ainsi activé va recruter au sein de la machinerie de transcription la protéine p300 ainsi que les histones H3 acétylase (Trimarchi & Lees, 2002). L'oncoprotéine virale Meq possède également le site de liaison au motif leucine zipper (B-ZIP) de la protéine c-Jun. L'hétérodimère Meq/Jun induirait la transcription de *vTR* en se liant au site AP-1 présent au niveau du promoteur du gène *vTR* (figure 27) (Osterrieder et al., 2006 ; Brown et al., 2009).

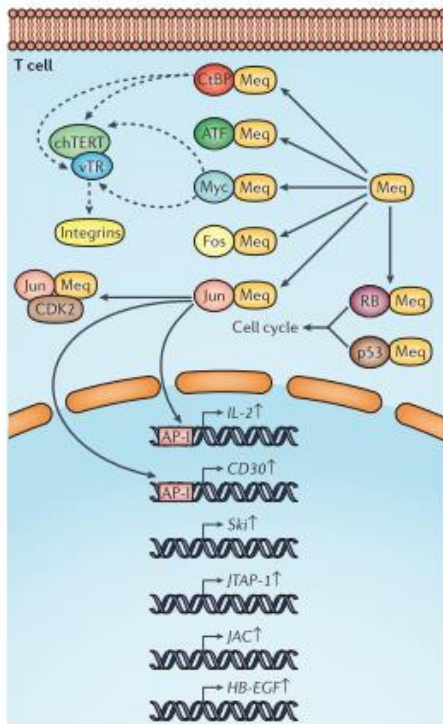


Figure 27: Interaction de l'oncogène viral Meq dans les cellules transformées par GaHV2. Meq se dimérise avec différentes protéines. Lorsque Meq interagit avec ctBP elle lève l'inhibition et permet la transcription des gènes vTR et chTERT. L'hétérodimère Meq/c-Jun entraîne la sur expression des gènes possédant un site de liaison AP-1. Un des gènes régulés par l'hétérodimère Meq/c-jun est l'interleukine 2 (IL-2) qui joue un rôle dans la croissance, la prolifération des lymphocytes T. Meq peut également lier la protéine rétinoblastome (RB) et la protéine (P53) et déréguler la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose.

V. Perspective et conclusion

Le résultat obtenu nous donne un aperçu de l'effet de la méthylation de l'ADN sur l'activité de trois gènes viraux : *vTR*, *pp38* et *14 kD* exprimés au cours de l'infection du virus de la maladie de Marek. La régulation transcriptionnelle des gènes étant un processus complexe faisant intervenir plusieurs facteurs, il serait intéressant de tester nos constructions dans le contexte de cellules infectées par MDV afin de pouvoir mieux comprendre l'effet de la méthylation de l'ADN sur l'activité promotrice des gènes au cours de l'infection par le virus de la maladie de Marek. Pour mimer au plus près le contexte viral les transfections des différentes constructions plasmidiques seraient réalisées dans les cellules MSB-1 qui sont des cellules lymphoblastoïdes MSB-1 transformées par GaHV-2 et infectées de manière latente par ce virus.

VI. Bibliographie

1. Adhya, D., & Basu, A. (2010). Epigenetic modulation of host: new insights into immune evasion by viruses. *Journal of Biosciences*, 35(4), 647–663. doi:10.1007/s12038-010-0072-9
2. Anderson, A.S., Francesconi, A., and Morgan, R.W. (1992). Complete nucleotide sequence of the Marek's disease virus ICP4 gene. *Virology* 189, 657-667.
3. Andrew C. Brown, 1 Lorraine P. Smith, 2 Lydia Kgosana, 2 Susan J. Baigent, 2, & Venugopal Nair, 2* and Martin J. Allday1*. (2009). Homodimerization of the Meq viral oncoprotein is necessary for induction of T-cell lymphoma by Marek's disease virus. *Journal of Virology*, 83(21), 11142–51. doi:10.1128/JVI.01393-09
4. Atanasiu, D., Kent, J.R., Gartner, J.J., & Fraser, N.W. (2006). The stable 2-kb LAT intron of herpes simplex stimulates the expression of heat shock proteins and protects cells from stress. *Virology* 350, 26-33.
5. Baron, B. (2012). Breaking the Silence : The Interplay Between Transcription Factors and DNA Methylation. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology* » “Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment”, Book Edited by Anica Dricu, ISBN 978-953-51-0881-8, Published: November 28, 2012 under CC BY 3.0 License, 11–13.
6. Benetti, L., & Roizman, B. (2004). Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), 9411–6. doi:10.1073/pnas.0403160101
7. Benton, W. J. C. (1957). The increased incidence of visceral lymphomatosis in broiler and replacement birds. *Avian Disease*, 320-327.
8. Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N., & Szyf, M. (1999). A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, 397(6720), 579–83. doi:10.1038/17533
9. Biggs, P. M. (1961). A discussion on the classification of the avian leukosis complex and fowl paralysis. *Br. vet. J.*, 117, 326-334.
10. Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6–21. doi:10.1101/gad.947102
11. Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106(6), 661–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572773>

12. Brown, A. C., Baigent, S. J., Smith, L. P., Chattoo, J. P., Petherbridge, L. J., Hawes, P., Nair, V. (2005). Interaction of MEQ protein and C-terminal-binding protein is critical for induction of lymphomas by Marek ' s disease virus, (17).
13. Brown, A. C., Nair, V., & Allday, M. J. (2012) Epigenetic regulation of the latency-associated region of Marek's disease virus in tumor-derived T-cell lines and primary lymphoma. *Journal of Virology*, 86(3), 1683–95. doi:10.1128/JVI.06113-11
14. Burnside, J., Bernberg, E., Anderson, A., Lu, C., Meyers, B. C., Green, P. J., Jain, N., Isaacs, G. & Morgan, R. W. (2006). Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the latency-associated transcript. *J Virol* 80, 8778-8786.
15. Campbell, J. G. (1961). A proposed classification of the leukosis complex and fowl paralysis. *Br. vet. J.*, 117, 316-325.
16. Cauchy, L. (1970). Recherches virologiques expérimentales et infrastructurales sur une néoplasie : la maladie de Marek. Thèse Doc, Fac, Sci. Nat., Paris, 1-79.
17. Cauchy, L., & Coudert, F. (1986). La maladie de Marek, 5(4), 1011–1024.
18. Chan, A. T. C., Tao, Q., Robertson, K. D., Flinn, I. W., Mann, R. B., Klencke, B., ... Ambinder, R. F. (2004). Azacitidine induces demethylation of the Epstein-Barr virus genome in tumors. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(8), 1373–81. doi:10.1200/JCO.2004.04.185
19. Chen, H.-S., Lu, F., & Lieberman, P. M. (2013). Epigenetic regulation of EBV and KSHV latency. *Current Opinion in Virology*, 3(3), 251–9. doi:10.1016/j.coviro.2013.03.004
20. Churchill, A. E., Chubb, R. C. & Baxendale, W. (1969). The attenuation, with loss of oncogenicity of the herpes-type virus of Marek's disease (strain HPRS-16) on passage in cell culture. *J Gen Virol* 4, 557-564.
21. Cui, X., Lee, L. F., Reed, W. M., Kung, H. J. & Reddy, S. M. (2004). Marek's disease virus encoded vIL-8 gene is involved in early cytolytic infection but dispensable for establishment of latency. *J Virol* 78, 4753-4760.
22. Cui, Z. Z., Yan, D. & Lee, L. F. (1990). Marek's disease virus gene clones encoding virus-specific phosphorylated polypeptides and serological characterization of fusion proteins. *Virus Genes* 3, 309-322.
23. Ding, J., Cui, Z., & Lee, L. F. (2007). Marek's disease virus unique genes pp38 and pp24 are essential for transactivating the bi-directional promoters for the 1.8 kb mRNA transcripts. *Virus Genes*, 35(3), 643–50. doi:10.1007/s11262-007-0129-5
24. Doerfler, W. (2005). On the biological significance of DNA methylation. *Biochemistry (Mosc)* 70, 505-524.
25. Endoh, D., Ikegawa, S., Kon, Y., Hayashi, M. & Sato, F. (1995). Expression of the endogenous Marek's disease virus ICP4 homolog (MDV ICP4) gene is enhanced in latently infected cells by transient transfection with the recombinant MDV ICP4 gene. *Jpn J Vet Res* 43, 109-124.
26. Flower, K., Thomas, D., Heather, J., Ramasubramanian, S., Jones, S., & Sinclair, A. J. (2011). Epigenetic control of viral life-cycle by a DNA-methylation dependent transcription factor. *PloS One*, 6(10), e25922. doi:10.1371/journal.pone.0025922
27. Fragnet, L., Blasco, M. A., Klapper, W., & Rasschaert, D. (2003). The RNA Subunit of Telomerase Is Encoded by Marek ' s Disease Virus The RNA Subunit of Telomerase Is Encoded by Marek ' s Disease Virus, 77(10). doi:10.1128/JVI.77.10.5985
28. Fragnet, L., Kut, E., & Rasschaert, D. (2005). Comparative functional study of the viral telomerase RNA based on natural mutations. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25), 23502–23515. doi:10.1074/jbc.M501163200

29. Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., & Tyner, A. L. (2001). interacts with Sp1 Sp3, 21.
30. Gimeno, I. M., Witter, R. L., Hunt, H. D., Reddy, S. M., Lee, L. F. & Silva, R. F. (2005). The pp38 gene of Marek's disease virus (MDV) is necessary for cytolytic infection of B cells and maintenance of the transformed state but not for cytolytic infection of the feather follicle epithelium and horizontal spread of MDV. *J Virol* 79, 4545-4549.
31. Gray, K. S., Forrest, J. C., & Speck, S. H. (2010). The de novo methyltransferases DNMT3a and DNMT3b target the murine gammaherpesvirus immediate-early gene 50 promoter during establishment of latency. *Journal of Virology*, 84(10), 4946–59. doi:10.1128/JVI.00060-10
32. Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33 Suppl(march), 245–54. doi:10.1038/ng1089
33. Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1074–80. doi:10.1126/science.1063127
34. Jones, D., Lee, L., Liu, J. L., Kung, H. J. & Tillotson, J. K. (1992). Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4042-4046.
35. Kamil, J. P., Tischer, B. K., Trapp, S., Nair, V. K., Osterrieder, N. & Kung, H. J. (2005). vLIP, a viral lipase homologue, is a virulence factor of Marek's disease virus. *J Virol* 79, 6984-6996.
36. Katsumata, A., Iwata, A. & Ueda, S. (1998). Cis-acting elements in the lytic origin of DNA replication of Marek's disease virus type 1. *J Gen Virol* 79 (Pt 12), 3015-3018.
37. Key, G. B., Kanamori, B., & Ikuta, K. (1987). Methylation of Marek ' s Disease Virus DNA in Chicken T-lymphoblastoid Cell Lines, 23, 1485–1490.
38. Kishi, M., Bradley, G., Jessip, J., Tanaka, A. & Nonoyama, M. (1991). Inverted repeat regions of Marek's disease virus DNA possess a structure similar to that of the a sequence of herpes simplex virus DNA and contain host cell telomere sequences. *J Virol* 65, 2791-2797.
39. Kuo, L. J., & Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *InVivo(Athens,Greece)*,22(3), 305–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18610740>
40. L. Cardona, C. J. & Kung, H. J. (2005). Marek's disease virus Meq transforms chicken cells via the v-Jun transcriptional cascade: a converging transforming pathway for avian oncoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14831-14836.
41. Lacoste, N., & Côté, J. (2014). Le code épigénétique des histones, 19, 955–959.
42. Lee, S.I., Ohashi, K., Morimura, T., Sugimoto, C., & Onuma, M. (1999). Re-isolation of Marek's disease virus from T cell subsets of vaccinated and non-vaccinated chickens. *Arch Virol* 144, 45-54.
43. Levy, A. M., Gilad, O., Xia, L., Izumiya, Y., Choi, J., Tsalenko, A., Yakhini, Z., Witter: Characterization of the chromosomal binding sites and dimerization partners of the viral oncoprotein Meq in Marek's disease virus-transformed T cells. *J Virol* 77, 12841-12851.
44. Li, B., Huang, G., Zhang, X., Li, R., Wang, J., Dong, Z., & He, Z. (2013). Increased phosphorylation of histone H3 at serine 10 is involved in Epstein-Barr virus latent membrane protein-1-induced carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*, 13(1), 124. doi:10.1186/1471-2407-13-124
45. Liang, Y., Vogel, J. L., Narayanan, A., Peng, H., & Kristie, T. M. (2009). Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks alpha-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nature Medicine*, 15(11), 1312–7. doi:10.1038/nm.2051
46. Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., ... Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315–22. doi:10.1038/nature08514

47. Liu, J.L., Ye, Y., Qian, Z., Qian, Y., Templeton, D.J., Lee, L.F. & Kung, H.J. (1999). Functional interactions between herpesvirus oncoprotein MEQ and cell cycle regulator CDK2. *J Virol* 73, 4208-4219.
48. Lu, F., Stedman, W., Yousef, M., Renne, R., & Lieberman, P. M. (2010). Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency by virus-encoded microRNAs that target Rta and the cellular Rbl2-DNMT pathway. *Journal of Virology*, 84(6), 2697–706. doi:10.1128/JVI.01997-09
49. Lupiani, B., Lee, L. F. & Reddy, S. M. (2001). Protein-coding content of the sequence of Marek's disease virus serotype 1. *Curr Top Microbiol Immunol* 255, 159-190.
50. lymphoblastoid cells. *J Virol* 70, 1125-1131.
51. Maray, T., Malkinson, M., & Becker, Y. (1988). RNA transcripts of Marek's disease virus (MDV) serotype-1 in infected and transformed cells. *Virus Genes* 2, 49-68.
52. Marek, J. (1907). Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Dtsch Tierärztl meq genes are involved in the maintenance of transformation of MDCC-MSB1 MDV transformed*
53. Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(20), 5546–53. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0977
54. Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. doi:10.1038/npp.2012.112
55. Munshi, A., Shafi, G., Aliya, N., & Jyothy, A. (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 36(2), 75–88. doi:10.1016/S1673-8527(08)60094-6
56. Nair, V. (2005). Evolution of Marek's disease - a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet J* 170, 175-183. Ross, N., O'Sullivan, G., Rothwell, C., Smith, G., Burgess, S.C.,
57. Nair, V., & Kung, H.-J. (2004). *Marek's disease virus oncogenicity: molecular mechanisms*: London: Elsevier Academic Press.
58. Nazerian, K. & Witter, R. L. (1970). Cell-free transmission and in vivo replication of Marek's disease virus. *J. Virol.*, 5, 388-397.
59. Nazerian, K. (1973). Oncogenesis of Marek's disease. *Cancer Res*, 33, 1427-1430.
60. Osterrieder, N., Kamil, J. P., Schumacher, D., Tischer, B. K., & Trapp, S. (2006). Marek's disease virus: from miasma to model. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(4), 283–94. doi:10.1038/nrmicro1382
61. Parcells, M. S., Lin, S. F., Dienglewicz, R. L., Majerciak, V., Robinson, D. R., Chen, H. C., Wu, Z., Dubyak, G. R., Brunovskis, P., Hunt, H. D., Lee, L. F. & Kung, H. J. (2001). Marek's disease virus (MDV) encodes an interleukin-8 homolog (vIL-8): characterization of the vIL-8 protein and a vIL-8 deletion mutant MDV. *J Virol* 75, 5159-5173.
62. Paschos, Konstantinos, & Allday, M. J. (2010). Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. *Trends in microbiology*, 18(10), 439–47.
63. Pflum, M. K., Tong, J. K., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (2001). Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47733–41. doi:10.1074/jbc.M105590200
64. Poon, A. P. W., Gu, H., & Roizman, B. (2006). ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 9993–8. doi:10.1073/pnas.0604142103
65. Pratt, W. D., Cantello, J., Morgan, R. W. & Schat, K. A. (1994). Enhanced expression of the Marek's disease virus-specific phosphoproteins after stable transfection of MSB-1 cells with the Marek's disease virus homologue of ICP4. *Virology* 201, 132-136.

66. Qian, Z., Brunovskis, P., Lee, L., Vogt, P.K., & Kung, H.J. (1996). Novel DNA binding specificities of a putative herpes virus bZIP oncoprotein. *J Virol* 70, 7161-7170.
67. Qian, Z., Brunovskis, P., Rauscher, F., 3rd, Lee, L. & Kung, H. J. (1995). Transactivation activity of Meq, a Marek's disease herpesvirus bZIP protein persistently expressed in latently infected
68. Reddy, S. M., Lupiani, B., Gimeno, I. M., Silva, R. F., Lee, L. F. & Witter, R. L. (2002). Rescue of a pathogenic Marek's disease virus with overlapping cosmid DNAs: use of a pp38 mutant to validate the technology for the study of gene function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7054-7059.
69. Rennie, M., Lee, L.F., & Davison, T.F. (1997). Marek's disease virus EcoRI-Q gene (meq) and a small RNA antisense to ICP4 are abundantly expressed in CD4+ cells and cells carrying a novel lymphoid marker, AV37, in Marek's disease lymphomas. *J Gen Virol* 78 (Pt 9), 2191-2198.
70. Rispens, B. H., Van Vloten, H., Mastenbroek, N., Maas, H. J. & Schat, K. A. (1972a). Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Dis* 16, 108-125.
71. Roth, S. Y., Denu, J. M., & Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 81–120. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.81
72. Santos-rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C. T., ... Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3, 419(September), 407–411. doi:10.1038/nature01071. Published
73. Schat, K. A., Buckmaster, A. & Ross, L. J. (1989). Partial transcription map of Marek's disease herpesvirus in lytically infected cells and lymphoblastoid cell lines. *Int J Cancer* 44, 101-109.
74. Shkreli, M., Dambrine, G., Soubieux, D., Kut, E., & Rasschaert, D. (2007a). Involvement of the oncoprotein c-Myc in viral telomerase RNA gene regulation during Marek's disease virus-induced lymphomagenesis. *Journal of Virology*, 81(9), 4848–57. doi:10.1128/JVI.02530-06
75. Silver, S., Tanaka, A., & Nonoyama, M. (1979). Transcription of the Marek's disease virus genome in a nonproductive chicken lymphoblastoid cell line. *Virology* 93, 127-133.
76. Simonetta Friso and Sang-Woon Choi. (2002). Trans-HHS Workshop : Diet , DNA Methylation Processes and Health, 1, 2382–2387.
77. Simonetta Friso and Sang-Woon Choi. (2002). Trans-HHS Workshop : Diet , DNA Methylation Processes and Health, 1, 2382–2387.
78. Sugaya, K., Bradley, G., Nonoyama, M., & Tanaka, A. (1990). Latent transcripts of Marek's disease virus are clustered in the short and long repeat regions. *J Virol* 64, 5773- 5782.
79. Tarakanova, V. L., Leung-Pineda, V., Hwang, S., Yang, C.-W., Matatall, K., Basson, M., ... Virgin, H. W. (2007). Gamma-herpesvirus kinase actively initiates a DNA damage response by inducing phosphorylation of H2AX to foster viral replication. *Cell Host & Microbe*, 1(4), 275–86. doi:10.1016/j.chom.2007.05.008
80. Tate, P. H. & Bird, A. (1993). Effects of DNA methylation on DNA binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.*: 3, 226–231.
81. Trimarchi, J. M., & Lees, J. a. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(1), 11–20. doi:10.1038/nrm714
82. Witter, R. L., Lee, L. F. & Fadly, A. M. (1995). Characteristics of CVI988/Rispens and R2/23, two prototype vaccine strains of serotype 1 Marek's disease virus. *Avian Dis* 39, 269- 284. Barrow, A. D., Burgess, S. C., Baigent, S. J., Howes, K. & Nair, V. K. (2003). Infection of macrophages by a lymphotropic herpesvirus : a new tropism for Marek's disease virus. *J Gen Virol* 84, 2635-2645.
83. Xie, Q., Anderson, A. S. & Morgan, R. W. (1996). Marek's disease virus (MDV) ICP4, pp38, and
84. Zhang, Y., & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, 15(18), 2343–60. doi:10.1101/gad.927301

