

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences biologiques et Chimie du vivant
ÉQUIPE Biologie des Virus Aviaires

THÈSE présentée par : **Djihad BENCHERIT**

soutenue le : **04 Avril 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Science de la vie et de la santé

ETUDE DES DOMMAGES À L'ADN INDUITS PAR LE VIRUS DE LA MALADIE DE MAREK ET LEUR IMPLICATION DANS LA PATHOGENÈSE VIRALE

THÈSE dirigée par :

Mme DENESVRE Caroline
Mme TRAPP-FRAGNET Laëtitia

Directrice de Recherche, HDR, INRA, Tours
Chargée de Recherche, Docteur, INRA, Tour

RAPPORTEURS :

Mr DERIANO Ludovic
Mme MANET Evelyne

Chargé de Recherche, HDR, Institut Pasteur, Paris
Directrice de Recherche, HDR, CNRS, Lyon

JURY :

Mme DENESVRE Caroline
Mr DERIANO Ludovic
Mme MANET Evelyne
Mr MEURENS François
Mr TOUZÉ Antoine
Mme TRAPP-FRAGNET Laëtitia

Directrice de Recherche, HDR, INRA, Tours
Chargé de Recherche, HDR, Institut Pasteur, Paris
Directrice de Recherche, HDR, CNRS, Lyon
Professeur en Microbiologie, HDR, ONIRIS, Nantes
Professeur d'Université, Université François Rabelais, Tours
Chargée de Recherche, Docteur, INRA, Tours

À la mémoire de mon Papi,

Remerciements

Après trois années passées dans le monde fascinant des comètes où j'ai touché "officiellement " au moins 388800 comètes, je sais que ça paraît complètement irrationnel pourtant c'est vrai !!!! Me voilà revenue sur terre avec dans mes bagages ce manuscrit.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail, Mr Ludovic Deriano et Mme Evelyne Manet, mes rapporteurs, Mr François Meurens, mon examinateur. Je tiens également à remercier Mr Antoine Touzé pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse et pour ses précieux conseils lors de mon comité de thèse.

Aussi, je voudrai remercier la Région Centre, l'INRA de Tours ainsi que la Ligue contre le cancer pour le financement de mon projet de thèse.

Je voudrais exprimer ma gratitude également aux directrices de l'unité Infectiologie et Santé publique ; Mme Dominique Buzoni-Gatel et Mme Nathalie Winter, pour m'avoir accueillies dans l'unité 213 ainsi que pour leur aide et sympathie quotidienne.

J'ai vécu cette aventure parmi les membres d'un équipage des plus agréables.

Mes premiers remerciements vont à ma responsable de thèse Laëticia Trapp-Fragnet. Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude. L'idée de voler de ses propres ailes est un peu effrayante, mais j'ai l'impression d'avoir grandi, d'avoir acquis une certaine confiance et maturité scientifique grâce à toi. D'un point de vue relationnel, "tu es une grande sœur géniale", tu étais toujours à mon écoute et ce que j'ai aimé par-dessus tout est ta rigueur scientifique, ta confiance et ton optimisme à toute épreuve. Un grand MERCI pour l'autonomie que tu m'as laissée tout en étant présente chaque fois que j'en ai eu besoin, que ce soit pour me transmettre une idée importante au moment où j'en manquais ou bien pour me rassurer lorsque les résultats n'étaient pas au rendez-vous. J'ai énormément appris à tes côtés. Sincèrement, MERCI pour toute cette énergie, ces idées, ces intuitions et également pour toutes les corrections de mon français qui parfois s'avère « exotique ». Je souhaite à tous les thésards d'avoir le même encadrement et la même interaction dont j'ai bénéficiés et qui ont rendu ces années de travail formidables à vivre.

Je voudrais également remercier grandement ma directrice de thèse, Caroline Denesvre, de m'avoir accueillie dans l'équipe BioVA, et pour toute son aide, son soutien, sa

sympathie et ses conseils scientifiques. Je te remercie aussi d'avoir été toujours disponible malgré tes responsabilités de chef d'équipe et de m'avoir accordé la liberté et la confiance dans la conduite de ce projet.

Ce voyage dans les comètes a été une expérience intense, passionnante et marquante. Je tiens à remercier les membres de mon équipe grâce à qui cette « grande aventure » a été des plus agréables à vivre. L'INRA, et plus particulièrement l'ISP 213, est un endroit où je ne me suis jamais sentie étrangère, j'étais toujours épaulée et je savais que je pouvais faire confiance à tout le monde.

J'exprime ma gratitude à Jean-François VAUTHEROT pour ses conseils scientifiques, son aide, sa gentillesse, sa sympathie quotidienne et son oreille attentive malgré son planning chargé. Cependant, je suis toujours en attente d'un anti Meq fluorescent mauve ! Je ne t'oublierai jamais Monsieur VAUTHEROT ni le Zeiss d'ailleurs....

Un MERCI très sincère à Sylvie Remy, "Mme Remy", pour son dévouement et son aide plus que précieuse. Tu as fait tellement de choses durant cette thèse... Ta gentillesse, ton calme, ta rigueur et ta motivation m'ont été plus que nécessaire. Sans toi cette thèse n'aurait certainement pas été aussi riche. Je n'oublierai jamais nos fous rires et la lampe inactinique... Un très grand MERCI pour la relecture de ma thèse, tes corrections et tes suggestions toujours très pertinentes. JE TE SERAI TOUJOURS RECONNAISSANTE "Mme Remy" et je tiens à te dire que l'offre d'embauche est toujours maintenue et promis, je vais vraiment négocier la villa avec les palmiers... Pour la piscine, on verra, ce n'est pas gagné...

Un grand MERCI à Katia Guyader pour sa gentillesse, son soutien, sa générosité, son aide et sa bonne humeur. Tu as toujours été là pour moi, tu m'as fait connaître ta famille, tes enfants et même tes parents, MERCI BEAUCOUP Katia. Nos cafés le matin étaient un moment de ZENITUDE... MERCI ! Je n'oublierai jamais les rigolades et les expressions françaises que tu m'as apprise, sans oublier les CESC's et la relecture de ce mémoire.

Je tiens à dire MERCI également à Mathilde Couteaudier, "Mathilda" pour sa gentillesse et ses conseils. Pendant ces années de thèse on a partagé beaucoup de choses et on a beaucoup échangé sur nos 2 projets. MERCI pour tout Mathilda. Je te souhaite bon courage dans ta vie aussi bien sur le plan professionnel que personnel. MERCI pour toutes les expressions françaises que tu m'as apprises.

Je remercie également David Padeloup pour sa lecture de l'article, sa sympathie et sa gentillesse. Je te souhaite beaucoup de succès dans l'équipe et dans ton projet MDV. Aussi, BON COURAGE pour les Western Blot avec les protéines du poulet.

Un grand MERCI à Camille Berthault pour les moments passés ensemble. MERCI beaucoup pour la cantine, je ne pourrai jamais oublier la grimace de l'agent de caisse de la SODEXO en lui disant tous les midis je m'appelle "Camille Berthault". Bon courage pour le reste Madame.

MERCI à Yves Le Vern, « Dr cytométrie », pour toutes les fois où on t'a demandé un créneau de tri cellulaire de toute urgence et aussi pour ta participation précieuse à cette thèse, MERCI.

Un grand MERCI également aux animaliers pour leur bonne humeur quotidienne ainsi que le travail énorme effectué lors des 2 expériences *in vivo*.

Je pense aux membres de l'équipe PIA: Un grand MERCI à Sascha pour sa générosité, son AIDE PRÉCIEUSE pour l'article et pour les discussions scientifiques. Un autre grand MERCI aux membres de son équipe : Pascale, Manu, Evelyne, Hélène, Adrien, Gaëlle et Denis pour leur aide et leur sympathie quotidienne ainsi qu'à Daniel pour son aide « Statistique ».

Mention spéciale également aux membres de l'équipe PCA: Kathy, Anne Christine, Nathalie, Angelina, Nathalie, Annie, Rodrigo, pour leur confiance et les deux bonnes années de Master.

Un MERCI tout particulier aux femmes de la laverie ; Brigitte et Laetitia ainsi qu'à Lydie. Vous faites un travail énorme souvent discret mais pourtant indispensable.

Enfin, je souhaite BON COURAGE à tous les thésards ; Gennaro, Adrien, Kévin, Mamadou, Laurent et Geoffrey.

Je voulais également vous faire part d'un résultat très prometteur que j'ai obtenu pendant cette thèse et qui fera, sans doute, le sujet de ma prochaine publication... En commençant la rédaction de mon manuscrit, j'ai décidé de collectionner les boîtes de café que j'ai consommées. En sachant que dans une boîte il y a 25 dosettes et que chaque dosette était diluée dans 50 ml d'eau, j'ai donc bu 12,5 L de café pendant 6 mois, ce qui représente environ

75 L de café pendant ma thèse. Je n'ose imaginer la concentration de caféine que mes cellules ont absorbée... Je suis certaine d'avoir largement dépassé la concentration charnière permettant à la caféine d'exercer sa fonction de drogue inhibitrice des voies de réponse aux dommages à l'ADN... Comme on dit, "Ce sont toujours les cordonniers les plus mal chaussés" ou en arabe "Ce sont toujours les portes des maisons de menuisiers qui sont les plus mal montées" ou "Ce sont toujours les bouchers qui dinent avec des navets". Ceci dit "Il ne faut pas mettre la charrue avant les bœufs" ni "se mettre la rate au court bouillon" puisque ces concentrations ont été absorbées sur une durée de 3 ans et demi. Cependant il faut que "je fasse des pieds et des mains" pour diminuer ma consommation de café.

La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien moral et affectif de mes parents Abdel Kader et Zohra. Je ne pourrais jamais assez-vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi, ces années de sacrifices pour que je puisse faire mes études en France. Je vous remercie de m'avoir donné un environnement familial et matériel idéal et de m'avoir enseigné les valeurs essentielles (la foi, l'humilité, l'honnêteté et la passion) qui m'ont été indispensables durant ces années d'immigration. MERCI Mama et Papa d'avoir su me comprendre et me soutenir dans les moments les plus difficiles et de m'avoir toujours fait confiance. Sachez que je vous suis et que je vous serai toujours très reconnaissante. J'espère être à la hauteur de vos attentes et de ne jamais vous décevoir. Vous êtes des parents géniaux.

MERCI aussi à mes sœurs Imane et Nadjah ainsi qu'à mes frères Amine et Rafik "IKO, mon gros bébé". Je vous aime plus que tout. Même si vous êtes tous grands maintenant, je vous verrais toujours comme mes bébés. Je vous souhaite beaucoup de réussite et que chacun de vous puisse évoluer dans sa discipline, je serai toujours à vos côtés. Six ans passés loin de vous furent difficiles à supporter mais maintenant me voilà de retour. A' nous la vie.

MERCI également à ma grand-mère « OUMA » qui m'a toujours soutenue et chouchoutée. Tu es une « Mamie Gâteaux ». J'espère être « la petite fille » dont tu as toujours rêvé et de ne jamais te décevoir. Je t'adore.

MERCI à tous mes cousins et cousines pour vos petits mots gentils. Votre soutien me fut indispensable. Je vous aime.

Aussi je voudrais dire MERCI à Mama Nana, Titoum, Tati, Ali, Benahmed, Samira et à tous les membres de ma famille aussi bien maternelle "Benzerga" que paternelle "Bencherit". Chez nous, la réussite n'est possible que grâce au soutien de la famille. MERCI.

Merci à mes indispensables amies, Amina (championne mondiale dans le saut du coq à l'âne), Sara (Mme la scientifique), Soumia (je pense juste à Grandmont et Messouda !!!!), Gulistan (la gentille), Fatiha, Souad, Sourya et Hadile, qui ont su être là aux bons moments en me prêtant une oreille toujours attentive, en étant patientes même si parfois mes préoccupations étaient très loin des leurs. Votre amitié m'est très précieuse et je tiens à vous dire ma sincère et profonde amitié.

Pour finir, mes plus grands remerciements vont à Mohamed, mon mari. Ta tendresse m'a toujours portée et ta gentillesse m'a toujours conquise. MERCI pour ces deux années de patience. MERCI de m'avoir supportée, encouragée et soutenue, tu m'as permis de me lever motivée, le cœur léger et l'esprit tranquille. Pour tout cela et pour ces années passionnantes, du fond du cœur : MERCI ! Je te souhaite beaucoup de succès dans ta carrière scientifique parce que tu le mérites et je te promets à mon tour tout mon soutien.

Résumé

Le virus de la maladie de Marek (MDV) est un alphaherpesvirus à l'origine du développement de lymphomes chez les volailles. A ce jour, l'origine du développement des tumeurs induites par le MDV est encore peu connue malgré l'identification de plusieurs oncoprotéines virales. Au vu de l'implication des dommages à l'ADN dans la pathogenèse de plusieurs virus notamment les herpesvirus, mon projet de thèse avait pour objectif de déterminer l'impact de l'apparition de lésions d'ADN sur le cycle viral du MDV. Nous avons montré que l'infection cytolytique de MDV s'accompagne d'une accumulation de lésions dans l'ADN cellulaire de lymphocytes et cellules fibroblastiques de poulet. La phase de latente de l'infection MDV n'affecte pas l'intégrité de l'ADN des lymphocytes alors que la réactivation du virus conduit à l'apparition de lésions d'ADN. De plus, en utilisant une approche originale *in vivo*, nous avons confirmé le rôle essentiel de la protéine virale VP22 dans l'induction de ces dommages. Nous avons pu établir que l'induction des dommages à l'ADN au cours de l'infection et/ou la réponse cellulaire engendrée sont non seulement favorables à la réplication du virus mais également que l'apparition de ces lésions est étroitement liée au pouvoir oncogène du MDV.

Mots-clés : MDV ; Herpesvirus ; oncoprotéine; dommages à l'ADN ; instabilité génomique ; latence ; réplication virale ; tumorigenèse.

Abstract

Marek's disease virus (MDV) is an alphaherpesvirus responsible of T lymphoma in chickens. Mechanisms leading to cellular transformation mediated by MDV are still incompletely understood. DNA damage and the associated cellular response participate actively in the life cycle of viruses, especially herpesviruses. Here, we aimed at deciphering the role of DNA damages in MDV pathogenesis. We show that MDV lytic infection leads to DNA lesions in lymphocytes and fibroblasts of chickens. Moreover, we demonstrated that MDV latently-infected lymphocytes exhibits undamaged DNA whereas MDV reactivation leads to an onset of DNA lesions. Also, using an original *in vivo* approach, we objectified the role of VP22 on DNA damages induction. Finally, we established that DNA damage and/or the associated DNA damage response are not only benefic to MDV replication but also that the DNA lesions onset might participate to MDV oncogenicity.

Key words : MDV, Herpesvirus ; oncoprotein; DNA damage; genomic instability; latency ; viral replication, tumorigenesis.

Table des matières

Remerciements	1
Abstract	7
Table des matières.....	8
Liste des tableaux.....	14
Liste des figures	15
Liste des annexes.....	18
Introduction	23
CHAPITRE 1	
Dommages à l’ADN et signalisation	24
1.1 Les différents types de lésions d’ADN	26
1.1.1 Les cassures d’ADN.....	26
1.1.1.1 Les cassures doubles brins (CDBs).....	26
1.1.1.2 Les cassures simple brins de l’ADN (CSBs)	27
1.1.2 Les modifications de la structure d’ADN	27
1.1.2.1 Adduits à l’ADN	27
1.1.2.2 Dimères de pyrimidine	28
1.1.2.3 Désamination.....	28
1.1.2.4 Dépurinations et dépyrimidations par hydrolyse de base.....	29
1.1.2.5 Instabilité des microsatellites (MSI)	30
1.2 La réponse aux dommages à l’ADN (DDR).....	31
1.2.1 Réponses aux dommages double brin (CDBs).....	32
1.2.1.1 La voie ATM.....	32
1.2.1.2 La voie DNA-PK.....	35
1.2.2 Réponse aux dommages simples brins et aux problèmes de fourches de réplifications : la voie ATR	37
1.3 Les voies de réparation des dommages à l’ADN	40
1.3.1 Réparation des dommages double brin de l’ADN	40
1.3.1.1 La ligature des extrémités non homologues (NHEJ)	40
1.3.1.2 La recombinaison homologue (HR).....	43
1.3.2 Réparation des dommages simple brin de l’ADN.....	44
1.3.2.1 La réparation par excision de bases (BER)	44
1.3.2.2 Réparation par excision de nucléotide (NER).....	45
1.3.2.3 La réparation des mésappariements (MMR).....	47

CHAPITRE 2	Micro-organismes et dommages à l'ADN.....	50
2.1	Infections bactériennes et dommages à l'ADN.....	51
2.2	Infections parasitaires et dommages à l'ADN.....	53
2.3	Infections virales et dommages à l'ADN	54
CHAPITRE 3	Herpesvirus et dommages à l'ADN.....	56
3.1	La famille des <i>herpesviridae</i>	57
3.1.1	Généralités.....	57
3.1.2	La classification des herpesvirus.....	58
3.1.3	Cycle viral des herpesvirus	59
3.1.3.1	Entrée	59
3.1.3.2	Transport vers le noyau	61
3.1.3.3	Maintien nucléaire du génome viral.....	61
3.1.3.4	Réplication virale	61
3.1.3.4.1	Phase très précoce.....	62
3.1.3.4.2	Phase précoce	64
3.1.3.4.3	Phase tardive et sortie des capsides virales du noyau.....	66
3.1.3.5	Latence virale	68
3.1.3.6	Tumorigenèse	70
3.2	Infection par les herpesvirus, dommages à l'ADN et DDR.....	71
3.2.1	Mécanismes d'activation de la DDR par les herpesvirus.....	71
3.2.1.1	Induction de dommages dans l'ADN des cellules hôtes.....	72
3.2.1.2	Détection des génomes viraux.....	75
3.2.1.3	La réplication virale	76
3.2.1.4	Induction du stress oxydatif	78
3.2.1.5	Action des protéines virales	79
3.2.2	Les mécanismes d'inhibition de la DDR par les herpesvirus.....	81
3.2.2.1	Régulation et dégradation des protéines de la DDR	81
3.2.2.2	Relocalisation des protéines de la DDR.....	82
3.2.3	DDR et cycle viral des herpesvirus	84
3.2.3.1	Implication de la DDR dans le cycle viral d'HCMV	87
3.2.3.2	Implication de la DDR dans le cycle viral d'EBV	89
CHAPITRE 4	Le virus de la Maladie de Marek (MDV)	94
4.1	Historique	95

4.2	La maladie de Marek.....	95
4.2.1	Formes cliniques de la maladie	95
4.2.2	Transmission de la maladie	96
4.2.3	La vaccination	96
4.2.4	Physiopathologie	98
4.2.4.1	La phase cytolytique primaire	98
4.2.4.2	La phase de latence	100
4.2.4.3	L'infection cytolytique tardive.....	101
4.2.4.4	La lymphomagenèse viro-induite.....	101
4.3	Le virus de la maladie de Marek	102
4.3.1	La classification du virus de la maladie de Marek	102
4.3.2	Structure du virus de la maladie de Marek.....	103
4.3.3	Facteurs de virulences impliqués dans la lymphomagenèse	105
4.3.3.1	Facteurs de virulence directement impliqués dans la tumorigenèse	106
4.3.3.1.1	L'oncogène Meq.....	106
4.3.3.1.2	L'oncogène viral <i>vTR</i>	108
4.3.3.1.3	Les miRs	109
4.3.3.2	Facteurs de virulence potentiellement impliqués dans la tumorigenèse	111
4.3.3.2.1	Les LATs (latency associated transcripts).....	111
4.3.3.2.2	La famille des transcrits BamHI-H.....	112
4.3.3.2.3	Le gène <i>pp38</i>	113
4.3.3.2.4	Le gène <i>RLORF4</i>	113
4.3.3.2.5	La protéine <i>vIL-8</i>	113
4.3.3.2.6	Le gène <i>v-LIP</i>	114
4.3.3.2.7	La protéine VP22.....	115
	Objectifs du projet de thèse	117
	Résultats	119
1.	Etude des dommages à l'ADN au cours du cycle viral de MDV	120
1.1	Induction de dommages à l'ADN dans les PBMCs durant l'infection MDV	121
1.2	La réplication du MDV est concomitante avec l'apparition de CDBs dans le génome cellulaire.....	124
1.3	Les CDBs facilitent la réplication de MDV dans les CESC.....	127
1.4	La réactivation du MDV est associée à une augmentation des dommages à l'ADN...	129

1.5	Les DSBs facilitent la réplication du MDV dans les lymphocytes T.....	131
2.	Rôle de la protéine virale VP22 dans l'induction des dommages à l'ADN et dans la pathogenèse de MDV	134
2.1	Rôle de VP22 dans l'induction des dommages à l'ADN lors de l'infection cytotytique de MDV.....	135
2.2	Rôle de VP22 et des dommages à l'ADN dans le cycle viral du MDV.....	137
2.3	Impact de l'infection MDV sur les populations lymphocytaires circulantes	140
3.	Caractérisation des voies de DDR déclenchées par l'infection MDV et de leur implication dans la pathogenèse virale.....	144
3.1	Effet de l'infection cytotytique du MDV sur les voies de DDR.....	145
3.2	Rôle de la DDR dans la réplication du MDV	149
3.3	Implication de la DDR dans la réactivation virale	153
	Discussion	157
	Conclusion et perspectives	169
	Matériel et Méthodes.....	172
1.	Matériel	173
1.1.	Les cellules.....	173
1.1.1.	Lignée MDCC-3867(K)	173
1.1.2.	Cellules embryonnaires de peau de poulet (CESC)	173
1.2.	Les virus	175
1.2.1.	vRB-1B.....	175
1.2.2.	recEGFPVP22	175
1.2.3.	vRB-1B EGFP22 et vRB-1B 22EGFP	175
1.3.	Les amorces utilisées.....	176
1.4.	Les sondes utilisées	176
1.5.	Les anticorps	177
1.5.1.	Les anticorps primaires	177
1.5.2.	Les anticorps secondaires.....	177
1.6.	Les agents pharmacologiques.....	178
2.	Méthodes	179
2.1	Techniques de biologie moléculaire.....	179
2.1.1.	Extraction d'ADN	179

2.1.2.	Quantification de la charge virale par PCR quantitative en temps réel (Taqman)	179
2.1.3.	Extraction d'ARN	181
2.1.4.	Transcription inverse	181
2.1.5.	Quantification de l'expression de <i>ICP4</i> par qRT-PCR en temps réel	181
2.2.	Techniques de biochimie	183
2.2.1.	Détection des ROS	183
2.2.2.	Le Western blot	184
2.2.2.1.	Préparation des extraits protéiques	184
2.2.2.2.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS en condition dénaturante	184
2.2.2.3.	Transfert semi-liquide sur membrane de nitrocellulose	185
2.2.2.4.	Détection des protéines d'intérêt	185
2.3	Techniques de biologie cellulaire et d'imagerie	185
2.3.1.	Infection des CESC	185
2.3.2.	Induction de CDBs par traitement Etoposide	185
2.3.3.	Inhibition des voies de DDR	186
2.3.4.	Mesure de la taille des plages d'infection	187
2.3.5.	Cytométrie en flux	187
2.3.5.1.	Tri cellulaire	187
2.3.5.2.	Analyse de l'expression de l'EGFP et de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux	188
2.3.6.	Détection des protéines impliquées dans la DDR par immunofluorescence	188
2.4.	Expérimentations animales	189
2.4.1.	Protocole	189
2.4.2.	Isolement de PBMCs	191
2.4.3.	Numération sanguine	191
2.5.	Le test des comètes	191
2.5.1	Principe	191
2.5.2	Technique	192
2.5.2.1	Préparation des lames	192
2.5.2.2	Inclusion des cellules en agarose	193
2.5.2.3	Etape de lyse	193
2.5.2.4	Electrophorèse	193

2.5.2.5	Neutalisation.....	193
2.5.2.6	Fixation.....	194
2.5.2.7	Coloration.....	194
2.5.2.8	Visualisation et analyse des comètes	194
Références bibliographiques		196
Annexes		221

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des virus du genre <i>Mardivirus</i>	103
Tableau 2. Comparaison entre les résultats bruts de la numération sanguine des poulets non-infectés par rapport à ceux des poulets infectés par les virus RB-1B, RB-1B Nterm et RB-1B Cterm.....	141
Tableau 3 : Inhibiteurs des voies de DDR.	150
Tableau 4 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'inhibition des voies de DDR sur la réplication de MDV dans le modèle CESC.....	152
Tableau 5 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'inhibition des voies de DDR sur la réplication de MDV dans le modèle 3867(K).	156
Tableau 6 : Séquences d'oligonucléotides utilisés en qPCR ou qRT-PCR.	176
Tableau 7 : Sondes utilisées en qPCR.....	176
Tableau 8 : Anticorps primaires ciblant les protéines de DDR utilisés en WB ou en IF.....	177
Tableau 9 : Anticorps secondaires utilisés en WB ou en IF	177
Tableau 10 : agents pharmalogiques inhibitrices des voies de DDR.	178
Tableau 11 : Composition chimique des gels de polyacrylamide SDS-PAGE.....	184
Tableau 12 : Concentrations utilisées lors des traitements des cellules par les inhibiteurs des voies de DDRs.....	186

Liste des figures

Figure 1. Exemples des différents types de dommages à l'ADN.....	25
Figure 2. Les différents types de désamination.....	28
Figure 3. Conséquence de la désamination de la cytosine	29
Figure 4. Conséquence de la dépurination de la Guanine.....	29
Figure 5. Schéma d'illustration du modèle « replication slippage »	30
Figure 6. Organisation générale d'une DDR.....	31
Figure 7. Schéma de la voie ATM	33
Figure 8. Contrôle du cycle cellulaire par la protéine ATM	34
Figure 9. Schéma de la voie DNA-PK.....	35
Figure 10. Schéma d'activation de la voie ATR	38
Figure 11. Représentation de la voie c-NHEJ.....	41
Figure 12. Représentation du système alt-NHEJ.....	42
Figure 13. La réparation des dommages double brin de l'ADN par recombinaison homologue.....	43
Figure 14. Représentation de la réparation de l'ADN par excision de base (BER)	45
Figure 15. La réparation par excision de nucléotides (NER).....	46
Figure 16. Schéma représentatif de la réparation des mésappariements (MMR)	48
Figure 17. Schéma représentatif des interactions entre les micro-organismes et la machinerie de maintien de la stabilité génomique	51
Figure 18. implication des infections bactériennes dans l'induction de l'instabilité génomique	52
Figure 19. Schéma représentatif des interactions entre les apicomplexes et la machinerie de maintien de la stabilité génomique.....	54
Figure 20. Schéma représentatif des interactions entre les virus et la DDR	55
Figure 21. Représentation schématique d'une particule d'herpesvirus.....	57
Figure 22. La famille des Herpesviridae	58
Figure 23. Schéma du cycle de répllication des herpesvirus.....	60
Figure 24. Activation de l'expression des gènes viraux lors de la répllication de HSV-1.....	62
Figure 26. Schéma représentatif des voies de sortie des capsides herpesvirales des noyaux de leurs cellules hôtes	67

Figure 27. Schéma représentatif des facteurs de virulences exprimés au cours de la latence d'EBV.....	69
Figure 28. Représentation des différentes structures de l'ADN viral pouvant déclencher la machinerie de DDR.....	75
Figure 29. Régulation de la transition G1/S par le couple protéique pRb/E2F.....	77
Figure 30. Schéma représentatif des différentes interactions entre le virus HSV-1 et les voies de DDR.....	86
Figure 31. Schéma récapitulatif de l'interaction du virus HCMV et la machinerie de DDR lors des différentes phases de son cycle viral.....	88
Figure 32. Schéma représentant l'implication de la machine de DDR dans la réplication et la latence d'EBV	91
Figure 33. Schéma représentant l'implication de la machinerie de DDR dans l'oncogenèse d'EBV.....	92
Figure 34. Evolution de la virulence des souches de MDV en fonction de la pression de sélection exercée par la vaccination	97
Figure 35. Chronologie de la pathogenèse de la maladie de Marek induite par une souche... virulente du MDV	99
Figure 36. Représentation schématique d'une particule d'herpesvirus (A gauche). Un virion intracellulaire MDV observé par microscopie électronique (A droite).....	103
Figure 37. Représentation schématique de l'organisation du génome de MDV.....	104
Figure 38. Comparaison de l'organisation génomique du virus MDV (GaHV-2) avec celle du VZV.....	105
Figure 39. Schéma représentatif du rôle de Meq et de vTR dans la transformation cellulaire MDV induite	107
Figure 40. Schéma représentatif des clusters de miRs codés par MDV.....	109
Figure 41. Représentation schématique des différents facteurs de virulence de MDV impliqués dans la tumorigenèse.	111
Figure 42. Cinétique d'apparition des dommages à l'ADN dans les PBMC de poulet infectés par le MDV.....	122
Figure 43. Etude des dommages à l'ADN lors de l'infection cytotytique de cellules fibroblastiques embryonnaires de poulet par le MDV	125
Figure 44. Effet de l'induction de CDBs sur la réplication du MDV	127

Figure 45. Etude des dommages à l'ADN lors de la phase de latence et de la réactivation virale dans une lignée de lymphocytes T transformés par le MDV	130
Figure 46. Effet de l'induction des CDBs sur la réactivation virale :	132
Figure 47. Rôle de la VP22 dans l'induction des dommages à l'ADN lors de l'infection cytotytique MDV.....	136
Figure 48. Rôle de la protéine VP22 dans l'induction des dommages à l'ADN et dans la pathogenèse du MDV.....	138
Figure 52. Impact de l'inhibition sélective des voies de DDR sur la réplication du MDV dans les CESC	151
Figure 54. Effet dose de l'inhibiteur de Chk1 sur la réactivation du MDV	155
Figure 55. Modèle de tumorigenèse de MDV selon la théorie du "hit and rest mechanism" proposé par Avanzi.....	168
Figure 56. Préparation des cellules embryonnaires de peau de poulet (CESC).....	174
Figure 57. Principe de la technologie TaqMan.	180
Figure 58. Principe de la technologie SYBR Green.....	182
Figure 59. Principe du test ROS-GLO™.	184
Figure 60. Schéma expérimental de l'expérience <i>in vivo</i> n1.....	190
Figure 61. Schéma expérimental de l'expérience <i>in vivo</i> n2.....	190
Figure 62. Principe du test des comètes.	192
Figure 63. Explication de certains paramètres de mesure des comètes.....	195

Liste des annexes

Annexe 1 Article soumis à Scientific Reports et accepté sous réserve de modification.....	222
Annexe 2 Article publié dans PLOS ONE.	260

Liste des abréviations

6-4 PPs : (6-4) pyrimidone	BGLF5 : EBV incoded DNase
ADN : Acide Désoxyribo Nucléique	BHRF1 : BamHI fragment H rightward
ADNc : Acide Désoxyribo Nucléique complémentaire	open reading frame 1
ADNsb : ADN simple brin	BoHV-1 : <i>Bovine herpesvirus</i> type 1
AKT : protéine kinase B	BRCA1 : Breast Cancer 1
aMDV : Marek's Disease Virus avirulent	bZIP : domaine Leucine Zipper
AP : site abasique ; A-purique, A-pyrimidique	CDBs : Cassures doubles brin de l'ADN
ARN : Acide RiboNucléique	Cdc : Cell Division Control
ARN Pol II : ARN polymérase II	Cdk : Cyclin-Dependent Kinase
ARNm : ARN messenger	CDT : cytolethal distending toxin
ATM : <i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>	CEFs : Fibroblastes d'embryons de poulet
ATR : <i>Ataxia-telangiectasia mutated and Rad3 related</i>	CESC : Chicken Embryonic Skin Cells (cellules primaires de peau de poulet)
ATRIP : ATR Interacting Protein	Chk1 et Chk2 : Checkpoint Kinases 1 et 2
ATRIP : ATR-interacting protein	chTERT : chicken Telomerase Reverse Transcriptase
ATRX : chromatin remodeler	chTR : Chicken Telomerase RNA
B10 : Boîte de culture cellulaire de 10 cm de diamètre	CMV : Cytomegalovirus
BAC : Chromosome Bactérien Artificiel	CoHV-1 : Colombid herpesvirus 1
BART : BamHI A rightward transcripts	CPD : dimères cyclobutaniques de pyrimidines
BER : base excision repair	Cpt : Camptothecine
	CSBs : Cassures simple brin de l'ADN

Daxx : Death-associated protein 6	HVT : Herpesvirus of Turkey (ou MeHV-1)
DDR : DNA Damage Response	ICP : Infected Cell Polypeptide
DNA-PK : <i>DNA dependant protein kinase</i>	ICTV : International Committee on
DNase : deoxyribonuclease	Taxonomy of viruses
E2F : Famille des facteurs de transcription	IE : gènes très précoces
EBER : Epstein–Barr virus-encoded small RNAs	iNOS : Inducible Nitric Oxyde Synthase
EBNA : Epstein–Barr nuclear antigen 1	IR : Séquence répétée interne
EBV : Epstein-Barr virus	IRL : Séquence répétée interne longue
eGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein	IRS : Séquence répétée interne courte
ETP : Etoposide	KSHV : Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus
FFE : Feather Follicle Epithelium	LATs : Latency Associated Transcripts
GaHV-2 : <i>Gallid herpesvirus 2</i>	LCL : lymphoblastoid cell lines
GaHV-3 : <i>Gallid herpesvirus 3</i>	LMP : Latent membrane protein
gB : Glycoprotéine B	MD : Marek's Disease (maladie de Marek)
gD : Glycoprotéine D	MDA : Malondialdehyde
H ₂ O ₂ : le peroxyde	MDV : Marek's Disease Virus
HHV : Human herpes virus	Meq : MDV EcoRI-Q protein
HMBA : N-N'-Hexamethylene Bisacétamide	MHV-68 : Murid herpesvirus 68
hpi : heure post infection	miRs : micro ARN
HR : Homologous Recombinaison	MMLV-RT : Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
HSV-1 : <i>Herpes Simplex virus type 1</i>	MMR : Mismatch Repair
	Mre11 : Meiotic Recombination 11

MRN : MRE11, Rad50 et Nbs1	RSK : Ribosomal S6 kinase
MSI : Instabilité de microsatellites	RT-PCR : Reverse Transcription-
Nbs1 : Nijmegen Breakage Syndrom 1	Polymerase Chain Reaction
ND10 : Nuclear Dots	SCGE : Single Cell Gel Electrophoresis
NER : Nucleotide excision repair	assay
NHEJ : Non Homologous End Joining	Ser : Sérine
NOx : Nitric Oxyde	siRNA : small interfering RNA
NOX2 : NADPH oxydase 2	SP : Sérum de poulet
O ₂ ⁻ : Superoxyde	SP100 : Nuclear Antigen
ORF : Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)	SVF : Serum de Veau Fœtal
PBS : Phosphate Buffer Saline	TA : Température ambiante
PCO : Protein Carbonyl	TAFs : TBP-associated factors
PCR : Polymerase Chain Reaction	TBP : TATA Binding Protein
PFA : Paraformaldéhyde	TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase	TFIID : Transcription factor II D
PIM1 : <i>pim-1</i> oncogene	TFIIH : Transcription factor II H
PKS : polyketide synthase	Thr : Thréonine
PML : Promyelocytic leukemia protein	Topo I : Topoisomérase I
pp : Phospho protéine	Topo II : Topoisomérase II
qPCR : PCR quantitative	TPA : tetradecanoyl phorbol acetate
Rad50 : R adiation sensitive 50	TR : Séquences Répétées Terminales
Rb : retinoblastoma protein	TR : Telomerase RNA (sous-unité ARN de la télomérase)
ROS : Réactifs oxygénés	TRL : Séquences Répétées Terminales Longues
RPA : Replication protein A	

TRS : Séquences Répétées Terminales

Courtes

UL : Séquence Unique Longue

US : Séquence Unique courte

UV : ultra-violet

V(D)J : Recombinaison des segments

VICE : Virus Induced Chaperone-Enriched

vIL8 : Viral interleukine 8

vMDV : Marek's Disease Virus virulent

VP22 : Virion Protein 22

vTR : viral Telomerase RNA

vv+MDV : Marek's Disease Virus

hypervirulent

vvMDV : Marek's Disease Virus très

virulent

WRN : Werner Syndrome

XLf : XRCC4-like factor

XRCC4 : X-ray repair cross

complementing group I

Introduction

CHAPITRE 1

Dommages à l'ADN et signalisation

L'ADN constitue le support universel de l'information génétique chez les êtres vivants. De ce fait, l'intégrité des séquences d'ADN doit être fidèlement préservée, notamment lors de mécanismes cellulaires utilisant l'ADN comme substrat, tel que la réplication du génome et ou lors de la réparation de lésions induites par des génotoxiques environnementaux physiques ou chimiques (Figure 1). On estime que l'ADN d'une cellule de mammifère métaboliquement active peut subir jusqu'à 10^4 lésions par jour (Lindahl & Barnes, 2000; Vilenchik & Knudson, 2003). Les cellules sont capables de corriger la majorité de ces dommages grâce à des systèmes efficaces de détection et de réparation. Cependant, la persistance et l'accumulation de lésions dans l'ADN peut s'avérer extrêmement délétère pour la cellule et aboutir à l'apparition d'une instabilité génomique et/ou à l'établissement de mécanismes néoplasiques (Vilenchik & Knudson, 2003).

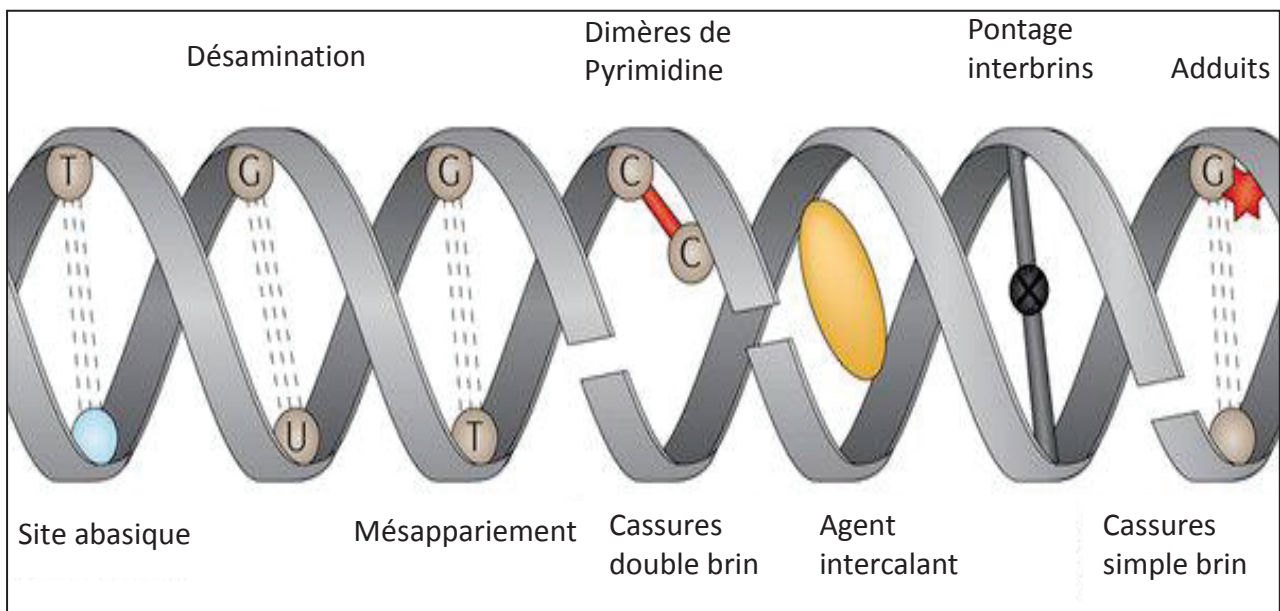


Figure 1. Exemples des différents types de dommages à l'ADN (Caldecott, 2008).

1.1 Les différents types de lésions d'ADN

1.1.1 Les cassures d'ADN

1.1.1.1 Les cassures doubles brins (CDBs)

Les cassures double brin de l'ADN (CDBs) résultent d'une rupture simultanée des 2 brins constituant la double hélice d'ADN. Elles correspondent généralement à l'apparition de 2 cassures simple brin générées à proximité l'une de l'autre sur des brins opposés. L'apparition de CDBs dans une cellule est rare (2 à 8 CDBs spontanées par cellule/jour). Néanmoins, ces dommages sont considérés comme les plus toxiques pour les cellules en altérant directement la structure et l'intégrité génomique. Les CDBs peuvent être induites spontanément lors de la réplication de l'ADN (Jackson, 2002). En effet, les fourches de réplication peuvent être bloquées par la présence de structures particulières de l'ADN (structures secondaires, hybrides ARN/ADN, etc...), de lésions sur l'ADN (bases modifiées ou sites abasiques, adduits, pontages, liaisons covalentes avec des protéines, cassures) ou entrer en collision avec le complexe de transcription. L'impossibilité pour la fourche de réplication de progresser peut alors introduire des ruptures internes de l'hélice d'ADN qui seront reconnues comme des CDBs (Kogoma, 1997; Kuzminov, 1995). Les CDBs peuvent également être provoquées par des facteurs exogènes tels que les radiations ionisantes ou des molécules anti-cancéreuses. Les radiations ionisantes (ex : rayons X) peuvent agir soit par interaction directe des énergies des radiations avec la molécule d'ADN, soit indirectement par radiolyse des molécules d'eau présentes dans la cellule conduisant un stress oxydatif et à la production de radicaux libres (H^+ , l'électron aqueux et OH^-) impliqués dans l'apparition des CDBs dans l'ADN (Siddiqi & Bothe, 1987). Par ailleurs, les CDBs peuvent survenir suite aux traitements par des drogues radiomimétiques utilisées notamment dans le cadre de thérapies anti-tumorales. Ces molécules présentent un mode d'action comparable à celui des radiations ionisantes, basé sur la génération de stress oxydatif dans la cellule conduisant à la production de réactifs oxygénés entraînant l'apparition de différents types de lésions d'ADN dont des CDBs. La Bléomycine, la Neocarzinostatine et la Calichéamicine font partie des drogues radiomimétiques les plus connues (Chen & Stubbe, 2005; Elmroth *et al.*, 2003; Hatayama & Goldberg, 1979; Povirk, 1996). Parmi les agents anti-cancéreux, les inhibiteurs de topoisomérases peuvent également provoquer des CDBs. L'étoposide et la Camptothécine sont en effet capables de stabiliser respectivement les complexes ADN/Topo II et ADN/Topo I, pouvant conduire à des collisions entre ces complexes et l'ADN polymérase lors de la

réplication de l'ADN ou à des torsions inhabituelles d'ADN résultant en la rupture de ses 2 brins (Chazin Ede *et al.*, 2014; Elmroth *et al.*, 2003; Hande, 1998; Martincic & Hande, 2005).

1.1.1.2 Les cassures simple brins de l'ADN (CSBs)

Ce type de dommages désigne la présence de discontinuités dans un brin de la double hélice d'ADN. Ces lésions sont les plus fréquentes dans les cellules, l'apparition spontanée de CSBs ayant été estimée entre 3 à 10^4 lésions par cellule et par jour (Caldecott, 2008). Aussi, en absence de réparation rapide et appropriée de ces dommages, les CSBs peuvent affecter la stabilité génétique et la survie cellulaire. Le stress oxydatif est l'une des sources majeures d'induction de CSBs. Il est attribué à l'action de radicaux libres qui créent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont responsables de l'apparition de CSBs. Bien que les ROS soient produits de façon endogène par le métabolisme aérobie cellulaire, ils peuvent aussi être induits par des facteurs exogènes, notamment par des radiations ionisantes qui par radiolyse de l'eau vont participer à une augmentation de la production de ROS cellulaire (Feldberg & Carew, 1981). Parmi les différents types de ROS, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est le plus répandu physiologiquement, il est à l'origine de la génération de 3 fois plus de CSBs que de CDBs (Caldecott, 2008). Il faut noter que les CSBs ne sont pas exclusivement générés par les ROS, elles peuvent également se produire directement par désintégration du sucre oxydé ou indirectement au cours de la réparation de la structure d'ADN par excision des bases (Caldecott, 2008).

1.1.2 Les modifications de la structure d'ADN

1.1.2.1 Adduits à l'ADN

Il s'agit d'un rajout de groupement chimique au site nucléophile de l'ADN par liaison covalente pouvant aboutir à des erreurs de réplication de l'ADN et à des altérations permanentes du code génétique. Les adduits à l'ADN sont de nature diverse et peuvent être provoqués par des agents alkylants de type N-nitrosamine (contenu notamment dans la fumée du tabac), des aflaxotines, des amines aromatiques, etc... (Poirier & Beland, 1997). Néanmoins, au vu du puissant pouvoir mutagène et létal de ces composés, les moutardes azotés (le cyclophosphamide : agent alkylant le plus utilisé), les Nitroso-urées et le Cisplatine sont des agents alkylants largement utilisés en thérapie anti-cancéreuse (Kondo *et al.*, 2010; Mielecki *et al.*, 2015; Mishina *et al.*, 2006; Tomas Lindahl *et al.*, 1983).

1.1.2.2 Dimères de pyrimidine

Le noyau aromatique des bases nucléiques absorbe l'énergie des photons associée à une longueur d'onde comprise entre 230 et 290 nm correspondant surtout aux rayons ultraviolets (UV) C et dans une moindre mesure à celle des UVB. L'effet de cette absorption déstabilise gravement la structure de la molécule d'ADN du fait de la formation d'une liaison covalente entre 2 pyrimidines adjacentes au détriment de la liaison d'hydrogène habituellement formée entre les bases complémentaires assurant la cohésion de l'hélice d'ADN. Ces pontages intramoléculaires perturbent la conformation stérique de l'ADN et inhibe la progression de la machinerie de réplication cellulaire (Rastogi *et al.*, 2010; Ravanat *et al.*, 2001). Les dimères de pyrimidine majoritairement induits sont les pyrimidines (6-4) pyrimidone (6-4 PPs) caractérisés par la formation d'une liaison covalente entre une cytosine et une thymine sur un même brin d'ADN (20 à 30% des mutations issues de l'action des UVB) et les dimères cyclobutaniques de pyrimidines (CPD) résultant de la formation d'une liaison covalente entre 2 thymines adjacentes (70 à 80% des photo-lésions générées par les UVB) (Rastogi *et al.*, 2010; Ravanat *et al.*, 2001; van Steeg & Kraemer, 1999).

1.1.2.3 Désamination

La désamination se définit par la perte du groupement amine (NH₂) des bases adénine, guanine ou cytosine constituant l'ADN sous l'effet d'un excès d'énergie thermique induisant la formation de composés de type hypoxanthine, xanthine et uracil respectivement (Figure 2) (Yonekura *et al.*, 2009). Chez les mammifères, la désamination de la cytosine est la plus fréquente et peut se produire environ 100 à 500 fois/génome/jour (Lindahl, 1993; Yonekura *et al.*, 2009).

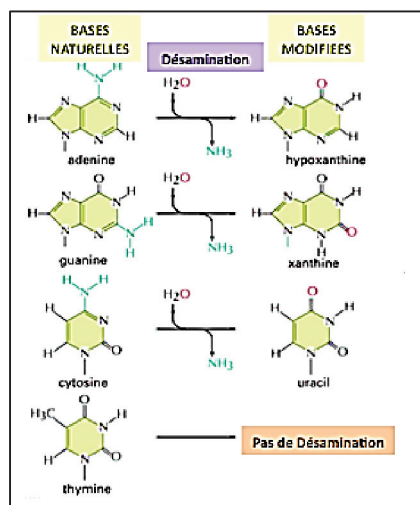


Figure 2. Les différents types de désamination.

La présence des bases ainsi modifiées est à l'origine de mutations dans l'ADN lors de la réplication. Aussi, une base uracile sur la molécule d'ADN conduit à l'apparition d'une mutation par mésappariement de type U:G qui après réplication de l'ADN conduit à une mutation par transition C:T (Figure 3).

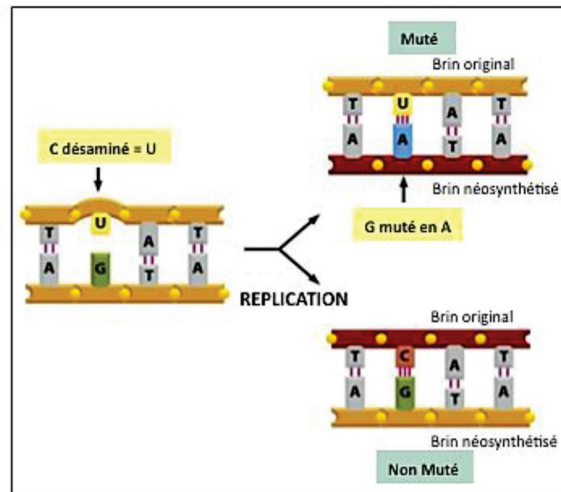


Figure 3. Conséquence de la désamination de la cytosine (Alberts, 2008).

1.1.2.4 Dépurinations et dépyrimidations par hydrolyse de base

L'ADN cellulaire est une macromolécule stable, néanmoins son interaction permanente avec l'H₂O conduit à des modifications spontanées des bases (Lindahl, 1993). Ainsi des lésions de types dépurinations et dépyrimidations peuvent se produire spontanément à pH acide par rupture de la liaison β -N-glycosidique conduisant à un site abasique. Chez les mammifères, le taux de perte de bases d'ADN par dépurination suite à une hydrolyse non enzymatique est estimé à environ 10^4 bases/jour (Lindahl, 1993). Les conséquences de cette dépurination sont d'autant plus graves lors de la réplication de l'ADN puisqu'elles sont à l'origine de délétions ou de substitutions (Figure 4).

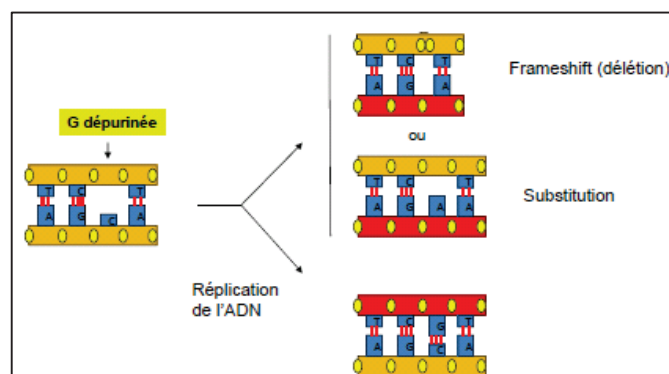


Figure 4. Conséquence de la dépurination de la Guanine.

1.1.2.5 Instabilité des microsatellites (MSI)

Les microsatellites désignent des répétitions (de 4 à 100 fois) de séquences d'ADN comportant de 1 à 6 nucléotides (Hile *et al.*, 2013). On estime que la présence des microsatellites représente 3% de la totalité du génome humain. L'instabilité des microsatellites se caractérise par une modification de la longueur des séquences répétées (élongation ou raccourcissement). Lors de la réplication, la composition nucléotidique des séquences microsatellites favorise la formation de structures en boucles (boucles d'insertions et de délétions) localisées à l'extérieur de la double hélice souvent à l'origine de l'apparition de mésappariements (Figure 5). Ces structures en boucle résultent de la dissociation des 2 brins d'ADN puis de leur re-hybridation incorrecte. De plus, la formation de ces boucles d'ADN conduit à une diminution de l'affinité de l'ADN polymérase au niveau de ces régions pouvant aboutir à son décrochage au cours de la réplication déclenchant l'accumulation de mutations par délétion ou par insertion. Ce phénomène est appelé « glissement de la réplication » ou « replication slippage » (Figure 5) (Ellegren, 2004; Hile *et al.*, 2013).

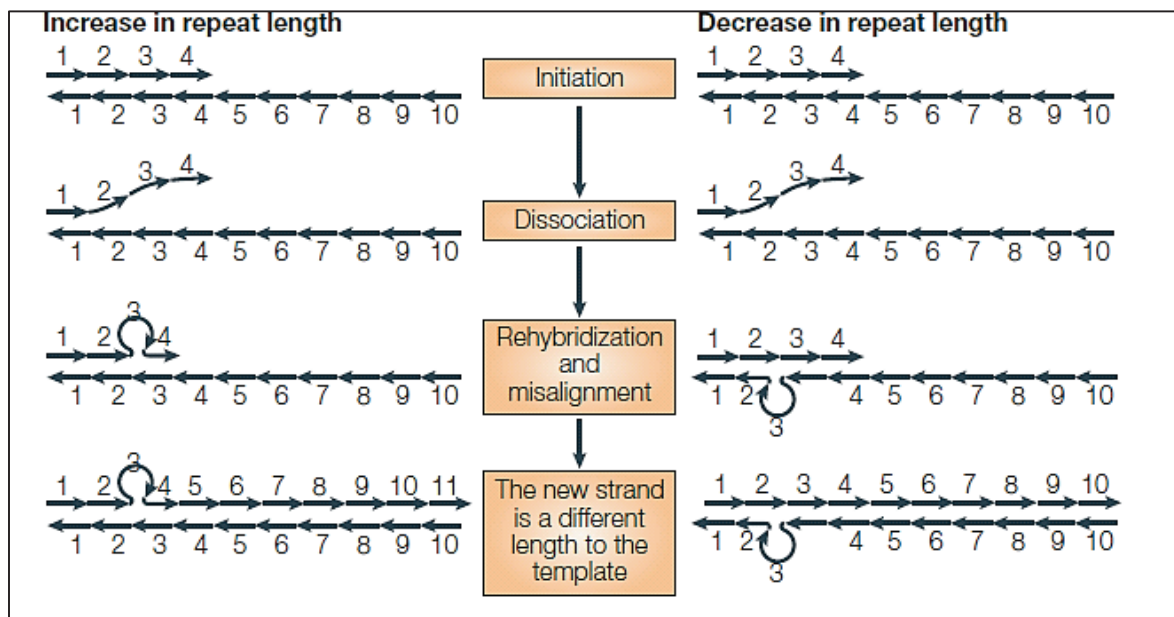


Figure 5. Schéma d'illustration du modèle « replication slippage » (Ellegren, 2004).

1.2 La réponse aux dommages à l'ADN (DDR)

La survenue d'altérations dans l'ADN cellulaire a pour conséquence d'activer une cascade de signalisation afin de mettre en place et de coordonner une réponse appropriée aux dommages subis par la cellule. Chez les eucaryotes, la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) peut faire intervenir 3 voies de signalisations : la voie ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*), la voie ATR (*ATM and Rad 3 related*) et la voie DNA-PK (*DNA dependant protein kinase*) (Shiloh & Ziv, 2013; Turnell & Grand, 2012b).

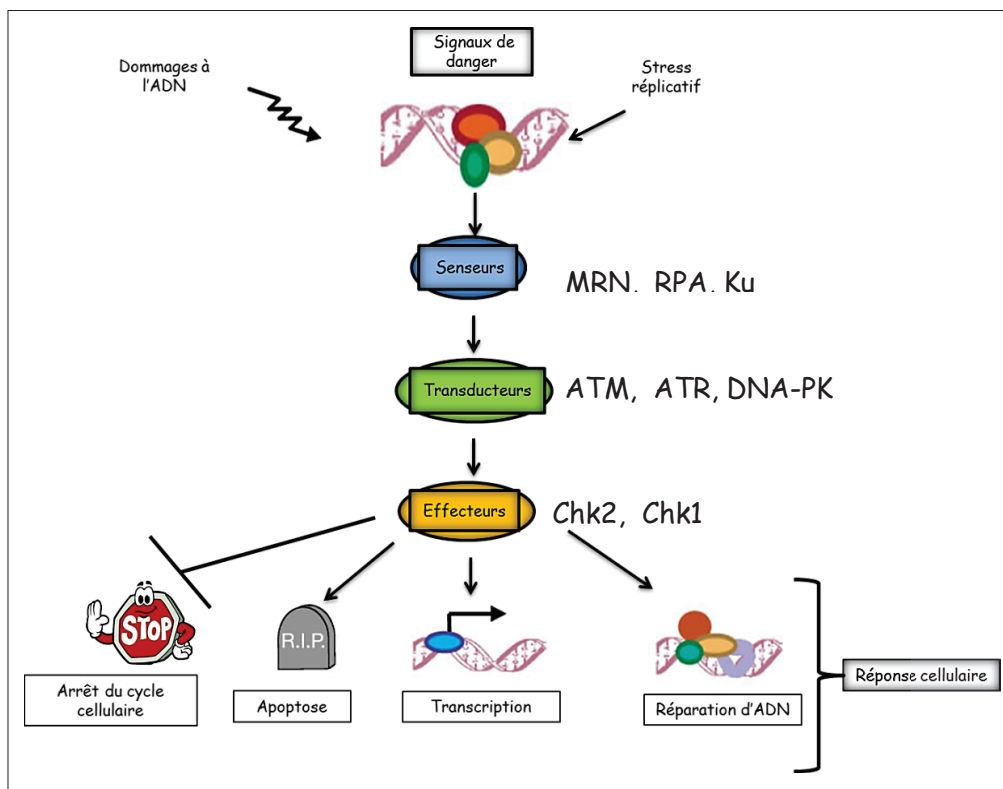


Figure 6. Organisation générale d'une DDR.

Les voies ATM et DNA-PK agissent généralement en réponse à des dommages double brin de l'ADN, alors que la voie ATR est classiquement activée en réponse à des lésions simple brin ou à des problèmes de progression des fourches de réplication (Turnell & Grand, 2012b). Ces 3 voies de signalisation font intervenir des protéines « Senseurs » permettant la détection et l'identification de la nature des lésions. Le signal est alors amplifié et transmis par des protéines adaptatrices aux protéines transductrices que sont les protéines kinases ATM, ATR et DNA-PKcs (Figure 6) (Dasika *et al.*, 1999; Houtgraaf *et al.*, 2006). Ces dernières appartiennent à la famille des phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase-like kinases

(PIKK) et sont capables d'activer différentes protéines effectrices ayant pour rôle de déclencher une réponse cellulaire appropriée aux dommages subis par la cellule. Les effecteurs sont notamment impliqués dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire permettant ainsi de ralentir ou de bloquer la prolifération des cellules jusqu'à restauration de l'intégrité génomique (Turnell & Grand, 2012b). Aussi, lorsque les dommages peuvent être réparés, ces protéines sont responsables de l'activation des voies de réparations de l'ADN afin de corriger les lésions survenues. En revanche, dans le cas où l'ADN est trop endommagé, ces protéines vont engager des voies de signalisation conduisant à une mort cellulaire.

1.2.1 Réponses aux dommages double brin (CDBs)

1.2.1.1 La voie ATM

L'induction de CDBs va rapidement induire l'assemblage du complexe MRN constitué des protéines Mre11-RAD50-Nbs1 au niveau du site de cassures de l'ADN (Figure 7). Ce complexe « senseur » va non seulement assurer la détection des CDBs mais également permettre de conserver un rapprochement des extrémités d'ADN lésées (Stracker & Petrini, 2011). Le complexe MRN va alors recruter la kinase ATM au site des CDBs via sa liaison à l'extrémité C-terminale de Nbs1 (Lee & Paull, 2005; Paull & Lee, 2005). Il faut noter qu'à l'état inactif ATM forme des homodimères. Aussi suite au remodelage de la chromatine résultant de l'apparition des CDBs, ces dimères se dissocieraient par autophosphorylation intermoléculaire de la sérine 1981, libérant des monomères actifs présentant une activité kinase (Bakkenist & Kastan, 2003). Immédiatement après son recrutement aux CDBs, ATM phosphoryle le variant H2AX de l'histone H2A sur la sérine 139 (nommé alors γ H2AX) qui est relocalisé aux CDBs (Burma *et al.*, 2001). La phosphorylation de H2AX va alors permettre le recrutement de divers composants de la DDR au niveau du site des cassures, notamment la protéine MDC1 qui amplifie le signal de DDR en recrutant de nouveaux complexes MRN au niveau de la CDBs (Paull *et al.*, 2000; Scully & Xie, 2013). ATM va parallèlement induire le recrutement transitoire de la protéine kinase effectrice Chk2 (check point kinase 2) induisant ainsi son activation par phosphorylation (Thr 68). Chk2 joue un rôle majeur dans la réponse aux dommages puisqu'elle est responsable de l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (Figure 7-8). En réponse à l'induction de CDBs le point de contrôle G1/S est activé afin d'éviter la réplication d'ADN endommagé. Plus particulièrement, la stabilisation de la protéine suppresseur de tumeur p53 par

phosphorylation par les kinases ATM et Chk2 joue un rôle majeur dans ce blocage. En effet, la protéine p53 de par son activité transactivatrice induit l'expression du régulateur du cycle cellulaire p21^{Cip1} qui est responsable de l'inhibition de la cycline E et des kinases cycline-dépendante cdk2 qui lui sont associées, empêchant ainsi la progression du cycle vers la phase S (Chehab *et al.*, 2000; Chehab *et al.*, 1999; Matsuoka *et al.*, 1998).

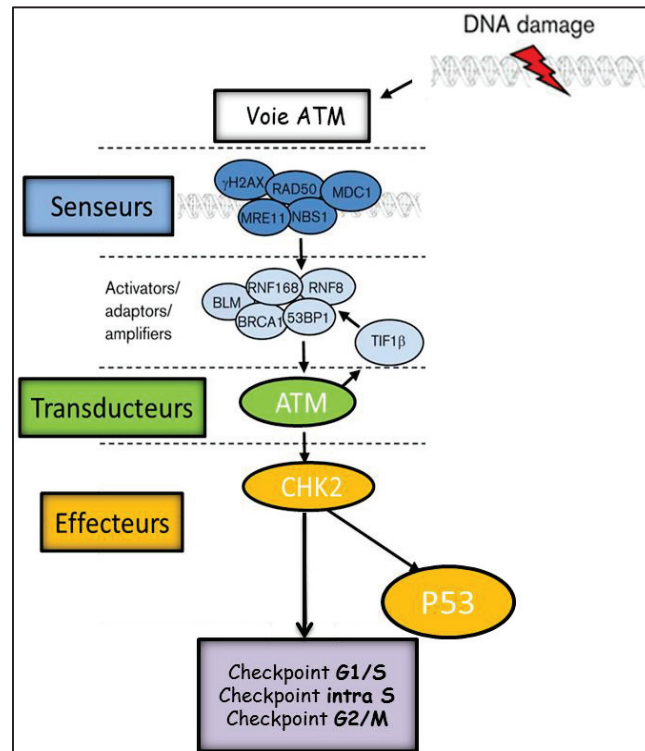


Figure 7. Schéma de la voie ATM (Turnell & Grand, 2012a).

La voie ATM peut également contribuer à l'activation du point de contrôle intra-phase S. Le mécanisme est actuellement peu connu mais il ferait intervenir les protéines Nbs1, MRE11 et BRCA1. L'activation de la voie ATM peut aussi conduire à un arrêt du cycle en G2/M notamment en induisant l'ubiquitinylation et la dégradation de la phosphatase Cdc25A par Chk2 ce qui a pour conséquence de maintenir la kinase cdc-2 (cell division cycle protein 2) dans un état inactif du fait de groupements phosphates inhibiteurs, empêchant ainsi la progression du cycle cellulaire et l'entrée en mitose (Falck *et al.*, 2001; Houldsworth & Lavin, 1980; Kastan & Lim, 2000; Smith *et al.*, 2010). Cet arrêt du cycle cellulaire est une étape transitoire mais essentielle pour le devenir des cellules. En effet, ATM et chk2 ont la capacité d'activer les protéines associées aux voies de réparation de l'ADN, notamment les systèmes de recombinaison homologue et NHEJ classiquement mis en œuvre suite à l'apparition de

CDBs et ainsi de permettre aux cellules de restaurer leur intégrité génomique avant l'entrée en mitose.

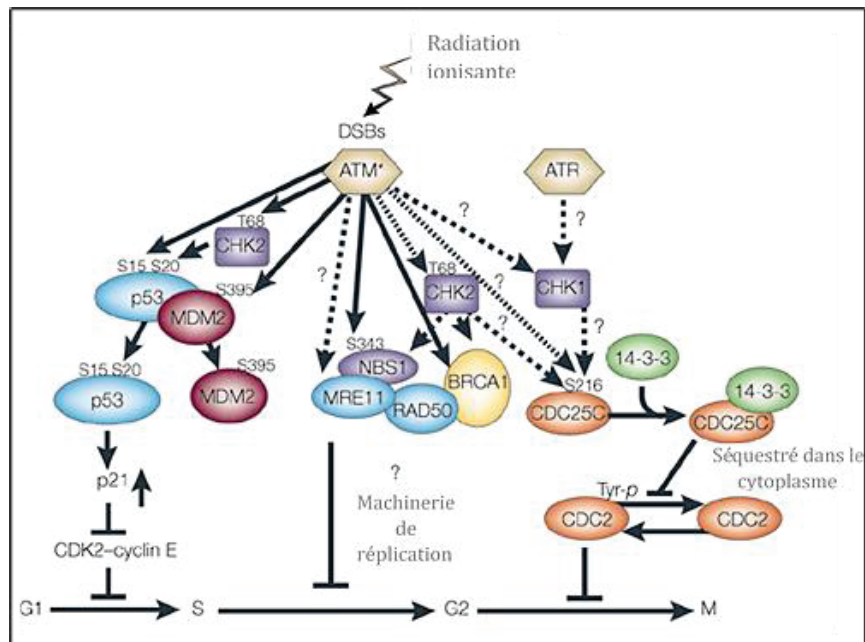


Figure 8. Contrôle du cycle cellulaire par la protéine ATM (Kastan & Lim, 2000).

La voie ATM est principalement régulée par des modifications post-traductionnelles des différentes protéines impliquées dans la signalisation (cascades de phosphorylations-déphosphorylations, ubiquitination...). Plusieurs études ont également permis de démontrer récemment que les microARN cellulaires régulaient l'expression des protéines ATM et H2AX (Tessitore *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2011). La voie ATM joue un rôle crucial dans le contrôle et la suppression de l'instabilité génomique. Aussi toute dérégulation de la signalisation ATM peut contribuer au développement de pathologies sévères telles que des cancers. L'importance de la voie ATM est particulièrement illustrée par plusieurs maladies génétiques associées à des mutations affectant le gène ATM qui sont responsables de la maladie neurodégénérative de l'ataxie-télangiectasie (Teive *et al.*, 2015), des mutations du gène codant la protéine Nbs1 du complexe MRN conduisant à l'apparition du syndrome des cassures de Nijmegen ou des mutations de chk2 impliquées dans le développement de la maladie de Li-Fraumeni (McBride *et al.*, 2014). Ces pathologies héréditaires sont généralement caractérisées par une déficience immunitaire et une prédisposition au développement de divers cancers du fait de l'instabilité chromosomique générée suite au

dysfonctionnement de la voie de signalisation ATM (Digweed, 2003; Digweed & Sperling, 2004).

1.2.1.2 La voie DNA-PK

La voie de signalisation DNA-PK (*DNA dependant protein kinase*) est activée en réponse à des dommages à l'ADN de type CDBs et est particulièrement importante dans la réparation de ces dommages. DNA-PK est une sérine/thréonine kinase composée d'une sous-unité catalytique DNA-PKcs et d'un hétérodimère régulateur constitué des protéines Ku70 et Ku80 (Pawelczak *et al.*, 2011). En présence de CDBs, le complexe Ku est rapidement recruté de part et d'autre du site de la lésion double-brin permettant ainsi de conserver une proximité des 2 extrémités de l'ADN endommagé (Figure 9). Le complexe Ku va également permettre le recrutement de la sous-unité catalytique DNA-PKcs et la stabilisation de son interaction avec l'ADN (Turnell & Grand, 2012a). La liaison de DNA-PKcs au complexe DNA/Ku induit en effet la translocation des hétérodimères Ku à une position distale de la lésion permettant à la kinase DNA-PKcs de se localiser directement au point de cassure (Yoo & Dynan, 1999).

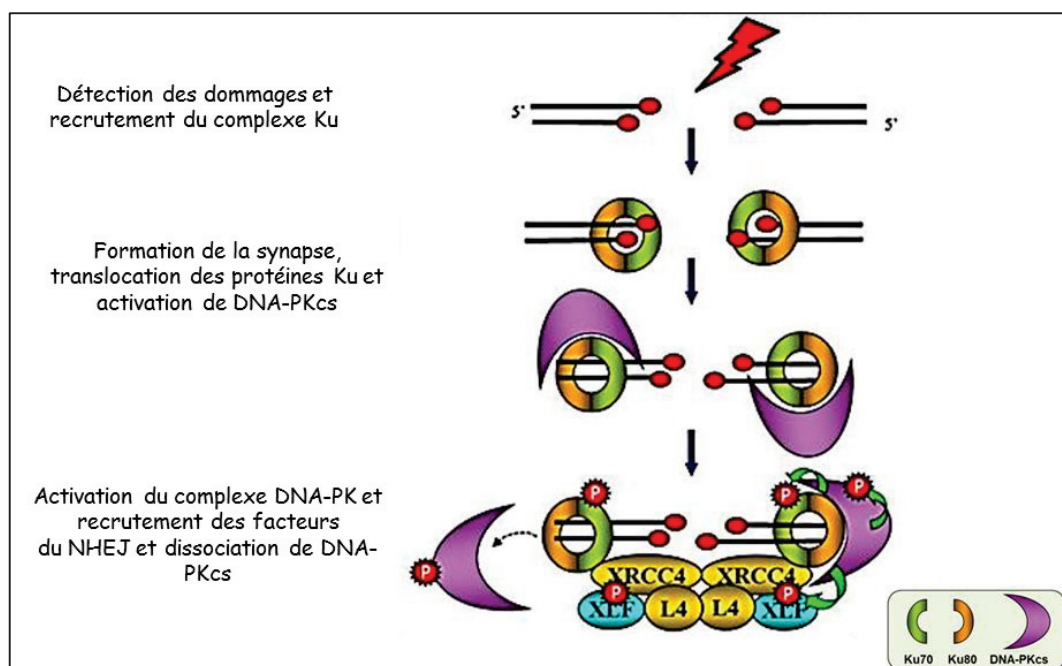


Figure 9. Schéma de la voie DNA-PK (Grundy *et al.*, 2014).

Le complexe hétérotrimérique DNA-PK/Ku 70/ crée une synapse fonctionnelle permettant de protéger les extrémités de l'ADN de l'action des nucléases cellulaires et ainsi

d'empêcher la perte de l'information génétique. De plus, l'activité catalytique de la DNA-PKcs activée par sa liaison à l'ADN induit la phosphorylation d'effecteurs impliqués dans la réparation de l'ADN et plus particulièrement les protéines participant au système de Non Homologous-End Joining (NHEJ) telles que XLF, XRCC4 ou le facteur Werner (WRN) (Yu *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2003), ainsi que des protéines impliquées dans la DDR (Artemis, H2AX et p53). Il faut noter que l'autophosphorylation de DNA-PKcs est une étape charnière dans le déroulement de cette voie de signalisation puisqu'elle conduirait à un changement conformationnel de la kinase engendrant sa dissociation des protéines Ku et de l'ADN, permettant ainsi la mise en place des protéines effectrices du système de réparation NHEJ (Davis *et al.*, 2014; Hill & Lee, 2010; Jette & Lees-Miller, 2015; Rivera-Calzada *et al.*, 2005).

La voie DNA-PK est hautement régulée par les mécanismes canoniques de phosphorylation-déphosphorylation. Cependant, comme ATM, la voie DNA-PK peut être également régulée par les miRs ou des processus d'ubiquitinylation. En effet, le miR 101 est non seulement responsable de la régulation de l'expression d'ATM mais aussi de celle de la kinase DNA-PKcs (Tessitore *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2011). Cette dernière est également régulée par ubiquitinylation suite l'action du de la protéine cdc 48/p97/VCP conduisant à sa dégradation protéolytique (Brinkmann *et al.*, 2015).

Par ailleurs, hormis son rôle central dans l'activation du système NHEJ, la voie DNA-PK serait également impliquée dans la mitose, la transcription et la stabilité du Golgi, ces activités ayant été mises en évidence récemment (Jette & Lees-Miller, 2015). La voie DNA-PK serait d'une importance particulière dans les phénomènes de maturation du système immunitaire notamment la machinerie de recombinaison V(D)J. En effet, la recombinaison V(D)J consiste en un mouvement de réorganisation et d'assemblage des segments de gènes Variable (V), Diverse (D) et Joining (J) via de multiples recombinaisons aléatoires permettant au système immunitaire de s'adapter aux différents antigènes (Fugmann *et al.*, 2000; Schatz *et al.*, 1992; van Gent *et al.*, 1996). Ce phénomène met en jeu des coupures doubles brins de l'ADN et le rôle de DNA-PK permettrait de protéger les extrémités de l'ADN de l'action inappropriée des nucléases cellulaires. L'analyse des produits de recombinaison V(D)J générés en absence de DNA-PK révèle la présence accrue de mutations par délétion (Jackson & Jeggo, 1995). Compte tenu de son implication dans ces processus de maturation du système immunitaire, la mutation du gène codant la protéine DNA-PKcs est en cause d'une immunodéficience sévère chez les patients T-B « SCID » (van der Burg *et al.*, 2009). Par

ailleurs, une mutation de l'hélicase WRN faisant partie de la signalisation de DNA-PK est à l'origine du syndrome de Werner (Franchitto & Pichierri, 2002).

1.2.2 Réponse aux dommages simples brins et aux problèmes de fourches de réplifications : la voie ATR

ATR (*ATM and Rad 3 related*) est activée par des structures d'ADN simple brin, qui peuvent par exemple résulter de la résection de CDBs ou de problèmes de progression de fourches de réplification. En effet, lorsque les ADN polymérases sont bloquées lors de la réplification de l'ADN, les hélicases continuent à relaxer l'ADN en amont de la fourche de réplification, conduisant à la production de longues régions d'ADN simple brin (ADNsb), qui sont alors reconnues par la protéine de liaison à l'ADNsb, RPA (replication protein A) qui agit comme senseur (Byun *et al.*, 2005; Cortez *et al.*, 2001; Wold, 1997). Les protéines RPA liées à l'ADNsb (Figure 10) vont recruter la kinase ATR en association avec son partenaire protéique ATRIP (ATR interacting protein) (Zou & Elledge, 2003; Zou *et al.*, 2003). Il faut noter que le complexe ATR-ATRIP serait également capable de se lier directement à l'ADN indépendamment de RPA lors de l'accumulation massive de dommages simple brin dans l'ADN (Pabla *et al.*, 2011). L'association de RPA avec l'ADNsb permet la liaison du complexe Rad17/RFC2-5 au niveau du site endommagé. La présence d'une jonction ADNdb /ADNsb active ce complexe conduisant au recrutement de l'hétérotrimère RAD9-HUS1-RAD1 (complexe 9-1-1) à l'extrémité de l'ADN (Ellison & Stillman, 2001). Le complexe 9-1-1 recrute alors la protéine TopBP1 (Topoisomerase binding protein 1) qui est nécessaire à l'activation de l'activité kinase d'ATR. Le mécanisme d'activation d'ATR reste encore actuellement à élucider, néanmoins la protéine TOPBP1 jouerait un rôle majeur probablement par son interaction avec ATR (Kumagai *et al.*, 2006; Nam & Cortez, 2011). Une fois activée, la kinase ATR va déclencher une cascade de signalisation entraînant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la stabilisation et le redémarrage des fourches de réplification bloquées (Abraham, 2001; Cimprich & Cortez, 2008; Cortez *et al.*, 2001; Gonzalez Besteiro & Gottifredi, 2015). Parmi les nombreux substrats d'ATR identifiés, la protéine Chk1 est une cible préférentielle. La phosphorylation de Cdk1 requiert l'intervention d'une protéine médiatrice, la Claspin, qui une fois localisée au site de cassure de l'ADN va recruter Chk1 et ainsi permettre une proximité entre chk1 et ATR facilitant ainsi la phosphorylation de Chk1 et son activation (Kumagai & Dunphy, 2003). Une fois activée,

Chk1 se dissocierait de la Claspin lui permettant d'interagir avec ses cibles nucléaires et cytoplasmiques (Bartek & Lukas, 2003).

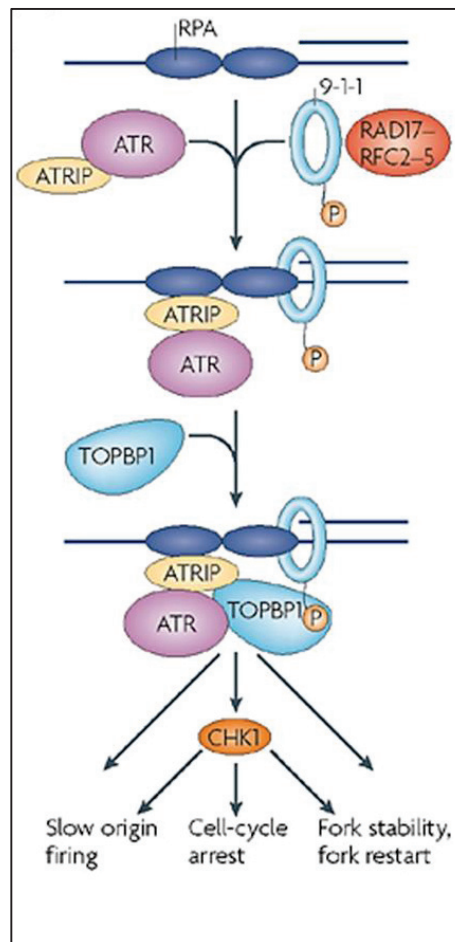


Figure 10. Schéma d'activation de la voie ATR (Cimprich & Cortez, 2008).

Chk1 est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire en intra-S et G2/M, afin de ralentir la progression de la réplication de l'ADN et de réparer l'ADN endommagé avant la mitose (Abraham, 2001; Bartek *et al.*, 2004; Cortez *et al.*, 2001; Gonzalez Besteiro & Gottifredi, 2015; Sorensen *et al.*, 2004). L'arrêt prolifératif induit par la voie ATR repose principalement sur 2 mécanismes faisant suite à la phosphorylation de régulateurs majeurs des complexes cdk/cycline par Chk1. Ainsi, Chk1 induit : (i) la dégradation de Cdc25A aboutissant à l'inhibition de Cdk2 (requis en association avec les cyclines E et A pour le fonctionnement des origines de réplication) (Xiao *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2002) et (ii) la séquestration de Cdc25C dans le cytoplasme sous forme inactive (associée aux protéines 14-3-3), inhibant sa capacité à déphosphoryler et activer Cdk1, et par conséquent l'entrée en

mitose (Graves *et al.*, 2001; Kumagai & Dunphy, 1999; Sanchez *et al.*, 1997). La voie ATR est également capable d'induire une cascade de signalisation à l'origine du déclenchement de l'apoptose dans le cas de la persistance des dommages à l'ADN et/ou de l'absence de leur réparation.

La voie ATR est également soumise à des régulations par les miRs, notamment les miR 185, miR 34b, miR 376a et miR 3928 qui réguleraient l'expression d'ATR et Chk1 (Tessitore *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2011). Contrairement aux autres voies de DDR, le rôle de l'ubiquitinylation dans la régulation de la voie ATR n'est pas établi. Hormis sa phosphorylation induite par ATR sur la sérine Ser345, Chk1 est susceptible d'être phosphorylée par d'autres voies de signalisation aboutissant à une modulation de sa fonction. Par exemple, CDK1 et CDK2 peuvent phosphoryler Chk1 sur ses résidus Ser286 et Ser301. D'autres études ont montré que Chk1 peut également être phosphorylé sur sa sérine Ser280 probablement via l'action de plusieurs kinases dont Akt, RSK, et PIM1 (Smits & Gillespie, 2015).

Des mutations affectant les protéines de la voie ATR sont également associées au développement de cancers ou de pathologies dégénératives. Les patients atteints du syndrome de Seckel caractérisé par un retard de croissance intra-utérin, de retards mentaux et de microcéphalie, présentent une mutation du gène codant la protéine ATR (Turnell & Grand, 2012a).

1.3 Les voies de réparation des dommages à l'ADN

1.3.1 Réparation des dommages double brin de l'ADN

La réparation des dommages à l'ADN de type double brin est effectuée principalement par 2 mécanismes : la ligature des extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (RH). L'activation de ces 2 mécanismes de réparation dépend de la nature des dommages et de la phase du cycle cellulaire.

1.3.1.1 La ligature des extrémités non homologues (NHEJ)

Bien que le système NHEJ soit actif tout au long du cycle cellulaire, son activité tend à augmenter lors de la progression de la phase G1 à G2/M (Mao *et al.*, 2008). Cette voie de réparation consiste à la ligature des 2 extrémités des CDBs. On distingue 2 types de réparation NHEJ : le NHEJ dit « canonique » (c-NHEJ) dépendant de la voie DNA-PK et le NHEJ « alternatif » (alt-NHEJ) indépendant des acteurs de la voie canonique (Sfeir & Symington, 2015; Truong *et al.*, 2013). Le NHEJ a longtemps été considéré comme un mécanisme infidèle de réparation des CDBs, cependant cette caractéristique semble être essentiellement attribuable au système alt-NHEJ. En effet, la voie alt-NHEJ est initiée par une résection des extrémités de la CDBs (réalisée par une nucléase et une hélicase) qui conduirait inévitablement à une délétion de séquence et donc une perte d'information génétique au niveau de la jonction de réparation. En revanche, le c-NHEJ est relativement conservateur même s'il peut ligaturer des extrémités d'ADN imparfaitement complémentaires, laissant une « cicatrice » de réparation. En conséquence, la qualité et la fidélité de la réparation ne dépendrait pas du système NHEJ *per se* mais serait plutôt attribuable à la structure des extrémités de la CDBs.

Le c-NHEJ est un mécanisme dynamique déclenché classiquement par une DDR de type DNA-PK. La reconnaissance de la CDBs par les protéines Ku70/80 entraîne non seulement le recrutement de la kinase DNA-PKc mais également des facteurs clés nécessaires à la ligature des extrémités de la CDBs telles que l'ADN ligase IV et ses cofacteurs XRCC4 et XLF qui vont alors former un complexe stable au niveau de la CDBs (Figure 11). Des enzymes de maturation des extrémités peuvent également être recrutées au site de la CDBs comme les nucléases APLF et Artemis, l'hélicase WRN ou l'ADN polymérase. Ces enzymes vont permettre lorsque cela est nécessaire de préparer les extrémités lésées par ligature en effectuant par exemple une résection d'ADN ou en éliminant des groupements de type adduits. L'étape ultime de ligature est réalisée par le complexe Ligase VI-XRCC4-XLF.

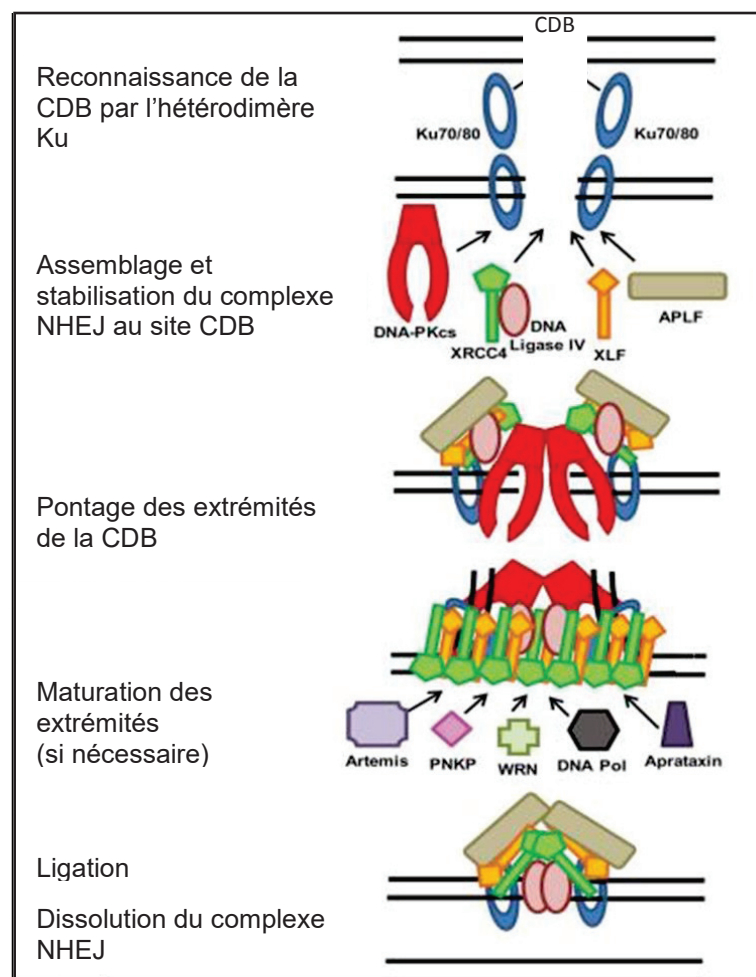


Figure 11. Représentation de la voie c-NHEJ (Davis *et al.*, 2014).

Bien que le principe du système alt-NHEJ soit similaire au c-NHEJ, il fait intervenir des protéines différentes (Figure 12). Aussi, la protéine PARP1 agit comme senseur des CDBs et la ligation est effectuée par la ligase 1 ou la ligase 3 couplée à son co-facteur XRCC1 (Dueva & Iliakis, 2013).

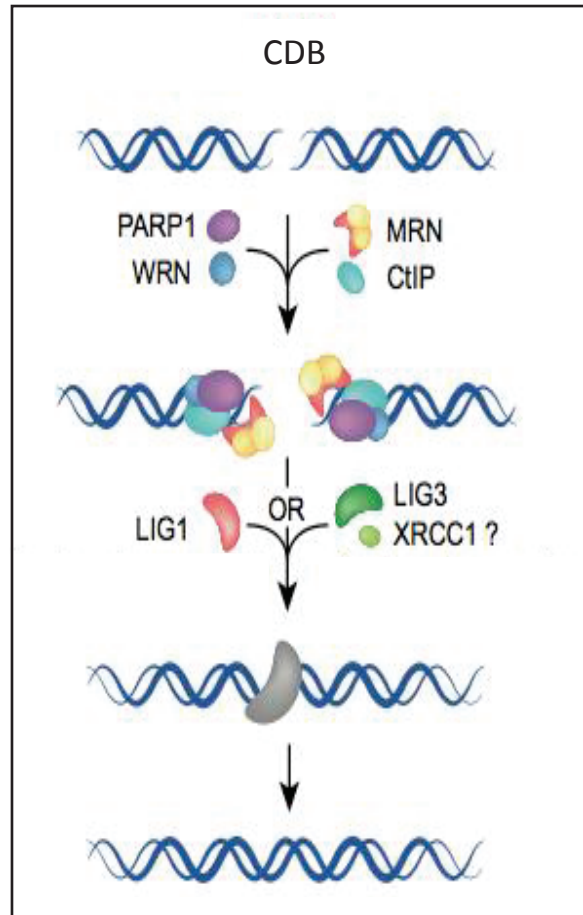


Figure 12. Représentation du système alt-NHEJ (Dueva & Iliakis, 2013).

Le système NHEJ est souvent à l'origine de mutations, il reste néanmoins un mécanisme essentiel pour maintenir la stabilité génomique. Aussi, des mutations dans les gènes codant les protéines impliquées dans cette voie de réparation peuvent entraîner une radiosensibilité, une augmentation des translocations/aberrations chromosomiques prédisposant aux processus néoplasiques et une à une immunodéficience sévère.

1.3.1.2 La recombinaison homologue (HR)

La RH est considérée comme un mécanisme « fidèle » puisqu'elle consiste à réparer l'ADN endommagé à partir du brin d'ADN complémentaire non lésé. La présence d'une chromatide sœur est donc nécessaire à la mise en œuvre d'une réparation par recombinaison homologue (RH). Aussi, ce mode de réparation est préférentiellement activé au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire. La RH débute par la prise en charge des extrémités CDBs par le complexe MRN qui réalise, via l'activité exonucléase de Mre11, une résection des extrémités 5' générant ainsi 2 extrémités 3' d'ADNsb qui sont stabilisées par le recrutement des protéines RPA (Figure 13)..

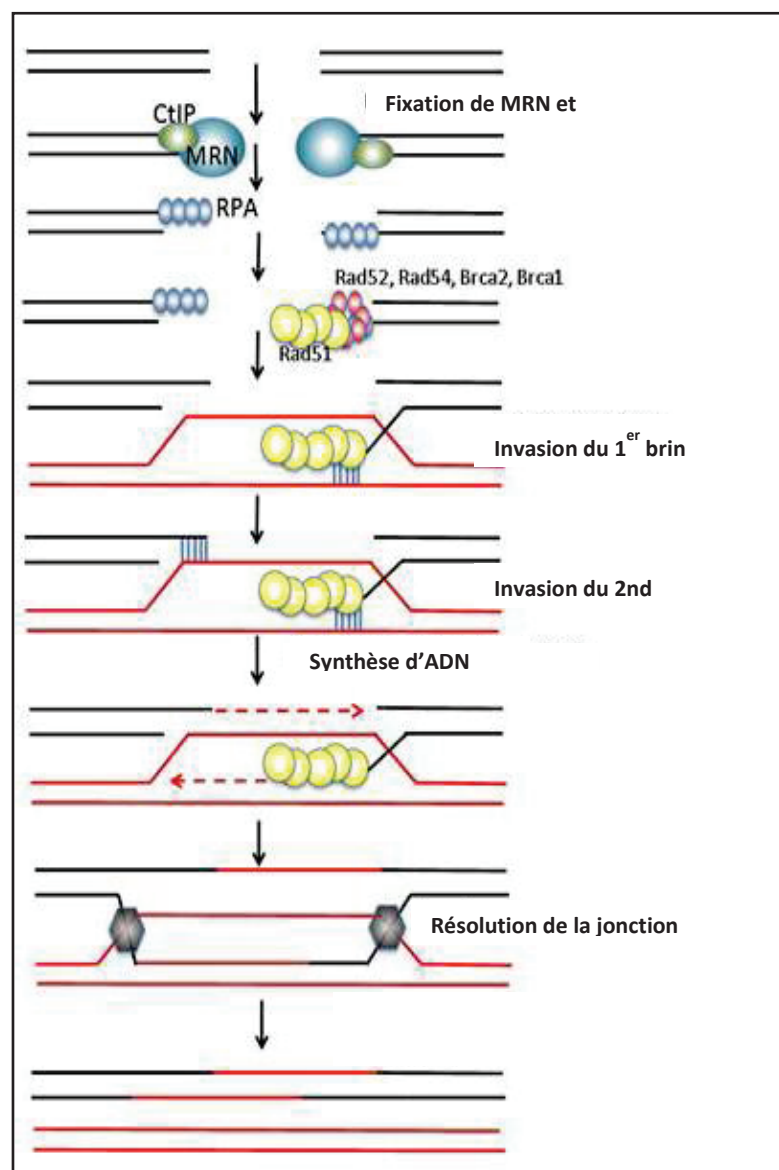


Figure 13. La réparation des dommages double brin de l'ADN par recombinaison homologue (Rass *et al.*, 2012).

Le recrutement des protéines BRCA1, BRCA2, RAD54 et RAD51 va alors faciliter le remplacement des protéines RPA par la recombinaise RAD51 qui forme un filament le long de l'ADNsb. RAD51 assure la recherche de la séquence matricielle homologue sur le brin complémentaire et permet l'invasion du brin d'ADN reséqué au niveau de l'ADN de la chromatide sœur. La synthèse d'ADN est alors réalisée à l'extrémité du brin 3' par l'ADN polymérase δ en utilisant comme matrice le brin d'ADN non-endommagé conduisant à la formation d'une double jonction de Holliday. Cette structure particulière de l'ADN sera finalement résorbée enzymatiquement par des résolvases et des ligases achevant ainsi la réparation. Une déficience du système de réparation RH serait impliquée dans de multiples cancers (ex : pancréas, prostate, ovaire, sein) et dans l'anémie de Fanconi; un syndrome prédisposant les personnes affectées aux cancers.

1.3.2 Réparation des dommages simple brin de l'ADN

1.3.2.1 La réparation par excision de bases (BER)

Ce mécanisme permet la réparation de mutations endogènes affectant jusqu'à 4 nucléotides. La réparation par BER débute par une étape de reconnaissance et d'élimination des bases endommagées sous l'action d'enzymes ADN glycosylases spécifiques qui hydrolysent la liaison N-glycosidique entre la base anormale et le désoxyribose créant ainsi un site abasique (site apurinique/apyrimidique ou site AP) (Figure 14). Les sites AP sont alors pris en charge par une endonucléase AP (APE1) qui clive la liaison phosphodiester en 5' du site abasique aboutissant à la formation d'une cassure simple brin dans l'ADN caractérisée par un résidu hydroxyl à l'extrémité 3' et un désoxyribose phosphate en 5'. La réparation de cette lésion est alors assurée par l'ADN polymérase β qui incorpore le nucléotide correct en position 3' de la cassure (en utilisant le brin d'ADN non-endommagé comme matrice). Enfin, la ligation de l'ADN est réalisée par le complexe XRCC1-ADN ligase III (Christmann *et al.*, 2003). Il faut noter que plusieurs enzymes accessoires telles que des phosphodiesterases et des phosphatases sont également impliquées dans le mécanisme de BER afin de modifier les extrémités des CSBs et ainsi faciliter leur réparation. Le système de réparation BER participe par conséquent au maintien de l'intégrité génomique et une déficience de ce mécanisme serait associée à diverses pathologies humaines (dégénérescence neurologique, dysfonctionnement du système immunitaire, vieillissement) et une prédisposition à certains cancers dans lesquels des mutations de pol β et de la glycosylase MutY ont notamment été rapportées (de Oliveira *et al.*, 2014; Wallace, 2014).

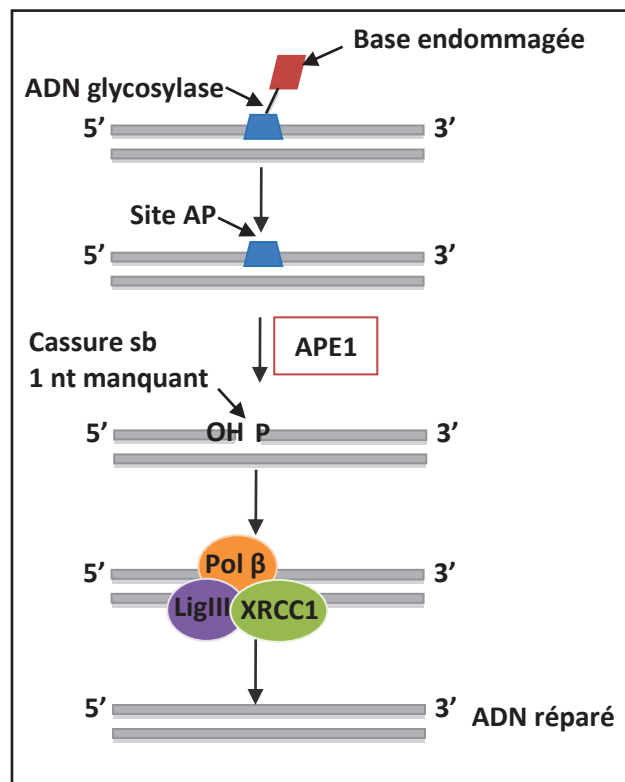


Figure 14. Représentation de la réparation de l'ADN par excision de base (BER) (Dianov & Hubscher, 2013).

1.3.2.2 Réparation par excision de nucléotide (NER)

Le système NER est principalement activé pour réparer des lésions liées à la structure de l'ADN. On distingue 2 types de NER appelées réparation génomique globale (GG-NER) et réparation couplée à la transcription (TC-NER) (Figure 15). La GG-NER assure la réparation des domaines présentant des distorsions de l'hélice d'ADN tandis que la TCR corrige les dommages survenant lors de l'étape d'élongation de la transcription, plus particulièrement lorsque l'ARN polymérase II est bloquée suite à une lésion sur le brin matrice. Les lésions sont reconnues soit directement par un complexe «senseur» composé des protéines XPC–RAD23B, CETN2 et UV-DDB dans le système GG-NER, soit indirectement par l'ARN pol II dans le système TC-NER. Le facteur de transcription TFIIH est alors recruté au niveau de la lésion et TFIIH du fait de l'activité hélicase de sa sous-unité XPD va procéder à l'ouverture des 2 brins d'ADN autour de la lésion, générant ainsi 2 domaines d'ADN sb. La protéine RPA (replication protein A) recouvre alors l'ADN sb non-endommagé et la sous-unité XPA de TFIIH recrute une endonucléase spécifique, XPF-ERCC1 qui est dirigée vers le brin d'ADN endommagé pour générer une incision en 5' de la lésion. XPG est alors activée et assure le

clivage en 3' de la lésion libérant ainsi une région de 22 à 30 nucléotides comportant la lésion. La protéine trimérique PCNA (proliferating cell nuclear antigen) présente au niveau de l'incision 5' recrute les ADN pol afin de combler fidèlement la région d'ADN qui a été excisée et l'action de ligases permet de finaliser la ligature de l'ADN (Christmann *et al.*, 2003; Marteijn *et al.*, 2014).

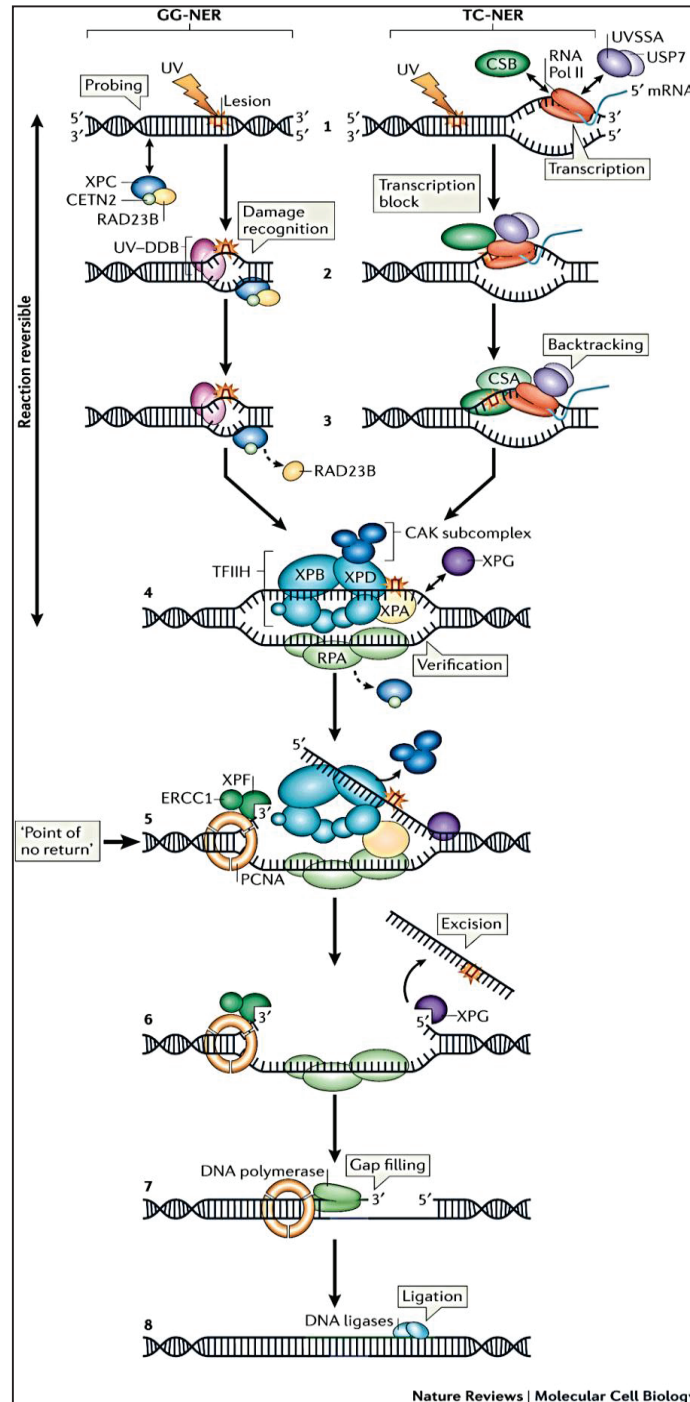


Figure 15. La réparation par excision de nucléotides (NER) (Marteijn *et al.*, 2014).

Une déficience du mécanisme de réparation NER entraîne une prédisposition à certains cancers notamment chez des patients atteints de la maladie Xeroderma Pigmentosum (résultant de la non-fonctionnalité du système NER), mais elle peut également être impliquée dans des défauts de développement neuronal associés à un vieillissement prématuré comme cela a été décrit dans le syndrome Cockayne (Marteijn *et al.*, 2014).

1.3.2.3 La réparation des mésappariements (MMR)

Le système de réparation MMR joue un rôle majeur dans la correction des erreurs survenant lors de la réplication de l'ADN. Il est également impliqué dans la réparation des mésappariements pouvant se produire durant les processus de recombinaison homologue. Chez les eucaryotes, la reconnaissance des mésappariements se fait par le complexe protéique MutSα (Figure 16). MutSα va alors recruter les hétérodimères MutLα présentant une activité ATPase et endonucléase. La conversion de l'ADP en ATP permet au complexe MutS/MutL de glisser le long du brin d'ADN jusqu'à la protéine PCNA qui a été préalablement recrutée au niveau d'une CSBs de l'ADN par le RFC (Facteur de réplication C). L'activité endonucléase de MutL est alors activée ce qui génère une nouvelle CSBs à proximité du mésappariement. L'étape d'élimination de la région d'ADN affectée par le dommage est assurée par l'exonucléase 1 (Exo1) qui est recrutée aux CSBs et dégrade le brin d'ADN muté depuis les CSBs jusqu'à 150 nucléotides au-delà du mésappariement. Le brin d'ADN complémentaire non-muté est protégé des nucléases cellulaires par l'association de protéines RPA. Le complexe de réparation se détache alors de l'ADN permettant le recrutement de l'ADN polymérase δ (Pol δ) assurant la synthèse de la portion d'ADN dégradé par Exo1 à partir du brin matrice non-muté. Enfin, l'ADN ligase I assure la ligation de ce fragment d'ADN néosynthétisé au reste de la molécule d'ADN (Jiricny, 2006; Pena-Diaz & Jiricny, 2012).

L'inactivation de la voie de réparation MMR suite à la mutation des gènes codant les protéines MutS et MutL engendre une augmentation de la fréquence des mutations spontanées dans la cellule et par conséquent un accroissement de l'instabilité génétique, notamment dans les régions de microsatellites, prédisposant à la carcinogenèse. Aussi, une déficience de MMR serait impliquée dans environ 15% des cancers et est à l'origine d'une forme de cancer colorectal héréditaire (HNPCC). Il a également été démontré que le syndrome de Turcot caractérisé par le développement d'une tumeur cérébrale primaire associée à de multiples adénomes colorectaux chez l'enfant serait causé par l'inactivation du MMR.

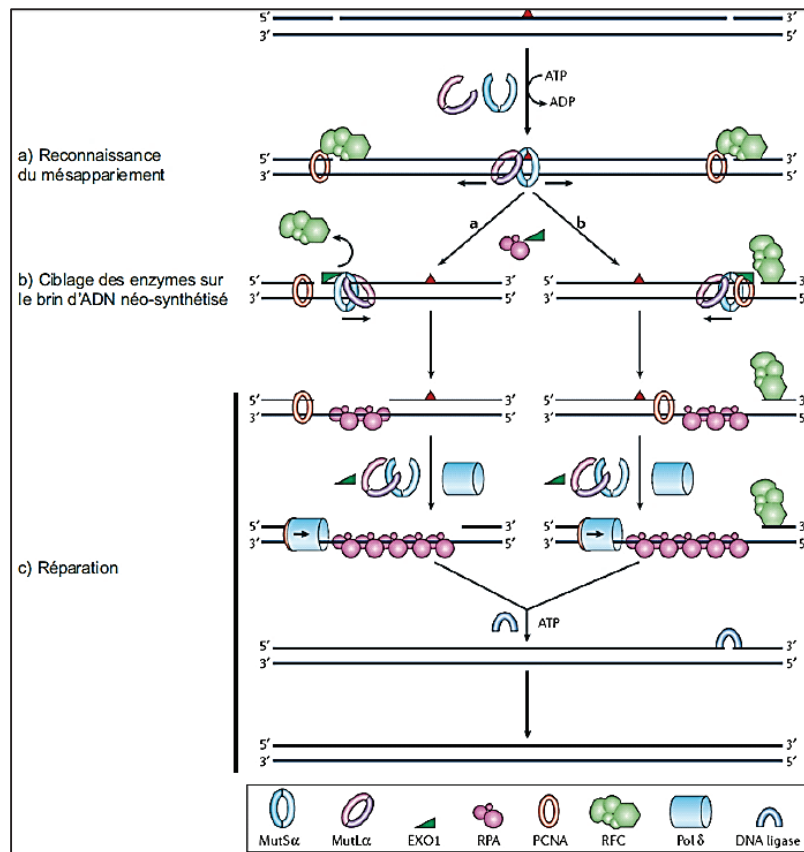


Figure 16. Schéma représentatif de la réparation des mésappariements (MMR) (Jiricny, 2006).

CHAPITRE 2

Micro-organismes et dommages à l'ADN

Outre les génotoxiques physiques ou chimiques mettant en péril l'intégrité génomique, les pathogènes peuvent être à l'origine d'une génération de dommages à l'ADN et ou d'une dérégulation des DDRs (Figure 17). De ce point de vue, les dommages à l'ADN et les troubles de DDR peuvent être la conséquence directe de l'action de protéines virales, bactériennes ou parasitaires. Toutefois, elle peut être aussi la résultante de la réplication de ces micro-organismes ou de la réaction cellulaire inflammatoire induite suite à l'infection (Weitzman & Weitzman, 2014).

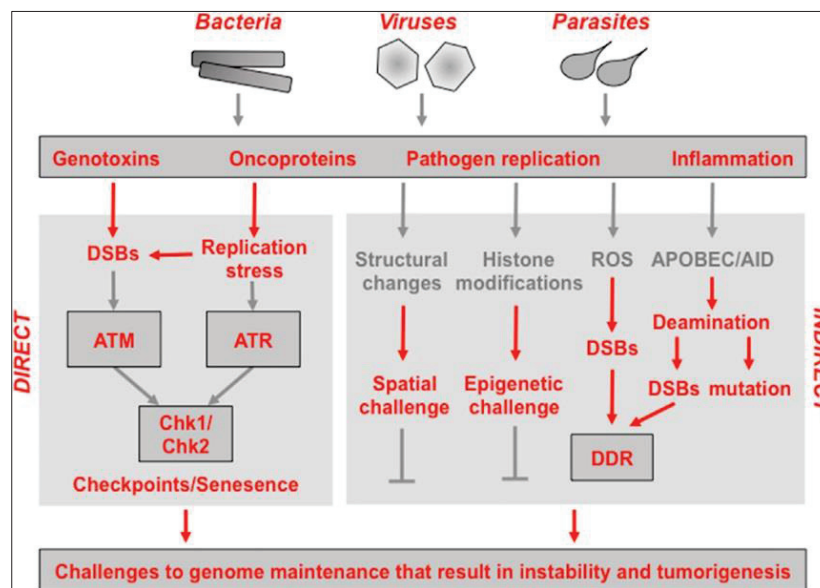


Figure 17. Schéma représentatif des interactions entre les micro-organismes et la machinerie de maintien de la stabilité génomique (Weitzman & Weitzman, 2014).

2.1 Infections bactériennes et dommages à l'ADN

Plusieurs études ont démontré que les bactéries pathogènes sont capables d'altérer le génome de la cellule hôte en produisant des CDBs et des modifications de l'ADN ainsi que d'interagir avec la DDR (Figure 18).

L'implication des toxines bactériennes dans la génération de dommages dans l'ADN cellulaire a clairement été démontrée. La caractérisation de l'îlot génomique « *pks* » présent dans les souches d'*Escherichia Coli* pathogènes appartenant au groupe phylogénétique B2 a permis d'identifier une génotoxine, la colibactine, qui est capable d'induire de multiples CDBs dans l'ADN. L'infection de cellules eucaryotes par des souches *E.coli pks+* conduit à l'activation de la protéine kinase ATM et des voies de signalisation en aval (Chk2 et Chk1) (Nougayrede *et al.*, 2006). Aussi, il est fortement suspecté que l'accumulation des CDBs lors

de l'infection par ces bactéries pks⁺ participerait aux processus de transformation cellulaire préalables au développement de cancers (Cuevas-Ramos *et al.*, 2010). L'îlot pks a depuis été retrouvé chez plusieurs entérobactéries dont *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella pneumoniae* et serait également à l'origine de l'apparition de CDBs dans les cellules infectées par ces bactéries. La toxine CDT (cytolethal distending toxin) produite par diverses bactéries pathogènes Gram⁻, notamment *Escherichia coli*, *Helicobacter ducreyi* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et plus récemment *Salmonella dysenteriae*, *Campylobacter sp* et *Salmonella enterica* serovar Typhi, est également responsable de l'accumulation de CDBs (propriété ayant été associée à une activité nucléasique de la sous-unité B de la CDT) et de l'activation des voies de signalisation ATM-Chk2 et ATR-Chk1 (Grasso & Frisan, 2015; Weitzman & Weitzman, 2014). L'infection par *Pseudomonas aeruginosa* s'accompagne elle aussi par l'apparition de CDBs induite par la toxine ExoS (et à moindre mesure ExoT) (Elsen *et al.*, 2013). Cette activité (dépendante d'un système de sécrétion de type III fonctionnel à la surface de la bactérie) est associée à une activation d'ATM et pourrait résulter de la production de réactifs oxygénés.

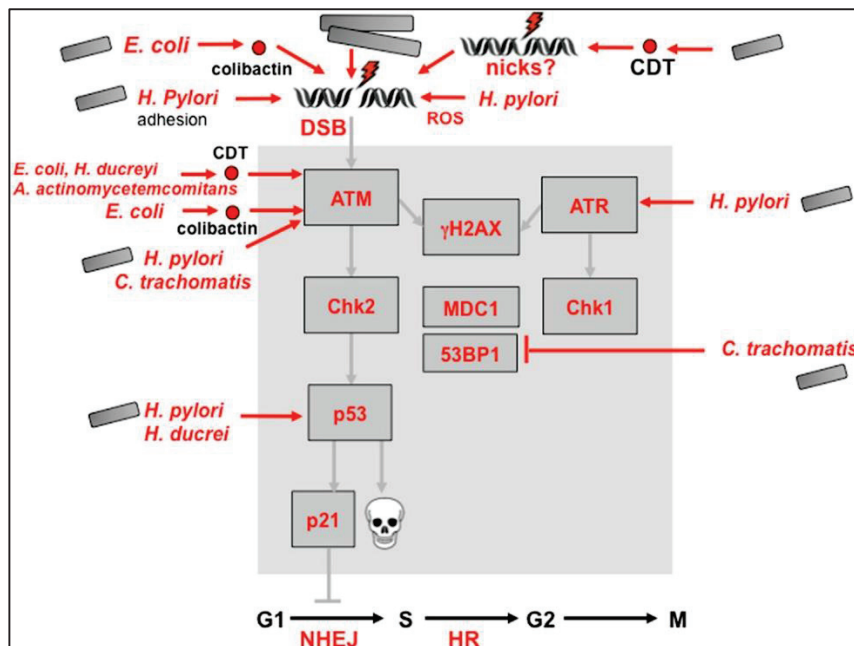


Figure 18. implication des infections bactériennes dans l'induction de l'instabilité génomique (Weitzman & Weitzman, 2014).

Certaines bactéries sont capables de provoquer des dommages à l'ADN dans les génomes des cellules hôtes indépendamment de l'action de toxines. La bactérie pathogène *Listeria monocytogenes* génère des CDBs et active une réponse aux dommages à l'ADN de type DNA-PK (Leitao *et al.*, 2014). L'induction de ces dommages est indépendante de l'activité de la toxine Lystériolysine (LLO) produite par *Listeria*. Il faut toutefois noter que cette toxine agit sur la DDR puisqu'elle est capable d'inhiber l'activation d'ATM en induisant la dégradation de la protéine Mre11 du complexe MRN et de diminuer l'expression des protéines ATM et 53BP1 (Samba-Louaka *et al.*, 2014).

La génotoxicité de certaines bactéries a été associée à l'apparition d'instabilité génomique dans les cellules pouvant conduire au développement de cancers. Ceci a particulièrement été illustré lors d'infections par *Helicobacter pylori*, bactéries à l'origine de cancers intestinaux. *H.pylori* est en effet capable d'induire des CDBs et de générer des réactifs oxygénés (ROS) dans les cellules infectées aboutissant au recrutement des voies ATM et ATR et à l'activation des checkpoints cellulaires. Parallèlement, *H.pylori* inhibe la réparation de ces dommages à l'ADN en provoquant une diminution de l'expression des protéines impliquées dans les systèmes de réparation de l'ADN (MMR et BER) et une augmentation de la dégradation de la protéine p53 par le protéasome. Aussi l'apparition des lésions dans l'ADN cellulaire associées à une réparation imprécise des dommages contribuerait significativement à l'accumulation des anomalies chromosomiques observées dans les cancers gastriques associés à *H.pylori* (Jang *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2009; Toller *et al.*, 2011).

2.2 Infections parasitaires et dommages à l'ADN

Les modalités d'interaction des parasites avec les voies de DDR sont jusqu'à l'heure peu connues. Toutefois, des études ont montré une modulation directe de ces voies par les parasites de la famille des Apicomplexes (Figure 19). Ainsi, une étude récente a suggéré la capacité du parasite *Toxoplasma gondii* à induire des lésions dans l'ADN des rétines de souris infectées (El-Sayed & Aly, 2014). D'autres parasites de cette famille seraient également capables d'interagir directement avec la protéine p53 à l'image de *Plasmodium* et de *Theileria annulata* dont l'infection conduit à la séquestration cytoplasmique de p53. Une autre étude a montré que les lymphocytes infectés par *Theileria parva* présentent une surexpression de mdm 2 associée à une inactivation de la DDR (Weitzman & Weitzman, 2014).

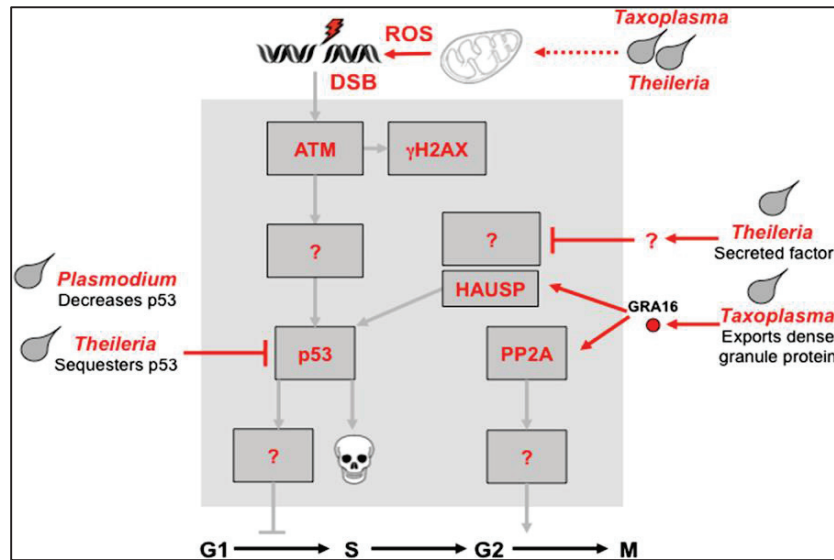


Figure 19. Schéma représentatif des interactions entre les apicomplexes et la machinerie de maintien de la stabilité génomique (Weitzman & Weitzman, 2014).

Il a récemment été rapporté que le parasite *Theileria* serait responsable du développement de lymphomes et que la production de ROS induite par l'invasion parasitaire pourrait participer à l'instabilité génomique à l'origine de la transformation cellulaire induite par ce parasite (Medjkane *et al.*, 2014).

2.3 Infections virales et dommages à l'ADN

Les infections virales constituent une agression majeure pour la cellule hôte et l'activation de la DDR peut s'avérer être dans certains cas une réponse cellulaire antivirale efficace (Figure 20). En effet, rapidement après l'infection, les génomes viraux peuvent être reconnus par la cellule comme de l'ADN endommagé conduisant à l'activation de la DDR et à l'arrêt prolifératif des cellules infectées voire à la mort de celles-ci et de ce fait à l'élimination du virus. D'autres mécanismes peuvent participer à l'activation de la DDR tels que l'induction de dommages à l'ADN par les virus ou encore via l'action de protéines virales. Qu'ils soient à ADN ou à ARN, plusieurs virus ont été démontrés comme étant capables de déclencher la DDR (Figure 20) (Baer *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2013; Kinjo *et al.*, 2010; Koyama *et al.*, 2013; Lilley *et al.*, 2007; McKinney *et al.*, 2015; Skalka & Katz, 2005; Turnell & Grand, 2012a; Weitzman & Weitzman, 2014; Wu *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Aussi, compte tenu du caractère antiviral que peut revêtir la DDR, cette réponse cellulaire à l'infection est souvent manipulée par les virus déployant une multitude de stratégies visant à

supprimer la signalisation de la DDR afin d'assurer la survie de la cellule hôte et de créer un environnement bénéfique au cycle viral (Luftig, 2014).

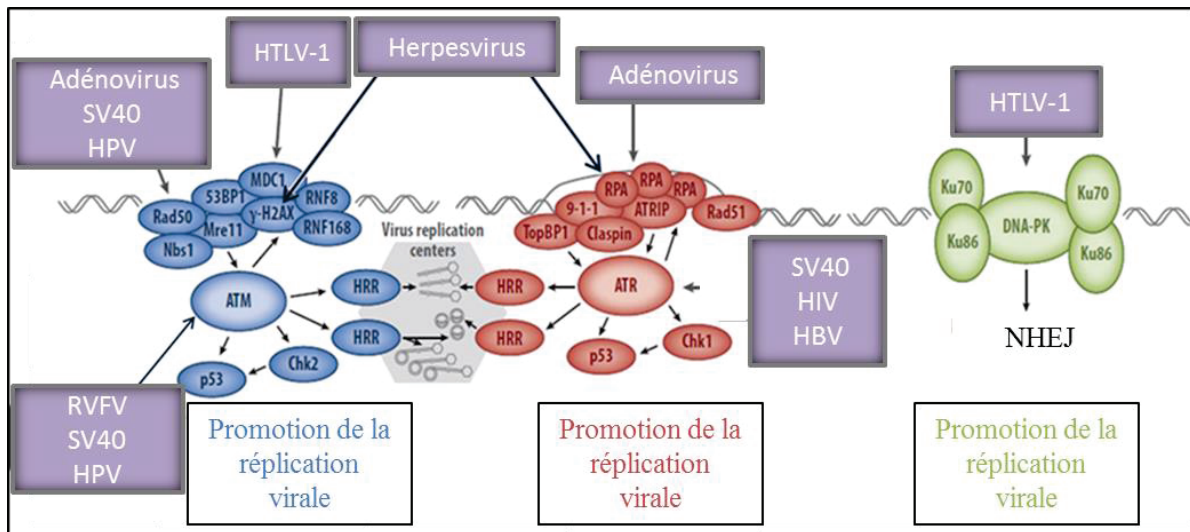


Figure 20. Schéma représentatif des interactions entre les virus et la DDR (Luftig, 2014).

La régulation des voies de DDR par les virus étant un champ thématique extrêmement large et mon projet de thèse portant sur un herpesvirus oncogène, j'ai souhaité m'attarder plus spécifiquement dans le chapitre qui suit sur les interactions existant entre les herpesvirus et les voies de DDR en mettant plus particulièrement l'accent sur les herpesvirus tumorigènes.

CHAPITRE 3

Herpesvirus et dommages à l'ADN

3.1 La famille des *herpesviridae*

3.1.1 Généralités

Cette famille regroupe actuellement plus de 200 espèces infectant les animaux, les poissons, les amphibiens et les êtres humains. Chez l'homme, 8 espèces ont été identifiées à ce jour. Il s'agit d'un groupe de virus ubiquitaire ayant une grande spécificité d'hôte et un tropisme cellulaire étroit. Toutefois, il n'est pas exclu qu'une même espèce hôte soit infectée par plusieurs herpesvirus. Une caractéristique principale des herpesvirus est leur potentiel à entrer en latence, leur permettant d'échapper au système immunitaire et de persister dans les cellules infectées durant toute la vie de son hôte. Ces virus sont généralement responsables d'infections bénignes chez l'homme néanmoins elles peuvent avoir un fort potentiel de mortalité et de morbidité chez certains patients à risques, notamment chez les personnes immunodéprimées (Pellett PE, 2007).

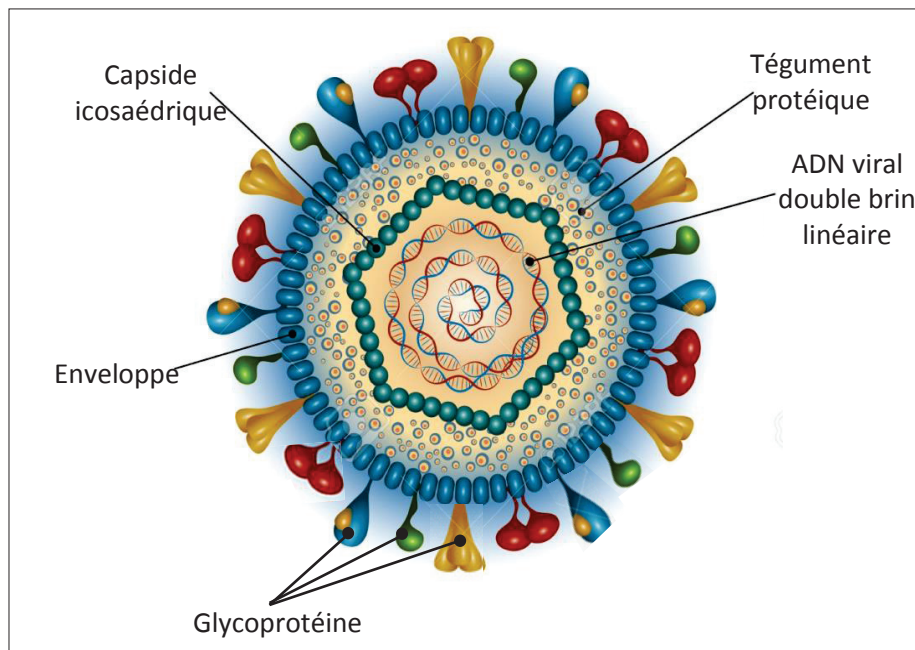


Figure 21. Représentation schématique d'une particule d'herpesvirus.

Une particule herpesvirale est classiquement constituée d'un génome ADN double-brin linéaire de 120 à 230 Kbp contenu dans une capside à symétrie icosaédrique, l'ensemble constituant la nucléocapside (Figure 21). Cette dernière est entourée d'un tégment protéique correspondant à une structure organisée caractéristique des herpesvirus qui est constitué d'un réseau de complexes protéiques souvent agencé de façon asymétrique. Le tégment représente

65% du volume de la particule virale et il est essentiel au déroulement du cycle viral. La composition du tégument varie au cours de la morphogenèse et en fonction du virus considéré (Liu & Zhou, 2007; Pellett PE, 2007). De par sa richesse protéique, le tégument présente de multiples rôles notamment dans la maturation et la production des virions. Le tégument est délimité par l'enveloppe virale. Elle est constituée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire dans laquelle sont insérées un ensemble de glycoprotéines virales qui jouent un rôle clé dans le cycle viral en permettant notamment l'adhésion et la pénétration du virion dans la cellule hôte. Ces glycoprotéines participent aussi à la morphogenèse virale lors du processus d'enveloppement/dé-enveloppement de la particule virale conduisant au transport des capsides du noyau au cytoplasme (Liu & Zhou, 2007; Pellett PE, 2007).

3.1.2 La classification des herpesvirus

L'ordre des Herpesvirales est composé de 3 familles virales : les *Herpesviridae* infectant les mammifères, les oiseaux et les reptiles ; les *Alloherpesviridae* regroupant des virus qui infectent les poissons et les amphibiens et les *Malacoherpesviridae* représentés par l'Ostreid herpesvirus 1, un herpesvirus infectant les mollusques bivalves.

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons à la famille des *Herpesviridae*. Les virus appartenant à cette famille virale ont été classés en 3 sous-familles par le comité international de taxonomie des virus « ICTV » sur la base de leur organisation génomique (Figure 22).

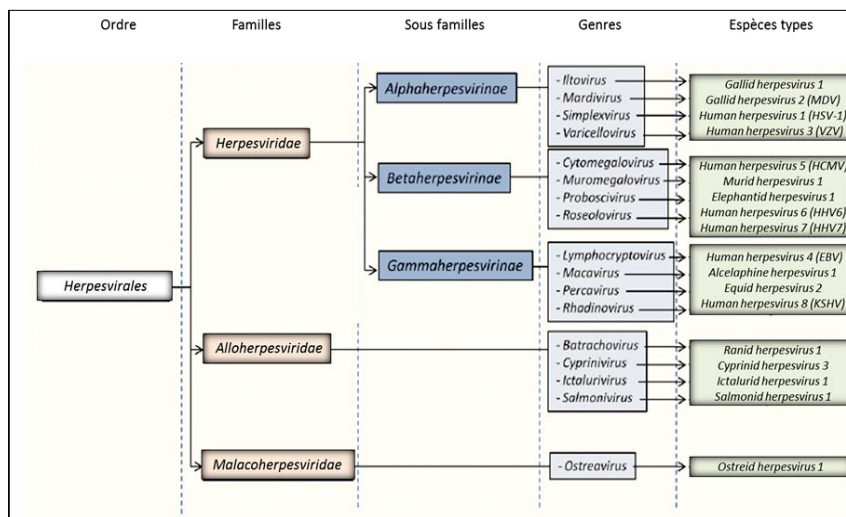


Figure 22. La famille des Herpesviridae (Pellett PE, 2007).

La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* regroupe des virus à tropisme neurotrope tels que les virus humains de l'herpès simplex 1 et 2 (HSV-1 ou HHV1 et HSV-2 ou HHV2) et le virus de la varicelle (VZV ou HHV3), ou encore des virus infectant les volailles dont le virus de la maladie de Marek. Les alphaherpesvirus sont généralement caractérisés par un cycle réplcatif relativement court et établissent une infection latente dans les ganglions neuro-sensitifs. La deuxième sous-famille, les *Betaherpesvirinae* comporte le cytomégalo virus (CMV ou HHV5) et les l'herpèsvirus humains 6 (HHV6) et 7 (HHV7). Ces virus se caractérisent par un cycle réplcatif plus long et entrent en latence dans les glandes sécrétoires, le système lymphoréticulaire, les cellules épithéliales et les leucocytes. Finalement, la sous-famille des *Gammapherpesvirinae*, est constituée de virus principalement lymphotropes comme le virus d'Epstein-Barr (EBV ou HHV4) et l'herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV8). Ces virus se singularisent par leur spécificité d'hôte et un cycle réplcatif long. Ils se répliquent dans les cellules lymphoblastoïdes dans lesquelles ils sont capables d'établir une infection latente *in vivo*. Cette sous-famille de virus regroupe plusieurs virus oncogènes chez l'homme dont le virus KSHV associé à l'apparition de lymphomes et le virus d'Epstein Barr (EBV) qui est à l'origine de la mononucléose infectieuse et du développement de divers lymphomes (Burkitt, maladie de Hodgkin, lymphomes non-hodgkiniens, lymphomes T) (Ann Arvin, 2007; Pellett PE, 2007; Roizmann *et al.*, 1992; Sedy *et al.*, 2008).

3.1.3 Cycle viral des herpesvirus

3.1.3.1 Entrée

L'entrée des particules herpesvirales dans la cellule peut s'effectuer par 2 mécanismes, soit par fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique cellulaire, soit par endocytose de la particule et fusion de l'enveloppe virale avec la membrane vésiculaire libérant ainsi la particule virale dans le cytoplasme (Figure 23). Les processus de reconnaissance, d'adhésion et de fusion du virus au niveau de la membrane plasmique font intervenir les glycoprotéines présentes dans l'enveloppe virale (notamment gC et gD) qui peuvent se lier à divers récepteurs cellulaires de type nectines, héparanes sulfates ou des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs au TNF.

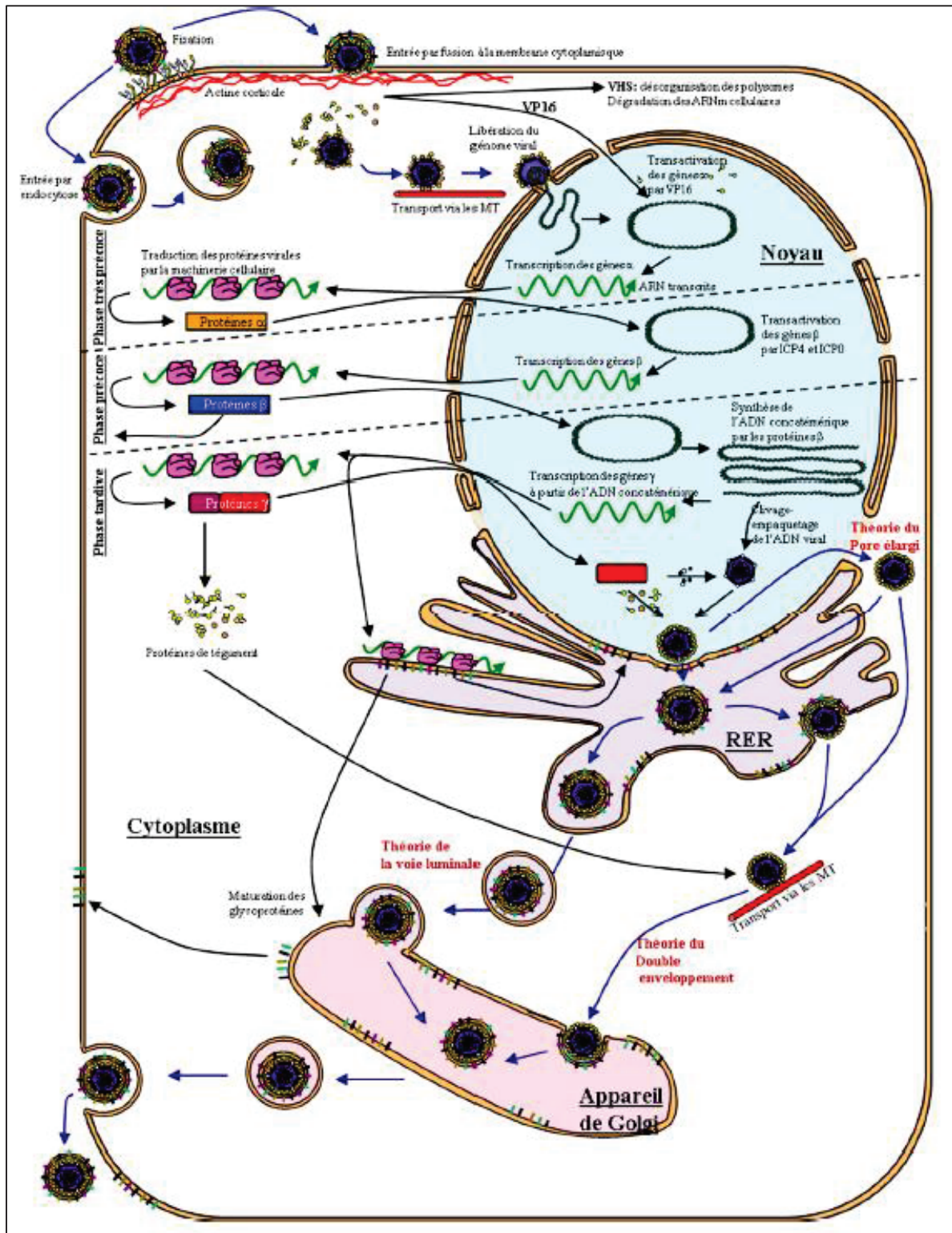


Figure 23. Schéma du cycle de réplication des herpesvirus.

MT : microtubule ; VHS : virion host shut-off protein ; RER : réticulum endoplasmique rugueux (Flint, 2000).

3.1.3.2 Transport vers le noyau

Rapidement après la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, une partie des protéines du tégument se dissocient de la nucléocapside qui est alors véhiculée vers le noyau par un transport actif assuré par le réseau de microtubules (Sodeik, 2000). Au niveau du noyau, l'ADN viral est alors relargué dans le nucléoplasme après la liaison de la capside virale au pore nucléaire, via un processus faisant intervenir l'importine β (Ojala *et al.*, 2000).

3.1.3.3 Maintien nucléaire du génome viral

Dans le nucléoplasme, le génome viral est partiellement chromatinisé et se circularise (Garber *et al.*, 1993; Strang & Stow, 2005; Su *et al.*, 2006). Si l'existence de ces formes épisomales (environ 30 minutes après l'infection) a été observée, le mécanisme de circularisation responsable de leur formation reste encore à élucider (Roizman *et al.*, 2005). Chez HSV-1, il a été spéculé que la circularisation du génome viral ferait intervenir les séquences terminales inversées et répétées du génome et des événements de recombinaison homologue qui seraient induits par des facteurs cellulaires. Néanmoins, ces séquences inversées et répétées n'existent pas chez tous les herpesvirus. Aussi, un autre mécanisme alternatif a été suggéré impliquant une ligature directe des extrémités génomiques (Boehmer & Nimonkar, 2003). Il faut noter que tous les génomes herpesviraux ne subiraient pas de circularisation, en particulier aucune forme épisomale n'a été décrite pour le génome du virus de la maladie de Marek. D'autre part, la chromatinisation du génome viral résultant du dépôt d'histones sur l'ADN du virus, pourrait constituer une réponse cellulaire visant à inhiber l'expression des gènes viraux (Kent *et al.*, 2004). Aussi, le virus HSV-1 contrecarre cette réponse anti-virale notamment par le biais de sa protéine tégumentaire VP16. En effet, ce transactivateur viral permet le recrutement d'histones acétyltransférases (CBP/p300) et de lysines déméthylases au niveau de l'ADN viral qui modifieraient les histones afin de favoriser la transcription et la synthèse des protéines virales (Herrera & Triezenberg, 2004; Kalamvoki & Roizman, 2011).

3.1.3.4 Réplication virale

L'expression des gènes viraux est finement régulée et ordonnée de façon séquentielle. Les gènes viraux sont classés en 3 groupes selon leur cinétique d'expression dans le cycle viral : les gènes très précoces (gènes α), précoces (gènes β) et tardifs (gènes γ) (Figure 24).

3.1.3.4.1 Phase très précoce

Chez HSV-1, la phase très précoce est initiée par la protéine virale VP16 qui après sa dissociation du tégument est rapidement redirigée vers le noyau et s'associe avec les facteurs cellulaires de transcription HCT-1 et Oct-1. Cette interaction permet à la VP16 de se lier sur des séquences régulatrices consensus 5'TAATGARAT3' présentes dans les promoteurs des gènes très précoces (Wysocka & Herr, 2003). Le domaine d'activation de VP16 permet également le recrutement de l'ARN polymérase II cellulaire et interagit avec les facteurs généraux de transcription (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIF, TFIIH) composant le complexe d'initiation de l'ARNpolII. De plus, ce domaine de VP16 assure le recrutement des co-activateurs de la transcription permettant de rendre l'ADN accessible aux facteurs de transcription.

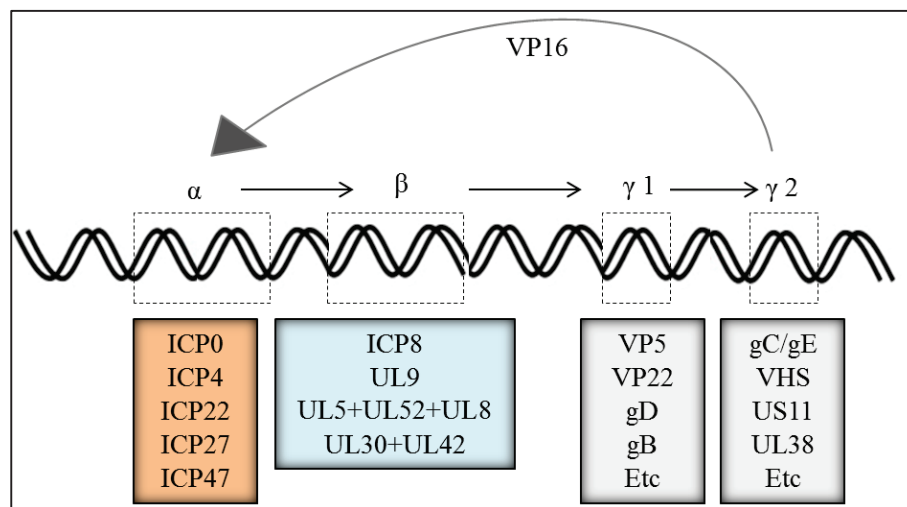


Figure 24. Activation de l'expression des gènes viraux lors de la réplication de HSV-1
(Roizman *et al.*, 2005)

Les protéines très précoces, ICP0 (Infected Cell Polypeptide 0), ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47, codées par ces gènes α sont principalement des protéines transactivatrices (à l'exception de ICP47) de l'expression des gènes viraux précoces β et tardifs γ . De plus, ces protéines transactivent des gènes cellulaires afin de créer un environnement cellulaire propice à la réplication du virus (Boehmer & Nimonkar, 2003; Roizman *et al.*, 2005).

La protéine ICP0 (Infected Cell Polypeptide 0) codée par HSV-1 joue un rôle majeur dans le cycle lytique du virus. La délétion de ICP0 du génome viral induit une forte diminution de réplication du HSV-1 en culture de cellule ainsi qu'un défaut d'expression génique majeur (Sacks & Schaffer, 1987). De par son activité E3 ubiquitine ligase, ICP0 a la capacité d'induire la dégradation protéolytique de nombreuses protéines cellulaires dont les composants des structures nucléaires ND10 (Nuclear Domain) (Lilley *et al.*, 2011). Les ND10 sont composés de l'accumulation inter-chromosomique de nombreuses protéines dont les principales sont les PML "ProMyelocytic Leukemia protein", Daxx (death domain-associated protein), ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) et Sp100 (SP100 nuclear antigen) (Maul *et al.*, 2000). Les ND10 auraient des rôles multiples puisqu'ils seraient impliqués dans l'oncogenèse, la réparation des dommages à l'ADN, l'apoptose, la réponse au stress, la sénescence et régulerait l'expression des gènes notamment en participant au remodelage de la chromatine (Tavalai & Stamminger, 2008). De plus, il a été démontré que les ND10 participeraient à la défense cellulaire anti-virale de par leur étroite association avec le système interféron et leur activité répressive de la réplication virale médiée par des modifications épigénétiques des génomes viraux (Everett & Chelbi-Alix, 2007; Regad & Chelbi-Alix, 2001). Aussi, il n'est pas surprenant que les virus concernés tels que HSV-1, CMV et EBV aient développé des stratégies visant à abolir cette action délétère au cycle viral (Bell *et al.*, 2000; Everett & Maul, 1994; Koriath *et al.*, 1996). En effet, les ND10 constituent le site de réplication préférentiel des herpèsvirus, le génome viral et les protéines nécessaires à leur réplication étant détectés à proximité de ces structures (Lilley *et al.*, 2011). Plusieurs protéines herpèsvirales responsables de la désorganisation des ND10 ont été identifiées notamment ICP0 et IE1 codées par HSV-1 et CMV respectivement. La participation de la protéine ICP0 dans ce mécanisme a été plus particulièrement étudiée révélant la capacité d'ICP0 à induire la dégradation protéolytique des protéines majeures des ND10 (PML et Sp100) et des protéines accessoires RNF8 et RNF168. Il en découle une perte de l'ubiquitylation de l'histone H2A favorisant le recrutement de la machinerie de réparation d'ADN et une amélioration de la croissance virale (Lilley *et al.*, 2010). Cette déstructuration des ND10 par ICP0 permet donc non seulement la levée de la répression de la réplication du génome viral opérée par les protéines composant les ND10 mais également de rendre l'ADN viral accessible aux facteurs nécessaires à sa réplication/transcription, facteurs qui sont disponibles en quantité importante dans les ND10 (Perusina Lanfranca *et al.*, 2013; Rivera-Molina *et al.*, 2013). Ce processus aboutit à la formation de structures transitoires appelées

foyers de pré-réplication préparant leur exploitation comme compartiment de réplication. Il faut noter que certaines protéines virales sont également relocalisées à proximité de ces compartiments telles que les protéines tégmentaires VP13/14, VP22 et la protéine très précoce ICP4 (Everett *et al.*, 2003; Hutchinson *et al.*, 2002).

ICP4 est une protéine virale essentielle impliquée dans la régulation des gènes codés par HSV-1. En effet, ICP4 favorise l'expression des gènes viraux précoces β et tardifs γ , mais est capable de réprimer celle des gènes très précoces α et donc sa propre expression (DeLuca *et al.*, 1985; Leopardi *et al.*, 1995). ICP4 activerait la transcription des gènes β et γ d'une part en facilitant la formation des compartiments pré-réplicatifs viraux et d'autre part en interagissant avec de nombreux facteurs de transcription cellulaire du complexe TFIID dont TBP (TATA-box binding protein) et 12 TAFs (TBP associated factors) et avec TFIIH induisant ainsi le recrutement de certains de ces facteurs dans les compartiments de réplication viraux (Dembowski & DeLuca, 2015; Grondin & DeLuca, 2000; Sampath & Deluca, 2008; Wagner & DeLuca, 2013).

La protéine virale ICP22 est essentielle pour la réplication et la latence de HSV-1 ainsi que pour l'expression des gènes viraux précoces et tardifs (Orlando *et al.*, 2006; Poffenberger *et al.*, 1994). Cette protéine virale se localise dans le noyau des cellules infectées et joue un rôle de régulateur transcriptionnel sur les gènes viraux et cellulaires (Bowman *et al.*, 2009). En effet, ICP22 s'associe avec les complexes transcriptionnels contenant la protéine transactivatrice ICP4, l'ARNpolIII et des facteurs cellulaires dont cdc25c et cdk9 (Durand & Roizman, 2008; Leopardi *et al.*, 1997; Smith-Donald *et al.*, 2008).

La protéine très précoce ICP27 est une protéine régulatrice assurant de multiples fonctions. Elle est notamment impliquée dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes β et γ , dans l'export nucléaire des ARNm viraux et faciliterait leur traduction via son interaction avec les facteurs cytoplasmiques d'initiation de traduction. Cependant, elle serait également responsable de l'inhibition de l'épissage de certains ARNs cellulaires (Fontaine-Rodriguez *et al.*, 2004; Koffa *et al.*, 2001; Sciabica *et al.*, 2003).

3.1.3.4.2 Phase précoce

Cette phase est caractérisée par l'expression des gènes β sous le contrôle des protéines très précoces α . Il s'agit essentiellement de facteurs du réplisome virale. Chez HSV-1, 7 gènes β codent les protéines UL5, UL8, UL9, UL29 (encore appelée ICP8), UL30, UL42 et UL52.

La recombinaise UL29 (ICP8) se lie à l'ADN simple brin et est une protéine essentielle à la réplication virale. Cette protéine joue également un rôle charnière dans l'expression des gènes de réplication puisqu'elle est capable d'interagir avec l'ARN polymérase II et ainsi de participer à la transactivation des gènes tardifs γ essentiels à l'assemblage des particules virales (Boehmer & Nimonkar, 2003; Muylaert *et al.*, 2011). La protéine UL9 se lie aux origines de réplication virale et est responsable du recrutement des autres facteurs du réplisome viral. Les protéines UL5, UL52 et UL8, quant à elles, constituent un complexe hélicase/primase requis pour l'action du complexe ADN polymérase composé de la polymérase virale UL30 et de son facteur de processivité UL42 (Figure 25) (Boehmer & Nimonkar, 2003; Muylaert *et al.*, 2011).

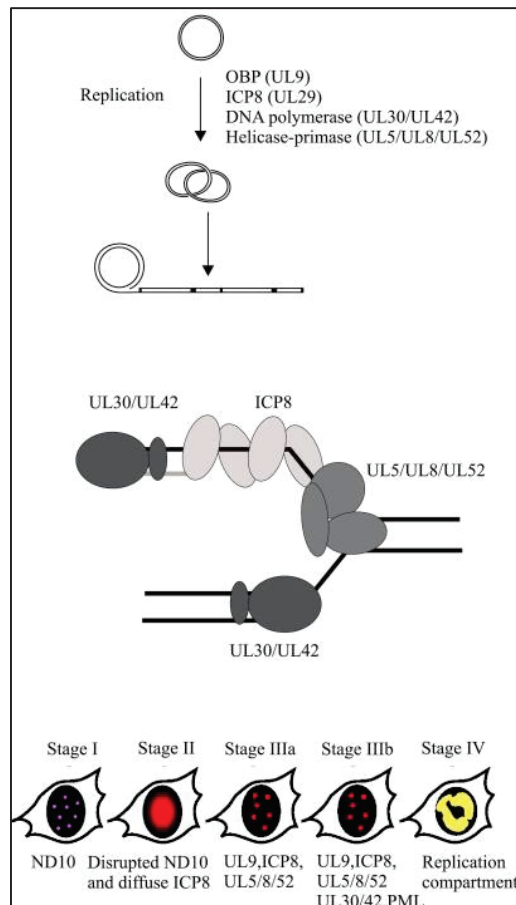


Figure 25. Schéma représentatif de la réplication de HSV-1 (Muylaert *et al.*, 2011).

En plus de leur appartenance au réplisome viral, les protéines β assurent la maturation des compartiments de réplication. On distingue 4 phases de formation de ces compartiments de réplication en se basant sur un marquage de la recombinaise virale ICP8 et de la protéine majeure des ND10, la protéine PML. Suite à l'entrée de HSV-1 dans les cellules, les ND10

sont intactes et expriment la PML (stade I). Puis, la dégradation des protéines PML et Sp100 sous l'action d'ICP0 induit la déstabilisation des ND10 et leur transformation en compartiments de pré-réplication (stade II), phase également concomitante avec le début de l'expression des gènes précoces dont la recombinaison ICP8 fait partie. Le recrutement de la protéine UL9 et le complexe hélicase primase UL5, UL52 et UL8 est alors à l'origine de l'évolution des compartiments de pré-réplication (stade III). En effet, les virus déficients de la protéine UL9 ou du complexe hélicase/primase ne sont pas capables de former des compartiments de stade III. Ce stade est aussi caractérisé par le recrutement du complexe polymérase UL30/UL42. Bien que son action ne soit pas nécessaire à l'évolution vers le stade 3, le complexe polymérase est essentiel au recrutement de nouvelles protéines PML jouant un rôle primordial dans l'accumulation des facteurs cellulaires de la machinerie de réplication. Ces compartiments de stade III sont rapidement remplacés par des compartiments de réplication matures de stade IV; site ultime de la réplication virale (Burkham *et al.*, 2001; Burkham *et al.*, 1998). A ce stade, le génome viral sous forme épisomale est répliqué en tandem selon le modèle de cercle roulant (rolling circle) aboutissant à la formation de concatémères constitués d'une juxtaposition de plusieurs copies linéaires du génome viral. Les concatémères sont alors clivés afin d'obtenir plusieurs unités génomiques monomériques qui seront ensuite encapsidées (Boehmer & Nimmonkar, 2003).

3.1.3.4.3 Phase tardive et sortie des capsides virales du noyau

Les gènes tardifs γ codent pour des protéines de structures telles que les protéines de capsides, de tégument et les glycoprotéines présentes dans l'enveloppe des virions. L'expression de ces gènes est contrôlée par les protéines α et β . L'assemblage de la capside et l'empaquetage de l'ADN viral se font dans le noyau. Le mécanisme de sortie des capsides du noyau reste encore aujourd'hui controversé.

Trois scénarios de sortie sont subodorés : la théorie de la voie luminale, la théorie du double enveloppement et la théorie du pore élargi (Figure 26).

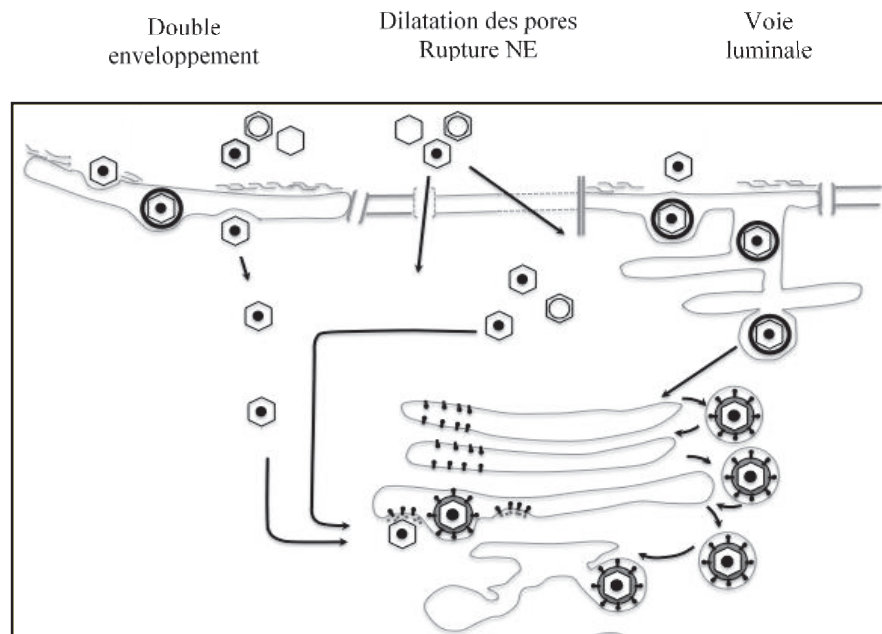


Figure 26. Schéma représentatif des voies de sortie des capsides herpesvirales des noyaux de leurs cellules hôtes herpesvirus (Denesvre, 2013).

La sortie par la voie luminale (proposée pour HSV-1 et VZV) consiste en l'enveloppement des nucléocapsides suite à leur bourgeonnement au niveau de la membrane nucléaire interne suivi de leur transport dans l'espace péri-nucléaire et de leur prise en charge par le réticulum endoplasmique puis par le Golgi (Leuzinger *et al.*, 2005). Les particules virales sont ensuite transportées vers la membrane plasmique et sont libérées par exocytose dans le milieu extracellulaire. La théorie du double enveloppement implique une étape d'enveloppement des capsides virales par bourgeonnement au niveau de la membrane interne nucléaire et d'un dé-enveloppement au niveau de la membrane externe (Denesvre, 2013; Mettenleiter *et al.*, 2013). Les capsides cytoplasmiques vont s'entourer des protéines de tégument et subir un ré-enveloppement au niveau du réseau trans-golgien. Les particules virales sont alors contenues dans des vésicules cytoplasmiques qui rejoindront la membrane plasmique et seront libérées par exocytose. Enfin, la théorie du pore élargi, décrite à la base pour HSV-1 et l'herpesvirus bovin de type 1, résulte d'un passage direct des nucléocapsides dans le cytoplasme par des pores nucléaires élargis ou suite à une rupture de l'enveloppe nucléaire (Denesvre, 2013; Klupp *et al.*, 2011; Leuzinger *et al.*, 2005).

3.1.3.5 Latence virale

Il s'agit d'une étape énigmatique typique des herpesvirus désignant une persistance du génome viral dans les cellules infectées accompagnée d'une restriction de son expression génique. La latence est régulée par des mécanismes épigénétiques de l'hôte faisant appel à la dynamique de la chromatine et notamment à des motifs particuliers de méthylation et d'acétylation des histones régulant l'accès de la machinerie de réplication aux promoteurs viraux (Grinde, 2013). En effet, lors de la latence du virus HSV-1, les promoteurs des gènes lytiques (ex : ICP4) sont complexés à des histones hypo-acétylés ou hyper-méthylés (généralement associées à l'hétérochromatine) aboutissant à la répression de l'expression de ces gènes. En revanche, les promoteurs des gènes exprimés lors de la latence (ex : Latency Associated Transcripts; LATs) sont associés à des histones hyper-acétylés permettant leur expression lors de cette phase du cycle viral (Nevels *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2005). La régulation de l'expression des gènes viraux lors de la latence permet au virus d'échapper aux réponses immunitaires et ainsi de persister dans la cellule hôte. Il faut cependant noter que la phase de latence est également conditionnée par la capacité du virus à redémarrer un cycle lytique appelé réactivation virale (Speck & Ganem, 2010).

La plupart des herpesvirus tel que HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV et KSHV maintiennent leurs génomes lors de la phase de latence sous forme épisomale extra-chromosomique (Aranda & Epstein, 2015; Arbuckle & Medveczky, 2011). Cependant, certains virus vont persister dans les cellules en intégrant leur génome dans l'ADN de leur hôte. L'intégration du génome des virus de la maladie de Marek (MDV) et du virus HHV-6 a été mise en évidence respectivement dans les lymphocytes T CD4⁺ activées et les macrophages/monocytes (Arbuckle & Medveczky, 2011; Kaufer *et al.*, 2011). L'intégration du génome d'EBV a également été détectée dans plusieurs lignées cellulaires transformées par EBV ainsi que dans des biopsies de carcinomes nasopharyngés de patients infectés par EBV. Cependant, l'intégration du virus EBV reste encore à l'heure actuelle à préciser étant donné qu'elle n'est pas systématique et ne serait pas essentielle à la persistance du virus lors de la latence. De plus, aucune réactivation à partir des formes intégrées de EBV n'a été constatée et il a été démontré que le virus ne peut pas se répliquer en absence des formes épisomales (Morissette & Flamand, 2010).

La latence virale de HSV-1 se produit dans les neurones sensitifs et est caractérisée par l'expression d'ARNs antisens du gène ICP4 appelés Latency Associated Transcripts (LATs) (Nicoll *et al.*, 2012). Les LATs favorisent la survie des neurones infectés, potentiellement en

inhibant l'apoptose induite par l'infection herpétique, et sont impliqués dans la répression de l'expression des gènes lytiques (Perng *et al.*, 2000). Huit miRs sont, en effet, exprimés à partir de la région LAT durant la latence et seraient à l'origine de l'activité répressive des LATs sur l'expression des gènes lytiques notamment ICP0 et ICP4 (Umbach *et al.*, 2008). Le virus EBV est capable d'établir une infection latente dans les lymphocytes B et les cellules épithéliales. La latence d'EBV est caractérisée par l'expression de 8 protéines (EBNA1, EBNA2, EBNA3A/3B/3C, EBNA-LP, LMP1 et LMP2), de petits ARN non-codants (EBERs) et de miRs (BART et BHRF1). Ces différents facteurs associés à la latence ont de multiples rôles, ils sont notamment responsables du maintien épisomal du génome EBV, favorisent la prolifération des cellules infectées et participent à la tumorigenèse induite par EBV (Figure 27).

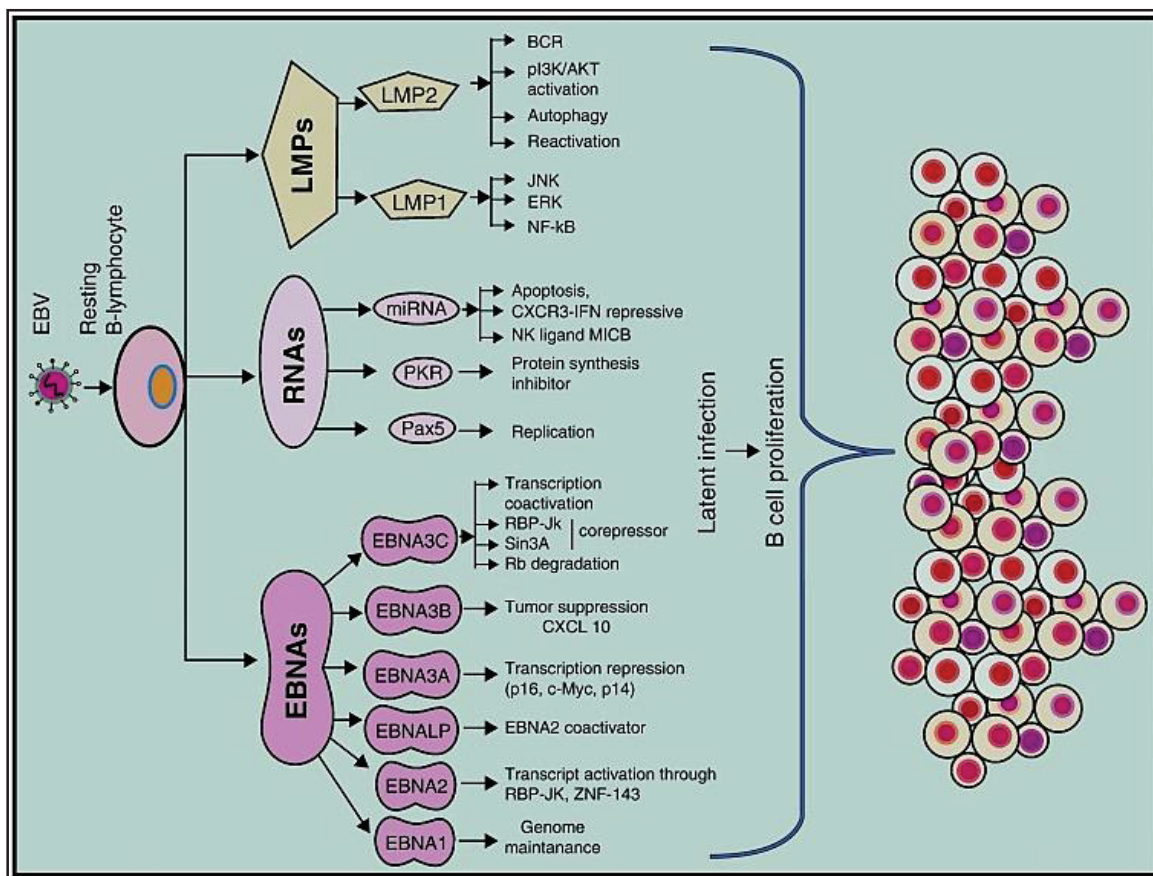


Figure 27. Schéma représentatif des facteurs de virulences exprimés au cours de la latence d'EBV (Kempkes & Robertson, 2015).

3.1.3.6 Tumorigenèse

A l'exception du virus de la maladie de Marek, les herpesvirus oncogènes sont regroupés dans la sous-famille des *Gammaherpesvirinae*. Aussi, l'implication des infections par les virus humains EBV et KSHV et le virus murin MHV-68 a clairement été démontrée dans le développement de maladies néoplasiques. Il faut noter que bien qu'étant un alphaherpesvirus, le MDV infecte principalement les lymphocytes dans lesquelles il se réplique et est capable d'établir une infection latente. Aussi, de par son lymphotropisme et sa pathogénèse, le MDV se rapproche des gammaherpesvirus. Ces herpesvirus oncogènes partagent donc la capacité d'établir une phase de latence dans des cellules lymphocytaires parmi lesquelles certaines vont être transformées et être à l'origine du développement de tumeurs. La tumorigenèse viro-induite est un processus complexe et multifactoriel qui n'est actuellement pas totalement élucidé. Plusieurs oncogènes codés par les herpesvirus ont été identifiés. Leur expression aboutit à la modulation de la réponse immunitaire, la dérégulation de la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et l'induction d'instabilité génomique, l'ensemble de ces événements participant à la transformation cellulaire.

Un des mécanismes majeurs impliqué dans l'induction de la transformation viro-induite est l'inactivation de la protéine suppressive des tumeurs p53 responsable de l'arrêt du cycle cellulaire et du déclenchement de l'apoptose. La protéine LANA codée par KSHV interagit avec p53, réprime son activité transcriptionnelle et inhibe sa capacité à engendrer une signalisation apoptotique. Tout comme LANA, l'oncoprotéine EBNA3C codées par EBV inactivent l'activité p53, notamment en s'associant avec p53 et en induisant sa dégradation protéolytique (Saha *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2009). En revanche, la protéine LMP-1 codée par EBV inactive l'action de p53 de façon indirecte en induisant l'expression de son antagoniste $\Delta Np73\alpha$ (Accardi *et al.*, 2013).

Par ailleurs, la dérégulation du cycle cellulaire est induite par les herpesvirus oncogènes en agissant sur le suppresseur de tumeur pRB. Ce dernier est inactivé par LANA conduisant à la libération du transactivateur cellulaire E2F forçant ainsi la cellule à dépasser le checkpoint cellulaire G1/S (Wen & Damania, 2010). De la même façon, EBNA-3C induit la transition G1/S en déclenchant la dégradation protéolytique de pRB et en stabilisant la Cycline D1 (Saha *et al.*, 2011; Saha *et al.*, 2012).

Les herpesvirus oncogènes engendrent également l'immortalisation des cellules infectées en modulant l'activité de la télomérase. La sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) est une cible préférentielle de ces virus. LMP-1 est capable de moduler l'activité télomérase en induisant l'association de hTERT et NF- κ B provoquant ainsi la translocation de hTERT vers le noyau dans les cellules de carcinome nasopharyngé (NPC) augmentant ainsi l'activité télomérase (Ding *et al.*, 2005b). De plus, LMP-1 est aussi capable de réguler hTERT au niveau transcriptionnel dans les lymphocytes B en activant son promoteur (Terrin *et al.*, 2008). Comme LMP-1, l'oncoprotéine LANA de KSHV favorise l'expression du promoteur de hTERT via la modulation de SP1 dans les lignées fibroblastiques et lymphocytaires (Verma *et al.*, 2004).

L'instabilité génomique est une pierre angulaire de l'établissement de la tumorigenèse. Elle peut être occasionnée par l'apparition de mutation, de dommages à l'ADN et/ou par la régulation de la DDR. Mon projet de thèse vise à étudier l'implication des dommages à l'ADN dans la pathogenèse d'un herpesvirus oncogène. Aussi, j'ai souhaité développer plus particulièrement ce sujet dans les paragraphes suivants.

3.2 Infection par les herpesvirus, dommages à l'ADN et DDR

L'impact des infections par les herpesvirus sur l'intégrité de l'ADN cellulaire est non-négligeable et revêt une importance particulière dans le contexte d'infection par les herpesvirus oncogènes. De plus, les herpesvirus ont également une grande capacité à moduler les voies de réponse à l'ADN (DDR) soit en les activant, soit en les réprimant ou en détournant spécifiquement certaines parties de la signalisation de ces DDR. La régulation des DDR par les herpesvirus leur permet non seulement de promouvoir leur cycle viral (réplication, persistance dans les cellules hôtes), mais également d'échapper à la réponse antivirale mise en œuvre par les cellules via la DDR.

3.2.1 Mécanismes d'activation de la DDR par les herpesvirus

L'infection par les herpesvirus est classiquement à l'origine de l'induction de la voie ATM. Cela a été démontré pour les alphaherpesvirus HSV1, HSV2 et VZV, le betaherpesvirus HCMV et les gammaherpesvirus EBV, KSHV et MHV-68 (Hau *et al.*, 2015; Hollingworth *et al.*, 2015; Shirata N1, 2005; Shirata *et al.*, 2005; Tarakanova *et al.*, 2007; Xiaofei & Kowalik, 2014; Yamamoto *et al.*, 2014). Cependant, certains herpesvirus sont

capables d'activer l'expression de certains facteurs impliqués dans les autres voies de DDR, tout en inhibant le fonctionnement de cette dernière.

Les DDR peuvent être activées par les herpesvirus par différents mécanismes plus ou moins directs.

3.2.1.1 Induction de dommages dans l'ADN des cellules hôtes

Certains herpesvirus sont capables d'induire des dommages dans les chromosomes des cellules hôtes. L'infection de cellules en phase S par HCMV est occasionne des lésions dans le chromosome 1 (en position 1q42 et 1q21). Des lésions ont été également décrites lors d'infection par HSV, toutefois la localisation de ces dommages reste controversée et dépend du type cellulaire considéré (Fortunato *et al.*, 2000; Xiaofei & Kowalik, 2014). Stich et collaborateurs ont initialement décrit la présence de lésions chromosomiques généralisées dans des cellules embryonnaires pulmonaires humaines suite à une infection par HSV. Parmi les cellules infectées, 35% présentaient au moins une lésion sur un chromosome ou une chromatide et après 22 heures d'infection 32% des cellules présentaient des chromosomes massivement fragmentés (Stich *et al.*, 1964). De plus, à partir d'une lignée cellulaire de hamster infectée par HSV une décondensation de l'ADN associée à un déroulement de l'ADN cellulaire sur le locus 3 du chromosome X et le locus 7 du chromosome 1 a été observée. Plusieurs études ont également montré par la suite la capacité des virus HSV-1 et/ou HSV-2 à générer des dommages chromosomiques dans différents types de cellules humaines à savoir les HEKs (cellules embryonnaires rénales), les HELs (cellules embryonnaires pulmonaires), et les HT-1080 (lignée de carcinome fibroblastique). Peu de temps après l'infection, ces cellules se caractérisent non seulement par des lésions chromosomiques généralisées allant parfois jusqu'à la pulvérisation des chromosomes mais aussi par des déroulements spécifiquement au niveau des régions centromériques des chromosomes 1, 9 et 16. En revanche, le même type d'infection dans des PBLs activées (cellules lymphocytaires périphériques) affecte sévèrement les chromosomes 2 et 4 et fragilise les chromosomes 1 et 3 sur les locus 1p32, 1q32 et 3p21. Les mécanismes à l'origine de l'induction de ces lésions chromosomiques par les HSVs restent encore à l'heure actuelle hypothétiques. Certaines études suggèrent que les déroulements et la décondensation sites-spécifiques des chromosomes seraient dus à l'action de protéines virales très précoces tandis que les protéines précoces, notamment les polymérases virales et les protéines tardives telles que les nucléases virales, seraient plutôt responsables des dommages chromosomiques généralisés et des

phénomènes de « pulvérisation » de l'ADN. La protéine très précoce ICP0 codée par HSV-1 est un régulateur majeur de la DDR, notamment de par son activité ubiquitine ligase. Aussi, il a été supposé que l'induction de la dégradation protéolytique des protéines du kinétochore CENP-C et CENP-A par ICP0 provoquerait une déstabilisation des centromères et pourrait être ainsi impliquée dans le déroulement spécifique affectant ces régions dans les chromosomes 1, 9 et 16 (Fortunato & Spector, 2003).

Un nouveau mécanisme en cause de l'apparition de lésions chromosomiques attribuées aux infections par le virus HSV-1 a récemment été identifié (Deng *et al.*, 2014). En effet, l'infection par le virus HSV-1 est également impliquée dans la déprotection des télomères s'accompagnant de la formation de foci induits suite à un dysfonctionnement des télomères (TIFs : Telomere Dysfunction-Induced Focus). Ces foci correspondraient à des lésions au niveau de l'ADN télomérique visualisables par une relocalisation du marqueur γ H2AX aux sites de cassures. Aussi, l'infection par HSV-1 conduit à une plus forte proportion de chromosomes présentant une sévère atrophie des télomères et des fusions télomériques. Ce phénomène serait causé d'une part par une augmentation de la transcription des télomères aboutissant à l'expression d'ARN contenant des répétitions télomériques (TERRA) qui modulent l'activité télomérase et l'accès aux télomères ; et d'autre part par la dégradation protéolytique de la protéine TPP1 du complexe Shelterin, protéine impliquée dans la protection des régions télomériques et la processivité de la télomérase. La protéine virale ICP0 jouerait un rôle essentiel dans la dégradation de TPP1 et dans l'augmentation de la transcription des TERRA induisant ainsi un remodelage des télomères cellulaires au cours de l'infection par HSV-1 (Deng *et al.*, 2014). De plus, ICP0 faciliterait la liaison de la protéine virale ICP8 à l'ADN télomérique aboutissant à une proximité des foyers pré-réplcatifs de HSV-1 avec les foci d'ADN télomérique endommagés, localisation qui serait favorable à la réplication du génome viral (Deng *et al.*, 2014). Un processus similaire a été décrit chez EBV, dont la protéine EBNA-1 provoque une accumulation d'aberrations chromosomiques associées à la formation de TIFs dans les lymphocytes B tumoraux (Kamranvar & Masucci, 2011).

Par ailleurs, EBV possède d'autres facteurs de virulence à l'origine de cassures dans l'ADN. La protéine précoce BGLF5 codée par EBV serait aussi fortement en cause d'instabilité génomique. Cette nucléase virale est en effet capable de générer des CDBs dans des cellules épithéliales favorisant la formation de micronucléi, marqueurs d'instabilité

génomique. De plus, BGLF5 cause l'apparition d'instabilités de microsatellites; MSI (Wu *et al.*, 2010). Les études de Gruhne *et al.* ont montré que l'instabilité génomique ne se limite pas aux stades précoces de l'infection par EBV mais est aussi caractéristique de sa phase de latence. L'expression combinée des protéines de latence EBNA-1, EBNA-3C et LMP induit une augmentation significative du taux des dommages à l'ADN (Gruhne *et al.*, 2009b). Une action complémentaire et synergique de ces 3 protéines conduirait à l'apparition d'aberrations chromosomiques sévères. En effet, EBNA-1 est à l'origine de CDBs tandis qu'EBNA3C favorise la propagation de ces dommages en induisant une perturbation du point de contrôle associé à la formation du fuseau mitotique. LMP, quant à elle, inhibe la réparation de ces dommages et inactive le point de contrôle cellulaire G2 favorisant ainsi la division des cellules endommagées et l'accumulation de l'instabilité génomique (Gruhne *et al.*, 2009a; Gruhne *et al.*, 2009b). Contrairement à EBV, seule la phase lytique de l'infection par KSHV serait caractérisée par la génération de CDBs. Cela a été démontré dans un modèle cellulaire de lymphocyte B (BCBL-1) permettant à la fois d'étudier la phase de latence de KSHV et la phase cytotytique suite à l'induction de la réplication virale par le tétradecanoyl phorbol acetate (TPA). Une augmentation significative des CDBs a été observée suite au traitement TPA, indiquant que les CDBs apparaissent préférentiellement dans les cellules en phase lytique de l'infection et peu ou pas dans les cellules en phase de latence (Xiao *et al.*, 2013). La capacité de HCMV à induire des dommages à l'ADN proprement dit n'est actuellement pas démontrée. Toutefois, il a été suggéré que le rôle de HCMV dans l'inactivation du régulateur de la prolifération cellulaire Rb aboutissant à la perturbation d'E2F1 serait en cause de l'accumulation de lésions CDBs. En effet, l'inactivation de Rb par les protéines transactivatrices virales IE1 et IE2 serait à l'origine de CDBs dans les fibroblastes humains (E *et al.*, 2011; Xiaofei & Kowalik, 2014).

De plus, les protéines du tégument des herpesvirus relarguées dans la cellule à l'entrée des virions semblent avoir un rôle dans l'induction de l'instabilité génomique. Les protéines de tégument pp71 et pUL97 codées par HCMV seraient impliquées dans l'apparition de CDBs dans les fibroblastes humains via l'inhibition de Rb (E *et al.*, 2011; Xiaofei & Kowalik, 2014). Une publication récente de notre laboratoire a également montré que la surexpression de la protéine de tégument VP22 codée par MDV induit l'apparition de CDBs et que le mécanisme mis en cause reposerait sur sa capacité à interagir avec les histones (Trapp-Fragnet *et al.*, 2014).

3.2.1.2 Détection des génomes viraux

La DDR peut être activée suite à la libération des génomes viraux dans les cellules. En effet, les extrémités libres de l'ADN viral double brin linéaire des herpesvirus (avant sa circularisation) ressemblent aux CDBs et peuvent donc être perçues par la cellule comme un ADN endommagé (Figure 28 a). Ces extrémités sont alors susceptibles d'être détectées par la DDR et aboutir à son activation (Luftig, 2014; Sinclair *et al.*, 2006). Il faut noter que les herpesvirus MDV, HHV6 et HHV7 possèdent des séquences télomériques homologues à celles de leurs cellules hôtes aux extrémités de leurs génomes (Kaufer *et al.*, 2011; Secchiero *et al.*, 1995). Par conséquent, la présence de ces séquences pourrait empêcher la détection de ces génomes viraux par les senseurs de la DDR.

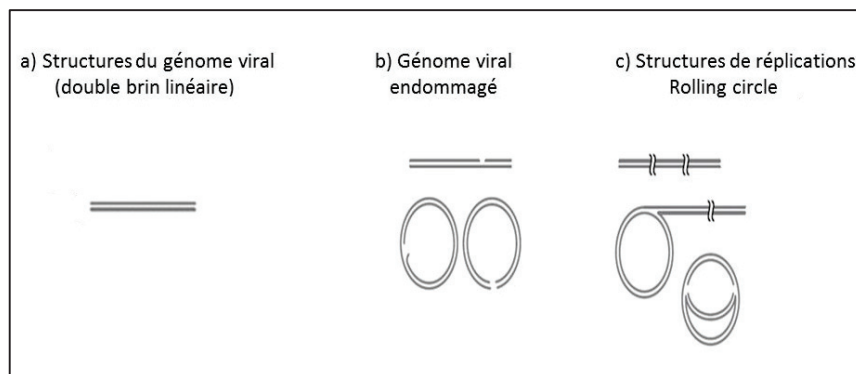


Figure 28. Représentation des différentes structures de l'ADN viral pouvant déclencher la machinerie de DDR (Luftig, 2014).

Par ailleurs, l'ADN des génomes viraux est soumis aux mêmes risques environnementaux et métaboliques que les génomes cellulaires (Luftig, 2014). Aussi, l'ADN viral peut accumuler des dommages dans son ADN tels que des modifications de base, des cassures franches CDBs ou CSBs, qui peuvent activer la DDR lorsque les génomes viraux sont libérés dans la cellule hôte (Figure 26 b) (Luftig, 2014). Millhouse et collaborateurs ont montré que l'ADN du virus HSV-1 subissait des dommages au cours de l'infection (Millhouse *et al.*, 2010). L'ADN viral extrait de cellules quiescentes infectées avec HSV-1 *in vitro* ou de ganglions de souris dans lesquels HSV-1 est en phase de latence, présente des altérations par rapport à l'ADN des virions utilisés comme inoculum viral. La présence de ces lésions engendre des problèmes d'amplification de l'ADN de HSV-1 par PCR, celui-ci étant 3 à 10 fois plus réfractaire à amplifier (Millhouse *et al.*, 2010).

Les herpesvirus se répliquent par le mécanisme «rolling circle» impliquant des structures et des conformations particulières de l'ADN viral, notamment suite à la circularisation du génome viral, pouvant être détectées comme anormales par la cellule et à l'origine de la stimulation d'une réponse aux dommages à l'ADN. De plus, ce mode de réplication débute à partir d'une incision dans l'ADN matrice et s'achève par l'action de nucléases assurant le clivage des concatémères néosynthétisés et à la formation de plusieurs génomes viraux doubles brins linéaires. Ces événements peuvent également être perçus par la cellule infectée comme des CDBs ou des CSBs et déclencher la DDR (Figure 28 c) (Sinclair *et al.*, 2006).

3.2.1.3 La réplication virale

Certaines structures répliquatives des virus peuvent conduire à l'activation de DDR. Cependant, le contexte cellulaire de réplication des virus peut également jouer un rôle important dans le déclenchement de ces voies. En effet, afin de créer un environnement propice à leur réplication, la plupart des virus ont développé des stratégies visant à faire progresser les cellules dans le cycle cellulaire et ainsi à disposer de la machinerie de réplication cellulaire pour leur propre réplication (Luftig, 2014). Aussi, l'action cumulée des événements accompagnant la réplication virale et l'induction d'une hyperprolifération cellulaire peut être à l'origine du déclenchement d'une situation de stress liée à l'augmentation du rythme de la réplication cellulaire appelée «Stress répliatif». Ce terme désigne une modification anormale des paramètres de réplication cellulaire marquée par une augmentation de la vitesse des fourches de réplication, une modification du profil d'activation des origines de réplication ou une variation de la durée de la phase S du cycle cellulaire. Cela conduit à une augmentation du nombre d'origines de réplication défectueuses et de fourches de réplication collapsées souvent à l'origine de la rupture de la structure de l'ADN et à l'induction de la DDR (Nikitin & Luftig, 2012; Zeman & Cimprich, 2014; Zou & Elledge, 2003).

En contexte infectieux, la stimulation de la prolifération cellulaire et notamment la création d'un environnement de phase S propice à la réplication virale, résulte de l'activation et/ou de la dérégulation de facteurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire. Les facteurs de transcription de la famille E2F jouent un rôle majeur dans ce processus. Au début de la phase G1, la protéine E2F est inactivée par séquestration par la protéine pRb (Figure 29). Le complexe cycline D/cdk4/6 activé au cours de cette phase G1 phosphoryle pRb

libérant ainsi le facteur E2F qui peut alors transactiver les gènes codant pour les protéines essentielles à la progression en G1, l'entrée en phase S et à la réplication de l'ADN. Il faut également noter que la dérégulation de l'activité d'E2F est responsable de l'activation de la voie ATM (Nikitin & Luftig, 2012).

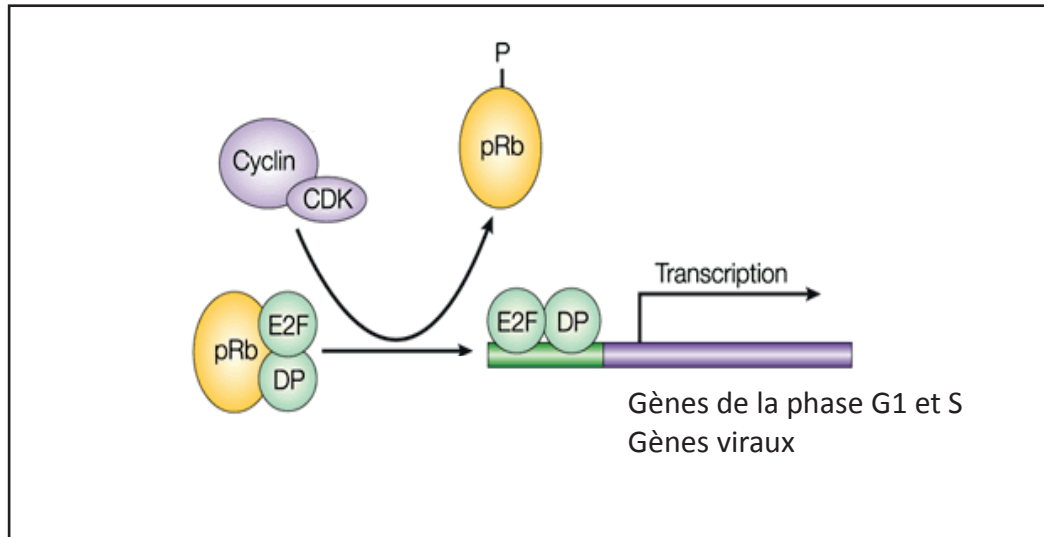


Figure 29. Régulation de la transition G1/S par le couple protéique pRb/E2F.

Les herpesvirus ont développé divers mécanismes afin de faciliter la progression du cycle et notamment d'induire l'activation de la cycline D ou la dissociation du complexe Rb/E2F (Chaurushiya & Weitzman, 2009). Le virus KSHV code pour une cycline virale, la v-Cycline, homologue de la cycline D cellulaire, qui est capable de s'associer à cdk6 et d'induire la phosphorylation de Rb libérant ainsi E2F. Il faut noter que son expression en cellules endothéliales conduit à l'activation de la DDR (Koopal *et al.*, 2007). Le virus EBV, ne codant pas de v-cycline, est néanmoins capable d'induire la surexpression de la Cycline D via ses protéines EBNA2 et LP. Par ailleurs, de nombreuses protéines virales sont capables d'interagir avec le complexe pRb/E2F aboutissant à la libération de E2F et favorisant la transition G1/S (Chaurushiya & Weitzman, 2009; Uppal *et al.*, 2014). Ainsi, les protéines précoces IE1, IE2, pp71 et pUL97 codées par HCMV sont capables de se lier à Rb et/ou d'induire sa phosphorylation inhibant ainsi son action sur E2F. L'activité de E2F est alors dérégulée et des CDBs peuvent survenir conduisant à l'activation de la voie ATM (Xiaofei & Kowalik, 2014). La protéine EBNA3C codée par EBV inactive également le complexe Rb/E2F, conduisant à la mise en place d'une « pseudo-phase S » accompagnée d'un afflux d'enzyme requis pour la réplication virale (Chaurushiya & Weitzman, 2009). De plus, la protéine majeure de tégument BPLF1 participe également à la pseudo-phase S (Luftig, 2014).

Une des conséquences de l'environnement « pseudo-phase S » est l'entrée inappropriée des cellules infectées en mitose déclenchant les points de contrôle du cycle cellulaire orchestrés par la DDR incluant notamment Chk2 (Nikitin & Luftig, 2012).

Récemment, nous avons également montré que la protéine tardive VP22 du tégment de MDV est associée à l'induction de CDBs et à une modulation du cycle cellulaire, sa simple surexpression en cellules hépatocytaires aviaires conduisant à un arrêt prolifératif intra-S dans plus de 90% des cellules (Trapp-Fragnet *et al.*, 2014). Cette dérégulation du cycle cellulaire est caractérisée par une augmentation de l'expression des ARNm codant pour la cycline D, cdk6, pRb et E2F1 (Trapp-Fragnet *et al.*, 2014). Bien que nous n'ayons pas été en mesure de préciser l'effet de la VP22 sur les voies de DDR, nous subodorons que celles-ci puissent être activées du fait des CDBs occasionnées par la VP22.

3.2.1.4 Induction du stress oxydatif

L'activation de la DDR relève aussi de l'action du stress oxydant induit par les ROS (Reactive Oxygen Species) et les RNS (Reactive Nitrogen Species). Les infections herpétiques sont généralement accompagnées d'une augmentation de la production de ROS, comme cela a été décrit pour HSV-1, CMV et plus largement pour les gammaherpesvirus EBV et KSHV (Gruhne *et al.*, 2009a; Kavouras *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2013). La protéine EBNA1 de l'EBV provoque la production des ROS aboutissant à l'activation de la voie ATM et à l'apparition d'aberrations chromosomiques (Gruhne *et al.*, 2009a). Ce mécanisme repose sur l'activation transcriptionnelle de la sous-unité catalytique NOX2/gp91^{PHOX} de l'oxydase NADPH par EBNA1, conduisant à l'accumulation de réactifs oxygénés de type superoxyde O₂⁻ générateurs de dommages à l'ADN dans les cellules infectées par EBV (Gruhne *et al.*, 2009a). De plus, une étude récente suggère que la production de ROS induite par EBNA1 favoriserait également le dysfonctionnement des télomères, signal moléculaire reconnu comme activateur de DDR (Gruhne *et al.*, 2009a; Kamranvar & Masucci, 2011; Nikitin & Luftig, 2012). La réplication lytique de KSHV ainsi que sa latence sont également accompagnées d'une hausse de la production des ROS. La protéine G cellulaire Rac1 joue un rôle central dans ce processus, son activation est en effet à l'origine de l'activation des NADPH oxydases (NOX). Il a été montré que Rac1 est surexprimée et activée dans les cellules infectées par KSHV (Ma *et al.*, 2013). Ce mécanisme ferait intervenir la protéine virale précoce vGPCR (récepteur couplé à la protéine G) qui activerait Rac1 conduisant ainsi à une surproduction du superoxyde O₂⁻. De plus, la

surexpression des transcrits majeurs de la latence de KSHV incluant les protéines LANA, v-cycline et v-FLIP dans les cellules 293T participerait à l'augmentation des ROS dans les cellules infectées (Ma *et al.*, 2013).

L'infection par le virus MDV est aussi associée à une augmentation du stress oxydatif traduite par une hausse de la concentration des métabolites MDA (Malendialdehyde), PCO (Protein Carbonyl) et NOx (Nitric Oxyde) dans le plasma des poulets. Dans cette étude, il a été montré que l'augmentation du stress oxydatif est corrélée à une élévation du taux des dommages à l'ADN pouvant être à l'origine de l'activation de la DDR (Keles *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la DDR peut être activée indirectement suite à l'inflammation induite par les infections herpétiques. En effet, le recrutement de cellules inflammatoires produisant des ROS et des RNS sont susceptibles de générer un stress oxydatif et des lésions oxydatives de l'ADN aboutissant à la DDR (Colotta *et al.*, 2009; Coussens & Werb, 2002). L'infection par KSHV induit notamment l'expression de la Cyclooxygénase 2 (COX2) (Mesri *et al.*, 2014). Cette enzyme exprimée en réponse à des facteurs pro-inflammatoires a également la capacité d'induire la formation d'adduits d'ADN (Lee *et al.*, 2005; Speed & Blair, 2011).

3.2.1.5 Action des protéines virales

L'expression des protéines très précoces peut activer une réponse DDR en agissant directement sur les acteurs des voies ATM, ATR et DNA-PK. La protéine ICP0 codée par HSV-1 induit la phosphorylation de la kinase ATM et de son substrat Chk2 (phosphorylation ATM-dépendante) conduisant à un arrêt G2/M du cycle cellulaire (Li & Glorioso, 2004). Cette activation d'ATM et de Chk2 a été montrée non seulement en contexte infectieux en utilisant un virus recombinant HSV-1 non-répliquatif dans lequel ICP0 est la seule protéine très précoce exprimée mais aussi suite à la surexpression d'ICP0 dans les cellules 293T (Li *et al.*, 2008). En effet, la surexpression de ICP0 en cellules humaines et murines est associée au recrutement massif du marqueur de CDBs, γ H2AX, et à l'augmentation de la phosphorylation d'ATM et de Chk2 (Li *et al.*, 2008). De la même façon, la surexpression des 2 protéines très précoces IE1 et IE2 de HCMV et de la protéine ZEBRA codée par EBV provoque la formation de foci intranucléaires de pATM et de γ H2AX (E *et al.*, 2011; Wang'ondou *et al.*, 2015).

Les protéines tardives codées par les herpesvirus jouent également un rôle dans le déclenchement de la DDR. Cela a été démontré pour la protéine mineure pUL35 du tégment

de HCMV. La surexpression de cette protéine en cellules humaines UO2S induit une accumulation nucléaire de 53BP1 et de γ H2AX dans les cellules transfectées, reflétant l'activation d'une réponse DDR (Salsman *et al.*, 2012). L'implication des kinases codées par les herpesvirus dans l'activation des DDR a particulièrement été étudiée dans le cadre d'infection par le gammaherpesvirus oncogène murin MHV-68. Tarakanova et collaborateurs ont en effet montré que la surexpression de la kinase *orf36* de MHV-68 dans les fibroblastes murins est suffisante pour augmenter le niveau d'expression de γ H2AX indépendamment de la réplication du virus. De plus, l'utilisation de mutants de *orf36* a permis de mettre en évidence que la phosphorylation de H2AX est dépendante du domaine catalytique de cette kinase. De plus, ATM ne semble pas être indispensable à ce processus puisque la phosphorylation de γ H2AX est également induite suite à l'expression de *orf36* dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) invalidés pour ATM. Néanmoins, ATM pourrait jouer dans l'amplification de la phosphorylation de H2AX lors de l'infection par le MHV-68. Il faut noter que *orf36* fait partie des sérines thréonines kinases conservées chez les herpesvirus. L'homologue BGLF4 codé par EBV conduit également à la phosphorylation de γ H2AX lors de sa surexpression en cellules murines. Cependant, la capacité de MHV-68-*orf36* et EBV-BGLF4 à augmenter l'expression de γ H2AX n'est pas conservée par les kinases homologues UL13, *orf47* et *orf36* codées respectivement par HSV-2, VZV et KSHV (Tarakanova *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2014). Il faut néanmoins noter qu'une étude de screening à haut débit visant à identifier des substrats communs aux kinases herpesvirales BGLF4, UL97, *orf36* et UL13 codées par les virus EBV, HCMV, KSHV et HSV a permis de mettre en évidence que les voies de DDR sont des cibles préférentielles de ces kinases (Li *et al.*, 2011). Ainsi, 12 protéines impliquées dans la DDR ont été identifiées comme des substrats communs de ces kinases, parmi lesquels certaines protéines seraient des cibles directes notamment Chk1, RPA1 et RAD51. L'histone acétyltransférase Tip60, est aussi un substrat de ces kinases qui l'activerait Tip60 par phosphorylation et ainsi déclencherait la voie ATM (Li *et al.*, 2011).

Les oncoprotéines virales participent également à l'activation de la DDR. Dans le cas de KSHV, la transduction de cellules épithéliales par un vecteur rétroviral codant la v-cycline conduit à la phosphorylation des protéines ATM, Chk2 et γ H2AX (Koopal *et al.*, 2007). De plus, la protéine LANA serait capable d'induire indirectement la DDR par modulation de c-Myc (Nikitin & Luftig, 2012). Chez EBV, les oncoprotéines EBNA2/LP et EBNA-1 sont elles aussi activatrices de la DDR. Une augmentation de EBNA2/LP dans des lymphocytes B primaires infectés par EBV est en effet corrélée à la formation de foci intra-nucléaires de

γ H2AX, et à une augmentation transitoire du recrutement de 53BP1 et de la phosphorylation de Chk2 (via d'ATM) (Nikitin *et al.*, 2010). L'activation de la phosphorylation d'ATM et de γ H2AX a été également rapportée dans des lignées de lymphocytes B exprimant stablement ou inducible la protéine EBNA-1. Une telle activation serait liée à la capacité de cette protéine à induire des dommages à l'ADN via l'expression des ROS (Gruhne *et al.*, 2009a).

3.2.2 Les mécanismes d'inhibition de la DDR par les herpesvirus

La plupart des virus à ADN stimulent la réponse DDR pour bénéficier de la machinerie enzymatique cellulaire pour promouvoir leur réplication. Toutefois, le déclenchement de la cascade de signalisation DDR peut revêtir un caractère antiviral en aboutissant notamment à l'activation de l'apoptose. Par conséquent, les virus ont développé des stratégies pour contrecarrer l'action préjudiciable de la DDR par des modes d'actions directs ou indirects impliquant la dégradation des médiateurs de la DDR et/ou la relocalisation subcellulaire des composants protéiques impliqués dans la DDR, bloquant ainsi l'aboutissement de la cascade de signalisation DDR.

3.2.2.1 Régulation et dégradation des protéines de la DDR

Les virus codent pour des protéines pouvant moduler directement certaines protéines cellulaires de la DDR au niveau post-traductionnel en modifiant leur profil de phosphorylation, d'acétylation, de SUMOylation ou d'ubiquitylation. Un des exemples les plus connus chez les herpesvirus, est celui de la protéine ICP0 codée par HSV-1. Cette protéine a été particulièrement étudiée du fait de son activité E3 ubiquitine ligase entraînant la dégradation de différents composants de la DDR. Parmi les cibles d'ICP0, la protéine DNA-PKcs est un substrat préférentiel. Des études ont montré que la dégradation protéolytique de la protéine DNA-PKcs suite à son ubiquitynylation par ICP0 aboutit à l'inactivation de la voie DNA-PK et à l'inhibition de la voie NHEJ (Parkinson *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2014). D'autre part, ICP0 est capable de perturber le fonctionnement de la voie ATM en induisant la dégradation protéolytique de RNF8 et RNF168, deux ubiquitine-ligases cellulaires impliquées dans l'ubiquitynylation de l'histone H2A et de son variant H2AX. Ce défaut d'ubiquitynylation de l'histone H2A empêche le recrutement des protéines de réparations de l'ADN au niveau de l'ADN lésé et éviterait le silencing transcriptionnel (Lilley *et al.*, 2010). Une dégradation de la protéine Mre11 est également observée lors des phases tardives de l'infection par HSV-1. Les

mécanismes en cause sont à élucider mais ils seraient indépendants de l'action d'ICP0 (Gregory & Bachenheimer, 2008; Turnell & Grand, 2012b). Aussi, au cours de l'infection HSV-1, il a été montré un recrutement de différentes protéines impliquées dans la voie ATR. Néanmoins la cascade de signalisation ATR est inhibée. Ce processus reposerait sur la modification post-traductionnelle de la protéine Rad9 (protéine du complexe 9-1-1) conduisant à sa dégradation par le protéasome. Bien que la nature de cette modification reste à l'heure actuelle à identifier, 2 sites de phosphorylation de la protéine Rad9 (Ser387 et Ser272) ont été mis en évidence dans des cellules infectées par HSV-1 exprimant stablement Rad9. Ces sites de phosphorylation seraient stabilisés par ICP0 et faciliteraient la réplication du virus. En conséquence, ICP0 parvient non seulement à contrecarrer les voies ATM et DNA-PK dans les cellules infectées par HSV mais pourrait également participer à l'inhibition de la voie ATR. Ce mode de fonctionnement n'est pas exclusif à HSV-1, il est aussi connu pour d'autres herpesvirus notamment EBV et KSHV. La protéine très précoce BZLF1 codée par EBV est responsable de la dégradation protéolytique de p53 lors de la phase cytotytique de l'infection (Sato *et al.*, 2009b). BZLF1 est en effet non seulement capable de se lier à p53 mais elle conduit également à sa dégradation par le protéasome via son rôle d'adaptateur du complexe ubiquitine ligase ECS (Elongin B/C-Cul2/5-SOCS-box protein) (Sato *et al.*, 2009a; Zhang *et al.*, 1994).

Par ailleurs, l'infection par les herpesvirus conduit à une régulation de l'expression et de l'activation de certaines protéines de la DDR. Ainsi, il a par exemple été montré que l'oncoprotéine LMP-1 codée par EBV provoquerait une diminution de l'expression de la protéine ATM (Gruhne *et al.*, 2009b). Une inhibition de l'activité d'ATM a également été décrite suite à l'infection par KSHV. La protéine v-IRF1 (v-Interferon Regulatory Factor 1) codée par KSHV est en effet capable d'interagir avec ATM induisant une inhibition de son activité kinase et par conséquent une diminution de la phosphorylation de p53 par ATM, vraisemblablement à l'origine de la dégradation protéolytique de p53 (Shin *et al.*, 2006; Turnell & Grand, 2012b).

3.2.2.2 Relocalisation des protéines de la DDR

Les herpesvirus sont également capables de relocaliser certaines protéines de la DDR afin de favoriser le recrutement de ces protéines dans des sites bénéfiques à la multiplication virale et d'éviter qu'elles ne soient un obstacle au déroulement de l'infection.

Une des caractéristiques majeures des infections herpétiques est la réorganisation du noyau des cellules infectées et la formation des compartiments de réplication viraux. Plusieurs herpesvirus utilisent ces structures pour séquestrer des facteurs de DDR. Il est actuellement bien établi que la voie ATM est activée en réponse aux infections par HSV-1. Néanmoins, HSV-1 procède à la redistribution des protéines de cette voie de DDR afin de l'inactiver et de détourner son fonctionnement à son avantage. Par exemple, les protéines Nbs1, Rad50 et pATM sont relocalisées simultanément avec ICP8 au niveau des compartiments de pré-réplication viraux (Lilley *et al.*, 2005). Cette délocalisation des facteurs de DDR, n'implique ni ICP0, ni les polymérases virales et le rôle des autres protéines virales reste méconnu. Toutefois, ICP0 jouerait un rôle dans la relocalisation subcellulaire de la protéine 53BP1. En effet, l'infection de cellules HFF par un virus HSV-1 sauvage conduit au recrutement des protéines MDC1 et γ H2AX au niveau de l'ADN viral tandis que les protéines 53BP1 et BRCA-1 restent diffuses dans le noyau. Or, l'infection par un virus HSV-1 mutant délété d'ICP0 provoque l'accumulation de 53BP1 au niveau du génome viral suggérant que ICP0 serait capable d'inhiber le recrutement de 53BP1 au niveau de l'ADN viral (Lilley *et al.*, 2011). Le recrutement de 53BP1 au niveau du génome viral est orchestré par les protéines cellulaires RNF8 et RNF168. ICP0 est responsable de la dégradation protéolytique de ces 2 protéines ce qui pourrait être à l'origine de la redistribution de 53BP1 (Lilley *et al.*, 2011; Lilley *et al.*, 2010). La voie ATR n'est pas activée lors de l'infection par HSV-1, toutefois certains composants de cette voie notamment RPA, ATR et ATRIP sont retrouvés dans les compartiments de réplication viraux. La relocalisation d'ATRIP et RPA s'opère dès la formation des compartiments de pré-réplication (Mohni *et al.*, 2010). Néanmoins, cette redistribution reste très controversée puisqu'une étude a démontré que les protéines ATRIP et RPA seraient également retrouvées séquestrées dans des domaines nucléaires appelés VICE « Virus Induced Chaperone-Enriched » qui sont composés majoritairement de protéines cellulaires impliquées dans la dégradation protéique et qui sont situés à proximité des compartiments de réplication viraux. Le mécanisme à l'origine du recrutement de RPA, ATR et d'ATRIP au niveau des compartiments de réplication viraux est encore méconnu, cependant ICP0 pourrait participer à la relocalisation d'ATRIP au niveau des domaines VICE (Wilkinson & Weller, 2006). Par ailleurs, la réplication du CMV est associée à une exclusion des protéines ATM, ATR, Chk1, Chk2 et pChk2 du noyau entraînant ainsi une dérégulation des points d'arrêt du cycle cellulaire (Gaspar & Shenk, 2006). Le mécanisme conduisant à la relocalisation de ces protéines pourrait impliquer la phosphoprotéine virale UL84 (Turnell &

Grand, 2012a), qui en se liant avec l' α -karyophérine KPNA2 pourrait inhiber le transport nucléaire de Chk2, entraînant ainsi son accumulation cytoplasmique (Gaspar & Shenk, 2006). Les travaux de Luo *et al* ont par contre démontré que les phases tardives de la réplication du CMV s'accompagnent d'une séquestration des facteurs de DDR dans les compartiments de réplication viraux. Selon leur degré de séquestration au niveau des compartiments de réplication viraux, les protéines de DDR s'organiseraient en 4 groupes : (i) des facteurs fortement séquestrés : complexe MRN, ATRIP, Chk1 et p53, (ii) des protéines partiellement séquestrées au niveau des compartiments de réplication viraux (ATM, pATM, Chk2 et γ H₂AX), (iii) les protéines Rad51 et 53BP1 qui présentent une localisation diffuse nucléaire non associée systématiquement aux compartiments de réplication viraux et (iv) les protéines exclues des compartiments de réplication : Ku70, Ku80, DNA-PK_{cs} et ATR (Luo *et al.*, 2007). Ce changement de la localisation subcellulaire des protéines de la DDR favoriserait la réparation et le maintien de l'intégrité génomique de l'ADN viral au détriment de celle du génome hôte. Une étude a en effet démontré que l'irradiation UV de cellules fibroblastiques infectées par CMV induisait une relocalisation des protéines de réparation de l'ADN de la voie NER notamment XPD, XPB sélectivement aux compartiments de réplication viraux. Cet adressage différentiel entraîne une réparation préférentielle de l'ADN viral par la voie NER au dépend de l'ADN cellulaire (O'Dowd *et al.*, 2012).

L'infection par EBV est aussi accompagnée d'une relocalisation des facteurs de DDR, MRN, p-p53 et pATM au niveau des compartiments de réplication viraux. La prise en charge du génome viral linéaire par les senseurs cellulaires de dommages à l'ADN pourrait être à l'origine de cette redistribution des protéines de DDR (Turnell & Grand, 2012a). Les protéines pRPA32, Rad51 et Rad52 ont également été retrouvées dans les compartiments de réplifications co-localisées avec les protéines virales BMRF1 et BALF2 (Turnell & Grand, 2012a).

3.2.3 DDR et cycle viral des herpesvirus

Les herpesvirus sont capables d'interagir et de réguler la DDR et les voies de réparation de l'ADN. Réciproquement, la DDR est fortement impliquée dans le cycle de ces virus. Implication de la DDR dans le cycle viral de HSV-1

L'infection par HSV est intimement liée à la machinerie de DDR néanmoins cette relation est pour le moins complexe. L'infection cytotytique de cellules fibroblastiques

primaires par HSV-1 induit l'activation de la voie ATM et par conséquent la phosphorylation de Chk2 et p53 (Shirata *et al.*, 2005). De plus, l'infection par HSV-1 aboutit au recrutement d'ATM et des composants du complexe MRN au niveau des compartiments de réplication viraux via un mécanisme ATM dépendant. Il est intéressant de noter que l'inhibition de l'ADN polymérase virale par l'acide phosphonoacétique réprime l'activation de la voie ATM suggérant un lien entre la réplication virale et le déclenchement de la voie ATM (Shirata *et al.*, 2005). L'importance de la voie ATM dans la réplication de HSV-1 a notamment été démontrée dans des cellules déficientes de γ H2AX et de Chk2, l'infection de ces cellules par HSV-1 résultant en une forte diminution de la production des virions infectieux (Li *et al.*, 2008; Lilley *et al.*, 2011). De plus, la réplication d'HSV-1 est sévèrement réduite dans des cellules AT (ATM^{-/-}) ou A-TLD (Mre11^{-/-}) en comparaison avec les mêmes cellules présentant une activité ATM ou Mre11 restaurée par complémentation (Lilley *et al.*, 2005). La fonctionnalité de la voie ATM semble donc indispensable à la réplication de HSV-1 (Lilley *et al.*, 2005). Lilley *et al.* ont suggéré un rôle de Mre11 accompagné des autres protéines de DDR dans la formation et la stabilisation des concatémères d'ADN viral (Lilley *et al.*, 2005). Cependant, la régulation de Mre11 durant l'infection par HSV-1 est très controversée. En effet, certaines études ont montré que l'expression de cette protéine n'est pas diminuée au cours de l'infection par HSV-1 étant donné son rôle dans la promotion de la réplication virale dans les compartiments de réplication viraux (Turnell & Grand, 2012a). Toutefois, Shirata *et al.* ont observé une diminution de son expression suite à l'infection par HSV (Shirata *et al.*, 2005).

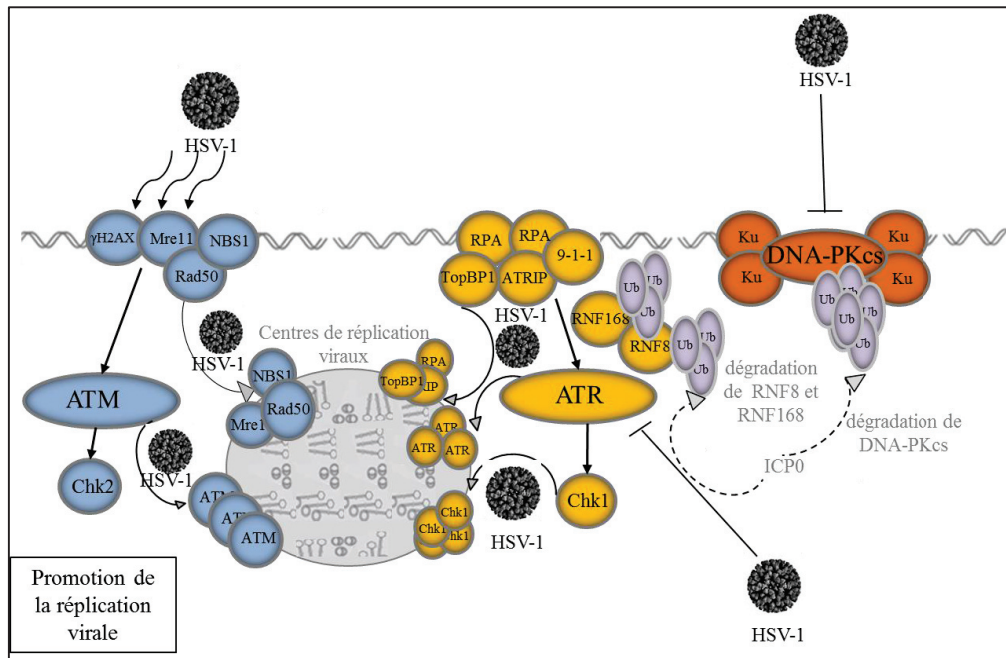


Figure 30. Schéma représentatif des différentes interactions entre le virus HSV-1 et les voies de DDR. Afin de favoriser sa réplication le virus HSV-1 procède à la relocalisation de plusieurs protéines des voies de DDR notamment NBS-1, Rad50, Mre11 et ATM de la voie ATM ainsi que RPA, TopBP1, ATRIP et ATR de la voie ATR au niveau de ces compartiments de réplication. Aussi, la protéine ICP0 de HSV-1 est responsable de la dégradation protéolytique de DNA-PKcs inhibant ainsi la voie DNA-PK.

Si la voie ATM est favorable à la réplication de HSV-1, la voie DNA-PK serait plutôt défavorable. Aussi, l'ubiquitine ligase ICP0 codée par HSV induit la dégradation protéolytique de DNA-PKcs et par conséquent l'inhibition de la voie DNA-PK, facilitant ainsi la réplication du virus. La réplication de HSV-1 et la production de virions infectieux sont en effet augmentées de 50 à 100 fois dans des cellules déficientes de DNA-PKcs par rapport à des cellules présentant une voie DNA-PK fonctionnelle (Parkinson *et al.*, 1999). L'activité antivirale de la voie DNA-PK résiderait dans sa capacité à activer les voies de réparation d'ADN de type NHEJ et RH. Aussi, l'inhibition de la voie DNA-PK par HSV-1 assurerait la protection du génome viral de l'action de ces voies de réparation d'ADN (Turnell & Grand, 2012a).

Bien que la voie ATR soit inhibée lors de l'infection par HSV-1, ses différents effecteurs RPA, ATRIP, Rad9, Hus1, Rad1, Rad17, CINP, TopBP1 et Chk1 sont retrouvés au niveau des compartiments de réplication viraux. Les protéines ATRIP, RPA70, CINP,

TopBP1 et Claspin favoriseraient la réplication virale, leur inhibition par des shRNA réduisant la réplication de HSV (Mohni *et al.*, 2013a). Cette diminution de la réplication du virus est renforcée lors de l'inhibition simultanée d'ATRIP avec une des 2 protéines RPA70 ou TopBP1. Il faut cependant noter que la surexpression conjointe de ATR avec ATRIP dans les cellules HeLa induit une diminution de la réplication virale d'un facteur 2 suggérant que la protéine ATR aurait une activité négative sur la réplication de HSV-1 (Mohni *et al.*, 2013a; Mohni *et al.*, 2010). Ces travaux indiquent donc que les protéines de la voie ATR auraient plutôt un effet bénéfique sur la réplication de HSV-1, mais que la cascade de signalisation de la voie ATR ne semble pas jouer un rôle majeur dans le cycle viral et pourrait même dans certaines conditions s'avérer délétère pour le virus (Mohni *et al.*, 2010).

Par ailleurs, Lilley *et al* ont montré que l'infection par HSV-1 de neurones différenciés, cellules cibles préférentielles de HSV-1, ne résulte pas en l'activation de la DDR, contrairement aux cellules non-différenciées. De plus, dans les neurones la formation des compartiments de réplication est altérée. Aussi, les auteurs ont suggéré que l'absence d'une réponse DDR à l'infection pourrait contribuer à l'établissement de l'infection latente de HSV-1 dans les neurones (Lilley *et al.*, 2005).

3.2.3.1 Implication de la DDR dans le cycle viral d'HCMV

Comme HSV-1, l'infection par HCMV conduit à l'activation de la voie ATM (Castillo *et al.*, 2005; E *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2007). Un recrutement de nombreuses protéines de cette voie notamment Mre11, Nbs1, Rad50, γ H2AX, pATM, Chk2 et p53 dans les compartiments de réplication viraux a été observé (E *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2007). De plus, des facteurs de la voie ATR tels que la protéine ATR et son substrat Chk1 co-localisent avec ces compartiments (E *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2007). Ces protéines de la DDR pourraient interagir avec la machinerie de réplication de l'ADN viral dans les compartiments de réplication viraux et favoriseraient ainsi la réplication du génome viral et l'expression des gènes viraux ainsi que le recrutement des protéines de réparation d'ADN (Xiaofei & Kowalik, 2014).

Bien qu'elle soit fortement impliquée dans la réplication des herpesvirus en général, l'importance de la voie ATM dans la réplication d'HCMV a fait longtemps un sujet de débat dans la communauté scientifique. En effet, Luo *et al* étaient les pionniers dans ce domaine en montrant que HCMV se multiplie aussi bien dans des fibroblastes ATM^{-/-} ou Mre11^{-/-} que

dans des fibroblastes sauvages (Luo *et al.*, 2007). Cette étude a été par la suite controversée par les travaux de Xiaofei *et al* montrant qu'un traitement des fibroblastes HELs par la caféine (inhibiteur des voies ATM et ATR) peu de temps après l'infection par HCMV conduit à l'abrogation quasi-totale de la réplication virale. De plus, l'inhibition spécifique de la voie ATM par le KU55933 induit une suppression dose dépendante de la réplication de HCMV (Li *et al.*, 2011). L'impact de la voie ATM sur la réplication du HCMV a également été démontré dans des fibroblastes provenant d'un patient atteint de l'ataxie télangiectasie (AT) n'exprimant pas ATM (E *et al.*, 2011). De plus, l'utilisation de siRNA ciblant la protéine ATM entraîne une réduction d'un facteur 10 de la réplication d'HCMV (E *et al.*, 2011). Ce processus s'accompagne d'une réduction du nombre des compartiments de réplication viraux matures. Aussi, il a été suggéré qu'ATM serait impliquée non seulement dans la formation mais aussi dans la maturation des compartiments de réplication d'HCMV. Parmi les protéines de la voie ATM, γ H2AX influence particulièrement la réplication d'HCMV. Sa délétion par siRNA dans les fibroblastes HELs diminue considérablement la réplication d'HCMV ainsi que l'expression des protéines virales IE2, pp65 et gB55.

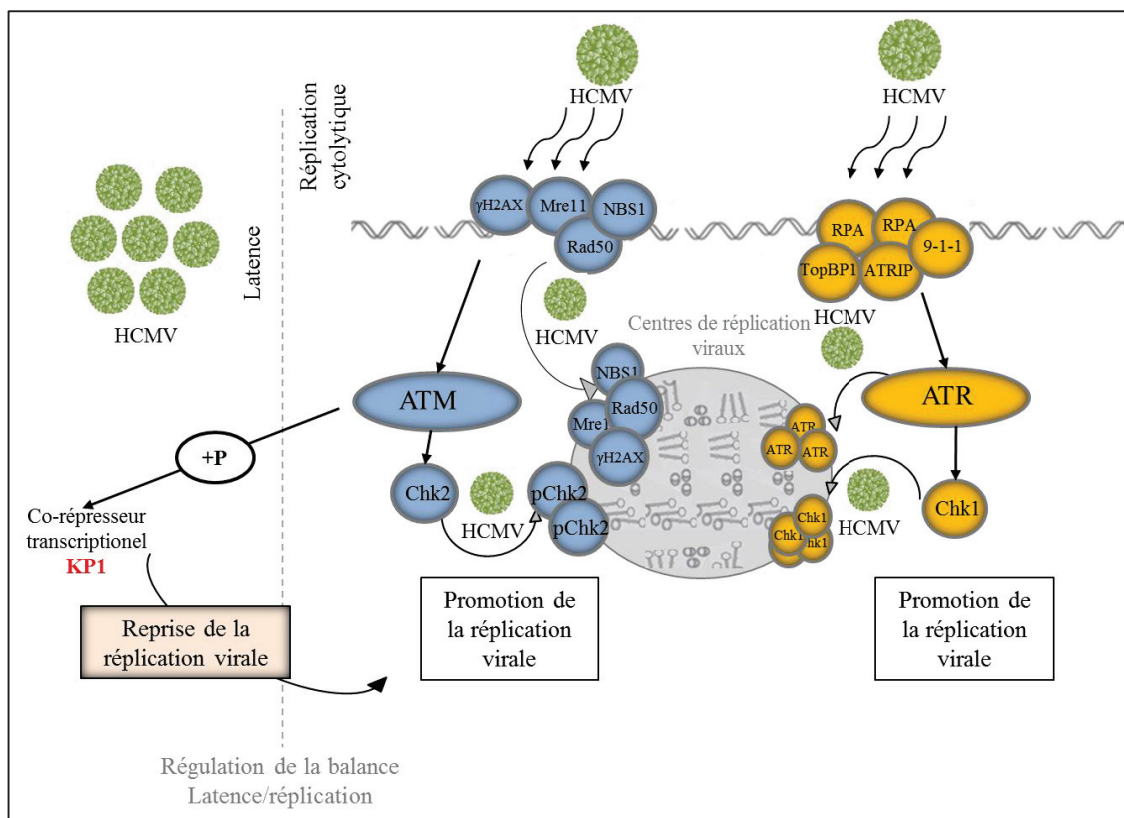


Figure 31. Schéma récapitulatif de l'interaction du virus HCMV et la machinerie de DDR lors des différentes phases de son cycle viral. Pour favoriser sa réplication, le virus HCMV

recrute les protéines de la voie ATM ; Nbs1, Mre11, Rad50, γ H2AX et pChk2 ainsi que certaines protéines de la voie ATR notamment ATR et Chk1 au niveau de ces compartiments de réplication. La voie ATM est également impliquée dans la régulation de balance latence/réactivation de HCMV. En effet, ATM est capable de phosphoryler le corépresseur transcriptionnel KP1 conduisant au remodelage de la chromatine aboutissant ultimement à la formation de l'hétérochromatine et à la reprise de l'expression des gènes viraux.

Par ailleurs, la voie ATM participerait à la régulation de la balance latence/réactivation de HCMV (Rauwel *et al.*, 2015). En effet, une étude récente a montré que l'activation chimique de la voie ATM par la chloroquine dans les cellules HSC (Hematopoietic Stem Cells) dans lesquelles HCMV est en phase de latence conduit à la reprise du cycle viral. Cette réactivation du virus se traduit par une augmentation du taux d'ADN viral, une hausse de l'expression des ARN viraux ainsi qu'une forte production de virions infectieux. Ce phénomène est réversible puisque le traitement des HSC par le KU55933 (inhibiteur spécifique de la voie ATM) inhibe la réactivation induite par la chloroquine. Le mécanisme par lequel ATM activerait la réactivation virale reste hypothétique, mais il a été suggéré qu'ATM pourrait induire la phosphorylation de KAP1, un co-represseur transcriptionnel impliqué dans la formation de l'hétérochromatine lors de la phase de latence virale. Cette phosphorylation de KAP1 favoriserait alors la reprise de la réplication et de l'expression du génome de HCMV (Rauwel *et al.*, 2015).

3.2.3.2 Implication de la DDR dans le cycle viral d'EBV

L'activation de la DDR a été observée dans les lymphocytes B et les cellules épithéliales infectées par EBV. Cette activation s'opère aussi bien au cours des phases d'infection cytotytique que durant sa phase de latence (Gruhne *et al.*, 2009b; Nikitin *et al.*, 2010; Turnell & Grand, 2012a). Le déclenchement de la DDR a été attribué à plusieurs événements accompagnants l'infection EBV y compris l'induction de CDBs, l'inhibition de la réparation de l'ADN, la détection du génome viral et le stress réplicatif (Hollingworth & Grand, 2015a).

Le rôle de la voie ATM dans le cycle viral de EBV et plus particulièrement dans la réplication du virus reste controversée. Kudoh *et al.* avaient montré qu'un traitement avec de la caféine (inhibiteur des 2 voies ATM et ATR) n'affectait pas la réplication d'EBV (Kudoh *et al.*, 2005). En revanche, des travaux ont démontré plus récemment que l'inhibition

spécifique de la voie ATM par la drogue KU55933 ou par des siRNA induit l'abrogation quasi-totale de la réplication d'EBV et de la production des virions infectieux (Kudoh *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2011). Aussi, les études actuelles tendent à s'accorder sur le fait que ATM aurait plutôt un impact bénéfique sur la réplication d'EBV. Il semble en effet qu'ATM soit impliqué dans la formation des compartiments de réplication viraux. De plus, l'infection lytique d'EBV conduit à l'accumulation de pATM et des protéines Nbs1-Rad50 et Mre11 du complexe MRN au niveau de ces compartiments (Hau *et al.*, 2015; Kudoh *et al.*, 2005). Par ailleurs, la voie ATM jouerait également un rôle majeur dans la réactivation du virus EBV. Selon le modèle proposé par Hagemeyer et al., l'activation de ATM permettrait de phosphoryler l'histone H2AX entraînant un changement de conformation de la chromatine qui conduirait à la stimulation des promoteurs des gènes viraux, notamment du promoteur du transactivateur BZLF1 essentiel au déclenchement de la réactivation virale (Hagemeyer, 2012). De plus, l'activation d'ATM lors de la réactivation d'EBV conduirait à la phosphorylation du facteur de transcription Sp1, qui serait alors relocalisé au niveau des compartiments de réplifications viraux (Hau *et al.*, 2015). Cette relocalisation de Sp1 s'accompagnerait du recrutement de protéines de la voie ATM et des protéines de réplication d'EBV au niveau de l'ADN viral favorisant ainsi sa réplication. Par ailleurs, la protéine 53BP1 jouerait un rôle clé dans la reprise de réplication d'EBV. L'inhibition de l'expression de 53BP1 par siRNA diminue en effet drastiquement la multiplication d'EBV (Bailey *et al.*, 2009). Une approche de protéomique a permis d'établir que l'interaction de la protéine 53BP1 avec la protéine virale BZLF1 serait importante pour le cycle réplcatif d'EBV (Bailey *et al.*, 2009).

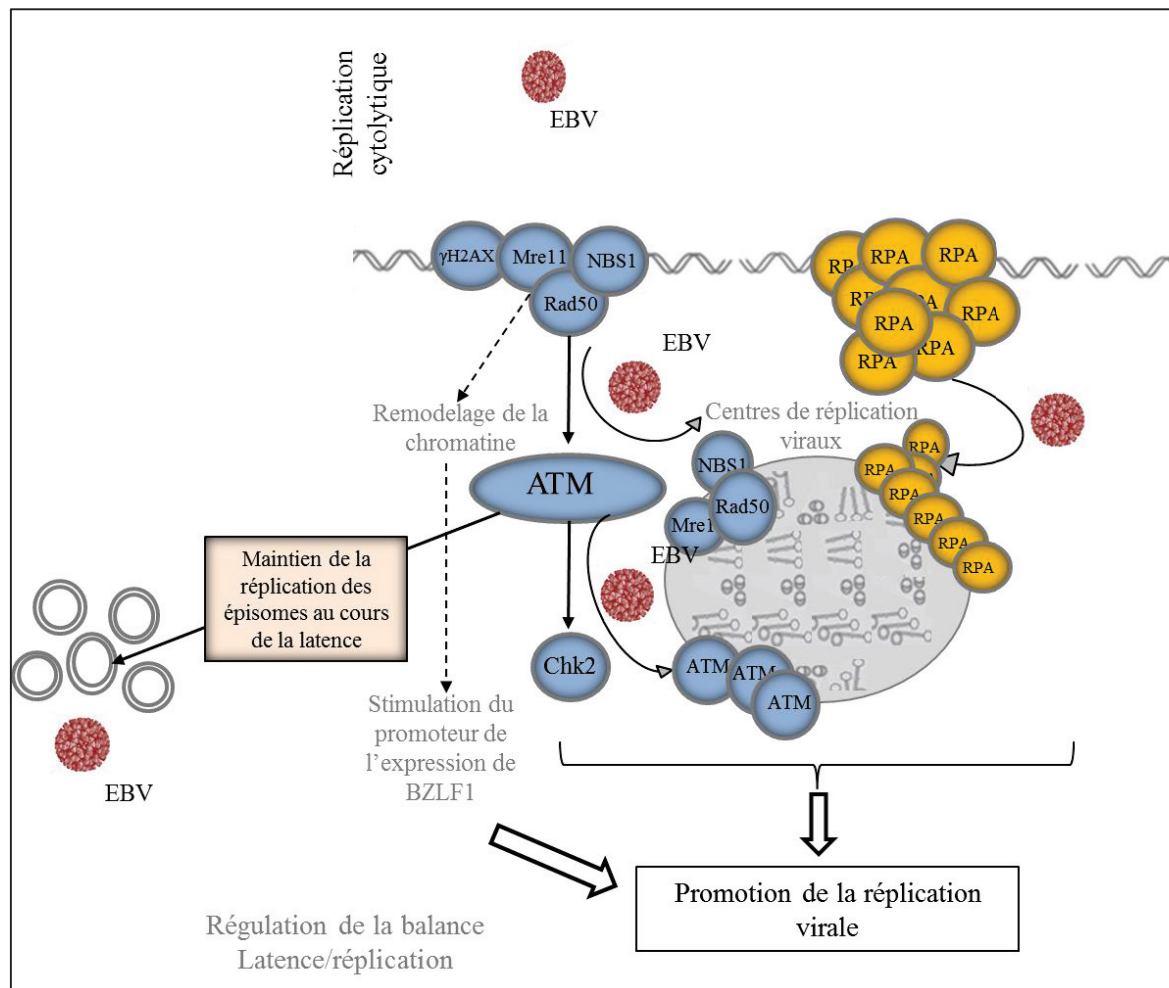


Figure 32. Schéma représentant l'implication de la machine de DDR dans la réplication et la latence d'EBV. EBV est responsable du recrutement des protéines de la voie ATM ainsi que du senseur de la voie ATR (RPA) au niveau de ses compartiments de réplication pour promouvoir sa multiplication. La phosphorylation de γ H2AX par ATM conduit à un remodelage chromatinien aboutissant à la stimulation du promoteur d'expression de la protéine BZLF-1 favorisant ainsi la réplication d'EBV. La voie ATM participe également au maintien et à la réplication des épisomes d'EBV lors de la phase de latence.

D'autre part, les protéines de la voie ATM contribuent au maintien ainsi qu'à la réplication des épisomes d'EBV au cours de la latence. Il a en effet été démontré que les protéines Mre11 et Nbs1 sont recrutées au niveau de l'origine de réplication des épisomes d'EBV (OriP) pendant la phase S (Dheekollu *et al.*, 2007; Hollingworth & Grand, 2015b; Nikitin & Luftig, 2011). Cette relocalisation de Mre11 et Nbs1 serait essentielle à la réplication et la stabilité des formes épisomales puisque le ciblage de ces protéines par des

siRNA induit la déstabilisation et l'inhibition de la réplication des épisomes. Aussi, l'infection EBV de cellules fibroblastiques déficientes pour ces 2 protéines conduit à la disparition des épisomes EBV et augmenterait la fréquence d'intégration d'EBV. De la même façon, aucune forme épisomale n'a été détectée lors de l'infection EBV de lignées lymphoblastoïdes ayant des mutations de NBS-1 (Dheekollu *et al.*, 2007).

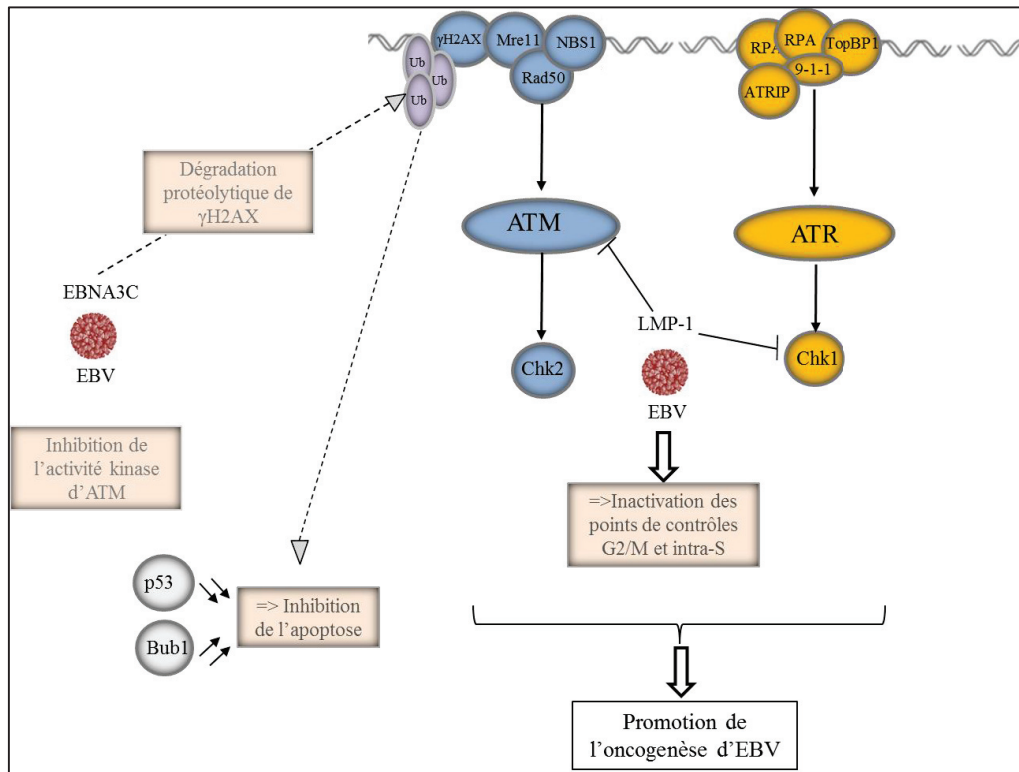


Figure 33. Schéma représentant l'implication de la machinerie de DDR dans l'oncogenèse d'EBV. L'activité de la machinerie de DDR est inhibée lors de la tumorigenèse d'EBV via l'action des protéines virales. La voie ATM est inhibée par les 2 oncogènes viraux LMP-1 et EBNA3C. La voie ATR, quant à elle, est bloquée par la protéine LMP-1 qui est responsable de l'inhibition de l'activation de Chk1.

L'oncogenèse induite par EBV semble être préférentiellement associée à une inhibition des voies de DDR pouvant être à l'origine de l'apparition d'instabilité génomique. L'hyperprolifération observée dans les cellules infectées par EBV se caractérise par une inactivation du point de contrôle intra-S via l'inhibition de la voie ATR et du point de contrôle G2/M (Figure 33). Plus particulièrement, l'interaction de EBNA-3C avec Chk2 et l'inhibition de l'activation de Chk1 et de l'activité kinase d'ATM par la protéine virale LMP-1 seraient responsables de l'inactivation de la transition G2/M (Nikitin *et al.*, 2010)

(Choudhuri *et al.*, 2007). }. De plus, EBNA3C en interagissant avec H2AX induit sa dégradation par le protéasome, ce qui aboutit à une régulation négative de l'expression du suppresseur de tumeur p53 dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) et une augmentation de l'expression de l'oncoprotéine Bub1, ayant pour conséquence l'inhibition de l'apoptose (Jha *et al.*, 2014). L'inhibition des voies ATM et ATR par les oncoprotéines codées par EBV, favoriserait donc la prolifération anarchique des cellules associée à une inhibition de l'apoptose. Ces dérégulations cellulaires pourraient conduire à générer de l'instabilité génétique dans les cellules infectées par EBV et *in fine* à la transformation cellulaire (Koganti *et al.*, 2014).

CHAPITRE 4

Le virus de la Maladie de Marek (MDV)

4.1 Historique

La maladie de Marek (MD) est une pathologie tumorale aviaire d'origine virale décrite pour la première fois en 1907 par Josef Marek comme une polynévrite. Les animaux affectés par cette maladie présentent en effet des paralysies des pattes et des ailes faisant suite à une atteinte du système nerveux périphérique (Biggs, 2004). L'incidence croissante de la MD et des leucoses lymphoïdes aviaires dans les années 1930 à 1950 détectées par un examen clinique ne permettant pas un diagnostic différentiel entre ces 2 affections avait conduit à considérer la MD comme un « complexe leucosique aviaire ». Ce n'est qu'en 1967 que l'agent étiologique responsable de la MD a été identifié par Churchill et Biggs comme étant un virus à ADN de la famille des *herpesviridae* communément appelé le virus de la maladie de Marek ou MDV (Davison, 2004), distinct des rétrovirus RSV responsables des leucoses aviaires.

4.2 La maladie de Marek

4.2.1 Formes cliniques de la maladie

La maladie de Marek se manifeste sous 3 formes cliniques : la forme classique ou nerveuse, la forme aiguë et la forme suraiguë.

La forme classique de la maladie désigne une paralysie flasque des membres du poulet qui est causée par une infiltration massive de lymphocytes T infectés et transformés par MDV au niveau du système nerveux périphérique (Burgess *et al.*, 2004; Nair, 2004). La paralysie est indirectement en cause de la mort des animaux du fait des difficultés des animaux à se mouvoir, limitant ainsi l'accès à la nourriture et la boisson.

La forme aiguë se traduit par l'apparition et la diffusion des lymphomes touchant plusieurs organes et tissus du poulet tels que le foie, la rate, les gonades, les poumons, le cœur, les reins, la peau et le tissu musculaire squelettique. L'évolution de la maladie est très rapide et peut entraîner la mort de l'animal en 4 semaines.

La forme suraiguë est caractérisée par une atteinte cérébrale des poulets sans développement de tumeurs. Elle conduit à une mort des animaux en une semaine.

Aujourd'hui, la MD est, sans doute, relativement rare en France du fait de la lourde couverture vaccinale. Cependant, son incidence réelle est mal connue étant donné qu'elle ne soit pas une maladie à déclaration obligatoire.

4.2.2 Transmission de la maladie

La MD affecte principalement la poule (*Gallus gallus*), mais des cas ont également été répertoriés chez d'autres oiseaux de la famille des Phasianidés. La transmission du MDV se fait exclusivement par voie horizontale. L'infection survient par voie respiratoire après inhalation de poussières contaminées par des particules virales excrétées lors de la desquamation et de la perte des plumes. Le follicule plumeux est, en effet, l'unique site de production et d'excrétion de virions infectieux dans l'environnement (Calnek *et al.*, 1970). Contrairement aux autres virus enveloppés, les virions MDV sont particulièrement résistants aux conditions du milieu extérieur et peuvent préserver leur pouvoir infectieux pendant plusieurs mois dans des conditions d'humidité et de température favorables (Nair, 2005). À l'image des autres herpesvirus, le MDV présente un spectre d'hôte très étroit puisque aucun cas n'a été rapporté jusqu'à ce jour chez l'homme ou les autres mammifères. Chez le poulet, la sensibilité au MDV dépend d'un certain nombre de critères incluant la virulence, la génétique de l'hôte (notamment le complexe majeur d'histocompatibilité), le sexe, l'âge, la voie d'inoculation (en conditions expérimentales) et les conditions d'élevage (le stress favorisant le développement de la maladie).

4.2.3 La vaccination

Malgré l'introduction de la vaccination à la fin des années 1960, le virus continue de circuler dans les élevages et induit des pertes économiques importantes au niveau mondial. En effet, les vaccins actuellement disponibles assurent une protection efficace contre le développement des tumeurs mais n'entravent pas la réplication et la dissémination du virus (Jarosinski *et al.*, 2006).

Rapidement après l'identification du virus en cause de la maladie de Marek, le premier vaccin contre le MDV a été développé par Churchill et ses collaborateurs en atténuant la souche virale oncogène HPRS-16 (GaHV-2) par passages successifs sur cellules de rein de poulet (Churchill *et al.*, 1969). Ce vaccin a ensuite été très vite remplacé par une souche vaccinale naturellement apathogène, l'herpesvirus de la dinde, HVT (*Meleagrid herpesvirus 1* ou MeHV1) (Okazaki *et al.*, 1970; Witter *et al.*, 1970). La mise en place de cette stratégie

vaccinale aux Etats-Unis a permis de contrôler la propagation de la MD et de nettement diminuer le taux de mortalité des poulets. Le vaccin HVT seul ou en combinaison avec d'autre vaccin est encore aujourd'hui largement utilisé (Sharma, 2004).

Parallèlement, Rispens *et al* ont isolé en 1972 une souche naturellement peu virulente chez le poulet, la souche CVI988. Après atténuation du virus par passages successifs sur des cultures de fibroblastes primaires de canard, cette souche a été utilisée comme vaccin depuis 1973 en Europe, puis plus tard aux Etats-Unis dans les années 1990. Il faut noter que CVI988 est un vaccin très efficace contre des souches hautement virulentes de MDV et il reste à l'heure actuelle un vaccin MDV de référence utilisé dans le monde. En vue de contrer l'émergence de souches MDV de virulence croissante, de nouveaux vaccins polyvalents (associant au moins deux souches vaccinales) ont été développés. Ainsi, des vaccins bivalents combinant la souche HVT à des souches non oncogènes de MDV faisant partie du sous type GaHV-3 (souche SB-1 par exemple) ou des vaccins trivalents HVT/SB-1/CVI988 sont utilisés aux USA depuis les années 1980. Les pays européens ont quant à eux choisi d'utiliser soit des vaccins monovalents HVT et CVI988 soit un vaccin bivalent HVT/ CVI988 (Sharma, 2004).

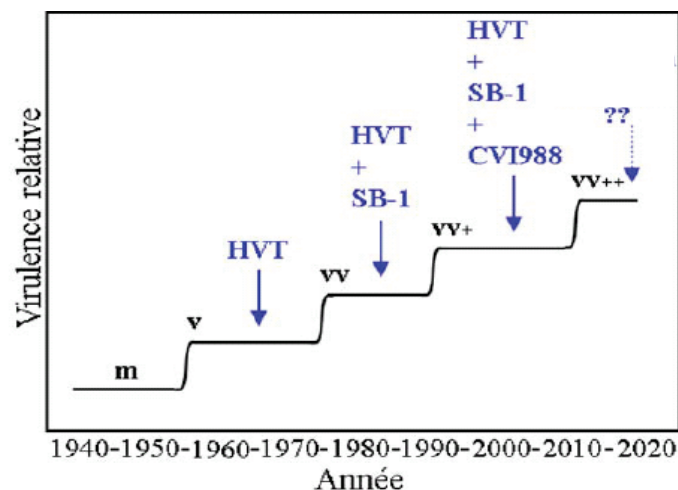


Figure 34. Evolution de la virulence des souches de MDV en fonction de la pression de sélection exercée par la vaccination. HVT: herpesvirus de dinde; SB-1: souche avirulente GaHV-3; CVI988: souche peu virulente atténuée GaHV-2; m: MDV moyennement virulent; v: MDV virulent; vv: MDV très virulent ;vv+: MDV hypervirulent; vv++ : MDV hyperhypervirulent (Jarosinski *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle la plupart des poulets des élevages industriels sont vaccinés. Aussi, la vaccination systématique des poules a permis de faire reculer la mortalité associée à MDV de 30% à moins de 5% en Europe et aux USA. Cependant, depuis la fin du 20^{ème} siècle, l'émergence de souches MDV de plus en plus virulentes échappant à la vaccination a conduit les équipes de recherche à élaborer de nouveaux concepts de vaccination. Ainsi, de nouveaux candidats vaccins basés sur la manipulation génétique des virus ont été développés. Ces stratégies consistent notamment à invalider des gènes MDV impliqués dans l'oncogenèse (Meq, vTR, miRs) ou à cibler des ARN viraux indispensables à la réplication par ARN interférence. Bien que certains de ces candidats-vaccins soient capables d'offrir une protection efficace contre les souches MDV vv+, leur utilisation n'a pas été encore appliquée à l'échelle de la filière avicole. Il faut noter qu'aucun de ces vaccins n'entravent pas la réplication du MDV, ni l'excrétion virale au niveau des follicules plumeux des animaux vaccinés. Aussi, les recherches sur le MDV restent un enjeu majeur afin de développer de nouveaux vaccins protégeant aussi contre l'infection et l'excrétion virale.

4.2.4 Physiopathologie

Le déroulement de l'infection de poulets par une souche virulente de MDV peut se résumer en 4 phases.

4.2.4.1 La phase cytotytique primaire

Cette phase d'infection se déroule dans les 2 à 7 jours suivant une infection expérimentale de poulets par voie parentérale (Davison, 2004). Dans un contexte d'infection naturelle, le virus pénètre au niveau du tractus respiratoire par inhalation de poussières contaminées présente dans l'environnement. Les cellules primo-infectées au niveau de l'appareil respiratoire n'ont pas été identifiées. Cependant, les cellules immunitaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques phagocyteraient le virus et le véhiculeraient vers les organes lymphoïdes (bourse de Fabricius, thymus et rate). Une étude a démontré que les lymphocytes B pulmonaires pourraient également être une cible principale du virus (Baaten *et al.*, 2009; Schat *et al.*, 1985). Dans les organes lymphoïdes, le virus infecte et se réplique activement dans les lymphocytes B qui le transmettent alors aux lymphocytes T activés, principalement CD4+. Il faut noter que le pourcentage des lymphocytes infectés dans les organes lymphoïdes n'excède pas 2% chez les poulets sensibles et est inférieur à 0,2% dans les poulets résistants. Parmi les cellules présentant une infection MDV cytotytique, 90% sont

des lymphocytes B (Davison, 2004). Cette phase du cycle viral est également concomitante à l'établissement d'une immunosuppression transitoire chez les poulets infectés associée à une atrophie des organes lymphoïdes (Abdul-Careem *et al.*, 2008; Islam *et al.*, 2002).

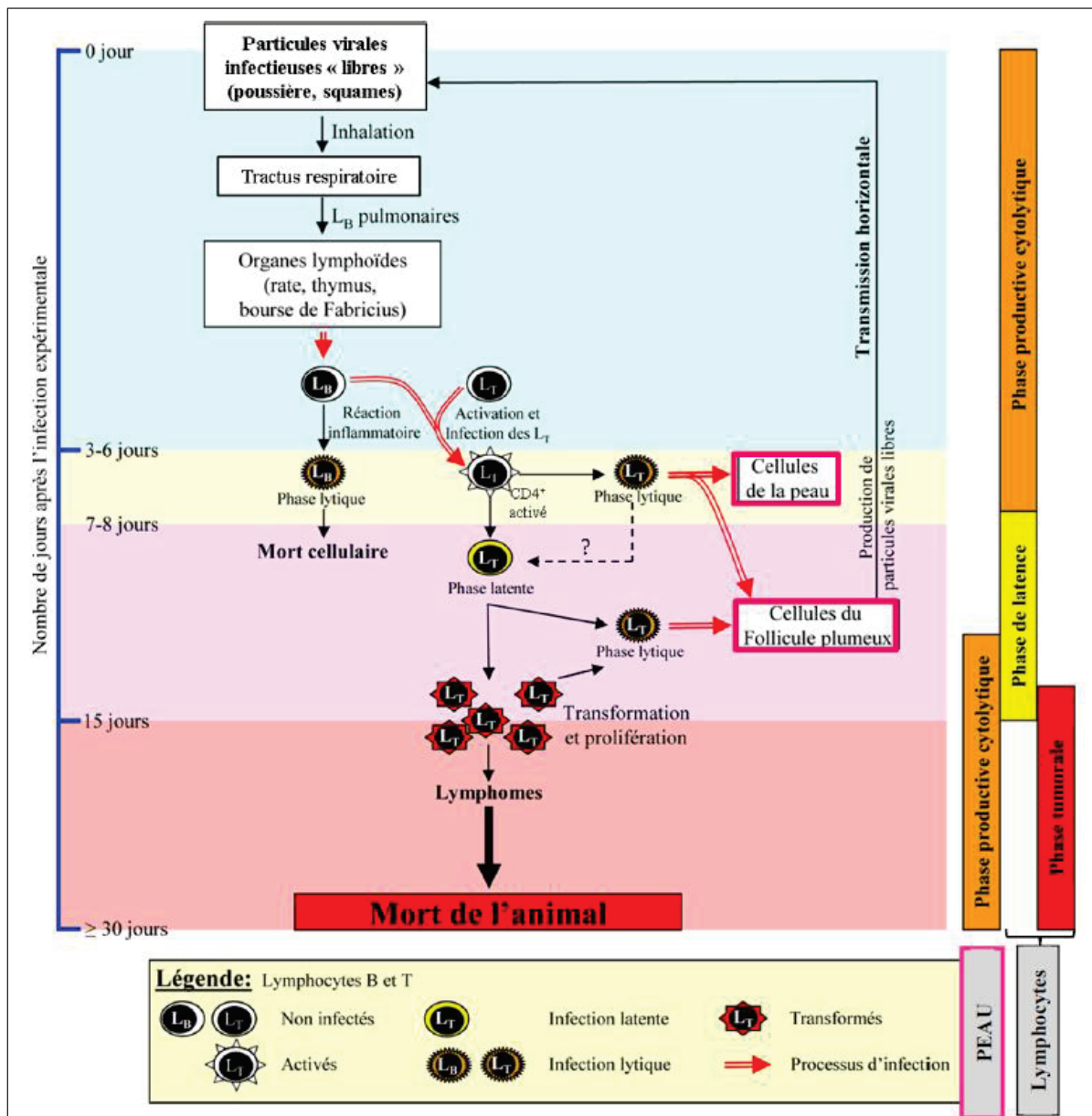


Figure 35. Chronologie de la pathogenèse de la maladie de Marek induite par une souche virulente du MDV (Couteaudier, 2015).

4.2.4.2 La phase de latence

Cette phase du cycle viral se caractérise par le maintien du génome MDV dans la cellule hôte sans production de virions infectieux. Elle débute environ 6 à 7 jours après infection, l'expression des antigènes viraux n'est plus détectable dans les tissus lymphoïdes. Contrairement à la phase cytotytique primaire, environ 90% des lymphocytes infectés en phase de latence sont des lymphocytes T, principalement CD4+, mais une infection latente a également été observée dans des lymphocytes B et T CD8+ (Davison, 2004; Lee *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2014). L'établissement et le maintien du virus en latence est multifactoriel impliquant des facteurs de l'immunité de l'hôte notamment les cytokines (IL-6, IL-18) et le monoxyde d'azote (NO), ainsi que des protéines virales exprimées spécifiquement au cours de la latence virale, notamment la protéine Meq (MDV EcoRI-Q protein), les transcrits LATs (Latency-associated transcripts) et des microARNs (Cantello *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2011; Morgan *et al.*, 2001). Au cours de la latence, le génome viral est retrouvé intégré dans l'ADN cellulaire des lymphocytes T CD4+ (Delecluse & Hammerschmidt, 1993; Delecluse *et al.*, 1993). Bien que l'intégration du génome de MDV concerne principalement les lymphocytes T, l'intégration de MDV a été également décrite récemment dans les lymphocytes B à des temps précoces après l'infection (Robinson *et al.*, 2014). Il faut noter que l'intégration virale a été détectée à de multiples sites chromosomiques, de 2 à 12 sites d'intégration de MDV dans les chromosomes ont en effet été identifiés, situés préférentiellement au niveau des régions télomériques et sub-télomériques (Delecluse & Hammerschmidt, 1993; Kaufer *et al.*, 2011). Bien que les mécanismes d'intégration ne soient toujours pas clairement identifiés, la présence de séquences télomériques (TMRs) aux extrémités du génome viral (identiques aux séquences télomériques des chromosomes aviaires) faciliterait ce processus potentiellement par recombinaison homologue (Delecluse & Hammerschmidt, 1993; Delecluse *et al.*, 1993; Kaufer *et al.*, 2011).

Chronologiquement, il est intéressant de noter que la phase de latence virale est concomitante à deux autres phases caractéristiques du MDV : la présence de MDV au niveau de l'épithélium des follicules plumeux (FFE) et la phase de tumorigenèse. Durant la 1^{ère} semaine de l'infection, MDV atteint le FFE à partir duquel il sera excrété jusqu'à la mort de l'animal. Dans ce tissu, l'ADN viral est détectable dès 6j pi et l'expression de protéines virales tardives a été mise en évidence dès 8j pi. Par ailleurs, il est difficile de distinguer les cellules dans lesquelles le MDV est en phase de latence et les cellules infectées et

transformées, sachant que les 2 formes sont quasiment co-existantes *in vivo* (Davison, 2004; Osterrieder *et al.*, 2006) et que la latence est un pré-requis à la transformation viro-induite.

4.2.4.3 L'infection cytolytique tardive

A partir du 14^e jour post-infection, une seconde phase d'infection cytolytique, dite « tardive », est observée chez les animaux (Calnek, 1986). Cette phase, communément appelée réactivation virale, se définit par une reprise de l'expression des protéines virales et de la multiplication virale dans certaines cellules lymphomateuses dans lesquelles le virus était en latence. La réactivation virale constituerait une source pérenne de virus pouvant être transmis au niveau de divers tissus lymphoïdes (thymus, bourse de Fabricius,...) et épithéliaux (foie, rein, proventricule,...). De plus, elle pourrait participer à la propagation du virus aux kératinocytes du FFE.

A ce jour, les mécanismes de réactivation virale sont encore méconnus. Néanmoins de nombreuses lignées cellulaires lymphoïdes transformées par le MDV ont été établies et constituent des modèles *in vitro* intéressants pour étudier la réactivation virale. En effet, dans ces cellules, le virus est majoritairement en phase de latence, mais dans certaines conditions de culture, une réactivation spontanée du virus est détectable dans une faible proportion de cellules (environ 5%) (Burgess & Davison, 2002; Calnek *et al.*, 1981; Denesvre *et al.*, 2015; Parcells *et al.*, 1999). De plus, l'utilisation d'inducteur de réactivation (i.e. butyrate de sodium, 5-Bromo 2-deoxyuridine...) augmente significativement la fréquence de réactivation virale (Hayashi *et al.*, 1994; Hunt *et al.*, 2001; Parcells *et al.*, 2001).

4.2.4.4 La lymphomagenèse viro-induite

La phase tumorale caractéristique des souches oncogènes de MDV est la conséquence ultime de l'interaction de MDV avec l'hôte. Elle se produit à partir de la 2^{ème} semaine d'infection et conduit au développement de lymphomes T suite à l'infiltration de LT transformés au niveau des organes viscéraux (reins, rate, foie, gonades), des nerfs périphériques et plus rarement de l'œil, de la peau et des muscles (Davison, 2004). La progression des lésions lymphomateuses compromet souvent la fonction de l'organe dans lequel elles se développent, résultant en une paralysie des animaux lors de l'atteinte du système nerveux périphérique ou en des pathologies toutes aussi mortelles quand elles touchent d'autres organes vitaux. Il faut également noter que la phase tumorale de la maladie s'accompagne d'une forte immunosuppression secondaire.

Les tumeurs MDV-induites sont composées de LT transformés (75%), de LB non transformés (15%) et de cellules immunitaires et inflammatoires non-infectées (10%) (Baigent, 2004). Les lymphomes sont issus majoritairement de la transformation de LT CD4+ infectés en latence (dans 98% des cas) et sont majoritairement monoclonaux et plus rarement oligoclonaux (Davison, 2004; Mwangi *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2010).

La tumorigenèse induite par MDV est un phénomène multifactoriel. En effet, plusieurs facteurs de virulence directement ou potentiellement impliqués ont été identifiés et seront décrits ci-dessous. Néanmoins, la compréhension de l'ensemble du mécanisme sous tendant la mise en place de la lymphomagenèse de MDV reste à élucider.

4.3 Le virus de la maladie de Marek

4.3.1 La classification du virus de la maladie de Marek

Le MDV appartient à l'ordre des *Herpesvirales* et à la famille des *Herpesviridae*. Bien que MDV ait été classé dans la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* en raison de son organisation génomique, le MDV possède des caractéristiques biologiques associées à celles des *Gammapherpesviridae*, notamment son lymphotropisme et sa capacité à induire des tumeurs. Il faut souligner que le MDV faisait initialement partie de la sous-famille des *Gammapherpesviridae*, puis de par son organisation génomique proche de celles des alphaherpesvirus, le MDV a été reclassé (Roizman & Baines, 1991). Au sein de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae*, le virus MDV (encore appelés Gallid herpesvirus 2 (GaHV-2)) est le prototype du genre *Mardivirus* dans lequel sont classés 4 autres espèces virales infectant les oiseaux : le Gallid herpesvirus 3 (GaHV-3), le Meleagrid herpesvirus 1 (MeHV-1 ou HVT), le Columbidae Herpesvirus 1 (CoHV-1) et l'Anatid herpesvirus 1 (DEV, herpesvirus des anatidés ou peste du canard). De nombreuses souches GaHV-2 ont été isolées et classées en 5 pathotypes selon leur virulence (notamment sur leur capacité à induire des lésions lymphoprolifératives) chez des animaux vaccinés : les souches avirulentes « a MDV », moyennement virulentes « m MDV », virulentes « v MDV », très virulentes « vv MDV » et hypervirulentes « vv+ MDV » (Tableau 1) (Witter, 1997).

Tableau 1 : Classification des virus du genre *Mardivirus*.

Espèce	Pathotype	Oncogénicité	Souches
GaHV-2 (MDV)	Avirulent (a)	0	CU-2, CV1988
	Moyennement virulente (m)	+/-	HPRS-17, Conn1
	Virulent (v)	+	HPRS-16, JM, GA, BC-1
	Très virulent (vv)	++	Md5, Md1, RB-1B
	Hypervirulent (vv+)	+++	648A, RK1, 584A
GaHV-3	Avirulent (a)	0	HPRS-24, SB-1, HN-1
MeHV-1 (HVT)	Avirulent (a)	0	FC126, PB1

4.3.2 Structure du virus de la maladie de Marek

Le MDV présente une structure classique d'un herpesvirus. Il est composé d'un génome ADN bicaténaire de 180 kb entouré d'une capside icosaédrique à l'extérieur de laquelle se trouve un tégument protéique délimité par une enveloppe d'origine cellulaire dans laquelle sont insérées des glycoprotéines virales (Jarosinski *et al.*, 2006; Osterrieder *et al.*, 2006).

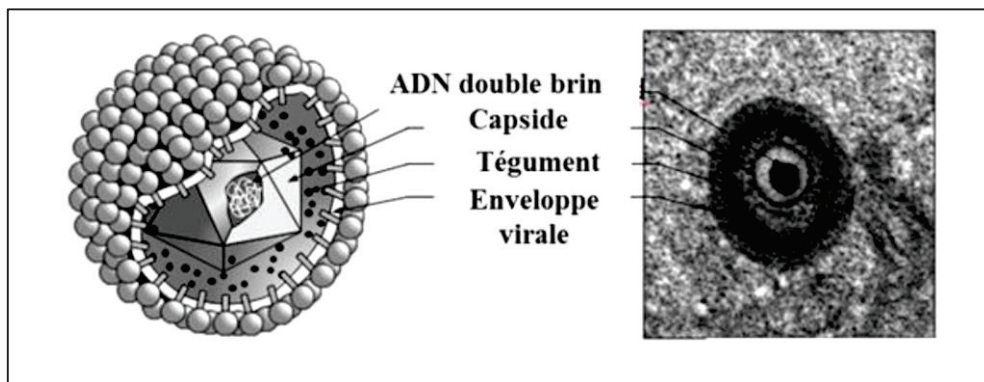


Figure 36. Représentation schématisée d'une particule d'herpesvirus (A gauche). Un virion intracellulaire MDV observé par microscopie électronique (A droite) (Denesvre *et al.*, 2007).

Le génome MDV possède une organisation génomique de classe E caractérisée par la présence de 2 séquences uniques (longue U_L et courte U_S) encadrées par des séquences répétées identiques et inversées internes et terminales IRL/TRL (Internal/Terminal Repeat Long) et IRS/TRS (Internal/Terminal Repeat Short) (Figure 37). Une particularité du génome de MDV est de posséder des séquences télomériques au niveau de ses extrémités et de la

jonction IRL/IRS. Ces séquences télomériques sont identiques à celles retrouvées chez le poulet et joueraient un rôle important dans l'intégration du MDV au cours de la phase de latence (Delecluse & Hammerschmidt, 1993; Kaufer *et al.*, 2011).

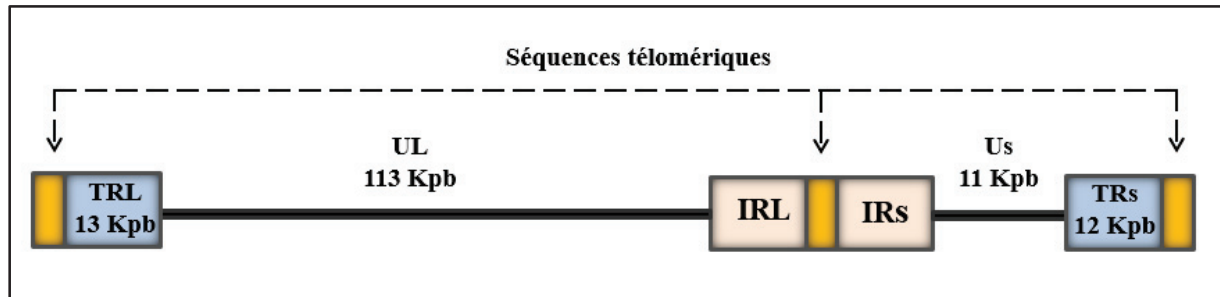


Figure 37. Représentation schématique de l'organisation du génome de MDV.

Le génome viral GaHV-2 code pour 103 protéines dont la majorité sont relativement homologues chez les alphaherpesvirus (Figure 38) (Tulman *et al.*, 2000). Les gènes les plus conservés sont localisés dans les régions UL et US, alors que les gènes spécifiques du MDV sont situés dans les régions répétées inversées. Les gènes spécifiques de GaHV2 sont fortement associés à son pouvoir pathogène et plus particulièrement à la tumorigénèse.

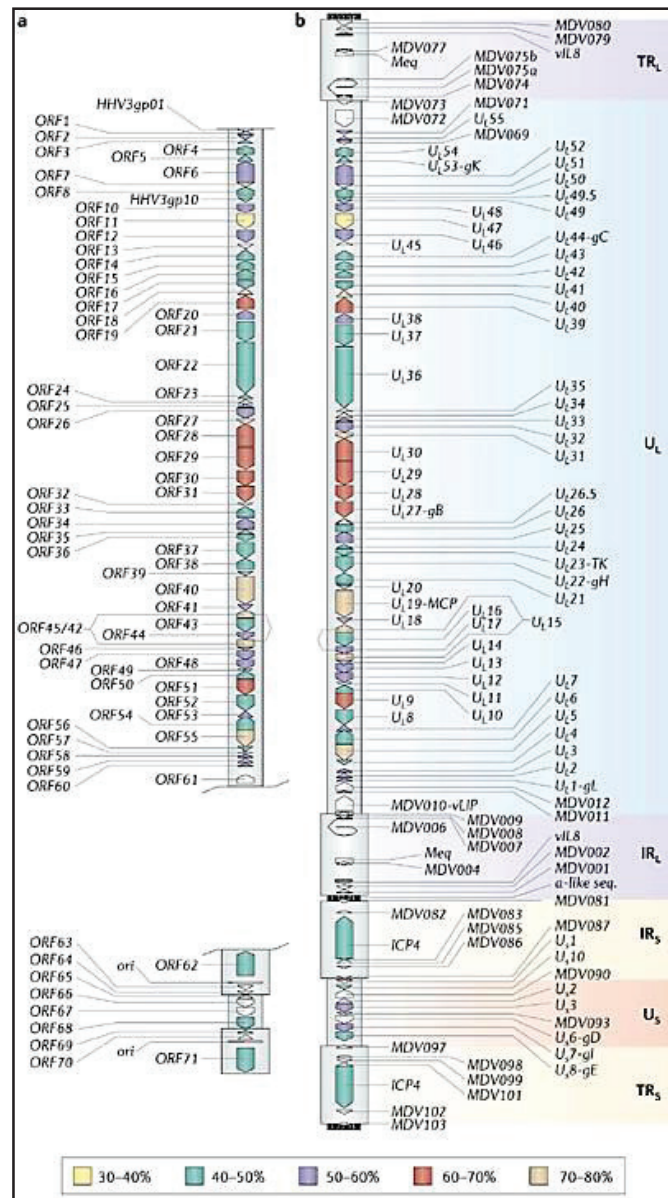


Figure 38. Comparaison de l'organisation génomique du virus MDV (GaHV-2) avec celle du VZV. VZV est l'herpesvirus humain le plus proche de MDV. La comparaison de la séquence génomique de MDV avec celle de VZV montre plusieurs zones d'homologie significative, surtout dans les régions uniques. Le taux de similarité de séquence est représenté par des codes couleurs (Osterrieder *et al.*, 2006).

4.3.3 Facteurs de virulences impliqués dans la lymphomagenèse

Mes travaux de recherche s'inscrivant principalement dans l'étude des processus conduisant à la tumorigenèse induite par le MDV, j'ai choisi de présenter plus

particulièrement dans ce manuscrit les gènes MDV impliqués dans le mécanisme néoplasique associé à l'infection.

4.3.3.1 Facteurs de virulence directement impliqués dans la tumorigénèse

4.3.3.1.1 L'oncogène Meq

Le gène *Meq* (Marek's disease EcoRI-fragment Q) est l'oncogène majeur de MDV (Kung *et al.*, 2001; Liu & Kung, 2000; Ross *et al.*, 1997). Ce gène présent en 2 copies dans le génome MDV (dans l'IRL et le TRL) code pour une nucléoprotéine de 339 acides aminés qui est exprimée dès 7j pi et durant toute la durée de l'infection jusqu'à la mort de l'animal (Debba-Pavard *et al.*, 2008; Jarosinski *et al.*, 2006). Cette protéine possède une multitude de fonctions impliquant sa capacité à se lier à l'ADN, à remodeler la chromatine et à réguler la transcription génique. En effet, Meq est un transactivateur majeur des gènes cellulaires et viraux, notamment du fait de la présence d'un domaine Leucine Zipper basique (bZIP) homologue à celui des oncogènes cellulaires de la famille Fos/Jun (Osterrieder *et al.*, 2006). Meq est ainsi capable de s'homodimériser ou de dimériser avec les protéines bZIP incluant c-Jun, B-Jun et c-Fos avec toutefois une affinité supérieure pour c-Jun (Liu & Kung, 2000; Osterrieder *et al.*, 2006). Les hétérodimères Meq/Jun et les homodimères Meq/Meq ont la capacité de se fixer sur des séquences spécifiques localisées dans les promoteurs : les séquences MERE (Meq Responsive Elements). L'hétérodimère Meq/Jun se lie préférentiellement aux promoteurs MERE I (GAGTGATGACGTCATC), alors que l'homodimère Meq/Meq peut se fixer sur MERE I et MERE II (RACACACAY) avec une plus grande affinité pour MERE II. Selon son partenaire de dimérisation, Meq peut avoir un rôle activateur (hétérodimère Meq/Jun reconnaissant AP-1) ou répresseur (homodimère Meq/Meq se fixant sur MERE II) (Ajithdoss *et al.*, 2009; Levy *et al.*, 2003; Suchodolski *et al.*, 2009). Des études d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis de révéler que Meq se liait au promoteur des gènes viraux pp24/pp38, Meq et ICP4, respectivement sur une site MERE II et sur 2 éléments de réponse AP-1 (Levy *et al.*, 2003). De plus, Meq peut transactiver des gènes cellulaires tels que l'interleukine 2, CD30 et Bcl-2 (Ajithdoss *et al.*, 2009; Burgess *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2003).

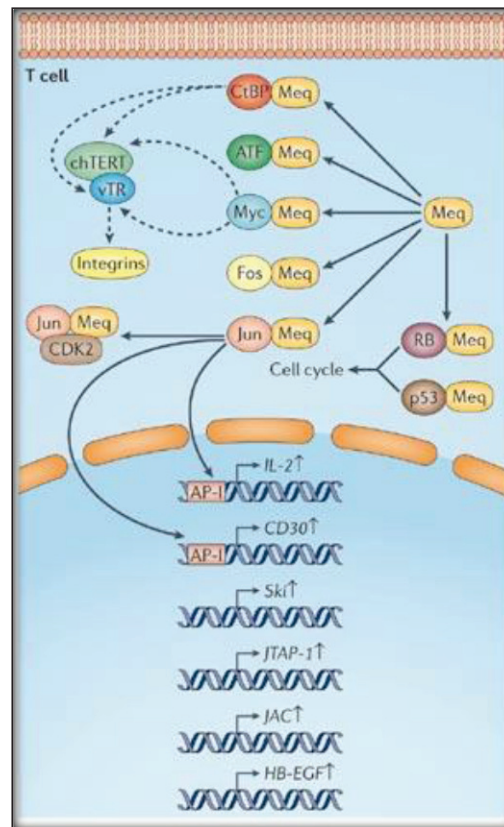


Figure 39. Schéma représentatif du rôle de Meq et de vTR dans la transformation cellulaire MDV induite (Osterrieder *et al.*, 2006).

Le rôle essentiel de Meq dans la tumorigénèse viro-induite a particulièrement été démontré par la perte totale d'oncogénicité d'un virus MDV recombinant délété du gène Meq (Lee *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008; Lupiani *et al.*, 2004). De plus, le pouvoir transformant de Meq a été établi par surexpression de la protéine dans deux lignées fibroblastiques murines, les cellules Rat-2 et NIH/3T3 (Ajithdoss *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 1998). La propriété oncogénique de la protéine Meq repose principalement sur son activité transactivatrice et ses propriétés anti-apoptotique. En effet, il a été démontré que l'expression ectopique de Meq permet aux cellules murines Rat-2 et aviaires DF-1 de résister à l'induction de l'apoptose induite suite à différents traitements, tels que la privation de sérum, l'irradiation par les UV ou des traitements avec du TNF- α ou des C2-céramides (Levy *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1998). Plus précisément, Meq activerait l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et inhiberait l'expression des gènes pro-apoptotiques Bax, Fas, FasL, et DAP5. Par ailleurs, la protéine Meq a également la capacité de se lier à plusieurs facteurs cellulaires impliqués dans la régulation du cycle cellulaire incluant Rb, p53 et CDK2 (Deng *et al.*, 2010; Osterrieder *et al.*,

2006). L'interaction de Meq avec ces protéines régulatrices majeures de la prolifération cellulaire participerait à la transformation des LTs et à l'oncogenèse induite par le MDV. Enfin, le motif PLDLS (Pro-Leu-Asp-Leu-Ser) localisé dans la partie N-terminale de la protéine Meq permettrait sa liaison à CtBP (C-terminal Binding Protein), facteur de transcription hautement conservé impliqué dans la régulation du développement, de la prolifération et de l'apoptose (Osterrieder *et al.*, 2006). Des études ont établi un lien direct entre la mutagenèse de ce motif et la perte du pouvoir oncogène du virus mutant RB1B correspondant (Brown *et al.*, 2006). Il faut noter que le motif PXDLS est également présent dans d'autres oncogènes viraux, tels que EBNA3A et EBNA3C qui interagissent avec CtBP et p53 (Brown *et al.*, 2006; Osterrieder *et al.*, 2006).

4.3.3.1.2 L'oncogène viral vTR

L'établissement de l'oncogenèse ne se limite pas à la transformation des cellules mais nécessite également leur l'immortalisation. La télomérase est une des enzymes impliquée dans la régulation de la survie cellulaire. Il s'agit d'un complexe ribonucléoprotéique assurant l'élongation des télomères localisés à l'extrémité des chromosomes maintenant ainsi leur intégrité lors des divisions cellulaires. Cette enzyme est constituée de 2 sous-unités : la sous-unité protéique ayant une activité reverse transcriptase nommé TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) et une sous-unité ARN (TR) servant de séquence matricielle à la reverse transcriptase TERT. Si l'activité télomérase est diminuée dans les cellules somatiques normales, elle est régulée positivement dans les cellules tumorales. Ainsi, la dérégulation de la télomérase participe activement aux processus d'immortalisation et de transformation cellulaire et son activation est observée dans plus de 85% des cas de cancers humains (Mu & Wei, 2002).

Le génome de MDV possède la spécificité de coder pour le seul homologue viral de la sous-unité ARN (TR) de la télomérase appelé (vTR) (Fragnet *et al.*, 2003). La séquence du gène codant vTR présente 88% d'homologie de séquence avec le gène codant la sous-unité ARN de la télomérase du poulet chTR. Le gène codant vTR est présent en 2 copies localisées dans les répétitions TRL et IRL (Trapp *et al.*, 2006). Des études menées *in vitro* ont permis de démontrer que l'interaction de vTR avec la sous-unité catalytique chTERT restitue une activité télomérase supérieure à celle obtenue avec la sous-unité chTR endogène (Fragnet *et al.*, 2003; Fragnet *et al.*, 2005). *In vivo*, vTR est exprimée tout au long du cycle de MDV et une augmentation de l'activité télomérase est observée dans les PBMCs de poulets infectés

par la souche vRB-1B (Shkreli *et al.*, 2007; Trapp *et al.*, 2006). De plus, une forte activité télomérase a été mise en évidence dans la lignée de lymphocytes aviaires transformées par MDV, MSB-1 (Djeraba-AitLounis *et al.*, 2004). Le rôle de vTR, dans le pouvoir oncogène du MDV a été illustré par l'abrogation quasi-totale de l'oncogenicité d'un virus MDV recombinant dans lequel les 2 copies du gène ont été délétées du génome viral (Trapp *et al.*, 2006). Toutefois, l'identification du rôle précis de vTR dans l'établissement de la tumorigenèse ne demeure pas claire. Il a été spéculé qu'elle pourrait favoriser l'intégration de MDV au sein du génome cellulaire par élongation des extrémités télomériques de MDV, augmenter la durée de la demi-vie des cellules infectées en latence et aussi d'être impliquée dans la sur-expression des intégrines de surface des cellules tumorales favorisant ainsi leur dissémination et leur infiltration dans les différents organes (Osterrieder *et al.*, 2006).

4.3.3.1.3 Les miRs

Le virus MDV code pour 14 microARNs « miRs » impliqués dans les différentes phases de sa pathogenèse et répartis en fonction de leur localisation en 3 clusters à savoir le Meq-cluster, le Mid-cluster et le LAT cluster (Figure 40) (Hicks & Liu, 2013; Teng *et al.*, 2015).

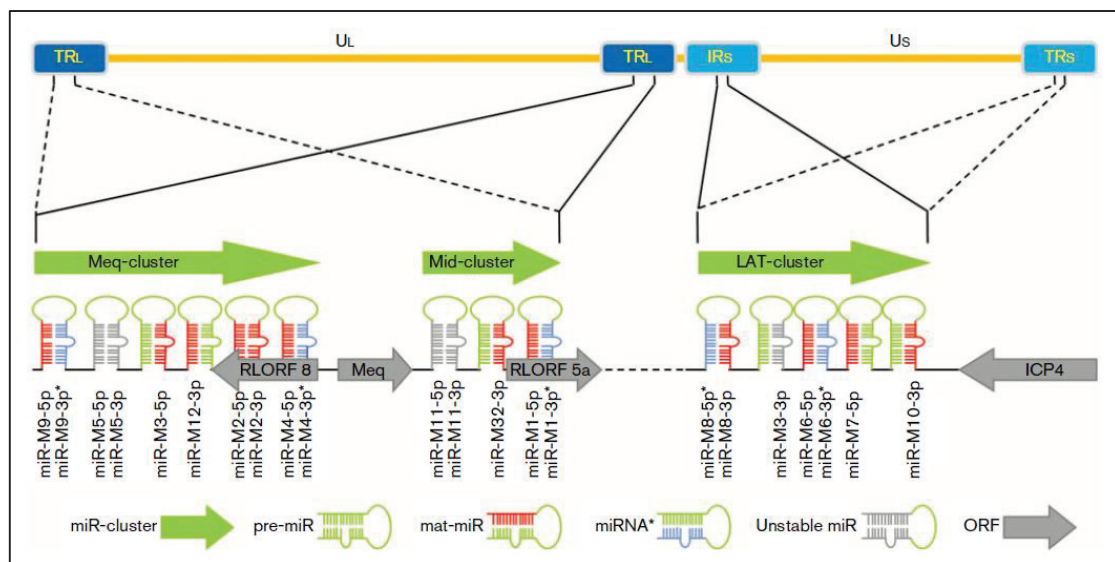


Figure 40. Schéma représentatif des clusters de miRs codés par MDV (Teng *et al.*, 2015).

L'implication des miRs dans la tumorigenèse de MDV a été mise en évidence par 2 études publiées en 2006 et 2008 démontrant que le taux d'expression de la majorité des miRs codés par MDV augmente considérablement dans les cellules extraites de tumeurs spléniques

ainsi que dans les lignées cellulaires T lymphoblastoïdes transformées par MDV (MSB-1) (Burnside *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2008). *In vivo*, le profil d'expression des différents miRs codés par MDV change au cours des différentes phases de la pathogenèse de MDV suggérant l'implication de ces miRs dans la régulation de la MD (Luo *et al.*, 2011). Bien que la séquence des miRs soit conservée parmi les souches oncogènes de MDV-1, les miRs appartenant au Meq-cluster présentent un niveau d'expression plus élevé dans les lymphomes induits par les souches très virulentes de MDV (vv) par rapport à ceux induits par les souches moins virulentes de MDV. Ces résultats semblent indiquer que les miRs du Meq-cluster pourraient jouer un rôle clé dans l'oncogenèse induite par le MDV.

Les miRs ; mdv1-miR-M9, mdv1-miR-M5, mdv1-miR-M3, mdv1-miR-M12, mdv1-miR-M2 et mdv1-miR-M4 constituent le Meq-cluster situé en amont de l'oncogène viral *meq* (Teng *et al.*, 2015). Le mdv1-miR-M4, similaire au miR-K12-11 codé par KSHV, est l'homologue fonctionnel viral du miR cellulaire miR-155 (Teng *et al.*, 2015). Mdv1-miR-M4 inhiberait spécifiquement la traduction des protéines virales (UL28 et UL32) impliquées dans le clivage et l'encapsidation de l'ADN viral (Muylkens *et al.*, 2010). De plus, son implication dans la tumorigenèse a clairement été établie, puisque que la délétion de mdv1-miR-M4 du génome de souches MDV très virulentes diminue drastiquement son oncogénicité (Yu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2011). Le mécanisme par lequel mdv1-miR-M4 participe à la tumorigenèse est encore peu connu, mais il serait notamment responsable de la dérégulation de la voie TGF- β en diminuant l'expression de LTBP1 (TGF- β binding protein 1), inhibant ainsi les activités pro-apoptotiques et anti-prolifératives du TGF- β . De plus, mdv1-miR-M4 serait responsable d'une augmentation d'expression et de l'activation du proto-oncogène c-myc (Chi *et al.*, 2015). Par ailleurs, les autres miRs du cluster Meq favoriseraient également l'oncogenèse viro-induite. Une étude récente a en effet démontré que la délétion des miR mdv1-miR-M2, mdv1-miR-M3, mdv1-miR-M5, mdv1-miR-M9 ou mdv1-miR-M12 entraine une forte diminution du taux de mortalité des animaux (jusqu'à 86%) et de l'incidence tumorale (Teng *et al.*, 2015). Le rôle de ces miRs reste à caractériser, cependant l'implication de mdv1-miR-M3 dans l'oncogenèse de MDV serait attribuable à la régulation négative qu'il induit sur l'expression de Smad2, un composant essentiel de la voie de signalisation du « facteur de croissance transformant » TGF- β , prolongeant ainsi la longévité des cellules infectées (Teng *et al.*, 2015). Bien que les miRs du cluster Meq soient nécessaires à la tumorigenèse viro-induite, ils ne sont pas essentiels à la réplication et à la latence du MDV (Teng *et al.*, 2015).

Le rôle des miRs du Med-cluster (situé en aval de l'oncogène viral *meq*) dans la pathogenèse du MDV a été peu étudié. Néanmoins, il a été suggéré que miR-M31 participerait indirectement à la tumorigenèse de MDV en ciblant un inhibiteur de cycle cellulaire, la protéine p27^{Kip1} (Galardi *et al.*, 2007). Les miRs du LAT-cluster, quant à eux, pourraient être impliqués dans la transition phase cytotytique/phase de latence de l'infection MDV.

4.3.3.2 Facteurs de virulence potentiellement impliqués dans la tumorigenèse

Si certains facteurs de virulence ont été clairement identifiés comme oncogènes, d'autres, impliqués dans diverses étapes du cycle viral n'ont pas de pouvoir tumorigène avéré mais participent activement aux processus néoplasiques viro-induits (Figure 41).

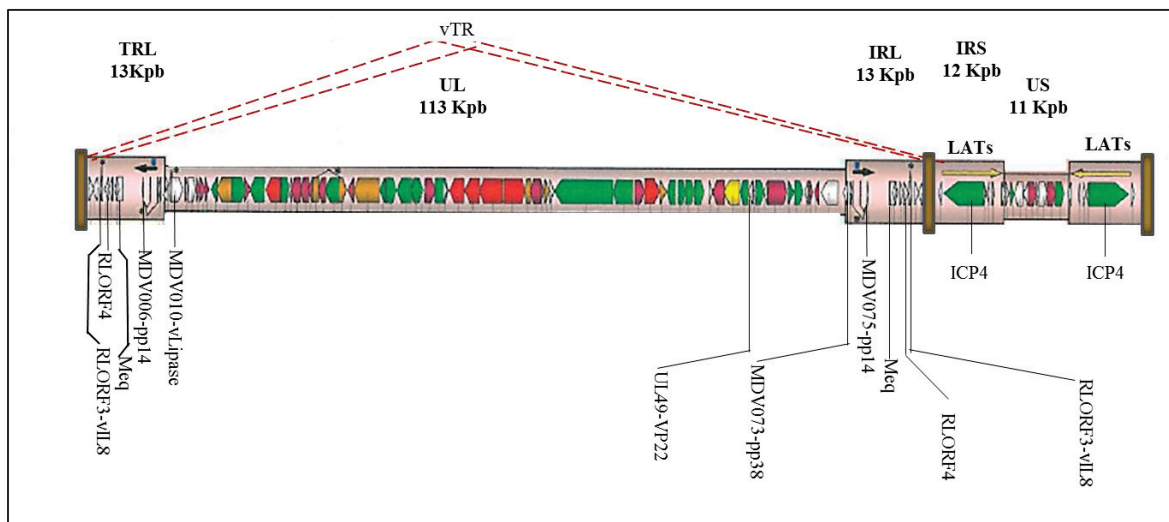


Figure 41. Représentation schématique des différents facteurs de virulence de MDV impliqués dans la tumorigenèse.

4.3.3.2.1 Les LATs (latency associated transcripts)

MDV code pour des transcrits spécifiquement associés à la latence et à la tumorigenèse, les LATs (Latency Associated Transcripts), localisés au niveau des régions répétées inversées (IRS/TRS) du génome viral sur le brin antisens du gène codant la protéine ICP4 (Baigent, 2004; Cantello *et al.*, 1994; Cantello *et al.*, 1997). Cette famille de transcrits est constituée de plusieurs ARNs dont un ARN non épissé de 10 kb appelé L RNA et deux petits ARN épissés de 0,75 et 0,90 kb appelés MSR (Marek's disease virus Small RNA) (Cantello *et al.*, 1994; Cantello *et al.*, 1997). D'autres transcrits issus d'épissages alternatifs

ont ensuite été découverts dans des lignées transformées par le MDV (Li *et al.*, 1998; Li & Schat, 2004; McKie *et al.*, 1995). Le rôle biologique de ces transcrits reste encore inconnu. En effet, aucune protéine connue à ce jour ne semble être exprimée à partir des LATs. Cependant, il a été observé que selon le stade de l'infection, l'expression d'*ICP4* serait inversement reliée à celle des LATs suggérant un mécanisme de régulation du gène *ICP4* par ARN interférence impliquant les LATs (Cantello *et al.*, 1994). Par ailleurs, les LATs seraient potentiellement impliqués dans l'établissement de la tumorigenèse de MDV puisque des poulets infectés par un virus recombinant RB-1B dans lequel le site d'initiation des LATs (l'extrémité 5' du promoteur de l'expression des LATs) a été délété ne développent pas de tumeurs après 8 semaines d'infection (Morgan *et al.*, 2001).

4.3.3.2.2 La famille des transcrits BamHI-H

Il s'agit d'une famille de gènes localisés dans les régions IRL et TRL des souches de l'espèce GaHV-2 et située à proximité des motifs répétés de 132pb. La région BamHI-H présente une activité transcriptionnelle aboutissant à l'expression de 3 transcrits de 1.8 kb, 3 kb et 3.8 kb produits à partir du promoteur bidirectionnel commun avec les gènes codant les protéines pp38 et pp24. Plusieurs phases ouvertes de lecture ORFs ont été prédites dans la séquence de ces transcrits néanmoins seulement 2 protéines ont été identifiées à ce jour : BHa et pp14 (Peng *et al.*, 1992). Le polypeptide BHa d'une masse de 7 kDa est codé par l'ORF-A et est exprimé par les cellules CEFs infectées par des souches oncogènes de MDV ou par les lignées cellulaires lymphoblastoïdes transformées par MDV (Peng *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 1995). La phosphoprotéine pp14, quant à elle, est codée par L-ORF10 et a été détectée dans des lysats de cellules lymphoblastoïdes MSB-1 ainsi que dans des lysats de cellules infectées par le MDV (Hong & Coussens, 1994; Hong *et al.*, 1995). Bien que la fonction des transcrits de cette région soit peu connue, des travaux de recherche ont suggéré un rôle de ces derniers dans l'oncogenèse de MDV et dans la prolifération des cellules tumorales. L'utilisation d'oligonucléotides antisens des ARNs de la famille BamHI-H diminuerait en effet drastiquement la prolifération des cellules lymphoblastoïdes transformées par MDV et induirait un arrêt du cycle cellulaire en phase-S (Hayashi *et al.*, 1999). L'implication des transcrits de la famille BamHI-H dans la lymphomagenèse viro-induite reste néanmoins à relativiser et à préciser étant donné que la délétion du transcrit de 1,8 kb aurait un rôle mineur sur le pouvoir oncogène du virus alors qu'il aurait un impact majeur sur la réplication virale (Sun *et al.*, 2010).

4.3.3.2.3 Le gène *pp38*

Le gène *pp38*, spécifique de GaHV-2, se situe à la jonction des séquences UL et IRL et code pour la phosphoprotéine pp38 (Ding *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2005a). Cette phosphoprotéine a été initialement identifiée comme un antigène de MDV exprimé par les cellules tumorales issues d'animaux atteints de MD et dans les lignées lymphoblastoïdes transformées par MDV laissant penser à une éventuelle implication de cette protéine dans l'oncogenèse de MDV (Cui *et al.*, 1990). De plus, la délétion de *pp38* du génome de la souche MDV très virulente Md5 aboutit à une forte atténuation de la réplication virale *in vivo* associée à une forte diminution de l'oncogénicité de cette souche virale (Reddy *et al.*, 2002).

4.3.3.2.4 Le gène *RLORF4*

RLORF4 est un cadre ouvert de lecture (ORF) présent en 2 copies situées dans les régions TRL et IRL du génome MDV (Jarosinski *et al.*, 2003). Ce gène coderait pour une protéine de 142 acides aminés exprimées durant les phases lytique et latente. Bien que son rôle reste encore hypothétique, il semblerait que cette protéine soit associée à la pathogenèse de MDV. En effet, une étude a mis en évidence que l'atténuation d'une souche MDV virulente par passages successifs en culture de cellules conduisait à des délétions dans la séquence *RLORF4* (Jarosinski *et al.*, 2003). De plus, l'invalidation de *RLORF4* dans un virus MDV recombinant virulent réduit considérablement son pouvoir oncogène puisque qu'aucun poulet infecté par ce virus ne développe de signes cliniques de MD jusqu'à 13 semaines post-infection. De plus, seulement 10% des poulets infectés par ce virus présentaient des tumeurs de taille réduite après autopsie (Jarosinski *et al.*, 2005). Il faut noter que cette mutation est également associée à une augmentation de la réplication et de la dissémination du virus *in vitro*. Cependant, la réplication de ce virus diminue à partir de 14 jours pi *in vivo*, pouvant suggérer un rôle potentiel de *RLORF4* dans la réactivation virale (Jarosinski *et al.*, 2005; Jarosinski *et al.*, 2006).

4.3.3.2.5 La protéine vIL-8

La protéine vIL-8 codée par le gène *RLORF3* présent en 2 copies dans le génome viral (TRL et IRL), a initialement été identifiée comme l'homologue viral de l'interleukine IL8 aviaire, chIL8 (Parcells *et al.*, 2001; Peng & Shirazi, 1996). vIL-8 est exprimée durant la phase lytique et est composée de trois exons codant pour une chimiokine virale de type CXC (Liu *et al.*, 1999; Parcells *et al.*, 2001). Toutefois, l'étude des propriétés chimio-attractives de

vIL8 a révélé que son pouvoir de chimio-attraction cible les lymphocytes et les macrophages contrairement à chIL8 qui attire les hétérophiles (équivalent aviaire des neutrophiles de mammifères) (Jarosinski *et al.*, 2006). Cette différence de tropisme cellulaire viendrait du remplacement du motif ELR (Glu-Leu-Arg) présent dans chIL8 par un motif DKR (Asp-Lys-Arg) dans vIL8. De ce fait, la vIL8 purifiée se lie préférentiellement aux LB et les LT CD4+ de poulet (Jarosinski *et al.*, 2006; Nair, 2013). Le taux d'expression de vIL8 semble être lié à la virulence des souches de MDV puisqu'une expression plus importante de vIL-8 a été observée lors de l'infection *in vivo* par des souches virulentes par rapport à des souches atténuées ou avirulentes (Jarosinski *et al.*, 2003). Le rôle de vIL-8 dans la pathogenèse de MDV a été mise en évidence dans plusieurs modèles expérimentaux incluant différents types de mutation de vIL8 (Jarosinski *et al.*, 2006). Ainsi, le remplacement de la séquence de vIL8 par la séquence de smGFP (soluble modified green fluorescent protein) dans le génome de la souche virale très virulente RB-1B mène à une diminution significative de la réplication virale *in vivo* ainsi qu'à une baisse de l'incidence tumorale. En effet, seuls 14% des poulets infectés par le virus invalidé pour vIL8 présentent des tumeurs par rapport à 100% des animaux infectés par un virus sauvage (Parcells *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que la délétion du premier exon de vIL-8 entraîne une diminution significative de l'infection lytique précoce (Jarosinski & Schat, 2007). En revanche, vIL8 ne semble pas impliquée dans l'établissement de la latence, ni dans la phase de réplication tardive du virus au niveau des follicules plumeux (Cui *et al.*, 2004). Le rôle de vIL8 dans la tumorigenèse serait plutôt indirect et reposerait sur la réduction du nombre de cellules infectées en cycle lytique et/ou à un défaut de recrutement des LT, entraînant une diminution de la probabilité d'apparition des événements de transformation cellulaire (Jarosinski *et al.*, 2006). De plus, vIL-8 est capable d'attirer pour les monocytes du sang circulant, et ainsi favoriser l'échappement de MDV à la réponse immune, tel que cela a déjà été décrit pour d'autres herpesvirus (Jarosinski *et al.*, 2006).

4.3.3.2.6 Le gène *v-LIP*

v-LIP est un autre exemple de gène non essentiel à l'oncogenèse mais affectant le développement de tumeurs chez les poulets infectés. Appelé également *LORF2*, le gène *v-LIP* code pour une protéine de 756 acides aminés présentant une homologie de séquence avec les lipases pancréatiques (Jarosinski *et al.*, 2006). Bien que la fonction précise de cette protéine reste méconnue, la protéine v-LIP favorise la réplication virale *in vivo* puisque la délétion de son gène conduit à une diminution significative du titre viral dans le sang dès les phases précoces de l'infection. De plus, la délétion de *v-LIP* induit une forte réduction de virulence

du MDV, le taux de survie des poulets infectés étant 4 fois supérieur aux poulets infectés par une souche sauvage (Jarosinski *et al.*, 2006; Kamil *et al.*, 2005).

4.3.3.2.7 La protéine VP22

La protéine VP22 est une phosphoprotéine majeure du tégument de MDV codée par le gène *UL49* présent dans la région unique longue (UL) du génome MDV. Bien qu'elle soit une protéine relativement tardive de la phase lytique de MDV, elle est abondamment exprimée dans le cytoplasme et le noyau des cellules infectées (Dorange *et al.*, 2000). Cette protéine est conservée chez les alphaherpèsvirus. Le rôle essentiel de VP22 dans la réplication virale a été démontré pour MDV et par la suite également pour le virus VZV puisque sa délétion du génome viral entraîne une perte totale de réplication et dissémination virale (Che *et al.*, 2008; Dorange *et al.*, 2002). En revanche, VP22 n'est pas indispensable au cycle viral des alphaherpèsvirus HSV-1, PRV (le virus de la pseudo-rage) et BoHV-1 (l'herpesvirus bovin de type 1). De plus, il a été démontré que la protéine VP22 codée par MDV joue un rôle dans la dissémination du virus de cellule à cellule (Denesvre *et al.*, 2007).

Bien qu'elle soit indispensable à la réplication de MDV, son rôle dans la pathogenèse virale notamment la lymphomagenèse est peu clair. Il faut noter que la protéine VP22 codée par MDV présente une forte affinité pour l'ADN, en particulier pour l'hétérochromatine (Dorange *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 2002). En outre, il a été précédemment démontré que VP22 présente à la fois une localisation nucléaire et cytoplasmique dans les cellules infectées par MDV et s'accumule dans le noyau lors de sa surexpression cellulaire (O'Donnell *et al.*, 2002). Nos recherches avaient récemment permis de mettre en évidence une dérégulation du cycle cellulaire conduisant à un arrêt prolifératif des cellules en phase-S spécifiquement dans les cellules infectées par le MDV. Ce blocage s'est avéré en liaison avec VP22. En effet, VP22 est une protéine modulatrice majeure du cycle cellulaire puisque sa surexpression dans les cellules aviaires LMH conduit à un blocage en intra-S de plus de 90% des cellules. Dans ces cellules, la VP22 présentait une localisation nucléaire et était fortement associée aux histones. Cette étude a également montré que l'expression de VP22 était associée à l'apparition de cassures double-brin de l'ADN (CDBs) visualisées par une accumulation nucléaire du marqueur γ H2AX en foci. Aussi, la modification de l'extrémité C-terminal de la protéine par fusion d'une étiquette EGFP abolit la capacité de la VP22 à induire ces dommages à l'ADN et à s'associer aux histones, alors qu'un étiquetage en N-terminal n'avait pas d'impact sur ces propriétés (Trapp-Fragnet *et al.*, 2014). Par ailleurs, des études récentes

ont montré que les virus recombinants MDV exprimant une protéine VP22 fusionnée à l'eGFP sont atténués *in vivo* (Jarosinski *et al.*, 2012; Remy *et al.*, 2013). Les travaux de Jarosinski *et al* ont, en effet, démontré qu'un virus recombinant MDV vRB-1B 22EGFP codant pour la protéine VP22 étiquetée à son extrémité C-terminale était fortement atténué chez les poulets par rapport au virus sauvage vRB-1B (seuls 10% des animaux infectés ont développé la MD) (Jarosinski *et al.*, 2012). Parallèlement, des travaux de notre laboratoire avaient mis en évidence que le virus MDV recombinant vRB-1B EGFP22 ayant une étiquette eGFP à l'extrémité N-terminale de sa protéine VP22 présentait également une atténuation *in vivo* puisque seulement 60% des animaux inoculés développaient des tumeurs (Remy *et al.*, 2013). Au vu de ces résultats et du fait de l'implication des CDBs dans la génération d'instabilité génomique, nous avons émis l'hypothèse que VP22 pourrait participer au processus néoplasique induit par le MDV.

Objectifs du projet de thèse

Depuis plusieurs années le couple MDV/poule s'est imposé comme un modèle d'étude de la tumorigenèse viro-induite (Osterrieder *et al.*, 2006). Néanmoins, malgré l'identification d'oncogènes viraux majeurs, les mécanismes à l'origine de la tumorigenèse de MDV sont encore à l'heure actuelle peu connus.

Des travaux réalisés dans notre laboratoire avaient démontré que l'infection par le MDV conduit à une dérégulation du cycle cellulaire marquée par un arrêt prolifératif des cellules infectées en phase-S. Nous avons également identifié la protéine tégumentaire VP22 comme un régulateur majeur du cycle cellulaire, sa surexpression en cellules aviaires induit un arrêt intra-S dans plus de 90% des cellules. Cette étude avait permis de démontrer que ce blocage du cycle cellulaire par VP22 reposerait sur sa capacité à interagir avec les histones et à induire des lésions double-brin dans l'ADN génomique. Au vu de la cytotoxicité associée à l'apparition de CDBs dans les cellules et de l'implication des dommages à l'ADN dans la mise en place des processus néoplasiques, mon projet de thèse visait à préciser l'implication des dommages à l'ADN dans la pathogenèse du MDV, plus particulièrement dans la tumorigenèse viro-induite et la réplication virale.

Les objectifs de ma thèse reposaient sur 3 axes principaux. Le premier axe consistait à déterminer si l'infection par le MDV conduit à l'apparition de lésions dans l'ADN de la cellule hôte *in vitro*, de préciser la cinétique d'apparition des dommages induits par le MDV *in vivo* et d'explorer leur rôle dans les différentes phases du cycle viral notamment les phases cytolitiques précoce et tardive, la phase de latence et la lymphomatogenèse. Le deuxième volet de ma thèse s'inscrivait dans la continuité de l'étude menée sur la VP22 et de son rôle dans l'induction de lésions dans l'ADN. Je me suis, en effet, attachée à vérifier en contexte infectieux l'implication de VP22 dans l'apparition de ces dommages et dans l'oncogenèse virale. Enfin, la dernière partie de ma thèse avait pour objectif d'étudier les voies de DDR mises en place en réponse à la génération des dommages à l'ADN en vue de déterminer leur implication dans le cycle viral.

Mon projet de thèse avait donc pour ambition d'apporter un éclairage nouveau sur la pathogenèse du MDV en précisant l'impact de dommages à l'ADN d'une part sur la cellule infectée et d'autre part sur le cycle viral du MDV.

Résultats

1. Etude des dommages à l'ADN au cours du cycle viral de MDV

1.1 Induction de dommages à l'ADN dans les PBMCs de poulet durant l'infection MDV

Afin d'étudier si l'infection par le MDV est à l'origine de l'apparition de dommages à l'ADN, nous avons réalisé une infection expérimentale de poulets par le MDV. Pour ce faire, deux groupes de poulets de race Leghorn Blanche âgés de 3,5 semaines ont été constitués : (i) un lot témoin comportant 10 poulets non-infectés et (ii) un lot de 13 animaux inoculé avec 10^3 PFU de la souche très virulente MDV-vRB-1B. L'expérimentation s'est déroulée pendant 35 jours à l'issue desquels le taux de mortalité associée au développement de la MD était de 46%. L'euthanasie et l'autopsie des poulets encore en vie à la fin de l'expérimentation a fait apparaître que 100% des poulets infectés avaient développés des tumeurs. Au cours de l'infection expérimentale, des prises de sang hebdomadaires ont été effectuées afin de déterminer la charge virale sur le sang total et de purifier les cellules périphériques mononucléaires sanguines (PBMCs) à partir desquelles nous avons étudié l'apparition des dommages à l'ADN.

La charge virale a été mesurée par qPCR sur la base du nombre de copies du gène viral *ICP4* par rapport à 10^6 copies du gène de ménage cellulaire *iNOS* (Figure 42A). Une augmentation significative du nombre de copies d'ADN viral a ainsi été détectée dès 7 jours pi dans le lot de poulets infectés, reflétant une réplication efficace du MDV lors de la phase cytotytique primaire. A partir de J7 pi, la charge virale augmente progressivement jusqu'à J35 pi.

Les dommages à l'ADN ont été évalués en utilisant le test des comètes (ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)) à partir de 2.10^5 PBMCs préalablement isolés sur un milieu de séparation de lymphocyte (MSL). Le test des comètes permet d'estimer qualitativement et quantitativement les lésions survenues dans l'ADN de cellules individualisées en calculant différents paramètres tenant compte de la longueur de la queue de la comète et/ou de la proportion d'ADN présent dans celle-ci. Dans notre étude, nous avons choisi de représenter les résultats selon le paramètre « olive tail moment » (OTM) qui est le plus représentatif de la sévérité des lésions et recommandé pour l'évaluation des dommages à partir de lymphocytes (Lee *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 1996a; Olive *et al.*, 1996b). Le test des comètes a permis de mettre en évidence que les PBMCs de poulets infectés à J0 et des poulets non-infectés au cours de l'expérimentation présentaient un ADN peu endommagé (Figure 42B). En revanche, 7 jours pi, l'ADN des PBMCs des animaux infectés apparaît sous forme de comètes avec un

OTM moyen 4 fois supérieur à celui observé dans les PBMCs des poulets non-infectés (Figure 42B).

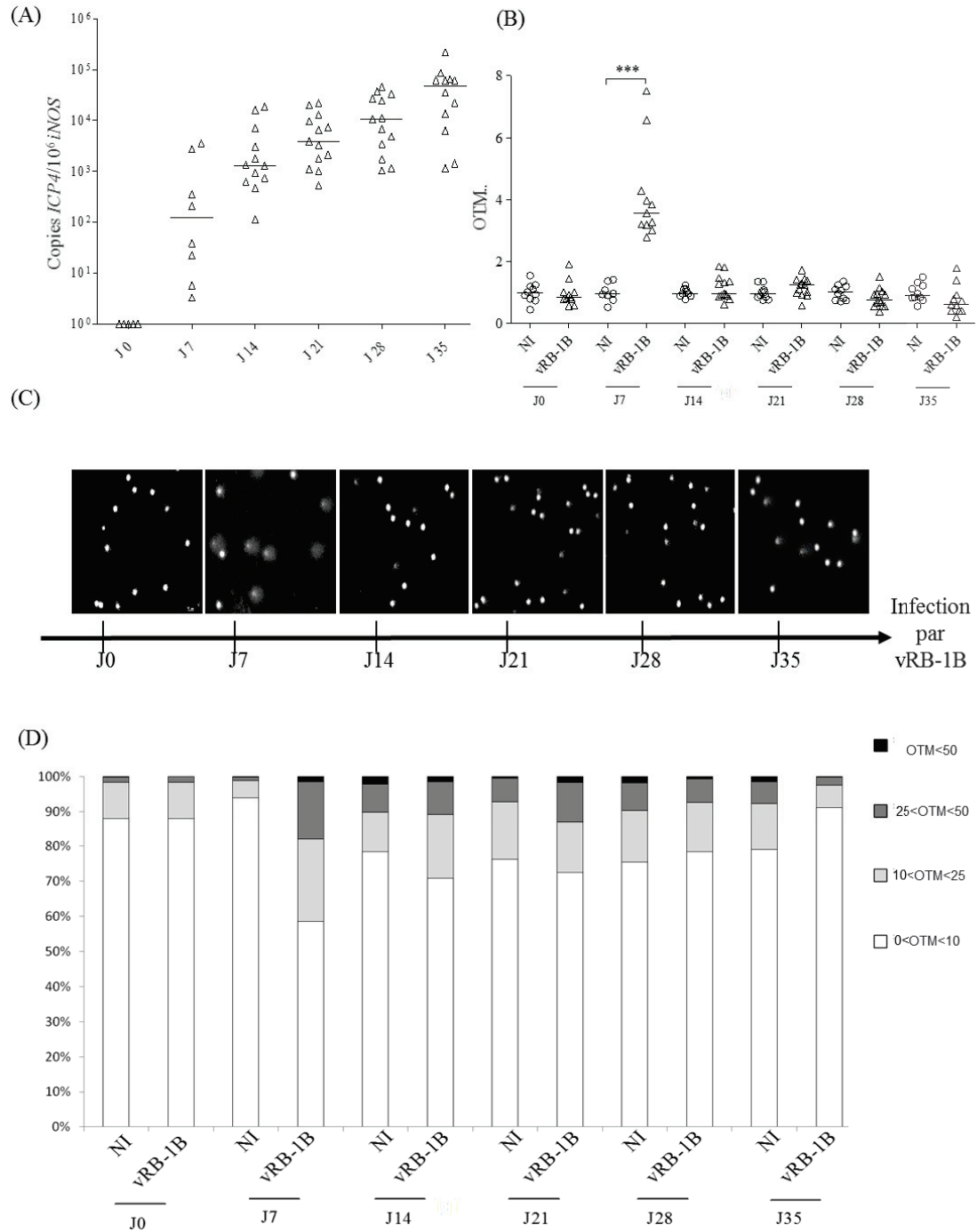


Figure 42. Cinétique d'apparition des dommages à l'ADN dans les PBMC de poulet infectés par le MDV

Deux lots de poulets Leghorn blanche âgés de 3,5 semaines ont été constitués : un lot de 10 animaux non-inoculés (groupe témoin) et un lot de 13 animaux qui ont été inoculés par voie intramusculaire avec 10^3 PFU de la souche sauvage très virulente vRB-1B. Des prises de sang ont été effectuées aux temps indiqués afin d'étudier la charge virale dans le sang total et de purifier les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) dans lesquels les dommages à l'ADN ont été analysés par un test des comètes. (A) Charge virale dans le sang des animaux infectés. La charge virale a été estimée par qPCR en utilisant la technologie Taqman à partir d'ADN extrait du sang total. Le nombre de copies du gène viral *ICP4* détecté a été rapporté à 10^6 copies du gène de ménage cellulaire *iNOS*. Les résultats sont présentés sous forme de nuages de points, chaque point représentant un animal. Les médianes ont été calculées à chaque temps d'infection et sont représentées par des barres horizontales (B) Analyse des dommages à l'ADN dans les PBMC de poulets non-infectés et infectés par le MDV. Après isolement des PBMCs, un test des comètes a été réalisé. Deux lames ont été préparées pour chaque animal à chaque temps de prélèvement et au moins 50 comètes ont été analysées/lame. Les moyennes du paramètre OTM obtenues à partir des 2 lames ont été calculées. Les résultats sont représentés sous forme de nuages de points où chaque point correspond à la moyenne de l'OTM obtenue pour chaque animal, relativisée par rapport à la moyenne de l'OTM obtenue pour les animaux non-infectés à chaque temps de prélèvement. Les médianes ont alors été calculées pour chacun des lots d'animaux (barres horizontales). Les résultats ont été comparés par un test de Mann Whitney et les différences significatives sont indiquées par une barre *** $p < 0,001$. (C) Photos d'illustration de l'évolution des dommages à l'ADN dans les PBMCs lors de l'infection par le virus vRB-1B. (D) Distribution des paramètres OTM obtenus pour chaque groupe d'animaux aux différents temps de prélèvement.

De plus, la distribution des OTM calculés révèle que plus de 40% des cellules infectées à J7 présentent un $OTM > 10$ indicatif de la sévérité des lésions d'ADN (Figure 42D). Aux temps plus tardifs de l'infection, l'intégrité de l'ADN des PBMCs des animaux infectés ne semblait pas altérée, aucune différence dans le profil des dommages à l'ADN n'ayant été détectée par rapport aux PBMCs des poulets témoins non-infectés (Figure 42B). Il faut noter que nous n'avons pas détecté de dommages à l'ADN aux temps plus tardifs malgré une charge virale qui reste élevée. Cependant, la détection de la charge virale par qPCR ne permet pas de discriminer les phases d'infection cytotytique et de latence lorsque le génome viral est intégré dans l'ADN cellulaire. Aussi, le génome viral reste détectable même lorsque le virus est en latence dans les lymphocytes T, ce qui pourrait expliquer l'absence de dommages détectables à partir de 14 jours pi, phase à laquelle les phases de latence et de tumorigenèse s'établissent. Ces résultats montrent que des lésions sont générées dans l'ADN des poulets préférentiellement lors des phases précoces d'infection par le MDV (7 jours pi), laissant suspecter une potentielle corrélation entre la survenue de ces dommages et la réplication du MDV.

1.2 La réplication du MDV est concomitante avec l'apparition de CDBs dans le génome cellulaire

Afin d'établir si la réplication du MDV est associée à l'apparition de lésions dans l'ADN cellulaire, nous avons infecté *in vitro* des cellules embryonnaires de peau de poulet (CESC), modèle cellulaire classiquement utilisé pour répliquer le virus. Les CESC ont été infectées par le virus MDV recombinant recEGFPVP22 généré à partir d'un chromosome bactérien artificiel (BAC) comportant le génome de la souche avirulente Bac20 dans lequel le gène *UL49* (codant pour la protéine VP22) a été fusionné en 5' avec l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) (Blondeau *et al.*, 2008; Denesvre *et al.*, 2007; Dorange *et al.*, 2000). Après 4 jours d'infection, les CESC ont ainsi pu être triées par cytométrie en flux sur la base de l'expression de la protéine VP22. Parallèlement, des CESC non-infectées (contrôles) ont été triées dans les mêmes conditions selon leur morphologie afin d'éliminer les débris cellulaires et les cellules apoptotiques pouvant introduire un biais dans l'étude des dommages à l'ADN. Un test des comètes a ensuite été réalisé spécifiquement à partir des populations cellulaires non-infectées (contrôles), GFP+ (cellules infectées) et GFP- (cellules non-infectées co-cultivées en présence de cellules infectées).

Dans les populations de cellules non-infectées (contrôles et GFP-), les résultats obtenus révèlent un ADN cellulaire peu endommagé apparaissant sous forme d'une sphère tandis que l'ADN des CESC infectées (GFP+) apparaît majoritairement sous forme d'une comète témoignant de la présence de cassures d'ADN (Figure 43A). Le calcul de l'OTM a permis de mettre en évidence que les cellules infectées présentent un taux de lésions dans l'ADN 6 à 8 fois plus important que les CESC non-infectées (GFP- ou CESC contrôles) (Figure 43A). De plus, environ 30% des cellules infectées GFP+ comportent des dommages d'ADN sévères avec un OTM > 10 (Figure 43B). Il faut noter que le taux de lésions d'ADN dans la population de cellules GFP- est semblable à celui observé dans la population de cellules non-infectées, indiquant que les dommages générés dépendent de la présence du virus dans les cellules et que l'infection n'a pas d'impact sur l'ADN des cellules non-infectées avoisinantes (effet by-stander). Aussi, les résultats obtenus *in vitro* semblent indiquer que la réplication du MDV serait à l'origine de l'apparition des lésions dans l'ADN de la cellule hôte, confortant les résultats obtenus *in vivo*.

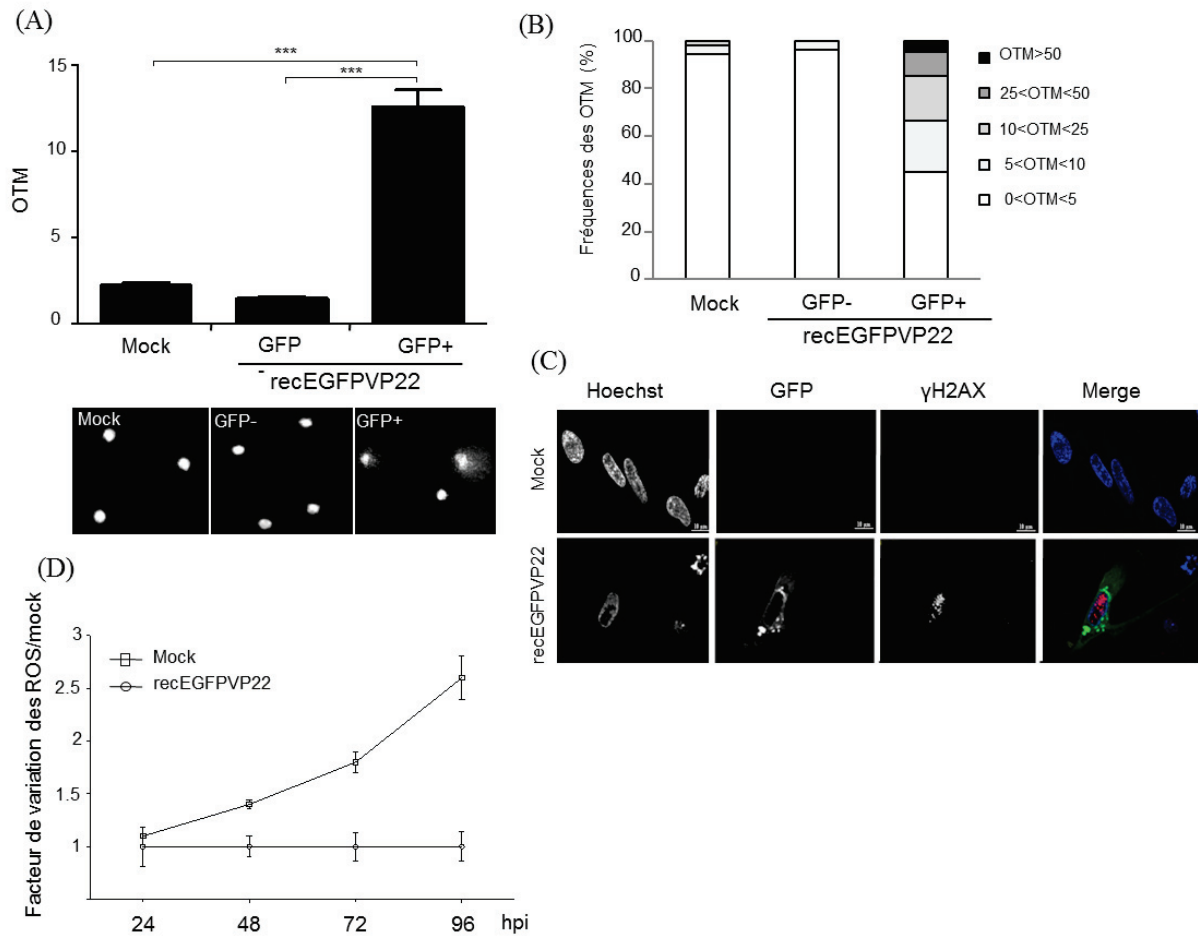


Figure 43. Etude des dommages à l'ADN lors de l'infection cytotytique de cellules fibroblastiques embryonnaires de poulet par le MDV

Les CESC (cellules embryonnaires de peau de poulet) ont été infectées par 10^4 PFU de virus MDV recombinant recEGFPVP22. (A) Analyse des dommages à l'ADN par le test des comètes. Les cellules non-infectées (Mock), les cellules GFP+ (infectées) et GFP- (non-infectées ayant été co-cultivées avec les cellules infectées) ont été triées 96hpi par cytométrie en flux. L'étude des dommages à l'ADN a été réalisée par le test des comètes à partir de $2 \cdot 10^5$ cellules de chaque population cellulaire. Les comètes ont été observées et acquises à l'aide d'un microscope Axiovert 200 M inversé à épifluorescence (Zeiss) équipé d'une caméra Axiocam MRm (Zeiss). Des images représentatives des comètes obtenues sont présentées. L'analyse des comètes a été effectuée par le logiciel CometScore version 1.5 TriKtek. La moyenne du paramètre OTM ($\pm$ écart type ; Mann Whitney, *** $p < 0,001$) est présentée sous forme d'histogramme. Les résultats sont représentatifs de l'analyse de 100 comètes en moyenne par condition. (B) Distribution des OTM. Une distribution de la fréquence des comètes selon le paramètre OTM a été obtenue pour chaque population cellulaire. (C) Nature des lésions à l'ADN induites lors de l'infection MDV. Après 4 jours d'infection, la forme phosphorylée de l'histone γ H2AX (marqueur de CDBs) a été détectée dans les CESC non-infectées (Mock) et infectées (recEGFPVP22) par immunofluorescence en utilisant l'anticorps monoclonal anti- γ H2AX (Ser 139) et l'anticorps secondaire AlexaFluor 594 (rouge). Les cellules infectées exprimant la protéine VP22 étiquetée EGFP ont été directement visualisés par microscopie à fluorescence (vert)

et les noyaux ont été marqués par le Hoechst 33342 (bleu). (D) Production de ROS dans les cellules non-infectées et infectées par le MDV. La production des ROS a été évaluée en quantifiant la concentration de H_2O_2 dans le surnageant de culture des cellules à l'aide du kit ROS Glo[®]. Les facteurs de variation du taux des ROS ont été calculés par rapport au taux des ROS produits par les cellules non-infectées à chaque temps de prélèvement.

Afin de préciser la nature des dommages à ADN survenant lors de l'infection par le MDV, nous avons cherché à détecter l'expression de la protéine cellulaire γ H2AX par immunofluorescence dans les CESC non-infectées et infectées par le virus recombinant recEGFPVP22 (4 jours après infection). La protéine γ H2AX, variant phosphorylé de l'histone H2AX, est directement recrutée après l'induction de cassures double-brin de l'ADN et est communément utilisée comme un marqueur de ces lésions (Mah *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013). Nous avons observé une augmentation significative de l'intensité du marquage de la protéine γ H2AX spécifiquement dans les cellules infectées (GFP+) (Figure 43C). De plus, dans ces cellules, la protéine γ H2AX apparaît nettement sous-forme de foci nucléaires traduisant la relocalisation de la protéine aux sites de cassures double-brin de l'ADN. Cette relocalisation de γ H2AX dans les cellules infectées indique que l'infection lytique de MDV conduit préférentiellement à la génération de CDBs dans l'ADN des cellules hôtes.

Parallèlement, nous nous sommes attachés à explorer par quels mécanismes les CDBs pouvaient être induite au cours de la réplication virale. Un stress oxydatif pouvant être à l'origine de l'apparition de CDBs, nous avons testé dans le modèle d'infection CESC *in vitro* si l'infection MDV pouvait générer des réactifs oxygénés (ROS) comme cela avait été précédemment montré lors de l'infection de poulets par le MDV *in vivo* (Keles *et al.*, 2010). Le taux de ROS a été estimé en dosant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit dans le surnageant de cellules infectées par recEGFPVP22 ainsi que dans les cellules témoins non-infectées (Figure 43D). Nous avons détecté une accumulation significative de H_2O_2 dans le surnageant des cellules infectées au cours du temps d'infection. En effet, le surnageant des cellules infectées présente un niveau de H_2O_2 de 2,5 à 4 fois supérieur par rapport aux cellules non-infectées à 96h pi et 168h pi. Nous avons donc confirmé *in vitro* que la réplication du MDV s'accompagne d'une production de ROS, qui pourraient potentiellement être impliqués dans la génération des CDBs induits au cours de l'infection MDV.

1.3 Les CDBs facilitent la réplication de MDV dans les CESC

Les dommages à l'ADN et la DDR associée peuvent faciliter la réplication des herpesvirus, nous avons cherché à déterminer si les lésions induites lors de la réplication du MDV pourraient également être favorable au cycle lytique du MDV.

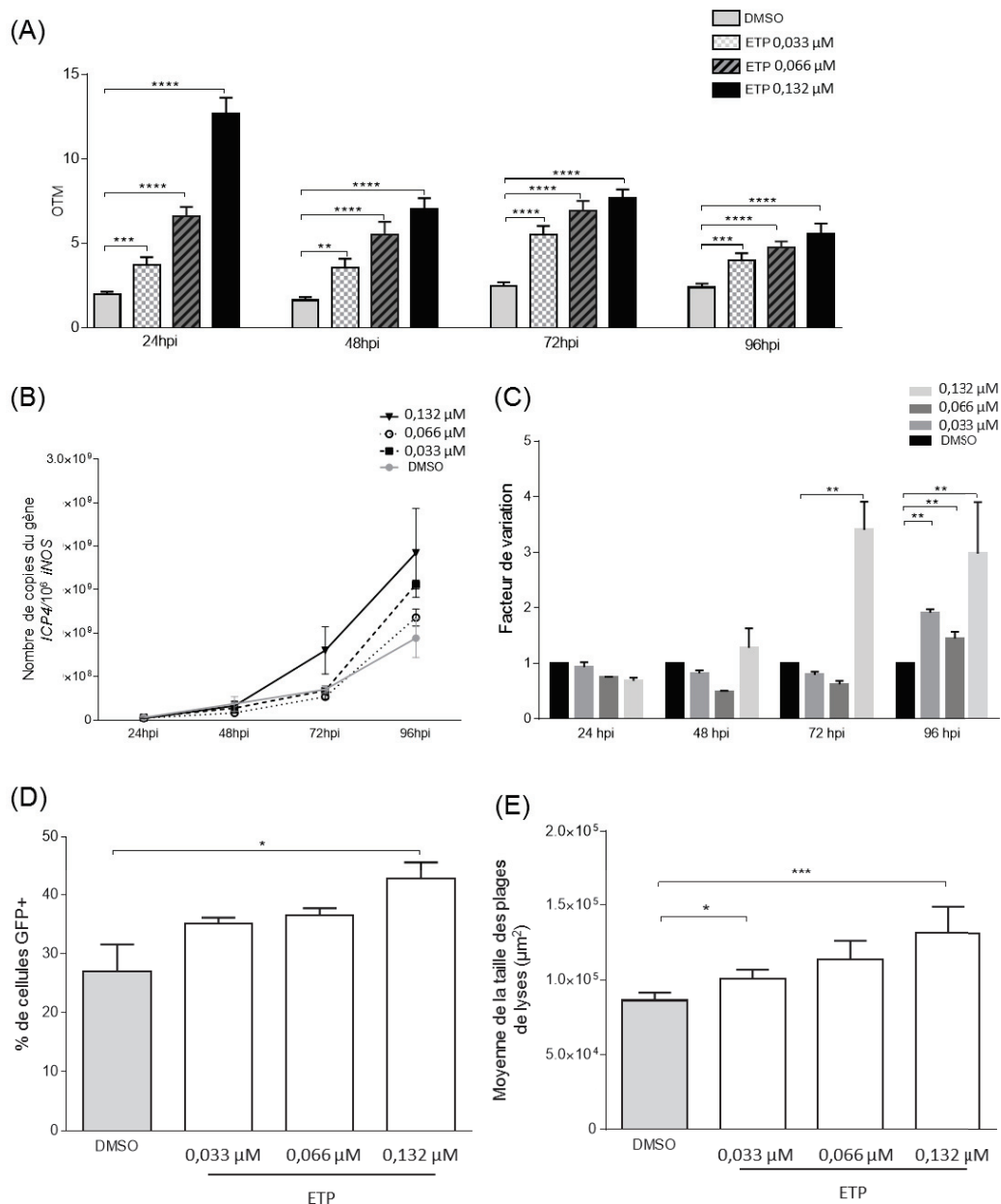


Figure 44. Effet de l'induction de CDBs sur la réplication du MDV

Les CESC infectées par le virus MDV recEGFPVP22 (10⁴ PFU) ont été traitées 6 hpi avec 0,033 ; 0,066 ; 0,132 μM d'étoposide (ETP) ou de DMSO (témoin négatif). (A) Analyse des dommages à l'ADN par le test des comètes dans les CESC non-infectées traitées par les différentes concentrations d'ETP à 24, 48, 72 et 96 hpi. (B-C) Effet du

traitement ETP sur la charge virale. L'ADN a été extrait des cellules 48, 72 et 96 hpi afin d'établir la charge virale par qPCR. Le nombre de copies de génome MDV (correspondant au nombre de copies du gène viral *ICP4*) a été normalisé par rapport à 10^6 cellules (nombre de copies du gène de ménage *iNOS*). Les résultats présentés en (B) correspondent à la moyenne des triplicats obtenus par qPCR ($\pm$ écart-type). A partir des résultats de qPCR, des facteurs de variation ont également été calculés en relativisant la charge virale détectée dans les cellules traitées par l'ETP à également par rapport à la charge virale obtenue dans les cellules infectées traitées par le DMSO (C) (Mann Whitney, * $p < 0,05$). (D) Effet du traitement ETP sur la réplication du MDV. Le nombre de cellules infectées après 96 h d'infection a été estimé par cytométrie sur la base de l'expression de la VP22 étiquetée EGFP. Le pourcentage de cellules GFP+ a été déterminée spécifiquement dans les cellules viables (marquées en utilisant le colorant de viabilité eFluor-780). Les histogrammes représentent la moyenne du pourcentage de cellules GFP+ pour chaque condition expérimentale ($\pm$ SD; Mann Whitney ; * $p < 0,05$). (E) Effet du traitement ETP sur la réplication/dissémination du MDV. La taille des plages d'infection MDV a été mesurée à 48h pi directement à partir de la fluorescence émise par la protéine virale de VP22 étiquetée EGFP. Les images des plages de lyse ont été acquises et analysées à l'aide d'un microscope Axiovert 200 M inversé à épifluorescence (Zeiss) équipé d'une caméra Axioacam MRm et du logiciel Axiovision Light Edition version 4.8 (Zeiss). Les moyennes sont présentées sous forme d'histogrammes ($\pm$ écart-type ; Mann Whitney, *** $p < 0,001$).

Nous avons donc infectées les cellules CESC par le virus recombinant recEGFPVP22 en présence de concentrations croissantes (de 0,033 à 0,132 μ M) d'un inducteur chimique de CDBs, l'étoposide (ETP) (Walker & Nitiss, 2002). De plus, afin de s'assurer que l'effet de l'ETP sur la réplication du MDV est uniquement attribuable à l'ETP et non au solvant utilisé pour préparer la solution d'ETP (DMSO), nous avons réalisé un contrôle du traitement qui consistait à infecter des CESC en présence de DMSO. L'efficacité du traitement ETP a parallèlement été vérifiée en réalisant un test de comètes sur des CESC non-infectées traitées avec les différentes concentrations d'ETP à 24h, 48h, 72h et 96h post traitement (Figure 44A). Comme attendu, nous avons observé une augmentation dose-dépendante des lésions dans les cellules traitées dès 24h post-traitement. Dans les CESC infectées, la réplication du MDV a été évaluée par qPCR à 48, 72 et 96 hpi en quantifiant le nombre de copies du gène virale lytique *ICP4* par rapport au gène de ménage cellulaire *iNOS* (Figure 44B et C). Le traitement ETP conduit à une augmentation de la charge virale à partir de 48h pi lorsque les cellules ont été traitées avec la plus forte concentration d'ETP (0,132 μ M) et à partir de 72h pi avec des traitements de 0,066 et 0,033 μ M (figure 44B). En effet, le nombre de copies de génome MDV était environ 3,5 fois supérieur à 72h et 96h pi dans les cellules infectées en présence de 0,132 μ M d'ETP comparé aux cellules témoins traitées avec du DMSO (Figure 44C). De même, à 96h pi une augmentation de la charge virale d'un facteur 1,5 à 2 a été détectée dans

les cellules traitées avec 0,066 et 0,033 μM d'ETP. Il faut noter que des concentrations plus élevées d'ETP ($>0,132\mu\text{M}$) induisent une diminution significative de la réplication du MDV, probablement associée à une forte cytotoxicité de l'ETP.

Par ailleurs, afin de confirmer l'effet de l'ETP sur le cycle viral du MDV, nous avons également déterminé le pourcentage de cellules exprimant la protéine VP22 (cellules GFP-positives) par cytométrie en flux 96hpi (Figure 44D). Nous avons observé parmi la population de cellules vivantes (eFluor-780 négative) que le traitement ETP augmentait le nombre de cellules infectées. En effet, le nombre de cellules GFP+ était 2 fois plus important lorsque les cellules étaient infectées en présence de 0,132 μM d'ETP. A des concentrations plus faible d'ETP (0,033 et 0,066 μM), le nombre de cellules infectées tend à augmenter mais cet effet n'est pas significatif comparé aux cellules traitées avec du DMSO.

Parallèlement, nous avons évalué l'effet de l'ETP sur la dissémination du virus en mesurant la taille des plages de lyse formées par le MDV à 48h pi. Nous avons ainsi pu constater que la taille des plages de lyses induites par le MDV a également tendance à s'accroître en présence de concentrations croissantes d'ETP (Figure 44E).

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que l'induction de dommages à l'ADN, et plus particulièrement de CDBs, serait bénéfique pour la réplication du MDV et/ou pourrait faciliter la dissémination du virus dans les CESC.

1.4 La réactivation du MDV est associée à une augmentation des dommages à l'ADN

Le MDV infectant naturellement les lymphocytes, nous avons élargi notre étude des dommages à l'ADN à un modèle cellulaire consistant en des lymphocytes T transformés par le MDV. La lignée cellulaire 3867(K) a été établie à partir de poulets infectés par un virus MDV recombinant codant pour la protéine UL47 fusionnée à l'EGFP. Il faut noter que l'utilisation de ce modèle cellulaire est doublement bénéfique dans notre étude puisqu'il constitue à la fois un modèle cellulaire de l'infection latente et de la phase cytotytique tardive du MDV. Aussi, l'étiquetage EGFP de la protéine UL47 nous a permis de distinguer les cellules GFP- dans lesquelles le virus est en latence et les cellules GFP+ dans lesquelles le virus réactive (cycle lytique) (Denesvre *et al.*, 2015).

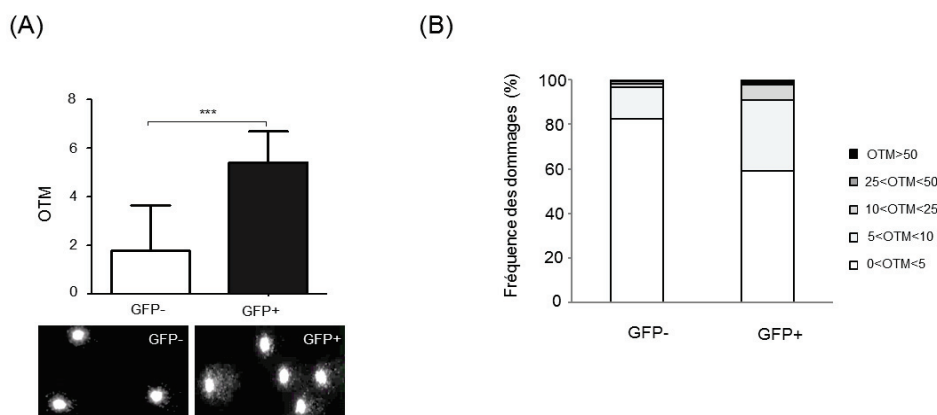


Figure 45. Etude des dommages à l'ADN lors de la phase de latence et de la réactivation virale dans une lignée de lymphocytes T transformés par le MDV

Les cellules 3867(K) ont été cultivées pendant 48h avant d'être triées par cytométrie. Les deux populations cellulaires obtenues, GFP+ (virus en phase de réactivation) et GFP- (virus en latence) ont été soumises à un test des comètes. (A) Analyse des dommages à l'ADN par le test des comètes. Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme correspondant à la moyenne des OTM calculés pour chaque population cellulaire ($\pm$ écart type ; Mann Whitney, *** p < 0,001). Des images représentatives des comètes obtenues sont présentées. (B) Distribution de la fréquence des comètes en fonction de leur valeur d'OTM.

Afin d'analyser les dommages à l'ADN dans ces 2 populations cellulaires, les cellules 3867(K) ont été cultivées pendant 48h, puis les populations cellulaires GFP- et GFP+ ont été triées par cytométrie en flux. Il faut noter que la réactivation spontanée du MDV est observable seulement dans 1 à 2% des cellules 3867(K) après 48h de culture. Comme précédemment, un test de comète a été réalisé à partir de 2.10^5 cellules de chacune des populations cellulaires et les résultats ont été analysés en utilisant l'OTM. Nous avons observé que les cellules en phase lytique d'infection (GFP+) présentent un ADN endommagé visualisé sous forme de comètes relativement étendues, alors que l'ADN des cellules dans lesquelles le virus est en latence (GFP-) est peu lésé (Figure 45A). Le calcul de l'OTM montre en effet que les cellules dans lesquelles le virus réactive (GFP+) ont un taux de dommages à l'ADN 3 fois supérieur à celui des cellules où le virus est latent (GFP-) (Figure 45A). La distribution de la fréquence des comètes a fait apparaître qu'environ 40% des cellules réactivant le MDV présentaient des dommages modérés avec un OTM > 5 (Figure 45B). Ces résultats semblent donc indiquer que des lésions à l'ADN sont également induites lors de la réplication du MDV dans les lymphocytes T, une des cibles préférentielles du virus. De plus, le modèle cellulaire 3867(K) nous a permis de mettre en évidence que ces lésions apparaissent spécifiquement

durant le cycle lytique du virus alors que la phase de latence virale est associée à un taux de dommages à l'ADN relativement faible.

1.5 Les DSBs facilitent la réplication du MDV dans les lymphocytes T

Nous avons démontré précédemment que l'induction de dommages à l'ADN semble faciliter la réplication du MDV dans les cellules CESC (Figure 44). Afin d'évaluer l'impact des dommages à l'ADN sur la reprise du cycle lytique du MDV dans les lymphocytes T, les cellules 3867(K) ont été traitées avec différentes concentrations d'ETP pendant 48h. Un test de comètes a été ensuite effectué afin de vérifier l'induction de dommages à l'ADN dans les 3867(K) traitées ETP (Figure 46A). Nous avons ainsi confirmé que le traitement ETP conduisait à une augmentation dose-dépendante des lésions dans les cellules (après 48h de traitement). La réplication virale a été estimée 48h post-traitement par qRT-PCR, et non par qPCR comme précédemment dans les cellules CESC, afin de s'affranchir de la détection des copies d'ADN viral intégré. L'expression de l'ARNm du gène viral *ICP4* a été détectée et rapportée à l'expression de l'ARNm du gène cellulaire *GAPDH* (Figure 46B). Les résultats obtenus ont montré que le niveau d'expression d'*ICP4* augmentait de façon dose-dépendante dans les cellules traitées par l'ETP. Nous avons en effet observé environ 2, 4 et 6 fois plus d'expression d'*ICP4* (par rapport aux cellules traitées DMSO) lorsque les cellules étaient cultivées en présence de 0,02 μ M, 0,1 μ M ou 0,5 μ M d'ETP respectivement.

L'effet du traitement ETP sur la réplication du MDV a été confirmé par l'analyse du pourcentage de cellules GFP+ par cytométrie en flux. Une augmentation significative dose dépendante de la proportion de cellules subissant la réactivation du MDV a en effet été observée lorsque les cellules étaient traitées par des concentrations d'ETP de 0,02 μ M, 0,1 μ M ou 0,5 μ M (Figure 46C).

Ces résultats suggèrent donc que l'induction de dommages à l'ADN serait favorable à la réactivation du MDV et pourraient également faciliter la réactivation du virus dans les lymphocytes T.

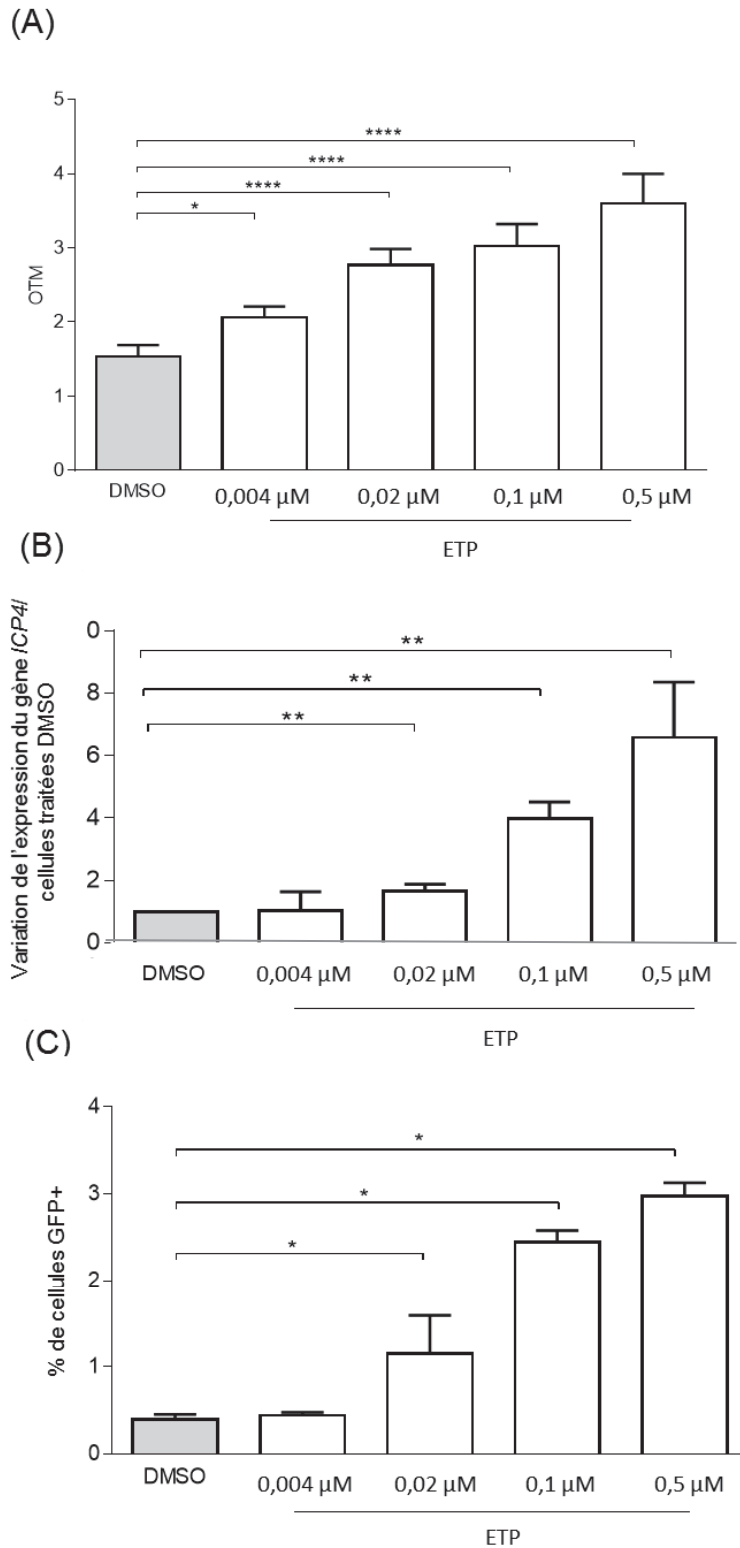


Figure 46. Effet de l'induction des CDBs sur la réactivation virale :

Les cellules 3867(K) ont été traitées avec les concentrations indiquées d'ETP pendant 48 heures. (A) Quantification des lésions à l'ADN induits par les différentes concentrations d'ETP par le test des comètes. Les résultats sont représentés sous forme d'histogramme

correspondant à la moyenne des OTM calculés pour chaque population cellulaire ($\pm$ écart type ;Mann Whitney, *** $p < 0,001$). (B-C) Effet du traitement ETP sur la réplication du MDV. (B) La réplication du MDV a été évaluée en quantifiant l'expression de l'ARNm du gène viral très précoce *ICP4* par qRT-PCR. L'expression de l'*ICP4* a été normalisée au taux d'expression de l'ARNm du gène de ménage cellulaire *GAPDH*. Les moyennes de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat sont présentées sous forme d'histogramme ($\pm$ écart-type ; Mann Whitney, * $p < 0,005$). (C) La réplication du MDV a également été estimée en déterminant le pourcentage de cellules dans lesquelles le virus réactive (GFP+) par cytométrie. Le pourcentage de cellules GFP+ a été établi spécifiquement dans les cellules viables, marquées avec le colorant de viabilité eFluor-780. Les moyennes sont présentées sous forme d'histogramme ($\pm$ SD; Mann Whitney, * $p < 0,005$).

2. Rôle de la protéine virale VP22 dans l'induction des dommages à l'ADN et dans la pathogenèse de MDV

Le 2ème volet de mon projet de thèse concerne le rôle de la protéine VP22 dans la pathogenèse du MDV. En effet, une étude récemment publiée par notre laboratoire a montré que la surexpression de VP22 dans une lignée hépatocytaire de poulet conduit à l'apparition de lésions double-brin de l'ADN (CDBs) (Trapp-Fragnet *et al.*, 2014). Cette étude a également permis de mettre en évidence que la modification de l'extrémité C-terminale de la protéine par la fusion d'une étiquette EGFP abolissait la capacité de la VP22 à induire des dommages à l'ADN, alors qu'un étiquetage en N-terminal n'avait pas d'impact sur cette activité. De plus, les travaux de Jarosinski *et al* (2012) ont démontré qu'un virus recombinant MDV codant pour la protéine VP22 étiquetée à son extrémité carboxy-terminale était fortement atténué chez les poulets (seuls 10% des animaux infectés ont développé la MD) par rapport au virus sauvage vRB-1B (Jarosinski *et al.*, 2012). Au vu de ces observations nous avons recherché si la protéine VP22 pouvait être responsable de l'apparition des dommages à l'ADN générés au cours de l'infection et si les dommages à l'ADN induits pouvaient être propices à l'établissement du processus de tumorigenèse associé à l'infection par le MDV.

2.1 Rôle de VP22 dans l'induction des dommages à l'ADN lors de l'infection cytotytique de MDV

Au vu des différences d'activité de la VP22 observées, selon que la protéine soit fusionnée à son extrémité N- ou C-terminale avec la EGFP, nous avons dans un premier temps testé l'impact de cet étiquetage sur la capacité du MDV à induire des dommages à l'ADN dans un contexte d'infection lytique *in vitro*. Les cellules CESC ont été infectées avec les 2 virus MDV recombinants vRB-1B EGFP22 (Remy *et al.*, 2013) et vRB-1B 22EGFP (Jarosinski *et al.*, 2012) codant respectivement la protéine VP22 étiquetée EGFP à leur extrémité N- et C-terminale, et le virus sauvage vRB-1B comme témoin d'induction de dommages à l'ADN (Blondeau *et al.*, 2007). Pour des raisons de lisibilité, les virus vRB-1B EGFP22 et vRB-1B 22EGFP seront par la suite renommés respectivement vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm. Parallèlement, des cellules CESC non-infectées ont été cultivées dans les mêmes conditions expérimentales et utilisées comme témoin négatif.

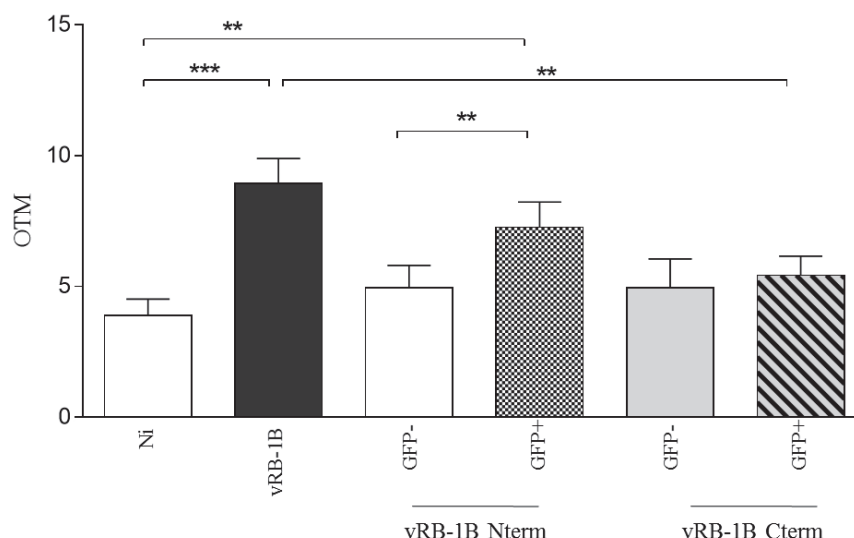


Figure 47. Rôle de la VP22 dans l'induction des dommages à l'ADN lors de l'infection cytotytique MDV

Les CESC ont été infectées par le virus sauvage vRB-1B (10^4 PFU) et les 2 virus MDV recombinants vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm. Les cellules infectées ont été triées 96 hpi par cytométrie en flux sur la base de l'expression de l'EGFP afin d'isoler les 2 populations cellulaires GFP+ (infectées) et GFP- (non-infectées). Parallèlement, les cellules non-infectées (Ni) ainsi que les cellules infectées par le virus sauvage vRB-1B ont été triées sur la base de leur morphologie. L'analyse des dommages à l'ADN a été réalisée à partir de 2.10^5 cellules de chaque population cellulaire par le test des comètes. Les résultats (représentatifs d'au minimum 100 comètes/ condition) sont représentés sous forme d'histogramme correspondant à la moyenne du paramètre OTM ($\pm$ écart type ; Mann Whitney, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Les CESC infectées par les 2 virus recombinants vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm ont été triées 96h pi par cytométrie en flux sur la base de l'expression de la GFP afin d'isoler les 2 populations cellulaires GFP+ (infectées) et GFP- (non-infectées). Bien que les CESC non-infectées et les CESC infectées par le virus sauvage vRB-1B n'aient pas été triées selon l'expression de marqueurs fluorescents, elles ont néanmoins été traitées dans des conditions similaires de tri en se basant sur des critères morphologiques afin de s'affranchir d'éventuels artefacts induits par le processus de tri cellulaire sur l'intégrité génomique. Les dommages à l'ADN ont été évalués par le test des comètes en utilisant le paramètre OTM. Les résultats montrent une augmentation significative du taux de lésions dans l'ADN des cellules infectées par les virus vRB-1B Nterm (GFP+) et vRB-1B sauvage par rapport aux cellules non-infectées et GFP-. De plus, le niveau de dommages à l'ADN observés lors de l'infection par

ces 2 virus est comparable, confirmant que l'étiquetage de la VP22 à son extrémité N-terminale ne modifie pas la propension du virus à induire des lésions dans l'ADN (Figure 47). En revanche, les CESC infectées avec le virus vRB-1B Cterm (GFP+) présentent un OTM similaire à celui des cellules non-infectées. Ces résultats sont donc concordants avec ceux obtenus précédemment au laboratoire à partir de cellules hépatocytaires surexprimant la VP22 modifiée en N- ou C-terminal et confirment dans un contexte d'infection que la protéine VP22 jouerait un rôle clé dans l'induction des dommages à l'ADN associée à l'infection cytolitique du MDV.

2.2 Rôle de VP22 et des dommages à l'ADN dans le cycle viral du MDV

Nos travaux ayant démontré que la génération de lésions à l'ADN est associée à la phase cytolitique de l'infection MDV et que ce processus favoriserait la réplication du MDV, il convenait de déterminer si les dommages à l'ADN pouvaient également participer à l'établissement de la latence et/ou de la tumorigenèse viro-induite. Aussi, nous avons mis en œuvre une approche originale basée sur les caractéristiques particulières du virus recombinant vRB-1B Cterm, à savoir la forte atténuation de son pouvoir oncogène et de sa capacité à induire des dommages à l'ADN *in vitro*. Cette étude devait également nous permettre de préciser le rôle de VP22 dans l'induction des dommages à l'ADN *in vivo* au cours de l'infection par le MDV et son éventuelle implication dans l'oncogenèse viro-induite. L'expérimentation comportait 4 lots de 6 à 13 poulets (Leghorn blanche) âgés de 3,5 semaines. Un groupe contrôle était constitué de 10 poulets non-infectés et les 3 autres groupes ont été inoculés avec 10^3 PFU de virus sauvage vRB-1B (6 animaux) ou de virus recombinants vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm (12 et 13 animaux respectivement dans chaque lot). Il faut noter que les inocula de virus EGFP ont été constitués à partir de cellules GFP+ triées par cytométrie en flux afin de s'assurer que les animaux ont été infectés avec un titre viral comparable. Comme précédemment, des prélèvements sanguins hebdomadaires ont été effectués afin de déterminer la charge virale par qPCR et de réaliser un test des comètes à partir des PBMCs. Afin d'améliorer la sensibilité du test utilisé pour évaluer la charge virale et de s'affranchir d'éventuels problèmes de détection des virus recombinants qui tendent à se répliquer plus faiblement que le virus sauvage, les qPCR ont été réalisées à partir d'ADN extrait de PBMC (et non à partir de sang total).

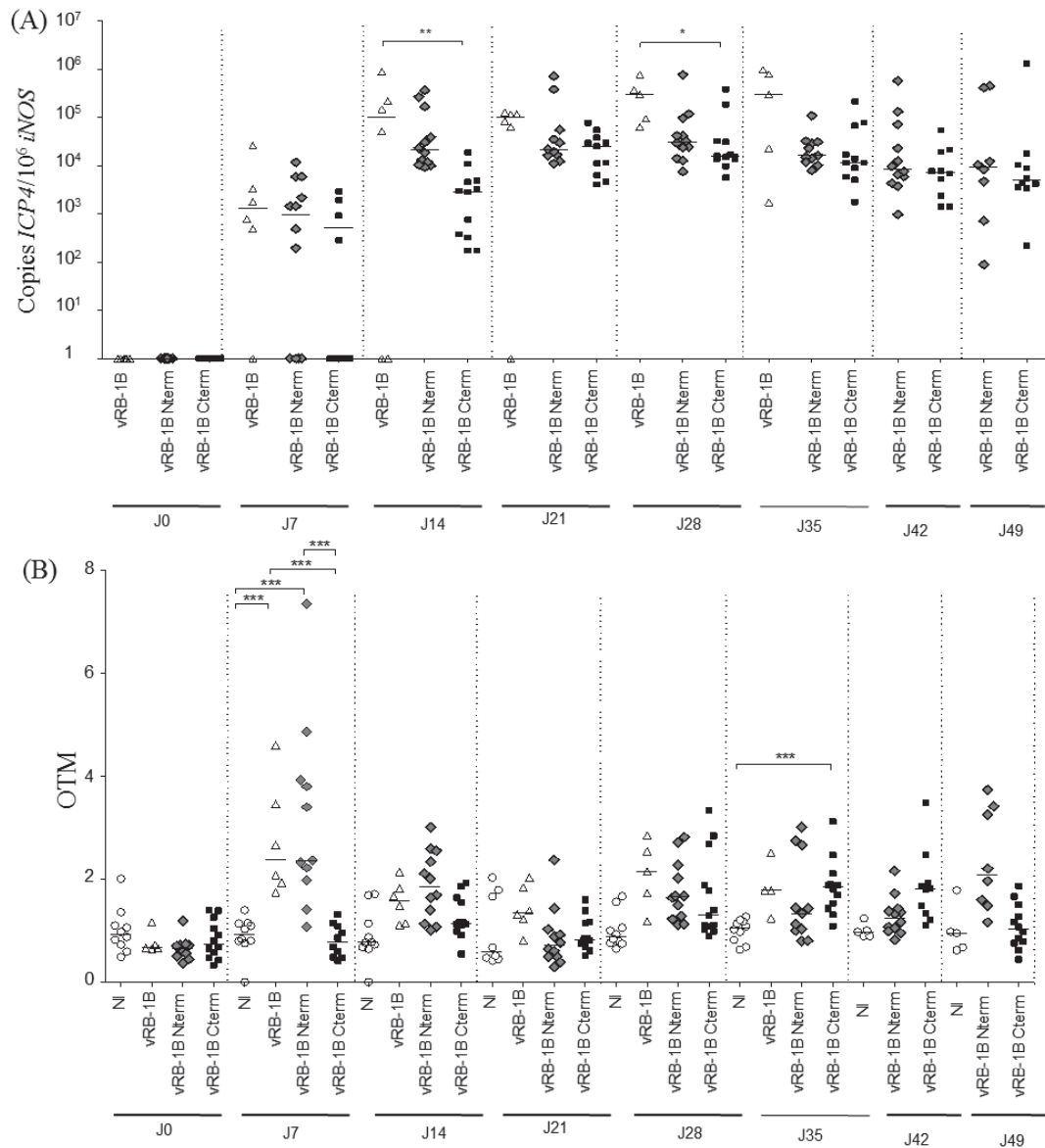


Figure 48. Rôle de la protéine VP22 dans l'induction des dommages à l'ADN et dans la pathogenèse du MDV

Quatre lots de poulets Leghorn blanche de 3,5 semaines ont été constitués : un lot témoin de 10 animaux non-infectés (NI), un lot de 6 animaux infectés par le virus très virulente vRB-1B et 2 groupes de 12 et 13 poulets inoculés respectivement avec les virus recombinants vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm. Les animaux ont été inoculés par voie intramusculaire avec 1500 PFU de virus vRB-1B, vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm. Pour chaque animal, des prélèvements de sang ont été effectués aux jours indiqués afin de purifier les PBMCs. (A) La charge virale a été évaluée par qPCR à partir d'ADN extrait de

PBMC. Le nombre de copies du gène virale *ICP4* a été normalisé par rapport à 10^6 copies de génome cellulaire (gène de ménage *iNOS*). Les résultats sont représentés sous forme d'un nuage de points dont chaque point correspond à la charge virale d'un animal. L'analyse statistique a été réalisée par le test Mann Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (B) Analyse des dommages à l'ADN dans les PBMCs des poulets non-infectés et infectés. Les lésions à l'ADN ont été détectées par le test des comètes à partir de $2 \cdot 10^5$ cellules PBMCs. Deux lames de comètes et au moins 50 comètes ont été analysées pour chaque animal à chaque temps de prélèvement. Les résultats sont représentés sous forme de nuage de points où chaque point correspond à la moyenne du paramètre OTM obtenue pour chaque animal considéré, relativisée par rapport à la moyenne de l'OTM obtenue pour les animaux non-infectés à chaque temps de prélèvement. Les médianes ont alors été calculées pour chacun des lots d'animaux. Les résultats ont été comparés par le test de Mann Whitney et les différences significatives sont indiquées (*** $p < 0,001$).

Le profil de la charge virale est similaire pour les 3 virus utilisés avec un nombre de copies du génome viral augmentant fortement dans les 7 premiers jours de l'infection (reflet de la réplication du virus). Une légère augmentation est ensuite observable jusqu'à J14 pi puis la charge virale est maintenue dans les temps plus tardifs de l'infection (Figure 48A). Bien que les 3 virus se répliquent, le virus vRB-1B Cterm présente un défaut de réplication significatif à J14 et J28 pi, le nombre de copies de génome viral étant réduit respectivement de 100- et 10 fois par rapport au virus vRB-1B.

Par ailleurs, dans le groupe d'animaux infectés par le virus sauvage vRB-1B, des tumeurs ont été observées chez 100% des poulets. En revanche, nous avons observé une atténuation de virulence marquée du virus vRB-1B Cterm, seuls 30% des poulets infectés ayant développés des tumeurs et une atténuation plus modérée du virus vRB-1B Nterm, 60% des animaux présentant des tumeurs à la fin de l'expérimentation. Ces résultats sont en adéquation avec les données publiées par K. Jarosinski (2012) et S. Remy (2013) (Jarosinski *et al.*, 2012; Remy *et al.*, 2013).

L'étude des dommages à l'ADN au cours de l'infection par le test des comètes a révélé que le virus vRB-1B Nterm présente un profil similaire à la souche sauvage vRB-1B, caractérisé par une apparition accrue de dommages à l'ADN détectables après 7 jours d'infection (Figure 48B). En revanche, l'ADN des PBMCs des animaux infectés par le virus vRB-1B Cterm ne semble pas plus endommagé que l'ADN des poulets contrôle à J7 pi, mais des lésions surviennent plus tardivement, au 36^{ème} jour pi (Figure 48B). Aussi, environ 40% des PBMCs provenant des poulets infectés par les virus vRB-1B et vRB-1B Nterm présentent un ADN sévèrement altéré avec un OTM > 10 à 7 jours pi, alors que seulement 10% des

PBMCs des animaux infectés par vRB-1B Cterm ont un OTM>10. Les lésions détectées à J7 pi pourraient coïncider avec la phase de réplication virale, comme nous l'avons rapporté précédemment. Concernant l'augmentation des dommages à l'ADN apparaissant à J36 pi, elle pourrait refléter la reprise du cycle lytique du MDV suite à la phase de latence dans les lymphocytes T (réactivation virale).

De plus, nos observations viennent conforter en contexte infectieux que la protéine VP22 serait impliquée dans l'apparition des dommages à l'ADN. En effet, l'infection par le virus MDV comportant la protéine VP22 étiquetée en N-terminal s'accompagne de dommages à l'ADN, alors que l'ADN des PBMCs de poulets infectés par le virus MDV codant une VP22 étiquetée en C-terminale est intègre. Ces résultats corroborent les observations obtenues lors de la surexpression de protéines VP22 modifiées en N- et C-terminal en lignée cellulaire aviaire (Trapp-Fragnet *et al.*, 2014) et lors de l'infection de CESCes avec les virus vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm.

2.3 Impact de l'infection MDV sur les populations lymphocytaires circulantes

Le laboratoire a établi récemment une collaboration avec l'équipe de Berndt Kaspers (LMU Munich) qui a mis au point une méthode de numération sanguine applicable aux cellules aviaires (Seliger C1). Nous avons donc utilisé ce test dans le cadre de l'infection expérimentale de poulets avec le MDV, afin de déterminer à partir de sang total si le taux de lymphocytes B et T variait au cours de l'infection et si ces variations pouvaient être corrélées à la détection des dommages à l'ADN dans les PBMCs. En effet, les cellules subissant des lésions trop importantes de l'ADN (lésions qui ne pourront être prises en charge par les systèmes de réparations de l'ADN) vont généralement entrer dans un processus de mort cellulaire (apoptose) ce qui dans notre étude pourrait se traduire par une diminution du nombre de cellules affectant potentiellement la formule sanguine des animaux.

L'étude de la cinétique d'évolution du nombre des différentes populations de cellules sanguines a été réalisée dans le cadre de l'infection des poulets infectés par les virus vRB-1B, vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm. Deux cent microlitres de sang ont été prélevés 7, 14, 21, 36 et 49 jours pi à partir de chaque poulet de chaque lot et les échantillons ont été envoyés au laboratoire de B. Kaspers qui a réalisé les numérations sanguines. Il faut noter que ces résultats obtenus restent très préliminaires du fait des problèmes de coagulation que nous

avons rencontrés et par conséquent du faible échantillonnage testé. Néanmoins, cette étude a révélé que seules les populations lymphocytaires (lymphocytes T et lymphocytes B) semblaient varier au cours de l'infection (Tableau 2). Les virus vRB-1B ou vRB-1B Nterm présentaient un effet comparable sur ces populations cellulaires. Nous avons en effet observé une faible diminution du nombre de lymphocytes B à 7 jours pi chez les poulets infectés par les virus vRB-1B ou vRB-1B Nterm suivie par un doublement de cette population cellulaire 14 jours pi (Figure 49A). En revanche, l'infection par le virus vRB-1B Cterm n'induirait pas de variations majeures du nombre de lymphocytes B circulants. Une sensible diminution (non significative) a été détectée 7jpi par rapport aux poulets non-infectés, mais ce virus ne semble pas occasionner d'augmentation de cette population cellulaire à 14jpi comme nous l'avons observé lors de l'infection par les virus vRB-1B ou vRB-1B Nterm. La diminution du nombre de lymphocytes B mise en évidence 7 jours pi pourrait refléter l'immunosuppression décrite précocement après l'infection des animaux par le MDV (Morimura *et al.*, 1997). A ce jour, les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'immunosuppression sont en cours de caractérisation au laboratoire (Projet Aniwha-MADISUP).

Tableau 2. Comparaison entre les résultats bruts de la numération sanguine des poulets non-infectés par rapport à ceux des poulets infectés par les virus RB-1B, RB-1B Nterm et RB-1B Cterm. Les résultats sont représentés sous forme d'une moyenne $\pm$ écart type

	Animaux	Thrombocytes	Hétérophiles	Monocytes	Lymphocytes	Lympho-T	Lympho-B
J7pi	Contrôles	41460 $\pm$ 6155	3206 $\pm$ 879	1356 $\pm$ 430	11557 $\pm$ 1376	10398 $\pm$ 1200	1159 $\pm$ 278
	RB-1B	40791 $\pm$ 11563	2804 $\pm$ 933	1286 $\pm$ 260	11561 $\pm$ 2671	10770 $\pm$ 2587	790 $\pm$ 253
	RB-1B Nterm	34017 $\pm$ 9255	3502 $\pm$ 1552	1730 $\pm$ 899	11424 $\pm$ 2985	10668 $\pm$ 2815	756 $\pm$ 261
	RB-1B CTerm	43090 $\pm$ 5543	2666 $\pm$ 981	1305 $\pm$ 533	11295 $\pm$ 2395	10529 $\pm$ 2271	766 $\pm$ 174
J14pi	Contrôles	35119 $\pm$ 6660	2290 $\pm$ 738	1623 $\pm$ 293	8790 $\pm$ 718	8153 $\pm$ 649	638 $\pm$ 96
	RB-1B	25020 $\pm$ ND	1083 $\pm$ ND	823 $\pm$ ND	15834 $\pm$ ND	14321 $\pm$ ND	1513 $\pm$ ND
	RB-1B Nterm	39558 $\pm$ 7338	2239 $\pm$ 1063	1410 $\pm$ 614	12586 $\pm$ 1907	11536 $\pm$ 1615	1049 $\pm$ 393
	RB-1B CTerm	36635 $\pm$ 7148	2024 $\pm$ 440	1256 $\pm$ 400	8866 $\pm$ 1523	8324 $\pm$ 1366	541 $\pm$ 196
J21pi	Contrôles	42468 $\pm$ 5055	2037 $\pm$ 708	1042 $\pm$ 474	10733 $\pm$ 1687	9790 $\pm$ 1488	943 $\pm$ 216
	RB-1B	45955 $\pm$ 11722	2261 $\pm$ 515	1587 $\pm$ 458	12238 $\pm$ 2324	11306 $\pm$ 2378	931 $\pm$ 177
	RB-1B Nterm	43948 $\pm$ 7850	2349 $\pm$ 875	1299 $\pm$ 430	12564 $\pm$ 1924	11709 $\pm$ 1791	855 $\pm$ 234
	RB-1B CTerm	38800 $\pm$ 9855	1958 $\pm$ 658	1123 $\pm$ 352	10197 $\pm$ 1766	9543 $\pm$ 1602	653 $\pm$ 221
J36pi	Contrôles	37278 $\pm$ 5085	2227 $\pm$ 893	1246 $\pm$ 338	10697 $\pm$ 1516	9985 $\pm$ 1354	712 $\pm$ 179
	RB-1B	62630 $\pm$ ND	7379 $\pm$ ND	2089 $\pm$ ND	17641 $\pm$ ND	16668 $\pm$ ND	973 $\pm$ ND
	RB-1B Nterm	52651 $\pm$ 15636	4110 $\pm$ 4872	2502 $\pm$ 951	14064 $\pm$ 4355	13212 $\pm$ 4069	852 $\pm$ 330
	RB-1B CTerm	35824 $\pm$ 11628	2826 $\pm$ 2642	1193 $\pm$ 509	11844 $\pm$ 3201	11091 $\pm$ 2984	752 $\pm$ 300
J49pi	Contrôles	48564 $\pm$ 1319	2063 $\pm$ 688	1194 $\pm$ 374	16139 $\pm$ 1787	14856 $\pm$ 1642	1283 $\pm$ 187
	RB-1B Nterm	64027 $\pm$ 15294	4260 $\pm$ 3035	2278 $\pm$ 1348	15373 $\pm$ 4454	13940 $\pm$ 4204	1433 $\pm$ 469
	RB-1B CTerm	57020 $\pm$ 15673	2820 $\pm$ 1533	2429 $\pm$ 2605	17347 $\pm$ 3360	15783 $\pm$ 3063	1564 $\pm$ 464

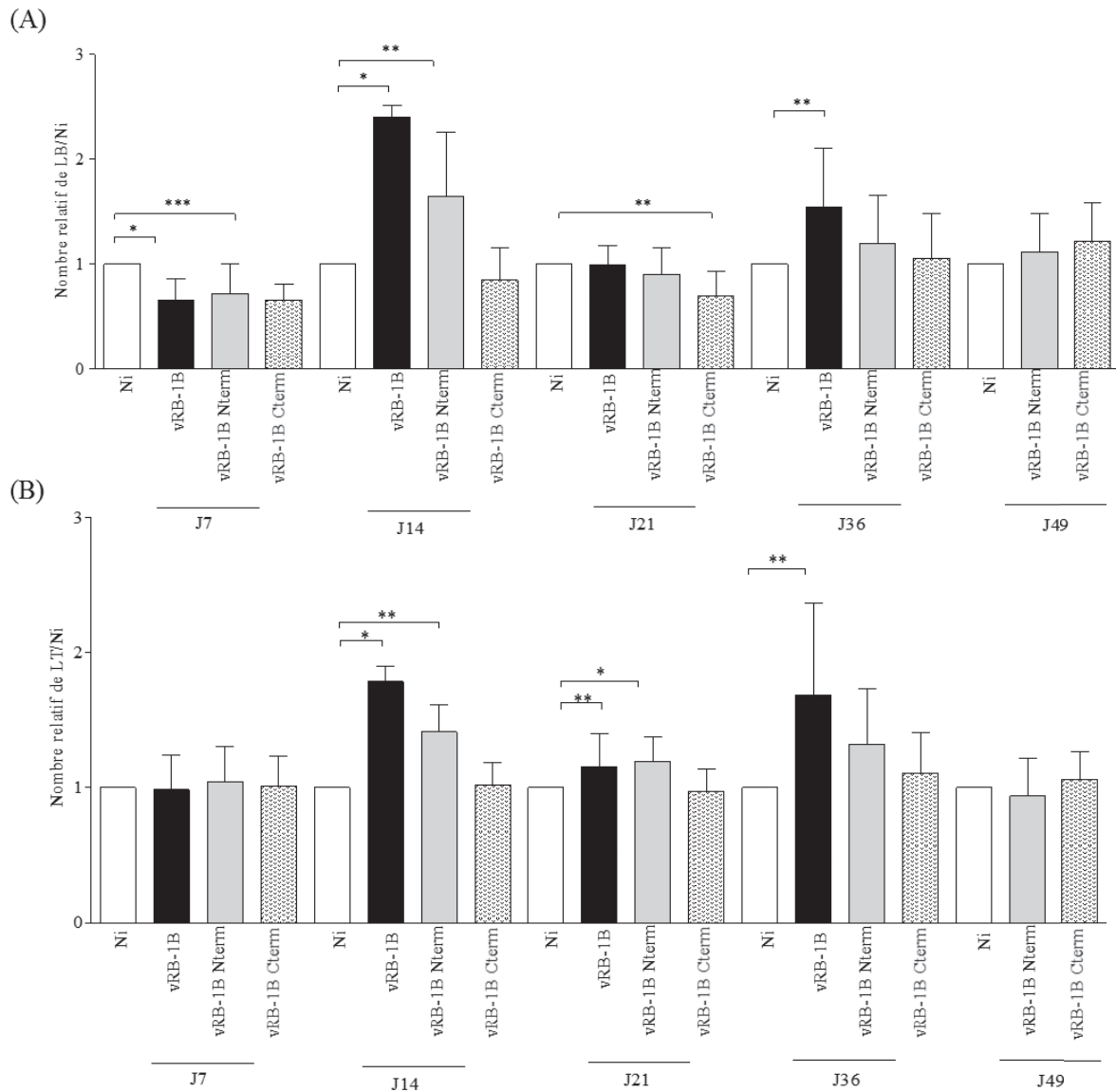


Figure 49. Impact de l'infection par le MDV sur le nombre de lymphocytes B et T chez le poulet

Les échantillons sanguins (200 µl de sang total) prélevés dans l'expérimentation *in vivo* 2 ont été analysés afin d'établir une numération sanguine des lymphocytes B (A) et T (B) par cytométrie. Ce test a été réalisé selon le protocole de Seliger *et al.*, 2012. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme. Les comparaisons entre les différents groupes ont été réalisées par le test de Mann Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Concernant les lymphocytes T, aucune variation n'a été détectée 7 jours pi quel que soit le virus considéré. Cependant, l'infection par les virus vRB-1B ou vRB-1B Nterm conduirait à une augmentation de cette population cellulaire à partir du 14^e jour d'infection

(Figure 49B). Cette hausse du nombre de lymphocytes T pourrait s'expliquer par la transformation des cellules T CD4⁺ par le MDV et la stimulation de leur prolifération.

Il est intéressant de noter qu'à J14 pi, le nombre de lymphocytes (T et B) semble corrélé à la virulence du MDV. En effet, le virus vRB-1B Cterm fortement atténué n'induit pas d'augmentation du nombre de lymphocytes. Par contre, l'infection par le virus très virulent vRB-1B serait responsable d'une augmentation significative de ces cellules et le virus vRB-1B Nterm, présentant une atténuation modérée de son pouvoir oncogène, a un effet intermédiaire sur la population lymphocytaire.

Bien que la diminution du nombre de lymphocytes B et l'apparition des lésions dans l'ADN des PMBCS apparaissent de façon concomitante après 7 jours d'infection, il est difficile d'établir une corrélation directe entre ces 2 événements. Nous ne pouvons exclure que ces dommages puissent être à l'origine de mort cellulaire, cependant il serait nécessaire de vérifier cette hypothèse en déterminant si les lésions sont générées spécifiquement dans les lymphocytes B infectés par le MDV.

3. Caractérisation des voies de DDR déclenchées par l'infection MDV et de leur implication dans la pathogenèse virale

3.1 Effet de l'infection cytotytique du MDV sur les voies de DDR

Après avoir montré que le MDV est capable d'induire des CDBs, il convenait d'étudier les voies de signalisation DDR déclenchées en réponse à ces dommages. Les travaux récemment publiés par notre laboratoire avaient montré que l'infection des cellules CESC par le MDV conduisait à un arrêt prolifératif en phase-S. Aussi, nous avons cherché à déterminer si l'apparition des CDBs durant l'infection pouvait être à l'origine du déclenchement de voies de signalisation DDR aboutissant à cet arrêt du cycle cellulaire.

Pour ce faire, les cellules CESC ont été infectées par 10^4 PFU du virus MDV recombinant recEGFPVP22. A 96hpi, les cellules infectées ont été cultivées à basse densité sur lamelle afin de tester l'état d'activation de différents acteurs des voies de signalisation DDR à savoir, la voie ATM, la voie DNA-PK et la voie ATR par immunofluorescence. Parallèlement, nous avons cherché à déterminer le niveau d'expression et d'activation de différentes protéines des voies de DDR par Western blot à partir d'extraits protéiques de CESC préparés après tri des cellules infectées (GFP+), et non-infectées (GFP-) par cytométrie en flux (à 96hpi). Avant de présenter nos observations, nous tenons à préciser que les résultats obtenus sont très préliminaires du fait de la faible spécificité des anticorps disponibles pour les protéines aviaires. Je souhaitais néanmoins inclure cette étude dans laquelle j'ai investi beaucoup de temps et d'énergie, bien que peu de données soient exploitables.

La voie ATM a été étudiée à l'aide des anticorps anti-Mre11 (ab190179), anti-pATM (cs5883P) et anti-pChk2 (cs2197). L'anticorps anti-Mre11 (ab190179) a permis de mettre en évidence, par Western blot, que la protéine Mre11 était exprimée à un niveau similaire dans les cellules non-infectées, GFP- et GFP+ (Figure 50A). L'anticorps anti-Mre11 utilisé générant beaucoup de bruit de fond lors des marquages d'immunofluorescence, nous n'avons pas pu préciser la localisation de cette protéine dans les cellules infectées. L'anticorps anti-pATM (cs 5883P) dont nous disposons ne semble pas être spécifique de la protéine ATM aviaire puisque aucun marquage spécifique n'a pu être détecté par immunofluorescence (Figure 50B) et par Western blot.

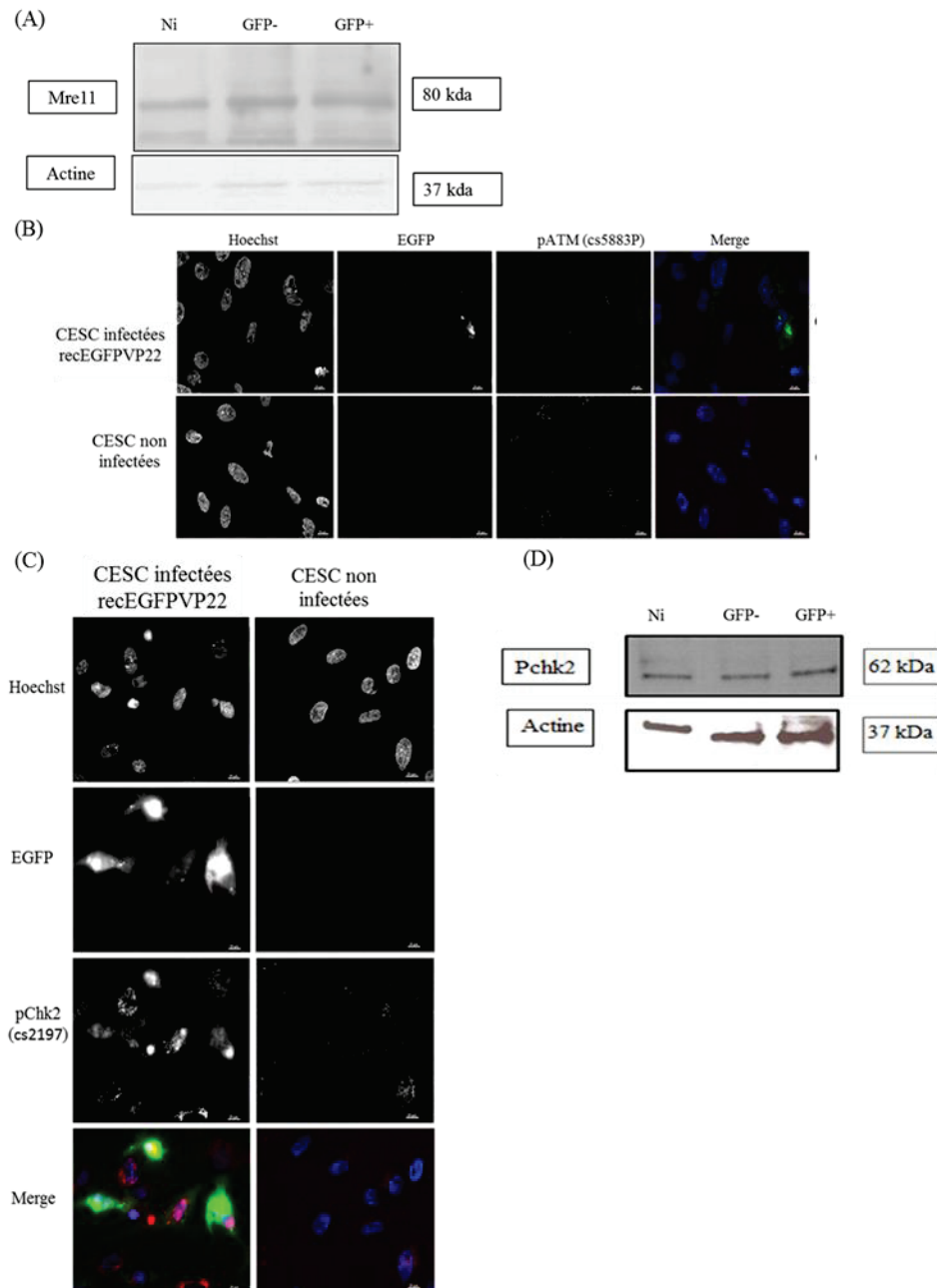


Figure 50. Effet de l'infection cytotyrique du MDV sur la voie ATM

Les cellules CESC ont été infectées avec le virus MDV recombinant recEGFPVP22 (10^4 PFU). La détection des protéines Mre11, pATM et pChk2 a été réalisée 96 hpi par Western blot et/ou immunofluorescence. (A et D) Expression des protéines Mre11 et pChk2 lors de l'infection MDV. Les extraits protéiques utilisés pour les Western blot ont été préparés à partir de cellules CESC triées sur la base de l'expression de la GFP pour les cellules infectées et sur la base de leur morphologie pour les CESC non-infectées. Les extraits protéiques ont été déposés sur gel SDS-PAGE 10%. Après migration électrophorétique, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose, et marquées à l'aide des anticorps primaires spécifiques et des anticorps secondaires correspondants couplés à la peroxydase. L'activité peroxydase a été révélée à l'aide du substrat ECL2 Western Blotting et le signal chimiluminescent a été détecté avec le système Fusion FX-7 (Vilber-Lourmat).

(B et C) Localisation des protéines pATM et pChk2 lors de l'infection MDV. Les CESC (infectées ou non-infectées) ont été cultivées à basse densité sur des lamelles en verre avant d'être fixées (PAF 4%) et marquées par les différents anticorps primaires spécifiques des protéines d'intérêt et de l'anticorps secondaire Alexa-Fluor 594 GAR (rouge). Les cellules infectées sont visualisées directement du fait de la fusion de l'EGFP avec la protéine VP22 (vert). Les noyaux cellulaires ont été marqués par une coloration Hoechst (bleu).

En revanche, le marquage de la forme phosphorylée de Chk2 semble être plus intense dans les cellules infectées et présente une localisation différente selon le stade d'infection. Un marquage en foci est en effet détecté dans les noyaux des cellules en début d'infection (présentant une fluorescence GFP faible) et diffus dans les cellules en phase tardive d'infection (cellules fortement GFP+) (Figure 50C). Les immunoblots réalisés avec l'anticorps anti-pChk2 ont permis de mettre en évidence la présence de la protéine (62 kDa). Toutefois après quantification, l'expression de la pChk2 s'est avérée identique dans les lysats issus des cellules Ni, GFP- ou GFP+ (Figure 50D). Au vu de ces résultats, il est difficile de conclure, actuellement quant à l'activation de la voie ATM.

Avec la voie ATM, la voie DNA-PK constitue la 2^{ème} voie de signalisation pouvant être déclenchée en réponse à la génération de CDBs. L'activation de cette voie de signalisation a été testée en utilisant l'anticorps anti-Ku80 (cs2180) dirigé contre la sous-unité Ku80 du complexe Ku80/Ku70. Aucun marquage de la protéine n'a pu être révélé par Western blot et immunofluorescence dans les cellules CESC infectées et non-infectées. Il faut noter que le contrôle de la réactivité de cet anticorps réalisé par immunoblot à partir d'extraits de cellules humaines (U2OS) traitées avec de l'étoposide (pour induire des CDBs) n'avait pas permis de mettre en évidence cette protéine. Aussi, l'activation de la voie DNA-PK en réponse aux CDBs reste à explorer.

La voie ATR est généralement activée en réponse à des dommages simple-brin et des problèmes de progression des fourches de réplication. Néanmoins, au vu de la régulation de cette voie par les herpesvirus, notamment par HSV-1, nous avons voulu tester son état d'activation. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'expression des protéines RPA70 et aux formes phosphorylées de ATR et Chk1. Malheureusement, comme précédemment, nous avons été confronté à un manque de spécificité des anticorps testés. Ainsi, l'anticorps anti-RPA70 ne semble pas reconnaître la protéine RPA de poulet et génère beaucoup de bruit de fond lors du marquage des cellules par immunofluorescence.

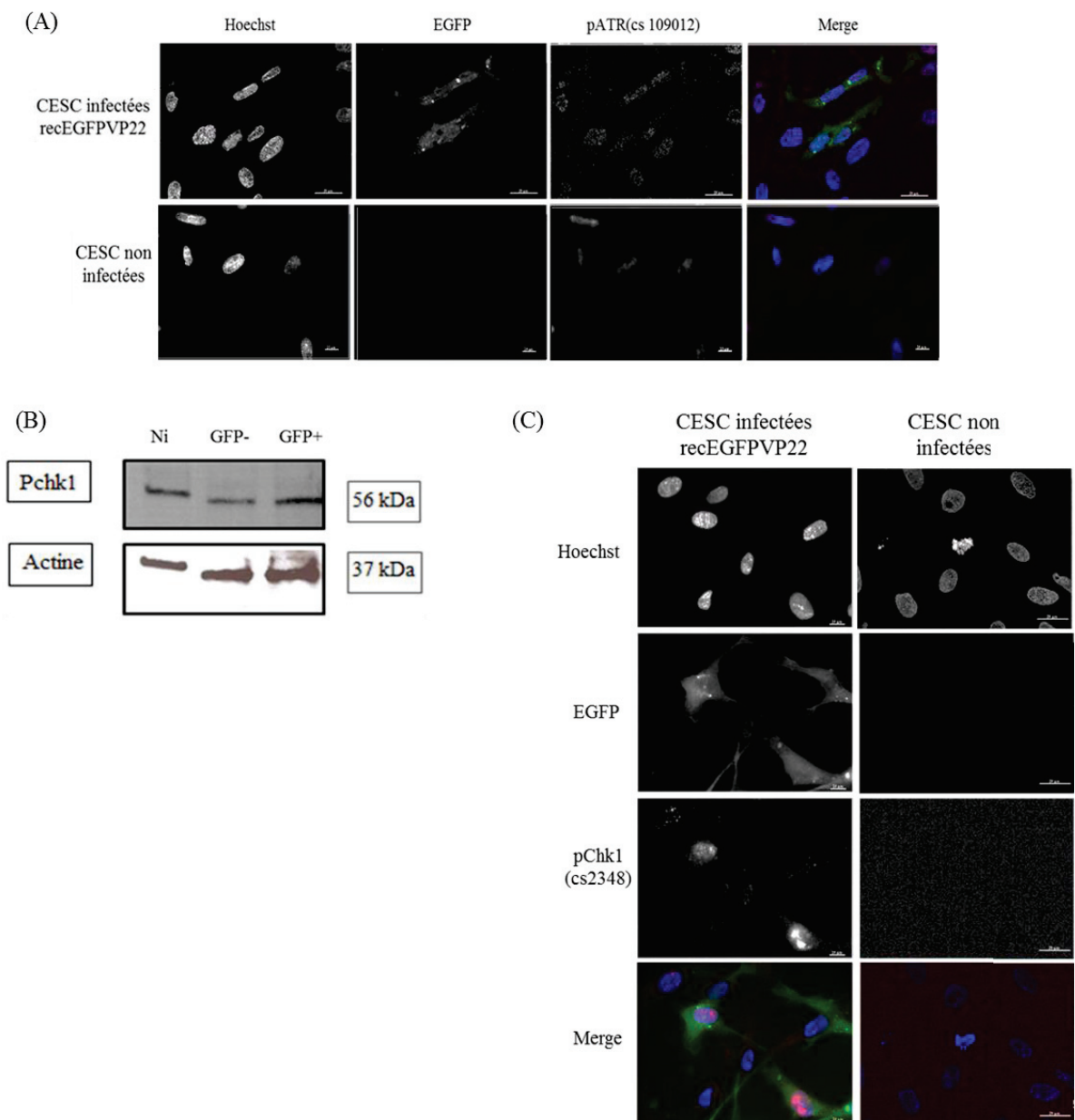


Figure 51. Effet de l'infection cytotolytique du MDV sur la voie ATR

Les cellules CEC ont été infectées avec le virus MDV recombinant recEGFPVP22 (10^4 PFU). La détection des protéines pATR et pChk1 a été réalisée 96 hpi par Western blot et/ou immunofluorescence. (A-C) Détection des protéines pATR (A) et pChk1 (C) par immunofluorescence. Les CEC infectées et non-infectées ont été cultivées à basse densité sur des lamelles en verre avant d'être fixées (PAF 4%) et marquées par les anticorps primaires spécifiques anti-pATR et anti-pChk1 et l'anticorps secondaire Alexa-Fluor 594 GAR (rouge). Les cellules infectées exprimant la protéine VP22 couplée à l'EGFP ont été visualisées directement (vert). Les noyaux cellulaires ont été marqués par une coloration Hoechst (bleu). (B) Détection de la protéine pChk1 par Western blot. Les extraits protéiques ont été préparés à partir de cellules CEC infectées (GFP+) et non-infectées (NI et GFP-) préalablement triées par cytométrie. La migration des extraits protéiques a été réalisée sur gel SDS-PAGE 10% puis les protéines ont été transférées sur membrane de

nitrocellulose. La protéine pChk1 a été marquée à l'aide de l'anticorps primaire spécifique anti-pChk1 (cs2348) et de l'anticorps secondaire IgG lapin couplé à la peroxydase. L'activité peroxydase a été révélée à l'aide du substrat ECL2 Western Blotting et le signal chemiluminescent a été détecté avec le système Fusion FX-7 (Vilber-Lourmat).

Les essais avec cet anticorps ont révélé un défaut de réactivité dans des cellules aviaires (cellules LMH) traitées aux UV (50 joules), et également dans des cellules humaines. En effet, le marquage de cette protéine (normalement nucléaire) dans les cellules U2OS était détecté exclusivement au niveau du cytoplasme et 2 bandes de 30 et 70kDa étaient mises en évidence par immunoblot. Par ailleurs, la protéine ATR (pATR) ne semble pas spécifiquement activée dans les cellules infectées GFP+, un signal similaire ayant été détecté par immunofluorescence dans les cellules GFP- (Figure 51A). L'anticorps anti-pATR n'étant pas utilisable en Western blot, nous avons malgré tout réalisé un marquage de la protéine pChk1 (cible préférentielle de pATR). Une bande spécifique de cette protéine (56 kDa) de même intensité a été mise en évidence par immunoblot dans les extraits protéiques provenant de cellules infectées et non-infectées, indiquant que l'infection par le MDV n'induirait pas d'activation de la protéine pChk1 (Figure 51B). En revanche, par immunofluorescence, nous avons pu observer un marquage de pChk1 plus intense dans le noyau des cellules infectées (Figure 51C). De plus, dans ces cellules, la protéine pChk1 semble se localiser dans des domaines particuliers du noyau qui pourraient correspondre aux centres de réplication du MDV. Cependant, cette hypothèse reste à vérifier étant donné que nous ne disposons pas d'anticorps spécifiques permettant de marquer ces foyers de réplication du MDV.

En conséquence, nos travaux réalisés dans le but d'identifier et de caractériser les voies DDR activées en réponse à l'infection par le MDV sont restés à l'état d'ébauches.

3.2 Rôle de la DDR dans la réplication du MDV

Au vu des difficultés que nous avons rencontrées pour étudier les voies de DDR par les méthodes conventionnelles permettant de détecter l'expression des facteurs de DDR, nous avons développé une approche alternative visant à étudier l'effet d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques de ces voies sur la réplication du MDV. Nous avons ainsi choisi de traiter les cellules infectées avec la Wortmanine (inhibiteur des voies ATM et DNA-PK), la Camptothécine (inhibiteur de la voie ATR), la caféine (inhibiteur des voies ATM et ATR), le Ly-29002 (inhibiteur de la voie DNA-PK), le PF-477736 (inhibiteur de CHK1) et un

inhibiteur spécifique de Chk2 (Tableau 3). Les CESCes ont été infectées avec 10^4 PFU du virus MDV recombinant recEGFPVP22 avant d'être traitées (6h post-infection) par différentes doses d'inhibiteurs (Figure 52). Des cellules infectées dans les mêmes conditions mais traitées avec le DMSO ont été utilisées comme témoin négatif. L'ADN a été extrait des cellules à 96h pi afin de mesurer la charge virale par qPCR.

Tableau 3 : Inhibiteurs des voies de DDR.

Inhibiteurs	Voie de DDR inhibée	Références
Caféine	ATM et ATR	(Simoes <i>et al.</i> , 2013)
Inhibiteur de Chk2	Chk2	(Dai <i>et al.</i> , 2011)
Wortmanine	ATM et DNA-PK	(Simoes <i>et al.</i> , 2013)
Ly 294002	DNA-PK	(Garcia-Echeverria & Sellers, 2008)
PF4777736	Chk1	(Blasina <i>et al.</i> , 2008)

Parmi les inhibiteurs utilisés dans cette étude, la caféine et le PF4777736 semblent avoir un effet bénéfique pour la réplication du virus. En effet, une augmentation de la réplication du MDV d'un facteur 8 et 10 a été observée dans les cellules infectées traitées avec 1 et 2 mM de caféine par rapport aux cellules infectées non-traitées (Figure 52A). Il faut noter que l'administration de 4 mM de caféine semble être délétère pour l'infection MDV, mais à cette concentration une forte toxicité a été observée dans les cellules. Le traitement PF4777736 inhibant la protéine Chk1, a un effet plus modéré sur la réplication du MDV. Les cellules infectées et traitées par 300nM de PF4777736 présentent une charge virale augmentée d'environ 2 fois par rapport aux cellules infectées traitées par le DMSO.

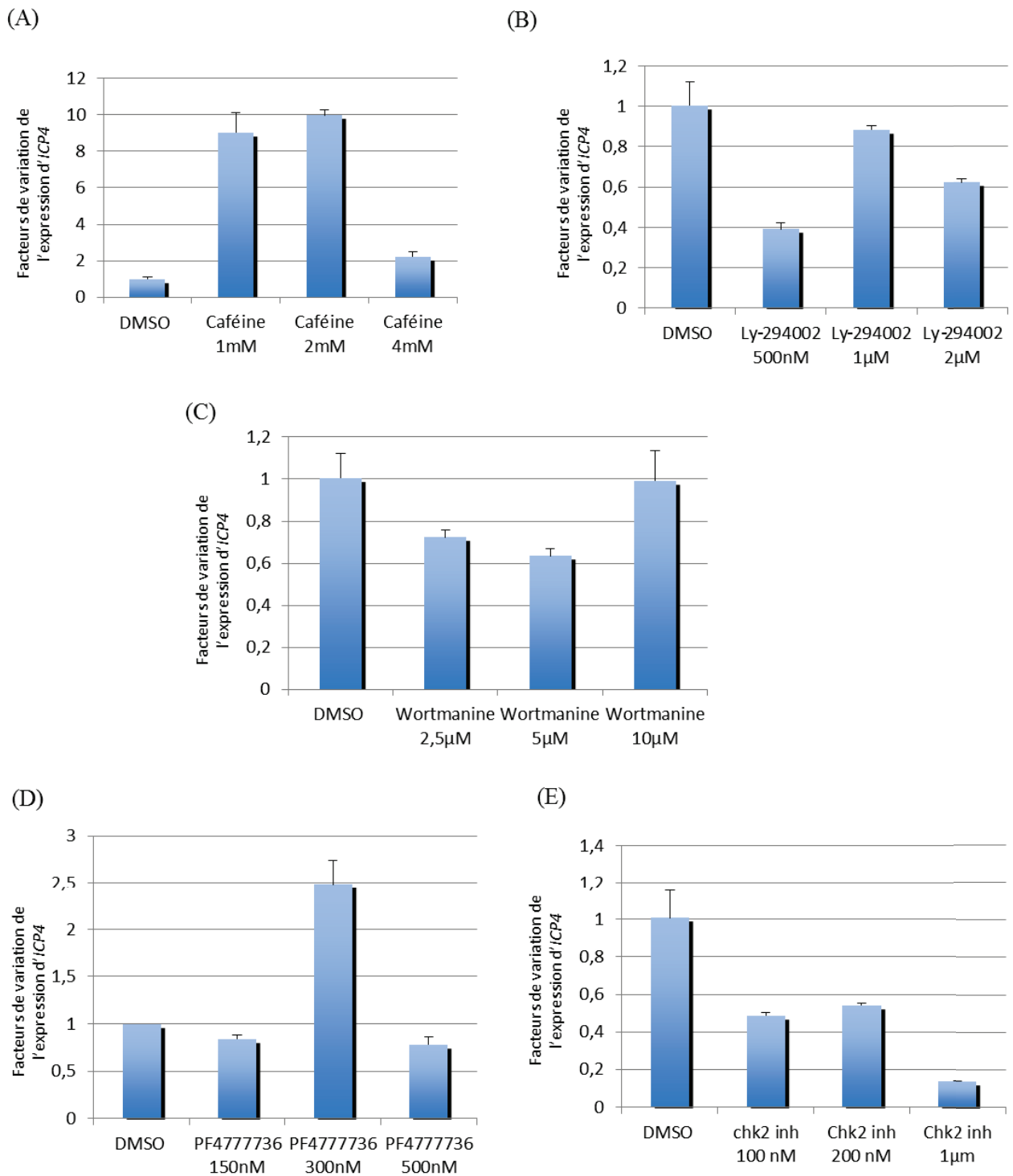


Figure 52. Impact de l'inhibition sélective des voies de DDR sur la réplication du MDV dans les CESC

Les CESC ont été infectées avec le virus MDV recombinant recEGFPVP22 (10^4 PFU) avant d'être traitées (6 hpi) avec différentes concentrations d'inhibiteurs des voies ATM, ATR et DNA-PK : caféine (A), Ly-29002 (B), Wortmanine (C), PF477736 (D) et un inhibiteur spécifique de Chk2 (Chk2 inh) (E). Parallèlement, des CESC infectées ont été traitées par du DMSO (témoin négatif). Des extractions d'ADN ont été effectuées 96 hpi afin de quantifier la charge virale par qPCR. Le nombre de copies du gène viral *ICP4* a été

normalisé par rapport au nombre de copies du gène de ménage cellulaire *iNOS*. Les résultats obtenus pour les cellules traitées ont ensuite été relativisés par rapport aux cellules traitées avec du DMSO et les moyennes ($\pm$ écart-type) sont présentées sous-forme d'histogrammes.

Par contre, le traitement des CESC infectées par le Ly-29002 (inhibiteur de la voie DNA-PK), la Wortmanine (inhibiteur des voies ATM et DNA-PK) et l'inhibiteur spécifique de Chk2 entraîne une diminution de la réplication virale (Figures 52B-C et E). La charge virale est en effet diminuée de 2,5 fois lorsque les cellules ont été traitées avec 500 nM d'inhibiteur de la voie DNA-PK (Ly-294002) ou avec 100 et 200 nM d'inhibiteur de Chk2. De même, l'inhibition des voies ATM et DNA-PK par la Wortmanine induit une baisse de réplication virale d'un facteur 1,7. Il faut noter qu'en raison de la forte cytotoxicité de la Camptothecine aux concentrations testées (100 mM, 250 mM et 500 mM), les analyses de qPCR n'ont pu être réalisées.

Ces travaux ont été conduits récemment et restent très préliminaires. Aussi, des expériences sont en cours au laboratoire afin d'affiner ces résultats et de déterminer la cytotoxicité des inhibiteurs utilisés. Ces tests nous permettront de déterminer une gamme de concentrations d'inhibiteurs plus appropriée afin de vérifier si les effets observés sur la réplication du MDV sont dose-dépendants.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'inhibition des voies de DDR sur la réplication de MDV dans le modèle CESC.

	Inhibition de la voie ATM	Inhibition de la voie ATR	Inhibition de la voie DNA-PK
Caféine			ND
Ly-29002	ND	ND	
Wortmanine		ND	
PF477736	ND		ND
Chk2 inhibiteur		ND	ND

Néanmoins, ces premières observations tendent à indiquer que la voie DNA-PK pourrait être favorable à la réplication virale, son inhibition entraînant une diminution de la charge virale. Par contre, il est difficile à ce jour de se prononcer sur l'importance des voies ATM et ATR dans le cycle viral. Les résultats obtenus suite aux traitements avec la caféine et

le PF477736 semblent suggérer un effet plutôt néfaste de la voie ATR sur la réplication du MDV, alors que la voie ATM pourrait faciliter la réplication du MDV (d'après les résultats obtenus avec les traitements Wortmanine et inhibiteur de Chk2) (Tableau 4).

3.3 Implication de la DDR dans la réactivation virale

Parallèlement aux travaux réalisés en CESC, nous avons cherché à déterminer si les voies de DDR pouvaient également jouer un rôle dans la reprise de la réplication du MDV à partir de cellules infectées en latence. Les cellules 3867(K) permettant d'étudier à la fois la phase de la latence virale et la phase de réplication tardive (réactivation) ont été cultivées pendant 48h en présence de différentes concentrations de Camptothecine, Wortmanine, caféine, Ly-29002, PF477736 et de l'inhibiteur spécifique de Chk2 (Tableau 3). Le taux de réactivation virale a été estimé par cytométrie en flux par la détection de la GFP accompagnant l'expression de la protéine virale UL47 dans les cellules dans lesquelles le virus est en cycle lytique. De plus, afin de s'affranchir d'un biais lié à la cytotoxicité des inhibiteurs, l'index de réactivation (pourcentage de cellules GFP+) a été déterminé spécifiquement dans la population de cellules vivantes, estimée par un marquage des cellules avec de l'iodure de propidium. Il faut noter que le taux moyen de réactivation dans les cellules traitées au DMSO (témoin négatif) était de 2,2%.

L'inhibition spécifique de Chk2 ainsi que des voies ATM et/ou DNA-PK avec la Wortmanine et du Ly-29002 ne semble pas avoir d'effet majeur sur la réactivation du virus aux concentrations testées (Figure 53A-C). L'inhibition des voies ATM et ATR par la caféine augmenterait sensiblement la réactivation du MDV d'un facteur 1,6 à 2 par rapport aux cellules traitées par du DMSO (Figure 53D). Toutefois, cet effet plutôt bénéfique pour le cycle lytique du virus a tendance à diminuer lorsque la concentration de caféine administrée augmente.

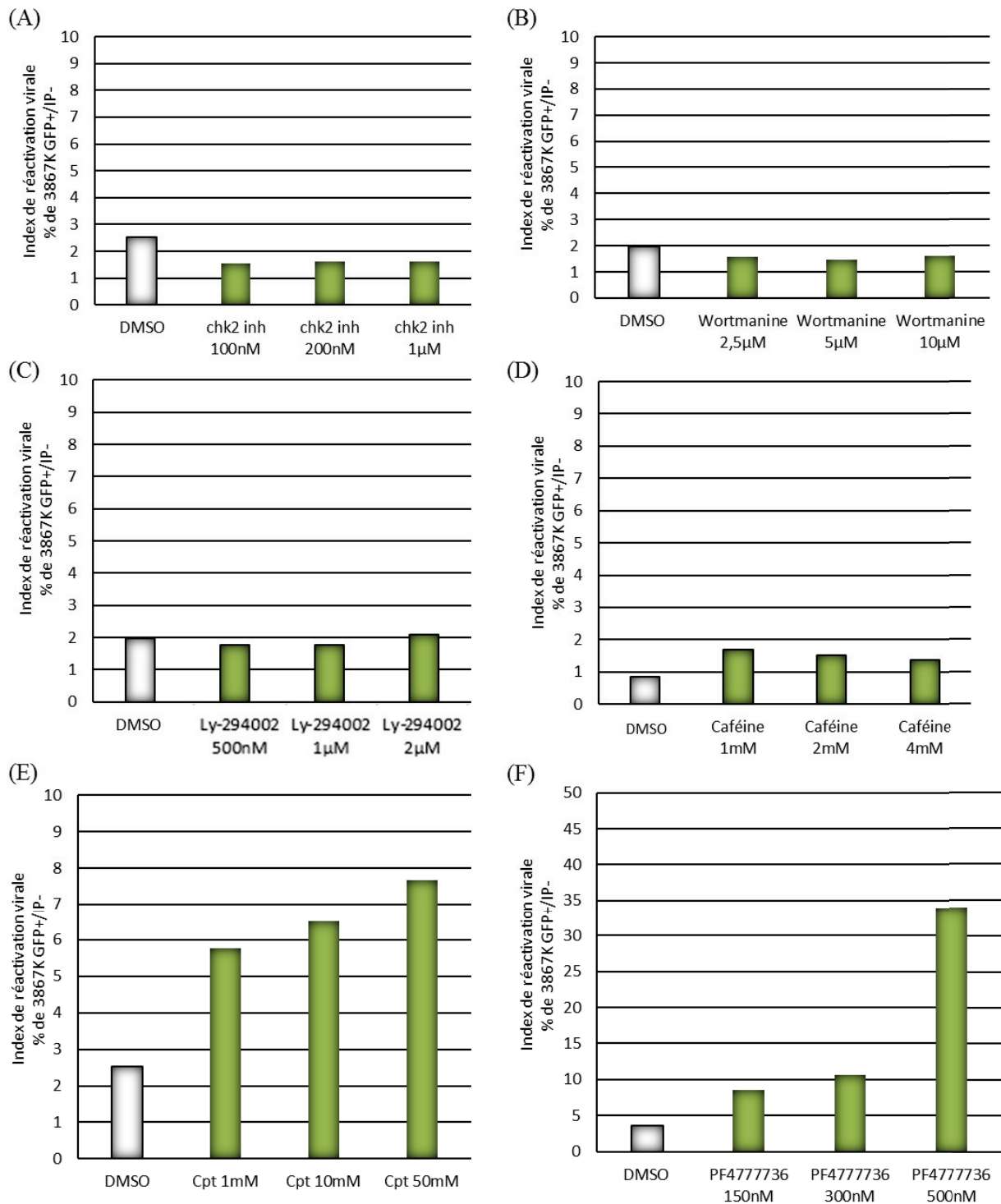


Figure 53. Impact de l'inhibition sélective des voies de DDR sur la réactivation virale

Les cellules 3867(K) ont été traitées pendant 48h avec les différentes concentrations d'inhibiteurs des voies ATM, ATR et DNA-PK : Chk2 inh (A), Wortmanine (B), Ly-294002 (C), caféine (D), Camptothécine (E), PF4777736 (F). Des cellules 3867(K) traitées avec du DMSO ont été utilisées comme témoin négatif du traitement. La cytotoxicité de chacune des concentrations des drogues a été déterminée par analyse cytométrique après marquage des 3867(K) à l'iodure de propidium (IP). Le niveau de réactivation virale dans les cellules viables (IP-) a été estimé par cytométrie sur la base de la présence d'une

fluorescence GFP associée à l'expression de la protéine virale *UL47*. Le pourcentage de cellules infectées (GFP+) dans la population de cellules viables (IP-) a été calculé et est représenté par des histogrammes.

En revanche, les traitements par les inhibiteurs de la voie ATR, Camptothecine et l'inhibiteur de Chk1 (PF4777736) semblent avoir un effet favorable à la reprise du cycle lytique du MDV dans les cellules 3867(K) (Figure 53E et 53F). Le taux de réactivation virale tend en effet à augmenter de 2,53% dans les cellules traitées DMSO à 7,67% lorsque les cellules sont traitées avec 50 mM de Camptothecine et de 3,62% à 34% lors du traitement avec le PF4777736 (à une concentration de 500 nM). Afin de confirmer l'effet antagoniste de Chk1 sur la reprise de la réplication du MDV, les cellules 3867(K) ont été traitées avec une gamme de concentration de PF4777736 allant de 18,75 nM à 500 nM. Les résultats montrent un effet dose de la drogue avec un taux de réactivation allant de 3,37% jusqu'à 16,73% pour les concentrations de PF4777736 testées (Figure 54).

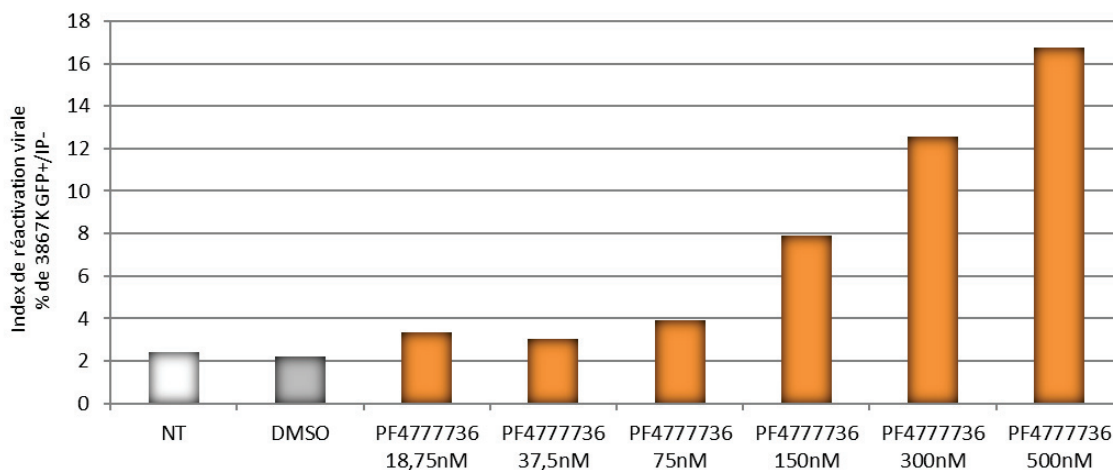


Figure 54. Effet dose de l'inhibiteur de Chk1 sur la réactivation du MDV

Les cellules 3867(K) ont été traitées pendant 48h par une gamme de 6 concentrations de PF4777736 (18,75 nM ; 37,5 nM ; 75 nM ; 150 nM ; 300 nM et 500 nM) ou avec du DMSO (témoin négatif). Un marquage des 3867(K) à l'iodure de propidium (IP) a permis de discriminer les cellules vivantes. Le niveau de réactivation virale a été déterminé par cytométrie en estimant le pourcentage de cellules GFP+ dans la population de cellules viables (IP-).

Ces résultats semblent donc suggérer que la voie ATR, notamment son effecteur Chk1, aurait un effet négatif sur le cycle lytique tardif du MDV et que son inhibition favoriserait la réactivation virale dans les lymphocytes T. Cependant, comme précédemment ces travaux très préliminaires doivent être reconduits afin de confirmer les tendances observées (Tableau 5).

Tableau 5 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'inhibition des voies de DDR sur la réplication de MDV dans le modèle 3867(K).

	Inhibition de la voie ATM	Inhibition de la voie ATR	Inhibition de la voie DNA-PK
Caféine			ND
Ly-29002	ND	ND	
Wortmanine	ND	/	ND
PF477736	ND		ND
Chk2 inhibiteur		ND	ND
Camptothecine	ND		ND

Discussion

Comprendre les interactions entre virus et cellules est un enjeu majeur pour développer de nouvelles cibles thérapeutiques et prophylactiques. Ces interactions sont complexes car les virus modulent de nombreuses voies de signalisation cellulaires afin notamment d'établir un environnement propice à leur maintien et leur réplication dans la cellule hôte. Le niveau de complexité de ces interactions augmente lorsqu'il s'agit d'infection par des virus oncogènes capables de déréguler sévèrement la biologie des cellules, notamment leur capacité de survie et de prolifération. Dans ce contexte, le virus de la maladie de Marek est un objet d'étude particulièrement intéressant de par ses relations avec les cellules hôtes lui permettant de se répliquer mais également d'établir une infection latente et de transformer les lymphocytes T chez le poulet.

Mon projet de thèse a consisté à étudier une des multiples facettes d'interaction du MDV avec la cellule, en caractérisant plus précisément si l'infection virale pouvait impacter le génome cellulaire en induisant des dommages et en tentant de comprendre les tenants et aboutissants de l'induction de tels dommages sur les étapes clés du cycle viral du MDV.

Mes travaux ont permis de mettre en évidence que l'infection par le MDV conduisait à l'apparition de lésions dans l'ADN génomique des cellules hôtes. Nous avons également pu préciser que ces dommages surviennent dans les temps précoces de l'infection (dès la 1^{ère} semaine) dans les PBMCs de poulets infectés, vraisemblablement lors de la phase cytotytique primaire de l'infection. Cette observation a été confirmée dans un modèle cellulaire *in vitro*, grâce auquel nous avons montré que les cellules CESC infectées par le MDV présentaient des cassures double-brin 96 hpi. Une étude réalisée par Keles *et al* en 2010 avait mis en évidence des dommages dans l'ADN de poulets dans des conditions d'infection naturelle par le MDV (Keles *et al.*, 2010). En raison du contexte d'infection dans lequel cette étude avait été menée, il était impossible de conclure quant à la souche virale étudiée et la cinétique d'apparition des lésions, aucune indication n'ayant été précisée concernant le temps auquel les prélèvements ont été effectués. Aussi, ces travaux ne pouvaient permettre de déterminer le rôle potentiel des dommages à l'ADN dans les différentes phases du cycle viral du MDV.

L'induction de dommages à l'ADN n'est pas spécifique à l'infection par le MDV. En effet, les herpesvirus notamment HSV-1 et HCMV sont également capables de provoquer des cassures chromosomiques à des sites spécifiques (Fortunato & Spector, 2003). De plus, il est actuellement clairement établi que l'infection par des gammaherpesvirus oncogènes comme EBV ou KSHV est responsable de l'apparition de CDBs dans l'ADN des cellules hôtes (Gruhne *et al.*, 2009b; Wu *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2013).

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de la survenue des lésions lors de l'infection par le MDV. Une source potentielle de dommages pourrait reposer sur l'expression de facteurs de virulence codés par le virus, notamment la protéine majeure de tégument VP22. Des études réalisées au laboratoire ont en effet montré que cette protéine se lie à l'ADN, préférentiellement à l'hétérochromatine et interagirait avec les histones (Dorange *et al.*, 2000; Trapp-Fragnet *et al.*, 2014). De plus, la surexpression de VP22 conduit non seulement à un arrêt des cellules en phase-S du cycle cellulaire mais également à l'apparition de CDBs dans l'ADN cellulaire. Ces propriétés de VP22 dépendent d'une extrémité C-terminale non-modifiée de la protéine, puisque l'introduction d'une étiquette EGFP en carboxy-terminal de VP22 abolit totalement sa capacité à bloquer le cycle cellulaire, à induire des dommages dans l'ADN et à se lier aux histones. Par contre, le positionnement de l'EGFP à l'extrémité N-terminale de VP22 n'affecte en rien ces propriétés (Trapp-Fragnet *et al.*, 2014). Afin de vérifier si VP22 est impliquée dans la survenue des dommages à l'ADN au cours de l'infection par le MDV, nous avons réalisé une étude comparative des virus MDV recombinants codant les gènes de ces VP22 modifiées. Cette approche est certes indirecte, mais se justifie par le fait que VP22 est une protéine essentielle à la réplication et à la dissémination du MDV (Dorange *et al.*, 2000; Dorange *et al.*, 2002; Remy *et al.*, 2013). Aussi, l'utilisation d'un virus invalidé pour le gène codant la VP22 n'était pas envisageable. Les infections expérimentales menées *in vivo* et *in vitro* ont conforté les précédentes observations indiquant que la protéine VP22 aurait un effet sur l'intégrité de l'ADN cellulaire. Nous avons, en effet, démontré que l'infection par les virus sauvage vRB-1B et recombinant vRB-1B Nterm est à l'origine de l'apparition de lésions dans l'ADN des cellules fibroblastiques, CESC. De même, seules les PBMC de poulets infectés par ces 2 virus présentent un accroissement notable des dommages à l'ADN 7 jours après infection. En revanche, aucune lésion additionnelle par rapport aux cellules non-infectées n'a été détectée lors des infections expérimentales réalisées *in vitro* et *in vivo* (à J7 pi) avec le virus MDV recombinant comportant la protéine VP22 étiquetée à son extrémité C-terminale. En conséquence, la protéine VP22 semble jouer un rôle déterminant dans l'apparition des lésions à l'ADN lors de la phase cytotytique de l'infection MDV.

Hormis VP22, il n'est pas exclu que d'autres protéines virales puissent être impliquées dans la génération des CDBs durant l'infection par le MDV, notamment la nucléase UL12 identifiée dans le génome du MDV (Tulman *et al.*, 2000). Le gène *UL12* présent dans le virus HSV-1 code pour une nucléase qui interagirait avec le complexe MRN (Balasubramanian *et*

al., 2010). Cependant, aucune étude n'a rapporté, à ce jour, un rôle de cette protéine dans l'induction de lésions dans l'ADN cellulaire. En revanche, la nucléase BGLF5 codée par EBV serait à l'origine de cassures double-brin de l'ADN qui, associées à une répression des systèmes de réparation de l'ADN, engendrerait une forte instabilité génomique dans les cellules épithéliales humaines (Wu *et al.*, 2010).

Nous avons montré que l'infection cytolitique de MDV en CESC provoque une augmentation de la production d'un métabolite ROS particulièrement génotoxique, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Keles *et al.*, avaient également observé une association entre la MD et une hausse de la concentration des métabolites pro-oxydatifs MDA (malondialdéhyde), PCO (plasma protein carbonyl) et NO (nitric oxide) dans le plasma des poulets atteints de la MD (Keles *et al.*, 2010). De plus, l'infection MDV s'accompagnerait d'une forte expression de l'ARNm de l'enzyme iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) dès la 1^{ère} semaine d'infection (Djeraba *et al.*, 2002a; Xing & Schat, 2000a ; 2000b). Ces travaux avaient permis de préciser que la résistance de certaines lignées de poulets à la MD serait attribuable à une plus forte production de NO et que le NO pourrait jouer un rôle dans la réplication virale (Djeraba *et al.*, 2002a; Djeraba *et al.*, 2002b; Xing & Schat, 2000b). L'exposition chronique de l'ADN cellulaire à l'action oxydative de ces radicaux libres peut être à l'origine de l'émergence de lésions dans l'ADN de type simple et double brin (Caldecott, 2008). Aussi, la production de ROS lors de l'infection cytolitique de MDV pourrait participer à la génération des CDBs observées comme cela a été rapporté dans le cas d'infections par EBV et KSHV. La protéine EBNA-1 d'EBV en induisant la production de ROS entrainerait des altérations chromosomiques (Gruhne *et al.*, 2009a). EBNA-1 est en effet responsable de la surexpression de la sous-unité NOX2 de l'oxydase NADPH favorisant ainsi l'accumulation des ROS (Gruhne *et al.*, 2009a). Il a également été montré que la réplication et la phase de latence de l'infection KSHV sont accompagnées d'une hausse de la production des ROS générant du stress oxydatif dans les cellules (Ma *et al.*, 2013). Bien que les mécanismes conduisant à l'induction des ROS durant l'infection par KSHV restent à préciser, les transcrits majeurs de la latence (LATs) et les protéines LANA ainsi que v-cycline et v-FLIP joueraient un rôle clé dans ce processus (Ma *et al.*, 2013). Dans ce contexte, il serait intéressant de caractériser les mécanismes moléculaires à l'origine de la génération des CDBs par VP22 et notamment de déterminer si VP22 est capable de réguler la production des ROS.

La réponse aux dommages à l'ADN est un processus organisé qui a une importance particulière lors des infections virales non seulement de par son action anti-virale mais également en favorisant la réplication de certains virus. Un des objectifs de ma thèse devait consister à caractériser les voies de DDR mises en œuvre lors de l'infection par le MDV et plus particulièrement en réponse aux dommages survenant durant la réplication virale. Malheureusement, du fait du manque d'anticorps spécifiques des différentes protéines de ces voies de signalisation, cette partie de mon projet a donné peu de résultats exploitables. À ce jour, mes travaux ont permis de mettre en évidence que les lésions apparues au cours de l'infection cytolitique des CESC par le MDV conduisent au recrutement du senseur γ H2AX qui se localisent aux points de cassures. De plus, il semblerait que la protéine Chk2 soit phosphorylée et s'accumulerait préférentiellement dans le noyau dans les cellules infectées par le MDV. Aussi, l'inhibition spécifique de Chk2 tend à diminuer la réplication du MDV dans les CESC et la reprise du cycle lytique dans les 3867(K). L'ensemble de ces observations semble indiquer que l'infection MDV pourrait conduire à l'activation de la voie ATM. Cette voie de signalisation est classiquement activée lors de l'infection par les herpesvirus comme cela a été décrit pour HSV-1, HSV-2, HCMV, EBV et MHV-68 (Shirata *et al.*, 2005; Tarakanova *et al.*, 2007; Turnell & Grand, 2012b; Xiaofei & Kowalik, 2014). Il faut, cependant, noter que le virus HSV-1 est également responsable de la redistribution de certaines protéines de la voie ATM, notamment en recrutant les protéines Nbs1, Rad50 et pATM à ses compartiments de pré-réplication, conduisant à l'inactivation de la signalisation ATM et au détournement de ses protéines cellulaires pour favoriser sa réplication (Li *et al.*, 2008; Lilley *et al.*, 2005; Lilley *et al.*, 2011; Shirata *et al.*, 2005; Turnell & Grand, 2012a).

Concernant la voie DNA-PK, également activée en réponse à des dommages de type double-brin, nos résultats ne permettent pas de conclure quant à sa modulation au cours de l'infection par le MDV.

La protéine pChk1 semble être relocalisée dans des domaines nucléaires particuliers des cellules infectées, suggérant une séquestration de cette protéine. De plus, dans les cellules lymphoblastoïdes 3867(K), nous avons observé que l'inhibition spécifique de Chk1 par un traitement avec le PF4777736 favoriserait la réactivation du MDV, laissant supposer que la voie ATR aurait un effet plutôt néfaste sur la réplication du virus. Au vu de ces résultats, nous subodorons que la signalisation ATR serait modulée négativement par le MDV (potentiellement par la séquestration de pChk1) comme cela avait été décrit lors de l'infection par HSV-1 (Mohani *et al.*, 2013a; Mohani *et al.*, 2010; Mohani *et al.*, 2013b).

A part les lésions induites lors de l'infection par le MDV, d'autres mécanismes sont susceptibles d'être à l'origine de l'activation de la DDR. Les extrémités double-brin linéaire des génomes herpesviraux peuvent être perçues par les cellules hôtes comme des cassures d'ADN aboutissant à l'activation de la DDR (Luftig, 2014; Sinclair *et al.*, 2006). Néanmoins, ce cas de figure est peu probable dans le cas du MDV étant donné qu'il possède aux extrémités de son génome des séquences télomériques homologues aux télomères cellulaires (Delecluse & Hammerschmidt, 1993; Delecluse *et al.*, 1993 ; Kaufer *et al.*, 2011). Malgré tout, l'ADN viral étant soumis aux mêmes risques environnementaux et métaboliques que les génomes cellulaires, nous ne pouvons pas exclure que le génome viral MDV présente *in situ* des lésions qui peuvent être reconnues par la machinerie de DDR, comme cela a été rapporté pour HSV-1 (Luftig, 2014; Smith *et al.*, 2014). De plus, le mode de réplication du MDV par le système de rolling circle, commun aux herpesvirus, pourrait également occasionner la stimulation de la DDR (Sinclair *et al.*, 2006). Par ailleurs, le stress réplicatif engendré par la réplication du virus pourrait également être un facteur non négligeable d'induction de DDR. Le facteur de transcription E2F régule l'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire vers la phase S. Sa dérégulation conduit à la génération de stress réplicatif dans les cellules et à l'activation de la voie ATM (Nikitin & Luftig, 2012). Le rôle du stress réplicatif dans le déclenchement de la DDR a été démontré lors d'infections par les herpesvirus. Les protéines IE1, IE2, pp71 et pUL97 codées par HCMV, au même titre que les protéines EBNA3C et BPLF1 codées par EBV sont en effet capables d'interagir avec pRb entraînant la dérégulation d'E2F et l'activation de la voie ATM (Luftig, 2014; Xiaofei & Kowalik, 2014). Dans le cas de EBV, il a été montré que la protéine E2F ainsi activée va conduire à la mise en place d'un environnement de pseudo-S et à une hyper prolifération des cellules à l'origine du déclenchement de la DDR (Nikitin & Luftig, 2012). Une étude menée au laboratoire a permis de mettre en évidence que l'infection par le MDV conduit à un arrêt prolifératif intra-S s'accompagnant d'une augmentation de l'expression des ARNm de E2F1 (x3.5), pRb (x3), cycline D (x6) et cdk6 (x2) (Trapp-Fragnet *et al.*, 2014). Aussi, l'accroissement de ces protéines pourrait être révélateur d'un stress réplicatif dans les cellules infectées par le MDV.

L'objectif majeur de ma thèse a consisté à comprendre en quoi sont impliqués les dommages à l'ADN dans le cycle viral du MDV, plus particulièrement dans la réplication, la phase de latence et la tumorigenèse viro-induite.

Les études menées *in vivo* ont permis de mettre en évidence une augmentation des lésions dans l'ADN des PBMC de poulets infectés 7 jours pi avec les virus vRB-1B et vRB-1B Nterm, mais pas avec le virus vRB-1B Cterm. Ces virus présentent des niveaux de réplication comparables dans les 7 premiers jours d'infection, ce qui semble indiquer que la réplication du MDV ne suffit pas à induire des cassures d'ADN. Par contre, il est intéressant de noter que le virus vRB-1B Cterm se réplique beaucoup moins efficacement que le virus sauvage vRB-1B à 14 et 28 jours pi. Ces observations suggèrent que le niveau de réplication virale pourrait malgré tout être corrélé à l'apparition des dommages apparus à des temps plus précoces. L'éventuelle corrélation entre les lésions générées au cours de l'infection cytotytique du MDV et son pouvoir réplcatif a été confortée *in vitro* en cellules fibroblastiques et en cellules lymphoblastoïdes. Nous avons en effet montré dans ces 2 types cellulaires que la réplication du MDV s'accompagnait de lésions dans l'ADN et que l'induction de CDBs par traitement chimique augmentait significativement la capacité du MDV à se répliquer. A ce jour, nous ne sommes pas en mesure de distinguer si l'effet bénéfique des lésions sur la réplication du virus est direct ou s'il résulte de l'activation de la DDR. En effet, la DDR et plus particulièrement la voie ATM joue un rôle important dans la promotion de la réplication virale des herpesvirus comme cela a été démontré lors d'infections par HSV-1, HCMV, EBV, KSHV et MHV-68 (Lilley *et al.*, 2007; Sinclair *et al.*, 2006; Turnell & Grand, 2012b; Weitzman *et al.*, 2010; Xiaofei & Kowalik, 2014). Bien que n'ayons pas pu conclure quant à l'activation des différentes voies de DDR, il est fort probable que l'infection par le MDV conduise également à l'activation de la signalisation ATM et que cette voie puisse avoir un impact positif sur la réplication du MDV. En effet, l'inhibition de pChk2 entraînerait une diminution de la réplication du MDV. De même, l'inhibition de la voie DNA-PK par un traitement Ly-29002 semble également diminuer la réplication du MDV et ce qui suggère que la signalisation DNA-PK pourrait également faciliter la réplication virale. Comme nous l'avons précisé précédemment, ces études d'infection en présence d'inhibiteurs doivent être reproduites afin de confirmer les résultats obtenus. Cependant, si les observations concernant la voie DNA-PK se vérifient, le MDV se distinguerait du virus HSV-1 pour lequel la signalisation DNA-PK aurait plutôt un effet défavorable sur sa réplication. En effet, le titre viral HSV-1 augmente significativement dans des cellules déficientes de DNA-PKcs par rapport à des cellules présentant une voie DNA-PK fonctionnelle (Parkinson *et al.*, 1999). En revanche, nous avons montré que lorsque la voie ATR et plus particulièrement pChk1 étaient inhibées, la réplication virale tendait à augmenter. Ces observations, bien que préliminaires,

pourraient indiquer que la signalisation ATR ne serait pas favorable à la réplication du MDV. Il faut noter que la signalisation ATR est inhibée lors de l'infection par HSV-1 mais que le virus relocalise les protéines impliquées dans la voie ATR (RPA, Chk1, Rad17, Rad9, Hus1 et TopBP1) au niveau de ses compartiments de réplication afin de se répliquer plus efficacement (Mohani *et al.*, 2013a; Mohani *et al.*, 2010; Mohani *et al.*, 2013b). Aussi, lors de l'infection par le MDV, nous avons détecté la protéine pChk1 dans des domaines particuliers du noyau. Faute d'anticorps spécifiques, nous ne sommes pas en mesure de déterminer si ces domaines nucléaires peuvent correspondre aux compartiments de réplication du MDV et/ou aux domaines ND10 nucléaires. Par extrapolation, on pourrait imaginer que le MDV en induisant la relocalisation et/ou la séquestration de pChk1 au niveau de ces compartiments nucléaires optimise sa réplication.

Contrairement aux phases de réplication, nous n'avons pas observé de dommages majeurs dans l'ADN des cellules lymphoblastoïdes dans lesquelles le MDV est en phase de latence. Il faut noter que cette observation a été réalisée avec une lignée de cellules en culture, mais que nous n'avons pas été en mesure de confirmer ce résultat *in vivo*. En effet, une augmentation de lésions à l'ADN a été détectée 7 jours pi dans les PBMCs d'animaux infectés puis le niveau de dommage était similaire à celui observé chez les poulets non-infectés. La phase cytotytique primaire d'infection par le MDV se produit généralement dans les 2 à 7 premiers jours de l'infection. Cependant la phase de latence se produisant majoritairement dans les LT CD4⁺ débute de façon concomitante 6 à 7 jours pi. Par conséquent, Il aurait été intéressant de déterminer plus précisément (i) dans quel type cellulaire (LT ou LB) ou (ii) lors de quelle phase d'infection (lytique/latence) se produisent les dommages à l'ADN. Malheureusement, compte tenu du faible pourcentage de cellules infectées dans le sang, nous n'avons pas pu envisager de faire un double marquage afin d'identifier les cellules infectées et de faire des analyses de comètes sur cette population. De plus, nos tentatives de discrimination des phases d'infection par qRT-PCR ne nous ont pas permis de discriminer les phases lytiques et latentes de l'infection, certainement du fait de la nature asynchrone de l'infection. Il faut noter que les analyses de qPCR réalisées sur le sang et les PBMCs des animaux infectés permettent de détecter le nombre de copies d'ADN viral, cependant, le génome viral étant sous-forme intégrée dans l'ADN cellulaire lors de la phase, cette technique ne peut être utilisée pour distinguer les cellules dans lesquelles le MDV est latent. Aussi, nous

ne pouvons pas exclure que les lésions dans l'ADN observées 7 Jours pi puissent participer à l'établissement de la latence dans les LT CD4+.

Une caractéristique majeure de la phase de latence MDV est l'intégration du génome viral (Delecluse & Hammerschmidt, 1993; Delecluse *et al.*, 1993; Kaufer *et al.*, 2011). Cette intégration se produirait à de multiples sites chromosomiques (de 2 à 12 sites) situés préférentiellement au niveau des régions télomériques ou subtélomériques des chromosomes (Delecluse & Hammerschmidt, 1993). Les mécanismes d'intégration du MDV ne sont actuellement pas totalement élucidés, il a été cependant suggéré que les télomères localisés aux extrémités du génome viral MDV puissent faciliter l'intégration du MDV par recombinaison homologue dans les télomères des chromosomes hôtes (Kaufer *et al.*, 2011). Aussi, il serait intéressant de déterminer quelle voie de réparation d'ADN est engagée en réponse aux dommages à l'ADN provoqués par l'infection MDV et notamment de définir si les voies de réparation HR ou NHEJ sont activées. Par ailleurs, il n'est pas exclu que les lésions occasionnées dans l'ADN cellulaire dans les phases précoces d'infection puissent également directement participer à l'intégration du génome MDV. Il a en effet été montré que les dommages à l'ADN faciliteraient l'intégration des virus HBV (Virus de l'hépatite B), des HPVs (Papillomavirus humains), de MCPyV (Polyomavirus de Merkel) et d'EBV (Bill & Summers, 2004; Chen *et al.*, 2014).

Nous n'avons pas pu établir clairement *in vivo* si la réactivation du MDV (phase cytolytique secondaire), qui se produit théoriquement à partir du 14^e jour post-infection, s'accompagne de dommages dans les PBMCs de poulets infectés. En effet, l'augmentation des lésions détectée à J14 pi chez les poulets inoculés avec le vRB-1B n'est pas statistiquement significative. Il faut, néanmoins, noter que le paramètre OTM tend à être légèrement plus élevé dans les PBMCs issus des animaux infectés vRB-1B que chez les poulets non-infectés. Aussi, afin de clarifier ce point, il aurait été pertinent de détecter les dommages à l'ADN spécifiquement dans les cellules où le virus réactive, mais pour les raisons techniques évoquées précédemment, il n'était pas envisageable de réaliser ces expériences. En revanche, l'utilisation du modèle cellulaire 3867(K) nous a permis de mettre en évidence *in vitro* que la réactivation virale est associée à l'apparition de lésions dans l'ADN cellulaire. A ce jour, il est difficile de conclure si les lésions apparues sont à l'origine de la reprise du cycle lytique dans les cellules ou si elles en sont la conséquence. En effet, la reprise de l'expression des gènes de la phase lytique, notamment de VP22, ainsi que la

réplication du génome viral pourrait conduire à générer ces dommages. Des lésions à l'ADN (et/ou l'activation de la DDR) ont également été détectées lors de l'induction chimique de la réactivation des virus KSHV et EBV en cellules (Gruhne *et al.*, 2009b; Xiao *et al.*, 2013). Aussi, notre étude a montré que l'induction de dommages par un traitement avec de l'étoposide augmentait la proportion de cellules infectées lytiquement par le MDV. Cette observation semble conforter que les lésions à l'ADN et/ou la DDR activée en réponse aux dommages facilite la réplication virale, comme nous l'avons suggéré lors de la phase d'infection cytolytique primaire. La « réactivation » du MDV est encore mal définie et de fait controversée, puisque certaines études ont évoqué que le génome viral puisse s'exciser du génome cellulaire (Delecluse *et al.*, 1993; Parcells *et al.*, 1999). Dans ce contexte, nous pourrions également imaginer que l'induction de cassures dans l'ADN cellulaire faciliterait l'excision du génome viral et par conséquent la réplication du MDV. Cependant, ceci reste très hypothétique et mériterait d'être étudié.

De nombreuses études ont montré une implication des dommages à l'ADN et de la DDR associée dans la tumorigenèse induite par les virus oncogènes (Hollingworth & Grand, 2015a; Nikitin & Luftig, 2011; 2012). Aussi, dans le contexte de l'infection par le MDV, nous avons pu établir une potentielle corrélation entre l'apparition de lésions de l'ADN et la lymphomagenèse viro-induite. En effet, les incidences tumorales associées à l'infection par le virus sauvage vRB-1B et par le virus recombinant vRB-1B Nterm ont été estimées respectivement à 100% et 60%. Ces 2 virus sont responsables d'une hausse de dommages à l'ADN dans les PBMCs de poulets infectés à 7 jours post infection. En revanche, l'infection par le virus recombinant vRB-1B Cterm, induisant une incidence tumorale fortement diminuée (30%), ne conduit pas à une augmentation de lésions dans l'ADN cellulaire à J7 pi, mais plus tardivement (36 jours pi). L'atténuation de ce virus ne semble pas être en relation avec un défaut de réplication puisque ce dernier se multiplie aussi bien que les 2 autres virus à J7 pi. Néanmoins, un défaut de réplication de ce virus a été détecté à partir de J14 pi, pouvant se traduire par une diminution du nombre de cellules infectées par ce virus. En conséquence, l'atténuation du virus vRB-1B Cterm pourrait s'expliquer par une diminution de la proportion de cellules dans lesquelles le virus entre en latence, à savoir des cellules qui sont susceptibles de subir la transformation cellulaire. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que les lésions survenant lors des étapes précoces de l'infection dans l'ADN cellulaire puissent être impliquées plus directement dans l'oncogenèse viro-induite.

Comme tous les processus néoplasiques, l'établissement de la tumorigenèse induite par le MDV reposerait sur une accumulation d'évènements se produisant au sein de la cellule et impliquant non seulement l'expression d'oncogènes viraux, mais également des dérégulations cellulaires. Avanzi *et al* ont récemment proposé le modèle « hit and rest » qui récapitule les évènements à l'origine de la tumorigenèse induite par les virus oncogènes en mettant l'accent sur l'importance des dommages à l'ADN dans ce processus (Avanzi *et al.*, 2013). Ce modèle suggère que les virus pourraient être responsables de l'apparition de dommages à l'ADN permanents dans un nombre limité de cellules. Ces dommages seraient initiés lors de la phase cytotytique primaire d'infection (« hit ») avant l'établissement de la latence (« rest »). Les cellules survivant à ces lésions deviendraient alors plus sensibles à la survenue de nouveaux dommages induits par des facteurs viraux exprimés au cours des phases de latence ou lors de la réactivation récurrente des virus. De plus, le nombre réduit de cellules présentant une combinaison de dommages génétiques et épigénétiques conduisant à un phénotype cancéreux s'expliquerait par le fait que la probabilité de l'événement (rare) de transformation dépendrait de la sévérité et de la fréquence des cycles de « hit and rest » associées aux réinfections et réactivations virales. Par analogie avec ce modèle, il est concevable que la réplication du MDV génère des lésions dans l'ADN des cellules lymphoïdes qui pourraient persister dans une faible population de LT CD4+. Ces dommages seraient susceptibles de favoriser l'intégration du MDV dans ces cellules et par conséquent l'établissement de la latence. En raison de la fragilité de l'ADN endommagé, les cellules comportant des lésions pourraient ainsi devenir plus vulnérables à d'autres dommages générés par l'expression des oncogènes viraux (Meq, vTR,...) ou par la réactivation du virus. Aussi, dans un contexte alliant des évènements tels que la dérégulation du cycle cellulaire, l'expression des oncogènes, l'activation de la télomérase et l'accumulation de lésions dans l'ADN, l'infection pourrait aboutir à une forte instabilité génomique à l'origine de la tumorigenèse induite par le MDV (Figure 55).

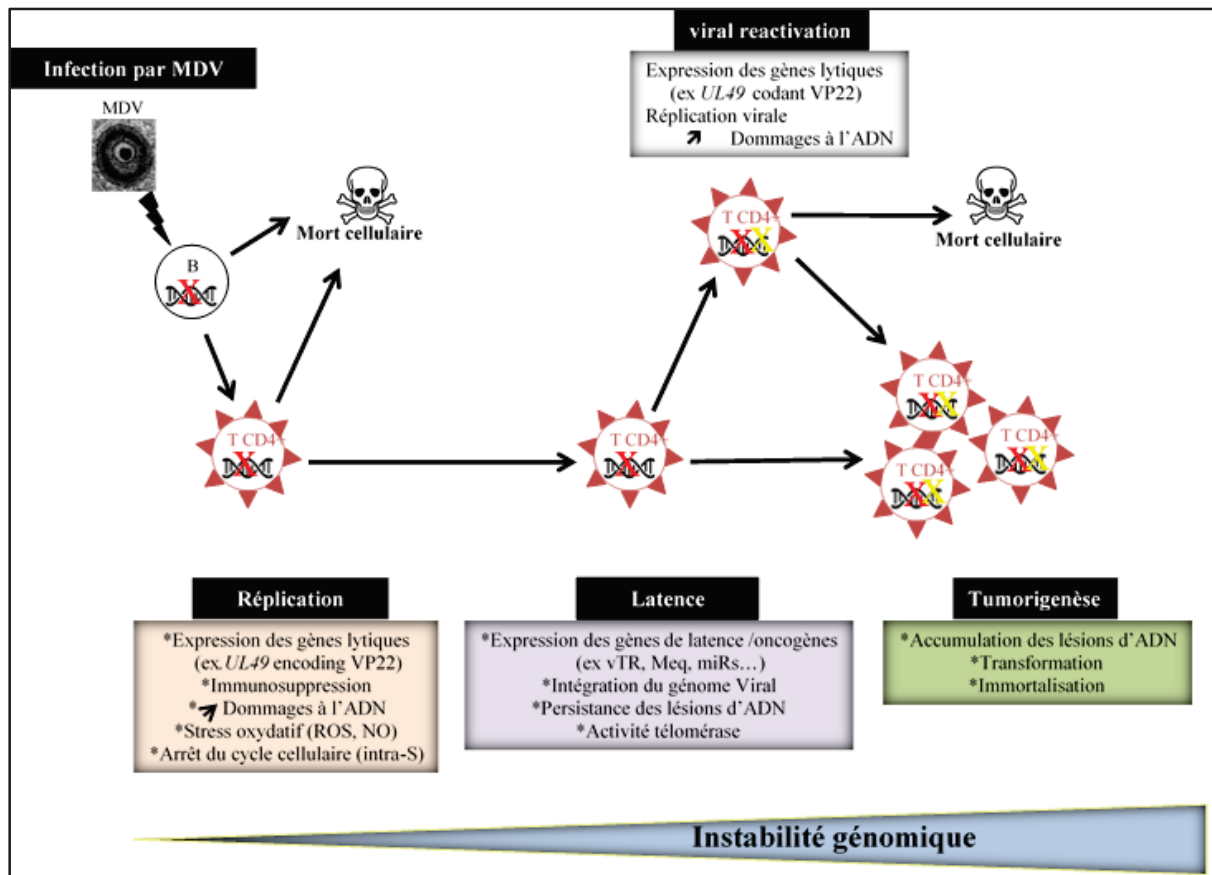


Figure 55. Modèle de tumorigenèse de MDV selon la théorie du "hit and rest mechanism" proposé par Avanzi (Avanzi *et al.*, 2013).

Conclusion et perspectives

Malgré l'identification de plusieurs oncogènes viraux, les données concernant les mécanismes moléculaires conduisant à la transformation des cellules induite par le MDV sont encore à l'heure actuelle parcellaires. Une meilleure connaissance des processus impliqués dans l'établissement de cette étape majeure de l'infection MDV pourrait permettre non seulement de comprendre comment les vaccins actuels protègent du développement des tumeurs chez le poulet en vue de les améliorer ou de développer de nouvelles approches vaccinales.

L'instabilité génomique est une des pierres angulaires de l'établissement des processus néoplasiques dans la cellule. Une étude menée au laboratoire avait permis de mettre en évidence que l'expression de la protéine tégumentaire VP22 s'accompagnait de dommages à l'ADN. Cette étude, à laquelle j'ai eu la chance de participer et d'être co-auteur de l'article publié dans PlosOne (2014), portait uniquement sur l'effet de la protéine VP22. Aussi, il convenait de vérifier si les dommages à l'ADN étaient également occasionnés dans un contexte infectieux. Mon projet de thèse a par conséquent permis de vérifier que l'infection par le MDV était effectivement associée à l'apparition de lésions dans l'ADN cellulaire de PBMC lors de la phase cytotytique primaire de l'infection MDV. De plus, nous avons pu préciser *in vitro* que ces dommages correspondaient à des cassures double-brin (CDBs) de l'ADN. Nous avons également établi que lors de la phase de latence virale dans les lymphocytes T, l'ADN cellulaire est très peu endommagé, alors que la réactivation du MDV entraîne une augmentation des dommages à l'ADN. Bien que nos résultats ne nous aient pas permis de conclure clairement quant aux voies de DDR mises en place suite à l'apparition de ces dommages, nous avons malgré montré que les lésions occasionnées et/ou la DDR seraient favorables à la réplication du virus et à sa réactivation. Enfin, un résultat majeur de mon projet a été de mettre en évidence l'étroite corrélation existant entre la capacité du MDV à générer des dommages dans l'ADN des lymphocytes et son pouvoir oncogène. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de la rédaction d'un article qui a été soumis en novembre 2015 à Scientific Reports et qui est encore actuellement en révision. De plus, j'ai pu présenter ces résultats lors de la journée scientifique du réseau HerPAS (Lyon, 2015).

Afin de finaliser ce projet, il conviendra de réitérer les infections expérimentations réalisées *in vitro* visant à identifier les voies de DDR susceptibles de faciliter ou d'inhiber la réplication du MDV. Nos résultats bien que préliminaires semblaient montrer que les voies ATM et ATR (notamment pChk1) auraient des rôles antagonistes sur la réplication du MDV. Aussi, afin de préciser quelles protéines des voies ATM/ATR sont impliquées dans le cycle

viral du MDV, une approche menée à l'aide de siRNA ciblant spécifiquement ces facteurs pourrait être envisagée.

Par ailleurs, il serait intéressant de déterminer si les dommages à l'ADN peuvent participer directement ou indirectement à l'établissement de la latence virale et plus particulièrement à l'intégration du génome MDV, évènement prérequis à la tumorigenèse viro-induite. Dans ce contexte, il serait judicieux de caractériser les systèmes de réparations de l'ADN activées en réponse aux lésions causées par le MDV, notamment les voies NHEJ et HR. Il a en effet été suggéré que la RH pourrait être à l'origine de l'intégration du MDV (sans que cette hypothèse n'ait été clairement vérifiée). Le système NHEJ pouvant s'avérer très mutagène, il n'est pas exclu que ce système de réparation puisse également générer de l'instabilité génétique et ainsi participer aux processus de transformation cellulaire.

Enfin, l'utilisation de virus MDV non-oncogènes tels que les souches vaccinales CVI-988 et l'herpèsvirus de la dinde HVT, pourrait être envisagée dans le but de confirmer la corrélation établie entre l'apparition des dommages à l'ADN et la lymphomagenèse.

Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Les cellules

1.1.1. Lignée MDCC-3867(K)

La lignée MDCC-3867(K) a été établie à partir d'un lymphome rénal induit après infection expérimentale d'un poulet avec le virus recombinant hautement pathogène vRB-1B 47EGFP codant pour le gène *UL47* fusionné à l'EGFP (Denesvre *et al.*, 2015). Cette lignée de lymphocytes T transformés par le MDV a été cultivée en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 (Lonza) contenant 4,5 g/l de glucose et additionné de 2 mM de L-Glutamine (Glut), 1% de purvate, 1% d'acides aminés non essentiels (Lonza), 10% de TBP (Bouillon Tryptose Phosphate) (Sigma) et 10% de SVF (sérum de veau fœtale, Gibco). Les cellules ont été incubées à 41°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂.

1.1.2. Cellules embryonnaires de peau de poulet (CESC)

Les cellules primaires embryonnaires de peau de poulet (CESC) sont un mélange de plusieurs types cellulaires dont la majorité sont de type fibroblastique et myoblastique. Elles ont été obtenues à partir d'embryons de poulets de race Leghorn Dorés (LD1) de 12 jours issus d'un élevage EOPS (certifiés Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques). La technique de préparation de ces cellules a été mise au point au laboratoire et décrite par Dorange *et al* (Dorange *et al.*, 2000). Les embryons de poulets ont été extraits stérilement de leur coquille (Figure 56A), puis rincés 2 fois avec du PBS 1X, 0,5% EDTA (acide éthylènediamine tétra-acétique, 11280, Serva), 4 fois avec du HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Invitrogen, Gibco) et 2 fois avec le milieu William's E (Lonza) complémenté de 2 mM de Glut (Lonza) (Figure 56B). Afin de dissocier les tissus, les embryons ont été immergés dans une solution de collagénase A (Roche) diluée à une concentration de 0,2 mg/ml en William's E, pendant 20 minutes sous agitation à 41°C dans une atmosphère humide en présence de 5% de CO₂ (Figure 56C). Le surnageant obtenu a été filtré sur gaze stérile puis sur un filtre de 100 µm (BD Falcon) (Figure 56D). Le filtrat a été ensuite centrifugé pendant 7 min à 200 x g (Figure 56E) et le culot cellulaire est repris dans 30 ml de William's E complémenté avec 2 mM Glut, 2% SVF et 3% SP (sérum de poulet, Gibco). Les cellules ont été alors réparties dans des boîtes de culture prétraitées avec du PBS 1X, 0,15% gélatine (Merck). Du fait de la présence d'érythrocytes dans la suspension cellulaire, il était

difficile de compter les CESC. Par conséquent, les cellules obtenues à partir d'un embryon ont été généralement réparties dans 2 boîtes de culture de 10 cm de diamètre ou dans 2 plaques de culture de 6 ou 24 puits. Les cellules ont été alors incubées à 41°C en atmosphère humide à 5% de CO₂ (Figure 56F). Trois heures après la mise en culture, les tapis cellulaires ont été rincés 1 à 2 fois avec du milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Lonza) afin d'éliminer les érythrocytes (Figure 56F à 56H). Les cellules ont été ensuite cultivées dans du milieu William's E, 2 mM Glut, 2% SVF et 3% SP à 41°C, en atmosphère humide à 5% de CO₂. Pour éviter la fusion des myoblastes, 5 mM de HMBA (N,N'-Hexamethylene bisacetamide, Sigma) ont été ajoutés dans le milieu de culture 24h après ensemencement des cellules.

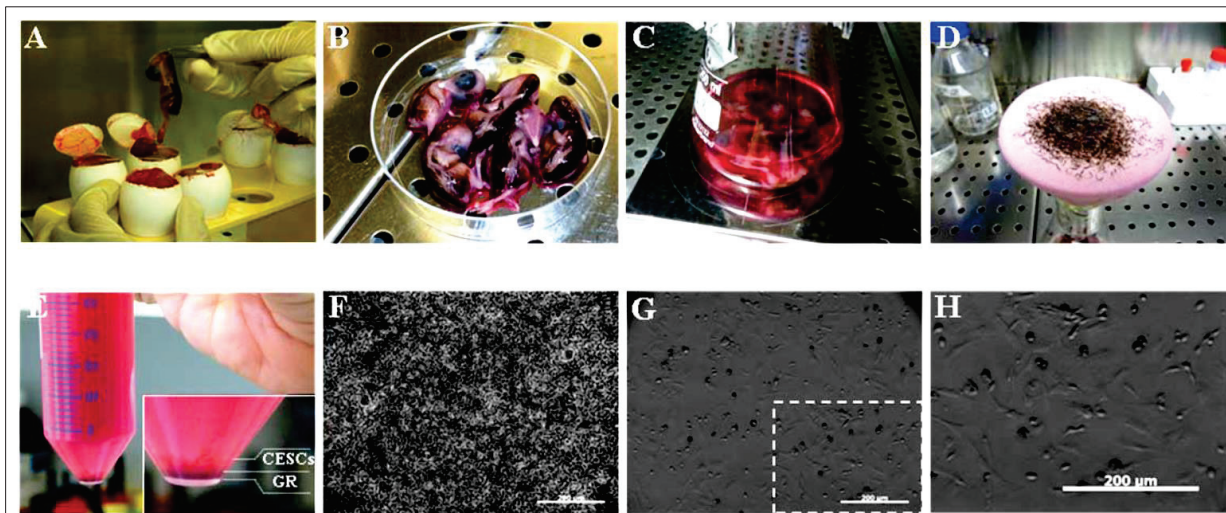


Figure 56. Préparation des cellules embryonnaires de peau de poulet (CESC).

(A) Extraction stérile des embryons de poulets LD1 de leur coquille. (B) rinçage des embryons. (C) Incubation sous agitation modérée en présence de collagénage A. (D) Filtration du surnageant de la collagénation. (E) Culot cellulaire contenant les CESC au niveau de la phase supérieure et les érythrocytes à sa base (GR). (F) Elimination par rinçage des érythrocytes présents dans le milieu de culture à 3 h post ensemencement. (G) Adhésion des CESC au support. (H) Agrandissement x2 de la photographie des CESC en G. Modifié d'après la thèse de N. Richerieux (Richerieux, 2012).

1.2. Les virus

1.2.1. vRB-1B

Le virus vRB-1B a été amplifié à partir du BAC pRB-1B contenant le génome complet de la souche MDV très virulente (vv) RB-1B cloné dans un chromosome bactérien artificiel (BAC). Ce virus nous a généreusement été fourni par N. Osterreider (Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Allemagne) (Jarosinski *et al.*, 2007).

1.2.2. recEGFPVP22

Ce virus recombinant a été dérivé du Bac20 comportant le génome de la souche atténuée (avirulente) 584Ap80C cloné dans un BAC. Le virus recEGFPVP22 a été obtenu en remplaçant le gène *UL49* codant la protéine VP22 par un gène *UL49* fusionné au gène codant l'*EGFP* en position 5' par la technique de mutagenèse « en passant » (Blondeau *et al.*, 2008).

1.2.3. vRB-1B EGFP22 et vRB-1B 22EGFP

Les virus vRB-1B EGFP22 et vRB-1B 22EGFP ont été dérivés du BAC pRB-1B dans lequel le gène *UL49* a été remplacé par la méthode de mutagenèse « en passant », par un gène *UL49* fusionné à l'extrémité 5' ou 3' avec l'*EGFP*. Le pRB-1B EGFP22 a été obtenu dans notre laboratoire et le pRB-1B 22EGFP nous a été aimablement fourni par B. Kaufer (Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Allemagne) (Jarosinski *et al.*, 2012; Remy *et al.*, 2013). Afin de simplifier la lecture de ce manuscrit, les virus vRB-1B EGFP22 et vRB-1B 22EGFP ont été respectivement renommés vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm.

La reconstitution des virus à partir de l'ADN des différents BAC a été réalisée comme décrit par Blondeau *et al.*, 2008 (Blondeau *et al.*, 2008). L'ADN des BAC a été amplifié en bactéries et purifié, avant d'être électroporé par nucléofection (Nucleofector II, Amaxa) dans des cellules CESC à confluence. Les virus ont été ensuite propagés par co-culture de CESC fraîchement préparées avec 10^4 PFU de cellules infectées.

1.3. Les amorces utilisées

Les couples d'amorces spécifiques sens (S) et antisens (AS) des gènes de ménages cellulaires *iNOS* et *GAPDH* et du gène virale *ICP4* utilisés en qPCR et/ou en qRT-PCR sont référencés ci-dessous dans le tableau 6.

Tableau 6 : Séquences d'oligonucléotides utilisés en qPCR ou qRT-PCR.

Amorces (Eurogentec)	Séquences (5' → 3')
iNOS (S)	GAGTGGTTTAACGAGTTGGATCTGA
iNOS (AS)	TTCCAGACCTCCCACCTCAA
ICP4 (S)	TTTCTAGCAAGGAGCGACGC
ICP4 (AS)	CTGACTTGCCTTACGGGAA
GAPDH (S)	TGATGATATCAAGAGGGTAGTGAAG
GAPDH (AS)	TTGGATGCCATGTGGACCAT

1.4. Les sondes utilisées

Les sondes spécifiques des gènes *iNOS* et *ICP4* utilisées pour réaliser des qPCR sont mentionnées dans le tableau 7. Ces sondes sont couplées aux fluorochrome FAM (6-carboxyfluorescéine).

Tableau 7 : Sondes utilisées en qPCR

Sondes (Eurogentec)	Séquences (5' → 3')
iNOS	CTGTGCCTGTTGCCAACATGC
ICP4	TCGCCCAGTCTAGTACCCCTTCTGATATTGGTG

1.5. Les anticorps

1.5.1. Les anticorps primaires

Les anticorps primaires listés dans le tableau 8 ont été utilisés pour détecter la présence des différentes protéines des voies de DDR par immunofluorescence (IF) ou par Western blot (WB).

Tableau 8 : Anticorps primaires ciblant les protéines de DDR utilisés en WB ou en IF.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Isotype	Classe	Poids moléculaire attendu (kDa)	Dilution en WB	Dilution en IF
Actine	Sigma	A4700	IgG souris	Monoclonal	42	1/500	1/500
γ H2AX	Millipore	05-636	IgG souris	Monoclonal	15	1/500	1/500
Mre11	Abcam	190179	IgG lapin	Polyclonal	80	1/1000	1/1000
pChk2	Cell signaling	2197	IgG lapin	Monoclonal	62	1/500	1/250
pATM	Cell signaling	5883P	IgG lapin	Monoclonal	350	1/1000	1/100
pChk1	Cell signaling	2348	IgG lapin	Monoclonal	56	1/500	1/50
pATR	Santa Cruz	109012	IgG lapin	Polyclonal	250	1/100	1/250

1.5.2. Les anticorps secondaires

Les anticorps secondaires référencés dans le tableau 9 ont été utilisés en Western blot (WB) ou en immuno-fluorescence (IF) aux dilutions indiquées.

Tableau 9 : Anticorps secondaires utilisés en WB ou en IF

Anticorps	Fournisseur	Référence	Isotype	Spécificité	Classe	Finalité	Dilution
Alexa Fluor ® 594 GAM	Invitrogen	A11005	IgG chèvre	souris	Polyclonal	IF	1/1000
Alexa Fluor ® 594 GAR		A11012	IgG chèvre	lapin	Polyclonal		1/4000
Anti-IgG souris couplé à la peroxydase	Sigma	A0545	IgG chèvre	souris	Polyclonal	WB	1/10000
Anti-IgG lapin couplé à la peroxydase		A4416	IgG chèvre	lapin	Polyclonal		1/10000

1.6. Les agents pharmacologiques

Les différents traitements chimiques utilisés pour induire des CDBs ou inhiber les voies de DDR sont listés dans le tableau 10.

Tableau 10 : agents pharmalogiques utilisés dans cette étude.

Drogues	Action	Milieu de préparation	Fournisseur	Références
Caféine	Inhibition des voies ATM et ATR	RPMI1640	Sigma	C0750-5G
Inhibiteur de Chk2	Inhibition de Chk2	DMSO	Sigma	C3742-5MG
Wortmanine	Inhibition des voies ATM et DNA-PK	DMSO	Jena Biosciences	INH-001
Ly-294002	Inhibition de la voie DNA-PK	DMSO	Jena Biosciences	INH-002
Camptothecine	Inhibiteur de Topoisomérase I	DMSO	Selleck chemicals	S1288-100MG
PF4777736	Inhibition de Chk1	DMSO	Sigma	PZ0186-5MG
Etoposide	Inducteur de CDBs (Inhibiteur de la Topoisomérase II)	DMSO	Sigma	E1383-25MG

2. Méthodes

2.1 Techniques de biologie moléculaire

2.1.1. Extraction d'ADN

Des extractions d'ADN ont été réalisées à partir de cultures de CESC (10^6 cellules), de PBMCs purifiés à partir du sang d'animaux (10^6 cellules) et de sang total préalablement dilué au 6^e dans du PBS 1X. L'ADN a été extrait à l'aide du kit QIAamp DNA mini kit selon les instructions du fabricant (Qiagen). Les cellules ont été lysées sous l'action d'un mélange de 200 µl de tampon AL et 20 µl de protéinase K à 56°C pendant 10 min (CESCs et sang total) ou pendant 2h (PBMCs). Après ajout de 200 µl d'éthanol aux lysats cellulaire, l'ADN est purifié sur une colonne de silice. L'élimination des contaminants est effectuée par 2 rinçages avec les tampons AW1 et AW2, puis l'ADN est élué avec 100 µl d'eau ultrapure. L'ADN extrait est ensuite quantifié avec un spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) avant d'être stocké à -20°C.

2.1.2. Quantification de la charge virale par PCR quantitative en temps réel (Taqman)

Le nombre de copies du génome de MDV dans les cellules infectées a été quantifié par PCR quantitative (qPCR) en utilisant la technologie Taqman. Le principe de cette technique repose sur l'activité 5'-exonucléase de la Taq polymérase qui est capable d'hydrolyser une sonde hybridée à la séquence cible durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR. Un fluorochrome émetteur (rapporteur FAM) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher BHQ-1) présent à l'extrémité 3'. Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. Lorsque la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce, elle va rencontrer sur son passage la sonde hybridée qu'elle hydrolyse grâce à son activité 5'-exonucléase. Le rapporteur est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (Figure 57).

La réaction de PCR en temps réel a été effectuée dans un volume final de 20 µl qui comprenait 950 ng d'ADN extrait à partir de sang total (expérience *in vivo* n°1) ou 250 ng d'ADN extrait de CESC ou de PBMC (expérience *in vivo* n°2), 10 µl de 2xABsolute Bleu

qPCR Mix (ABgene, Thermo Fischer), 0,9 μM de chacune des amorces spécifiques des gènes *ICP4* et *iNOS* (Tableau 6) et 0,25 μM de sondes *ICP4* et *iNOS* (Tableau 7). Nous avons utilisé une méthode de quantification absolue à l'aide d'une gamme de dilution des plasmides standards contenant la séquence des gènes *ICP4* et *iNOS*. Cette gamme permet d'obtenir une courbe standard utilisée pour la quantification du nombre de copies des gènes d'intérêt. Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel le logiciel CFX Manager 3TM software 3.0 (Biorad). La PCR est réalisée dans un thermocycleur C1000 TouchTM (Bio-Rad) équipé du système de détection PCR CFX96TM Real Time System. La réaction débute par une étape d'activation enzymatique de 5 min à 95°C, suivie par 39 cycles composés chacun d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 15s et d'une étape d'appariement/élongation/acquisition à 60°C pendant 30s. Le nombre de copies du gène viral *ICP4* a été normalisée à 10⁶ copies du gène cellulaire de référence *iNOS*. Chaque réaction de qPCR a été réalisée en triplicat. La charge virale des différents groupes de poulets infectés a été comparée par le test de Mann Whitney, $p < 0,05$.

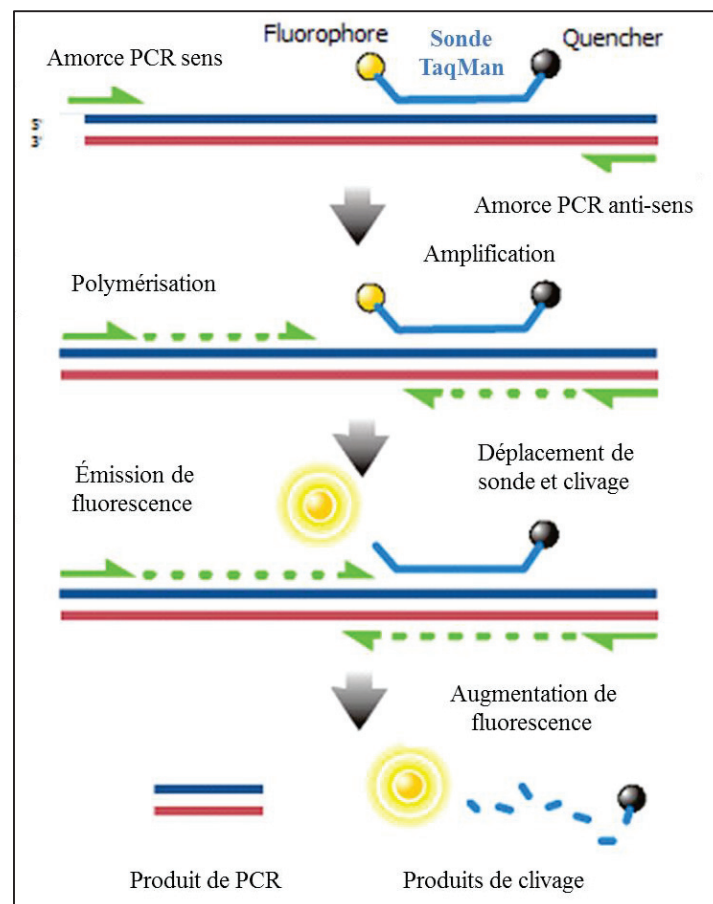


Figure 57. Principe de la technologie TaqMan.

2.1.3. Extraction d'ARN

L'ARN des cellules 3867(K) a été extrait à partir de 10^6 cellules en utilisant le kit RNeasy® mini kit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les cellules 3867(K) ont été centrifugées 7 min à $300 \times g$ et les cellules ont été lysées dans 300 μ l de tampon RLT contenant 1% de β -Mercapto-éthanol. Le lysat cellulaire a été mélangé avec 350 μ l d'éthanol 70% avant de purifier l'ARN sur colonne de silice. Les contaminants protéiques et ADN ont été éliminés par un lavage de la colonne avec le tampon RW1 et 2 lavages successifs avec le tampon RPE. L'ARN a été ensuite élué avec 40 μ l d'eau ultrapure. La quantité et la pureté des ARN totaux extraits ont été estimées par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo Scientific).

Afin d'éliminer les contaminations résiduelles par de l'ADN génomique, les ARN extraits ont subi un traitement par la DNase I. Un microgramme d'ARN a été incubé avec 1 μ l de RQ1 DNase (Promega), 1 μ l de son tampon (10X, Promega) et 1 μ l d'inhibiteur de RNase (RNasin, Promega) dans un volume final de 10 μ l. Le mélange réactionnel a été incubé 1 heure à 37°C, puis l'enzyme a été inactivée à 65°C pendant 10 min. L'ARN a été conservé à -80°C.

2.1.4. Transcription inverse

Les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés à partir d'un microgramme d'ARN (préalablement traité à la DNase) dans un volume final de 20 μ l. L'ARN total a été dénaturé à 65°C pendant 10 min en présence d'1 μ l d'amorce oligo dT (500 μ g/ml). Un mélange réactionnel composé de 200 μ M de chaque dNTP (désoxyribonucléotides triphosphates), 50 mM de Tris-HCl pH8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$, 10 mM de DTT et 200 unités de M-MLV reverse transcriptase (Promega) a été ajouté aux ARN. La synthèse des ADNc a été alors réalisée à 37°C pendant 2h, puis l'enzyme a été inactivée par incubation à 85°C pendant 5 minutes. Les ADNc résultants ont été alors quantifiés au Nanodrop, puis dilués à une concentration de 100 ng/ μ l avant d'être conservé à -20°C.

2.1.5. Quantification de l'expression de *ICP4* par qRT-PCR en temps réel

La réaction a été effectuée en présence de SYBR Green, un fluorochrome se liant à l'ADN double brin néo-synthétisé. Au cours de la réaction de PCR la fluorescence augmente avec la quantité des amplicons et est mesurée à chaque cycle (Figure 58). L'amplification de

l'ADNc par qPCR a été réalisée à partir de 250 ng d'ADNc dans un volume final de 15 μ l. Le mélange réactionnel contenait 7,5 μ l de 2 $\times$ iQ Supermix SYBR Green (Bio-Rad) et 0,75 μ l de chaque amorce spécifique du gène viral *ICP4* (10 μ M) ou du gène cellulaire glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase de poulet, *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Tableau 6). La PCR a été effectuée dans le thermocycler C1000 Touch™ CFX96™ Real Time System (Bio-Rad). Une étape d'activation de l'enzyme de 5 min à 95°C, suivie par 39 cycles d'amplification (15s à 95°C et 30s à 60°C) ont été réalisés. Les résultats ont été analysés en utilisant le logiciel CFX Manager 3™ software 3.0 (Biorad). Après chaque réaction, une courbe de fusion a été établie afin de vérifier que le produit d'amplification est unique (une seule T° de fusion, à laquelle la fluorescence chute). L'expression du gène *GAPDH* a été utilisée comme référence pour la normalisation du niveau d'expression des ARNm du gène *ICP4* afin de permettre des comparaisons croisées entre les échantillons. Les changements relatifs dans l'expression du gène ont été déterminés par la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$. La comparaison du niveau d'expression du gène *ICP4* a été réalisée par un test Mann Whitney, $p < 0,05$.

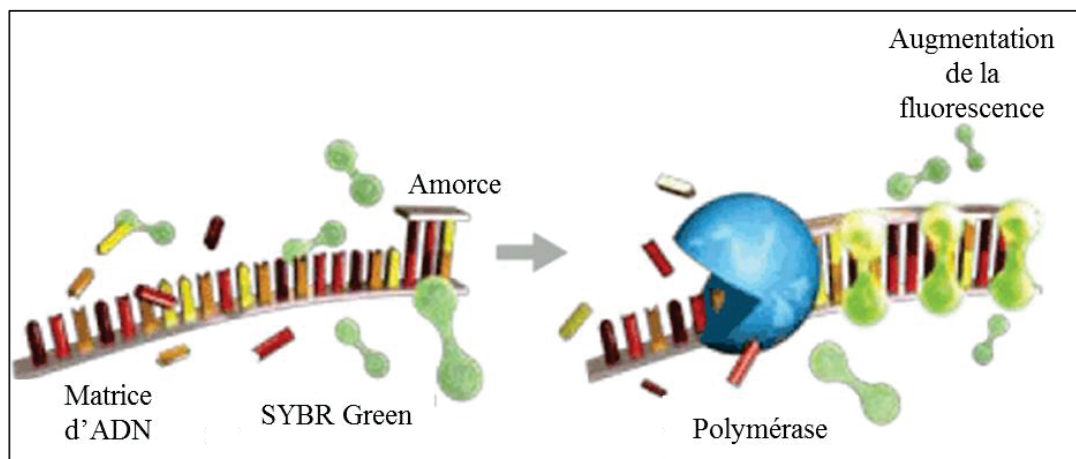


Figure 58. Principe de la technologie SYBR Green.

2.2. Techniques de biochimie

2.2.1. Détection des ROS

La production de ROS a été analysée à partir de 80 µl du surnageant de culture des CESC non-infectées et infectées par le virus recombinant recEGFPVP22 à 24h, 48h, 72h et 96h pi en utilisant le kit ROS-GloTM H₂O₂ (Promega). Le principe de ce test repose sur la mesure du niveau de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit par les cellules. Un substrat de l'H₂O₂ (20 µl) est ajouté au surnageant de culture et forme, en réagissant avec l'H₂O₂, un précurseur de la luciférine. Après 3 h d'incubation à 41°C (température de culture des cellules aviaires), la solution de détection ROS-GloTM (100 µl) contenant la luciférase recombinante Ultra-GloTM et la D-cystéine est ajoutée au mélange réactionnel. La D-cystéine convertit le précurseur la luciférine en luciférine qui va réagir avec l'Ultra-GloTM luciférase afin de générer un signal lumineux proportionnel à la concentration de l'H₂O₂ (Figure 59). La luminescence émise a été détectée après 20 min d'incubation à température ambiante (TA) à l'aide du luminomètre Glomax[®] multidétection (Promega). Les résultats sont représentés comme des unités lumineuses relatives (ULR). Les analyses ont été effectuées en triplicat à chaque temps de prélèvement. Les résultats obtenus à partir des cellules infectées ont été relativisés par rapport à ceux obtenus pour les cellules non-infectées et exprimés sous forme de moyennes (± écart type).

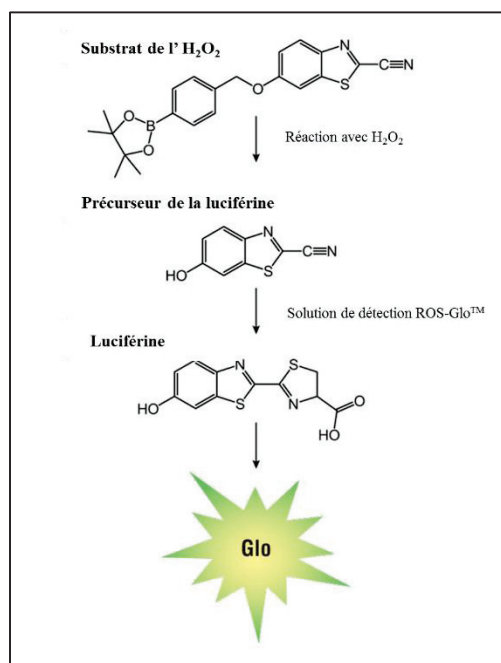


Figure 59. Principe du test ROS-GLOTM

2.2.2. Le Western blot

2.2.2.1. Préparation des extraits protéiques

Les cellules ont été lysées dans 200 µl de tampon Laemmli 2X (0,125 M Tris HCl, 4% SDS, 20% de glycérol, 10% β-Mercapto-éthanol, 0,004% de bleu de bromophénol, pH 6,8). Les lysats ont été ensuite soumis à sonication à une amplitude de 30 Hertz pendant 1min et dénaturés 5 min à 100°C.

2.2.2.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS en condition dénaturante

Les gels de polyacrylamide ont été préparés à une résolution de 10% selon la composition décrite ci-dessous (Tableau 11).

Tableau 11 : Composition chimique des gels de polyacrylamide SDS-PAGE

Gels	Gel de concentration	Gel de résolution
	4%	10%
Acrylamide 40%	250µl	2,5ml
⁽¹⁾ Tampon Upper Tris 4X	630µl	
⁽²⁾ Tampon Lower Tris 4X		2,5ml
H ₂ O	1,60ml	4,96ml
Sulfate d'ammonium	12,5µl	50µl
Temed	5µl	10µl

¹ Tampon Upper Tris 4X : 6,05% de Tris ; 0,4% de SDS ; pH 6,8.

² Tampon Lower Tris 4X : 36,4% de Tris ; 0,8% de SDS ; pH 8,8.

Les extraits protéiques (20 µl) et 5 µl de marqueur de poids moléculaire Fermentas-PageRuler™ Protein Ladder (10-250 kDa) ont été déposés dans les puits du gel. L'électrophorèse a été effectuée dans du tampon Tris-Glycine 1X contenant 0,1% de SDS sous une tension de 80 V pendant 40 min afin de focaliser les protéines, puis 120 V pendant environ 20 min afin de procéder à la séparation des protéines.

2.2.2.3. Transfert semi-liquide sur membrane de nitrocellulose

Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 μm (Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack, Biorad) selon les recommandations du fournisseur. Le transfert a été effectué pendant 7 min sous ampérage constant 0,7 mA/cm² à l'aide du système de transfert Trans-Blot® Turbo™ (Biorad).

2.2.2.4. Détection des protéines d'intérêt

La membrane de nitrocellulose a été incubée pendant 30 min à TA dans une solution de saturation TBS (Tris Buffered Saline) à pH 7,5 ; 0,1% de Tween 20 et 5% de lait. La membrane a été, ensuite, incubée pendant 16h à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires (Tableau 8) dilués dans une solution de TBS-0,1% Tween 20 contenant 1% de lait. Après 3 lavages de 5 min en TBS-0,1% Tween 20, la membrane a été incubée en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Tableau 9) pendant 1h à TA sous agitation. L'activité peroxydase a été ensuite révélée à l'aide du substrat ECL2 Western Blotting (Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant. La chimioluminescence émise a été détectée avec le système Fusion FX-7 (Vilber-Lourmat).

2.3 Techniques de biologie cellulaire et d'imagerie

2.3.1. Infection des CESC

Le virus MDV est un virus associé aux cellules, aucune particule virale n'étant détectable dans le surnageant de culture. Par conséquent, l'infection des CESC a été réalisée par co-culture avec des cellules infectées par le MDV. Classiquement, les CESC (7x10⁶) cultivées à confluence dans une boîte de culture de 10 cm de diamètre ont été infectées par 10⁴ PFU de virus MDV. Après 1h d'incubation à 41°C, l'inoculum a été éliminé et les CESC ont été incubées pendant 24, 48, 72 et/ou 96h (selon l'expérience considérée) dans du milieu William's E (Lonza) contenant 2 mM Glut, 1% de SVF et 1,5% de SP.

2.3.2. Induction de CDBs par traitement Etoposide

Afin d'induire des dommages à l'ADN de type CDBs dans les cellules et d'étudier leur impact sur l'infection MDV, 10⁶ cellules CESC ont été infectées par le virus MDV recombinant rec22EGFP et 6h pi, 0,033 μM , 0,066 μM et 0,132 μM d'ETP ont été ajoutés au milieu de culture. Parallèlement, des cellules témoins ont été traitées par du DMSO (milieu de

solubilisation de l'ETP) ajouté avec des volumes équivalents à ceux utilisés lors des traitements par l'ETP. A 48 hpi, un renouvellement du milieu de culture contenant de l'ETP (ou du DMSO) aux différentes concentrations indiquées ci-dessus a été effectué. Les cellules ont alors été à nouveau incubées à 41°C pendant 24 ou 48 hpi.

Le traitement des cellules 3867(K) par l'ETP (et le DMSO) a été réalisé en milieu RPMI-1640 complet (4,5 g/l de glucose, 2 mM de Glut, 1% de purvate, 1% d'acides aminés non essentiels, 10% de TBP et 10% de SVF) additionné de 0,004 μ M, 0,02 μ M, 0,1 μ M et 0,5 μ M d'ETP (ou d'un volume similaire de DMSO). Les cellules ont été incubées pendant 48h à 41°C.

2.3.3. Inhibition des voies de DDR

Dans le but d'inhiber sélectivement la signalisation DDR, différents inhibiteurs des voies de DDR ont été utilisées (Tableau 10). Les CESC_s infectées par le virus MDV recombinant rec22EGFP ont été traitées 6 hpi par ajout des inhibiteurs dans le milieu de culture aux concentrations indiquées ci-dessous (Tableau 12). Un témoin négatif du traitement, consistant en des cellules infectées traitées avec du DMSO, ont été cultivées en parallèle dans les mêmes conditions. Les cellules ont été incubées pendant 96h à 41°C.

Les cellules 3867(K) ont été directement cultivées en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs pendant 48h.

Tableau 12 : Concentrations utilisées lors des traitements des cellules par les inhibiteurs des voies de DDRs.

La drogue	Concentration 1	Concentration 2	Concentration 3
Caféine	1mM	2mM	4mM
Inhibiteur de Chk2	100nM	200nM	1 μ M
Wortmanine	2,5 μ M	5 μ M	10 μ M
Ly-294002	500nM	1 μ M	2 μ M
Camptothecine	1mM	10mM	50mM
PF4777736	150nM	300nM	500nM

2.3.4. Mesure de la taille des plages d'infection

Afin de tester l'impact de l'induction de CDBs (par traitement ETP) sur la réplication/dissémination du MDV, la taille des plages d'infection a été déterminée à partir de CESC infectées avec le virus rec22EGFP (exprimant la protéine VP22 fusionnée à l'EGFP). À 48 hpi, les CESC ont été fixées avec du paraformaldéhyde (PAF) 4% pendant 20 min à TA. Après 3 rinçages avec du PBS 1X, les plages de lyse ont été détectées directement sur la base de l'expression de la GFP dans les cellules infectées à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence Axiovert 200 M équipé d'un objectif PlanApochromat/DIC x5 (Zeiss). La mesure de l'aire de 50 à 100 plages a été effectuée grâce au logiciel Axiovision Light Edition version 4.8 (Zeiss). Les 50 plus grandes plages d'infection de chaque condition ont été retenues pour les tests statistiques et le calcul de la moyenne, afin d'éliminer les éventuelles plages secondaires. Les moyennes ont été comparées par le test statistique Mann Whitney, $p < 0,05$.

2.3.5. Cytométrie en flux

2.3.5.1. Tri cellulaire

Les cellules CESC infectées par les virus MDV recombinants et les cellules 3867(K) dans lesquelles le virus réactive ont été triées par cytométrie sur la base de l'expression des protéines VP22 et UL47 fusionnées à l'EGFP, respectivement. Les CESC infectées ont été triées 4 jours pi et le tri des cellules 3867(K) a été effectué 48h après leur mise en culture. Il faut noter que les CESC non-infectées (contrôle négatif) ont également été triées sur la base de leur morphologie afin d'éliminer les cellules endommagées et les débris cellulaires, et de s'affranchir d'un éventuel biais expérimental lié au tri cellulaire, notamment dans le cadre de l'étude des dommages à l'ADN.

Avant de procéder au tri cellulaire, les cellules ont été lavées 2 fois en PBS 1X, puis filtrées successivement sur des filtres de 100 μm (BD Falcon) et de 40 μm (BD Falcon) afin d'éliminer les agrégats cellulaires. Les cellules GFP positives et négatives ont alors été triées à l'aide d'un cytomètre à haut débit MoFlo (Beckman Coulter) équipé d'un laser fonctionnant à 488 nm et 100 mW. La vitesse de tri était d'environ 15000 cellules/s et les cellules ont été recueillies dans les milieux appropriés complémentés avec 10% de SVF avant d'être utilisées dans les différentes expériences.

2.3.5.2. Analyse de l'expression de l'EGFP et de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux

L'effet des traitements inducteur de CDBs et inhibiteurs des voies de DDR sur la réplication du MDV (CESC) et la réactivation virale (cellules 3867(K)) a été évalué en déterminant le pourcentage de cellules infectées (vivantes) exprimant les protéines virales étiquetées EGFP par cytométrie en flux.

Les cellules ayant subi les différents traitements ont été collectées aux temps appropriés. Afin d'analyser la fluorescence EGFP spécifiquement dans les cellules vivantes, les cellules ont été marquées soit par 0,01 mg/ml d'iodure de propidium (IP) (Invitrogen), soit par le marqueur de viabilité colorant eFluor® 780 (eBioscience) dilué au 1/1000^e en PBS 1X. Les marquages ont été effectués pendant 15 min sur glace à l'obscurité. Les cellules marquées eFluor® 780 ont été ensuite lavées deux fois dans de l'isoflow (Beckman Coulter) avant d'être fixées en PAF 1%. La viabilité cellulaire a été analysée avec un filtre à bande passante 780/40 nm et la fluorescence EGFP a été analysée par cytométrie avec un filtre 530/40 nm. Les analyses effectuées sur la population GFP +/- eFluor- ou IP-, nous ont permis d'établir le pourcentage de cellules vivantes infectées pour chaque condition testée. Le nombre de cellules GFP+ a été comparé en utilisant le test de Mann Whitney, $p < 0,05$

2.3.6. Détection des protéines impliquées dans la DDR par immunofluorescence

A 96 hpi, les CESC infectées par le virus MDV recombinant recEGFPVP22 ont été trypsinées et ré-ensemencées à basse densité sur des lamelles de verre pendant 8h. Les cellules ont été fixées par du PAF 4% pendant 20 min à TA, puis perméabilisées avec du PBS 1X contenant 0,5% de triton X-100 pendant 5 min. Elles ont ensuite été incubées pendant 20 min dans un tampon de blocage contenant du PBS 1X, 0,1% de triton X-100 et 2% de BSA, la BSA permettant d'éviter la fixation non-spécifique des anticorps primaires et secondaires. Le marquage des cellules a été effectué avec les différents anticorps primaires dilués à la concentration appropriée en tampon de blocage (Tableau 8). Après 1h d'incubation à TA, les cellules ont été rincées 3 fois en PBS 1X, 0,1% de triton X-100. Les anticorps secondaires dilués (en tampon de blocage) comme indiqué dans le tableau 9 ont alors été incubés avec les cellules pendant 1h. Trois lavages en PBS 1X, 0,1% de triton X-100 ont été effectués avant de procéder au marquage des noyaux cellulaires à l'aide d'une solution de Hoechst 33342 (Molecular Probe) diluée au 1/2000^{ème} en PBS 1X, pendant 1 min. Les

lamelles sont ensuite lavées 3 fois en PBS 1X, puis montées sur des lames de microscopie à l'aide de milieu de montage (Vectashield, Vector Laboratories). Les cellules sont observées avec un microscope inversé à épifluorescence Axiovert 200 M équipé d'un objectif PlanApochromat/DIC x63 et d'un système d'imagerie Apotome (Zeiss). Les images ont été acquises avec une caméra CCD Axioacam MRm (Zeiss) en utilisant le logiciel d'Axiovision.

2.4. Expérimentations animales

2.4.1. Protocole

Deux expériences *in vivo* ont été réalisées au cours de ce projet de thèse. La 1^{ère} expérience (Figure 60) comportait 2 lots de poulets : un 1^{er} lot de 10 animaux non-infectés (lot contrôle) et un 2nd lot de 13 animaux qui ont été infectés par le virus vRB-1B. La 2^{ème} expérience (Figure 61) était composée de 4 lots de poulets : un lot non-infecté (10 poulets), un lot infecté par le virus vRB-1B (6 poulets) et 2 lots contenant chacun 12 et 13 poulets inoculés respectivement avec les virus vRB-1B Nterm ou vRB-1B Cterm. Les 2 expérimentations ont été menées sur des poulets SPF (Specific Pathogen Free) de race "white Leghorn" (haplotype B13/B13) âgés de 3,5 semaines. Les animaux ont été inoculés par voie intramusculaire (muscles pectoraux) avec 10^3 PFU du virus vRB-1B (expérience 1) ou $1,5 \cdot 10^3$ PFU des virus vRB-1B, vRB-1B Nterm ou vRB-1B Cterm (expérience 2). Afin de s'assurer que les doses de virus administrées aux poulets soient identiques, les inocula utilisés pour les 2 virus vRB-1B Nterm et vRB-1B Cterm étaient constitués exclusivement de cellules CESC infectées (GFP+), triées préalablement par cytométrie. Chaque animal a subi des prélèvements de sang (1 ml) sur 3% de citrate de sodium à 0, 7, 14, 21, 28 et 35 jours pi dans le cadre de l'expérience 1 et à 0, 7, 14, 21, 28, 36, 42 et 49 jours pi lors de l'expérience 2. Ces prélèvements ont par la suite permis de déterminer la charge virale sur sang total (expérience 1) et/ou d'isoler les PBMCs utilisés dans les essais comètes (expérience 1 et 2) et la détermination de la charge virale (expérience 2). Afin de réaliser une numération sanguine chez les animaux infectés et non-infectés, des prélèvements de sang ont été réalisés au cours de l'expérimentation 2 (à J7, 14, 21, 36 et 49 pi) dans des tubes prétraités à l'EDTA (Microvette®, Sarstedt).

A la fin des expérimentations (à J35 pi pour l'expérience 1 et J69 pi pour l'expérience 2), les poulets n'ayant pas succombé à la MD ont été euthanasiés et autopsiés afin de rechercher des lésions MD et d'établir le pourcentage précis des poulets ayant développé des tumeurs (incidence tumorale). Toutes les procédures expérimentales ont été menées en

conformité avec les règles du respect de l'animal et avec l'approbation du comité d'éthique local ("Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale de Val de Loire", CEEA VdL, numéro de protocole 03/09/2012).

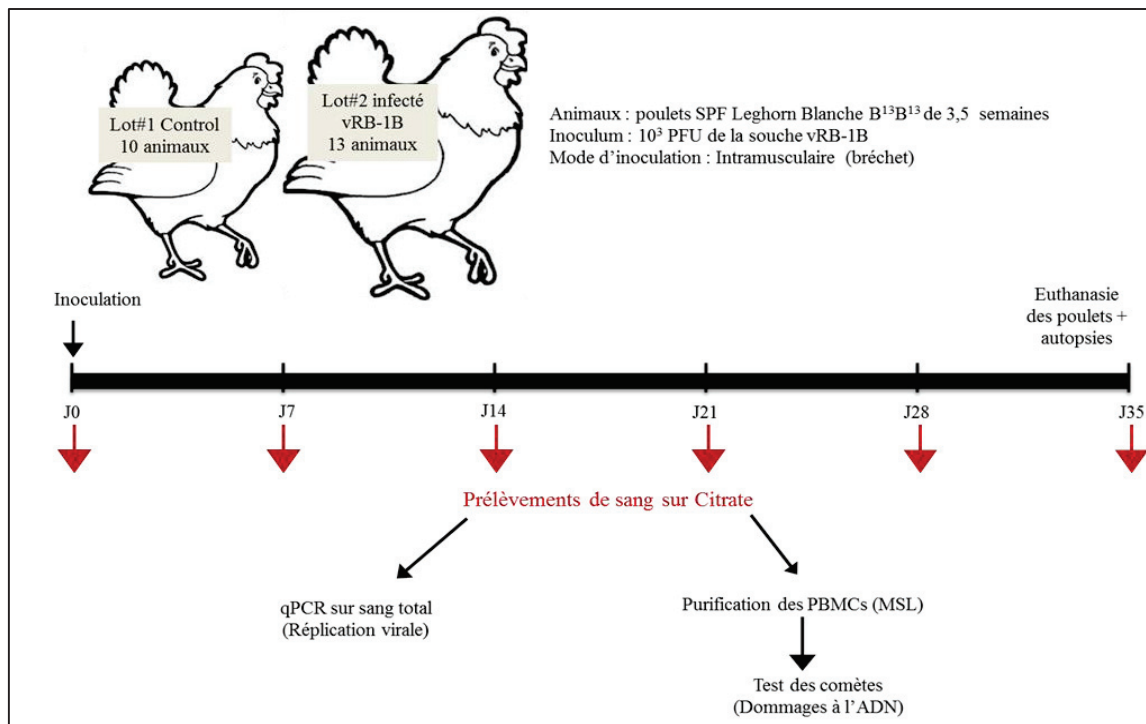


Figure 60. Schéma expérimental de l'expérience *in vivo* n1.

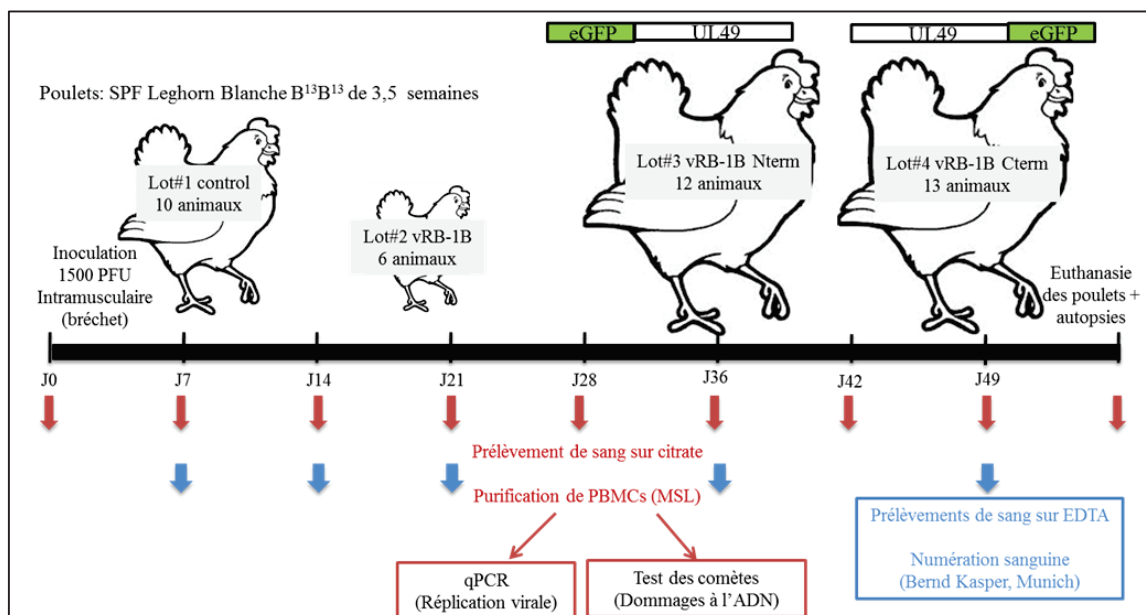


Figure 61. Schéma expérimental de l'expérience *in vivo* n2.

2.4.2. Isolement de PBMCs

Les PBMC ont été isolés à partir de 1 ml de sang total. Le sang a été dilué au tiers dans du PBS 1X avant d'être déposé délicatement (volume à volume) sur du milieu de séparation de lymphocytes MSL (Eurobio). Après une étape de centrifugation de 30 min à 290 x g, l'anneau de PBMC a été récupéré et lavé 2 fois dans du PBS 1X. Le culot cellulaire a été repris dans 1 ml de PBS 1X et les PBMCs ont été comptés sur cellule KOVA® (Hycor Biomedical Inc) avant d'être utilisés pour réaliser les tests des comètes et/ou déterminer la charge virale.

2.4.3. Numération sanguine

Afin d'estimer la proportion des différentes populations cellulaires dans le sang des poulets (thrombocytes, hétérophiles, monocytes, lymphocytes B et T), des prélèvements sanguins ont été effectués sur les animaux de l'expérience 2 à 7, 14, 21, 36 et 49 jours pi. Pour chaque animal 200 µl de sang ont été prélevés dans des tubes de prélèvement prétraités avec de l'EDTA (Microvette®, Starstedt). Les numérations ont été effectuées par cytométrie en flux dans le laboratoire de Bernd Kaspers (Institute für Tierphysiologie, Munich) selon la technique décrite par Selinger *et al* (Selinger *et al.*, 2012). Aussi, afin de préserver la qualité des échantillons de sang lors du transport, 40 µl de solution de fixation Transfix® (Invitrogen) ont été ajoutés au prélèvements sanguins et l'envoi a été effectué à 4°C. le nombre de cellules constituant dans chaque population cellulaire considérée a été comparé avec le test de Mann Whitney, $p < 0,05$.

2.5. Le test des comètes

2.5.1 Principe

Le test des comètes permet de détecter et d'analyser les lésions de l'ADN dans une cellule individualisée (Figure 62). Ce test consiste à faire migrer l'ADN des cellules par électrophorèse après les avoir incluses dans un gel d'agarose sur lames de microscopie et lysées en condition alcaline. Après coloration de l'ADN au bromure d'éthidium (BET) et observation microscopique, l'ADN cellulaire intact apparaît sous forme d'une sphère tandis que l'ADN cellulaire qui a subi des lésions prend la forme d'une comète dont la queue contient l'ADN endommagé. La longueur et l'intensité de la queue de la comète reflètent l'ampleur des dommages.

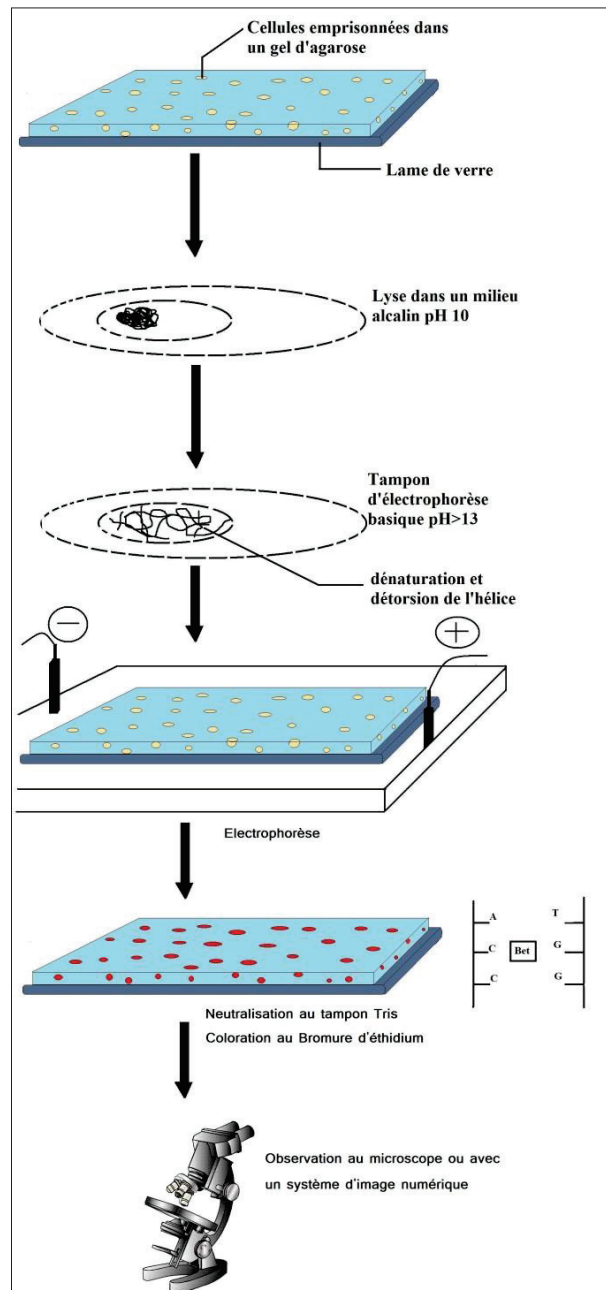


Figure 62. Principe du test des comètes.

2.5.2 Technique

2.5.2.1 Préparation des lames

Afin d'assurer l'adhérence de la couche d'agarose contenant les cellules, les lames de microscopie Superfrost Plus (Menzel-Gläser, Thermo-Scientific) ont été dans un premier temps prétraitées dans de l'agarose 0,8% (Eurogentec) dissout dans du PBS 1X et maintenu à 100°C. Les lames ont été ensuite séchées à plat pendant au moins 2h.

2.5.2.2 Inclusion des cellules en agarose

Les cellules ont été comptées afin de prévoir 200 000 cellules pour réaliser 2 lames d'essai comète pour chaque condition expérimentale. A partir de cette étape, il est important de préserver les cellules à l'abri de la lumière et de toute source de rayonnement afin d'éviter l'induction de dommages à l'ADN artéfactuels. Aussi, la suite de l'expérimentation a été réalisée en chambre noire sous l'éclairage d'une lampe inactinique. L'agarose dans lequel les cellules ont été incluses est un agarose à bas point de fusion (Low Melting Point, Invitrogen). L'agarose LMP a été préparé à une concentration de 0,5% en PBS 1X, chauffé 5 min à 100°C et incubé à 37°C au bain-marie pendant 2h, afin qu'il soit à une température optimale au contact des cellules. Les culots cellulaires ont été repris avec 210 µl d'agarose LMP et homogénéisés délicatement par pipetage. Soixante-cinq microlitres de ce mélange cellules-agarose ont été déposés sur une lame de microscopie prétraitée. Rapidement une lamelle a été déposée sur la lame, qui a ensuite été placée sur glace pendant 10 min. Ainsi lors du retrait de la lamelle, nous avons obtenu une fine couche d'agarose solidifiée contenant les cellules, qui sera alors recouverte d'une deuxième couche d'agarose LMP (80 µl) afin de finaliser l'inclusion des cellules. Comme précédemment l'agarose est recouverte d'une lamelle, la lame a été placée sur glace et la lamelle a été retirée après 10 min de solidification de l'agarose.

2.5.2.3 Etape de lyse

Les cellules incluses en agarose ont été lysées à l'abri de la lumière pendant 1h à 4°C dans une solution de lyse (NaCl 2,5 M ; EDTA 0,1 M ; Tris 10 mM ; pH ajusté à 10) additionnée de 10% de DMSO et 1% de Triton X-100.

2.5.2.4 Electrophorèse

Les lames sont ensuite incubées pendant 40 min à l'abri de la lumière à 4°C dans une solution alcaline d'électrophorèse (2,4 mM EDTA ; 11,5 M NaOH ; pH ajusté à 13) afin de permettre la dénaturation des molécules d'ADN avant la migration. L'électrophorèse a été réalisée à 12 volts pendant 26 min (1 volt par cm de distance entre les électrodes).

2.5.2.5 Neutralisation

Afin de permettre le réappariement sommaire des brins d'ADN et ainsi d'assurer la fixation du BET lors de l'étape de coloration, les lames ont été incubées 2 fois pendant 5 min à 4°C dans une solution de neutralisation (0,2 M Tris-HCl, pH 7,5).

2.5.2.6 Fixation

Les gels d'agarose ont été déshydratés afin d'éviter la diffusion de l'ADN dans le gel et de pouvoir conserver nos lames pour un marquage ultérieur. Pour ce faire, les lames ont été incubées 2 fois dans de l'éthanol absolu (conservé à 4°C) pendant 10 min à TA, et séchées à l'air libre 1 à 2 h.

2.5.2.7 Coloration

Le marquage de l'ADN a été effectué par dépôt de 20 µl de BET à 0,1 µg/ml sur les lames. Les lamelles ont ensuite été apposées délicatement sur les lames et lutées avec du vernis.

2.5.2.8 Visualisation et analyse des comètes

Les comètes ont été observées au microscope Axiovert 200 M à épifluorescence inversé à l'aide de l'objectif 20 × PlanNeofluar/Dic et du système ApoTome (Zeiss). Les images ont été acquises avec une caméra CCD AxioCam MRm (Zeiss) en utilisant le logiciel d'Axiovision (Zeiss). A partir de chaque lame, 100 images de comètes ont été acquises et analysées en utilisant le logiciel CometScore version 1.5 (TriTek). A partir de l'image d'une comète, le logiciel détermine la limite entre la tête et la queue de la comète et analyse ainsi différents paramètres (Figure 63).

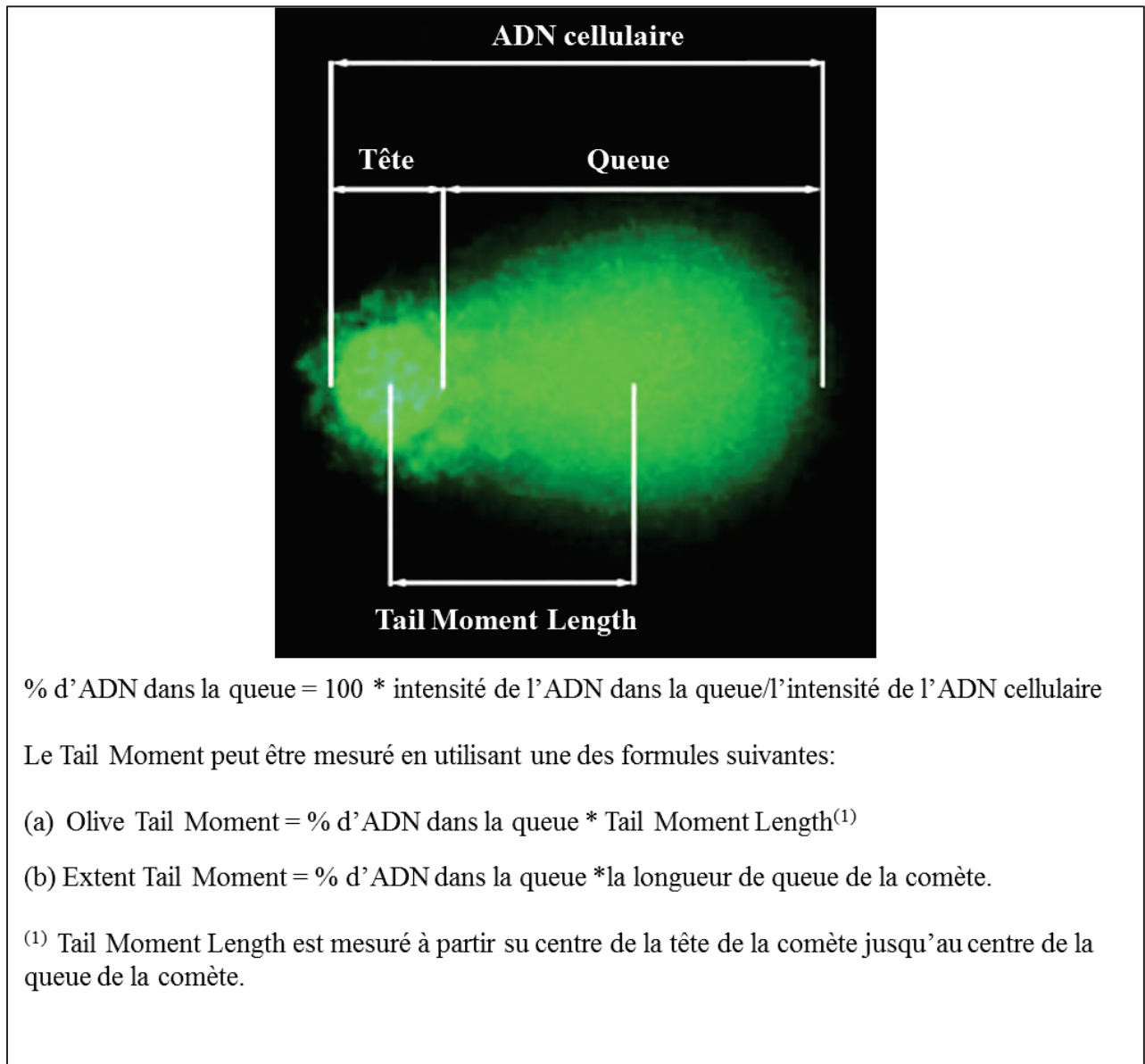


Figure 63. Explication de certains paramètres de mesure des comètes.

Nous avons choisi de présenter les résultats de nos études en utilisant le paramètre OTM qui reflète non seulement la sévérité des lésions (taille de la comète) et également la quantité d'ADN lésé. De plus, une étude réalisée par Lee *et al* a mis en évidence que ce paramètre serait le plus approprié pour estimer les dommages à l'ADN survenant dans les lymphocytes (Lee *et al.*, 2004). Les résultats ont été présentés sous forme de moyenne ($\pm$ SD) d'OTM calculée pour chaque condition ou comme une distribution des comètes par rapport à leur valeur respective d'OTM (soit le pourcentage de cellules présentant un OTM défini). Les moyennes des OTM ont été comparées par le test statistique Mann Whitney, $p < 0,05$.

Références bibliographiques

- Abdul-Careem, M. F., Hunter, B. D., Lee, L. F., Fairbrother, J. H., Haghighi, H. R., Read, L., Parvizi, P., Heidari, M. & Sharif, S. (2008).** Host responses in the bursa of Fabricius of chickens infected with virulent Marek's disease virus. *Virology* **379**, 256-265.
- Abraham, R. T. (2001).** Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development* **15**, 2177-2196.
- Accardi, R., Fathallah, I., Gruffat, H., Mariggio, G., Le Calvez-Kelm, F., Voegelé, C., Bartosch, B., Hernandez-Vargas, H., McKay, J., Sylla, B. S., Manet, E. & Tommasino, M. (2013).** Epstein - Barr virus transforming protein LMP-1 alters B cells gene expression by promoting accumulation of the oncoprotein DeltaNp73alpha. *PLoS pathogens* **9**, e1003186.
- Ajithdoss, D. K., Reddy, S. M., Suchodolski, P. F., Lee, L. F., Kung, H. J. & Lupiani, B. (2009).** In vitro characterization of the Meq proteins of Marek's disease virus vaccine strain CVI988. *Virus Res* **142**, 57-67.
- Alberts, B. (2008).** Molecular biology of the cell. *New York : Garland Science, c2008 5th ed.*
- Ann Arvin, B. R., Edward Mocarski, Gabriella Campadelli-Fiume, Koichi Yamanishi, Patrick S. Moore, Richard Whitley (2007).** Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*: Cambridge University Press.
- Aranda, A. M. & Epstein, A. L. (2015).** [Herpes simplex virus type 1 latency and reactivation: an update]. *Medicine sciences : M/S* **31**, 506-514.
- Arbuckle, J. H. & Medveczky, P. G. (2011).** The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **13**, 731-741.
- Avanzi, S., Alvisi, G. & Ripalti, A. (2013).** How virus persistence can initiate the tumorigenesis process. *World journal of virology* **2**, 102-109.
- Baaten, B. J., Staines, K. A., Smith, L. P., Skinner, H., Davison, T. F. & Butter, C. (2009).** Early replication in pulmonary B cells after infection with Marek's disease herpesvirus by the respiratory route. *Viral immunology* **22**, 431-444.
- Baer, A., Austin, D., Narayanan, A., Popova, T., Kainulainen, M., Bailey, C., Kashanchi, F., Weber, F. & Kehn-Hall, K. (2012).** Induction of DNA damage signaling upon Rift Valley fever virus infection results in cell cycle arrest and increased viral replication. *The Journal of biological chemistry* **287**, 7399-7410.
- Baigent, S. J., and Davison, F. (2004).** Marek's disease virus: Biology and life cycle. In *Marek's disease An evolving problem*, pp. 62-77. Campton UK: Elsevier Academic Press.
- Bailey, S. G., Verrall, E., Schelcher, C., Rhie, A., Doherty, A. J. & Sinclair, A. J. (2009).** Functional interaction between Epstein-Barr virus replication protein Zta and host DNA damage response protein 53BP1. *Journal of virology* **83**, 11116-11122.
- Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. (2003).** DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506.
- Balasubramanian, N., Bai, P., Buchek, G., Korza, G. & Weller, S. K. (2010).** Physical interaction between the herpes simplex virus type 1 exonuclease, UL12, and the DNA double-strand break-sensing MRN complex. *Journal of virology* **84**, 12504-12514.
- Bartek, J., Lukas, C. & Lukas, J. (2004).** Checking on DNA damage in S phase. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**, 792-804.
- Bartek, J. & Lukas, J. (2003).** Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer cell* **3**, 421-429.

- Bell, P., Lieberman, P. M. & Maul, G. G. (2000).** Lytic but not latent replication of epstein-barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. *Journal of virology* **74**, 11800-11810.
- Biggs, P. M. (2004).** Marek's disease: long and difficult beginnings. In *Marek's disease An evolving problem*, pp. 8-15. Campton UK: Elsevier.
- Bill, C. A. & Summers, J. (2004).** Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11135-11140.
- Blasina, A., Hallin, J., Chen, E., Arango, M. E., Kraynov, E., Register, J., Grant, S., Ninkovic, S., Chen, P., Nichols, T., O'Connor, P. & Anderes, K. (2008).** Breaching the DNA damage checkpoint via PF-00477736, a novel small-molecule inhibitor of checkpoint kinase 1. *Molecular cancer therapeutics* **7**, 2394-2404.
- Blondeau, C., Chbab, N., Beaumont, C., Courvoisier, K., Osterrieder, N., Vautherot, J. F. & Denesvre, C. (2007).** A full UL13 open reading frame in Marek's disease virus (MDV) is dispensable for tumor formation and feather follicle tropism and cannot restore horizontal virus transmission of rRB-1B in vivo. *Veterinary research* **38**, 419-433.
- Blondeau, C., Marc, D., Courvoisier, K., Vautherot, J. F. & Denesvre, C. (2008).** Functional homologies between avian and human alphaherpesvirus VP22 proteins in cell-to-cell spreading as revealed by a new cis-complementation assay. *Journal of virology* **82**, 9278-9282.
- Boehmer, P. E. & Nimonkar, A. V. (2003).** Herpes virus replication. *IUBMB life* **55**, 13-22.
- Bowman, J. J., Orlando, J. S., Davido, D. J., Kushnir, A. S. & Schaffer, P. A. (2009).** Transient expression of herpes simplex virus type 1 ICP22 represses viral promoter activity and complements the replication of an ICP22 null virus. *Journal of virology* **83**, 8733-8743.
- Brinkmann, K., Schell, M., Hoppe, T. & Kashkar, H. (2015).** Regulation of the DNA damage response by ubiquitin conjugation. *Frontiers in genetics* **6**, 98.
- Brown, A. C., Baigent, S. J., Smith, L. P., Chattoo, J. P., Petherbridge, L. J., Hawes, P., Allday, M. J. & Nair, V. (2006).** Interaction of MEQ protein and C-terminal-binding protein is critical for induction of lymphomas by Marek's disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1687-1692.
- Burgess, S. C. & Davison, T. F. (2002).** Identification of the neoplastically transformed cells in Marek's disease herpesvirus-induced lymphomas: recognition by the monoclonal antibody AV37. *Journal of virology* **76**, 7276-7292.
- Burgess, S. C., Young, J. R., Baaten, B. J., Hunt, L., Ross, L. N., Parcells, M. S., Kumar, P. M., Tregaskes, C. A., Lee, L. F. & Davison, T. F. (2004).** Marek's disease is a natural model for lymphomas overexpressing Hodgkin's disease antigen (CD30). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13879-13884.
- Burkham, J., Coen, D. M., Hwang, C. B. & Weller, S. K. (2001).** Interactions of herpes simplex virus type 1 with ND10 and recruitment of PML to replication compartments. *Journal of virology* **75**, 2353-2367.
- Burkham, J., Coen, D. M. & Weller, S. K. (1998).** ND10 protein PML is recruited to herpes simplex virus type 1 prereplicative sites and replication compartments in the presence of viral DNA polymerase. *Journal of virology* **72**, 10100-10107.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. J. (2001).** ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry* **276**, 42462-42467.

- 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. *Journal of virology* **80**, 8778-8786.
- Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M. C., Walter, J. C. & Cimprich, K. A. (2005).** Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes & development* **19**, 1040-1052.
- Caldecott, K. W. (2008).** Single-strand break repair and genetic disease. *Nature reviews Genetics* **9**, 619-631.
- Calnek, B. W. (1986).** Marek's disease--a model for herpesvirus oncology. *Crit Rev Microbiol* **12**, 293-320.
- Calnek, B. W., Adldinger, H. K. & Kahn, D. E. (1970).** Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian diseases* **14**, 219-233.
- Calnek, B. W., Shek, W. R. & Schat, K. A. (1981).** Latent infections with Marek's disease virus and turkey herpesvirus. *Journal of the National Cancer Institute* **66**, 585-590.
- Cantello, J. L., Anderson, A. S. & Morgan, R. W. (1994).** Identification of latency-associated transcripts that map antisense to the ICP4 homolog gene of Marek's disease virus. *Journal of virology* **68**, 6280-6290.
- Cantello, J. L., Parcells, M. S., Anderson, A. S. & Morgan, R. W. (1997).** Marek's disease virus latency-associated transcripts belong to a family of spliced RNAs that are antisense to the ICP4 homolog gene. *Journal of virology* **71**, 1353-1361.
- Castillo, J. P., Frame, F. M., Rogoff, H. A., Pickering, M. T., Yurochko, A. D. & Kowalik, T. F. (2005).** Human cytomegalovirus IE1-72 activates ataxia telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. *Journal of virology* **79**, 11467-11475.
- Chang, K. S., Ohashi, K., Lee, S. I., Takagi, M. & Onum, M. (2005).** Detection of the meq gene in the T cell subsets from chickens infected with Marek's disease virus serotype 1. *Jpn J Vet Res* **53**, 3-11.
- Chaurushiya, M. S. & Weitzman, M. D. (2009).** Viral manipulation of DNA repair and cell cycle checkpoints. *DNA repair* **8**, 1166-1176.
- Chazin Ede, L., Reis Rda, R., Junior, W. T., Moor, L. F. & Vasconcelos, T. R. (2014).** An overview on the development of new potentially active camptothecin analogs against cancer. *Mini reviews in medicinal chemistry* **14**, 953-962.
- Che, X., Reichelt, M., Sommer, M. H., Rajamani, J., Zerboni, L. & Arvin, A. M. (2008).** Functions of the ORF9-to-ORF12 gene cluster in varicella-zoster virus replication and in the pathogenesis of skin infection. *Journal of virology* **82**, 5825-5834.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M. & Halazonetis, T. D. (2000).** Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes & development* **14**, 278-288.
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S. & Halazonetis, T. D. (1999).** Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13777-13782.
- Chen, J. & Stubbe, J. (2005).** Bleomycins: towards better therapeutics. *Nature reviews Cancer* **5**, 102-112.
- Chen, Y., Williams, V., Filippova, M., Filippov, V. & Duerksen-Hughes, P. (2014).** Viral carcinogenesis: factors inducing DNA damage and virus integration. *Cancers* **6**, 2155-2186.
- Chi, J. Q., Teng, M., Yu, Z. H., Xu, H., Su, J. W., Zhao, P., Xing, G. X., Liang, H. D., Deng, R. G., Qu, L. H., Zhang, G. P. & Luo, J. (2015).** Marek's disease virus-

- encoded analog of microRNA-155 activates the oncogene c-Myc by targeting LTBP1 and suppressing the TGF-beta signaling pathway. *Virology* **476**, 72-84.
- Choudhuri, T., Verma, S. C., Lan, K., Murakami, M. & Robertson, E. S. (2007).** The ATM/ATR signaling effector Chk2 is targeted by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C to release the G2/M cell cycle block. *Journal of virology* **81**, 6718-6730.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P. & Kaina, B. (2003).** Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**, 3-34.
- 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. *The Journal of general virology* **4**, 557-564.
- Cimprich, K. A. & Cortez, D. (2008).** ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**, 616-627.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. (2009).** Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073-1081.
- Cooper, A., Garcia, M., Petrovas, C., Yamamoto, T., Koup, R. A. & Nabel, G. J. (2013).** HIV integration and T cell death: additional commentary. *Retrovirology* **10**, 150.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J. & Elledge, S. J. (2001).** ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**, 1713-1716.
- Coussens, L. M. & Werb, Z. (2002).** Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860-867.
- Couteaudier, M. (2015).** Réplication, Dissémination et Morphogenèse du virus de la Maladie de Marek en cellules différenciées vers le lignage peau, p. 261: François Rabelais, Tours.
- Cuevas-Ramos, G., Petit, C. R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E. & Nougayrede, J. P. (2010).** Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 11537-11542.
- 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. *Journal of virology* **78**, 4753-4760.
- 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.
- Dai, B., Zhao, X. F., Mazan-Mamczarz, K., Hagner, P., Corl, S., Bahassi el, M., Lu, S., Stambrook, P. J., Shapiro, P. & Gartenhaus, R. B. (2011).** Functional and molecular interactions between ERK and CHK2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature communications* **2**, 402.
- Dasika, G. K., Lin, S. C., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A. & Lee, E. Y. (1999).** DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* **18**, 7883-7899.
- Davis, A. J., Chen, B. P. & Chen, D. J. (2014).** DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. *DNA repair* **17**, 21-29.
- Davison, S. J. B. a. F. (2004).** Marek's disease virus: biology and life cycle. In *Mrek's disease an evolving problem*, pp. 62-77.
- de Oliveira, A. H., da Silva, A. E., de Oliveira, I. M., Henriques, J. A. & Agnez-Lima, L. F. (2014).** MutY-glycosylase: an overview on mutagenesis and activities beyond the GO system. *Mutation research* **769**, 119-131.
- Debba-Pavard, M., Ait-Lounis, A., Soubieux, D., Rasschaert, D. & Dambrine, G. (2008).** Vaccination against Marek's disease reduces telomerase activity and viral gene

- transcription in peripheral blood leukocytes from challenged chickens. *Vaccine* **26**, 4904-4912.
- Delecluse, H. J. & Hammerschmidt, W. (1993).** Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common. *Journal of virology* **67**, 82-92.
- Delecluse, H. J., Schuller, S. & Hammerschmidt, W. (1993).** Latent Marek's disease virus can be activated from its chromosomally integrated state in herpesvirus-transformed lymphoma cells. *The EMBO journal* **12**, 3277-3286.
- DeLuca, N. A., McCarthy, A. M. & Schaffer, P. A. (1985).** Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *Journal of virology* **56**, 558-570.
- Dembowski, J. A. & DeLuca, N. A. (2015).** Selective recruitment of nuclear factors to productively replicating herpes simplex virus genomes. *PLoS pathogens* **11**, e1004939.
- Denesvre, C. (2013).** Marek's disease virus morphogenesis. *Avian diseases* **57**, 340-350.
- Denesvre, C., Blondeau, C., Lemesle, M., Le Vern, Y., Vautherot, D., Roingeard, P. & Vautherot, J. F. (2007).** Morphogenesis of a highly replicative EGFPVP22 recombinant Marek's disease virus in cell culture. *Journal of virology* **81**, 12348-12359.
- Denesvre, C., Remy, S., Trapp-Fragnet, L., Smith, L. P., Georgeault, S., Vautherot, J. F. & Nair, V. (2015).** Marek's disease virus undergoes complete morphogenesis after reactivation in T-lymphoblastoid cell line transformed by recombinant fluorescent marker virus. *The Journal of general virology*.
- Deng, X., Li, X., Shen, Y., Qiu, Y., Shi, Z., Shao, D., Jin, Y., Chen, H., Ding, C., Li, L., Chen, P. & Ma, Z. (2010).** The Meq oncoprotein of Marek's disease virus interacts with p53 and inhibits its transcriptional and apoptotic activities. *Virology journal* **7**, 348.
- Deng, Z., Kim, E. T., Vladimirova, O., Dheekollu, J., Wang, Z., Newhart, A., Liu, D., Myers, J. L., Hensley, S. E., Moffat, J., Janicki, S. M., Fraser, N. W., Knipe, D. M., Weitzman, M. D. & Lieberman, P. M. (2014).** HSV-1 remodels host telomeres to facilitate viral replication. *Cell reports* **9**, 2263-2278.
- Dheekollu, J., Deng, Z., Wiedmer, A., Weitzman, M. D. & Lieberman, P. M. (2007).** A role for MRE11, NBS1, and recombination junctions in replication and stable maintenance of EBV episomes. *PloS one* **2**, e1257.
- Dianov, G. L. & Hubscher, U. (2013).** Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic acids research* **41**, 3483-3490.
- Digweed, M. (2003).** Response to environmental carcinogens in DNA-repair-deficient disorders. *Toxicology* **193**, 111-124.
- Digweed, M. & Sperling, K. (2004).** Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA repair* **3**, 1207-1217.
- 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**, 643-650.
- Ding, J., Cui, Z., Lee, L. F., Cui, X. & Reddy, S. M. (2006).** The role of pp38 in regulation of Marek's disease virus bi-directional promoter between pp38 and 1.8-kb mRNA. *Virus genes* **32**, 193-201.
- Ding, J. B., Cui, Z. Z., Jiang, S. J., Sun, A. J. & Sun, S. H. (2005a).** [Study on the characterization of the bi-directional promoter between pp38 gene and 1.8kb mRNA transcripts of Marek's disease viruses]. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* **45**, 363-367.

- Ding, L., Li, L. L., Yang, J., Tao, Y. G., Ye, M., Shi, Y., Tang, M., Yi, W., Li, X. L., Gong, J. P. & Cao, Y. (2005b). Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 modulates nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein by activating nuclear factor-kappaB p65 in human nasopharyngeal carcinoma cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **37**, 1881-1889.
- Djeraba-AitLounis, A., Soubieux, D., Klapper, W. & Rasschaert, D. (2004). Induction of telomerase activity in avian lymphoblastoid cell line transformed by Marek's disease virus, MDCC-MSB1. *Veterinary pathology* **41**, 405-407.
- Djeraba, A., Musset, E., Bernardet, N., Le Vern, Y. & Quere, P. (2002a). Similar pattern of iNOS expression, NO production and cytokine response in genetic and vaccination-acquired resistance to Marek's disease. *Veterinary immunology and immunopathology* **85**, 63-75.
- Djeraba, A., Musset, E., van Rooijen, N. & Quere, P. (2002b). Resistance and susceptibility to Marek's disease: nitric oxide synthase/arginase activity balance. *Veterinary microbiology* **86**, 229-244.
- Dorange, F., El Mehdaoui, S., Pichon, C., Coursaget, P. & Vautherot, J. F. (2000). Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16. *The Journal of general virology* **81**, 2219-2230.
- Dorange, F., Tischer, B. K., Vautherot, J. F. & Osterrieder, N. (2002). Characterization of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) deletion mutants that lack UL46 to UL49 genes: MDV-1 UL49, encoding VP22, is indispensable for virus growth. *Journal of virology* **76**, 1959-1970.
- Dueva, R. & Iliakis, G. (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Translational cancer research* **2**, 163-177.
- Durand, L. O. & Roizman, B. (2008). Role of cdk9 in the optimization of expression of the genes regulated by ICP22 of herpes simplex virus 1. *Journal of virology* **82**, 10591-10599.
- E, X., Pickering, M. T., Debatis, M., Castillo, J., Lagadinos, A., Wang, S., Lu, S. & Kowalik, T. F. (2011). An E2F1-mediated DNA damage response contributes to the replication of human cytomegalovirus. *PLoS pathogens* **7**, e1001342.
- El-Sayed, N. M. & Aly, E. M. (2014). Toxoplasma gondii infection can induce retinal DNA damage: an experimental study. *International journal of ophthalmology* **7**, 431-436.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews Genetics* **5**, 435-445.
- Ellison, V. & Stillman, B. (2001). Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine. *Cell* **106**, 655-660.
- Elmroth, K., Nygren, J., Martensson, S., Ismail, I. H. & Hammarsten, O. (2003). Cleavage of cellular DNA by calicheamicin gamma1. *DNA repair* **2**, 363-374.
- Elsen, S., Collin-Faure, V., Gidrol, X. & Lemerrier, C. (2013). The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* activates the DNA double-strand break signaling and repair pathway in infected cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**, 4385-4397.
- Everett, R. D. & Chelbi-Alix, M. K. (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* **89**, 819-830.
- Everett, R. D. & Maul, G. G. (1994). HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *The EMBO journal* **13**, 5062-5069.
- Everett, R. D., Sourvinos, G. & Orr, A. (2003). Recruitment of herpes simplex virus type 1 transcriptional regulatory protein ICP4 into foci juxtaposed to ND10 in live, infected cells. *Journal of virology* **77**, 3680-3689.

- Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J. & Lukas, J. (2001).** The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**, 842-847.
- Feldberg, R. S. & Carew, J. A. (1981).** Water radiolysis products and nucleotide damage in gamma-irradiated DNA. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* **40**, 11-17.
- Flint, S. J. E., L.W; Racaniello, V. R; Skalka, A. M (2000).** *Principles of virology*. Washington ASM Press.
- Fontaine-Rodriguez, E. C., Taylor, T. J., Olesky, M. & Knipe, D. M. (2004).** Proteomics of herpes simplex virus infected cell protein 27: association with translation initiation factors. *Virology* **330**, 487-492.
- Fortunato, E. A., Dell'Aquila, M. L. & Spector, D. H. (2000).** Specific chromosome 1 breaks induced by human cytomegalovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 853-858.
- Fortunato, E. A. & Spector, D. H. (2003).** Viral induction of site-specific chromosome damage. *Reviews in medical virology* **13**, 21-37.
- Fragnet, L., Blasco, M. A., Klapper, W. & Rasschaert, D. (2003).** The RNA subunit of telomerase is encoded by Marek's disease virus. *Journal of virology* **77**, 5985-5996.
- 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**, 23502-23515.
- Franchitto, A. & Pichierri, P. (2002).** Protecting genomic integrity during DNA replication: correlation between Werner's and Bloom's syndrome gene products and the MRE11 complex. *Human molecular genetics* **11**, 2447-2453.
- Fugmann, S. D., Lee, A. I., Shockett, P. E., Villey, I. J. & Schatz, D. G. (2000).** The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annual review of immunology* **18**, 495-527.
- Galardi, S., Mercatelli, N., Giorda, E., Massalini, S., Frajese, G. V., Ciafre, S. A. & Farace, M. G. (2007).** miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *The Journal of biological chemistry* **282**, 23716-23724.
- Garber, D. A., Beverley, S. M. & Coen, D. M. (1993).** Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* **197**, 459-462.
- Garcia-Echeverria, C. & Sellers, W. R. (2008).** Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* **27**, 5511-5526.
- Gaspar, M. & Shenk, T. (2006).** Human cytomegalovirus inhibits a DNA damage response by mislocalizing checkpoint proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2821-2826.
- Gonzalez Besteiro, M. A. & Gottifredi, V. (2015).** The fork and the kinase: a DNA replication tale from a CHK1 perspective. *Mutation research Reviews in mutation research* **763**, 168-180.
- Grasso, F. & Frisan, T. (2015).** Bacterial Genotoxins: Merging the DNA Damage Response into Infection Biology. *Biomolecules* **5**, 1762-1782.
- Graves, P. R., Lovly, C. M., Uy, G. L. & Piwnica-Worms, H. (2001).** Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* **20**, 1839-1851.
- Gregory, D. A. & Bachenheimer, S. L. (2008).** Characterization of mre11 loss following HSV-1 infection. *Virology* **373**, 124-136.

- Grinde, B. (2013).** Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *Journal of oral microbiology* **5**.
- Grondin, B. & DeLuca, N. (2000).** Herpes simplex virus type 1 ICP4 promotes transcription preinitiation complex formation by enhancing the binding of TFIID to DNA. *Journal of virology* **74**, 11504-11510.
- Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S. A., Gastaldello, S. & Masucci, M. G. (2009a).** The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2313-2318.
- Gruhne, B., Sompallae, R. & Masucci, M. G. (2009b).** Three Epstein-Barr virus latency proteins independently promote genomic instability by inducing DNA damage, inhibiting DNA repair and inactivating cell cycle checkpoints. *Oncogene* **28**, 3997-4008.
- Grundy, G. J., Moulding, H. A., Caldecott, K. W. & Rulten, S. L. (2014).** One ring to bring them all--the role of Ku in mammalian non-homologous end joining. *DNA repair* **17**, 30-38.
- Hande, K. R. (1998).** Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* **34**, 1514-1521.
- Hatayama, T. & Goldberg, I. H. (1979).** DNA damage and repair in relation to cell killing in neocarzinostatin-treated HeLa cells. *Biochimica et biophysica acta* **563**, 59-71.
- Hau, P. M., Deng, W., Jia, L., Yang, J., Tsurumi, T., Chiang, A. K., Huen, M. S. & Tsao, S. W. (2015).** Role of ATM in the formation of the replication compartment during lytic replication of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal epithelial cells. *Journal of virology* **89**, 652-668.
- Hayashi, M., Furuichi, T., Ren, S., Isogai, E., Nonoyama, M. & Namioka, S. (1994).** Enhancement of mRNA synthesis from Marek's disease virus genome in the lymphoblastoid cell line, MDCC-MSB1, by 5-azacytidine. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* **56**, 287-291.
- Hayashi, M., Kawamura, T., Akaike, H., Arai, S. & Okui, T. (1999).** Antisense oligonucleotide complementary to the BamHI-H gene family of Marek's disease virus induced growth arrest of MDCC-MSB1 cells in the S-phase. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* **61**, 389-394.
- Herrera, F. J. & Triezenberg, S. J. (2004).** VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. *Journal of virology* **78**, 9689-9696.
- Hicks, J. A. & Liu, H. C. (2013).** Current state of Marek's disease virus microRNA research. *Avian diseases* **57**, 332-339.
- Hile, S. E., Shabashev, S. & Eckert, K. A. (2013).** Tumor-specific microsatellite instability: do distinct mechanisms underlie the MSI-L and EMAS phenotypes? *Mutation research* **743-744**, 67-77.
- Hill, R. & Lee, P. W. (2010).** The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell Cycle* **9**, 3460-3469.
- Hollingworth, R. & Grand, R. J. (2015a).** Modulation of DNA damage and repair pathways by human tumour viruses. *Viruses* **7**, 2542-2591.
- Hollingworth, R. & Grand, R. J. (2015b).** Modulation of DNA Damage and Repair Pathways by Human Tumour Viruses. *Viruses* **7**, 2542-2591.
- Hollingworth, R., Skalka, G. L., Stewart, G. S., Hislop, A. D., Blackbourn, D. J. & Grand, R. J. (2015).** Activation of DNA Damage Response Pathways during Lytic Replication of KSHV. *Viruses* **7**, 2908-2927.

- Hong, Y. & Coussens, P. M. (1994).** Identification of an immediate-early gene in the Marek's disease virus long internal repeat region which encodes a unique 14-kilodalton polypeptide. *Journal of virology* **68**, 3593-3603.
- Hong, Y., Frame, M. & Coussens, P. M. (1995).** A 14-kDa immediate-early phosphoprotein is specifically expressed in cells infected with oncogenic Marek's disease virus strains and their attenuated derivatives. *Virology* **206**, 695-700.
- Houldsworth, J. & Lavin, M. F. (1980).** Effect of ionizing radiation on DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. *Nucleic acids research* **8**, 3709-3720.
- Houtgraaf, J. H., Versmissen, J. & van der Giessen, W. J. (2006).** A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions* **7**, 165-172.
- Hunt, H. D., Lupiani, B., Miller, M. M., Gimeno, I., Lee, L. F. & Parcells, M. S. (2001).** Marek's disease virus down-regulates surface expression of MHC (B Complex) Class I (BF) glycoproteins during active but not latent infection of chicken cells. *Virology* **282**, 198-205.
- Hutchinson, I., Whiteley, A., Browne, H. & Elliott, G. (2002).** Sequential localization of two herpes simplex virus tegument proteins to punctate nuclear dots adjacent to ICP0 domains. *Journal of virology* **76**, 10365-10373.
- Islam, A. F., Wong, C. W., Walkden-Brown, S. W., Colditz, I. G., Arzey, K. E. & Groves, P. J. (2002).** Immunosuppressive effects of Marek's disease virus (MDV) and herpesvirus of turkeys (HVT) in broiler chickens and the protective effect of HVT vaccination against MDV challenge. *Avian pathology : journal of the WVPA* **31**, 449-461.
- Jackson, S. P. (2002).** Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23**, 687-696.
- Jackson, S. P. & Jeggo, P. A. (1995).** DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends in biochemical sciences* **20**, 412-415.
- Jang, S. H., Lim, J. W., Morio, T. & Kim, H. (2012).** Lycopene inhibits Helicobacter pylori-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. *Free radical biology & medicine* **52**, 607-615.
- Jarosinski, K. W., Arndt, S., Kaufer, B. B. & Osterrieder, N. (2012).** Fluorescently tagged pUL47 of Marek's disease virus reveals differential tissue expression of the tegument protein in vivo. *Journal of virology* **86**, 2428-2436.
- Jarosinski, K. W., Margulis, N. G., Kamil, J. P., Spatz, S. J., Nair, V. K. & Osterrieder, N. (2007).** Horizontal transmission of Marek's disease virus requires US2, the UL13 protein kinase, and gC. *Journal of virology* **81**, 10575-10587.
- Jarosinski, K. W., O'Connell, P. H. & Schat, K. A. (2003).** Impact of deletions within the Bam HI-L fragment of attenuated Marek's disease virus on vIL-8 expression and the newly identified transcript of open reading frame LORF4. *Virus genes* **26**, 255-269.
- Jarosinski, K. W., Osterrieder, N., Nair, V. K. & Schat, K. A. (2005).** Attenuation of Marek's disease virus by deletion of open reading frame RLORF4 but not RLORF5a. *Journal of virology* **79**, 11647-11659.
- Jarosinski, K. W. & Schat, K. A. (2007).** Multiple alternative splicing to exons II and III of viral interleukin-8 (vIL-8) in the Marek's disease virus genome: the importance of vIL-8 exon I. *Virus genes* **34**, 9-22.
- Jarosinski, K. W., Tischer, B. K., Trapp, S. & Osterrieder, N. (2006).** Marek's disease virus: lytic replication, oncogenesis and control. *Expert review of vaccines* **5**, 761-772.
- Jette, N. & Lees-Miller, S. P. (2015).** The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. *Progress in biophysics and molecular biology* **117**, 194-205.

- Jha, H. C., A, J. M., Saha, A., Banerjee, S., Lu, J. & Robertson, E. S. (2014).** Epstein-Barr virus essential antigen EBNA3C attenuates H2AX expression. *Journal of virology* **88**, 3776-3788.
- Jiricny, J. (2006).** The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**, 335-346.
- Kalamvoki, M. & Roizman, B. (2011).** The histone acetyltransferase CLOCK is an essential component of the herpes simplex virus 1 transcriptome that includes TFIID, ICP4, ICP27, and ICP22. *Journal of virology* **85**, 9472-9477.
- 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. *Journal of virology* **79**, 6984-6996.
- Kamranvar, S. A. & Masucci, M. G. (2011).** The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress. *Leukemia* **25**, 1017-1025.
- Kastan, M. B. & Lim, D. S. (2000).** The many substrates and functions of ATM. *Nature reviews Molecular cell biology* **1**, 179-186.
- Kaufer, B. B., Jarosinski, K. W. & Osterrieder, N. (2011).** Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *The Journal of experimental medicine* **208**, 605-615.
- Kavouras, J. H., Prandovszky, E., Valyi-Nagy, K., Kovacs, S. K., Tiwari, V., Kovacs, M., Shukla, D. & Valyi-Nagy, T. (2007).** Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N neural cell cultures. *Journal of neurovirology* **13**, 416-425.
- Keles, H., Fidan, A. F., Cigerci, I. H., Kucukkurt, I., Karadas, E. & Dundar, Y. (2010).** Increased DNA damage and oxidative stress in chickens with natural Marek's disease. *Veterinary immunology and immunopathology* **133**, 51-58.
- Kempkes, B. & Robertson, E. S. (2015).** Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Curr Opin Virol* **14**, 138-144.
- Kent, J. R., Zeng, P. Y., Atanasiu, D., Gardner, J., Fraser, N. W. & Berger, S. L. (2004).** During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. *Journal of virology* **78**, 10178-10186.
- Kinjo, T., Ham-Terhune, J., Peloponese, J. M., Jr. & Jeang, K. T. (2010).** Induction of reactive oxygen species by human T-cell leukemia virus type 1 tax correlates with DNA damage and expression of cellular senescence marker. *Journal of virology* **84**, 5431-5437.
- Klupp, B. G., Granzow, H. & Mettenleiter, T. C. (2011).** Nuclear envelope breakdown can substitute for primary envelopment-mediated nuclear egress of herpesviruses. *Journal of virology* **85**, 8285-8292.
- Koffa, M. D., Clements, J. B., Izaurrealde, E., Wadd, S., Wilson, S. A., Mattaj, I. W. & Kuersten, S. (2001).** Herpes simplex virus ICP27 protein provides viral mRNAs with access to the cellular mRNA export pathway. *The EMBO journal* **20**, 5769-5778.
- Koganti, S., Hui-Yuen, J., McAllister, S., Gardner, B., Grasser, F., Palendira, U., Tangye, S. G., Freeman, A. F. & Bhaduri-McIntosh, S. (2014).** STAT3 interrupts ATR-Chk1 signaling to allow oncovirus-mediated cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 4946-4951.
- Kogoma, T. (1997).** Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **61**, 212-238.

- Kondo, N., Takahashi, A., Ono, K. & Ohnishi, T. (2010). DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of nucleic acids* **2010**, 543531.
- Koopal, S., Furuhielm, J. H., Jarviluoma, A., Jaamaa, S., Pyakurel, P., Pussinen, C., Wirzenius, M., Biberfeld, P., Alitalo, K., Laiho, M. & Ojala, P. M. (2007). Viral oncogene-induced DNA damage response is activated in Kaposi sarcoma tumorigenesis. *PLoS pathogens* **3**, 1348-1360.
- Korioth, F., Maul, G. G., Plachter, B., Stamminger, T. & Frey, J. (1996). The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res* **229**, 155-158.
- Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M. & Ishizaka, Y. (2013). DNA damage enhances integration of HIV-1 into macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* **10**, 21.
- Kudoh, A., Fujita, M., Zhang, L., Shirata, N., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Nishiyama, Y. & Tsurumi, T. (2005). Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *The Journal of biological chemistry* **280**, 8156-8163.
- Kumagai, A. & Dunphy, W. G. (1999). Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes & development* **13**, 1067-1072.
- Kumagai, A. & Dunphy, W. G. (2003). Repeated phosphopeptide motifs in Claspin mediate the regulated binding of Chk1. *Nature cell biology* **5**, 161-165.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y. & Dunphy, W. G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* **124**, 943-955.
- Kung, H. J., Xia, L., Brunovskis, P., Li, D., Liu, J. L. & Lee, L. F. (2001). Meq: an MDV-specific bZIP transactivator with transforming properties. *Current topics in microbiology and immunology* **255**, 245-260.
- Kuzminov, A. (1995). Collapse and repair of replication forks in Escherichia coli. *Molecular microbiology* **16**, 373-384.
- Lee, E., Oh, E., Lee, J. & Sul, D. (2004). Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **81**, 121-132.
- Lee, J. H. & Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**, 551-554.
- Lee, L. F., Kreager, K. S., Arango, J., Paraguassu, A., Beckman, B., Zhang, H., Fadly, A., Lupiani, B. & Reddy, S. M. (2010). Comparative evaluation of vaccine efficacy of recombinant Marek's disease virus vaccine lacking Meq oncogene in commercial chickens. *Vaccine* **28**, 1294-1299.
- Lee, L. F., Lupiani, B., Silva, R. F., Kung, H. J. & Reddy, S. M. (2008). Recombinant Marek's disease virus (MDV) lacking the Meq oncogene confers protection against challenge with a very virulent plus strain of MDV. *Vaccine* **26**, 1887-1892.
- Lee, S. H., Williams, M. V., Dubois, R. N. & Blair, I. A. (2005). Cyclooxygenase-2-mediated DNA damage. *The Journal of biological chemistry* **280**, 28337-28346.
- 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. *Archives of virology* **144**, 45-54.
- Lee, Y. L., Liu, C. E., Cho, W. L., Kuo, C. L., Cheng, W. L., Huang, C. S. & Liu, C. S. (2014). Presence of cytomegalovirus DNA in leucocytes is associated with increased oxidative stress and subclinical atherosclerosis in healthy adults. *Biomarkers* **19**, 109-113.

- Leitao, E., Costa, A. C., Brito, C., Costa, L., Pombinho, R., Cabanes, D. & Sousa, S. (2014). *Listeria monocytogenes* induces host DNA damage and delays the host cell cycle to promote infection. *Cell Cycle* **13**, 928-940.
- Leopardi, R., Michael, N. & Roizman, B. (1995). Repression of the herpes simplex virus 1 alpha 4 gene by its gene product (ICP4) within the context of the viral genome is conditioned by the distance and stereoaxial alignment of the ICP4 DNA binding site relative to the TATA box. *Journal of virology* **69**, 3042-3048.
- Leopardi, R., Ward, P. L., Ogle, W. O. & Roizman, B. (1997). Association of herpes simplex virus regulatory protein ICP22 with transcriptional complexes containing EAP, ICP4, RNA polymerase II, and viral DNA requires posttranslational modification by the U(L)13 protein kinase. *Journal of virology* **71**, 1133-1139.
- Leuzinger, H., Ziegler, U., Schraner, E. M., Fraefel, C., Glauser, D. L., Heid, I., Ackermann, M., Mueller, M. & Wild, P. (2005). Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *Journal of virology* **79**, 13047-13059.
- Levy, A. M., Gilad, O., Xia, L., Izumiya, Y., Choi, J., Tsalenko, A., Yakhini, Z., Witter, R., Lee, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14831-14836.
- Levy, A. M., Izumiya, Y., Brunovskis, P., Xia, L., Parcells, M. S., Reddy, S. M., Lee, L., Chen, H. W. & Kung, H. J. (2003). Characterization of the chromosomal binding sites and dimerization partners of the viral oncoprotein Meq in Marek's disease virus-transformed T cells. *Journal of virology* **77**, 12841-12851.
- Li, D., O'Sullivan, G., Greenall, L., Smith, G., Jiang, C. & Ross, N. (1998). Further characterization of the latency-associated transcription unit of Marek's disease virus. *Archives of virology* **143**, 295-311.
- Li, H., Baskaran, R., Krisky, D. M., Bein, K., Grandi, P., Cohen, J. B. & Glorioso, J. C. (2008). Chk2 is required for HSV-1 ICP0-mediated G2/M arrest and enhancement of virus growth. *Virology* **375**, 13-23.
- Li, H. & Glorioso, J. C. (2004). Activation of an ATM/chk2-dependent pathway is required for HSV-1 protein ICP0 induced G2/M cell cycle arrest. *Mol Ther* **9**, S247-S247.
- Li, R., Zhu, J., Xie, Z., Liao, G., Liu, J., Chen, M. R., Hu, S., Woodard, C., Lin, J., Taverna, S. D., Desai, P., Ambinder, R. F., Hayward, G. S., Qian, J., Zhu, H. & Hayward, S. D. (2011). Conserved herpesvirus kinases target the DNA damage response pathway and TIP60 histone acetyltransferase to promote virus replication. *Cell host & microbe* **10**, 390-400.
- Li, X. & Schat, K. A. (2004). Quail cell lines supporting replication of Marek's disease virus serotype 1 and 2 and herpesvirus of turkeys. *Avian diseases* **48**, 803-812.
- Lilley, C. E., Carson, C. T., Muotri, A. R., Gage, F. H. & Weitzman, M. D. (2005). DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5844-5849.
- Lilley, C. E., Chaurushiya, M. S., Boutell, C., Everett, R. D. & Weitzman, M. D. (2011). The intrinsic antiviral defense to incoming HSV-1 genomes includes specific DNA repair proteins and is counteracted by the viral protein ICP0. *PLoS pathogens* **7**, e1002084.
- Lilley, C. E., Chaurushiya, M. S., Boutell, C., Landry, S., Suh, J., Panier, S., Everett, R. D., Stewart, G. S., Durocher, D. & Weitzman, M. D. (2010). A viral E3 ligase targets RNF8 and RNF168 to control histone ubiquitination and DNA damage responses. *The EMBO journal* **29**, 943-955.

- Lilley, C. E., Schwartz, R. A. & Weitzman, M. D. (2007).** Using or abusing: viruses and the cellular DNA damage response. *Trends in microbiology* **15**, 119-126.
- Lindahl, T. (1993).** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Lindahl, T. & Barnes, D. E. (2000).** Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **65**, 127-133.
- Liu, F. & Zhou, Z. H. (2007).** Comparative virion structures of human herpesviruses. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Edited by A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P. S. Moore, B. Roizman, R. Whitley & K. Yamanishi. Cambridge.
- Liu, J. L. & Kung, H. J. (2000).** Marek's disease herpesvirus transforming protein MEQ: a c-Jun analogue with an alternative life style. *Virus genes* **21**, 51-64.
- Liu, J. L., Lin, S. F., Xia, L., Brunovskis, P., Li, D., Davidson, I., Lee, L. F. & Kung, H. J. (1999).** MEQ and V-IL8: cellular genes in disguise? *Acta virologica* **43**, 94-101.
- Liu, J. L., Ye, Y., Lee, L. F. & Kung, H. J. (1998).** Transforming potential of the herpesvirus oncoprotein MEQ: morphological transformation, serum-independent growth, and inhibition of apoptosis. *Journal of virology* **72**, 388-395.
- Luftig, M. A. (2014).** Viruses and the DNA Damage Response: Activation and Antagonism. *Ann Rev Virol* **1**, 605-625.
- Luo, J., Sun, A. J., Teng, M., Zhou, H., Cui, Z. Z., Qu, L. H. & Zhang, G. P. (2011).** Expression profiles of microRNAs encoded by the oncogenic Marek's disease virus reveal two distinct expression patterns in vivo during different phases of disease. *The Journal of general virology* **92**, 608-620.
- Luo, M. H., Rosenke, K., Czornak, K. & Fortunato, E. A. (2007).** Human cytomegalovirus disrupts both ataxia telangiectasia mutated protein (ATM)- and ATM-Rad3-related kinase-mediated DNA damage responses during lytic infection. *Journal of virology* **81**, 1934-1950.
- Lupiani, B., Lee, L. F., Cui, X., Gimeno, I., Anderson, A., Morgan, R. W., Silva, R. F., Witter, R. L., Kung, H. J. & Reddy, S. M. (2004).** Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11815-11820.
- Ma, Q., Cavallin, L. E., Leung, H. J., Chiozzini, C., Goldschmidt-Clermont, P. J. & Mesri, E. A. (2013).** A role for virally induced reactive oxygen species in Kaposi's sarcoma herpesvirus tumorigenesis. *Antioxidants & redox signaling* **18**, 80-90.
- Machado, A. M., Figueiredo, C., Seruca, R. & Rasmussen, L. J. (2010).** Helicobacter pylori infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochimica et biophysica acta* **1806**, 58-65.
- Machado, A. M., Figueiredo, C., Touati, E., Maximo, V., Sousa, S., Michel, V., Carneiro, F., Nielsen, F. C., Seruca, R. & Rasmussen, L. J. (2009).** Helicobacter pylori infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 2995-3002.
- Mah, L. J., El-Osta, A. & Karagiannis, T. C. (2010).** gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **24**, 679-686.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. & Gorbunova, V. (2008).** DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* **7**, 2902-2906.

- Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W. & Hoeijmakers, J. H. (2014).** Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology* **15**, 465-481.
- Martincic, D. & Hande, K. R. (2005).** Topoisomerase II inhibitors. *Cancer chemotherapy and biological response modifiers* **22**, 101-121.
- Matsuoka, S., Huang, M. & Elledge, S. J. (1998).** Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**, 1893-1897.
- Maul, G. G., Negorev, D., Bell, P. & Ishov, A. M. (2000).** Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *Journal of structural biology* **129**, 278-287.
- McBride, K. A., Ballinger, M. L., Killick, E., Kirk, J., Tattersall, M. H., Eeles, R. A., Thomas, D. M. & Mitchell, G. (2014).** Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management. *Nature reviews Clinical oncology* **11**, 260-271.
- McKie, E. A., Ubukata, E., Hasegawa, S., Zhang, S., Nonoyama, M. & Tanaka, A. (1995).** The transcripts from the sequences flanking the short component of Marek's disease virus during latent infection form a unique family of 3'-coterminal RNAs. *Journal of virology* **69**, 1310-1314.
- McKinney, C. C., Hussmann, K. L. & McBride, A. A. (2015).** The Role of the DNA Damage Response throughout the Papillomavirus Life Cycle. *Viruses* **7**, 2450-2469.
- Medjkane, S., Perichon, M., Marsolier, J., Dairou, J. & Weitzman, J. B. (2014).** Theileria induces oxidative stress and HIF1alpha activation that are essential for host leukocyte transformation. *Oncogene* **33**, 1809-1817.
- Mesri, E. A., Feitelson, M. A. & Munger, K. (2014).** Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell host & microbe* **15**, 266-282.
- Mettenleiter, T. C., Muller, F., Granzow, H. & Klupp, B. G. (2013).** The way out: what we know and do not know about herpesvirus nuclear egress. *Cellular microbiology* **15**, 170-178.
- Mielecki, D., Wrzesinski, M. & Grzesiuk, E. (2015).** Inducible repair of alkylated DNA in microorganisms. *Mutation research Reviews in mutation research* **763**, 294-305.
- Millhouse, S., Su, Y. H., Zhang, X., Wang, X., Song, B. P., Zhu, L., Oppenheim, E., Fraser, N. W. & Block, T. M. (2010).** Evidence that herpes simplex virus DNA derived from quiescently infected cells in vitro, and latently infected cells in vivo, is physically damaged. *Journal of neurovirology* **16**, 384-398.
- Mishina, Y., Duguid, E. M. & He, C. (2006).** Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chemical reviews* **106**, 215-232.
- Mohni, K. N., Dee, A. R., Smith, S., Schumacher, A. J. & Weller, S. K. (2013a).** Efficient herpes simplex virus 1 replication requires cellular ATR pathway proteins. *Journal of virology* **87**, 531-542.
- Mohni, K. N., Livingston, C. M., Cortez, D. & Weller, S. K. (2010).** ATR and ATRIP are recruited to herpes simplex virus type 1 replication compartments even though ATR signaling is disabled. *Journal of virology* **84**, 12152-12164.
- Mohni, K. N., Smith, S., Dee, A. R., Schumacher, A. J. & Weller, S. K. (2013b).** Herpes simplex virus type 1 single strand DNA binding protein and helicase/primase complex disable cellular ATR signaling. *PLoS pathogens* **9**, e1003652.
- Morgan, R. W., Xie, Q., Cantello, J. L., Miles, A. M., Bernberg, E. L., Kent, J. & Anderson, A. (2001).** Marek's disease virus latency. *Current topics in microbiology and immunology* **255**, 223-243.
- Morimura, T., Ohashi, K., Kon, Y., Hattori, M., Sugimoto, C. & Onuma, M. (1997).** Apoptosis in peripheral CD4⁺T cells and thymocytes by Marek's disease virus-infection. *Leukemia* **11 Suppl 3**, 206-208.

- Morissette, G. & Flamand, L. (2010).** Herpesviruses and chromosomal integration. *Journal of virology* **84**, 12100-12109.
- Mu, J. & Wei, L. X. (2002).** Telomere and telomerase in oncology. *Cell research* **12**, 1-7.
- Muylaert, I., Tang, K. W. & Elias, P. (2011).** Replication and recombination of herpes simplex virus DNA. *The Journal of biological chemistry* **286**, 15619-15624.
- Muylkens, B., Coupeau, D., Dambrine, G., Trapp, S. & Rasschaert, D. (2010).** Marek's disease virus microRNA designated Mdv1-pre-miR-M4 targets both cellular and viral genes. *Archives of virology* **155**, 1823-1837.
- Mwangi, W. N., Smith, L. P., Baigent, S. J., Beal, R. K., Nair, V. & Smith, A. L. (2011).** Clonal structure of rapid-onset MDV-driven CD4⁺ lymphomas and responding CD8⁺ T cells. *PLoS pathogens* **7**, e1001337.
- Nair, V. (2004).** Successful control of Marek's disease by vaccination. *Developments in biologicals* **119**, 147-154.
- Nair, V. (2005).** Evolution of Marek's disease -- a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *Vet J* **170**, 175-183.
- Nair, V. (2013).** Latency and tumorigenesis in Marek's disease. *Avian diseases* **57**, 360-365.
- Nam, E. A. & Cortez, D. (2011).** ATR signalling: more than meeting at the fork. *The Biochemical journal* **436**, 527-536.
- Nevels, M., Nitzsche, A. & Paulus, C. (2011).** How to control an infectious bead string: nucleosome-based regulation and targeting of herpesvirus chromatin. *Reviews in medical virology* **21**, 154-180.
- Nicoll, M. P., Proenca, J. T. & Efstathiou, S. (2012).** The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS microbiology reviews* **36**, 684-705.
- Nikitin, P. A. & Luftig, M. A. (2011).** At a crossroads: human DNA tumor viruses and the host DNA damage response. *Future virology* **6**, 813-830.
- Nikitin, P. A. & Luftig, M. A. (2012).** The DNA damage response in viral-induced cellular transformation. *British journal of cancer* **106**, 429-435.
- Nikitin, P. A., Yan, C. M., Forte, E., Bocedi, A., Tourigny, J. P., White, R. E., Allday, M. J., Patel, A., Dave, S. S., Kim, W., Hu, K., Guo, J., Tainter, D., Rusyn, E. & Luftig, M. A. (2010).** An ATM/Chk2-mediated DNA damage-responsive signaling pathway suppresses Epstein-Barr virus transformation of primary human B cells. *Cell host & microbe* **8**, 510-522.
- Nougayrede, J. P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U. & Oswald, E. (2006).** Escherichia coli induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* **313**, 848-851.
- O'Donnell, L. A., Clemmer, J. A., Czymmek, K. & Schmidt, C. J. (2002).** Marek's disease virus VP22: subcellular localization and characterization of carboxyl terminal deletion Mutations. *Virology* **292**, 235-240.
- O'Dowd, J. M., Zavala, A. G., Brown, C. J., Mori, T. & Fortunato, E. A. (2012).** HCMV-infected cells maintain efficient nucleotide excision repair of the viral genome while abrogating repair of the host genome. *PLoS pathogens* **8**, e1003038.
- Ojala, P. M., Sodeik, B., Ebersold, M. W., Kutay, U. & Helenius, A. (2000).** Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Molecular and cellular biology* **20**, 4922-4931.
- Okazaki, W., Purchase, H. G. & Burmester, B. R. (1970).** Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. *Avian diseases* **14**, 413-429.
- Olive, P. L., Trotter, T., Banath, J. P., Jackson, S. M. & Le Riche, J. (1996a).** Heterogeneity in human tumour hypoxic fraction using the comet assay. *The British journal of cancer Supplement* **27**, S191-195.

- Olive, P. L., Vikse, C. M. & Banath, J. P. (1996b).** Use of the comet assay to identify cells sensitive to tirapazamine in multicell spheroids and tumors in mice. *Cancer research* **56**, 4460-4463.
- Orlando, J. S., Balliet, J. W., Kushnir, A. S., Astor, T. L., Kosz-Vnenchak, M., Rice, S. A., Knipe, D. M. & Schaffer, P. A. (2006).** ICP22 is required for wild-type composition and infectivity of herpes simplex virus type 1 virions. *Journal of virology* **80**, 9381-9390.
- 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**, 283-294.
- Pabla, N., Ma, Z., McIlhatton, M. A., Fishel, R. & Dong, Z. (2011).** hMSH2 recruits ATR to DNA damage sites for activation during DNA damage-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **286**, 10411-10418.
- Parcells, M. S., Dienglewicz, R. L., Anderson, A. S. & Morgan, R. W. (1999).** Recombinant Marek's disease virus (MDV)-derived lymphoblastoid cell lines: regulation of a marker gene within the context of the MDV genome. *Journal of virology* **73**, 1362-1373.
- 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. *Journal of virology* **75**, 5159-5173.
- Parkinson, J., Lees-Miller, S. P. & Everett, R. D. (1999).** Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *Journal of virology* **73**, 650-657.
- Paull, T. T. & Lee, J. H. (2005).** The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* **4**, 737-740.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. & Bonner, W. M. (2000).** A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current biology : CB* **10**, 886-895.
- Pawelczak, K. S., Bennett, S. M. & Turchi, J. J. (2011).** Coordination of DNA-PK activation and nuclease processing of DNA termini in NHEJ. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 2531-2543.
- Pellett PE, R. B. (2007).** The family herpesviridae: A brief introduction. In *Fields virology, 5th edition*, pp. 2479-2499. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Pena-Diaz, J. & Jiricny, J. (2012).** Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends in biochemical sciences* **37**, 206-214.
- Peng, F., Bradley, G., Tanaka, A., Lancz, G. & Nonoyama, M. (1992).** Isolation and characterization of cDNAs from BamHI-H gene family RNAs associated with the tumorigenicity of Marek's disease virus. *Journal of virology* **66**, 7389-7396.
- Peng, F., Specter, S., Tanaka, A. & Nonoyama, M. (1994).** A 7-kda protein encoded by the bamhi-h gene family of marek's-disease virus is produced in lytically and latently infected-cells. *International journal of oncology* **4**, 799-802.
- Peng, Q. & Shirazi, Y. (1996).** Characterization of the protein product encoded by a splicing variant of the Marek's disease virus Eco-Q gene (Meq). *Virology* **226**, 77-82.
- Peng, Q., Zeng, M., Bhuiyan, Z. A., Ubukata, E., Tanaka, A., Nonoyama, M. & Shirazi, Y. (1995).** Isolation and characterization of Marek's disease virus (MDV) cDNAs mapping to the BamHI-I2, BamHI-Q2, and BamHI-L fragments of the MDV genome from lymphoblastoid cells transformed and persistently infected with MDV. *Virology* **213**, 590-599.

- Perng, G. C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S. M., Hofman, F. M., Ghiasi, H., Nesburn, A. B. & Wechsler, S. L. (2000).** Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* **287**, 1500-1503.
- Perusina Lanfranca, M., Mostafa, H. H. & Davido, D. J. (2013).** Two overlapping regions within the N-terminal half of the herpes simplex virus 1 E3 ubiquitin ligase ICP0 facilitate the degradation and dissociation of PML and dissociation of Sp100 from ND10. *Journal of virology* **87**, 13287-13296.
- Poffenberger, K. L., Idowu, A. D., Fraser-Smith, E. B., Raichlen, P. E. & Herman, R. C. (1994).** A herpes simplex virus type 1 ICP22 deletion mutant is altered for virulence and latency in vivo. *Archives of virology* **139**, 111-119.
- Poirier, M. C. & Beland, F. A. (1997).** Aromatic amine DNA adduct formation in chronically-exposed mice: considerations for human comparison. *Mutation research* **376**, 177-184.
- Povirk, L. F. (1996).** DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutation research* **355**, 71-89.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P. & Lopez, B. S. (2012).** [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother* **16**, 1-10.
- Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B. & Sinha, R. P. (2010).** Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of nucleic acids* **2010**, 592980.
- Rauwel, B., Jang, S. M., Cassano, M., Kapopoulou, A., Barde, I. & Trono, D. (2015).** Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch. *eLife* **4**.
- Ravanat, J. L., Douki, T. & Cadet, J. (2001).** Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* **63**, 88-102.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 7054-7059.
- Regad, T. & Chelbi-Alix, M. K. (2001).** Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* **20**, 7274-7286.
- Remy, S., Blondeau, C., Le Vern, Y., Lemesle, M., Vautherot, J. F. & Denesvre, C. (2013).** Fluorescent tagging of VP22 in N-terminus reveals that VP22 favors Marek's disease virus (MDV) virulence in chickens and allows morphogenesis study in MD tumor cells. *Veterinary research* **44**, 125.
- Rivera-Calzada, A., Maman, J. D., Spagnolo, L., Pearl, L. H. & Llorca, O. (2005).** Three-dimensional structure and regulation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs). *Structure* **13**, 243-255.
- Rivera-Molina, Y. A., Martinez, F. P. & Tang, Q. (2013).** Nuclear domain 10 of the viral aspect. *World journal of virology* **2**, 110-122.
- Robinson, C. M., Cheng, H. H. & Delany, M. E. (2014).** Temporal kinetics of Marek's disease herpesvirus: integration occurs early after infection in both B and T cells. *Cytogenetic and genome research* **144**, 142-154.
- Robinson, C. M., Hunt, H. D., Cheng, H. H. & Delany, M. E. (2010).** Chromosomal integration of an avian oncogenic herpesvirus reveals telomeric preferences and evidence for lymphoma clonality. *Herpesviridae* **1**, 5.

- Roizman, B. & Baines, J. (1991).** The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **14**, 63-79.
- Roizman, B., Gu, H. & Mandel, G. (2005).** The first 30 minutes in the life of a virus: unREST in the nucleus. *Cell Cycle* **4**, 1019-1021.
- Roizmann, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A. C. & Studdert, M. J. (1992).** The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of virology* **123**, 425-449.
- Ross, N., O'Sullivan, G., Rothwell, C., Smith, G., Burgess, S. C., 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. *The Journal of general virology* **78** (Pt 9), 2191-2198.
- Sacks, W. R. & Schaffer, P. A. (1987).** Deletion mutants in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 exhibit impaired growth in cell culture. *Journal of virology* **61**, 829-839.
- Saha, A., Halder, S., Upadhyay, S. K., Lu, J., Kumar, P., Murakami, M., Cai, Q. & Robertson, E. S. (2011).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C facilitates G1-S transition by stabilizing and enhancing the function of cyclin D1. *PLoS pathogens* **7**, e1001275.
- Saha, A., Lu, J., Morizur, L., Upadhyay, S. K., Aj, M. P. & Robertson, E. S. (2012).** E2F1 mediated apoptosis induced by the DNA damage response is blocked by EBV nuclear antigen 3C in lymphoblastoid cells. *PLoS pathogens* **8**, e1002573.
- Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Bajaj, B., Sims, K. & Robertson, E. S. (2009).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *Journal of virology* **83**, 4652-4669.
- Salsman, J., Jagannathan, M., Paladino, P., Chan, P. K., Dellaire, G., Raught, B. & Frappier, L. (2012).** Proteomic profiling of the human cytomegalovirus UL35 gene products reveals a role for UL35 in the DNA repair response. *Journal of virology* **86**, 806-820.
- Samba-Louaka, A., Pereira, J. M., Nahori, M. A., Villiers, V., Deriano, L., Hamon, M. A. & Cossart, P. (2014).** Listeria monocytogenes dampens the DNA damage response. *PLoS pathogens* **10**, e1004470.
- Sampath, P. & Deluca, N. A. (2008).** Binding of ICP4, TATA-binding protein, and RNA polymerase II to herpes simplex virus type 1 immediate-early, early, and late promoters in virus-infected cells. *Journal of virology* **82**, 2339-2349.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. & Elledge, S. J. (1997).** Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**, 1497-1501.
- Sato, Y., Kamura, T., Shirata, N., Murata, T., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Isomura, H., Nishiyama, Y. & Tsurumi, T. (2009a).** Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex. *PLoS pathogens* **5**, e1000530.
- Sato, Y., Shirata, N., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Murata, T., Isomura, H., Nishiyama, Y. & Tsurumi, T. (2009b).** Expression of Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early protein induces p53 degradation independent of MDM2, leading to repression of p53-mediated transcription. *Virology* **388**, 204-211.
- Schat, K. A., Calnek, B. W., Fabricant, J. & Graham, D. L. (1985).** Pathogenesis of infection with attenuated Marek's disease virus strains. *Avian pathology : journal of the WVPA* **14**, 127-146.

- Schatz, D. G., Oettinger, M. A. & Schlissel, M. S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annual review of immunology* **10**, 359-383.
- Sciabica, K. S., Dai, Q. J. & Sandri-Goldin, R. M. (2003). ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *The EMBO journal* **22**, 1608-1619.
- Scully, R. & Xie, A. (2013). Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation research* **750**, 5-14.
- Secchiero, P., Nicholas, J., Deng, H., Xiaopeng, T., van Loon, N., Ruvolo, V. R., Berneman, Z. N., Reitz, M. S., Jr. & Dewhurst, S. (1995). Identification of human telomeric repeat motifs at the genome termini of human herpesvirus 7: structural analysis and heterogeneity. *Journal of virology* **69**, 8041-8045.
- Sedy, J. R., Spear, P. G. & Ware, C. F. (2008). Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. *Nature reviews Immunology* **8**, 861-873.
- Seliger C1, S. B., Kohn M, Pendl H, Weigend S, Kaspers B, Härtle S. A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens.
- Seliger, C., Schaerer, B., Kohn, M., Pendl, H., Weigend, S., Kaspers, B. & Hartle, S. (2012). A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens. *Veterinary immunology and immunopathology* **145**, 86-99.
- Sfeir, A. & Symington, L. S. (2015). Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends in biochemical sciences*.
- Sharma, B. M. a. J. (2004). Vaccination against Marek's disease. In *Marek's disease: an evolving problem*, pp. 168-182. London: Fred Davison and Venugopal Nair.
- Shiloh, Y. & Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**, 197-210.
- Shin, Y. C., Nakamura, H., Liang, X., Feng, P., Chang, H., Kowalik, T. F. & Jung, J. U. (2006). Inhibition of the ATM/p53 signal transduction pathway by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interferon regulatory factor 1. *Journal of virology* **80**, 2257-2266.
- Shirata N1, K. A., Daikoku T, Tatsumi Y, Fujita M, Kiyono T, Sugaya Y, Isomura H, Ishizaki K, Tsurumi T. (2005). Activation of ataxia telangiectasia-mutated DNA damage checkpoint signal transduction elicited by herpes simplex virus infection.
- Shirata, N., Kudoh, A., Daikoku, T., Tatsumi, Y., Fujita, M., Kiyono, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Ishizaki, K. & Tsurumi, T. (2005). Activation of ataxia telangiectasia-mutated DNA damage checkpoint signal transduction elicited by herpes simplex virus infection. *The Journal of biological chemistry* **280**, 30336-30341.
- Shkreli, M., Dambrine, G., Soubieux, D., Kut, E. & Rasschaert, D. (2007). Involvement of the oncoprotein c-Myc in viral telomerase RNA gene regulation during Marek's disease virus-induced lymphomagenesis. *Journal of virology* **81**, 4848-4857.
- Siddiqi, M. A. & Bothe, E. (1987). Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiation research* **112**, 449-463.
- Simoës, M., Martins, C. & Ferreira, F. (2013). Host DNA damage response facilitates African swine fever virus infection. *Veterinary microbiology* **165**, 140-147.
- Sinclair, A., Yarranton, S. & Schelcher, C. (2006). DNA-damage response pathways triggered by viral replication. *Expert reviews in molecular medicine* **8**, 1-11.
- Skalka, A. M. & Katz, R. A. (2005). Retroviral DNA integration and the DNA damage response. *Cell death and differentiation* **12 Suppl 1**, 971-978.
- Smith-Donald, B. A., Durand, L. O. & Roizman, B. (2008). Role of cellular phosphatase cdc25C in herpes simplex virus 1 replication. *Journal of virology* **82**, 4527-4532.

- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. & Gillespie, D. A. (2010).** The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research* **108**, 73-112.
- Smith, S., Reuven, N., Mohni, K. N., Schumacher, A. J. & Weller, S. K. (2014).** Structure of the herpes simplex virus 1 genome: manipulation of nicks and gaps can abrogate infectivity and alter the cellular DNA damage response. *Journal of virology* **88**, 10146-10156.
- Smits, V. A. & Gillespie, D. A. (2015).** DNA damage control: regulation and functions of checkpoint kinase 1. *The FEBS journal* **282**, 3681-3692.
- Sodeik, B. (2000).** Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends in microbiology* **8**, 465-472.
- Sorensen, C. S., Syljuasen, R. G., Lukas, J. & Bartek, J. (2004).** ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage. *Cell Cycle* **3**, 941-945.
- Speck, S. H. & Ganem, D. (2010).** Viral latency and its regulation: lessons from the gamma-herpesviruses. *Cell host & microbe* **8**, 100-115.
- Speed, N. & Blair, I. A. (2011).** Cyclooxygenase- and lipoxygenase-mediated DNA damage. *Cancer metastasis reviews* **30**, 437-447.
- Stich, H. F., Hsu, T. C. & Rapp, F. (1964).** Viruses and Mammalian Chromosomes. I. Localization of Chromosome Aberrations after Infection with Herpes Simplex Virus. *Virology* **22**, 439-445.
- Stracker, T. H. & Petrini, J. H. (2011).** The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**, 90-103.
- Strang, B. L. & Stow, N. D. (2005).** Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *Journal of virology* **79**, 12487-12494.
- Su, Y. H., Zhang, X., Wang, X., Fraser, N. W. & Block, T. M. (2006).** Evidence that the immediate-early gene product ICP4 is necessary for the genome of the herpes simplex virus type 1 ICP4 deletion mutant strain d120 to circularize in infected cells. *Journal of virology* **80**, 11589-11597.
- Suchodolski, P. F., Izumiya, Y., Lupiani, B., Ajithdoss, D. K., Gilad, O., Lee, L. F., Kung, H. J. & Reddy, S. M. (2009).** Homodimerization of Marek's disease virus-encoded Meq protein is not sufficient for transformation of lymphocytes in chickens. *Journal of virology* **83**, 859-869.
- Sun, A., Li, Y., Wang, J., Su, S., Chen, H., Zhu, H., Ding, J. & Cui, Z. (2010).** Deletion of 1.8-kb mRNA of Marek's disease virus decreases its replication ability but not oncogenicity. *Virology journal* **7**, 294.
- Tarakanova, V. L., Leung-Pineda, V., Hwang, S., Yang, C. W., Matatall, K., Basson, M., Sun, R., Piwnica-Worms, H., Sleckman, B. P. & Virgin, H. W. t. (2007).** Gamma-herpesvirus kinase actively initiates a DNA damage response by inducing phosphorylation of H2AX to foster viral replication. *Cell host & microbe* **1**, 275-286.
- Tavalai, N. & Stamminger, T. (2008).** New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. *Biochimica et biophysica acta* **1783**, 2207-2221.
- Teive, H. A., Moro, A., Moscovich, M., Arruda, W. O., Munhoz, R. P., Raskin, S. & Ashizawa, T. (2015).** Ataxia-telangiectasia - A historical review and a proposal for a new designation: ATM syndrome. *Journal of the neurological sciences* **355**, 3-6.
- Teng, M., Yu, Z. H., Sun, A. J., Min, Y. J., Chi, J. Q., Zhao, P., Su, J. W., Cui, Z. Z., Zhang, G. P. & Luo, J. (2015).** The significance of the individual Meq-clustered miRNAs of Marek's disease virus in oncogenesis. *The Journal of general virology* **96**, 637-649.

- Terrin, L., Dal Col, J., Rampazzo, E., Zancai, P., Pedrotti, M., Ammirabile, G., Bergamin, S., Rizzo, S., Dolcetti, R. & De Rossi, A. (2008).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus activates the hTERT promoter and enhances telomerase activity in B lymphocytes. *Journal of virology* **82**, 10175-10187.
- Tessitore, A., Cicciarelli, G., Del Vecchio, F., Gaggiano, A., Verzella, D., Fischietti, M., Vecchiotti, D., Capece, D., Zazzeroni, F. & Alesse, E. (2014).** MicroRNAs in the DNA Damage/Repair Network and Cancer. *International journal of genomics* **2014**, 820248.
- Toller, I. M., Neelsen, K. J., Steger, M., Hartung, M. L., Hottiger, M. O., Stucki, M., Kalali, B., Gerhard, M., Sartori, A. A., Lopes, M. & Muller, A. (2011).** Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 14944-14949.
- Tomas Lindahl, Björn Rydberg, Thomas Hjelmgren, Monica Olsson & Jacobsson, A. (1983).** Cellular Defense Mechanisms Against Alkylation of DNA In *Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis* pp. 89-102
- Trapp-Fragnet, L., Bencherit, D., Chabanne-Vautherot, D., Le Vern, Y., Remy, S., Boutet-Robinet, E., Mirey, G., Vautherot, J. F. & Denesvre, C. (2014).** Cell cycle modulation by Marek's disease virus: the tegument protein VP22 triggers S-phase arrest and DNA damage in proliferating cells. *PloS one* **9**, e100004.
- Trapp, S., Parcels, M. S., Kamil, J. P., Schumacher, D., Tischer, B. K., Kumar, P. M., Nair, V. K. & Osterrieder, N. (2006).** A virus-encoded telomerase RNA promotes malignant T cell lymphomagenesis. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1307-1317.
- Truong, L. N., Li, Y., Shi, L. Z., Hwang, P. Y., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M. W. & Wu, X. (2013).** Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 7720-7725.
- Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Rock, D. L. & Kutish, G. F. (2000).** The genome of a very virulent Marek's disease virus. *Journal of virology* **74**, 7980-7988.
- Turnell, A. S. & Grand, R. J. (2012a).** DNA viruses and the cellular DNA-damage response. *The Journal of general virology* **93**, 2076-2097.
- Turnell, A. S. & Grand, R. J. (2012b).** DNA viruses and the cellular DNA-damage response. *Journal of General Virology* **93**, 2076-2097.
- Umbach, J. L., Kramer, M. F., Jurak, I., Karnowski, H. W., Coen, D. M. & Cullen, B. R. (2008).** MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* **454**, 780-783.
- Uppal, T., Banerjee, S., Sun, Z., Verma, S. C. & Robertson, E. S. (2014).** KSHV LANA-- the master regulator of KSHV latency. *Viruses* **6**, 4961-4998.
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M. & Bonassi, S. (2013).** gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation research* **753**, 24-40.
- van der Burg, M., van Dongen, J. J. & van Gent, D. C. (2009).** DNA-PKcs deficiency in human: long predicted, finally found. *Current opinion in allergy and clinical immunology* **9**, 503-509.
- van Gent, D. C., Ramsden, D. A. & Gellert, M. (1996).** The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell* **85**, 107-113.
- van Steeg, H. & Kraemer, K. H. (1999).** Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Molecular medicine today* **5**, 86-94.

- Verma, S. C., Borah, S. & Robertson, E. S. (2004).** Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus up-regulates transcription of human telomerase reverse transcriptase promoter through interaction with transcription factor Sp1. *Journal of virology* **78**, 10348-10359.
- Vilenchik, M. M. & Knudson, A. G. (2003).** Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12871-12876.
- Wagner, L. M. & DeLuca, N. A. (2013).** Temporal association of herpes simplex virus ICP4 with cellular complexes functioning at multiple steps in PolII transcription. *PloS one* **8**, e78242.
- Walker, J. V. & Nitiss, J. L. (2002).** DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer investigation* **20**, 570-589.
- Wallace, S. S. (2014).** Base excision repair: a critical player in many games. *DNA repair* **19**, 14-26.
- Wan, G., Mathur, R., Hu, X., Zhang, X. & Lu, X. (2011).** miRNA response to DNA damage. *Trends in biochemical sciences* **36**, 478-484.
- Wang'ondur, R., Teal, S., Park, R., Heston, L., Delecluse, H. & Miller, G. (2015).** DNA Damage Signaling Is Induced in the Absence of Epstein-Barr Virus (EBV) Lytic DNA Replication and in Response to Expression of ZEBRA. *PloS one* **10**, e0126088.
- Wang, Q. Y., Zhou, C., Johnson, K. E., Colgrove, R. C., Coen, D. M. & Knipe, D. M. (2005).** Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16055-16059.
- Weitzman, M. D., Lilley, C. E. & Chaurushiya, M. S. (2010).** Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. *Annual review of microbiology* **64**, 61-81.
- Weitzman, M. D. & Weitzman, J. B. (2014).** What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. *Cell host & microbe* **15**, 283-294.
- Wen, K. W. & Damania, B. (2010).** Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. *Cancer letters* **289**, 140-150.
- Wilkinson, D. E. & Weller, S. K. (2006).** Herpes simplex virus type I disrupts the ATR-dependent DNA-damage response during lytic infection. *Journal of cell science* **119**, 2695-2703.
- Witter, R. L. (1997).** Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian diseases* **41**, 149-163.
- Witter, R. L., Nazerian, K., Purchase, H. G. & Burgoyne, G. H. (1970).** Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *American journal of veterinary research* **31**, 525-538.
- Wold, M. S. (1997).** Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual review of biochemistry* **66**, 61-92.
- Wu, C. C., Liu, M. T., Chang, Y. T., Fang, C. Y., Chou, S. P., Liao, H. W., Kuo, K. L., Hsu, S. L., Chen, Y. R., Wang, P. W., Chen, Y. L., Chuang, H. Y., Lee, C. H., Chen, M., Wayne Chang, W. S. & Chen, J. Y. (2010).** Epstein-Barr virus DNase (BGLF5) induces genomic instability in human epithelial cells. *Nucleic acids research* **38**, 1932-1949.
- Wu, X. Y., Qian, J. J., Lin, Y. & Zheng, M. H. (2008).** Hepatitis B virus X protein disrupts DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C induced ATR dependent intra-S-phase checkpoint. *Eur J Cancer* **44**, 1596-1602.

- Wysocka, J. & Herr, W. (2003). The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends in biochemical sciences* **28**, 294-304.
- Xiao, Y., Chen, J., Liao, Q., Wu, Y., Peng, C. & Chen, X. (2013). Lytic infection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces DNA double-strand breaks and impairs non-homologous end joining. *The Journal of general virology* **94**, 1870-1875.
- Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A. H., Sowin, T. J., Rosenberg, S. H., Fesik, S. & Zhang, H. (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *The Journal of biological chemistry* **278**, 21767-21773.
- Xiaofei, E. & Kowalik, T. F. (2014). The DNA damage response induced by infection with human cytomegalovirus and other viruses. *Viruses* **6**, 2155-2185.
- Xing, Z. & Schat, K. A. (2000a). Expression of cytokine genes in Marek's disease virus-infected chickens and chicken embryo fibroblast cultures. *Immunology* **100**, 70-76.
- Xing, Z. & Schat, K. A. (2000b). Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's disease virus. *Journal of virology* **74**, 3605-3612.
- Yamamoto, T., Ali, M. A., Liu, X. & Cohen, J. I. (2014). Activation of H2AX and ATM in varicella-zoster virus (VZV)-infected cells is associated with expression of specific VZV genes. *Virology* **452-453**, 52-58.
- Yao, Y., Zhao, Y., Xu, H., Smith, L. P., Lawrie, C. H., Watson, M. & Nair, V. (2008). MicroRNA profile of Marek's disease virus-transformed T-cell line MSB-1: predominance of virus-encoded microRNAs. *Journal of virology* **82**, 4007-4015.
- Yi, F., Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Knight, J. S., Cai, Q., Choudhuri, T. & Robertson, E. S. (2009). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C targets p53 and modulates its transcriptional and apoptotic activities. *Virology* **388**, 236-247.
- Yonekura, S., Nakamura, N., Yonei, S. & Zhang-Akiyama, Q. M. (2009). Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA. *Journal of radiation research* **50**, 19-26.
- Yoo, S. & Dynan, W. S. (1999). Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic acids research* **27**, 4679-4686.
- Yu, Y., Mahaney, B. L., Yano, K., Ye, R., Fang, S., Douglas, P., Chen, D. J. & Lees-Miller, S. P. (2008). DNA-PK and ATM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not required for repair of DNA double strand breaks. *DNA repair* **7**, 1680-1692.
- Yu, Y., Wang, W., Ding, Q., Ye, R., Chen, D., Merkle, D., Schriemer, D., Meek, K. & Lees-Miller, S. P. (2003). DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination. *DNA repair* **2**, 1239-1252.
- Yu, Z. H., Teng, M., Sun, A. J., Yu, L. L., Hu, B., Qu, L. H., Ding, K., Cheng, X. C., Liu, J. X., Cui, Z. Z., Zhang, G. P. & Luo, J. (2014). Virus-encoded miR-155 ortholog is an important potential regulator but not essential for the development of lymphomas induced by very virulent Marek's disease virus. *Virology* **448**, 55-64.
- Zeman, M. K. & Cimprich, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature cell biology* **16**, 2-9.
- Zhang, Q., Gutsch, D. & Kenney, S. (1994). Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Molecular and cellular biology* **14**, 1929-1938.
- Zhao, F., Hou, N. B., Yang, X. L., He, X., Liu, Y., Zhang, Y. H., Wei, C. W., Song, T., Li, L., Ma, Q. J. & Zhong, H. (2008). Ataxia telangiectasia-mutated-Rad3-related DNA damage checkpoint signaling pathway triggered by hepatitis B virus infection. *World journal of gastroenterology : WJG* **14**, 6163-6170.

- Zhao, H., Watkins, J. L. & Piwnica-Worms, H. (2002).** Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14795-14800.
- Zhao, Y., Xu, H., Yao, Y., Smith, L. P., Kgosana, L., Green, J., Petherbridge, L., Baigent, S. J. & Nair, V. (2011).** Critical role of the virus-encoded microRNA-155 ortholog in the induction of Marek's disease lymphomas. *PLoS pathogens* **7**, e1001305.
- Zou, L. & Elledge, S. J. (2003).** Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542-1548.
- Zou, L., Liu, D. & Elledge, S. J. (2003).** Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13827-13832.

Annexes

Annexe 1 Article soumis à Scientific Reports et accepté sous réserve de modification.

Implication of cellular DNA damage triggered by Marek's Disease virus infection in viral replication and pathogenesis.

D. Bencherit,¹ S. Remy,¹ Y. Le Vern,² C. Denesvre,¹ and L. Trapp-Fragnet¹

¹ INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, Equipe Biologie des Virus Aviaires, Nouzilly, France.

² INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Laboratoire de Cytométrie, Nouzilly, France.

Running title: DNA damage upon MDV infection.

Corresponding author: Laëtitia Trapp-Fragnet, INRA, UMR1282, Infectiologie et Santé Publique, Equipe Biologie des Virus Aviaires, Nouzilly, France; Tel: +33 2 474 279 42.

E-mail: fragnet@tours.inra.fr

18 **ABSTRACT**

19 Marek's disease is a highly contagious neoplastic disease affecting chickens caused by the
20 Marek's disease alphaherpesvirus (MDV). We previously showed that MDV infection
21 impacts the cell cycle progression by blocking cells in S-phase and that the tegument protein
22 VP22 plays a major role in this arrest. We also demonstrated that VP22 is able to induce
23 double strand breaks (DSB) in the cellular DNA. DNA damage and the associated cellular
24 response participate actively in the life cycle of viruses, especially herpesviruses. Here, we
25 explored the role of DNA damage in MDV replication and pathogenesis. We showed that
26 MDV lytic infection leads to DNA lesions in blood cells of chickens and to the generation of
27 DSB in lytically infected cells *in vitro*. Moreover, we demonstrated that MDV latently
28 infected lymphoblastoid cells exhibit undamaged DNA while MDV reactivation leads to an
29 onset of DNA lesions. Also, DNA damage and/or the resulting DNA damage response might
30 facilitate MDV replication and reactivation. Finally, we depicted the role of VP22 on DNA
31 damage induction in a viral context *in vivo* and we discuss a potential participation of DNA
32 damage in MDV induced oncogenesis.

33 INTRODUCTION

34 Marek's disease (MD) is an oncogenic lymphoproliferative disease caused by a herpesvirus,
35 the Marek's disease virus (MDV), also referred as to *Gallid herpesvirus 2*. Although MDV is
36 classified within the *Alphaherpesvirinae* subfamily due to its genomic organization, MDV
37 presents physiological features more related to that of gammaherpesviruses. This is especially
38 illustrated by its lymphotropism and its ability to maintain its DNA in an integrated form into
39 the host-cell genome during latency. Moreover, infection of susceptible chickens with very
40 virulent MDV strains induces a rapid onset of tumors (within 3-4 weeks) associated to a high
41 level of mortality. Therefore, MDV turned out to be a relevant model to study virus mediated-
42 lymphomagenesis ¹. MDV life cycle is complex and can be broken down into four phases ²:
43 (i) an early cytolytic phase, corresponding to the replication of MDV in B and T-lymphocytes
44 (first week of infection); (ii) the establishment of a latent infection in CD4+ T-lymphocytes
45 (7-10 days post-infection (dpi)) during which the genome of MDV is integrated within the
46 host DNA; (iii) the reactivation of the virus from latently infected cells, which is accompanied
47 by its late replication and continuous shedding of the virus from the feather follicle
48 epithelium; and (iv) the tumorigenic phase characterized by transformation of CD4+ T-
49 lymphocytes and the development of T-lymphoma.

50 The exact mechanism leading to lymphoma development remains unclear even though several
51 viral oncogenes have been identified such as the latent oncoprotein Meq and the viral
52 telomerase RNA subunit, vTR ³⁻⁸. Among processes that might contribute to MDV-induced
53 tumorigenesis, we recently showed that MDV is able to trigger the proliferation of low
54 proliferating cells and to subsequently delay the cell cycle progression in S-phase ⁹. We also
55 identified the tegument protein VP22 as a major cell cycle modulator able to induce a drastic
56 arrest of proliferating cells in S-phase in the absence of other viral proteins. This blockade is
57 associated to a massive onset of double strand breaks (DSBs). The UL49-encoded VP22

58 protein is essential for MDV replication¹⁰. Its role has been particularly illustrated in the cell-
59 to-cell spread of MDV, but its ability to interact with DNA/histones, to interfere with the cell
60 cycle progression and to mediate DNA damage suggests that the VP22 protein could also be
61 implicated in key events of the MDV life cycle, especially in the establishment of latency
62 and/or transformation processes. Moreover, it was recently shown that a recombinant MDV
63 virus expressing a VP22 with a C-terminal GFP-tag is highly attenuated *in vivo*, suggesting
64 that VP22 plays a role in MDV-induced tumorigenesis¹¹. In addition, we have previously
65 observed that such modification of VP22 C-terminus abolishes its cell cycle modulation
66 activity as well as its ability to induce DNA damage upon overexpression of the protein in
67 proliferating cells⁹. Of note, the fusion of a GFP tag at the N-terminal extremity of VP22
68 does not affect the properties of the protein *in vitro* and only mildly attenuates the virulence of
69 the virus *in vivo*^{9, 12}.

70 Chromosomal aberrations and modulation of DNA damage response (DDR) are commonly
71 encountered during viral infections and are important for viral life cycle (reviewed in¹³⁻¹⁸).
72 This has been particularly evidenced in herpesviruses infections for which the ATM (Ataxia
73 Teliangiectasia-mutated) and ATR (ATM and Rad3 related) DNA damage pathways proteins
74 play essentially a beneficial role for viral replication¹⁹⁻²³. Effectors of the DDR and DNA
75 repair pathways also facilitate virus maintenance in cells and the establishment of latent
76 infection²³⁻²⁵. Moreover, in the case of transforming viruses such as the Epstein Barr virus
77 (EBV) and the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), the deregulation of these
78 pathways and the induction of DNA damage are of particular importance since genomic
79 instability promotes the establishment of neoplastic processes²⁶⁻³². Although DNA damage
80 following MDV infection have been previously suggested³³, the relevance of the DNA
81 damage in MDV pathogenesis was difficult to demonstrate since DNA damage analysis was
82 performed on blood samples (composed of 95% of nucleated erythrocytes in chickens)

83 collected from birds diagnosed with MD in a context of natural infection with uncharacterized
84 field viral strains.

85 In the present study, we aimed to elucidate the kinetic of DNA damage in MDV infection in
86 order to determine the role of DNA damage on MDV life cycle. We demonstrated *in vitro* that
87 lytically infected cells showed an accumulation of DNA breaks, whereas latently infected
88 cells did not. We also observed that DNA damage and/or DDR are actively involved in MDV
89 lytic replication and reactivation from the latent stage. Using a comparative *in vivo* study
90 realized with oncogenic and attenuated MDV viruses we confirmed the role of VP22 in the
91 generation of DNA damage in the context of MDV infection *in vivo* and made attempts to
92 elucidate whether DNA damage induction might be involved in the oncogenicity of MDV.

93 **RESULTS**

94 **DNA damage induction in chicken peripheral blood mononuclear cells upon MDV** 95 **infection**

96 To determine the impact of MDV infection on the generation of DNA lesions, we performed
97 an *in vivo* experimental study including one group of mock-infected chicken and one group of
98 birds infected with the very virulent MDV strain vRB-1B. Blood was collected from all birds
99 at day 0, 7, 14, 21, 28, and 35 post-infection (pi). Viral load was assessed by qPCR on whole
100 blood and DNA damage was determined using the alkaline comet assay on isolated peripheral
101 blood mononuclear cells (PBMCs). The olive tail moment (OTM) parameter, which reflects
102 the extent of DNA lesions, showed that, at day 7 pi, PBMCs from infected chickens had DNA
103 damage about 3-fold higher than PBMCs from mock-infected birds (Fig. 1a). However, no
104 significant differences were detected in DNA damage between the mock and infected
105 chickens at other time points. The higher rate of DNA damage observed at day 7 pi appeared
106 to be correlated with the replication of MDV, as shown by a 100-fold increase in viral load

between days 0 and 7 pi (Fig.1b). The viral load remained then high from 14 dpi (reaching a plateau), indicating that the MDV genome persists in blood cells. Of note, the qPCR technique used herein does not permit to discriminate the cytolytic and latent infection of MDV. Nevertheless, we assume that latency might establish from day 7 pi as previously reported^{34,35}. These data showed that MDV replication during the early lytic infection is associated with transient DNA damage in PBMCs, but that no significant DNA damage occurs during the latent infection.

MDV replication leads to double strand breaks in the host genome

To define whether the DNA damage observed at day 7 pi could originate from MDV lytic replication, we infected chicken embryo skin cells (CESCs) with the recEGFPVP22 recombinant virus encoding a VP22 fused at its N-terminus with the EGFP gene. At 96 hours post-infection (hpi), infected cells (GFP-positive cells) and non-infected cells (GFP-negative cells) were sorted by cytometry and DNA damage was assessed using the alkaline comet assay and by calculating the OTM. Cells undergoing MDV lytic replication had 8.5-fold and 6-fold higher rates of DNA damage compared to GFP-negative and mock-infected cells, respectively (Fig.2a). Moreover, the distribution of the calculated OTM showed that up to 30% of the infected cells presented an OTM>10 indicative for highly damaged DNA (Fig.2b). To specify the nature of the DNA damage induced in infected cells, we monitored the expression and localization of γ -H2AX, a marker classically used to detect DSBs. The immunostaining of γ -H2AX revealed a significant increase in intensity of γ -H2AX and a typical localization of the protein as foci in the nucleus of CESCs infected with the recEGFPVP22 virus (Fig.2c), indicative of its recruitment at DSB sites. This particular location of γ -H2AX suggests that MDV lytic infection leads to an onset of DSBs in host cells. During the course of infection, we also monitored the level of reactive oxygen species by measuring hydrogen peroxide (H₂O₂) in MDV or mock-infected cell supernatants (Fig.2d).

We detected a significant accumulation of H₂O₂ in the supernatant of infected cells from 48 to 96 hpi (up to 2.5-fold higher than mock-infected cells), suggesting the onset of oxidative stress in cells infected with MDV.

DSBs facilitate MDV replication

In order to determine whether DNA damage induction and/or the subsequent DDR could play a role in MDV lytic replication, we infected CESC cells with the recEGFPVP22 recombinant virus in the presence of increasing concentrations of the potent inducer of DSBs, etoposide (ETP)³⁶, or DMSO (as a negative control). ETP treatment efficacy was monitored by comet assay for each ETP concentration and at different time points (Supplementary Fig.S1 online). MDV replication was evaluated by qPCR at 24, 48, 72, and 96 hpi (Fig.3a and b). Viral growth curves showed that cells treated with 0.033 or 0.066 μ M of ETP had a 2- to 1.5-fold higher viral load at 96 hpi compared with cells treated with DMSO (Fig.3a and b). At the highest concentration (0.132 μ M), ETP had a more significant effect on MDV replication, since the viral load is 3.5- to 3-fold increased at 72 hpi and 96 hpi, respectively. We also determined the percentage of cells expressing the VP22 protein (GFP-positive cells) in the viable cell population (eFluor-780 negative cells) at 96 hpi (Fig.3c). Results showed a 2-fold higher number of VP22-expressing cells at 96 hpi after treatment with 0.132 μ M compared with DMSO-treated cells, however despite a slight increase of the number of GFP+ cells no significant differences were observed with lower ETP concentrations. MDV plaques also tended to enlarge in the presence of increased concentrations of ETP compared with those observed with DMSO (Fig.3d). These data indicate that DNA damage induction, especially DSBs, might be beneficial for MDV replication and/or could facilitate the dissemination of the virus in CESC cells.

MDV reactivation in T-lymphoblastoid cells is accompanied by DNA damage

In vivo, the replication of MDV is not only restricted to the primary lytic cycle observed early after infection in lymphoid cells, but it is also detected at later time points during the reactivation of the virus from latently infected T-lymphocytes. To verify whether MDV reactivation also leads to DNA damage, we used the MDCC-3867(K) cell line, established from a lymphoma induced in chicken by a highly pathogenic fluorescent MDV RB-1B UL47EGFP recombinant virus³⁷. Although the 3867(K) cells undergo mainly latent infection of MDV, it also provides a model of choice to study MDV reactivation in T-lymphocytes. The fusion of EGFP to the UL47 tegument protein allowed us to sort EGFP-positive cells (which correspond to cells that undergo a lytic cycle of MDV, i.e., exhibit spontaneous reactivation of the virus) by cytometry. Of note, these cells represented about 1.75% of the total population. DNA damage was assessed by using the alkaline comet assays in EGFP-positive and -negative cells and by estimating the OTM. EGFP-positive cells showed a level of DNA damage about 3-fold higher than EGFP-negative cells exhibiting MDV latent infection (Fig.4a). Among cells undergoing MDV lytic replication about 8% showed severe DNA damage (OTM>10) (Fig.4b). These observations indicate that MDV reactivation (lytic cycle) in T-lymphocytes is associated with DNA damage, while MDV latent infection produces only limited damage.

We previously demonstrated that DNA damage might facilitate MDV replication in CESC cells (Fig.3). In order to evaluate the impact of DNA damage on MDV lytic replication in T-lymphocytes in the context of viral reactivation, 3867(K) cells were treated with increased concentration of ETP (0.004 to 0.5 μ M) for 48 hours. Comet assay was performed in order to confirm the induction of DNA damage by ETP treatments (Supplementary Fig.S2 online). MDV replication was estimated by measuring ICP4 gene expression by qRT-PCR (Fig.4c) and by counting GFP+ cells by cytometry (Fig.4d). Cells treated with ETP concentrations

from 0.02 μ M showed a dose dependent increased expression of ICP4 of about 2- to 6-fold compared to DMSO treated cells. Likewise, the number of GFP+ cells is enhanced of 2.9- to 7.5-fold, suggesting that DNA damage is also favorable for MDV replication in T-lymphocytes undergoing viral reactivation.

Involvement of VP22 in the generation of DNA damage upon MDV infection and tumor incidence

Two previous reports showed that the vRB-1B 22EGFP virus harboring a VP22 protein fused with EGFP at its C-terminal extremity is severely attenuated while the vRB-1B EGFP22 virus encoding a VP22 tagged at its N-terminus showed only a mild decrease in oncogenicity^{11,12}. Moreover, we showed in a recent study that cells overexpressing the VP22 tagged at the N-terminus had a higher rate of DNA lesions than cells overexpressing the C-terminal tagged protein⁹. Based on these observations, we designed a comparative study of the vRB-1B 22EGFP and vRB-1B EGFP22 viruses in order to investigate the role of VP22 in DNA lesions triggered by MDV infection *in vivo* and concomitantly to study the involvement of VP22 and DNA damage in MDV pathogenesis. The experiment consisted of 4 groups of animals: mock-infected chickens (negative control); chickens infected with the parental (wild-type) vRB-1B virus; chickens infected with the vRB-1B 22EGFP recombinant virus and chickens infected with the vRB-1B EGFP22 recombinant virus. Blood samples were collected weekly (until 42 dpi) from all birds. At 49 dpi, blood from survival animals was collected and necropsies were performed in order to evaluate MD incidence. PBMCs were isolated from the blood to assess DNA damage using the alkaline comet assay and to assess the viral genomic DNA load by qPCR.

Our observations corroborated the previously shown attenuation of the vRB-1B 22EGFP virus, since only 31% of infected-birds developed tumors whereas tumors were found in 100% and 66% of chickens infected with the vRB-1B (wild-type) and the vRB-1B EGFP22

viruses, respectively (Supplementary Fig.S3 online). The vRB-1B 22EGFP and vRB-1B EGFP22 viruses showed a similar pattern of replication during the course of the experimental infection, although the vRB-1B 22EGFP yielded a significantly lower viral load (100-fold less) at 14 and 28 dpi compared to the wild-type virus vRB-1B (Fig.5a). DNA damage analysis revealed a higher rate of lesions in PBMCs of birds infected with vRB-1B or vRB-1B 22EGFP at 7 dpi compared to chickens infected with vRB-1B EGFP22 or mock-infected birds (Fig.5b). The 3 viruses did not produce significant DNA damage in PBMCs at later time points when compared to mock-infected chickens, with the exception of a slightly higher level of DNA damage at 36 dpi in birds infected with vRB-1B 22EGFP. Nevertheless, at that late time point the rate of DNA damage in vRB-1B 22EGFP-infected birds was comparable to the level detected in PBMCs of vRB-1B- and vRB-1B EGFP22-infected chickens. These observations showed that the attenuated recombinant virus (encoding a VP22 protein tagged at the C-terminus) seems to be less efficient to elicit DNA lesions than its oncogenic counterpart (encoding a VP22 tagged at the N-terminus), corroborating the involvement of VP22 in genomic DNA damage. Our data also show that infections with oncogenic MDV viruses, vRB-1B and vRB-1B 22EGFP, are more likely to be accompanied with DNA damages at the early stages of infection than infection with the attenuated virus vRB-1B EGFP22.

DISCUSSION

The hallmark of the present study was the observation of an onset of DNA lesions in cells sustaining MDV replication *in vivo* and *in vitro*. By using experimental *in vivo* approaches, we demonstrated that MDV early cytolitic replication is associated with an increase in DNA damages in PBMCs of infected chickens early after infection (7 dpi). This observation was confirmed *in vitro* in MDV-infected CESC cells in which we detected DNA DSBs at 96 hpi. Moreover, we showed *in vitro* that lymphoblastoid cells (3867(K)) undergoing MDV

231 replication induced from the spontaneous reactivation of the virus are also affected by DNA
232 damage. Of note, the occurrence of DNA lesions during MDV reactivation was not as clear *in*
233 *vivo* since the level of DNA damage in the PBMCs of birds infected with the highly virulent
234 RB-1B at 21 dpi (time point at which a peak of viral reactivation was expected according to
235 the literature) was statistically not significantly different from that of the mock-infected birds.
236 This might be due to a lack of sensitivity of the comet assay, notably since virus reactivating
237 CD4+ T-lymphocytes represent only a small and variable number of cells within the pool of
238 PBMCs in which DNA damages were assessed. To compare the onset of DNA damage in
239 latently infected versus MDV reactivating cells *in vivo*, it would therefore be critical to define
240 the peak of virus reactivation during the course of experimental infection. In order to
241 determine at which time points the switches from primary lytic infection to latency and from
242 latency to reactivation occurred, we assessed by qRT-PCR the expression levels of lytic viral
243 genes in PBMCs obtained from vRB-1B infected birds at different times post infection.
244 However, unfortunately, the data were not conclusive, probably due to the established MDV
245 feature of asynchronous replication ensuing overlapping lytic replication events (primary
246 and/or reactivated lytic replication) as well as the marked variability between individual birds
247 (data not shown).

248 Interestingly, DNA lesions were detected at 7 dpi in the PBMCs of chickens infected with
249 vRB-1B or vRB-1B EGFP22 virus, but not with the vRB-1B 22EGFP virus, even though all 3
250 viruses showed similar robust replication as was assessed by qPCR results. This observation
251 may indicate that MDV replication is not sufficient to induce DNA breaks. However, at 14
252 and 28 dpi the attenuated vRB-1B 22EGFP virus displayed a lower replication rate compared
253 to the wild-type vRB-1B virus. We could assume that this growth defects might be associated
254 with the low rate of DNA lesions occurring during the early replication of the virus (at 7 dpi),
255 and thus that DNA damage might be favorable for MDV replication. These observations also

confirmed that VP22 is a major viral determinant associated to DNA damages *in vivo*. In a previous study we reported that the overexpression of VP22 leads to DSB induction in proliferating cells, and that this activity of VP22 depends on an unmodified C-terminal extremity⁹. Herein we show *in vivo*, in an infectious context, that VP22 is involved in the induction of DNA lesions observed during MDV early cytolytic infection, and that the modification of the C-terminal extremity of the protein subverted the ability of MDV to trigger DNA damage in PBMCs. Although we detected an increase of DNA lesions in lymphocytes of vRB-1B infected chickens upon MDV replication, we could not precise whether these lesions correspond to DSB *in vivo* (e.g. through γ H2AX staining) because of the low percentage of MDV infected cells within the PBMC population that does not permit flow cytometry analysis or cell sorting. The mechanism by which VP22 is involved in the onset of DNA lesions is still unclear. VP22 could have a direct genotoxic activity on DNA since VP22 can interact with DNA and histones^{9,38}, or could activate cellular metabolism pathways leading to DNA damage. In support to the latter hypothesis, we showed an increase of hydrogen peroxide production in CESC cells infected with MDV. Oxidative stress, mediated notably by the production of reactive oxidative species (ROS), is a major generator of DNA breaks including DSBs³⁹. Previous studies reported that MDV infection also influences reactive nitrogen species (e.g. nitric oxide [NO])^{33,40}. A correlation was notably established between the virulence of MDV strains and its ability to induce NO, with the most virulent strains inducing the highest level of NO⁴⁰. It is believed that NO plays a role in MD pathogenesis through its involvement in the immune suppression observed early after infection⁴⁰. Our results support the hypothesis that oxidative stress could participate to DNA lesions, which in turn would facilitate MDV replication and consequently potentiate the virulence of MDV. We have indeed demonstrated that chemical induction of DSBs (by ETP) can promote MDV replication and enhance MDV reactivation from latent infection.

Another question to address is how DNA damage favors MDV replication. As previously demonstrated for a number of viruses and especially herpesviruses, the DNA damage response (DDR) plays a major role in viral replication (for review see ^{14-16, 18, 41}). Unfortunately in the present study, we were not able to characterize more precisely the DDR pathways induced during MDV infection due to a lack of specific tools cross-reacting with chicken proteins. Nevertheless, we may reasonably believe that, like for most viruses, MDV infection results in the activation of a DDR. We identified at least two processes that could contribute to the DDR pathways activation: (i) the generation of DNA lesions in cellular DNA triggered upon MDV replication, and (ii) an increase in ROS detected in MDV-infected CESC. Elevated levels of ROS are known to activate DDR pathways, as demonstrated notably upon EBV infection in which the latent protein EBNA1 promotes ROS accumulation and consequently ATM-dependent DDR activation ²⁶. Moreover, our previous study demonstrated that MDV induces an intra S-phase growth arrest in fibroblasts ⁹. This constitutive S-phase induction may create a favorable environment for viral replication but could also lead to replicative stress, a potent mechanism responsible of DDR induction. Although we currently cannot determine the DDR pathways activated by MDV, we can speculate that ATM signaling may be induced in response to the DSBs and to the oxidative stress generated during MDV infection ^{42, 43}. Of note, ATM pathway activation seems to be a common characteristic of herpesviruses infections (as previously reported notably for the human herpesvirus type-1 (HSV-1), the cytomegalovirus (CMV), EBV and KSHV), and in most case ATM has been demonstrated to be beneficial for viral replication ^{20, 44-46}.

Finally, a major point of interest of the present study is the potential involvement of the onset of DNA lesions in MDV-induced lymphomagenesis. Many reports have shown that DNA damage and the DDR can contribute to generate genomic instability in cells, and in turns to the development of tumors. Moreover, DSBs are among the most deleterious lesions

occurring in cells and if unrepaired, accumulation of DSBs could promote cell-death and the loss of genome integrity possibly leading to carcinogenesis⁴⁷. Several studies demonstrated the interplay between oncogenic viruses and DNA damage/DDR signaling and its crucial implication in virus mediated-tumorigenesis (for review see^{27, 31, 32}). Our data support these findings since we observed a greater rate of DNA damage in PBMCs from chickens infected with virulent MDV viruses (vRB-1B and vRB-1B EGFP22) and to a significantly lesser extend in PBMCs of birds infected with an attenuated recombinant virus (vRB-1B 22EGFP). The lack of oncogenicity of the vRB-1B 22EGFP virus might well be associated with its diminished replication capacity (as observed at day 14 pi). However, in the light of our results, one can also speculate that the viral phenotype relates to the absence of an early onset of DNA lesions in infected leukocytes that otherwise might contribute to MDV induced tumorigenesis. One hypothesis would be that DNA damage, through facilitating MDV replication, may lead to an increase of the number of latently infected cells from which transformed T cells originate. However, one should not underestimate the impact of a potential genomic instability originating from DNA damage generated during MDV replication, which could play a role in the transformation process ultimately leading to MD lymphoma formation.

Also, the kinetics of the onset of the DNA damage may be critical in the establishment of the viral-mediated tumorigenesis. We indeed detected damages in PBMCs of chicken infected with the two most virulent viruses (vRB-1B and vRB-1B EGFP22) at 7 dpi while the attenuated vRB-1B 22EGFP induced DNA damage at a later time points (36 dpi). This observation supports the idea that neoplastic processes originate from multistep events and that the tumorigenic potential of viruses is not only dependent on the expression of viral oncogenes but is closely associated to genomic alterations already accumulated in cells. Based on the “hit and rest mechanism” proposed by Avanzi, we could postulate that MDV

first “hits” the cells by inducing DNA damage during early replication in lymphoid cells. A majority of cells might thus be driven to cell death due to viral replication and/or DNA damage, but some lesions might persist at low-grade in a limited population of CD4+ T-lymphocytes that undergo MDV latent infection (Fig.6)⁴⁸. Due to the fragility of the damaged DNA, cells encompassing lesions may become more susceptible to further damage mediated either by oncogenes or during reactivation of the virus (second “hit” of the virus) and therefore more prone to transformation⁴⁹. Consequently, it is conceivable that, in a context combining events such as cell cycle deregulation and reprogramming genomic expression resulting from viral oncogene activities and telomerase activation, the accumulation of DNA lesions upon MDV infection may generate genomic instability, which paves the way to MDV-induced tumorigenesis.

Methods

Cells and viruses

Chicken embryo skin cells were prepared from 12 day-old specific-free-pathogen White Leghorn (LD1) embryos and maintained in culture as previously described³⁸. The MDCC-3867(K) cell line is derived from a renal lymphoma induced after infection of chicken with the highly pathogenic recombinant vRB-1B 47EGFP virus encoding the UL47 gene fused to the enhanced green fluorescent protein (EGFP)³⁷. The 3867(K) cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 2 mM glutamine, 1% pyruvate, 1% non-essential amino acids, 1% glucose, 10% tryptose phosphate broth and 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained at 41 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

The recEGFPVP22 recombinant virus encoding the VP22 tegument protein fused at its 5' end with the EGFP gene was generated from the avirulent MDV-BAC20 strain cloned as BAC⁵⁰. The very virulent vRB-1B virus was amplified from the pRB-1B infectious bacterial artificial chromosome (BAC) clone that was restored for horizontal transmission (kindly provided by

N. Osterreider, Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Germany)⁵¹. The vRB-1B EGFP22 and vRB-1B 22EGFP (previously dubbed vUL49-EGFP¹¹) recombinant viruses harboring the UL49 gene (encoding VP22) fused with the EGFP gene respectively at their 5' and 3' end, were previously generated from the oncogenic pRB-1B BAC^{11, 12}. The pRB-1B 22EGFP was kindly provided by B.B. Kaufer (Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Germany). All recombinant viruses were reconstituted from purified BAC-DNA transfected into confluent layer of CESC and viruses were then propagated by co-culture of 7x10⁶ fresh CESC in a 100-mm diameter plate with 10⁴ plaque-forming units (pfu) of infected cells, as previously reported⁵⁰.

Chemical induction of DNA damages

DSB were induced in CESC infected with the recEGFPVP22 recombinant virus by etoposide (ETP). ETP (Sigma-Aldrich) was added at 6 h post-infection to the culture medium at a final concentration of 0.033, 0.066 or 0,132 µM for 18h, 42h, 66h or 90h (corresponding respectively to 24, 48, 72, and 96h post-infection). At 42h post-treatment, culture media was totally replaced by fresh media containing ETP at appropriated concentration. Etoposide treatment of 3867(K) cells were performed for 48h at the concentrations of 0.004, 0.02, 0.1 and 0.5 µM. As negative control, DMSO (used to solubilize ETP) was added in the culture medium at a volume equivalent to the one corresponding to the highest concentration of ETP treatments.

Animal experiments

Two *in vivo* experiments were conducted in this study. The first experiment (Fig.1) was performed with 2 groups of animals composed of 10 non-infected chickens and 13 birds infected with vRB-1B. The second experiment (Fig.5-6) consisted of 4 lots of animals: a non-infected group constituted of 10 birds, a vRB-1B infected group composed of 6 animals and 2 groups containing each 12 or 13 chickens infected with vRB-1B EGFP22 or vRB-1B 22EGFP

viruses respectively. Specific pathogen free White Leghorn chicks (B13/B13 haplotype) were housed in isolation units. Chicks were inoculated intramuscularly (pectoral muscles) at 3.5 weeks of age with 1,000 pfu of vRB-1B (experiment #1) or 1,500 pfu of vRB-1B, vRB-1B EGFP22 and vRB-1B 22EGFP (experiment #2). In order to compensate the growth defect of vRB-1B EGFP22 and vRB-1B 22EGFP in culture and to inoculate an equal amount of virus to chickens, the stocks of vRB-1B EGFP22 and vRB-1B 22EGFP viruses were constituted exclusively of EGFP+ positive sorted CESCes (i.e. infected cells). Birds were evaluated daily for symptoms of MD. In the case of clinical evidence of MD, the chickens were euthanized and examined at postmortem for the presence of gross MD lesions. At the end of the experiments (35 dpi in experiment #1 and 49 dpi in experiment #2), all survival birds were euthanized and necropsied. In order to study the DNA damage occurrence in peripheral blood mononuclear cells and to follow the viral load, blood was collected on 3% sodium citrate from all birds at day 0, 7, 14, 21, 28 and 35 pi for experiment #1 and days 0, 7, 14, 21, 28, 36, 42 and 49 pi for experiment #2. PBMCs were isolated from 1 ml of whole blood using lymphocytes-separation medium LSM (Eurobio, France) as previously described¹².

All experimental procedures were performed in accordance with guidelines and regulations as outlined and approved by the local ethic committee “Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale de Val de Loire” (CEEA VdL, protocol number 2012-09-3).

DNA extraction and real-time quantitative PCR (qPCR)

In order to quantify the viral load, DNAs were extracted from 30 µl whole blood (*in vivo* experiment #1) or from $2 \cdot 10^6$ isolated cells (PBMCs in the *in vivo* experiment #2 and CESCes). DNA extraction was performed using the QIAamp DNA mini kit according to the manufacturer’s instructions (Qiagen). The quantification of MDV genome copies was done by qPCR using the Taqman technology as previously described^{12, 40}. Primers and probes specific for the immediate early MDV-ICP4 gene and the chicken inducible nitric oxid synthase

(iNOS) (reported in ⁴⁰) were purchased from Eurogentec (Belgium). Real-time PCR was performed in a 20 µl volume using 950 ng DNA (experiment#1) or 250 ng DNA (experiment#2), 10 µl of 2 × ABsolute Blue qPCR Mix (ABgene, Thermo Fischer), 10 pmol of forward and reverse gene-specific primers and 5 pmol of ICP4 and iNOS probes. Each qPCR reaction was performed in triplicate in a Dyad Disciple Chromo 4 apparatus (BioRad, France) and results were analyzed using the MJ opticon monitor software (BioRad, France). Standard curves for ICP4 and iNOS were obtained as previously described ¹². The number of ICP4 copies (referring to the MDV genome copies) was normalized to 10⁶ copies of cellular genome (estimated by the detection of iNOS copies).

Alkaline comet assay

Alkaline comet assays were performed from 2.10⁵ cells as previously described ^{9,52}. Two slides for comet assays were prepared for each condition. Comets were observed using the Axiovert 200 M inverted epifluorescence microscope (Zeiss) and images were captured with an Axiocam MRm camera (Zeiss). A minimum of 50 comets was analyzed on each replicate slide using the CometScore software version 1.5 (TriTek). The olive tail moment parameter (OTM) was calculated on the basis of the tail length and the relative proportion of DNA contained in the tail. Results are presented as the mean (±SD) of the OTM calculated for each condition or as a distribution of the comets with respect to their respective OTM value (i.e. the percentage of cells presenting a defined OTM).

Cell sorting and flow cytometry analysis

Sorting of CESCes infected with recombinant viruses expressing fluorescent VP22 proteins were performed at 4 dpi. The 3867(K) cells exhibiting MDV lytic replication were sorted on the basis of the expression of the UL47 protein tagged with EGFP. Of note, mock-infected CESCes (negative control) were also sorted in order to process non-infected and infected-samples evenly and thus to avoid experimental bias linked to sorting. Prior to sorting, cells

were twice filtered on 50- μ m and 30- μ m-pore-size membranes. EGFP positive and negative cells were sorted using a MoFlo[®] high-speed cell sorter (Beckman Coulter, Fort Collins, CO, USA) equipped with two lasers : the blue one operating at 488 nm and 100 mW and the red one operating at 635 nm and 25 mW. The sorting speed was around 15,000 cells/s and cells were collected in appropriate media supplemented with 10% of FBS prior to further investigations. Damaged cells and debris were eliminated on the basis of morphological criteria. EGFP fluorescence was analyzed with a 530/40 nm band-pass filter. Cells viability was estimated from $5 \cdot 10^6$ CESC^s using the fixable viability dye eFluor[®] 780 (eBioscience) at dilution of 1:1000. Staining was performed for 15 minutes on ice in the dark. Cells were washed twice in PBS before being fixed with paraformaldehyde (PAF) 1%. Cell viability was analyzed with a 780/40 nm band-pass filter.

Reactive oxygen species (ROS) assay

ROS production was assayed from supernatant (80 μ l) of mock- and recEGFPVP22-infected CESC^s at 24h, 48h, 72h and 96h pi using the ROS-Glo[™] H₂O₂ assay following manufacturer's instructions (Promega). Luminescence quantification was performed using a Glomax[®] Multidetector system luminometer (Promega). Results were recorded as relative luminescent units (RLU). Assays were done in triplicates at each time point. Results obtained from infected-cells were normalized to that of mock-infected conditions and expressed as means ($\pm$ SD).

Fluorescence Microscopy

CESC^s were grown on glass coverslips and infected with recEGFPVP22. At 4 days pi, infected and non-infected cells were fixed with PFA 4% for 20 min at room temperature (RT) and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5 minutes at RT. After blocking with PBS, 0.1% Triton X-100, 2% Bovine Serum Albumin (BSA), cells were incubated with mouse monoclonal IgG directed against phospho-histone H2AX (Ser139) (Millipore; clone JBW301)

at a dilution of 1:500. Goat anti-mouse IgG Alexa-Fluor 594 secondary antibody (Invitrogen) was used at 1:2000. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Invitrogen). EGFP fluorescence was directly observed from cells expressing the viral EGFP-tagged VP22 protein. Cells were observed under an Axiovert 200 M inverted epifluorescence microscope equipped with a 40× PlanNeofluar oil/Dic objective or a 63× PlanApochromat oil/DIC and the Apotome imaging system (Zeiss). Images were captured with a CCD AxioCam MRm camera (Zeiss) by using the Axiovision software.

MDV plaque size measurement assay

At 48h pi, CESC's monolayers infected with the recEGFPVP22 virus and treated with ETP were fixed with PAF 4%. Fluorescence emitted from the viral EGFP-tagged VP22 protein was directly visualized under an Axiovert 200 M inverted epifluorescence microscope equipped with a 5× fluar objective. Viral plaques were measured and analyzed as previously described⁵⁰.

RNA extraction and quantitative Reverse Transcription-PCR (qRT-PCR)

RNAs were extracted from 10⁶ 3867(K) cells using the RNeasy Mini kit following the manufacturer's instructions (Qiagen). The expression of the ICP4 viral gene and the chicken housekeeping gene glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) were assessed by qRT-PCR using the Supermix SYBR green (Bio-Rad) as previously described⁹.

Statistical analysis

All graphs and statistics were performed using the GraphPad Prism software version 5.02 (San Diego, USA). Data are presented as means and standard deviations (±SD). One-way ANOVA test was used to compare differences in multiple groups and the Mann-Whitney (two-tailed) was used to compare nonparametric variables between two groups. Significant differences were determined using Student's *t*-test. *P* values <0.05 were considered statistically significant as indicated in the figure legends.

481

482

483 REFERENCES

- 484 1. Osterrieder, N., Kamil, J.P., Schumacher, D., Tischer, B.K. & Trapp, S. Marek's
485 disease virus: from miasma to model. *Nat Rev Microbiol* **4**, 283-294 (2006).
- 486 2. Calnek, B.W. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr Top Microbiol*
487 *Immunol* **255**, 25-55 (2001).
- 488 3. Brown, A.C. *et al.* Homodimerization of the Meq viral oncoprotein is necessary for
489 induction of T-cell lymphoma by Marek's disease virus. *J Virol* **83**, 11142-11151
490 (2009).
- 491 4. Fragnet, L., Blasco, M.A., Klapper, W. & Rasschaert, D. The RNA subunit of
492 telomerase is encoded by Marek's disease virus. *J Virol* **77**, 5985-5996 (2003).
- 493 5. Trapp, S. *et al.* A virus-encoded telomerase RNA promotes malignant T cell
494 lymphomagenesis. *J Exp Med* **203**, 1307-1317 (2006).
- 495 6. Nair, V. Latency and tumorigenesis in Marek's disease. *Avian Dis* **57**, 360-365 (2013).
- 496 7. Burnside, J. *et al.* Marek's disease virus encodes MicroRNAs that map to meq and the
497 latency-associated transcript. *J Virol* **80**, 8778-8786 (2006).
- 498 8. Engel, A.T., Selvaraj, R.K., Kamil, J.P., Osterrieder, N. & Kaufer, B.B. Marek's
499 disease viral interleukin-8 promotes lymphoma formation through targeted recruitment
500 of B cells and CD4⁺ CD25⁺ T cells. *J Virol* **86**, 8536-8545 (2012).
- 501 9. Trapp-Fragnet, L. *et al.* Cell cycle modulation by Marek's disease virus: the tegument
502 protein VP22 triggers S-phase arrest and DNA damage in proliferating cells. *PLoS*
503 *One* **9**, e100004 (2014).
- 504 10. Dorange, F., Tischer, B.K., Vautherot, J.F. & Osterrieder, N. Characterization of
505 Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) deletion mutants that lack UL46 to UL49

506 genes: MDV-1 UL49, encoding VP22, is indispensable for virus growth. *J Virol* **76**,
507 1959-1970 (2002).

508 11. Jarosinski, K.W., Arndt, S., Kaufer, B.B. & Osterrieder, N. Fluorescently tagged
509 pUL47 of Marek's disease virus reveals differential tissue expression of the tegument
510 protein in vivo. *J Virol* **86**, 2428-2436 (2011).

511 12. Remy, S. *et al.* Fluorescent tagging of VP22 in N-terminus reveals that VP22 favors
512 Marek's disease virus (MDV) virulence in chickens and allows morphogenesis study
513 in MD tumor cells. *Vet Res* **44**, 125 (2013).

514 13. Fortunato, E.A. & Spector, D.H. Viral induction of site-specific chromosome damage.
515 *Rev Med Virol* **13**, 21-37 (2003).

516 14. Lilley, C.E., Schwartz, R.A. & Weitzman, M.D. Using or abusing: viruses and the
517 cellular DNA damage response. *Trends Microbiol* **15**, 119-126 (2007).

518 15. Sinclair, A., Yarranton, S. & Schelcher, C. DNA-damage response pathways triggered
519 by viral replication. *Expert Rev Mol Med* **8**, 1-11 (2006).

520 16. Turnell, A.S. & Grand, R.J. DNA viruses and the cellular DNA-damage response. *J*
521 *Gen Virol* **93**, 2076-2097 (2012).

522 17. Weitzman, M.D., Carson, C.T., Schwartz, R.A. & Lilley, C.E. Interactions of viruses
523 with the cellular DNA repair machinery. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1165-1173 (2004).

524 18. Xiaofei, E. & Kowalik, T.F. The DNA damage response induced by infection with
525 human cytomegalovirus and other viruses. *Viruses* **6**, 2155-2185 (2014).

526 19. Hau, P.M. *et al.* Role of ATM in the Formation of the Replication Compartment
527 during Lytic Replication of Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal Epithelial Cells. *J*
528 *Virol* **89**, 652-668 (2015).

529 20. Hollingworth, R. *et al.* Activation of DNA Damage Response Pathways during Lytic
530 Replication of KSHV. *Viruses* **7**, 2908-2927 (2015).

- 531 21. Mohni, K.N., Dee, A.R., Smith, S., Schumacher, A.J. & Weller, S.K. Efficient herpes
532 simplex virus 1 replication requires cellular ATR pathway proteins. *J Virol* **87**, 531-
533 542 (2012).
- 534 22. Mounce, B.C. *et al.* Gammaherpesvirus gene expression and DNA synthesis are
535 facilitated by viral protein kinase and histone variant H2AX. *Virology* **420**, 73-81
536 (2011).
- 537 23. Lilley, C.E., Carson, C.T., Muotri, A.R., Gage, F.H. & Weitzman, M.D. DNA repair
538 proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**,
539 5844-5849 (2005).
- 540 24. Jha, H.C. *et al.* H2AX phosphorylation is important for LANA-mediated Kaposi's
541 sarcoma-associated herpesvirus episome persistence. *J Virol* **87**, 5255-5269 (2013).
- 542 25. Tarakanova, V.L., Stanitsa, E., Leonardo, S.M., Bigley, T.M. & Gauld, S.B.
543 Conserved gammaherpesvirus kinase and histone variant H2AX facilitate
544 gammaherpesvirus latency in vivo. *Virology* **405**, 50-61 (2010).
- 545 26. Gruhne, B., Sompallae, R. & Masucci, M.G. Three Epstein-Barr virus latency proteins
546 independently promote genomic instability by inducing DNA damage, inhibiting DNA
547 repair and inactivating cell cycle checkpoints. *Oncogene* **28**, 3997-4008 (2009).
- 548 27. Hollingworth, R. & Grand, R.J. Modulation of DNA damage and repair pathways by
549 human tumour viruses. *Viruses* **7**, 2542-2591 (2015).
- 550 28. Koopal, S. *et al.* Viral oncogene-induced DNA damage response is activated in
551 Kaposi sarcoma tumorigenesis. *PLoS Pathog* **3**, 1348-1360 (2007).
- 552 29. Wu, C.C. *et al.* Epstein-Barr virus DNase (BGLF5) induces genomic instability in
553 human epithelial cells. *Nucleic Acids Res* **38**, 1932-1949 (2010).

- 554 30. Xiao, Y. *et al.* Lytic infection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces
555 DNA double-strand breaks and impairs non-homologous end joining. *J Gen Virol* **94**,
556 1870-1875 (2013).
- 557 31. Nikitin, P.A. & Luftig, M.A. At a crossroads: human DNA tumor viruses and the host
558 DNA damage response. *Future Virol* **6**, 813-830 (2011).
- 559 32. Nikitin, P.A. & Luftig, M.A. The DNA damage response in viral-induced cellular
560 transformation. *Br J Cancer* **106**, 429-435 (2012).
- 561 33. Keles, H. *et al.* Increased DNA damage and oxidative stress in chickens with natural
562 Marek's disease. *Vet Immunol Immunopathol* **133**, 51-58 (2010).
- 563 34. Calnek, B.W., Schat, K.A., Ross, L.J. & Chen, C.L. Further characterization of
564 Marek's disease virus-infected lymphocytes. II. In vitro infection. *Int J Cancer* **33**,
565 399-406 (1984).
- 566 35. Shek, W.R., Calnek, B.W., Schat, K.A. & Chen, C.H. Characterization of Marek's
567 disease virus-infected lymphocytes: discrimination between cytolytically and latently
568 infected cells. *J Natl Cancer Inst* **70**, 485-491 (1983).
- 569 36. Walker, J.V. & Nitiss, J.L. DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy.
570 *Cancer Invest* **20**, 570-589 (2002).
- 571 37. Denesvre, C. *et al.* Marek's disease virus undergoes complete morphogenesis after
572 reactivation in T-lymphoblastoid cell line transformed by recombinant fluorescent
573 marker virus. *J Gen Virol*, DOI: 10.1099/jgv.1090.000354 (2015).
- 574 38. Dorange, F., El Mehdaoui, S., Pichon, C., Coursaget, P. & Vautherot, J.F. Marek's
575 disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and
576 UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and
577 VP16. *J Gen Virol* **81**, 2219-2230 (2000).

- 578 39. Karanjawala, Z.E., Murphy, N., Hinton, D.R., Hsieh, C.L. & Lieber, M.R. Oxygen
579 metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis
580 observed in DNA double-strand break repair mutants. *Curr Biol* **12**, 397-402 (2002).
- 581 40. Jarosinski, K.W., Yunis, R., O'Connell, P.H., Markowski-Grimsrud, C.J. & Schat,
582 K.A. Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease
583 virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian Dis* **46**, 636-649
584 (2002).
- 585 41. Weitzman, M.D., Lilley, C.E. & Chaurushiya, M.S. Genomes in conflict: maintaining
586 genome integrity during virus infection. *Annu Rev Microbiol* **64**, 61-81 (2010).
- 587 42. Guo, Z., Deshpande, R. & Paull, T.T. ATM activation in the presence of oxidative
588 stress. *Cell Cycle* **9**, 4805-4811 (2010).
- 589 43. Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D. & Paull, T.T. ATM activation by
590 oxidative stress. *Science* **330**, 517-521 (2010).
- 591 44. E, X. *et al.* An E2F1-mediated DNA damage response contributes to the replication of
592 human cytomegalovirus. *PLoS Pathog* **7**, e1001342 (2011).
- 593 45. Kudoh, A. *et al.* Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal
594 transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J Biol Chem* **280**,
595 8156-8163 (2005).
- 596 46. Shirata, N. *et al.* Activation of ataxia telangiectasia-mutated DNA damage checkpoint
597 signal transduction elicited by herpes simplex virus infection. *J Biol Chem* **280**,
598 30336-30341 (2005).
- 599 47. Bohgaki, T., Bohgaki, M. & Hakem, R. DNA double-strand break signaling and
600 human disorders. *Genome Integr* **1**, 15 (2010).
- 601 48. Avanzi, S., Alvisi, G. & Ripalti, A. How virus persistence can initiate the
602 tumorigenesis process. *World J Virol* **2**, 102-109 (2013).

- 603 49. Fang, C.Y. *et al.* Recurrent chemical reactivations of EBV promotes genome
604 instability and enhances tumor progression of nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J*
605 *Cancer* **124**, 2016-2025 (2009).
- 606 50. Blondeau, C., Marc, D., Courvoisier, K., Vautherot, J.F. & Denesvre, C. Functional
607 homologies between avian and human alphaherpesvirus VP22 proteins in cell-to-cell
608 spreading as revealed by a new cis-complementation assay. *J Virol* **82**, 9278-9282
609 (2008).
- 610 51. Jarosinski, K.W. *et al.* Horizontal transmission of Marek's disease virus requires US2,
611 the UL13 protein kinase, and gC. *J Virol* **81**, 10575-10587 (2007).
- 612 52. Lebailly, P. *et al.* Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers
613 occupationally exposed to the fungicide captan. *Occup Environ Med* **60**, 910-917
614 (2003).

615 **ACKNOWLEDGEMENTS**

616 This study was supported by the “Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest”, comities of “Indre
617 et Loire” and “Cher”. D. Bencherit was supported by a fellowship from the INRA/Region
618 Centre Val de Loire. We thank F. Paillard for editing the manuscript, D. Padeloup for his
619 constructive comments on the manuscript, as well as C. Berthault and K. Courvoisier for their
620 technical help. We are most grateful to S. Trapp for his helpful comments and corrections of
621 the revised version of the manuscript.

622 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

623 L.T.F. initiated and supervised the study. L.T.F. and D.B. designed and conducted the
624 experiments and analyzed the data. S.R. contributed to *in vivo* experiments and to comet
625 assays. Y.L. performed flow cytometry analysis. L.F.T. and D.B. wrote the manuscript. C.D.
626 supervised with L.F.T. and contributed to the *in vivo* experiments and discussed the
627 experiments and the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Induction of DNA damage in PBMCs of chickens infected with MDV. Specific pathogen free (SPF) susceptible White Leghorn chicks (B13/B13 haplotype) were inoculated intramuscularly with 1,000 pfu of the very virulent MDV strain vRB-1B. DNA damage onset in PBMCs was assessed in 10 non-infected chickens (each animals being represented on the graph as a circle) and 13 birds infected with vRB-1B (represented as triangles). Blood was collected from all birds at indicated time points. (a) DNA damage analysis in PBMCs isolated from mock- and vRB-1B infected chickens by alkaline comet assays. Two slides for comet assays were prepared for each animal at each time point. A minimum of 50 comets were observed and further analyzed on each replicate slide using the CometScore software. Results are presented as dot plot, each dot representing an animal and the mean of OTM for each group is indicated as a bar (**p<0.001). (b) Viral load estimated after DNA extraction from whole blood and quantification of MDV genome copies using qPCR. For each group, the number of ICP4 copies (referring to the MDV genome copies) was normalized to 10⁶ copies of cellular genome (estimated by the detection of iNOS copies); the medians are indicated as a bar.

Figure 2. Induction of DNA damage in MDV lytically infected cells. CESCes were infected with 10⁴ pfu of recEGFPVP22. (a) DNA damage analysis in mock- or recEGFPVP22-infected CESCes. At 4 dpi, EGFP-positive and -negative cells were sorted by flow cytometry and DNA damage was analyzed from 2.10⁵ cells by alkaline comet assays. Two slides for comet assays were prepared for each condition and analyzed using the CometScore software. Results are presented as the mean of OTM (± SD; ***p<0,001) and representative images of

comets are shown as photographs. (b) Frequency distribution of the comets with respect to their OTM value. (c) Expression and localization of γ H2AX in CESC cells infected with recEGFPVP22. At 4 dpi, mock- and recEGFPVP22-infected CESC cells were subjected to immunofluorescence using a mouse anti- γ H2AX monoclonal antibody and an AlexaFluor 594-conjugated secondary antibody (red). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue) and infected cells expressing the EGFP-tagged VP22 were directly visualized by fluorescent microscopy (green). (d) ROS accumulation in supernatant of mock- and recEGFPVP22-infected cells. At 24, 48, 72, and 96 hpi, supernatant of mock- and recEGFPVP22-infected cells were collected, and H_2O_2 accumulation was quantified using the ROS-Glo™ kit (Promega). Results were normalized to RLU values obtained from mock-infected cells and expressed as means ($\pm$ SD).

Figure 3. DNA damage induction facilitates MDV replication. CESC cells were infected with recEGFPVP22 and treated at 6 hpi with 0.033, 0.066 or 0.132 μ M of ETP or with DMSO (as a negative control). (a-b) At 24, 48, 72, and 96 hpi, DNA was extracted and MDV replication was assessed using qPCR. For each group, the number of MDV genome copies (corresponding to ICP4 copies number) was normalized per 10^6 cells (estimated by the iNOS copies number). (a) Representative growth curve from a total of 3 independent experiments. Means of qPCR triplicates are indicated ($\pm$ SD). (b) Fold change in MDV copies in ETP-treated cells relative to DMSO-treated cells (** $p < 0.05$). (c) Number of MDV lytically infected cells estimated at 96 hpi by cytometry on the basis of EGFP-tagged VP22 expression. The percentage of GFP positive cells was determined specifically in viable cells labeled using the viability dye eFluor-780. Means are represented as bars ($\pm$ SD ; * $p < 0.05$). (d) MDV plaques size was measured at 48 hpi directly from the fluorescence emitted from the viral EGFP-tagged VP22 protein. Means are presented as histograms ($\pm$ SD ; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

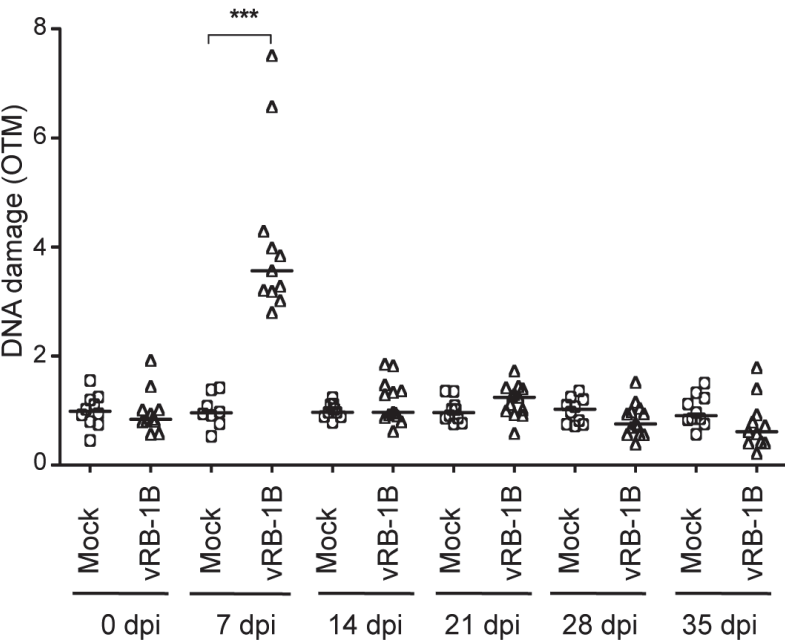
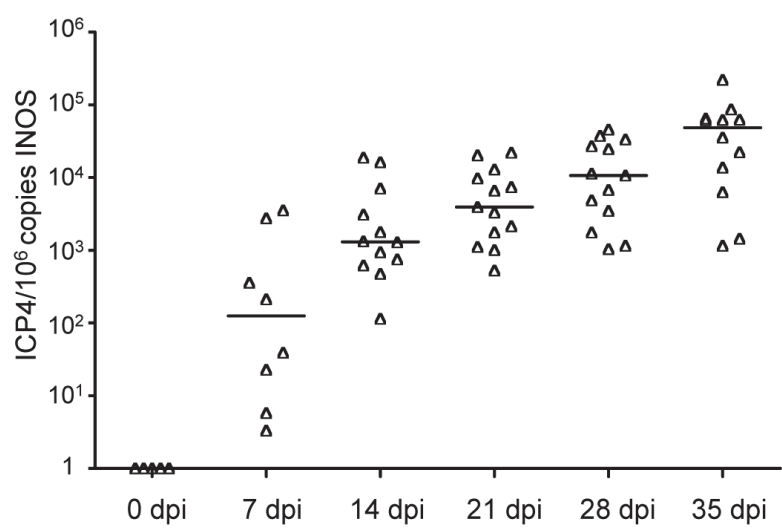
Figure 4. DNA damage analysis in latently versus lytically MDV infected lymphocytes.

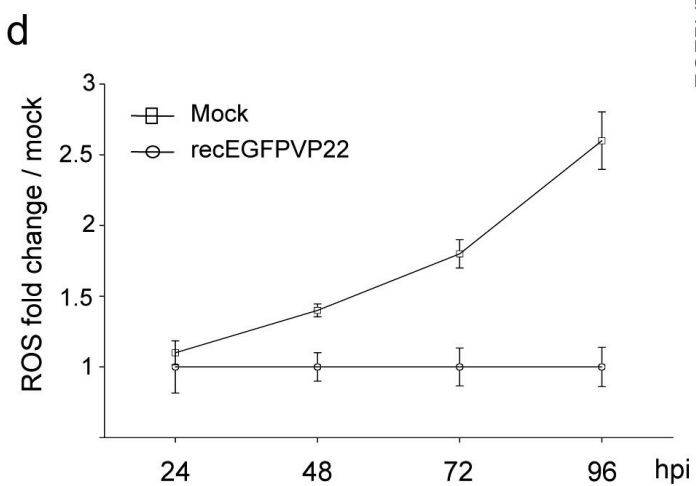
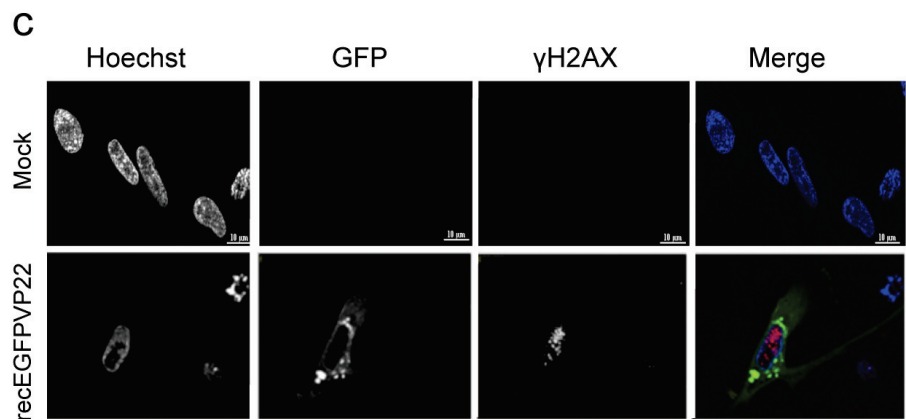
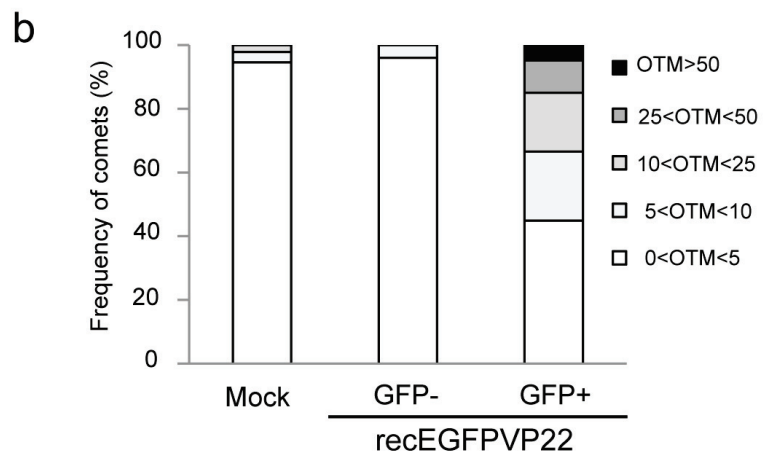
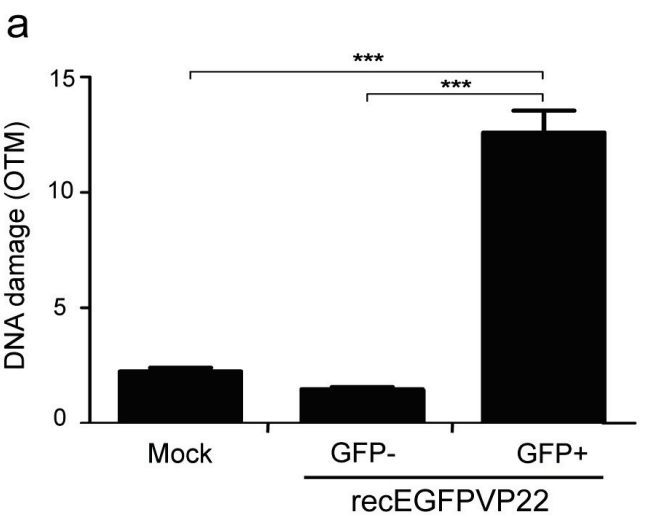
3867(K) cells undergoing MDV lytic replication were sorted by cytometry on the basis of the expression of the UL47 gene tagged with EGFP. (a) DNA damage analysis in lytically (GFP+) and latently (GFP-) infected cells. The alkaline comet assay was performed on EGFP-positive and -negative sorted cells. Results are presented as the mean of OTM ($\pm$ SD; *** $p < 0.001$) and comets pictures are shown below. (b) Frequency distribution of the comets with respect to their OTM value. (c-d) Effect of ETP-induced DNA damage on MDV reactivation. 3867(K) cells were treated with ETP at the indicated concentrations for 48 hours. (c) MDV replication was evaluated by quantifying the mRNA expression of the immediate-early gene ICP4 by qRT-PCR. ICP4 expression was normalized to the expression of GAPDH and results are presented as means ($\pm$ SD; ** $p < 0.005$). (d) Number of MDV reactivated 3867(K) cells. The percentage of GFP positive cells (expressing the EGFP-tagged UL47 protein) was determined 48h post-treatment by cytometry specifically in viable cells labeled using the viability dye eFluor-780. Means are represented as bars ($\pm$ SD; * $p < 0.05$). (a-d) Results are representative of 3 independent experiments realized in triplicates.

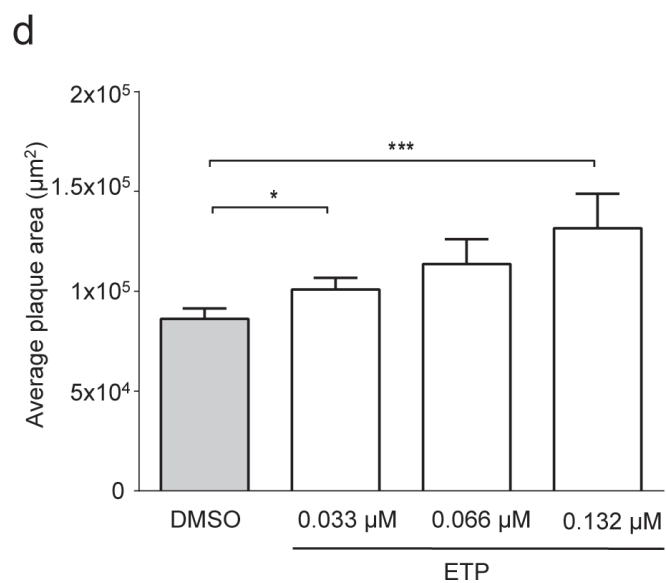
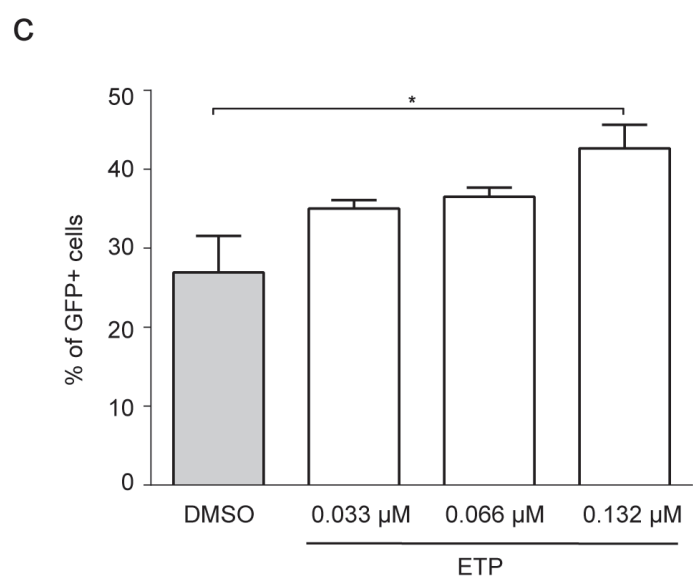
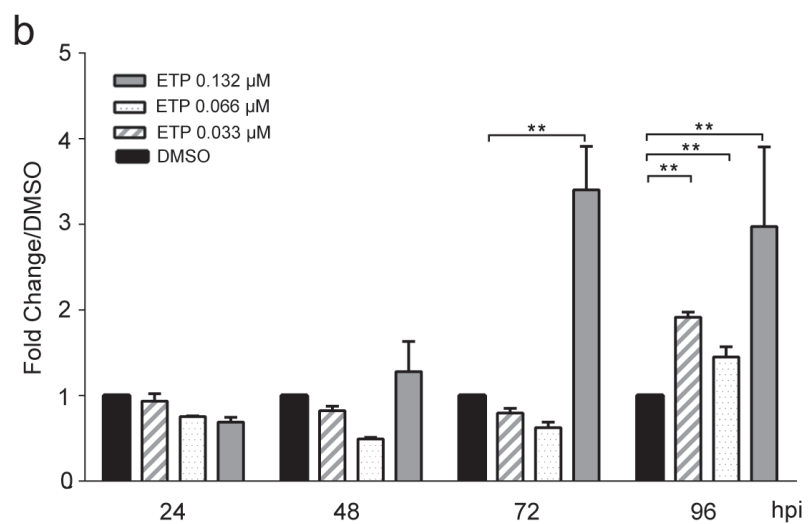
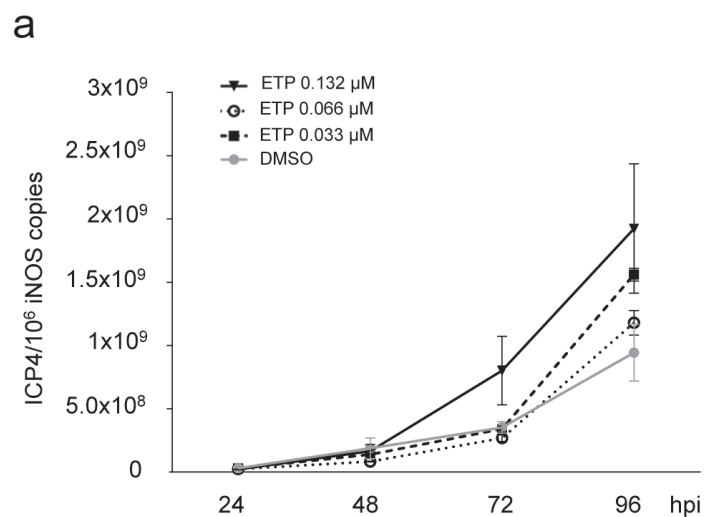
Figure 5. Role of VP22 and DNA damage in MDV-mediated oncogenicity in chickens.

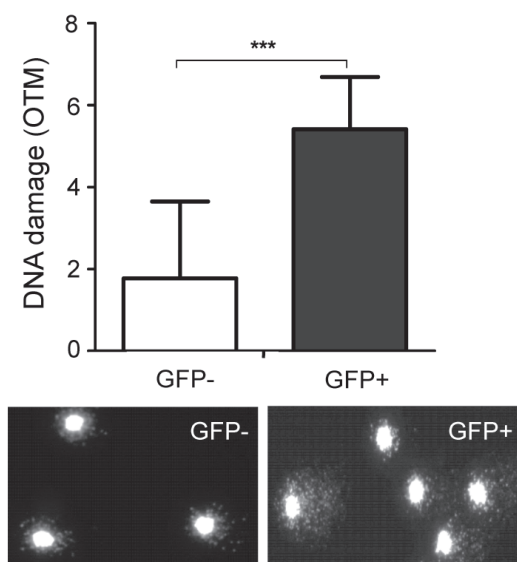
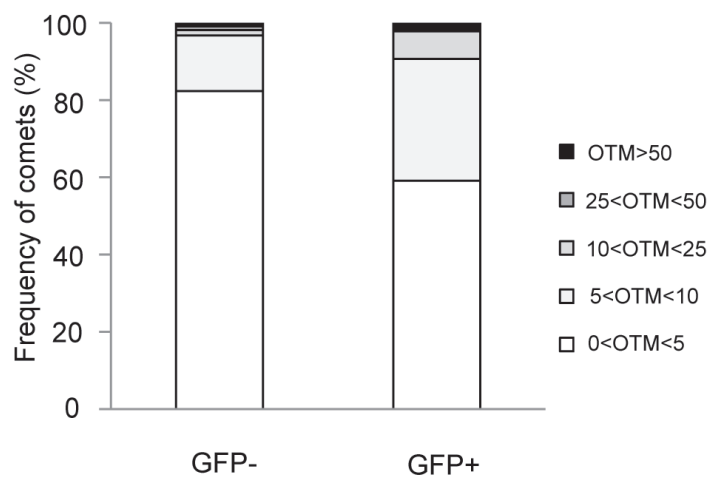
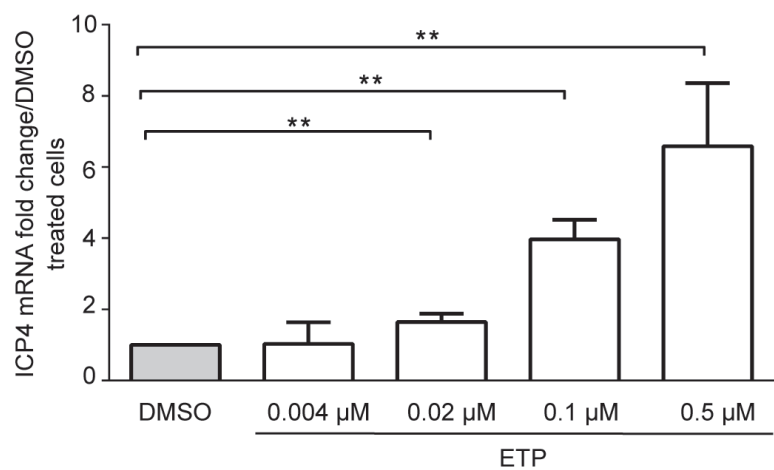
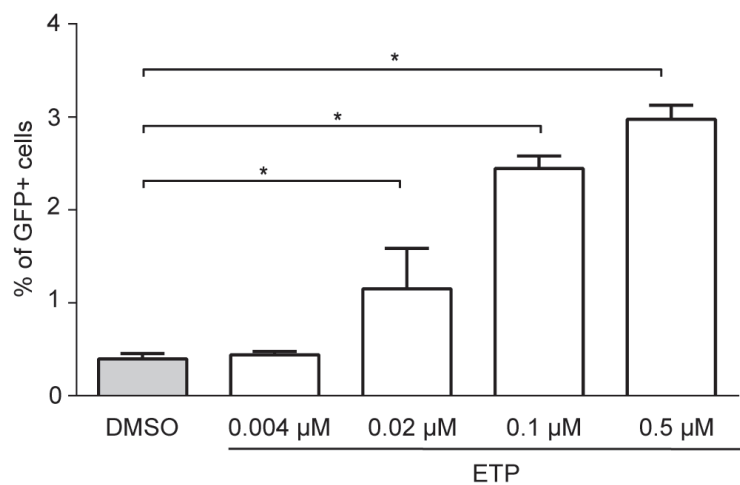
SPF White Leghorn chicks were inoculated with 1,500 pfu of vRB-1B, vRB-1B EGFP22, or vRB-1B 22EGFP. Blood was collected from all birds at indicated time points and PBMCs were isolated. (a) MDV viral load was evaluated by qPCR on DNA extracted from PBMCs. The number of MDV copies per 10^6 cells is presented as a dot plot, each dot representing an animal. For each group, the median is indicated as a bar (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$). (b) DNA damage was quantified from $2 \cdot 10^5$ PBMCs using the alkaline comet assay. Results are presented as dot plots, each dot representing an animal. For each group, the median of the OTM is indicated as a bar (***) $p < 0.001$).

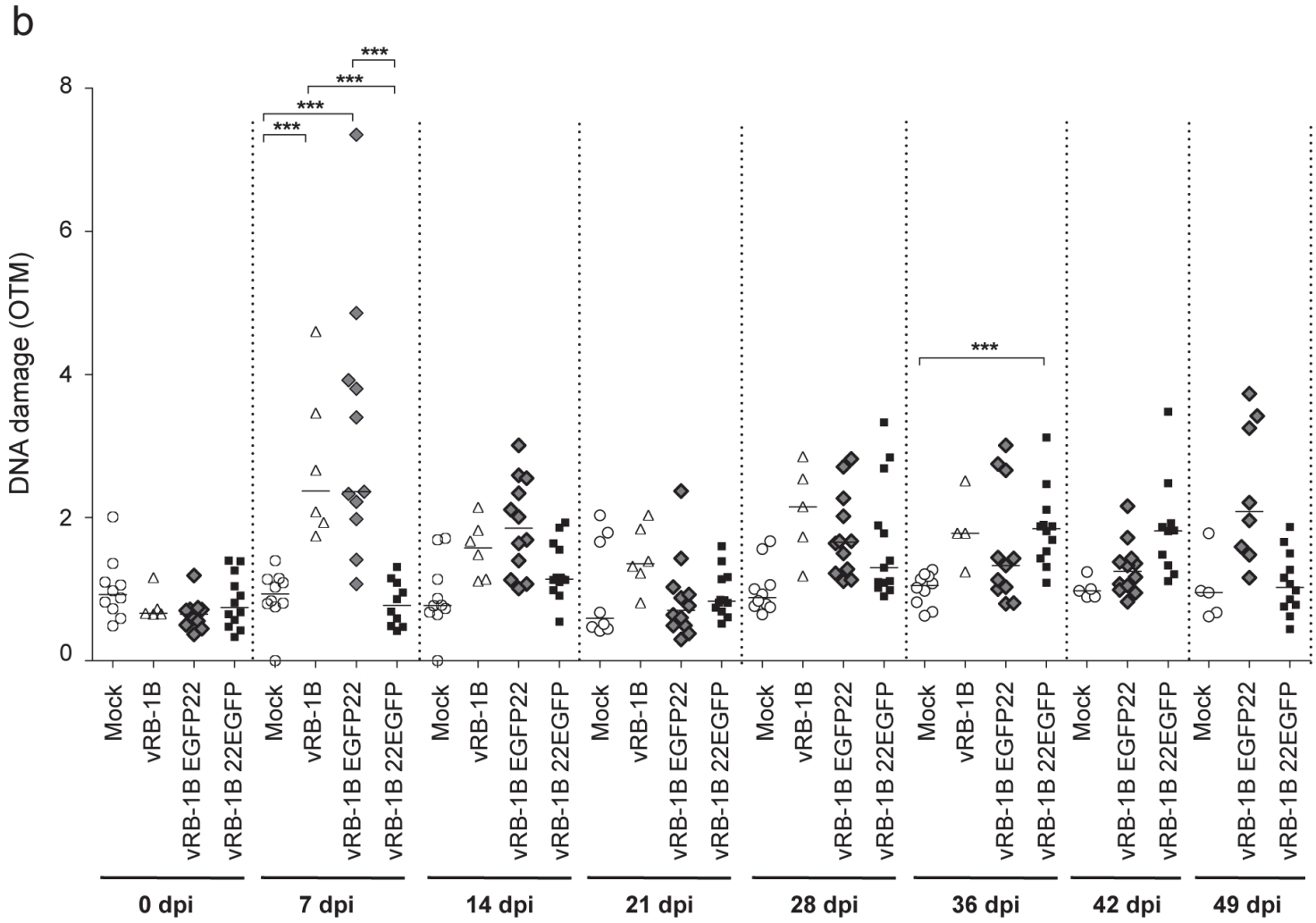
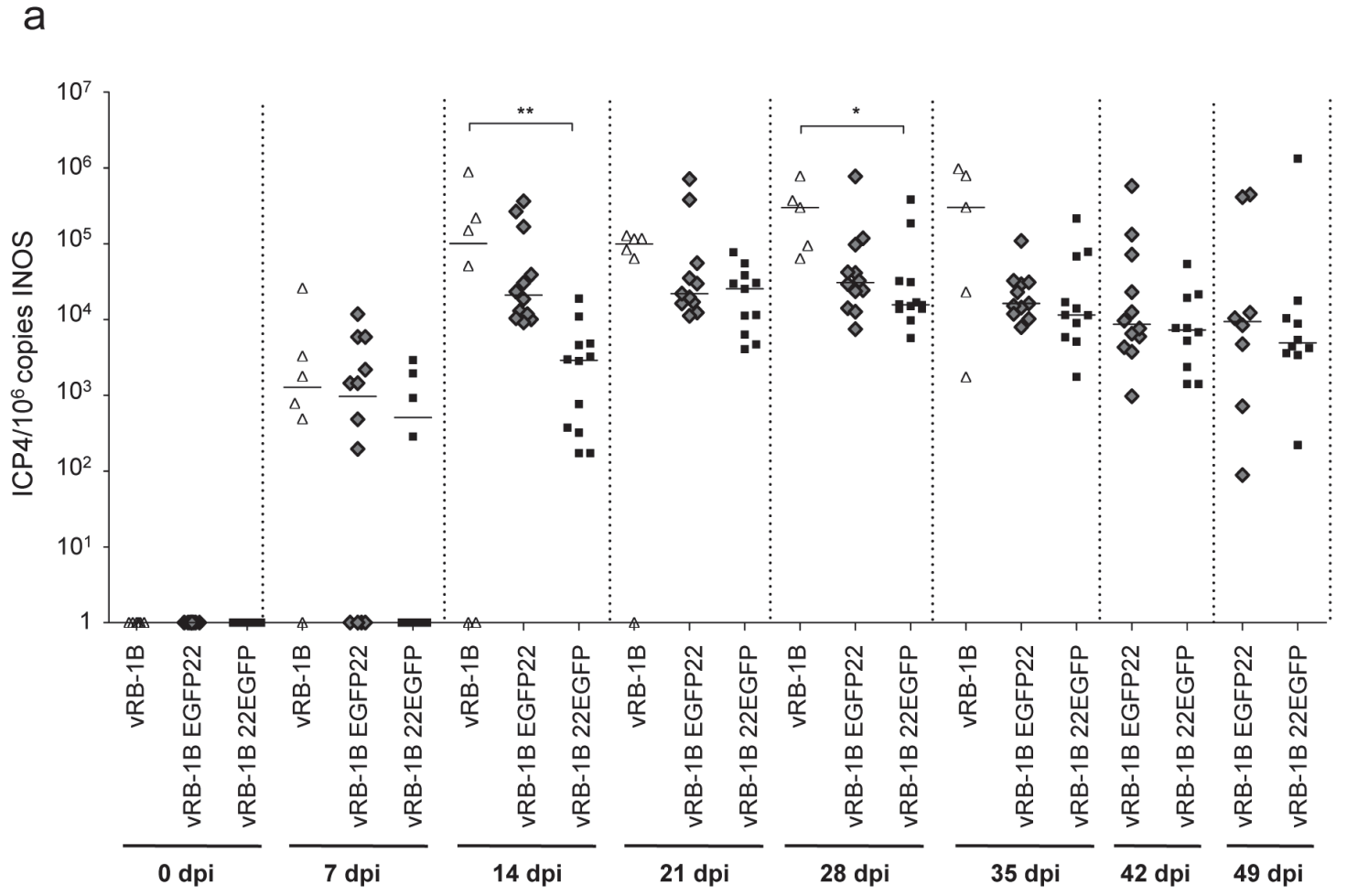
Figure 6. Proposed model of the multistep mechanism leading to MDV-mediated tumorigenesis. This model was based on the “hit and rest” mechanism previously described by Avanzi ⁴⁸. Early lytic replication of MDV results in DNA lesions into the genome of lymphocytes. DNA damage induction and/or the DDR activation are beneficial for MDV replication. Most of the cells lytically infected are killed and a small population of CD4+ T-lymphocytes undergoes MDV-latent infection. DNA lesions and/or the associated DNA repair machinery (i.e., homologous recombination) may facilitate the integration of the MDV genome within the host genomic DNA. Moreover, latently infected cells, which already have accumulated DNA lesions from MDV lytic replication, may be more sensitive to further genetic alterations resulting from MDV reactivation or MDV oncogenes expression. Consequently, DSBs accumulated from the early MDV replication could predispose cells to genomic instability which, when combined to cellular pathways deregulation (cell cycle, telomerase activation, etc.), could lead to cellular transformation and finally to tumor development.

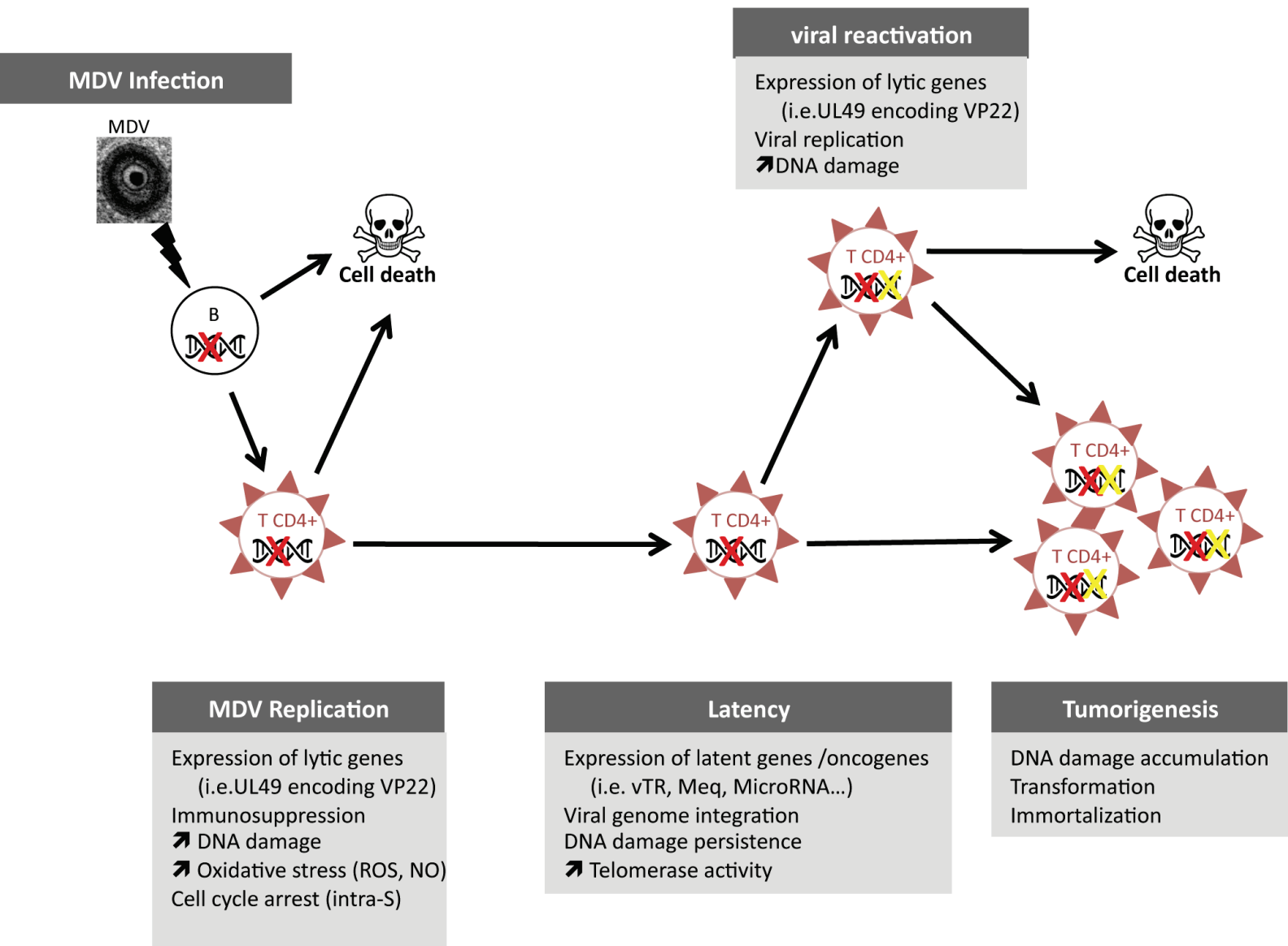
a**b**





a**b****c****d**





Genomic instability

Annexe 2 Article publié dans PLOS ONE.

Cell Cycle Modulation by Marek's Disease Virus: The Tegument Protein VP22 Triggers S-Phase Arrest and DNA Damage in Proliferating Cells



Laëticia Trapp-Fragnet^{1*}, Djihad Bencherit¹, Danièle Chabanne-Vautherot¹, Yves Le Vern², Sylvie Remy¹, Elisa Boutet-Robinet^{3,4}, Gladys Mirey^{3,4}, Jean-François Vautherot¹, Caroline Denesvre¹

1 INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Equipe Biologie des Virus Aviaires, Nouzilly, France, **2** INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Laboratoire de Cytométrie, Nouzilly, France, **3** INRA, UMR 1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Toulouse, France, **4** University of Toulouse, UPS, UMR1331, Toxalim, Toulouse, France

Abstract

Marek's disease is one of the most common viral diseases of poultry affecting chicken flocks worldwide. The disease is caused by an alphaherpesvirus, the Marek's disease virus (MDV), and is characterized by the rapid onset of multifocal aggressive T-cell lymphoma in the chicken host. Although several viral oncogenes have been identified, the detailed mechanisms underlying MDV-induced lymphomagenesis are still poorly understood. Many viruses modulate cell cycle progression to enhance their replication and persistence in the host cell, in the case of some oncogenic viruses ultimately leading to cellular transformation and oncogenesis. In the present study, we found that MDV, like other viruses, is able to subvert the cell cycle progression by triggering the proliferation of low proliferating chicken cells and a subsequent delay of the cell cycle progression into S-phase. We further identified the tegument protein VP22 (pUL49) as a major MDV-encoded cell cycle regulator, as its vector-driven overexpression in cells lead to a dramatic cell cycle arrest in S-phase. This striking functional feature of VP22 appears to depend on its ability to associate with histones in the nucleus. Finally, we established that VP22 expression triggers the induction of massive and severe DNA damages in cells, which might cause the observed intra S-phase arrest. Taken together, our results provide the first evidence for a hitherto unknown function of the VP22 tegument protein in herpesviral reprogramming of the cell cycle of the host cell and its potential implication in the generation of DNA damages.

Citation: Trapp-Fragnet L, Bencherit D, Chabanne-Vautherot D, Le Vern Y, Remy S, et al. (2014) Cell Cycle Modulation by Marek's Disease Virus: The Tegument Protein VP22 Triggers S-Phase Arrest and DNA Damage in Proliferating Cells. *PLoS ONE* 9(6): e100004. doi:10.1371/journal.pone.0100004

Editor: Bruce W. Banfield, Queen's University, Canada

Received: December 28, 2013; **Accepted:** May 21, 2014; **Published:** June 19, 2014

Copyright: © 2014 Trapp-Fragnet et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the "Ligue contre le Cancer du Grand-Ouest", comités of "Indre et Loire" and "Vendée" (<http://www.ligue-cancer.net>). The "Cluster en Infectiologie de la Région Centre" (<http://www.infectiologie-regioncentre.fr>) supported the technical collaboration between the "Biologie des Virus Aviaires" laboratory and the Research Center in Food Toxicology. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fragnet@tours.inra.fr

Introduction

Gallid herpesvirus 2 (GaHV-2), more frequently referred to as Marek's disease virus (MDV), is an alphaherpesvirus (type species of the genus *Mardivirus*) and the causative agent of a highly infectious lymphoproliferative disease termed Marek's disease (MD) affecting many birds in the *Phasianidae* family. Despite global vaccination campaigns that are effective to prevent disease development, MDV field strains continue to spread in poultry and appear to evolve towards increased virulence. The dissemination of MDV in poultry is mediated by infectious viral particles associated with dander and feather debris [1,2]. With the exception of the feather follicle epithelium, the site where free infectious viral particles are shed, the virus remains strictly cell-associated and progression of the infection is restricted to viral cell-to-cell spread [3]. The MDV particle is composed of a 180-kbp double-strand DNA genome packaged in an icosahedral capsid surrounded by a tegument layer, which insures the morphological and functional continuity between the capsid and the host cell derived viral envelope. By homology with other alphaherpes-

viruses, a number of viral proteins composing the tegument have been identified, including a major tegument protein, VP22 (pUL49), various trans-activators and two protein kinases (pUL13 and pUS3). The UL49-encoded VP22 protein is abundantly expressed in infected cells and is essential for MDV replication [4,5,6]. VP22 is a specific tegument protein of alphaherpesviruses and conserved among this subfamily. To date, the absolute requirement of the UL49 gene for viral replication was initially demonstrated for MDV [5] and afterwards for Varicella Zoster virus (VZV) [7]. The deletion of VP22 in other alphaherpesviruses including Herpes Simplex virus 1 (HSV-1), Pseudorabies virus (PRV), Bovine herpesvirus 1 (BoV-1) still allows viral replication, even though viral spread is reduced in some cell types [8,9,10,11,12]. While its role in virus infection remains unclear, it was demonstrated for HSV-1 that VP22 interacts with and recruits various viral proteins, such as the trans-activators ICP0, ICP4 and viral glycoproteins composing the infectious virions [9,10,13]. Furthermore, VP22 was shown to interact with cellular proteins involved in the organization of microtubules and nucleosome assembly [14,15]. The VP22 protein encoded by

MDV shares common functional features with VP22 encoded by other alphaherpesviruses [5,16]. It was previously shown that MDV-VP22 shows both a cytoplasmic and nuclear location in infected cells and accumulates in the nucleus upon overexpression in cells [4]. Moreover, MDV-VP22 exhibits a strong affinity to DNA, especially heterochromatin, and to microtubules [4,17]. We previously demonstrated the role of VP22 in MDV cell-to-cell spread, which could explain the necessity of VP22 in MDV replication [16,18]. It was recently shown that recombinant MDV viruses expressing VP22 with a C or N-terminal GFP-tag are highly attenuated *in vivo* suggesting that VP22 might play a role in MDV-induced lymphomagenesis [6,19]. However, the precise role of VP22 in MDV replication and MD pathogenesis remains unclear. Notably, the functional significance of the VP22 nuclear distribution is still unknown, even if previous reports on VP22 encoded by alphaherpesviruses evoke a possible regulatory function of VP22 within nuclei [17,20,21,22].

Virus infection frequently results in the disturbance of key cellular processes within the host cell. The subversion of cell cycle pathways is a well-established mechanism by which viruses create the most suitable environment for their replication. Especially, the induction of S-phase is either mandatory or at least advantageous for lytic replication of a number of viruses. The eminent role of cellular factors from the DNA synthesis machinery in viral replication was demonstrated for viruses from different families such as the Flaviviridae, Retroviridae, Parvoviridae, and Polyomaviridae [23,24,25,26,27,28]. In contrast, herpesviruses encode their own DNA polymerase and accessory proteins, and thus theoretically do not require an S-phase environment to support their replication (reviewed in [29,30]). Nevertheless, several studies have demonstrated the importance of the S-phase in the life cycle of VZV and Epstein-Barr virus (EBV) [31,32]. For EBV, S-phase cyclin-dependent kinase activity is essential for the expression of immediate early and early viral proteins and is thus required for viral replication [31]. *Vice versa*, EBV lytic replication is able to provide a S-phase-like cellular environment by modulating DNA damage pathways [33]. The impact of the S-phase environment on the viral life cycle is not restricted to lytic viral replication but is also involved in the episomal genome maintenance during viral latency or reactivation processes, as was recently shown for EBV and the Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) [34,35]. Strikingly, infections with oncogenic viruses (e.g., SV40, HPV, HTLV-1, EBV) are often associated with S-phase deregulation and genomic instability, preferentially occurring during this critical phase of the cell cycle [24,27,33,36].

In relation with cell cycle delay, DNA damage signaling is often triggered upon viral infections (reviewed in [37,38]). Particularly, DNA damage response (DDR) pathways are preferential targets of herpesviruses, including HSV-1, EBV, KSHV, human cytomegalovirus and murine gamma-herpesvirus 68 [33,39,40,41,42,43]. The role of DDR in herpesviruses life cycle is complex. On the one hand, recent evidence suggests that DDR acts as an efficient antiviral response [44]. On the other hand, DDR modulation can be beneficial for herpesviruses by facilitating viral replication, viral genome processing or latency establishment [33,34,40,42,45]. Moreover, during the course of cellular infections with large DNA tumour viruses, such as human papillomaviruses (HPV) or gammaherpesviruses (e.g. EBV and KSHV), the generation of DNA damage and/or activation of DDR were found to be associated with genomic instability which in turns can participate to virus-induced tumorigenesis (reviewed in [46,47,48]).

In the present study, we set out to elucidate an important aspect of MDV-host cell interaction by analyzing the impact of MDV and virus-encoded proteins on the regulation of the cell cycle. We

demonstrate that MDV lytic infection activates the proliferation of chicken primary skin cells concomitant with a delay in S-phase. By studying the effects of transient vector-driven overexpression in a proliferating chicken cell line, we identified the VP22 tegument protein as a potent cell cycle modulator encoded by MDV. A comparative experimental approach employing VP22 variants with a C- or N-terminal eGFP-tag allowed us to show that an unmodified C-terminus of VP22 is required to elicit the observed S-phase arrest. Moreover, the cell cycle regulating activity of VP22 relies on its ability to be associated with chromatin in the nucleus. In order to define the mechanisms underlying the drastic S-phase arrest observed in VP22 expressing cells, we investigated the impact of VP22 expression on DNA integrity. Strikingly, we found that the DNA of cells expressing this viral protein showed significant DNA damage, as was assessed by comet assay. Together, these data provide new insights into the interaction of MDV with the host cell during lytic replication and pinpoint to a novel powerful function of VP22 that may help to better understand the pre-eminent role of VP22 in MDV replication and more generally in the life cycle of the virus.

Materials and Methods

Cell Culture and Viruses

Chicken Embryo Skin Cells (CESC) were prepared from 12-days-old chicken embryos (LD1 Brown Leghorn chicken strain) and maintained in culture as previously described [4]. This procedure was carried out in strict compliance with the French legislation for animal experiments and ethics stating that the use of embryos from oviparous species before the last third of their normal development (i.e. before day 14 for chicken embryos) is not submitted to regulation (Art. R.214-88). Thus, the preparation of CESC from 12-days-old chicken embryos does not require the permission of governmental or local authorities. Embryos were sacrificed by opening the eggshell, cervical dislocation and immersion in William's Medium E (Lonza) supplemented with collagenase as described by Dorange *et al.*, 2000. The chicken hepatocellular carcinoma cell line LMH was cultured on gelatin-coated flasks in William's Medium E (Lonza) supplemented with 2 mM glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. As positive controls for DNA damage analyses, LMH cells were treated for 24 h with 1.5 µM etoposide, a topoisomerase II α inhibitor potent inducer of DNA double strand breaks.

Recombinant viruses were generated from the avirulent MDV-BAC20 strain cloned as bacterial artificial chromosome (BAC) [49]. The recEGFPVP22 recombinant virus harboring the UL49 gene fused at its 5' end with the eGFP gene was previously described [16].

Parental BAC20 and recEGFPVP22 viruses were produced after transfection of BAC-DNA into CESC as previously reported [16]. Infections were performed by co-culture of 7×10^6 fresh CESC in a 100-mm diameter plate with infected cells at a ratio of 10^4 PFU/plate.

Plasmids

The pcDNA3-UL49 and pcDNA3-UL48 plasmids encoding the wild-type (wt) VP22 and VP16 tegument proteins of the RB-1B oncogenic MDV-RB-1B strain, have been previously described [4]. Two plasmids harboring the VP22 protein cloned in frame with the enhanced green fluorescent protein (eGFP) were used: (i) the pEGFP-UL49, encoding a VP22 tagged with eGFP at its N-terminal extremity [18] and (ii) the pUL49-eGFP in which VP22 is tagged with eGFP at its C-terminus. The latter construct was

generated by PCR amplification of the UL49-eGFP fragment from the purified rUL49-eGFP BAC-DNA kindly provided by B. Kauer (Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Germany) [19]. The primer pairs used for amplification were UL49FCL-BamHI/eGFPendNotI (Table 1). The PCR product was inserted into the PCR2.1 TOPO TA cloning vector (Invitrogen) and the BamHI/NotI fragment was then sub-cloned into the peGFP-N1 vector (BD Biosciences, Clontech) where the internal eGFP cassette was previously removed by BglII/NotI enzymatic cleavage. The pGE109 plasmid harbouring the UL49 gene encoded by HSV-1 was kindly provided by G. Elliott [50]. The HSV1-UL49 gene was cloned in frame with eGFP at the Bgl II site in the peGFP-C1 vector (BD Biosciences, Clontech). The VZV-ORF63 encoding the VZV orthologue of UL49 was amplified from pcDNA63wt (kindly provided by C. Sadzot-Delvaux) with the primer pair 5FUL49VZVXhoI/3RUL49VZVBamHI (Table 1) [51]. The PCR product was T/A-cloned into the pGEMT-easy cloning vector (Promega) and subsequently sub-cloned in fusion with eGFP in the peGFP-C1 vector at the Xho I and Bam HI sites.

The genes encoding UL37 (pUL37), UL54 (encoding the ICP27 trans-activator), and the two viral kinases UL13 (pUL13) and US3 (pUS3) were amplified from RB-1B genomic DNA with the primer pairs UL37F/UL37R; UL13F/UL13R; UL54F/UL54R, and US3F/US3R, respectively (Table 1). Amplification products were inserted into the pGEMT-easy cloning vector (Promega). The UL37, UL13, and US3 genes were sub-cloned under control of the cytomegalovirus immediate early promoter into the pcDNA3.1 vector (Invitrogen) at the NotI site, and the UL54 gene was cloned into the pcDNA3.1 vector at the EcoRV site. All intermediate and final constructs were verified by sequencing (Eurofins, MWG Operon).

Transient Expression

The different eukaryotic expression vectors were transfected into CESC or LMH by using Lipofectamine 2000, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Briefly, cells at 80% of confluency plated on 60-mm dishes were rinsed twice with OptiMEM (Fischer Scientific) and were transfected with 5 µg of the plasmid of interest. After 6 h of incubation at 37°C, the

transfection mix was removed and serum complemented fresh medium was added. Cells were harvested 24 h or 48 h after transfection for further analysis. Each transfection was performed in triplicate.

Cell Cycle Analysis

At the time points indicated, 1.10^6 vector-transfected or infected cells were trypsinized and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) prior to fixation with 70% ethanol at 4°C for 24 h. Cells were then washed twice in cold PBS and incubated in PBS containing 500 µg/ml Ribonuclease A (Sigma-Aldrich) at 37°C for 1 h. After filtration through a 30-µm pore size membrane, cells were stained with 10 µg/ml propidium iodide (Invitrogen) for 15 min in the dark. Flow cytometry analysis was performed using a MoFlo high-speed cell sorter (Beckman Coulter, Fort Collins, CO, USA) equipped with a solid-state laser operating at 488 nm and 100 mW. Cellular DNA content was analyzed with a 740 nm long-pass filter. Doublets were discarded on the basis of combination of pulse width and area/peak fluorescence. eGFP autofluorescence was detected with a 530/40 nm band-pass filter and the cell cycle distribution was specifically analyzed for eGFP-positive versus eGFP-negative cells. Cell cycle profiles were analyzed with the MultiCycle AV software (Phoenix Flow Systems, California, USA).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Real Time Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from 10^6 cells with Trizol according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). RNAs were treated with RNase-free RQ1 DNase (Promega, France) and RNA concentration was measured with a NanoDrop spectrophotometer. One µg of each total RNA preparation was reverse transcribed using 100 µg/mL oligo(dT) primers (Promega) and M-MLV reverse transcriptase according to the manufacturer's recommendations (Promega).

The expression of the different cellular genes involved in cell cycle regulation was analyzed by qPCR. Amplification of the cDNA by qPCR (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System; Bio-Rad) was performed in triplicate, using 200 ng of

Table 1. Primers used for the cloning of the genes of interest in eukaryotic expression vectors.

Primer names	Primer sequences
UL49FCLBamHI ⁽¹⁾	5'GGG GATCC CATGGGGATTCTGAAAGCGG3'
eGFPendNotI ⁽²⁾	5'AGGCGGCCGCTTACTTGACAGCTCGTCCATG3'
5FUL49VZV XhoI ⁽³⁾	5'GG CTCGAG CTTTGGCATCTCCGACGGTGA3'
3RUL49VZVBamHI ⁽¹⁾	5'GGG GATCC TATTTTCGCGTATCAGTTC3'
UL37F	5'AGGCCTATGTCTGCCGTAAACACCGA3'
UL37R	5'CTGCAGTTATGCATTATCACCGTTTG3'
UL13F	5'CCAGATCTATGGATACTGAATCAAAAAAC3'
UL13R	5'CCGAATTCCTAGTTCATAACAACAAATC3'
UL54F	5'AGGCCTATGTCTGTAGATGCATTCTCTC3'
UL54R	5'AGGCCTTAGATTACATAACAAACAGAGTATTGCAG3'
US3F	5'CCAGATCTATGTCTTCGAGTCCGGAGGC3'
US3R	5'CCGAATTCCTACATATGAGCGGCAGTTATC3'

⁽¹⁾BamHI restriction site is indicated in bold.

⁽²⁾NotI restriction site is underlined.

⁽³⁾XhoI restriction site is indicated in bold underlined.

doi:10.1371/journal.pone.0100004.t001

cDNA, 7.5 μ l 2 $\times$ iQ Supermix SYBR green (Bio-Rad), 1 μ l ultrapure water (Sigma-Aldrich) and 0.75 μ l of each specific primer (10 μ M) selected according to the EST data deposited in Genbank (described in Table 2). The PCR program consisted of a 5 min activation step at 95°C, followed by 39 cycles of 95°C for 10 s and 60°C for 10 s. Expression of the chicken glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used for the normalization of all target gene mRNAs to enable cross-comparisons among the samples. The relative changes in gene expression were determined by the $2(-\Delta\Delta CT)$ method.

The expression of MDV genes (ICP4, UL13, US3, UL49, UL37, UL54 and UL48) was assessed by RT-PCR performed with 100 ng of the synthesized cDNA prepared from LMH or CESC cells transfected with the corresponding expression vector and

10 μ M of specific primers (Table 2). The GAPDH gene was used as internal control. Specific PCR products were resolved by agarose (2%) gel electrophoresis.

Immunofluorescence Microscopy

At 24 h or 48 h post-transfection, cells grown on glass coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min at room temperature (RT), permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5 min at RT and blocked with PBS, 0.1% Triton X-100, 2% Bovine Serum Albumin (BSA). Immunostainings were performed with monoclonal antibodies directed against phospho-histone H2AX (Ser139) (Millipore; clone JBW301) and tubulin (Sigma-Aldrich; catalog number T9026) at a dilution of 1:250 and 1:500, respectively. Goat anti-mouse IgG Alexa-Fluor 594 secondary

Table 2. List of forward (For) and reverse (Rev) primers used for (q)RT-PCR.

Target gene		Primers sequences	Accession number gene
Cyclin A	For	5'CAAGCTCCAGAATGAAACTC3'	GenBank X72892
	Rev	5'GATGTAGACGAAGCTGCTA3'	
Cyclin B	For	5'GTTCTGTCTCTGTCCTAT3'	GenBank X62531
	Rev	5'AGCTCAAGCTGTCTCAGATA3'	
Cyclin D	For	5'GCATTTACACCGACAACCTCC3'	GenBank NM_205381
	Rev	5'GCATGTTACGGATGATCTG3'	
Cyclin E	For	5'TCACCGCTACCAATTCTGGG3'	ENSGALT00000007159
	Rev	5'ACTTCACAACTCCATTAG3'	
Cdk1	For	5'GTAGTGACACTGTGTACAG3'	GenBank NM_205314
	Rev	5'CTGAAGATTCTGAAGAGCTG3'	
Cdk6	For	5'ATGTTGATCAGCTAGGAAA3'	GenBank NM_001007892
	Rev	5'CGATTTAAGAAGCAAGTCTT3'	
pRb	For	5'GATGTGTTCCATGTATGGCA3'	GenBank NM_204419
	Rev	5'TGAACACTAAGTTGTAGAAG3'	
p53	For	5'CAGCCAAATCGTCACTGCG3'	Genbank NM_205264
	Rev	5'CCGACCACTTCGGCCACGT3'	
c-Myc	For	5'CCGAGGACATCTGGAAGAAGTT3'	GenBank J00889.1
	Rev	5'TCGCAGATGAAGCTCTGGTTGA3'	
E2F1	For	5'CGGTGAAGCGGAAGCTGAAC3'	GenBank NM_205219
	Rev	5'GCTCCAGGAAGCGCTTGGTG3'	
ICP4	For	5'TTTCTAGCAAGGAGCGACGC3'	GenBank NC_002229.3
	Rev	5'CTGACTTGCCTTACGGGAA3'	
UL13	For	5'CTCGGCAAGCAGTTGTGTTTC3'	Genbank EF523390
	Rev	5'GTCAGACTAAAATCACCATTAC3'	
US3	For	5'CGCCTGAAGTCTTGCACCTG3'	Genbank EF523390
	Rev	5'TGGATCTCAGCTGAGAACCTG3'	
UL49	For	5'GGAAGACGTTTCGTCTACAC3'	Genbank EF523390
	Rev	5'CATACGCTGATTAAATGCCACTG3'	
UL37	For	5'GCGCATTGGGTTGAAAGAAC3'	Genbank EF523390
	Rev	5'CGTTGCGCACTTATCAGCCG3'	
UL54	For	5'CTCGGAGTCCGATGACATG3'	Genbank EF523390
	Rev	5'GTTCTGCGTACACGGTGCC3'	
UL48	For	5'CGAAGCATCTCAATGGGACG3'	Genbank EF523390
	Rev	5'CTGAGCCCGAGTTCAGGAG3'	
GAPDH	For	5'TGATGATATCAAGAGGGTAGTGAAG3'	GenBank K01458
	Rev	5'TCCTTGGATGCCATGTGGACCAT3'	

doi:10.1371/journal.pone.0100004.t002

antibody (Invitrogen) was used at 1:2000. Cell nuclei were counterstained with Hoechst 33342 dye (Invitrogen). Cells were observed under an Axiovert 200 M inverted epifluorescence microscope equipped with the Apotome imaging system (Zeiss). Images were captured with an Axiocam MRm camera and analyzed by using the Axiovision software (Zeiss). To determine the cellular distribution of eGFP-tagged proteins, a minimum of 100 transfected cells were observed and the results were presented as percentage reflecting the nuclear and/or cytoplasmic distribution of the protein.

Cell Sorting

RecEGFPVP22-infected cells or LMH cells transfected with peGFP vectors were trypsinized 24 h post-transfection and filtered on a 30- μ m-pore-size membrane. eGFP positive and negative cells were sorted with a MoFlo (Beckman Coulter, Fort Collins, CO, USA) high-speed cell sorter equipped with a solid-state laser operating at 488 nm and 100 mW. Damaged cells and debris were eliminated on the basis of morphological criteria. eGFP fluorescence was analyzed with a 530/40 nm band-pass filter. The sorting speed was around 15,000 cells/s and cells were collected in appropriate media supplemented with 10% of FBS.

Alkaline Comet Assay

LMH cells transfected with the peGFP, peGFP-UL49 or pUL49-eGFP were harvested 24 h post-transfection and eGFP positive and negative cell were sorted by flow cytometry. After sorting, 2.10^5 cells were used to prepare 3 slides for comet assays, realized as previously described with minor modifications [52]. Electrophoresis was performed at 0.7 volts/cm for 26 min with the Sub-cell GT agarose gel electrophoresis system (Bio-Rad). DNA was then stained with a 20 μ g/ml ethidium bromide solution and slides were observed using the Axiovert 200 M inverted epifluorescence microscope (Zeiss). Images were captured with an Axiocam MRm camera (Zeiss) and comets were analyzed with the CometScore software version 1.5 (TriTek). The Tail Extend Moment (TEM) was calculated on the basis of the comet tail length and the relative proportion of DNA contained in the tail. Experiments were carried out 3 times and for each experiment, a minimum of 50 comets was analyzed on each of the 3 slides. Results are presented as the mean ($\pm$ SD) of the TEM calculated for each condition or as a distribution of the comets with respect to their respective TEM value.

High Salt Extraction of Histones

Salt extraction of histones from chromatin was performed as previously described [53]. Briefly, 1.10^7 cells were resuspended in 1 ml extraction buffer (340 mM Sucrose, 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 10% glycerol) containing 0.2% Igepal (Sigma-Aldrich) and 1X protease inhibitors (Complete Mini EDTA free, Roche). After incubation on ice for 10 min, the soluble fraction was separated from the nuclei by centrifugation at $6,500 \times g$ for 5 min. Nuclei were resuspended in 1 ml no-salt lysis buffer (3 mM EDTA, 0.2 mM). After incubation at 4°C for 30 min, the chromatin was pelleted by centrifugation at $6,500 \times g$ for 5 min, and incubated in 500 μ l of high-salt solubilization buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2.5 M NaCl and 0.05% NP40) for 30 min at 4°C. Nuclear debris were pelleted by centrifugation at $16,000 \times g$ for 10 min and the supernatant containing the histones fraction was collected. The proteins included in this fraction were separated in a 10% SDS-PAGE gel and revealed with colloidal coomassie blue staining (Sigma-Aldrich). Detection of VP22 was accomplished by immunoblotting using the monoclonal anti-VP22 antibody (L13a, [4]) diluted 1:1000 and

an anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich). Specific protein signals were detected with the Pierce ECL2 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) and the Fusion-FX7 imaging system (Vilber Lourmat). Quantification was carried out using the Bio-profil 1D++ software (ChemiSmart 5000).

Statistical Analysis

All graphs and statistics were performed using the GraphPad Prism software version 5.02 (San Diego, USA). Data are presented as means and standard deviations ($\pm$ SD). Significant differences were determined using Student's *t*-test. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

Results

MDV Infection Delays Cell Cycle Progression in S-phase

In order to analyze the influence of MDV infection on cell cycle progression, chicken embryonic skin cells (CESC) were infected with the parental BAC20 virus. At days 1, 4, and 6 post-infection (pi), mock- and virus-infected cells were fixed in ethanol, DNA was stained with propidium iodide and DNA content was analyzed by flow cytometry (Fig. 1A). While no significant difference in the cell cycle progression was observed in the early steps of infection (1 dpi), at day 4 pi the cell population in S-phase in BAC20-infected cells was about 3-fold higher than in mock-infected cells. At day 6 pi, the proportion of cells in S-phase as well as in the G2-phase remained 3-fold higher in BAC20-infected cells, suggesting that MDV infection activates cell cycle progression of CESC that normally exhibit a low proliferating rate (3 to 4% of cells in S-phase) and that MDV may delay the cell cycle in S-phase. In order to ascertain viral replication, mRNA expression of the early ICP4 viral gene was followed by qRT-PCR (Fig. 1B lower panel). To confirm the activation of the cell cycle progression assessed by DNA content analysis, and to define the molecular mechanisms of this process upon infection, we examined the expression of key factors involved in cell cycle regulation including cyclins and cyclin dependent kinases (cdk). CESC were mock-infected or infected with BAC20, and qRT-PCR analyzes were performed on total mRNAs extracted at 1, 4, and 6 days pi (Fig. 1B). At 4 dpi, BAC20-infected cells showed an increase of the mRNA expression of cyclin D (of about 6 fold), cdk6 (2.3-fold), pRb (3-fold), E2F1 (3.5-fold) and c-myc (3.1-fold) compared to mock-infected control cells. A slight up-regulation of cyclin A (1.7-fold), cyclin B (1.5-fold) and cdk1 (1.6-fold) mRNA expression was also detected at 1 dpi in infected cells compared to non-infected cells, while the level of cyclin E mRNA expression was comparable to that in mock-infected cells. These observations are in good agreement with the DNA content analyses showing an activation of the proliferative capacities of infected CESC, since cell cycle progression markers, especially cellular factors involved in the progression into G1 and S-phases (cyclin D, cyclin A, cdk6, pRb, c-Myc, and E2F1) were up-regulated during MDV infection. Interestingly, analysis of the mRNA expression pattern of p53, a protein crucially involved in cell cycle checkpoints and DNA damage pathways, revealed a strong up-regulation (of about 5.9 fold) of its expression at 4 dpi. Of note, we also observed a down-regulation of the mRNA expression of cdk6, pRb, E2F1 and c-myc at 6 dpi that reflect the non-progression of the cell cycle in G1/S phase.

To specifically determine the regulation of the cell cycle in infected cells and to preclude problems associated to asynchronous infection and moderate infectivity titers, CESC infected with the recEGFPVP22 virus, an MDV recombinant virus expressing an eGFP-VP22 fusion protein, were sorted by flow cytometry [18].

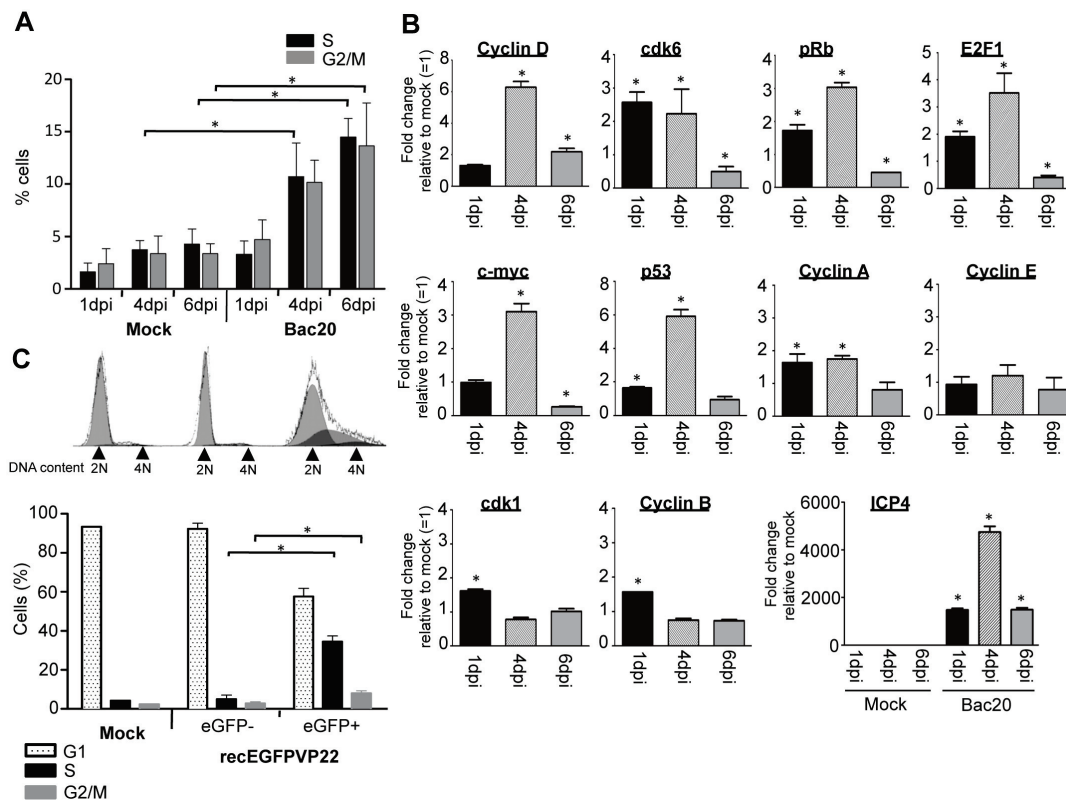


Figure 1. Cell cycle regulation during MDV infection. (A) Cell cycle analysis of CESC infected with the BAC20 virus. Mock-infected or infected CESC were harvested 1, 4, and 6 days pi and the cellular DNA content was analyzed by flow cytometry after staining with propidium iodide. The percentage of cells in S and G2/M phases is represented as bars. * $p < 0.05$. (B) mRNA expression of cell cycle regulators during MDV infection. RNAs were extracted from mock-infected and BAC20-infected cells at indicated time points. The mRNA expression levels of cellular key cell cycle regulators were detected by qRT-PCR using specific primers given in Table 2. To assess lytic viral replication, the expression of the ICP4 gene encoded by MDV was analyzed in parallel by qRT-PCR. Expression of GAPDH mRNA was used for the normalization of mRNA expression levels of all target genes and the relative changes in gene expression were determined by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Results are presented as histograms showing the fold-change of expression of the target gene in infected cells relative to its expression in mock-infected cells (Mock = 1). * $p < 0.05$. (C) Cell cycle regulation in MDV infected cells. CESC were mock-infected or infected with the recEGFPVP22 virus. Six days post-infection, cells were trypsinized, fixed, and the DNA was stained with propidium iodide. DNA content was analyzed by flow cytometry in late infected cells (eGFP+) and non-infected cells (eGFP-). Single parameter histograms are shown, and the results corresponding to the percentage of cells in G1, S, and G2/M phases of 3 independent experiments is presented as mean ($\pm$ SD). * $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0100004.g001

Infected cells monolayers were harvested at 6 days pi, and the DNA content in non-infected (eGFP-negative) and infected cells (eGFP-positive) was analyzed by flow cytometry. Using this approach, we could observe that 34.4% of the eGFP-positive cells were delayed in S-phase (Fig. 1C), while in the eGFP-negative population the percentage of cells in S-phase was equivalent to that in mock-infected cells (up to 5%). In addition, a slight increase of cells in G2-phase was detected in infected cells (8% compared to 2.8% in eGFP-negative cells or mock-infected cells). All together, these data clearly demonstrate that lytic MDV infection drives primary avian cells into an active proliferating state. Furthermore, the significant increase of MDV-infected cells accumulating in S-phase is also indicative of a virus-mediated delay in S-phase progression.

VP22 is a Major Cell Cycle Regulator

To identify viral factors involved in the regulation of the cell cycle during MDV infection, we tested the impact of the overexpression of six different viral proteins in CESC (low rate proliferating primary cells) and LMH cells (a cell line with high proliferative rate). Putative candidates were selected either on the

basis of their biological activities that might influence host cell-encoded cell cycle regulators and/or on the basis of their essential role in the MDV life cycle. Because of the central role of cellular kinases in cell cycle progression, we were interested to test the two kinases encoded by MDV, pUL13 and pUS3. The ICP27 protein, encoded by the UL54 gene, was also included in the study as a multifunctional viral regulatory protein that has previously been shown to contribute to cell cycle modulation during HSV-1 infection [54,55]. Three tegument proteins were also tested: the UL48-encoded viral trans-activator VP16, as well as pUL37 and VP22, both of which were shown to be essential for MDV growth [J-F Vautherot, unpublished data; [5]]. Eukaryotic expression vectors harboring the viral candidate genes UL37, UL48, UL49, and UL54 (encoding pUL37, VP16, VP22 and ICP27, respectively) were transiently transfected into LMH or CESC cells. At 48 h post-transfection, the cell cycle status was analyzed as outlined earlier and the expression of each of the transfected MDV genes was verified by RT-PCR from total RNA extractions. No significant differences in the proportion of cells in each cell cycle phase was observed (Fig. 2A, left panel) for transfected CESC, suggesting that none of the overexpressed proteins was able to

impact the cell cycle in quiescent CESC. In LMH cells, we also did not observe any cell cycle regulation in response to the expression of UL13, US3, UL37, UL54 and UL48, despite an effective expression of their respective mRNA (Fig. 2A lower panel). However, VP22 (pUL49) overexpression had a substantial effect on the cell cycle in the LMH cell line (Fig. 2A, right panel), as shown by the strong accumulation of cells in S-phase compared to control cells transfected with the empty vector pcDNA (35% versus 18% of cells in S-phase). Next, we tried to confirm our finding that VP22-expression alone results in an increase of cells in S-phase by transfecting LMH cells with plasmids encoding the VP22 protein fused to a eGFP-tag at its N- or C-terminus. Using an N-terminal eGFP-tagged VP22 protein (peGFP-UL49), we could confirm our finding that VP22 modulates the cell cycle, since more than 90% of LMH cells expressing VP22 (eGFP-positive cells) were blocked in S-phase (Fig. 2B). However, cells transfected with the plasmid encoding VP22 tagged at its C-terminus did not show any difference in cell cycle regulation compared to empty vector (peGFP)-transfected cells, which indicates that the location of the eGFP-tag at the carboxy-terminal extremity of the VP22 protein abrogates its activity on the cell cycle. Of note, the dramatic intra S-phase arrest observed with the N-terminal eGFP-tagged VP22 protein could be reproduced after overexpression of VP22 in two other avian cell lines: the chicken fibroblast cell line DF1 and the quail myoblast cell line QM7 (data not shown).

To verify whether the S-phase promoting activity of the MDV-encoded UL49 is conserved in other alphaherpesvirus orthologues, we tested the ability of VP22 encoded by HSV-1 and VZV to regulate the cell cycle. The HSV-1 and VZV-UL49 genes were cloned in-frame with eGFP and transiently overexpressed in the LMH cell line. At 48 hours post-transfection, the flow cytometry-based cell cycle analysis targeting transfected cells (eGFP-positive population) showed a significant S-phase arrest upon expression of all VP22 orthologues tested (Fig. 2C). VP22 orthologues derived from MDV and VZV proved to be equally efficient, as approximately 80% of the cells expressing these VP22 were blocked in S-phase. Although HSV-1-VP22 substantially blocked the cell cycle progression in S-phase (61.8% of the transfected cells), it appeared slightly less efficient than other VP22 orthologues (especially MDV-VP22) in this process.

We thus identified a novel function for MDV-VP22 as a potent cell cycle modulator, with a strong S-phase promoting activity. We also revealed that an unmodified C-terminal extremity of VP22 is required for this process. Moreover this biological feature seems to be conserved among the human alphaherpesvirus, even though the two VP22 orthologues tested does not exhibit equal activity.

Subcellular Localization of the VP22 Protein Encoded by MDV

We took advantage of the differential cell cycle modulating activities of the C- or N-terminally eGFP-tagged VP22 fusion proteins to decipher which VP22 properties are crucial to mediate S-phase arrest. One hypothesis for different activity patterns could rest on differential subcellular distributions of the two proteins. To test this hypothesis, the two constructs peGFP-UL49 and pUL49-eGFP were transfected in LMH cells and the respective locations of the proteins were analyzed based on the eGFP signal by fluorescence microscopy at 48 h post transfection. In order to visualize more accurately the distribution of the two proteins, nuclei were stained with Hoechst 33342 and the cytoskeleton was stained with an anti- α -tubulin. Upon overexpression in LMH, the control eGFP protein (peGFP) was distributed all over the cells; the two VP22 proteins tagged at the N- or C-terminus did not show

any significant difference in their cellular localization (Fig. 3A), with respectively 74,4% or 72,6% of eGFP-positive cells presenting an exclusive nuclear distribution and 17,2% or 25% showing a combined nuclear/cytoplasmic staining (Fig. 3B). Thus, the location of the eGFP tag, at the amino- or carboxy-terminus of VP22, does not seem to affect VP22 cellular distribution in LMH cells.

Another interesting feature of VP22 is its ability to bind to chromatin, especially to histones as it has previously been shown for the VP22 encoded by BoHV-1 [20,56]. By performing a high-salt histones extraction protocol from cells transfected with either pcDNA-UL49 or pcDNA3.1 (empty vector), we found VP22 to be included in the histones fraction, as it is demonstrated by a 27 kDa band in the colloidal coomassie blue SDS-PAGE gel and by the VP22-specific antibody (L13a)-probed Western blot (shown in Fig. 3C-left panel). This result indicates that MDV-VP22 shares the ability of the VP22 encoded by BoHV-1 to interact with histones. In order to investigate the impact of the position of the eGFP tag on the ability of VP22 to associate with chromatin, we carried out a similar experiment using LMH cells transfected with peGFP, peGFP-UL49 or pUL49-eGFP. We observed that the VP22 tagged at its amino terminus could be co-extracted with histones and visualized as a specific 55 kDa band in coomassie blue-stained SDS-PAGE gel (Fig. 3C-right panel). However, the protein tagged at its carboxy terminus appeared to be significantly less retained in the histones fraction (Fig. 3C). These observations were confirmed by immunoblotting experiments using the anti-VP22 L13a antibody that show the presence of VP22 in the histone extracts prepared from cells expressing peGFP-UL49 and at a far lesser extent (about 4.5 fold) from the pUL49-eGFP transfected cells (Fig. 3C lower panel). All together, these data indicate that VP22 is predominantly targeted to the nucleus of LMH transfected cells independently of the eGFP tag location. However, the fusion of eGFP at the C-terminus of the VP22 protein affects its capacity to associate with chromatin.

Accumulation of DNA Damages in VP22 Overexpressing Cells

Arrest or delay in S phase can arise either from the occurrence of DNA damages, especially double strand breaks (DSB), or replication fork stalling [57,58]. Since VP22 is able to drastically arrest the cell cycle in S phase and moreover seems to be associated to chromatin, we tested whether the overexpression of VP22 in LMH can induce DNA damages. LMH cells were transfected with pcDNA-UL49 or pcDNA3.1 (as a negative control) and DNA damages were analyzed by alkaline comet assay at 24 h post-transfection. This method, based on a single-cell gel electrophoresis, allows the detection of DNA breaks that are visualized as fragmented DNA exhibiting the shape of a comet's tail. We could observe an increased number of comets in the population of cells transfected with VP22 compared to the cells transfected with the empty vector pcDNA3.1 (Fig. 4A). To estimate the extent of DNA damages, a more precise analysis with the Comet Score software was performed and the tail extent moment (TEM) was calculated. This parameter is calculated on the basis of the tail length, reflecting the severity of the damages and the amount of DNA in the tail relative to the head, which is an indicator of DNA break frequencies. The calculation of the TEM could show that cells expressing VP22 presented a significant higher TEM (12.62 ± 0.62) than the cells transfected with pcDNA3.1 (4.11 ± 0.25), indicating that the expression of VP22 seems to be associated with the occurrence of DNA damages in LMH cells (Fig. 4A lower panel). However, it should be stressed that this result reflects the DNA damage analysis on the whole

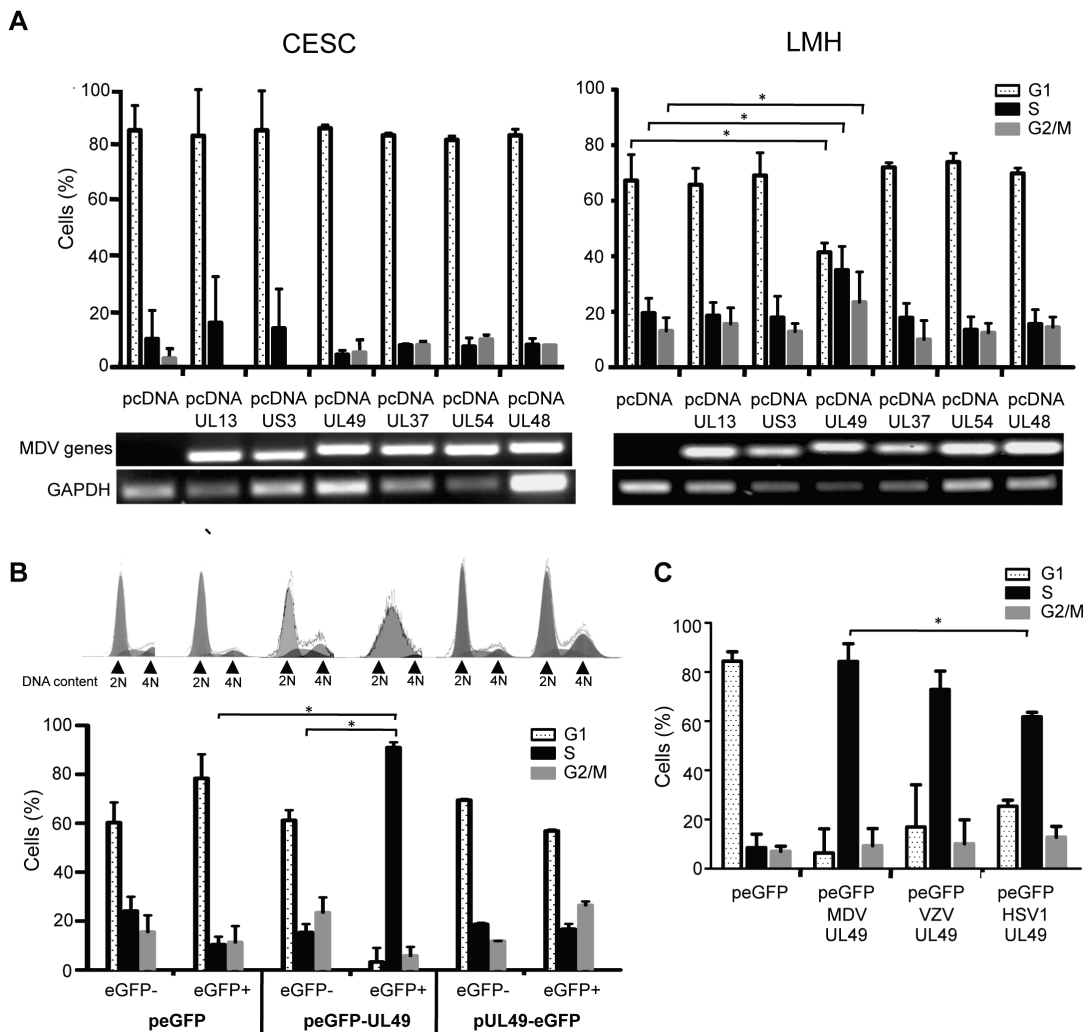


Figure 2. Identification of VP22 as a potent cell cycle modulator in proliferating cells. (A) Impact of the overexpression of different viral proteins on the cell cycle modulation. Primary (CESC) and high proliferating (LMH) cells were transfected with either an empty vector (pcDNA3) or with vectors expressing MDV-UL13, US3, UL49, UL37, UL54, or UL48 under CMV promoter control. Cell cycle analysis was performed at 48 h post-transfection by flow cytometry on the whole cell population ($p < 0.05$). The mRNA expression of the different MDV genes transfected was assayed by RT-PCR from total RNA extracted. GAPDH expression was analyzed for each sample as a control. The RT-PCR products were resolved by agarose (2%) gel electrophoresis. (B) Cell cycle regulation in VP22 expressing cells. LMH cells were transfected with plasmids harboring the UL49 gene in fusion with eGFP either at its N-terminal extremity (peGFP-UL49) or at its C-terminus (pUL49-eGFP) and with the empty vector peGFP. At 48 h post-transfection, cell cycle was analyzed specifically in UL49-expressing cells (eGFP+) and in non-transfected cells (eGFP-). Single parameter cytometry histograms are shown and the percentage of cells in the G1, S, and G2/M phases of the cell cycle is reported as bars. $p < 0.05$. (C) Cell cycle analysis in LMH cells expressing human VP22 orthologues. LMH cells were transfected with the empty vector peGFP and plasmids harboring the UL49 gene encoded by MDV, VZV and HSV-1 cloned in frame with eGFP at the N-terminus (peGFP-UL49). Cell cycle was analyzed at 48 h post-transfection exclusively in UL49-expressing cells (eGFP+) and the percentage of cells in the G1, S, and G2/M phases of the cell cycle is represented as bars. $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0100004.g002

population of pcDNA-UL49 transfected and non-transfected cells. Consequently to corroborate these findings and to determine whether the VP22 protein tagged at the C- or N-terminus was also able to induce DNA damage in LMH cells, we transfected the peGFP (empty vector), peGFP-UL49 or pUL49-eGFP plasmids in LMH cells and examined the onset of DNA damages by alkaline comet assay at 24 h post-transfection specifically in the eGFP positive cells sorted by flow cytometry. As positive control, LMH cells were treated with etoposide and as negative control, non-treated and non-transfected LMH cells were analyzed. We could readily observe comets from cells treated with etoposide and most of the cells overexpressing eGFP-UL49 and, to a lesser extent,

from cells expressing the UL49-eGFP protein, whereas cells expressing peGFP produced almost no comets or comets with a shorter tail similar to the non-transfected cells (Fig. 4B). Calculation of TEM revealed that the mean tail moments of cells expressing eGFP-UL49 (27.73 ± 2.11) or UL49-eGFP (11.99 ± 1.52) is significantly higher than for cells transfected with peGFP (4.739 ± 0.54), indicating that the expression of both tagged-VP22 proteins increases DNA damage in cells (Fig. 4B left panel). However, the damages were significantly more pronounced in cells expressing the protein tagged at its amino-terminal extremity than in cells expressing the C-terminally tagged version of VP22. Of note cells treated with etoposide showed a TEM of

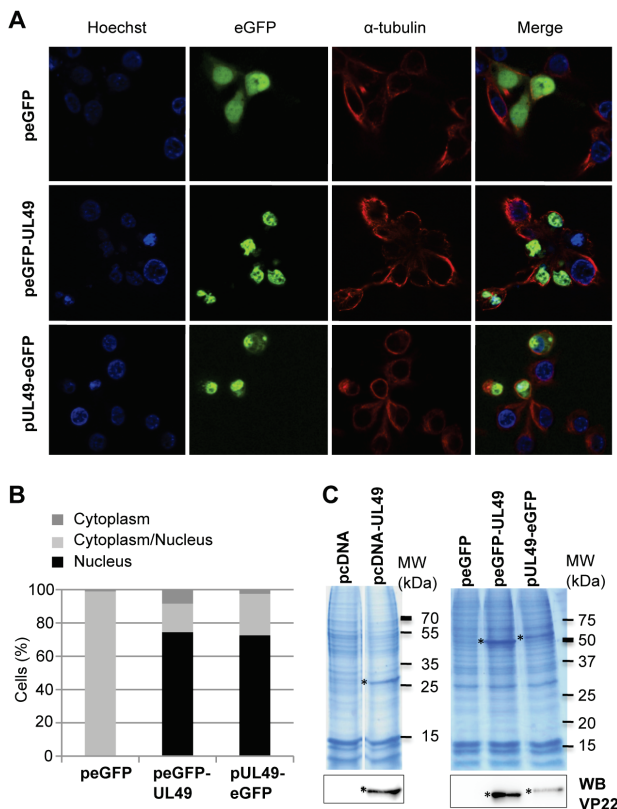


Figure 3. VP22 is predominantly located in the nucleus and associated to histones. (A–B) Subcellular localization of VP22 in LMH cells. The peGFP-UL49 and pUL49-eGFP plasmids as well as the peGFP empty vector were transfected in LMH. At 48 h post-transfection, cells were fixed with PFA 4% and subjected to immunofluorescence using anti- α -tubulin and AlexaFluor594-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody in order to demarcate the cytoplasm (red). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue) and the eGFP proteins (green) were visualized directly by fluorescence microscopy. A representative example of the results obtained is shown (A). The nuclear/cytoplasm distribution of the eGFP proteins was estimated on an average of 100 cells and results are represented as stacked bars (B). (C) VP22 associates with histones. At 48 h post-transfection, histones were extracted in high salt conditions from LMH cells transfected with pcDNA, pcDNA3-UL49, peGFP, peGFP-UL49 or pUL49-eGFP. Extracts were separated by SDS-PAGE. Proteins were either directly stained in the gel with colloidal coomassie blue or transferred onto nitrocellulose membrane to perform a western blot analysis with an anti-MDV VP22 antibody (L13a). (*) indicates the presence of the VP22 proteins. The unmodified VP22 shows a molecular weight of 27 kDa and the N- or C-terminus tagged VP22 have a molecular weight of 55 kDa. doi:10.1371/journal.pone.0100004.g003

77.47 ± 0.55 thereby affirming the drastic induction of DNA damages by this DNA topoisomerase II inhibitor. In addition, we were interested to analyze the frequency distribution of tail moments (i.e. the percentage of cells presenting a defined TEM), which is representative for the number of cells encompassing damages (Fig. 4C). About 63% of cells transfected with peGFP had a tail moment inferior at 5, indicating that the majority of the cells contain non-damaged DNA or DNA with very limited damages. However, this cellular population decreased when VP22 was expressed both with the eGFP tag at the N-terminus or C-terminus (10% and 29%, respectively), and we could observe a marked increase of the proportion of cells presenting TEM values above 5 (89,6% and 71%, respectively). In particular, the expression of

eGFP-UL49 tends to increase the frequency of cells with highly damaged DNA, more than 50% of the cells having a TEM > 20 and 13,7% presenting TEM > 50. In comparison, 19,7% of cells expressing UL49-eGFP showed a TEM > 20 and only 1,9% a TEM > 50. These observations indicate that the expression of VP22 in cells leads to an increased incidence DNA damaged cells and that damages are more severe when the VP22 is fused to eGFP at its N-terminal extremity. It should be however stressed that although the expression of VP22 leads to the occurrence of significant DNA damage, those damages are relatively less heavy than the ones induced by drugs such as etoposide that are responsible of potent damages (more than 55% of the comet having a TEM > 50).

In order to specify the nature of the DNA damages generated in cells expressing VP22, we monitored by immunofluorescence staining the expression and localization of γ -H2AX in LMH cells transfected with peGFP-UL49, pUL49-eGFP or with the empty vector peGFP. Because histone H2AX is rapidly phosphorylated (γ -H2AX) after generation of DNA double strand breaks (DSB), γ -H2AX is a preferential marker used to reveal these damages [59]. As positive control, the expression of γ -H2AX was also examined in cells exposed to etoposide [60]. We observed an overall increase of the staining intensity of the γ -H2AX DSB-marker in cells treated with etoposide and specifically in cells expressing eGFP-UL49 compared to non-transfected cells, peGFP transfected cells or UL49-eGFP expressing cells (Fig. 5A). Moreover, with higher magnification we could visualize that γ -H2AX formed discrete foci in the nucleus of eGFP-UL49 transfected cells as was also observed in etoposide-treated cells (Fig. 5B). This typical punctuated staining of γ -H2AX reflects its recruitment to sites of DNA damage and thus indicates that cells expressing VP22 tagged at its amino-terminus undergo multiple DSB.

Discussion

In the present report, we show for the first time that MDV lytic infection leads to a dysregulation of the cell cycle progression of the host cell. MDV infection not only promotes the proliferation of primary embryonic skin cells, but also leads to an accumulation of infected cells in S-phase. This modulation of the cell cycle is accompanied by a significant up-regulation of cellular genes involved in G0/G1 transition (cyclin D, cdk6) and in G1 to S-phase progression (pRb, E2F1, c-myc, cyclins A). A substantial mRNA up-regulation of the cell cycle regulator p53 was also observed early after infection. Cell cycle modulation is a mechanism that is frequently exploited by viruses in order to facilitate viral replication. In contrast to small DNA viruses, a cellular S-phase environment is not mandatory for herpesviruses encoding their own DNA polymerase and accessory factors required for optimal viral replication [29]. Consequently, for most of alphaherpesviruses it has been demonstrated that they prevent the S-phase entry and rather activate the G1/S checkpoint. MDV is an alphaherpesvirus that shares a number of biological features with gammaherpesviruses, notably the viral lymphotropism and the ability to induce tumors. With respect to cell cycle modulation, our data suggest that MDV has adapted a similar strategy than EBV and KSHV, both of which were shown to promote cell cycle progression, especially into S-phase [33,61]. It is conceivable that the MDV-mediated cell cycle modulation might also play a role in the multi-factorial events eventually leading to transformation and tumorigenesis. The S-phase is in fact the most vulnerable period of the cell cycle and a defect or inactivation of the key components of the intra S-phase checkpoint may predispose cells to oncogenic transformation (for review [57]).

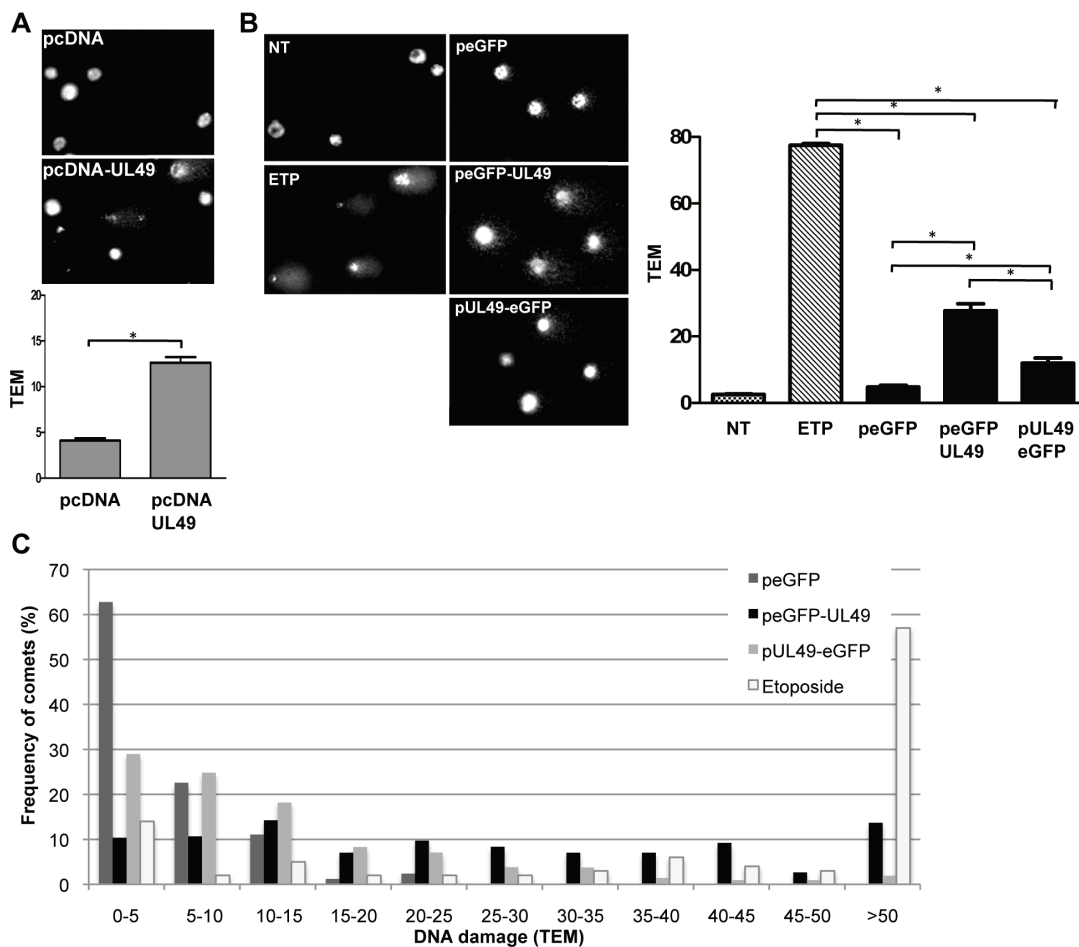


Figure 4. Expression of VP22 leads to cellular DNA damage. Detection of DNA damage in cells overexpressing VP22 by comet assay. (A–B) LMH cells were transfected with pcDNA, pcDNA3-UL49, peGFP, peGFP-UL49 or pUL49-eGFP as indicated. Non-treated (NT) LMH cells and cells treated with 1.5 μ M etoposide (ETP) for 24 h were used as negative and positive control, respectively. After 24 h, the whole population of NT, ETP-treated cells, pcDNA and pcDNA3-UL49 transfected cells was directly subjected to comet assay. In the case of eGFP transfected cells, the eGFP positive cells were sorted by flow cytometry prior to comet assay analysis (B). Representative images of comets are shown as photographs. Quantitative and qualitative analyses of the comets are represented as histograms ($\pm$ SD) on the basis of the calculation of the means of the tail extent moments (TEM) parameter measured with the CometScore software. (C) Frequency distribution of the comets with respect to their value of TEM. * $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0100004.g004

The most unexpected discovery of our study is the identification of the MDV-VP22 protein as a potent trigger of cell cycle arrest in S-phase, as evidenced by the observation that its overexpression in proliferating LMH cells lead to the enrichment of up to 90% of transfected cells in S-phase. VP22 is a major component of the viral tegument of the *Alphaherpesvirinae*. While VP22 orthologs exhibit functional homology, their significance for alphaherpesviruses life cycle varies according to the virus species. This is well illustrated by previous studies showing that VP22 is dispensable for *in vitro* replication of PRV, HSV-1, and BoHV1, whereas it is essential for MDV and VZV replication [5,7,8,10,11,12]. However, the biological properties of VP22 that determine its key role in the life cycle of MDV remain still unknown. One hypothesis is based on the crucial function of VP22 in cell-to-cell spread [5,18]. We can also not exclude that a rapid distribution of VP22 after viral entry might prepare an optimal environment for viral replication by inducing an S-phase arrest.

Several viral proteins encoded by herpesviruses have been shown to have an impact on the cell cycle. Among the ones encoded by the *Alphaherpesvirinae*, the ICP0 protein is probably the

best studied. This multifunctional protein required for efficient HSV-1 lytic replication and reactivation from latency, has been identified as a major cell cycle modulator that is able to act either on the G1/S or at the G2/M checkpoints [62]. However, the observation that ICP0 deficient mutant viruses are still capable to elicit proliferation arrest indicates that other viral factors also impact the cell cycle [62]. Notably, the immediate early protein ICP27 was shown to be essential for the G1/S cell cycle arrest triggered by HSV-1, with ICP4, ICP0, and the virion host shutoff protein acting as contributors [55]. Hence, MDV and HSV-1 appear to employ differential cell cycle modulation mechanisms as MDV does not encode a functional ICP0 protein and we could not detect any effect of ICP27-overexpression on cell proliferation. It is an interesting speculation that MDV may have evolved a distinct mechanism for cell cycle modulation that crucially involves VP22 in order to compensate for the absence of ICP0 activities. It should be noted that the overexpression of the VP22 proteins encoded by HSV-1 or VZV also resulted in a dramatic arrest of the cell cycle in S-phase in transfected LMH cells. This finding suggests that VP22 might also contribute to the modulation of the cell cycle in

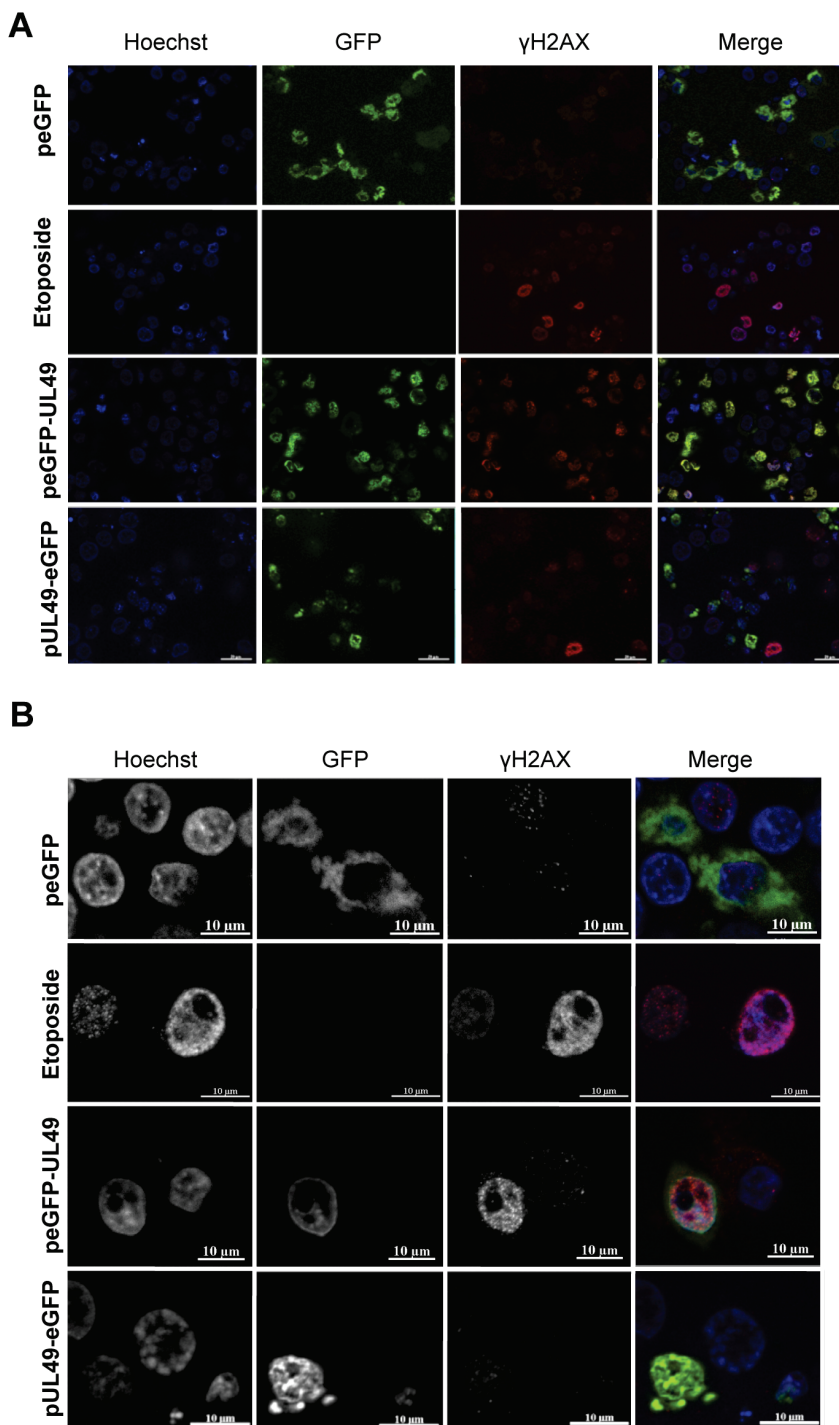


Figure 5. Accumulation of DNA double strand breaks in VP22 expressing cells. At 24 h post-transfection, LMH cells expressing VP22 eGFP-tagged proteins (at N or C-terminus) or the empty vector peGFP were subjected to immunofluorescence using mouse anti- γ H2AX and AlexaFluor594-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies (red). LMH cells exposed 24 h to etoposide were stained with the anti- γ H2AX antibody and served as a positive control. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue) and eGFP positive cells expressing VP22 were directly visualized by fluorescent microscopy (green) at low (A) and high magnifications (B).
doi:10.1371/journal.pone.0100004.g005

the context of infections with human herpesviruses. While screening for viral factors that are involved in the MDV-associated cell cycle regulation, we also tested whether the activity of the two MDV-encoded serine-threonine kinases pUS3 and pUL13 could

have a cell cycle regulatory effect. Indeed, it is well known that cell cycle progression is submitted to a tight regulation mediated by kinases and phosphatases. Overexpression of UL13 and/or US3 in low proliferating cells (CESC) or high proliferating cells (LMH)

had no effect on the cell cycle, thus excluding a direct involvement of these kinases in the cell cycle modulation. However, pUS3 and pUL13 are able to phosphorylate various cellular and viral proteins, including the VP22 proteins encoded by HSV-1 and -2, as well as BoHV-1 [63,64,65]. So far, the phosphorylation status of MDV-VP22 during infection has not been investigated, and we cannot exclude post-translational modifications of MDV-VP22 by UL13 and/or US3, as previously shown for other alphaherpesviruses.

Intra-S checkpoints activation mainly reflects DNA breaks or stalled replication fork formation [58]. In order to identify the molecular mechanisms underlying the VP22-driven S-phase arrest, we focused on the impact of VP22 expression on the generation of DNA damage in the host cell genome. Following overexpression of VP22 in proliferating cells, we could indeed show by comet assay that the presence of VP22 coincided with the occurrence of massive DNA damage. Moreover, VP22-expressing cells showed an increased staining of the phosphorylated form of H2AX, suggesting that the DNA lesions observed are double strand breaks [59]. Interestingly, the VP22-mediated generation of DNA damages seems to be tightly associated to the cell cycle modulation property of VP22. This was evidenced by our comparative experimental approach using two versions of the VP22 protein tagged either at its N- or C-terminus. The data from this experiment show that virtually all cells expressing eGFP-VP22 (N-terminal eGFP-tag) are arrested in S-phase and present severe DNA damage, whereas cells expressing VP22-eGFP (C-terminal eGFP-tag) are not affected in their cell cycle progression and show significantly less DNA lesions. Of note, all our attempts to generate a LMH stable cell line overexpressing the MDV-VP22 protein failed due to a high level of cellular mortality. These observations raised the question of the potential toxicity of VP22, which might find an explanation in the induction of double strand breaks in cells overexpressing VP22.

The mechanisms by which VP22 induces S-phase arrest and DNA breaks still remain to be elucidated. However, among the characteristics of VP22, we can speculate that its capacity to interact with chromatin and histones might participate to those processes. Interactions of VP22 protein with nucleosomes were previously demonstrated for the BoHV-1-encoded VP22, which physically interacts with nucleosome-associated histones and thereby causes an impaired acetylation of histone H4 [21,56]. In addition, for MDV-VP22, the regions allowing interaction with heterochromatin were previously defined [17]. In the present study, we confirmed that MDV-VP22 is found predominately in the nucleus of cells following overexpression in LMH cells. We also found that an N-terminally eGFP-tagged MDV-VP22 can be extracted from chromatin preparations together with histones. However, for a C-terminally eGFP-tagged MDV-VP22, the efficiency of recovery from histones extracts was far less, suggesting that an unmodified C-terminal extremity of VP22 is necessary for the association of VP22 with chromatin. Together, these observations suggest that the abilities of VP22 to arrest the cell cycle in S-phase and to effect DNA damage are linked to its direct or indirect interaction with histones and/or chromatin. According

to this model, it is conceivable that the interaction of VP22 with chromatin or histones may disturb the unwinding of DNA in a similar fashion than cellular helicases or topoisomerases by preventing access to the DNA replication machinery. Alternatively, it can be speculated that an association of VP22 with DNA/histones may cause physical tension of the DNA double helix eventually leading to DNA breaks.

Activation of DNA damage response (DDR) pathways is well documented for a number of viruses, especially tumorigenic viruses and plays a central role in viral replication [46,47]. While our data only provide clear evidence for a role of VP22 as a powerful inducer of DNA damage in a non-infectious context, it can be assumed that DDR activation might play a role in MDV replication and/or MD pathogenesis. Due to the critical role of VP22 for MDV-replication [5], it is so far impossible to evidence the function of VP22 as a major cell cycle regulatory factor during MDV infection by using a VP22-deleted virus. However, Jarosinsky *et al.* have demonstrated that a recombinant MDV harboring a VP22 protein tagged with eGFP at the C-terminus (a construct that is identical to the VP22-eGFP used in the present study) showed a drastic decrease in its ability to induce MD in infected chickens, with only 10% of the chicken developing tumors [19]. In addition, we have recently observed that a recombinant virus with the VP22 protein tagged at the N-terminus is also attenuated, but in a lower extent, with 33 to 66% of the infected chickens developing MD lymphoma [6]. Although the impairment of pathogenicity of the recombinant MDV studied by Jarosinsky *et al.* could in parts be explained by a lower viral replication efficiency *in vivo*, in view of our data, it can also be speculated that the defect in tumor development observed by the authors might be due to the loss of the ability of the C-terminally tagged VP22 protein to induce S-phase arrest and DNA damage.

In conclusion, our findings provide new insights into herpesvirus-cell host interactions by demonstrating that the oncogenic alphaherpesvirus MDV affects the cell cycle progression in infected cells. Moreover, we could assign a novel role to the VP22 tegument protein as a potent cell cycle modulator, property that seems to be associated to its ability to induce DNA damages in cells. Current efforts are under way to elucidate the detailed mechanisms of VP22-induced DNA damage response, and its role during viral infection, especially with respect to a possible involvement of DDR in MDV replication and/or the establishment of MDV-latency and subsequent lymphoma formation.

Acknowledgments

We thank S. Trapp (INRA, Nouzilly, France) and J. Vignard for their constructive comments and corrections on the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LTF. Performed the experiments: LTF DB DCV YLV SR EBR. Analyzed the data: LTF JFV CD GM. Contributed reagents/materials/analysis tools: JFV CD EBR GM. Wrote the paper: LTF.

References

- Calnek BW, Adldinger HK, Kahn DE (1970) Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Dis* 14: 219–233.
- Carrozza JH, Fredrickson TN, Prince RP, Luginbuhl RE (1973) Role of desquamated epithelial cells in transmission of Marek's disease. *Avian Dis* 17: 767–781.
- Nazerian K, Burmester BR (1968) Electron microscopy of a herpes virus associated with the agent of Marek's disease in cell culture. *Cancer Res* 28: 2454–2462.
- Dorange F, El Mehdaoui S, Pichon C, Coursaget P, Vautherot JF (2000) Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16. *J Gen Virol* 81: 2219–2230.

5. Dorange F, Tischer BK, Vautherot JF, Osterrieder N (2002) Characterization of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) deletion mutants that lack UL46 to UL49 genes: MDV-1 UL49, encoding VP22, is indispensable for virus growth. *J Virol* 76: 1959–1970.
6. Remy S, Blondeau C, Le Vern Y, Lemesle M, Vautherot JF, et al. (2013) Fluorescent tagging of VP22 in N-terminus reveals that VP22 favors Marek's disease virus (MDV) virulence in chickens and allows morphogenesis study in MD tumor cells. *Vet Res* 44: 125.
7. Che X, Reichelt M, Sommer MH, Rajamani J, Zerboni L, et al. (2008) Functions of the ORF9-to-ORF12 gene cluster in varicella-zoster virus replication and in the pathogenesis of skin infection. *J Virol* 82: 5825–5834.
8. del Rio T, Werner HC, Enquist LW (2002) The pseudorabies virus VP22 homologue (UL49) is dispensable for virus growth in vitro and has no effect on virulence and neuronal spread in rodents. *J Virol* 76: 774–782.
9. Duffy C, Lavail JH, Tauscher AN, Wills EG, Blaho JA, et al. (2006) Characterization of a UL49-null mutant: VP22 of herpes simplex virus type 1 facilitates viral spread in cultured cells and the mouse cornea. *J Virol* 80: 8664–8675.
10. Elliott G, Hafezi W, Whiteley A, Bernard E (2005) Deletion of the herpes simplex virus VP22-encoding gene (UL49) alters the expression, localization, and virion incorporation of ICP0. *J Virol* 79: 9735–9745.
11. Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Kopp M, Mettenleiter TC (2002) The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *J Virol* 76: 6729–6742.
12. Liang X, Chow B, Li Y, Raggo C, Yoo D, et al. (1995) Characterization of bovine herpesvirus 1 UL49 homolog gene and product: bovine herpesvirus 1 UL49 homolog is dispensable for virus growth. *J Virol* 69: 3863–3867.
13. Maringer K, Stylianou J, Elliott G (2012) A network of protein interactions around the herpes simplex virus tegument protein VP22. *J Virol* 86: 12971–12982.
14. van Leeuwen H, Okuwaki M, Hong R, Chakravarti D, Nagata K, et al. (2003) Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 interacts with TAF-I proteins and inhibits nucleosome assembly but not regulation of histone acetylation by INHAT. *J Gen Virol* 84: 2501–2510.
15. Elliott G, O'Hare P (1998) Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 induces the stabilization and hyperacetylation of microtubules. *J Virol* 72: 6448–6455.
16. Blondeau C, Marc D, Courvoisier K, Vautherot JF, Denesvre C (2008) Functional homologies between avian and human alphaherpesvirus VP22 proteins in cell-to-cell spreading as revealed by a new cis-complementation assay. *J Virol* 82: 9278–9282.
17. O'Donnell LA, Clemmer JA, Czymmek K, Schmidt CJ (2002) Marek's disease virus VP22: subcellular localization and characterization of carboxyl terminal deletion Mutations. *Virology* 292: 235–240.
18. Denesvre C, Blondeau C, Lemesle M, Le Vern Y, Vautherot D, et al. (2007) Morphogenesis of a highly replicative EGFPVP22 recombinant Marek's disease virus in cell culture. *J Virol* 81: 12348–12359.
19. Jarosinski KW, Arndt S, Kaufner BB, Osterrieder N (2011) Fluorescently tagged pUL47 of Marek's disease virus reveals differential tissue expression of the tegument protein in vivo. *J Virol*.
20. Ingvarsdotter K, Blaho JA (2010) Association of the herpes simplex virus major tegument structural protein VP22 with chromatin. *Biochim Biophys Acta* 1799: 200–206.
21. Zhu J, Qiu Z, Wiese C, Ishii Y, Friedrichsen J, et al. (2005) Nuclear and mitochondrial localization signals overlap within bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22. *J Biol Chem* 280: 16038–16044.
22. Elliott G, O'Hare P (2000) Cytoplasm-to-nucleus translocation of a herpesvirus tegument protein during cell division. *J Virol* 74: 2131–2141.
23. Berthet C, Raj K, Saudan P, Beard P (2005) How adeno-associated virus Rep78 protein arrests cells completely in S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13634–13639.
24. Dickmanns A, Zeitvogel A, Simmersbach F, Weber R, Arthur AK, et al. (1994) The kinetics of simian virus 40-induced progression of quiescent cells into S phase depend on four independent functions of large T antigen. *J Virol* 68: 5496–5508.
25. Gilbert DM, Cohen SN (1987) Bovine papilloma virus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell* 50: 59–68.
26. Helt AM, Harris E (2005) S-phase-dependent enhancement of dengue virus 2 replication in mosquito cells, but not in human cells. *J Virol* 79: 13218–13230.
27. Liang MH, Geisbert T, Yao Y, Hinrichs SH, Giam CZ (2002) Human T-lymphotropic virus type 1 oncoprotein tax promotes S-phase entry but blocks mitosis. *J Virol* 76: 4022–4033.
28. Tang QH, Zhang YM, Fan L, Tong G, He L, et al. (2011) Classic swine fever virus NS2 protein leads to the induction of cell cycle arrest at S-phase and endoplasmic reticulum stress. *Virol J* 7: 4.
29. Flemington EK (2001) Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments. *J Virol* 75: 4475–4481.
30. Nascimento R, Costa H, Parkhouse RM (2012) Virus manipulation of cell cycle. *Protoplasma* 249: 519–528.
31. Kudoh A, Daikoku T, Sugaya Y, Isomura H, Fujita M, et al. (2004) Inhibition of S-phase cyclin-dependent kinase activity blocks expression of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes, preventing viral lytic replication. *J Virol* 78: 104–115.
32. Moffat JF, McMichael MA, Leisenfelder SA, Taylor SL (2004) Viral and cellular kinases are potential antiviral targets and have a central role in varicella zoster virus pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1697: 225–231.
33. Kudoh A, Fujita M, Zhang L, Shirata N, Daikoku T, et al. (2005) Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J Biol Chem* 280: 8156–8163.
34. Dheekollu J, Lieberman PM (2011) The Replicative Pausing Factor Timeless is Required for Episomal Maintenance of Latent Epstein-Barr Virus. *J Virol*.
35. Ma W, Galvin TA, Ma H, Ma Y, Muller J, et al. (2011) Optimization of chemical induction conditions for human herpesvirus 8 (HHV-8) reactivation with 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) from latently-infected BC-3 cells. *Biologicals*.
36. Teissier S, Pang CL, Thierry F (2010) The E2F5 repressor is an activator of E6/E7 transcription and of the S-phase entry in HPV18-associated cells. *Oncogene* 29: 5061–5070.
37. Lilley CE, Schwartz RA, Weitzman MD (2007) Using or abusing: viruses and the cellular DNA damage response. *Trends Microbiol* 15: 119–126.
38. Turnell AS, Grand RJ (2012) DNA viruses and the cellular DNA-damage response. *J Gen Virol* 93: 2076–2097.
39. Gruhn B, Sompallae R, Masucci MG (2009) Three Epstein-Barr virus latency proteins independently promote genomic instability by inducing DNA damage, inhibiting DNA repair and inactivating cell cycle checkpoints. *Oncogene* 28: 3997–4008.
40. Jha HC, Upadhyay SK, M AJP, Lu J, Cai Q, et al. (2013) H2AX phosphorylation is important for LANA-mediated Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus episome persistence. *J Virol* 87: 5255–5269.
41. Luo MH, Rosenc K, Czornak K, Fortunato EA (2007) Human cytomegalovirus disrupts both ataxia telangiectasia mutated protein (ATM)- and ATM-Rad3-related kinase-mediated DNA damage responses during lytic infection. *J Virol* 81: 1934–1950.
42. Mohini KN, Dee AR, Smith S, Schumacher AJ, Weller SK (2012) Efficient herpes simplex virus 1 replication requires cellular ATR pathway proteins. *J Virol* 87: 531–542.
43. Xiao Y, Chen J, Liao Q, Wu Y, Peng C, et al. (2013) Lytic infection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces DNA double-strand breaks and impairs non-homologous end joining. *J Gen Virol* 94: 1870–1875.
44. Lilley CE, Chaurushiya MS, Boutell C, Everett RD, Weitzman MD (2011) The intrinsic antiviral defense to incoming HSV-1 genomes includes specific DNA repair proteins and is counteracted by the viral protein ICP0. *PLoS Pathog* 7: e1002084.
45. Tarakanova VL, Stanitsa E, Leonardo SM, Bigley TM, Gauld SB (2010) Conserved gammaherpesvirus kinase and histone variant H2AX facilitate gammaherpesvirus latency in vivo. *Virology* 405: 50–61.
46. Weitzman MD, Lilley CE, Chaurushiya MS (2010) Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. *Annu Rev Microbiol* 64: 61–81.
47. Nikitin PA, Luftig MA (2012) The DNA damage response in viral-induced cellular transformation. *Br J Cancer* 106: 429–435.
48. Nikitin PA, Luftig MA (2011) At a crossroads: human DNA tumor viruses and the host DNA damage response. *Future Virol* 6: 813–830.
49. Schumacher D, Tischer BK, Fuchs W, Osterrieder N (2000) Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol* 74: 11088–11098.
50. Elliott GD, Meredith DM (1992) The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49. *J Gen Virol* 73 (Pt 3): 723–726.
51. Bontems S, Di Valentin E, Baudoux L, Rientier B, Sadzot-Devaux C, et al. (2002) Phosphorylation of varicella-zoster virus IE63 protein by casein kinases influences its cellular localization and gene regulation activity. *J Biol Chem* 277: 21050–21060.
52. Lebaillly P, Devaux A, Pottier D, De Meo M, Andre V, et al. (2003) Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan. *Occup Environ Med* 60: 910–917.
53. Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB (2007) Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* 2: 1445–1457.
54. Sandri-Goldin RM (2011) The many roles of the highly interactive HSV protein ICP27, a key regulator of infection. *Future Microbiol* 6: 1261–1277.
55. Song B, Yeh KC, Liu J, Knipe DM (2001) Herpes simplex virus gene products required for viral inhibition of expression of G1-phase functions. *Virology* 290: 320–328.
56. Ren X, Harms JS, Splitter GA (2001) Bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22 interacts with histones, and the carboxyl terminus of VP22 is required for nuclear localization. *J Virol* 75: 8251–8258.
57. Bartek J, Lukas C, Lukas J (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 792–804.
58. Grallert B, Boye E (2008) The multiple facets of the intra-S checkpoint. *Cell Cycle* 7: 2315–2320.
59. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858–5868.
60. Schonn I, Hennesen J, Dartsch DC (2010) Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage. *Apoptosis* 15: 162–172.

61. Fujimuro M, Wu FY, ApRhys C, Kajumbula H, Young DB, et al. (2003) A novel viral mechanism for dysregulation of beta-catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *Nat Med* 9: 300–306.
62. Lomonte P, Everett RD (1999) Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 inhibits progression of cells through mitosis and from G(1) into S phase of the cell cycle. *J Virol* 73: 9456–9467.
63. Coulter LJ, Moss HW, Lang J, McGeoch DJ (1993) A mutant of herpes simplex virus type 1 in which the UL13 protein kinase gene is disrupted. *J Gen Virol* 74 (Pt 3): 387–395.
64. Geiss BJ, Tavis JE, Metzger LM, Leib DA, Morrison LA (2001) Temporal regulation of herpes simplex virus type 2 VP22 expression and phosphorylation. *J Virol* 75: 10721–10729.
65. Labiuk SL, Lobanov V, Lawman Z, Snider M, Babiuk LA, et al. (2010) Bovine herpesvirus-1 US3 protein kinase: critical residues and involvement in the phosphorylation of VP22. *J Gen Virol* 91: 1117–1126.

**Etude des dommages à l'ADN induits par le
virus de la maladie de Marek et leur
implication dans la pathogenèse virale**

Résumé

Le virus de la maladie de Marek (MDV) est un alphaherpesvirus à l'origine du développement de lymphomes chez les volailles. A ce jour, l'origine du développement des tumeurs induites par le MDV est encore peu connue malgré l'identification de plusieurs oncoprotéines virales. Au vu de l'implication des dommages à l'ADN dans la pathogenèse de plusieurs virus notamment les herpesvirus, mon projet de thèse avait pour objectif de déterminer l'impact de l'apparition de lésions d'ADN sur le cycle viral du MDV. Nous avons montré que l'infection cytotytique de MDV s'accompagne d'une accumulation de lésions dans l'ADN cellulaire de lymphocytes et cellules fibroblastiques de poulet. La phase de latente de l'infection MDV n'affecte pas l'intégrité de l'ADN des lymphocytes alors que la réactivation du virus conduit à l'apparition de lésions d'ADN. De plus, en utilisant une approche originale *in vivo*, nous avons confirmé le rôle essentiel de la protéine virale VP22 dans l'induction de ces dommages. Nous avons pu établir que l'induction des dommages à l'ADN au cours de l'infection et/ou la réponse cellulaire engendrée sont non seulement favorables à la réplication du virus mais également que l'apparition de ces lésions est étroitement liée au pouvoir oncogène du MDV.

Mots-clés : MDV ; Herpesvirus ; oncoprotéine; dommages à l'ADN ; instabilité génomique ; latence ; réplication virale ; tumorigénèse.

Abstract

Marek's disease virus (MDV) is an alphaherpesvirus responsible of T lymphoma in chickens. Mechanisms leading to cellular transformation mediated by MDV are still incompletely understood. DNA damage and the associated cellular response participate actively in the life cycle of viruses, especially herpesviruses. Here, we aimed at deciphering the role of DNA damages in MDV pathogenesis. We show that MDV lytic infection leads to DNA lesions in lymphocytes and fibroblasts of chickens. Moreover, we demonstrated that MDV latently-infected lymphocytes exhibits undamaged DNA whereas MDV reactivation leads to an onset of DNA lesions. Also, using an original *in vivo* approach, we objectified the role of VP22 on DNA damages induction. Finally, we established that DNA damage and/or the associated DNA damage response are not only benefic to MDV replication but also that the DNA lesions onset might participate to MDV oncogenicity.

Key words : MDV, Herpesvirus ; oncoprotein; DNA damage; genomic instability; latency ; viral replication, tumorigenesis.