



HAL
open science

Etude de la déstabilisation des structures protéique et chromatinienne des centromères par la protéine ICP0 du virus Herpes Simplex de Type 1

Sylvain Gross

► **To cite this version:**

Sylvain Gross. Etude de la déstabilisation des structures protéique et chromatinienne des centromères par la protéine ICP0 du virus Herpes Simplex de Type 1. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10238 . tel-00838586

HAL Id: tel-00838586

<https://theses.hal.science/tel-00838586>

Submitted on 26 Jun 2013

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

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

Université Claude Bernard Lyon 1
Chimie et sciences du vivant
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

THESE

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Présentée et soutenue publiquement par

Sylvain GROSS

Le 1 Décembre 2011

**Etude de la déstabilisation des structures protéique
et chromatinienne des centromères par la protéine
ICP0 du virus Herpes Simplex de Type 1**

Jury

Dr Eliette Bonnefoy (Rapporteur)

Dr Claire Francastel (Rapporteur)

Pr André-Patrick Arrigo (Examineur)

Pr Marc Labetoulle (Examineur)

Dr Patrick Lomonte (Directeur de Thèse)

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Ministère de l'Éducation, de la Recherche et de la Technologie qui m'a financé pendant 3 ans (bourse MENRT) et la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) qui m'a permis de faire une quatrième année de thèse.

Je remercie les membres du jury : Dr Éliette Bonnefoy, Dr Claire Francastel, Pr André Patrick Arrigo, Pr Marc Labetoulle, et Dr Patrick Lomonte d'avoir accepté de rapporter ou d'examiner ma thèse.

Je remercie le Dr Pierre Couble qui m'a permis, en 2006, de rencontrer Patrick Lomonte et d'effectuer mon stage de M2 et ma thèse au sein du CGMC.

Je remercie mon directeur de thèse Patrick Lomonte qui m'a permis d'effectuer ma thèse dans son équipe. Je te remercie grandement de m'avoir apporté tant de savoir, de passion, de technique, d'énergie, d'optimisme et de rigueur de travail. Ce fut 5 années très enrichissantes à tes côtés et te serai toujours redevable pour le scientifique et la personne que je suis devenue. Je remercie également Frédéric Catez, mon co-directeur de thèse, qui m'a énormément apporté scientifiquement, techniquement, et surtout humainement. Tu m'as appris à prendre mon temps pour faire les choses bien, les construire pas à pas et à ne pas se précipiter car en biologie, « rien ne sert de courir... ». Comme pour Patrick, le scientifique que je suis devenu te sera toujours redevable de la formation en or que tu m'as donnée.

Je remercie également les autres membres de l'équipe (passés ou toujours présents) Pascale, Eric, Johnny, Mirna, Nelly, (désolé pour ceux que j'ai oubliés), pour votre aide, bonne humeur et optimisme de tout les jours. Merci également à Karine et Joëlle de l'équipe Epstein pour votre aide mais surtout votre bonne humeur ! Je remercie tout les membres du CGMC pour l'excellente ambiance de travail qui y règne.

Je remercie également ma famille et Gaëlle, ma compagne, qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse lors des bons et moins bons moments, je n'y serai jamais arrivé sans votre soutien et votre amour, merci du fond du cœur, je vous aime.

Finalement, je dédie cette thèse à ma mère; Tu es partie trop tôt, j'aurais tant aimé ta présence aujourd'hui, j'espère que tu es fière de moi.

“When it is dark enough, you can see the stars.”

Charles Austin Beard

Résumé

Le virus *Herpes Simplex de type 1* (HSV-1) possède un mode d'infection particulier dit bimodal. Il peut soit se répliquer de manière active lors d'une phase dite lytique soit migrer dans les neurones et rester en latence. Il peut réactiver pour rétablir une infection lytique. Une protéine virale majeure dans la réactivation de HSV-1 est ICP0. C'est une protéine nucléaire à activité E3 ubiquitine ligase, qui possède la particularité d'induire la dégradation par le protéasome de plusieurs protéines centromériques constitutives, ce qui provoque une déstabilisation du centromère interphasique. Mon équipe a découvert une réponse cellulaire à l'instabilité centromérique, induite par la protéine ICP0, et nommée iCDR (pour interphase Centromere Damage Response.). L'objectif général de ma thèse est de déterminer les modifications structurales que subissent les centromères endommagés par ICP0 à l'origine de l'iCDR et probablement de la réactivation. J'ai pu démontrer qu'ICP0 affectait toute la structure protéique étroitement associée aux centromères durant l'interphase. Suite à ces résultats, j'ai pu démontrer, par des analyses de digestion de chromatine à la nucléase micrococcale (MNase), que l'occupation nucléosomique de la chromatine centromérique suite à l'activité d'ICP0 était affectée de façon significative. Une étude *in vivo* effectuée à partir de tissus nerveux provenant de souris infectées de manière latente, a permis de démontrer une co-localisation entre les génomes HSV-1 latents et les centromères. Cette co-localisation est associée à une répression transcriptionnelle du virus. Les résultats de ma thèse montrent donc que les effets d'ICP0 sur la déstabilisation des centromères sont en relation avec un rôle de ces centromères durant la latence. Ceci suggère fortement une implication de la déstabilisation des centromères dans le processus de réactivation contrôlé par ICP0.

Summary

The *Herpes Simplex type 1* (HSV-1) virus possesses a bimodal mode of infection. It can either replicate in an active way during the lytic cycle, or it can infect neurons and stay in latency. HSV-1 reactivates from latently infected neurons for re-establishing a lytic infection. A major viral protein implicated in reactivation is ICP0. It is a nuclear E3 ubiquitin-ligase, which has the particularity to induce the proteasome-mediated degradation of several constitutive centromeric proteins. This activity severely destabilizes the interphase centromere. My team has discovered a novel cellular response triggered by the destabilization of centromeres by ICP0, called iCDR (interphase Centromere Damage Response). The general aim of my thesis is to determine the centromere structural modifications induced by ICP0 that can trigger the iCDR and probably the reactivation.

I was able to demonstrate that ICP0 affected the entire proteinaceous structure of interphase centromeres. Following this, I showed by micrococcal nuclease (MNase) digestion approach that the nucleosomal organization of centromeric chromatin was significantly affected by ICP0. An *in vivo* study in nervous tissues coming from latently infected mice enabled to show a co-localization between latent HSV-1 genomes and centromeres. This co-localisation is linked to a transcriptional repression of the virus. The results of my thesis show that the destabilization of centromere by ICP0 correlates with a role of the centromeres during latency. This strongly suggests an implication of centromere destabilization in the ICP0-controlled reactivation process.

ABBREVIATIONS

aa : amino acid

α -SAT : Alpha SATellite DNA

ATRX : Alpha Thalassemia/mental Retardation syndrome X-linked

BAC : Bacterial Artificial Chromosome

bp : base pair

BPM : Bas Poids Moléculaires

BSA : bovine sérum albumine

β -SAT : Beta SATellite DNA

CAD : CENP-A nucleosome Distal complex

CAF-1 : Chromatin Assembly Factor-1

CATD : CENP-A Targeting Domain

CCAN : Constitutive Centromere Associated Network

Cellules BAC ou YAC : Cellules contenant un chromosome artificiel issu d'BAC ou d'un YAC

Cellules BAC-int ou YAC-int : Cellules dont la construction BAC ou YAC s'est intégrée dans le génome.

cenH3 : centromeric histone H3

CENP : CENtromeric Protein

ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation

Cid : Centromere identifier

CoREST : Corepressor of Repressor Element 1 Silencing Transcription

CREST : Calcinosis, Raynaud syndrome, Esophageal dysmotility, Scleroderma and Telangiectasia

Cse-4 : Chromosome segregation-4

CTCF : CCCTC binding Factor

C-term : Carboxyl terminal extremity

DNA-PK : DNA protein kinase

E : Early

EBV : Epstein-Barr virus

EF : Elongation Factor

FBS : Fetal Bovine Serum

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

GAPDH : GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase

Gems : Gemini of Cajal bodies

GFP : Green Fluorescent Protein

γ-SAT : gamma SATellite DNA

HAC : Human Artificial Chromosome

HAT : Histone Acetyl Transferase

H3K4 : Histone H3 Lysine 4

H3K4 me2 ou me3 : Di ou trimethylation de l'Histone H3 sur la Lysine 4

H3K9 : Histone H3, Lysine 9

H3K9 me ou me2 ou me3 : mono, di ou trimethylation de l'histone H3 sur la lysine 9

HA : Hemmaglutinin

HC : HétéroChromatine

HCF-1 : Host Cell Factor -1

HDAC : Histone DeACetylase

HIRA : Histone Regulatory A

HJURP : Holiday Junction Recognition Protein

HKMT : Histone Lysine MethylTransferase

HMG : High Mobility Group

HP1 : heterochromatin protein 1

HS : Heat Shock

HSV-1 : herpes simplex virus type 1

HUL : Herpes Ubiquitin Ligase

iCDR : interphase Centromere Damage Response

ICP0 : Infected Cell Protein 0

IE : Immediate Early

IF : ImmunoFluorescence

IFN : InterFeroN

IP : ImmunoPrecipitation

IRF : Interferon Regulatory Factor

Kb : Kilobase pair

KDa : Kilo Dalton

KO : Knock Out
L : Late
LAT : Latency Associated Transcript
LSD-1 : Lysin Specific Demethylase 1
LTR : Long Terminal Repeats
Mb : Megabase pair
miRNA : micro RNA
mRNA : messenger RNA
NAC : CENP-A Nucleosome Associated Complex
NHEJ : Non Homologous DNA End Joining
NoLS : Nucleolar Localization Signal
NLS : Nuclear Localization Signal
N-Term : Amino terminal extremity
PARP : Poly-ADP-Ribose Polymerase
PC : PolyComb
PFA : ParaFormAldéhyde
PML protein : ProMyelocytic Leukemia protein
PRC 1 ou 2 : Polycomb Repressive Complex 1 ou 2
PRMT : Protein Arginine Methyl Transferase
qPCR : quantitative PCR
rDNA : ribosomal DNA
RING : Really Interesting New Gene
RISC : RNA Induced Silencing Complex
RNAi : RNA interference
RNA pol I, II ou III : RNA polymerase I, II ou III
RNF-8 ou 68 : RiNg Finger protein 8 ou 68
RNP : RiboNucleoProtein
rRNA : ribosomal RNA
RT : Room Temperature
SAT : SATellite DNA
SB : Southern blot
SENP : SUMO/SENtrin-specific Protease
siRNA : small interfering RNA
SMN : Survival of Motor Neuron

snRNA : small nuclear RNA
snRNP : small nuclear RNP
SMA : Spinal Muscular Atrophies
SUMO : Small Ubiquitin-like MOdifier
TE : Transposable Element
TK : Thymidine Kinase
TLR : Toll Like Receptor
TSA : TrichoStatin A
USP : Ubiquitin Specific Protein
VP16 : Virion Protein 16
YAC : Yeast Artificial Chromosome
WB : Western Blot
Wt : Wild type

Table des matières

Analyse Bibliographique

| | |
|---|-----------|
| Chapitre 1 : Le Virus Herpes Simplex de type I..... | 12 |
| 1. Généralités..... | 12 |
| 2. Epidémiologie..... | 13 |
| 3. Génome | 14 |
| 4. Structure du Virion | 14 |
| 5. Cycle viral bimodal | 15 |
| 5.1 Le cycle lytique..... | 15 |
| 5.2 Le cycle latent..... | 17 |
| 6. La protéine Virale ICP0..... | 20 |
| 6.1 Généralités..... | 20 |
| 6.2 Activité E3 ubiquitine ligase d'ICP0 | 21 |
| 6.3 ICP0 et réponse iCDR | 28 |
| 6.4 Association d'ICP0 avec des protéines cellulaires..... | 30 |
| 7. Virus HSV-1 et chromatine | 33 |
| 7.1 Etat chromatinien du génome de HSV-1 pendant la phase lytique de l'infection..... | 33 |
| 7.1.1 Rôles de VP16 et d'ICP0 dans la régulation de la structure de la chromatine des gènes lytiques pendant l'infection lytique :..... | 34 |
| 7.1.2 Variants d'histones et chromatine..... | 35 |
| 7.2 Etat chromatinien du génome de HSV-1 pendant la phase latente de l'infection..... | 36 |
| 7.2.1 La régulation de la répression des gènes lytiques ne fait pas intervenir la méthylation de l'ADN | 36 |
| 7.2.2 Eléments insulateurs et latence..... | 37 |
| 7.2.3 Chromatine et réactivation du virus en latence..... | 41 |
| 7.3 Rôle des protéines de la famille Polycomb dans la régulation de l'expression des gènes viraux | 45 |
| Chapitre 2 : La chromatine | 48 |
| 1. Généralités..... | 48 |
| 1.1 Les histones..... | 48 |
| 1.1.1 Les histones de cœur | 48 |
| 1.1.2 Les histones de liaison | 50 |
| 1.2 Structuration de la chromatine..... | 50 |
| 1.3 Les modifications post-traductionnelles des histones | 52 |
| 1.3.1 L'acétylation | 53 |
| 1.3.2 La phosphorylation | 55 |
| 1.3.3 La méthylation | 56 |
| 1.3.4 L'ubiquitination | 60 |
| 1.3.5 Les autres modifications..... | 61 |
| 1.4 Insertion de variants d'histones..... | 63 |
| 1.4.1 H2.A..... | 64 |
| 1.4.2 H2.B..... | 65 |
| 1.4.3 H3..... | 65 |
| Chapitre 3 : Le centromère : Structure et fonctions..... | 67 |
| 1. Introduction | 67 |
| 2. Organisation de la séquence centromérique | 68 |
| 3. Structure protéique associée au centromère | 69 |
| 3.1 La protéine CENP-A | 69 |
| 3.1.1 Les nucléosomes contenant CENP-A | 70 |
| 3.1.2 CENP-A, identité et conservation centromérique..... | 75 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.2 | La protéine CENP-B..... | 78 |
| 3.2.1 | Généralités..... | 78 |
| 3.2.2 | Rôle de CENP-B dans la néoformation des centromères..... | 81 |
| 3.2.3 | Rôle de CENP-B dans la maintenance épigénétique du centromère..... | 81 |
| 3.3 | La protéine CENP-C..... | 83 |
| 3.4 | La protéine HMIS12..... | 85 |
| 3.5 | Les protéines du NAC et du CAD..... | 86 |
| 3.5.1 | CENP-H..... | 86 |
| 3.5.2 | CENP-I..... | 86 |
| 3.5.3 | CENP-N et autres protéines..... | 87 |
| 3.6 | La chromatine péricentromérique..... | 88 |
| 3.6.1 | Généralités..... | 88 |
| 3.6.2 | Incorporation de l'histone H3.3 au niveau des péricentromères..... | 89 |
| 3.7 | Les modifications post-traductionnelles des histones centromériques et péricentromériques..... | 90 |
| 3.8 | Les centromères de Souris (<i>mus musculus</i>)..... | 92 |
| 3.8.1 | Le centromère..... | 93 |
| 3.8.2 | Le péricentromère..... | 94 |
| 3.9 | Transcription et centromères..... | 94 |
| 3.10 | Néocentromères et chromosomes dicentriques..... | 97 |
| 3.10.1 | Néocentromères..... | 97 |
| 3.10.2 | Les chromosomes dicentriques..... | 100 |
| 3.11 | La répression génique associée aux centromères..... | 101 |
| 4. | Les chromosomes artificiels..... | 103 |
| 4.1 | Formation de HACs à partir de YACs et de BACs..... | 104 |
| 4.2 | Caractéristiques moléculaires des HACs..... | 106 |
| 4.3 | Utilisation des chromosomes artificiels..... | 107 |
| | Objectifs de ma thèse..... | 109 |

Matériel et Méthodes

| | | |
|-----------|--|------------|
| 1. | Lignées cellulaires et souches virales..... | 111 |
| 1.1 | Cellules utilisées..... | 111 |
| 1.2 | Synchronisation des cellules..... | 112 |
| 1.3 | Infection par HSV-1 et transfections..... | 112 |
| 2. | L'hybridation fluorescente (FISH) et l'immuno-FISH..... | 113 |
| 2.1 | Obtention des sondes par PCR..... | 113 |
| 2.2 | Le Marquage des sondes..... | 114 |
| 2.2.1 | La « nick-translation »..... | 114 |
| 2.2.2 | L'amorçage aléatoire (ou Random Priming)..... | 114 |
| 2.3 | Protocoles de FISH..... | 115 |
| 2.3.1 | Sur chromosomes mitotiques..... | 115 |
| 2.3.2 | Sur cellules interphasiques..... | 115 |
| 2.3.3 | Sur tissus congelés..... | 116 |
| 2.3.4 | Double FISH ADN/ARN sur tissus congelés..... | 116 |
| 2.4 | Immunofluorescence et immuno-FISH..... | 117 |
| 2.4.1 | Sur cellules interphasiques et chromosomes mitotiques..... | 117 |
| 2.4.2 | Sur tissus congelés..... | 118 |
| 3. | La digestion à la nucléase micrococcale (ou MNase)..... | 119 |
| 4. | Le southern blot..... | 120 |
| 4.1 | Migration de l'ADN..... | 120 |
| 4.2 | Le Transfert..... | 120 |
| 4.2.1 | Pour une hybridation des séquences spécifiques du chromosome artificiel..... | 120 |
| 4.2.2 | Pour une hybridation des séquences alphaséiques du chromosome 21..... | 120 |
| 4.3 | Le marquage des sondes radioactives..... | 121 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.1 Par amorçage aléatoire (random-priming (Ready to go DNA labelling beads, GE healthcare))..... | 121 |
| 4.3.2 Par Nick Translation (Kit Roche)..... | 121 |
| 5. L'immunoprécipitation de chromatine (ou ChIP)..... | 122 |
| 6. La PCR quantitative (qPCR)..... | 123 |
| 7. Le Western Blotting..... | 124 |

Résultats

| | |
|---|------------|
| Chapitre 1 : Analyse de la déstabilisation de la structure protéique des centromères par la protéine ICPO..... | 126 |
| 1. Déstabilisation des structures NAC et CAD dans les centromère endogènes | 126 |
| 1.1 Approche d'immunofluorescence..... | 126 |
| 1.2 Approche de Western Blot..... | 130 |
| 2. Effets d'ICPO sur les chromosomes artificiels..... | 133 |
| 2.1 Détection des HACs dans les cellules | 133 |
| 2.1.1 Par « polymerase chain réaction » (PCR)..... | 133 |
| 2.1.2 Par « Fluorescent In Situ Hybridization » (FISH)..... | 135 |
| 2.2 Détection de la protéine ICPO sur le chromosome artificiel par Immuno-FISH | 137 |
| 2.2.1 Déstabilisation des Protéines Centromériques (CENPs) associées aux HACs..... | 139 |
| 2.2.2 La réponse iCDR sur les HACs | 144 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 2 : Etude de la déstabilisation de la chromatine centromérique par la protéine ICPO | 146 |
| 1. Analyse par digestion à la Nucléase Micrococcale (MNase)..... | 146 |
| 1.1 Profils MNase dans les cellules HT1080 W0201R-8 contenant un chromosome artificiel..... | 147 |
| 1.2 Étude de digestion MNase de la chromatine des centromères endogènes..... | 151 |
| 1.2.1 Validation de la sonde alphoïde humaine | 151 |
| 1.2.2 Analyse de la structure chromatinienne centromérique dans les cellules infectées | 152 |
| 1.3 Analyse de la structure chromatinienne centromérique dans les cellules HeLa TRex inductibles pour l'expression d'ICPO | 158 |
| 1.3.1 Vérification de la fonctionnalité du système inductible TRex par Western Blot | 158 |
| 1.3.2 Vérification par Immunofluorescence..... | 159 |
| 1.3.3 Analyse de la structure chromatinienne centromérique..... | 160 |
| 1.4 Digestion MNase dans les cellules de souris NIH3T3 TRex..... | 165 |
| 2. Analyse de la structure chromatinienne des centromères par Immunoprécipitation de chromatine (ChIP)/ PCR quantitative | 168 |

Article 1: Centromere architecture breakdown induced by the viral protein ICPO

| | |
|---|------------|
| Chapitre 3 : Analyse <i>in vivo</i> de la localisation et de l'expression du génome de HSV-1 | 170 |
|---|------------|

Article 2: Physical association of latent HSV-1 genomes with centromeres correlates with viral transcriptional repression

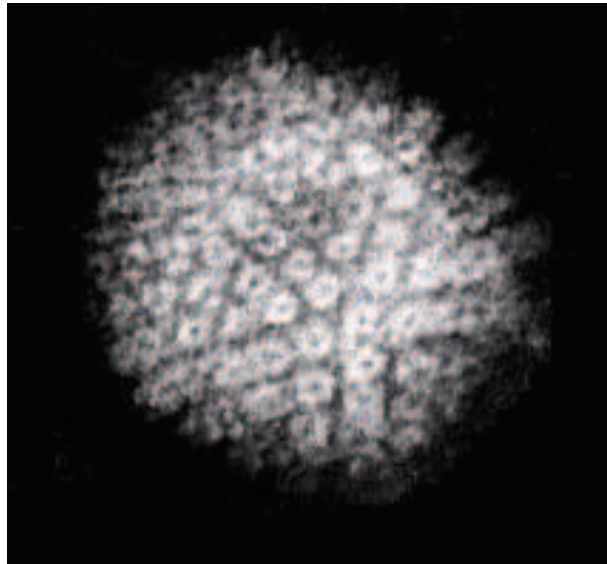
Discussion générale et discussion

| | |
|----------------------------------|------------|
| Discussion Générale | 174 |
| Conclusion..... | 185 |

Références bibliographiques

Analyse Bibliographique

CHAPITRE 1 : LE VIRUS HERPES SIMPLEX DE TYPE I



1. GENERALITES

Le Virus Herpes Simplex de type I (HSV-1) appartient à la famille des Herpesviridae.

La famille des herpesviridae regroupe une centaine de virus découverts à ce jour. Ils sont largement retrouvés dans le règne animal à l'instar des classes suivantes : mammifères, oiseaux, marsupiaux, reptiles, amphibiens, poissons et bivalves. Les Herpèsvirus possèdent les caractéristiques communes suivantes : (i) Une morphologie qui consiste en une capsidie icosaédrique constituée de 162 capsomères, entourée par un tégument et une enveloppe, (ii) un génome, renfermé au sein de la capsidie, qui se compose d'une molécule d'ADN double brin de 250 kpb, (iii) la propriété de coder pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques et dans la réplication de génome viral, (iv) la réalisation d'une partie de leur cycle dans le noyau des cellules infectées, et (v) la capacité d'entrer en latence dans certaines cellules de leur hôte naturel et ainsi de persister tout au long de la vie

de l'hôte et de pouvoir réactiver pour réaliser de nouveaux cycles productifs (Pour revue, voir (Whitley, Kimberlin, et B Roizman 1998)).

Les herpesvirus infectant la classe des mammifères sont répartis en trois sous-familles : les Alphaherpesvirinae, les Betaherpesvirinae, et les Gammaherpesvirinae. Au sein de ces trois sous-familles, 8 herpesvirus humains ont été mis en évidence à ce jour. La sous-famille des alphaherpesvirinae regroupe les virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), l'herpès simplex de type 2 (HSV-2) et le virus varicella-zoster (VZV). Ils possèdent un cycle réplcatif relativement court et un large spectre d'hôte *in vitro*, et sont de plus, bien adaptés à une colonisation efficace du système nerveux périphérique (PNC), ou ils établissent des infections latentes pouvant durer toute la vie de l'hôte (Pour revue voir (B Roizman et Whitley 2001)).

Le virus de type 1 (HSV1) est responsable de la majorité des herpès situés au dessus de la taille. Il correspond généralement à l'herpès labial, classiquement appelé bouton de fièvre. Le virus peut également se développer sur d'autres parties du visage comme les yeux ((Labetoulle 2004) ; (Labetoulle et al. 2005)).

2. EPIDEMIOLOGIE

Le virus HSV-1 est un agent infectieux très fréquemment rencontré chez l'homme. La prévalence de la séroconversion HSV-1 est de 65% de la population générale de France, alors que seulement 32% présente des manifestations cliniques (Pour revue voir (B Roizman et Whitley 2001)).

Cette séroconversion est plus tardive et moindre dans les pays industrialisés, par rapport aux pays défavorisés. L'expression clinique de cette maladie est très variable et peut aller d'une infection totalement asymptomatique, à une infection généralisée et grave. Il est à noter que chez les sujets immunodéprimés les formes cliniques de l'infection herpétique sont souvent graves, avec notamment des récurrences multiples et sévères, évoluant sous forme chronique.

Les formes néonatales des infections par HSV-1 et HSV-2 représentent de 1 à 5 nouveaux nés pour 10000 naissances en France. Seuls 20 % de ces cas correspondent à une infection par HSV-1. L'Herpès orofacial est du très majoritairement à HSV-1 et est la plus fréquente

des affections orofaciales. L'encéphalite Herpétique a une incidence de 0,5 à 1 pour 500000 personnes en France et représente de 10 à 20 % des encéphalites virales.

3. GENOME

C'est un virus à ADN bicaténaire de 152kpb qui code pour environ 80 gènes, qui sont exprimés d'une manière séquentielle au cours de l'infection :

Tout d'abord les gènes très précoces (ou IE pour Immediate Early), qui sont exprimés dès l'entrée du génome dans le noyau ; Une protéine très importante dans le mode d'infection du virus fait partie de cette classe de gènes, il s'agit de la protéine ICP0 pour Infected Cell Protein 0, et fera l'objet d'un chapitre ultérieur dans cette première partie. La plupart des protéines codées lors de cette phase auront un rôle dans l'activation des gènes dit précoces ou E (Early) codant des protéines indispensables pour la réplication virale. Une fois cette dernière engagée, les gènes tardifs ou L (pour Late), codant des protéines structurales nécessaires à l'édification du virion seront enfin exprimés, bien que certaines de ces protéines jouent un rôle de régulation de l'expression dans le cycle viral suivant (pour revue (McGeoch 1987)).

4. STRUCTURE DU VIRION

La particule virale d'HSV-1 est constituée de 4 éléments structuraux concentriques (Figure 1). Le génome viral qui est contenu dans une capsid, elle-même entourée par le tégment, à son tour recouvert par une enveloppe lipidique. La capsid est une structure icosaédrique d'une épaisseur d'environ 15nm et d'un diamètre d'environ 125nm, et est composée de 162 capsomères (150 hexons et 12 pentons) qui sont reliés entre eux par un complexe asymétrique trimérique. Le tégment, fortement associé à cette capsid, forme une matrice protéique, composée d'une vingtaine de protéines virales. L'enveloppe, qui recouvre le tégment, est une bicouche lipidique enrichie en glycoprotéines virales qui ont un rôle dans

la pénétration du virus dans la cellule cible et également dans la propagation du virus de cellules à cellules.

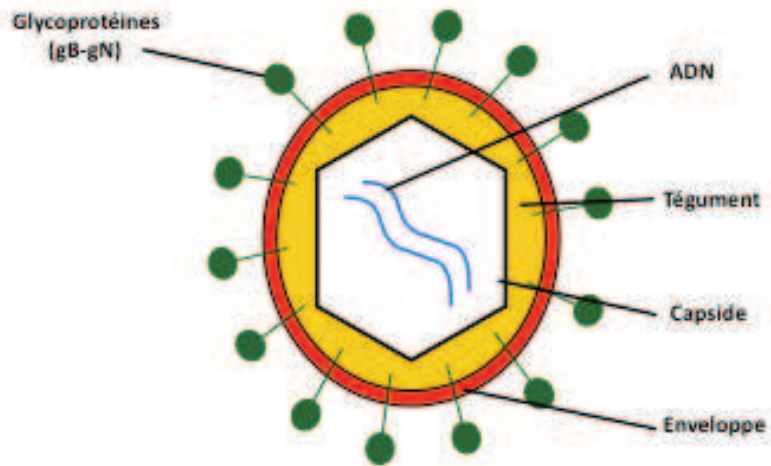


Figure 1. Schéma de la particule virale HSV-1

5. CYCLE VIRAL BIMODAL

5.1 Le cycle lytique

Le virus HSV-1 se distingue des autres virus par son mode d'infection caractéristique dit bimodal, qui est composé de 2 types de cycles d'infection bien distincts (Figure 2). Cette particularité à toujours fait du virus HSV-1 un modèle d'étude très intéressant pour comprendre ce qui permet à un virus de passer d'un mode d'infection à un autre, mais également ce qui caractérise, évolutivement et moléculairement, chacune de ces phases.

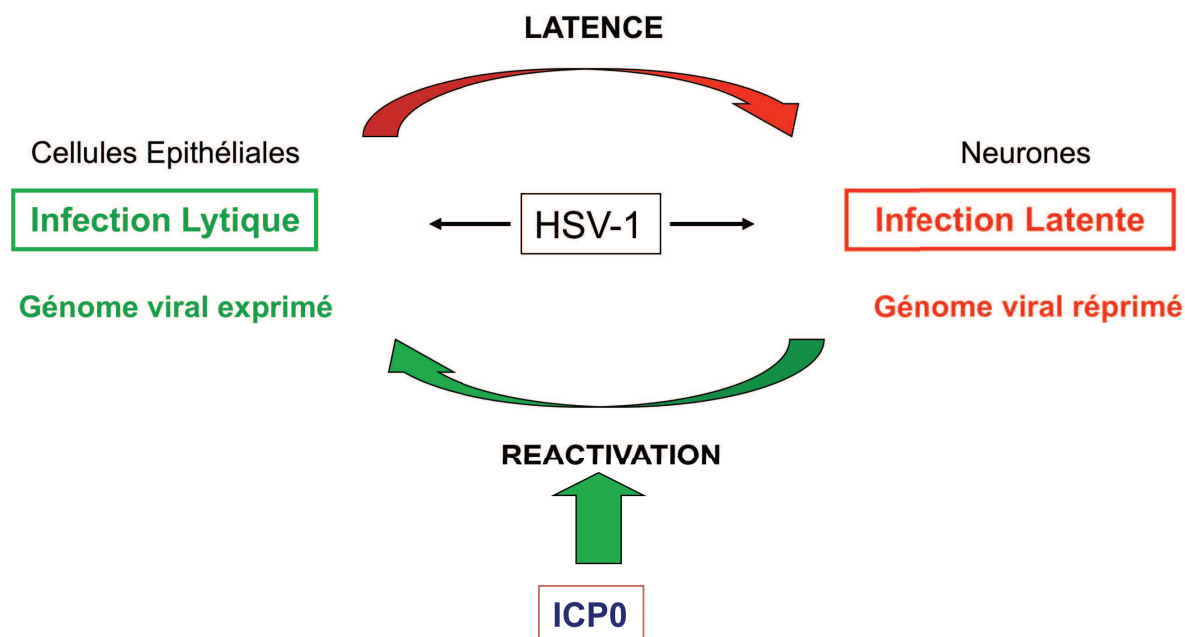


Figure 2. Mode d'infection bimodal du virus HSV-1

Le virus HSV-1 possède un mode d'infection particulier appelé bimodal ; tout d'abord il va s'établir une infection dite lytique dans les cellules épithéliales de la région orale, durant cette phase, tous les gènes du virus sont exprimés. Le virus va ensuite être capable de migrer le long des axones jusqu'aux corps cellulaires des ganglions trigéminalés, situés à la base du cerveau, et où il va s'établir en phase dite de latence, pendant laquelle tout les gènes viraux excepté un locus seront réprimés.

Après la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, la capsid est relâchée dans le cytoplasme et transportée le long des microtubules grâce au complexe moteur dynéine/dynactine (Döhner et al. 2002)). Une fois arrivée au niveau de la membrane nucléaire, le génome s'introduit dans le noyau via les pores nucléaires. Il était communément admis jusqu'à récemment qu'une molécule d'ADN circulaire devait servir de matrice pour la réplication du génome de HSV-1 (D A Garber, Beverley, et D M Coen 1993). Cette hypothèse a été mise en doute par la proposition que la protéine ICP0 contrôle la configuration du génome viral dans la cellule hôte et que la conformation la plus favorable du virus pour servir de matrice est une conformation linéaire (Jackson et Neal A DeLuca 2003).

Juste après l'entrée du génome dans le noyau, HSV-1 démarre une cascade très bien synchronisée d'expression des différents gènes viraux, régulée initialement par l'expression d'une protéine transrégulatrice apportée en tant que protéine du tégument, la protéine VP16. VP16 est une protéine exprimée à partir des gènes tardifs, ce type de protéines présente l'avantage d'être disponible dès l'entrée du virus dans la cellule. Elle forme un complexe avec les protéines Oct-1 et HCF, qui transporte VP16 au niveau du noyau, ce qui active la

transcription RNA Pol II dépendante des promoteurs Immediate Early (IE) (LaBoissière et P O'Hare 2000). Tous les transcrits viraux sont produits par l'ARN pol II et sont coiffés en 5' et polyadénylés en 3'. Une fois les gènes IE transcrits et les protéines produites, elles peuvent induire la transcription des gènes Early et Late, codant les protéines impliquées dans la réplication des ADN et les protéines structurales, respectivement. Les protéines codées par les gènes IE incluent ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47. ICP4 est une protéine virale essentielle, requise pour l'expression correcte des protéines codées par les gènes E et L. Elle fonctionne comme un facteur de transcription en facilitant la formation d'un complexe de préinitiation de la transcription au niveau des promoteurs viraux. ICP4 peut également réprimer la transcription virale et cellulaire (Grondin et N DeLuca 2000). ICP22, une protéine virale non essentielle, est aussi impliquée dans la régulation de l'expression des gènes IE et E. ICP27 est impliquée dans la régulation de l'expression de certains gènes IE et L mais également dans la répression de certains gènes cellulaires durant l'infection (C A Spencer, Dahmus, et S A Rice 1997). Les mécanismes utilisés par ICP27 sont inconnus mais il a été montré qu'ICP27 interagissait avec la RNA pol II, ce qui pourrait affecter son activité (Changhong Zhou et David M Knipe 2002). ICP27 peut également inhiber l'épissage des ARNs (Hardy et Sandri-Goldin 1994). ICP47 est la seule protéine virale non impliquée dans la régulation des gènes. Cela dit, elle peut se lier au « Transporter Associated with antigen Presentation » (TAP), bloquant de ce fait son association avec les peptides antigéniques. Ceci empêche la présentation des antigènes viraux par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), et de ce fait le virus échappe à la réponse immunitaire cellulaire (Tomazin et al. 1998). ICP0 possède la caractéristique d'activer la transcription virale pendant la phase lytique de l'infection mais également de permettre la réactivation du virus à partir de la phase latente de l'infection (Halford et P A Schaffer 2001). Suite à ceci, le virus va pouvoir démarrer le deuxième mode d'infection, qui est appelé cycle latent.

5.2 Le cycle latent

Ce cycle dépend de la capacité du virus à pouvoir migrer le long des axones, à partir des terminaisons axonales présentes dans les zones de l'infection primaire lytique. Une fois parvenu dans les corps cellulaires des neurones en question il va pouvoir s'établir en ce que l'on appelle la latence.

Ce mode d'infection lui permet donc d'être à l'abri du système immunitaire dans le système nerveux de l'hôte, et ce, pendant une période indéfinie.

Durant la latence, le virus va être sous une forme circulaire inactive ou encore appelée épisome, qui est une structure indépendante du génome de l'hôte car elle est non intégrée (pour revue voir (Clinton Jones 2003)).

Le virus va cependant être capable de sortir de cette phase de latence pour réactiver et recommencer un cycle lytique au niveau de l'épiderme oro-facial, ceci se traduisant physiquement par le bouton de fièvre (Voir précédemment).

Après l'infection primaire des cellules épithéliales, les nouveaux virions produits sont capables de transport rétrograde le long des axones jusqu'au noyau des neurones, où s'établit, soit une infection productive, soit la latence virale au cours de laquelle il n'y a aucune expression protéique détectable. Dans le deuxième cas, le génome viral d'HSV-1 est réprimé à l'exception des ARN LAT (Pour Latency Associated Transcripts) qui sont transcrits. LAT inhibe l'apoptose et maintient la survie des neurones infectés. Le mécanisme par lequel LAT protège les cellules de l'apoptose est encore obscur. Les transcrits LATs regroupent plusieurs ARNs non polyadénylés et dépourvus de la coiffe 5' ce qui montre qu'ils ne sont pas des précurseurs d'ARNm (pour revue voir (Clinton Jones 2003)). Cette famille d'ARNs se compose d'ARN précurseurs de 8,3 kb (appelé minor LAT ou mLAT), l'intron de 2,0 kb, qui dérive de l'ARN LAT 8,3 kb. Les ARNs LAT 1,5 kb et 1,4 kb résultent d'un épissage supplémentaire dans l'ARN LAT 2,0 kb. L'ARN LAT de 6,5 kb est instable (Nicosia et al. 1994). Il est à noter que les transcrits LAT sont anti-sens par rapport aux transcrits codant les protéines ICP0 et ICP34.5.

La latence et les transcrits LATs : rôle des miRNAs ?

Le rôle des transcrits LATs a été étudié à l'aide de virus mutants. Tout d'abord les transcrits LATs et plus particulièrement les transcrits issus de l'épissage de l'ARN de 8,3 kb interviendraient dans l'établissement et le maintien de la latence. Néanmoins, peu de neurones infectés survivent lorsque ces transcrits LAT sont mutés (R L Thompson et N M Sawtell 2001). Il semblerait que les transcrits LAT puissent empêcher la réactivation de HSV-1 en bloquant l'expression des gènes viraux et notamment celle des gènes très précoces (N Mador et al. 1998) mais elle aide les neurones à survivre après une infection.

De plus, il a été montré que les transcrits LATs pourraient empêcher une surinfection d'une cellule qui est déjà le lieu d'une infection latente, mais également au niveau du site primaire d'infection de l'hôte (Nurith Mador, Amos Panet, et Israel Steiner 2002).

En 2008, Umbach et ses collègues ont montré que le LAT fonctionnait comme un précurseur primaire des micro ARNs (miARN) et codait quatre miARNs dans les cellules infectées par HSV-1. Parmi ces miARNs, le miR-H2-3p est transcrit dans le sens contraire d'orientation du gène ICP0. Ils ont montré aussi que miR-H2-3p est capable de réduire l'expression d'ICP0 sans affecter son niveau d'expression d'ARNm (Jennifer Lin Umbach et al. 2008). Ils ont également identifié un cinquième miARN à partir d'HSV-1 en phase de latence dans les ganglions trigéminals, le miR-H6. Le miR-H6 découle d'un ARN précurseur inconnu différent de LAT. Ils ont également montré une complémentarité de ce micro ARN avec l'ARNm codant ICP4, et l'inhibition de son expression. Ces résultats pourraient expliquer la capacité que possède LAT à maintenir le virus en phase de latence grâce notamment à l'inactivation de l'ARNm d'ICP0. Cette découverte de miARNs, réalisée chez la souris a été confirmée chez l'homme l'année suivante avec en plus la mise en évidence de deux miARN supplémentaires spécifiques de l'homme, miR-H7 et miR-H8 (Jennifer L Umbach et al. 2009). Plus tard, des miARNs ont été trouvés chez HSV-2, et cette fois-ci, ce sont deux miARN qui possèdent une complémentarité avec la séquence d'ICP0 (Jennifer L Umbach et al. 2010). De plus de nombreux miARNs supplémentaires ont récemment été découverts, et ce, pour les deux virus (Jurak et al. 2010). Ce système de petits ARN représente donc un mécanisme de régulation de l'expression des gènes viraux assez important. Est-t-il possible que le virus cible également des gènes cellulaires grâce à ce mécanisme ? Une telle probabilité n'est pas à exclure vu les moyens mis en œuvre par la cellule pour se débarrasser du virus, qui contrecarre ces actions grâce à plusieurs protéines, dont une des plus importantes semble être ICP0.

6. LA PROTEINE VIRALE ICP0

6.1 Généralités

La protéine très précoce ICP0 (Infected Cell Protein 0) occupe une place particulière dans la biologie du virus HSV-1. ICP0, initialement appelée Vmw110, est une des cinq protéines très précoces (IE) synthétisées par HSV-1 (pour revue (R D Everett 2000a)). C'est un transactivateur ubiquitaire capable de stimuler l'expression des trois classes des gènes herpétiques ainsi que celle de nombreux autres gènes cellulaires de façon non spécifique (Cheung, Panning, et Smiley 1997) et sans se fixer directement à l'ADN. ICP0 est une protéine nucléaire en début d'infection mais qui est capable de s'accumuler dans le cytoplasme pendant les phases plus tardives de l'infection (Lopez, Van Sant, et B Roizman 2001). Il a été montré récemment qu'ICP0 serait en fait déjà présente dans le tégument du virus et ferait partie des différentes protéines relarguées dans le cytoplasme cellulaire lors de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique cellulaire (Maringer et Gillian Elliott 2010). Elle est composée de 775 acides aminés et plusieurs domaines fonctionnels ont été décrits (Voir figure 3) :

La région N terminale d'ICP0 est responsable de l'activation de la transcription de plusieurs gènes lytiques. Elle contient dans son domaine C terminal un site de multimérisation, important pour sa localisation dans les corps PML, ainsi qu'un résidu sérine phosphorylable, modification qui aura un rôle dans la localisation subcellulaire d'ICP0 (Meredith et al. 1995).

Dans sa région N terminale se trouve un domaine RING Finger (Really Interesting New Gene), essentiel pour plusieurs de ses activités biologiques, dont la plus importante est une activité E3 ubiquitine ligase, conférée par un domaine HUL-2 (Herpes Ubiquitin Ligase), en synergie avec un autre domaine HUL-1 trouvé dans la région C terminale de la protéine (Ryan Hagglund et Bernard Roizman 2002).

Ce domaine HUL-1 est également capable d'induire l'auto-ubiquitination de la protéine et d'interagir avec la protéine USP7 (Ubiquitin Specific Protease) (Voir ultérieurement).

Il a été prouvé qu'ICP0 avait un rôle dans la réactivation du virus HSV-1 à partir de la phase de latence, en effet, des virus mutants pour la protéine ICP0, à savoir la souche dl1403

(virus dont le gène codant ICP0 est déléte) et la souche vFXE (virus dont le génoe est tronqué dans le domaine RING Finger) sont incapables de réactiver *in vivo* (Halford et P A Schaffer 2001). L'activité E3 ubiquitine ligase d'ICP0 et l'interaction d'ICP0 avec des protéines cellulaires seront les sujets des sous chapitres suivants.

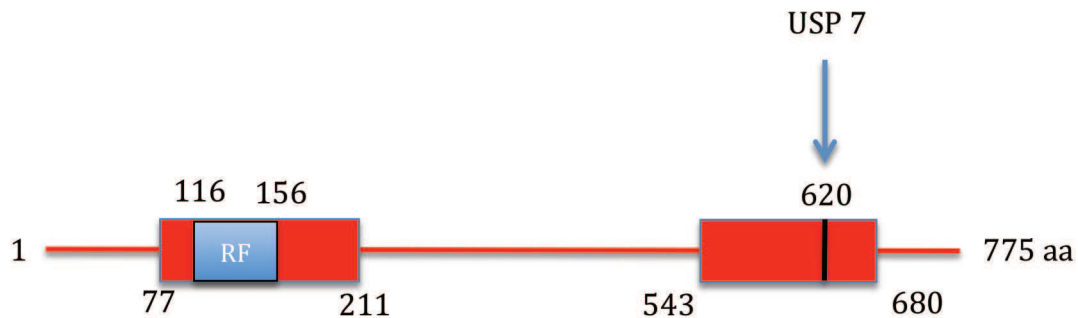


Figure 3 : Représentation schématique de la protéine ICP0 et de ses domaines d'activités E3 ubiquitine ligase (D'après P. Lomonte, La protéine ICP0 du virus herpès simplex de type 1 : l'ubiquitination au service de l'infection ; virologie Volume 10, Numéro 6, Novembre-Décembre 2006)

Les deux régions minimales décrites pour leur activité E3 ubiquitine ligase sont représentées par des rectangles rouges avec l'indication des acides aminés de début et de fin. La position du domaine RING Finger (RF) est également représentée avec les acides aminés de début et de fin. La position de l'acide aminé impliqué dans l'interaction avec la protéine USP7 est indiquée.

6.2 Activité E3 ubiquitine ligase d'ICP0

Une des propriétés les plus singulières d'ICP0 est de posséder une activité E3 ubiquitine ligase. L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés servant, elle-même, de marqueur de protéines à éliminer. Elle est ainsi appelée parce qu'elle est localisée dans tous les compartiments subcellulaires de toutes les cellules des organismes, elle est dite ubiquitaire. L'ubiquitination désigne la fixation (covalente, ATP dépendante grâce à une cascade d'enzymes E1, E2, E3) spécifique et régulée d'une ou plusieurs ubiquitines sur une protéine cible. Cette modification post-traductionnelle a pour principale fonction la reconnaissance puis la destruction de la protéine ainsi marquée, par le complexe protéolytique du protéasome.

Plusieurs molécules d'ubiquitine sont liées de façon covalente à la protéine cible (polyubiquitination), grâce à l'action de trois enzymes : E1, E2 et E3-ligases. La protéine ainsi modifiée est ensuite dirigée vers le protéasome, une structure en forme de baril dont l'activité est régulée par l'ubiquitine, et dans laquelle la protéolyse se déroule. L'ubiquitine est alors libérée de son substrat et peut être réutilisée.

Action séquentielle des enzymes impliquées dans ce mécanisme: (Figure 4)

- Activation carboxylation terminale de l'ubiquitine par l'enzyme activatrice E1
- Conjugaison : transfert de la molécule activée d'ubiquitine sur un groupe sulfure de l'enzyme conjugante E2.
- Transfert : transfert de la molécule d'ubiquitine via une ubiquitine-ligase E3 à un groupe amyle d'une lysine accepteur de la protéine à dégrader. Cette protéine s'était auparavant liée à la ligase.

Ce processus peut se répéter de nombreuses fois jusqu'à former un polymère. Il faut au moins quatre molécules d'ubiquitine fixées à la protéine pour que celle-ci soit adressée au protéasome et dégradée.

E1 fixe l'ubiquitine; E1-Ubiquitine se fixe sur E2 puis transfère l'ubiquitine sur E2; E2-Ubiquitine se fixe sur E3. Le complexe E3-E2-Ubiquitine est actif.

E1 (*enzyme d'activation de l'ubiquitine*) serait unique. Il existerait près d'une centaine de types d'E2 (*enzyme de conjugaison d'ubiquitine*) et plus de 1000 types d'E3 (*ligase ubiquitine-protéine*), cette dernière expliquant la spécificité de la réaction. E2 et E3 sont souvent associées l'une à l'autre dans le cytoplasme. (Pour revue voir (Sorokin, E R Kim, et Ovchinnikov 2009)).

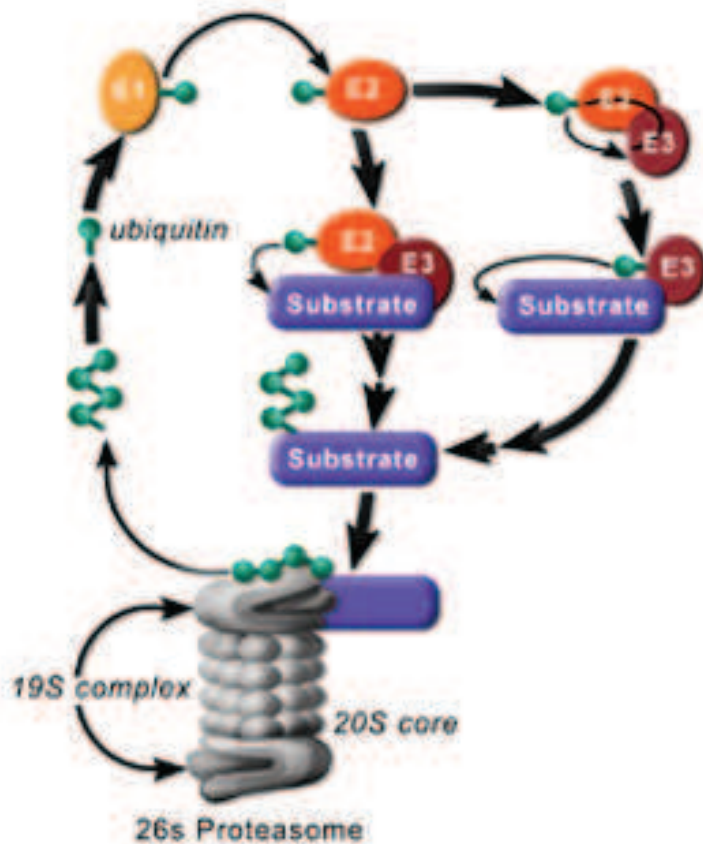


Figure 4 : Représentation Schématique du mécanisme d'ubiquitination et de la dégradation par le protéasome (D'après Dr. Marta Rubio, MIT, USA)

Une molécule d'ubiquitine va être activée par carboxylation terminale par l'enzyme E1, puis transférée sur la l'enzyme de conjugaison E2, qui va elle même interagir avec l'enzyme E3 ubiquitine ligase (comme ICP0 par exemple). Le complexe actif E2-E3 va transférer plusieurs molécules d'ubiquitine sur la protéine cible à dégrader (substrate) jusqu'à formation d'un polymère. La protéine cible sera ensuite dégradée via la protéasome.

L'activité E3 ubiquitine ligase de la protéine ICP0 a été découverte grâce à la mise en évidence de la disparition des corps PML et de l'induction de la dégradation de la protéine PML (Promyelocytic Leukemia protein) par ICP0. Les corps PML, dont le principal constituant est la protéine PML (pour revue voir (Lallemand-Breitenbach et Hugues de Thé 2010)) sont des organelles qui ont un rôle répressif dans la régulation du cycle cellulaire, mais également dans la réponse cellulaire antivirale déclenchée par ICP0. Ils sont déstabilisés grâce à la présence d'un domaine spécifique d'ICP0, le domaine RING Finger. Cette déstabilisation survient 2 heures seulement après la localisation d'ICP0 sur ces structures en début d'infection (R D Everett et G G Maul 1994). Il a été montré plus tard que

2 des constituants majeurs de ces corps PML, la protéine PML et la protéine SP100, étaient dégradés via une activité d'ICP0 impliquant le protéasome (Chelbi-Alix et H de Thé 1999). L'année suivante Roger Everett et collaborateurs ont prouvé que cette activité était liée au système d'ubiquitination des protéines et qu'ICP0 agissait comme une E3 Ubiquitine ligase et que non seulement les protéines PML et SP100 étaient dégradées par ce mécanisme, mais également la protéine CENP-C (R D Everett 2000b), (R D Everett et al. 1999). Les domaines RING Finger ont été prouvés comme souvent associés à une activité E3 ubiquitine ligase (Freemont 2000). Boutell et al. ont donc cherché à savoir si c'était le cas pour la protéine ICP0 *in vitro*, et ce fut effectivement le cas. L'activité E3 ubiquitine ligase d'ICP0 est directement liée à son domaine RING-Finger (Boutell, Sadis, et Roger D Everett 2002). Dans une étude comparative récente, les homologues d'ICP0 chez les bovins, équins, porcins et VZV possèdent tous cette activité E3-ubiquitine ligase. Cette découverte implique donc une importance de cette activité au cours de l'évolution, cette activité ne se limitant pas aux virus humains (Roger D Everett et al. 2010).

Quel est l'intérêt du virus à dégrader les corps PML? Des éléments de réponse viennent du fait que l'expression de la protéine PML est induite lors de l'activation de la voie de défense immunitaire Interféron (IFN) (Chelbi-Alix et al. 1995) et également de résultats obtenus lors d'une étude montrant l'importance de la protéine PML dans la réponse antivirale déclenchée par HSV-1. En effet, dans des cellules qui n'expriment plus PML grâce à l'expression de shARNs ciblés contre la protéine, et qui sont infectées par un virus HSV-1 nul pour ICP0, l'efficacité d'infection est restaurée (formation de plaques et expression des gènes lytiques), c'est à dire que le phénotype mutant est complété, tout du moins en partie. Ceci permet donc de penser qu'ICP0 contrecarre un mécanisme de défense antiviral mis en place par PML (Roger D Everett et al. 2006). Il existe plusieurs isoformes de la protéine PML. Cuchet et al. ont récemment mis en évidence que les isoformes I et II de la protéine étaient particulièrement importantes dans la réponse cellulaire anti-HSV-1 (Cuchet et al. 2011). De la même manière, la même équipe a prouvé que la protéine SP100 était responsable d'une inhibition de la réplication virale, la complémentation fonctionnelle d'un virus mutant nul pour ICP0 est plus importante lorsque les protéines PML et SP100 sont absentes des cellules (Roger D Everett et al. 2008). Deux autres protéines des corps PML, ATRX et hDaxx, ont été montrées comme ayant un rôle dans la répression anti virale déclenchée par l'arrivée de HSV-1 dans la cellule. Ces deux protéines font partie de complexes répressifs de remodelage de la chromatine. Cette fonction antivirale est également contrecarrée par ICP0 (Lukashchuk et Roger D Everett 2010). Les protéines RNF8 et RNF168, qui sont des

ubiquitine ligases, sont également impliquées dans la réponse anti-HSV-1, mais indépendamment des protéines des corps PML. Ces protéines vont très vite s'associer au génome de HSV-1 car elles sont impliquées dans la réponse de réparation de l'ADN dit « nu » mais vont être ciblées par ICP0 et dégradées par le protéasome ((Lilley et al. 2010),(Lilley et al. 2011)).

Le virus HSV-1 fait donc face à un arsenal défensif de la part de la cellule assez important et dont le principal contrecarrant semble être la protéine ICP0. En induisant la dégradation de toutes les protéines impliquées dans son éventuelle désactivation, il s'assure de démarrer correctement un cycle lytique et ainsi de survivre le plus longtemps possible chez l'hôte.

En plus de la diversité et du nombre de protéines cellulaires antivirales, celles ci peuvent également avoir une activité interdépendante, comme les protéines PML et SP100. La protéine SP100 protège PML de la dégradation induite par ICP0, ce qui témoigne de l'existence de plusieurs niveaux de régulation au sein d'une même voie de défense antivirale (Negorev, Vladimirova, et Gerd G Maul 2009).

La protéine USP-7

Il a été montré qu'ICP0 interagissait avec la protéine USP7 (Ubiquitin Specific Protease 7), une protéine impliquée dans la coupure du lien entre le groupement ubiquitine et la protéine ciblée (R D Everett et al. 1997). Il a été prouvé plus tard que cette interaction protégeait ICP0 de son auto-ubiquitination et augmentait donc la stabilité de la protéine (Mary Canning et al. 2004). Cet équilibre est également le produit d'un niveau supplémentaire de régulation, impliquant l'ubiquitination de USP-7 par ICP0 (Boutell et al. 2005). Mais cet équilibre est atteint grâce à la favorisation de l'activité régulatrice de USP-7 sur ICP0 plutôt que l'inverse, la présence de la protéine USP-7 étant importante pour une bonne activité transactivatrice d'ICP0 en début d'infection. Plus récemment une isoforme plus lourde de USP-7, USP-7 beta, a été mise en évidence (Antrobus et Boutell 2008). Cette protéine est également capable d'être ubiquitinée et dégradée par ICP0, la présence d'isoformes (il est supposé qu'il en existe d'autres) de protéines régulatrices d'ICP0 complexifie d'un niveau supplémentaire la régulation de la stabilité de la protéine ICP0. L'interaction d'ICP0 avec USP-7 aurait un rôle dans l'inhibition de la réponse Toll Like Receptor (TLR), une réponse cellulaire immunitaire majeure faisant intervenir la voie NFkappaB. En déubiquitinant deux protéines régulatrices de cette voie (TRAFF-6 et IkkGamma), USP-7, sous le contrôle d'ICP0, empêche cette réponse d'avoir lieu et permet donc au virus d'échapper à cette

défense immunitaire (Daubeuf et al. 2009) (Figure 5).

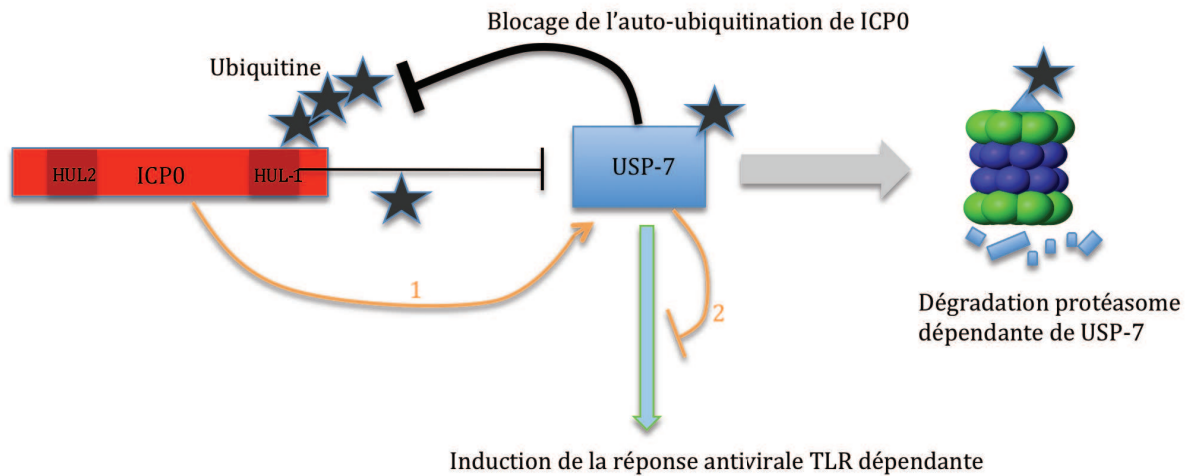


Figure 5: Interdépendance des protéines ICP0 et USP7

La protéine ICP0 est capable d'interagir avec la protéine USP7 et d'induire sa dégradation via son activité E3 ubiquitine ligase contenue dans son domaine HUL-1. En retour USP-7 est capable d'empêcher l'autoubiquitination d'ICP0 et donc de contrôler sa stabilité. L'équilibre semble plus en faveur de l'activité régulatrice de USP-7, même si cette protéine est capable d'activer la réponse antivirale liée à TLR. ICP0 peut également bloquer indirectement cette réponse antivirale en induisant (1) USP-7 à déubiquitiner des protéines importantes dans la régulation (répression) de la voie de défense TLR (2).

Autres protéines

Il a également été montré qu'ICP0 ubiquitinait p53 *in vivo* et *in vitro* (Boutell et Roger D Everett 2003). Cela dit, cette ubiquitination est plus faible que celle engendrée par la protéine régulatrice de p53, mdm2. Comme les auteurs le suggèrent, cette ubiquitination pourrait avoir un rôle dans la réponse anti apoptotique induite par les UV, en empêchant les cellules de rentrer en apoptose, le virus garderait le contrôle sur le cycle cellulaire et favoriserait sa survie. Une autre étude montre que p53 est stabilisée par phosphorylation lors de l'infection par HSV-1, mais que les protéines ICP0 et USP-7 ne sont pas impliquées dans cette régulation, mais plutôt la protéine ICP4 (Boutell et Roger D Everett 2004).

Une autre protéine Ubiquitine ligase, SIAH-1 (Seven In Absentia Homolog -1) impliquée dans l'ubiquitination et donc la régulation d'ICP0, est dégradée via l'activité E3 ubiquitine ligase d'ICP0. USP-7 n'est donc pas la seule protéine cellulaire qui tente de réguler l'expression d'ICP0 (Claus-Henning Nagel et al. 2011).

Une autre protéine à activité E3-Ubiquitine ligase, E2FBP1, (E2F Binding Protein 1) est également ciblée pour la dégradation par ICP0 (Fukuyo et al. 2011). Cette situation est

particulière car E2FBP1 induit également la dissociation des corps PML, en étant toutefois une protéine impliquée dans la défense anti virale induite par HSV-1. En effet E2FBP1 est responsable de la baisse de la quantité d'ARNm ICP0. Il est intéressant de noter que E2FBP1 est impliquée dans le passage de la phase G1/S (M Suzuki et al. 1998).

Parallèlement à ces études, il a été prouvé qu'ICP0 se localisait au niveau des centromères et induisait la dégradation des protéines CENP-C et CENP-A et CENP-B ((R D Everett et al. 1999), (P Lomonte, K F Sullivan, et R D Everett 2001), (Patrick Lomonte et Morency 2007)) et ce toujours grâce à son domaine RING Finger. En détruisant les protéines suscitées, ICP0 induit le blocage des cellules en phase de ce que l'on appelle la pseudo-prométaphase, les cellules bloquées dans cette phase vont être incapables de finir la mitose. Les rares cellules qui arrivent à effectuer une mitose malgré tout donnent en général naissance à des cellules aneuploïdes (P Lomonte et R D Everett 1999). La même année une autre étude montrait qu'effectivement, ICP0 induisait une dérégulation du cycle cellulaire (Hobbs et N A DeLuca 1999). Plus tard, une étude réalisée à des fins plus appliquées, montrait que la surexpression d'ICP0 induisait une diminution de la prolifération cellulaire dans des glioblastomes, une forme de cancer du cerveau très agressive. Cette étude présentait donc ICP0 comme une éventuelle protéine médicament dans le traitement de ce type de cancer (Cuchet et al. 2005).

Pour résumer, l'activité E3 ubiquitine ligase *in vitro* de la protéine ICP0 a premièrement été décrite dans 2 études ((Boutell, Sadis, et Roger D Everett 2002) (Van Sant et al. 2001)) et est la preuve incontestable que c'est grâce à cette activité que la protéine induit notamment la dégradation des corps PML, en ciblant les protéines PML et SP100, protéines majeures des corps PML et d'autre part les protéines centromériques CENPs. Les protéines CENP-A, CENP-B et CENP-C sont donc des cibles pour le protéasome grâce à la protéine ICP0. Nous nous sommes logiquement intéressés au devenir des protéines centromériques plus récemment mises en évidence, notamment les protéines du NAC (CENP-A Nucleosome Associated Complex) et du CAD (CENP-A Distal complex), deux complexes protéiques centromériques associés à la protéine CENP-A, et nous nous sommes aperçus que la majorité de ces protéines étaient également ciblées par ICP0 pour une dégradation via le protéasome (Voir résultats).

La dégradation de la majorité des protéines associées aux centromères va fortement endommager son intégrité et on peut supposer que la structure chromatinienne du centromère risque d'être désorganisée en conséquence.

Cet effet d'ICP0 sur la structure du centromère constitue le sujet au sens large de ma thèse et je vais maintenant détailler ce qui est déjà connu de l'effet d'ICP0 sur la charpente protéique associée aux centromères et la réponse cellulaire qui en découle, l'iCDR (pour en anglais interphase Centromere Damage Response).

6.3 ICP0 et réponse iCDR

Des études effectuées dans notre laboratoire ont pu mettre en évidence un nouveau mécanisme cellulaire appelé iCDR pour interphase Centromere Damage Response (Morency et al. 2007) (Figure 6).

L'infection par le virus HSV-1 des cellules en culture induit la déstabilisation des centromères pendant l'interphase. Cette déstabilisation est induite par la protéine virale ICP0, et fait suite à l'induction de la dégradation par ICP0 et *via* le protéasome de protéines importantes pour l'intégrité de ces structures. Dès qu'elle pénètre dans le noyau, ICP0 se localise provisoirement aux centromères et induit la dégradation protéasomale de la majorité des protéines CENPs localisées au niveau du centromère, dont les protéines CENP-A, CENP-B et CENP-C, protéines essentielles dans la structuration de la chromatine centromérique. Bien que la signification biologique de la déstabilisation des centromères induite par ICP0 ne soit pas encore clairement élucidée, ICP0 est d'un intérêt exceptionnel comme outil pour étudier la structure centromérique et les mécanismes cellulaires impliqués dans le maintien de l'architecture centromérique. L'iCDR a été mise en évidence dans des lignées cellulaires humaines et murines exprimant ICP0. En effet, à quatre heures post-infection, il est observée une accumulation aux centromères endommagés de trois protéines appartenant aux corps de Cajal, aux nucléoles et aux organelles associées, les gems. Ces protéines sont la coïline, la fibrillarine et SMN. Nous avons été en mesure de démontrer que la redistribution de la coïline aux centromères dépendait de la seule activité d'ICP0 et ne nécessitait pas d'autres facteurs viraux. Il est donc très probable qu'il s'agisse d'une conséquence directe de la dégradation des protéines centromériques induite par ICP0. La coïline se localise aux centromères indépendamment des corps de Cajal et n'est pas accompagnée par des ARNs, normalement associés aux corps de Cajal. Toutefois, la fibrillarine et SMN sont également redistribuées aux centromères avec la coïline, ce qui pourrait suggérer que ces trois protéines forment un complexe centromérique. Il a également été montré dans l'équipe que la coïline pouvait interagir directement avec l'ADN α -SAT de

type I. La redistribution de la coïline aux centromères est également visible dans les cellules murines, ce qui indique que ce phénomène est conservé au cours de l'évolution. L'étape suivante était de déterminer si ce phénomène était un mécanisme cellulaire endogène ou si cette réponse n'était possible que grâce la présence d'un facteur exogène, tel qu'ICP0. En utilisant des siARNs dirigés contre les ARNms des protéines centromériques, il a été démontré que la coïline était capable de s'accumuler aux centromères dans les cellules déficientes en protéine CENP-B. Ceci confirme l'existence d'une réponse cellulaire qui est déclenchée par l'instabilité du centromère interphasique, indépendamment de tout facteurs exogènes. Il a alors été proposé alors que l'iCDR faisait partie d'un nouveau mécanisme de sauvegarde consacré au maintien des centromères interphasiques. Ce mécanisme est possiblement lié à un assemblage correct du kinétochore, l'attachement des microtubules, et enfin l'achèvement de la mitose.

Il est également supposé que cette réponse puisse jouer un rôle précoce dans le processus de reconstruction des centromères endommagés, par exemple lors de la signalisation de ces dommages centromériques à la cellule, qui devra alors aviser de la réparation de ses centromères ou plutôt rentrer en apoptose. Ceci est bien sûr une supposition et nous ne pouvons pas exclure que l'iCDR puisse jouer un rôle plus en aval dans la voie de réparation des centromères endommagés, voir même à plusieurs endroits dans cette voie de réparation.

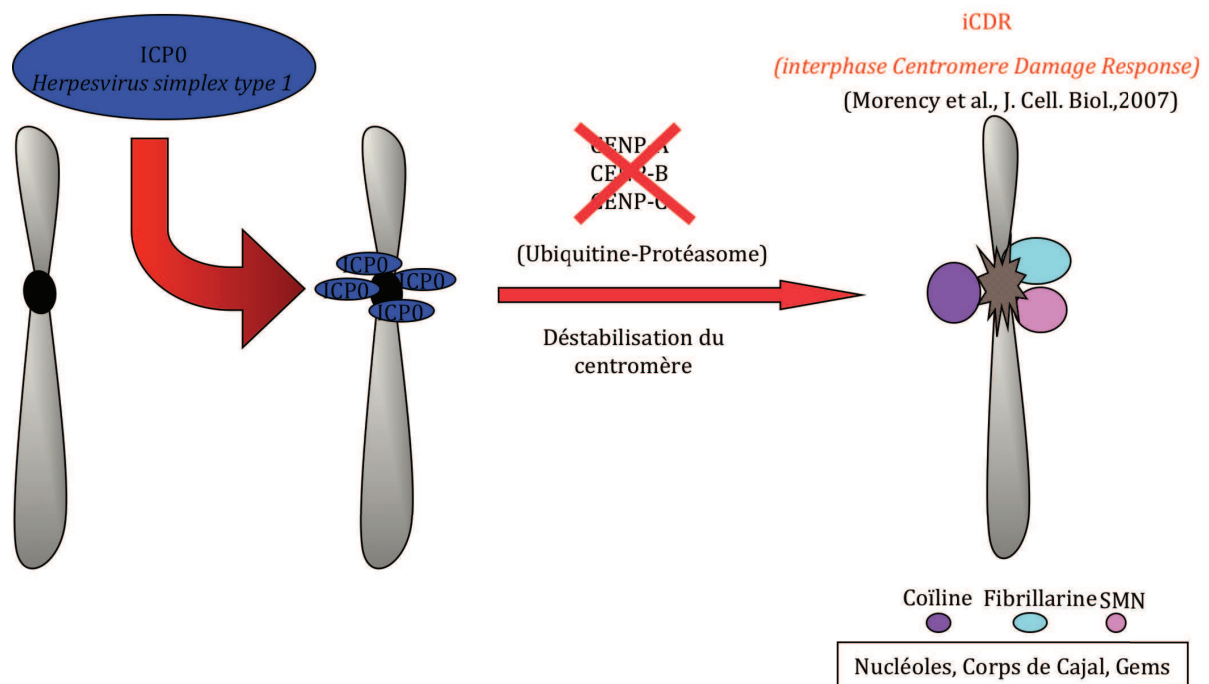


Figure 6 : Déstabilisation des centromères et réponse iCDR

Durant la phase aiguë de l'infection, la protéine ICP0 (En bleu) va s'accumuler puis désorganiser les centromères en provoquant la dégradation via le système ubiquitine protéasome de plusieurs protéines centromériques majeures dont font parties les protéines CENP-A, CENP-B et CENP-C, qui sont importantes dans la structuration même de la région centromérique. Cette déstabilisation va induire une réponse cellulaire nommée iCDR pour interphase Centromere Damage Response qui se traduit par la relocalisation de trois protéines nucléaires normalement localisées dans les nucléoles, les corps de Cajal et des organelles associées à ces corps de Cajal nommés Gems (Gemini of Cajal Bodies): Ces trois protéines sont la Coiline, la fibrillarine et SMN.

6.4 Association d'ICP0 avec des protéines cellulaires

Lorsque le virus rentre dans la cellule, il va être la cible de plusieurs mécanismes de défense antiviraux qu'il devra contrecarrer pour rester le plus longtemps possible chez l'hôte. ICP0 est un acteur principal dans cette contre défense virale, et la majorité des interactions que la protéine possède est liée à cette activité. Il est intéressant d'extrapoler par rapport à notre étude ces différents mécanismes dans un contexte de réactivation virale.

Tout d'abord ICP0 est capable d'interagir avec elle même, et d'induire son autoubiquitination mais également avec la protéine ICP4, autre protéine transactivatrice synthétisée en phase précoce de l'infection par HSV-1 et qui agit de manière synergique avec ICP0 (Yao et P A Schaffer 1994).

ICP0 se lie directement à plusieurs protéines cellulaires, sans pouvoir les dégrader, comme le facteur d'élongation de la traduction EF-1 γ (Y Kawaguchi, Bruni, et B Roizman 1997), le facteur de transcription BMAL-1 (Y Kawaguchi et al. 2001), et la protéine p60 (Bruni et al. 1999). Aussi, ICP0 affecte directement la biosynthèse protéique en se liant à EF-1, un facteur clé dans l'élongation des chaînes polypeptidiques. L'interaction d'ICP0 avec USP7 a été décrite auparavant. La fonction de la protéine p60 n'étant pas connue, les conséquences de son interaction avec ICP0 restent non élucidées (Bruni et al. 1999). ICP0 se lie au complexe IRF-3 et CBP/p300 et bloque l'accumulation de IRF-3 (Interferon Regulatory Factor-3) suggérant une possible dégradation de IRF-3 par ICP0 (Melroe et al. 2007). L'activation du facteur IRF-3, après une infection virale, est importante pour induire la transcription de IFN- β (interféron bêta). Donc la dégradation de IRF-3 empêche la cellule de déclencher la réponse innée liée à IFN- β . CBP et p300 sont les partenaires de IRF-3 et interviennent dans l'activation de la transcription. Une étude plus récente a montré qu'ICP0, selon sa localisation cellulaire, induisait le blocage de l'activation des gènes régulés par IRF-3, indépendamment de son activité E3-Ubiquitine ligase (Paladino, Collins, et Mossman 2010). Ceci va donc plus dans le sens d'une inactivation indirecte de la part d'ICP0 et non pas d'une dégradation directe de IRF-3 via l'activité E3-Ubiquitine ligase d'ICP0. Cela dit l'homologue d'ICP0 chez le bovin bICP0 est capable d'induire la dégradation de IRF-3 de manière protéasome dépendante. Ceci suppose quand même qu'un tel mécanisme puisse avoir lieu chez l'homme également (Saira, You Zhou, et Clinton Jones 2007).

Toujours concernant la réponse Interféron (IFN), qui est déclenchée par l'infection virale, il a été montré que certaines isoformes de la protéine SP100, qui sont impliquées en aval de la réponse IFN, inhibent la transcription de certains gènes IE, dont ICP0 et ICP4 (Negorev et al. 2006). Il apparaît donc logique qu'ICP0, en retour, induise la dégradation ces isoformes de la protéine SP100.

Une autre protéine activée par la voie interféron, la RNase L, est impliquée dans la dégradation des transcrits viraux, mais cette protéine n'est pas la cible d'ICP0, qui cela dit empêche la dégradation des transcrits via un mécanisme indépendant de cette réponse IFN (Sobol et Mossman 2006).

ICP0 est capable d'interagir avec la cycline D3 (Y Kawaguchi, Van Sant, et B Roizman 1997), de plus ICP0 colocalise avec les cyclines D1, D2 et D3 dans les corps PML en phase

précoce d'infection (Kalamvoki et Bernard Roizman 2009). Il a été montré que la cycline D3 était en fait stabilisée grâce à son interaction avec la protéine ICP0. Dans cette étude, le site d'interaction d'ICP0 avec D3 a été muté, ce qui rend la protéine D3 moins stable et parallèlement, certaines propriétés neuroinvasives du virus sont altérées, ce qui montre bien qu'il existe une interdépendance liée au contrôle du cycle cellulaire entre les deux protéines (Van Sant, Y Kawaguchi, et B Roizman 1999). Cela dit ces résultats sont controversés (Roger D Everett 2004).

L'initiation de la transcription des gènes alpha est dépendante de la déméthylation des histones virales par la protéine LSD-1 (Lysin Specific Demethylase 1) (Liang et al. 2009). LSD-1 fait partie d'un complexe protéique contenant, entre autres les histones déacetylases 1 et 2 (HDAC-1, HDAC2), HMG20B (High Mobility Group 20B), et CoREST (Corepressor of Repressor Element 1 Silencing Transcription). Ce complexe est recruté par REST sur l'ADN au niveau d'un élément de réponse RE 1. Le rôle primordial de ce complexe est de réprimer les gènes neuronaux dans les cellules non neuronales (Ballas et Mandel 2005). Il a été prouvé tout d'abord qu'ICP0 interagissait avec le complexe CoREST, (pour revue voir (Bernard Roizman 2011)), suite à cette interaction, ICP0 interagirait (Patrick Lomonte et al. 2004) puis déplacerait deux protéines HDAC-1 ou HDAC-2 (Gu et al. 2005) dans le but d'inhiber la répression génique engendrée par ces deux protéines (Poon, Liang, et Bernard Roizman 2003). Suite à ceci, une déméthylation (Liang et al. 2009) puis une acétylation ICP0 dépendante aurait lieu sur les histones virales grâce à la protéine histone acétyltransferase CLOCK (Kalamvoki et Bernard Roizman 2010). Bien que la gestion par ICP0 de ce complexe de modifications chromatiniennes semble être évidente, les interactions précises entre ICP0 et les différents membres du complexe CoREST/REST restent encore à définir.

Il faut noter enfin qu'ICP0 colocalise avec une enzyme de SUMOylation, SENP-1 (SUMO/sentrin specific peptidase-1) et que l'activité de cette SUMOylase dépend du domaine RING Finger d'ICP0 (Daniel Bailey et Peter O'Hare 2002).

7. VIRUS HSV-1 ET CHROMATINE

Dans ce chapitre je vais me focaliser sur la régulation de la chromatine et de ses modifications pendant les phases lytiques et latentes de l'infection par HSV-1. De plus en plus d'études font apparaître que le passage de l'une à l'autre des deux phases du cycle infectieux serait contrôlé par la chromatine elle-même et par ses modifications. L'état chromatinien agirait comme un interrupteur (ou Switch), capable de faire passer le génome viral d'un état transcriptionnel fermé à un état ouvert et inversement. Ce Switch est contrôlé par un certain nombre de protéines virales et cellulaires dont certaines seront décrites dans ce chapitre.

7.1 Etat chromatinien du génome de HSV-1 pendant la phase lytique de l'infection

Des études de digestion à la nucléase micrococcale réalisées voici plusieurs années ont permis de prouver que le génome viral pendant l'infection lytique restait majoritairement dépourvu d'histones ((Leinbach et Summers 1980);(Muggeridge et N W Fraser 1986); (Lentine et Bachenheimer 1990)). De plus les histones sont exclues des compartiments de réplication viraux dans les noyaux de cellules infectées ((Monier et al. 2000); (Simpson-Holley et al. 2004)) et les histones H1 ont une plus grande mobilité pendant l'infection lytique (Conn, Hendzel, et Schang 2008). La même équipe a prouvé que le génome viral de HSV-1 n'était pas dépourvu d'histones, mais était plutôt associé à des histones sous formes de complexes nucléosomiques instables, ne possédant pas les mêmes propriétés structurales que les nucléosomes cellulaires (Lacasse et Schang 2010). Des études de ChIP (immunoprécipitation de chromatine) ont montré que les histones étaient présentes en moindre quantité sur le génome viral par rapport à la quantité présente sur les gènes endogènes. En effet la quantité d'ADN (en fraction d'ADN input) présente sur les histones est plus faible dans le cas du génome viral par rapport à l'ADN immunoprécipité sur les histones présentes dans le génome cellulaire ((Herrera et Triezenberg 2004)) ; (J .Huang et al. J virol 2006)). Toutes ces données vont donc dans le sens que le génome viral, s'il n'est pas complètement dépourvu d'histones, possède une structure chromatinienne particulière,

agencée différemment de la chromatine cellulaire. Cet état chromatinien intermédiaire plus ouvert, serait un avantage pour le virus car la chromatine serait plus accessible aux différents facteurs de transcription dont le virus a besoin pour se répliquer correctement. De plus, des marques épigénétiques liées à une chromatine plus permissive (euchromatine) sont déposées au cours de l'infection lytique, ce qui conforte l'idée de la création d'une chromatine ouverte et permissive à la transcription. (Pour revue, voir (Kutluay et Triezenberg 2009)).

7.1.1 Rôles de VP16 et d'ICP0 dans la régulation de la structure de la chromatine des gènes lytiques pendant l'infection lytique :

VP16 : Herrera et Triezenberg (Herrera et Triezenberg 2004) ont fourni la première preuve directe qu'un produit de gène viral pouvait avoir un rôle actif en réduisant la quantité de chromatine sur les promoteurs de gènes lytiques. Des analyses de ChIP ont prouvé que la protéine transactivatrice du virion VP16, en plus de son activité de recrutement de facteurs de transcription au niveau de promoteurs de gène IE, recrutait également les protéines co-activatrices de modification de chromatine CBP (cAMP response élément Binding Protein (CREB)-Protein) et p300, mais également des composants des orthologues humains du complexe SWI/SNF chez la levure (BRG1 et BRM) au niveau des promoteurs viraux de gènes IE. Sans VP16, des plus grandes quantités d'histone H3 sont associées aux promoteurs des gènes d'IE et des niveaux plus bas d'histones acétylées sont associés aux promoteurs des gènes E. Par conséquent, la protéine VP16 réduit le niveau de chromatine totale associée aux gènes IE pendant l'infection lytique et favorise la formation d'euchromatine sur les histones associées aux gènes lytiques. Cela dit, la même équipe a montré que le recrutement des facteurs de transcription et de remodelage de la chromatine par VP16 n'était pas nécessaire pour une expression correcte des gènes IE en phase lytique (Kutluay et al. 2009). Ceci suggère un rôle plus complexe de VP16 dans la régulation de l'expression de ces gènes lytiques.

ICP0 : Récemment, Il a été montré qu'ICP0 induisait à la fois la disparition des histones et l'acétylation au niveau des gènes viraux en phase lytique (Cliffe et David M Knipe 2008). Cette étude est très importante car elle indique qu'ICP0 semble posséder une activité de déstabilisation de la chromatine, ce qui est également une des conclusions de ma thèse. Conformément aux observations concernant l'acétylation, il avait déjà été prouvé qu'ICP0

interagissait avec des enzymes HDAC (Patrick Lomonte et al. 2004), qui font partie du complexe CoREST/REST, qui contient également la protéine LSD-1, une déméthylase probablement recrutée au niveau des gènes viraux (Voir précédemment). L'homologue bovin d'ICP0, bICP0 interagit avec HDAC-1 mais également avec l'Histone Acetyl Transferase p300. Les rôles de bICP0 sur ces protéines sont opposés, déstabilisant la première et stabilisant la deuxième ((Y Zhang et C Jones 2001), (Yange Zhang et al. 2006)). Des inhibiteurs de HDACs complètent le phénotype de virus mutants pour ICP0, ce qui confirme le rôle répresseur d'ICP0 sur ces enzymes (Poon, Liang, et Bernard Roizman 2003)

7.1.2 *Variants d'histones et chromatine*

Un mécanisme supplémentaire pour changer l'état de chromatine est l'incorporation des variants d'histones. Les variants d'histones diffèrent des histones canoniques dans leur composition en acides aminés, leurs patterns d'expression et leurs fonctions dans le contexte de la chromatine. Un variant particulier d'histone, H3.3 est incorporé dans le génome de HSV-1 juste après l'infection (Placek et al. 2009).

H3.3 est un variant de l'histone H3 canonique, appelée le H3.1, et bien que la composition en acides aminés des deux variants de H3 soit fortement semblable (chez les mammifères ils diffèrent par seulement 4 acides aminés), leurs fonctions dans la biologie de chromatine sont tout à fait distinctes. H3.1 est exprimée pendant la phase de S du cycle cellulaire, pendant la synthèse d'ADN, et son incorporation dans le génome viral grâce au facteur d'assemblage CAF-1 (Chromatin Assembly Factor -1) est couplée à la réplication (pour revue voir (Placek et Shelley L Berger 2010) , voir figure 7). En revanche, H3.3 est exprimée pendant tout le cycle cellulaire et son incorporation est indépendante de la réplication de l'ADN. L'association de H3.3 avec HSV-1 se fait juste après l'infection, avant la réplication (Placek et al. 2009). La réduction de la protéine chaperonne de l'histone H3.3, HIRA (Histone Regulatory A) diminue l'incorporation du H3.3 dans le génome viral. Cette diminution de H3.3 mène à une réduction significative de transcription et de la réplication de HSV-1. Il est intéressant de voir qu'un variant d'histone puisse avoir un rôle dans la réplication et la transcription du génome viral, nous pouvons en effet imaginer qu'un autre variant de H3, la protéine CENP-A, puisse avoir un rôle dans le cycle et la vie du virus HSV-1 et que cette fonction en ferait une cible privilégiée pour ICP0.

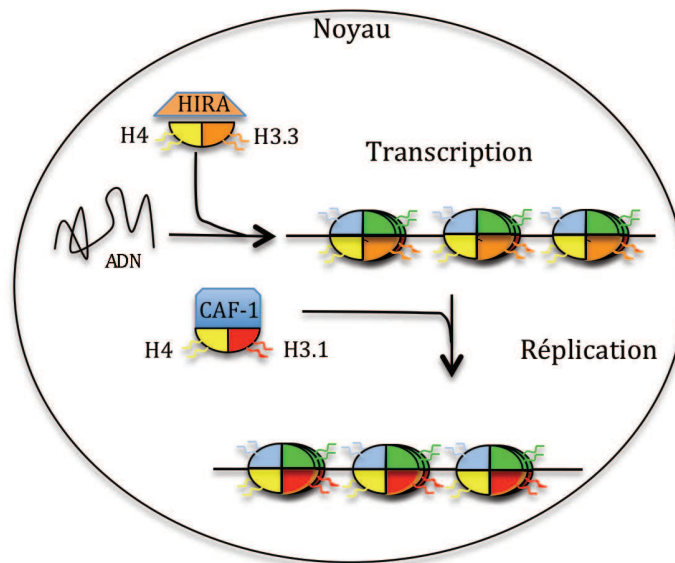


Figure 7: Association des différentes isoformes de H3 avec le génome de HSV-1 au cours du cycle viral (d'après (Placek et Shelley L Berger 2010))

Lors de son entrée dans le noyau, le génome viral est associé à des nucléosomes contenant majoritairement le variant H3.3, grâce au facteur d'assemblage de la chromatine HIRA. Ceci facilite la transcription du génome viral. La réplication du génome viral est associée avec le dépôt de l'histone canonique H3.1 dans le génome, grâce au facteur d'assemblage de la chromatine CAF-1

7.2 Etat chromatinien du génome de HSV-1 pendant la phase latente de l'infection

7.2.1 La régulation de la répression des gènes lytiques ne fait pas intervenir la méthylation de l'ADN

Alors qu'il a été montré que la méthylation des nucléotides CpG joue un rôle dans la régulation des promoteurs des gènes lytiques chez certains membres des familles beta et gammaherpesvirus, les analyses HpaII/MspI et les analyses de séquences au bisulfite des génomes latents de HSV n'ont pas permis de détecter d'ilots de méthylations CpG dans ces génomes (Dressler, Rock, et N W Fraser 1987). Cette différence apparente dans le rôle de la méthylation CpG comme mécanisme de contrôle transcriptionnel entre les alpha-herpesvirus et les beta et les gamma-herpesvirus peut refléter une nécessité de différents mécanismes de contrôles transcriptionnels dans les cellules où ces virus établissent leur latence. Les neurones dans le cas des alpha-herpesvirus, et les lymphocytes dans le cas de beta et de gamma-herpesvirus. Pendant la phase de latence, le transcrit LAT est le seul gène viral

encore exprimé, mais des données permettent de supposer que ce transcrit n'est par contre pas traduit (Drolet et al Virol 1998). Le génome viral est sous forme chromatinisée pendant la phase de latence et maintenu dans le génome de l'hôte sous forme d'épisome circulaire (Deshmane et N W Fraser 1989)). Les séquences promotrices du gène LAT sont associées à des quantités plus grandes d'acétylation sur les résidus lysines 9 et 14 de l'histone H3 (H3K9/K14ac) (Voir partie chromatine), comparativement aux niveaux présents sur le gène ICP0, inactif pendant la latence (Kubat et al. 2004). La même étude montre que le locus LAT joue un rôle important dans la mise en place de ces marques épigénétiques répressives sur les gènes lytiques. Toujours chez la souris et pendant l'établissement de la latence, les gènes viraux lytiques s'associent progressivement à de l'H3K9 diméthylée, indiquant la formation d'hétérochromatine sur le génome viral (Qing-Yin Wang et al. 2005). Cette étude montre également que le locus LAT joue un rôle dans la mise en place de cette modification.

Cela dit, une étude chez le lapin en latence, a fait apparaître des résultats contradictoires. En effet, lors d'infections avec des virus mutants dans le promoteur du locus LAT, les marques épigénétiques permissives situées au niveau des gènes lytiques sont moins importantes, par rapport à une infection avec un virus sauvage. De façon concomitante, la quantité de transcrits issus des régions lytiques est plus faible lorsque le promoteur LAT est muté (Giordani et al. 2008). Les deux études chez la souris et chez le lapin arrivent à des conclusions apparemment contradictoires, une explication (concernant la quantité de transcrits, en tout cas) à ceci pourrait venir du fait que chez le lapin, le niveau de transcription est régulé plus fortement et que le nombre de transcrits est de toute façon plus faible pour cette espèce (Giordani et al. 2008). Les mécanismes de mise en place et de maintenance de marques épigénétiques ne sont peut être pas les mêmes chez ces deux espèces.

7.2.2 *Éléments insulateurs et latence*

La prévention de la propagation de l'hétérochromatine sur la région LAT est supposée contrôlée en partie par CTCF mais également par des éléments barrières, présents en amont du promoteur LAT (Amelio, McAnany, et Bloom 2006). En effet, les profils transcriptionnel et chromatinien du virus latent soutiennent fortement l'existence de barrières génétiques pour maintenir des domaines distincts. Sans la présence d'un élément barrière dans le génome, il n'y aurait aucune manière d'empêcher la diffusion de l'hétérochromatine dans des

secteurs d'euchromatine. Récemment la protéine CTCF (CCCTC binding factor) connue pour lier des éléments insulateurs chez les vertébrés, s'est avérée reconnaître plusieurs régions du génome latent de HSV ((Amelio, McAnany, et Bloom 2006);(Qi Chen et al. 2007)). La protéine ubiquitaire CTCF est une protéine à 11 domaines RING Finger possédant une activité de régulation transcriptionnelle phosphorylation-dépendante. Bien qu'un seul domaine de liaison à l'ADN ait été montré comme suffisant pour son activité, ces motifs sont souvent présents sous forme de clusters ce qui permet une affinité de liaison à l'ADN plus grande (Chao et al. 2002). L'attachement de CTCF permet la formation et la régulation des éléments barrière grâce au recrutement par CTCF de protéines de modification de la chromatine. Quand CTCF est lié dans le génome de HSV-1, les éléments barrières en résultant peuvent agir en tant qu'entraves physiques pour bloquer la diffusion de l'hétérochromatine. Des analyses des domaines de fixation de CTCF ont permis de mettre en évidence deux grandes régions de fixation (domaines B1 et B2, voir figure 8). Ces régions encadrent les régions promotrices du LAT. Cinq autres régions, moins importantes, ont également été découvertes. Pendant la latence, les sept régions sont occupées par le facteur CTCF (Amelio, McAnany, et Bloom 2006). Ces régions, notamment la région B2, située dans l'intron 2kb du LAT, semblent contrôler l'expression du locus LAT et des gènes lytiques avoisinants. Un mécanisme de régulation supposé se ferait via la formation de boucles, caractéristiques de ces régions, et la formation de boucles sur seulement certaines régions isolatrices pourrait aboutir à l'expression différentielle de certains gènes (Gerasimova et al. 2007) (Voir figure 9). CTCF a été également montré comme jouant un rôle dans la régulation de la transcription en phase de latence dans d'autres herpesvirus, notamment EBV (Kang et Lieberman 2009). Parallèlement à cette étude, il a été montré que l'intron de 2 kb LAT contenait bien un élément insulateur de 800 bp et que cet élément se comportait comme une barrière afin de séparer la chromatine active associée avec le locus LAT de la région réprimée contenant le gène ICP0, au cours de la latence (Qi Chen et al. 2007). Il est très probable que cet élément soit en fait l'élément B2, décrit dans l'étude d'Amelio et al.

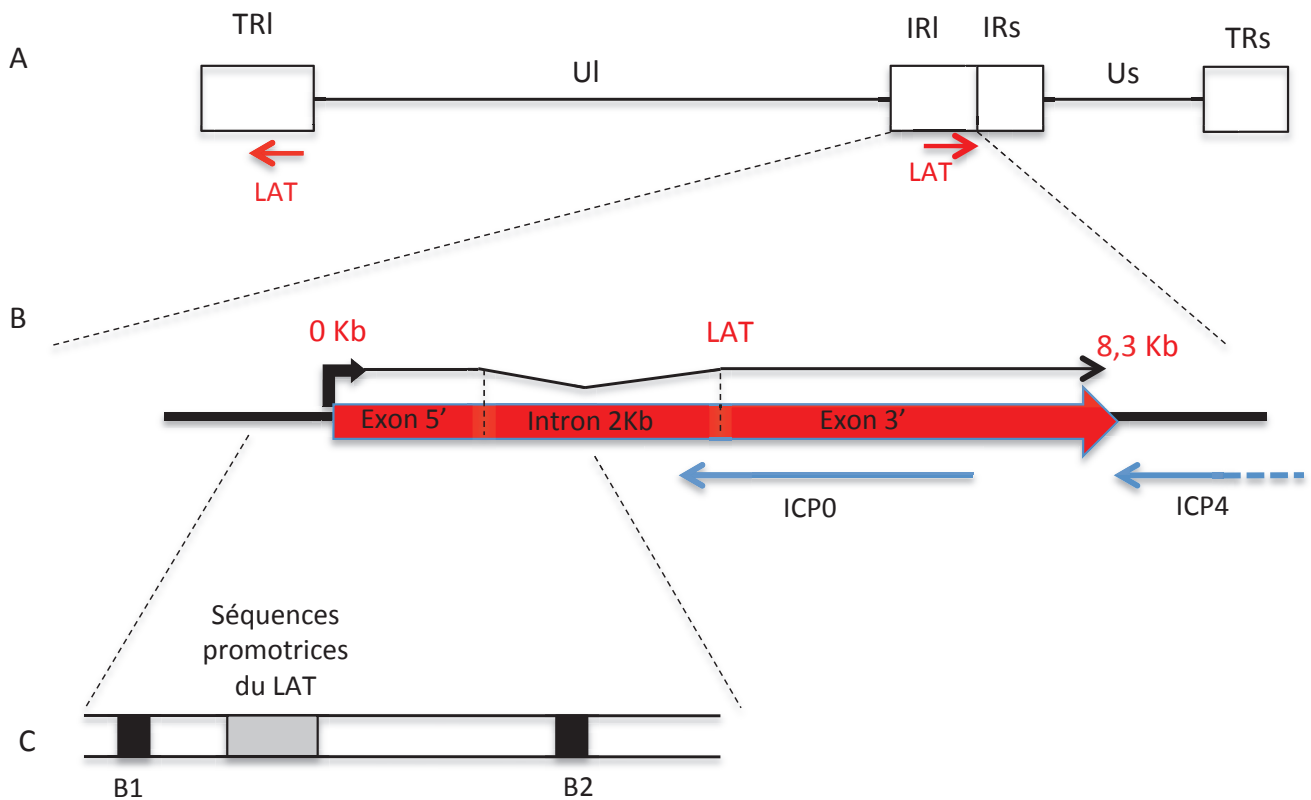


Figure 8: Représentation schématique des éléments insulateurs du locus LAT au sein du génome de HSV-1 (D'après (Bloom, Giordani, et Kwiatkowski 2010))

A) Illustration des différentes régions du génome de HSV-1: La région unique longue (UI), courte (Us), et deux couples de répétitions, les répétitions terminales (TRI et s) et intermédiaires (IRl et s). Le locus LAT est dupliqué dans le génome. Il est à la fois présent dans la répétition terminale longue (TRI) et dans la région intermédiaire longue (IRI). B) Agrandissement de la région codant le locus LAT: Le transcrite primaire de 8,3kb, comprenant les deux régions exoniques et l'intron de 2kb sont représentées, et également les transcrits d'ICP0 et d'ICP4. C) Agrandissement de la région promotrice du LAT (rectangle gris), encadrée par les deux éléments barrière B1 et B2 (boîtes noires).

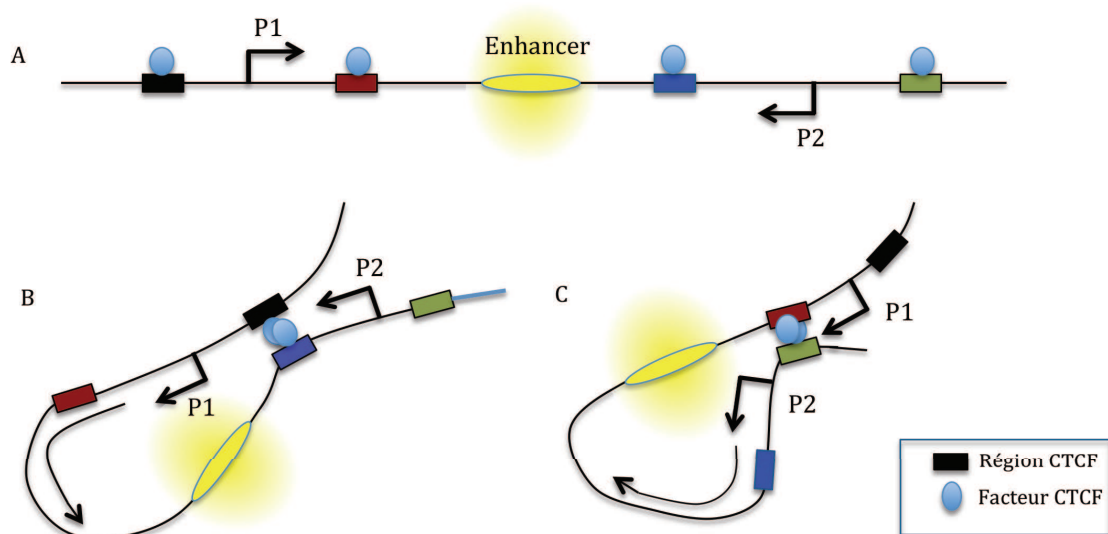


Figure 9: Régulation transcriptionnelle par la formation de boucles entre éléments isolateurs CTCF (D'après (Bloom, Giordani, et Kwiatkowski 2010))

A) Les éléments isolateurs CTCF, lorsqu'ils sont fixés par le facteur CTCF, peuvent agir en tant que bloqueurs d'élément « enhancer » dans le but de bloquer l'effet de cette région sur les gènes avoisinants (promoteurs P1 et P2). B) L'interaction entre les éléments isolateurs bleu et noir crée une boucle permettant l'activation transcriptionnelle du promoteur P1. C) L'interaction entre les éléments insulateurs marron et vert exclut le promoteur P1 de la région d'activation et permet l'activation transcriptionnelle du promoteur P2.

Pendant la latence, le génome viral est donc intégralement hétérochromatinisé, à l'exception du locus LAT. L'absence du LAT aboutit à une augmentation de l'expression des gènes lytiques pendant la latence (S H Chen et al. 1997) (D A Garber, P A Schaffer, et D M Knipe 1997)). Il est donc important de distinguer entre le cas où LAT induit la répression des gènes lytiques en induisant la formation d'hétérochromatine directement et le cas où cette formation est indirecte, par l'inhibition de l'expression des gènes lytiques d'abord, ce qui pourrait ensuite conduire à la formation d'hétérochromatine. Du fait que LAT s'accumule dans le noyau en de grandes quantités sans être localisé dans des foci distincts contenant du génome viral, il apparaît peu probable que LAT induise la formation d'hétérochromatine sur le génome viral. La récente découverte de miRNAs codés par LAT qui ciblent les gènes IE pourrait expliquer comment LAT induit la répression de l'expression des gènes lytiques et la formation d'hétérochromatine sur le génome viral ((Murphy et al. 2008) ; (Jennifer Lin Umbach et al. 2008), voir précédemment). Bien que LAT puisse participer à la régulation de la chromatinisation du génome latent, il est important de noter que tous les neurones infectés en latence n'expriment pas LAT (Leib et al. 1989). Donc le LAT ne peut pas être le seul

facteur régulateur de la chromatine virale pendant la latence. Une étude innovante de notre équipe consistant à détecter par FISH le génome viral (ce qui n'avait jamais été réussi jusqu'à présent) dans des neurones de souris a permis d'observer, premièrement, que le génome viral était associé de très près aux centromères, deuxièmement qu'il existait au moins deux profils de localisation différents selon la quantité de génomes présents dans les neurones, et troisièmement que l'expression du gène LAT dépendait de ces profils (Catez et al. Soumis pour publication). Cette étude permet de comprendre plus précisément l'influence du positionnement du génome viral au niveau des centromères (ce qui n'avait jamais été visualisé) sur l'expression du locus LAT pendant la latence.

7.2.3 *Chromatine et réactivation du virus en latence*

La réactivation des génomes viraux en latence dans des neurones *in vivo* et dans des cellules infectées et en phase de latence et de quiescence, qui est un modèle cellulaire non neuronal de la latence, se fait grâce à ICP0 ((Harris et al. 1989), (X X Zhu et al. 1990)(Halford et P A Schaffer 2001), (Roger D Everett, Parsy, et Anne Orr 2009) (Ferenczy et Neal A DeLuca 2011)). Etant donné que la chromatine virale en phase de latence est normalement chromatinisée (Deshmane et N W Fraser 1989), il est possible d'envisager qu'un des rôles d'ICP0 dans la réactivation du virus soit de déchromatiser partiellement le génome viral de manière à ce qu'il soit plus ouvert et transcriptible. En effet la présence d'ICP0 coïncide avec une modification globale de la structure chromatinienne du génome viral (perte de nucléosomes) dans des cellules en quiescence (Ferenczy et Neal A DeLuca 2011). De plus lorsqu'ICP0 est exprimée à des niveaux élevés dans ces cellules, il est observée une perte des marques hétérochromatiques (HP1 gamma, méthylation de K9 sur H3) couplée à une augmentation des marques euchromatiques (acétylation) sur les histones restantes. Toutes ces modifications coïncident également avec la réactivation transcriptionnelle des gènes viraux. Une autre étude avait précédemment montré que cette réactivation en phase de quiescence était dépendante des domaines RING Finger et NLS d'ICP0 (Roger D Everett, Parsy, et Anne Orr 2009). Conformément aux observations de Ferenczy et DeLuca, et celles de A. Cliffe et D.Knipe (Cliffe et David M Knipe 2008), j'ai moi-même observé une activité de déstabilisation de la chromatine liée à ICP0 (Gross et al. soumis pour publication) cette fois ci ciblée contre la chromatine cellulaire. Cette activité est décrite en détail dans la partie résultats.

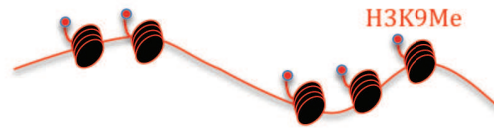
Chez EBV, une famille de protéines qui agit de manière similaire est la famille EBNA (Epstein Barr Nuclear Antigens). Le rôle de ces protéines semble également être la déchromatinisation de certains gènes pour permettre leur transcription (D Y Wu et al. 1996).

Pendant la réactivation du génome viral par explantation de ganglions infectés, la modification H3K9/K14ac disparaît du promoteur LAT, mais apparaît sur le promoteur nouvellement actif d'ICP0, parallèlement à la diminution du transcrit LAT (Amelio et al. 2006). Une observation concomitante avec ces résultats est que lorsque l'on inhibe l'activité des Histones Déacétylases (HDAC) par injection intrapéritonéale de Butyrate de Sodium, l'acétylation des histones est augmentée sur les gènes lytiques, dont ICP0, et une réactivation virale est observée dans des souris infectées (Neumann et al. 2007). Lors d'autres expériences récentes de réactivation au butyrate de sodium chez la souris, il a été prouvé que le locus LAT-ICP0 jouait un rôle dans la régulation de l'expression des gènes de l'hôte. Les gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine sont notamment surexprimés lors de la réactivation (Clement et al. 2011). Cette étude permet de conclure que le locus LAT joue à la fois un rôle dans la régulation des gènes viraux mais également dans celle des gènes cellulaires de l'hôte. Une surexpression de certains gènes cellulaires impliqués dans la défense immunitaire de l'hôte suite à une réactivation virale par choc thermique (HS) avait déjà été observée par la même équipe (Clement et al. 2009).

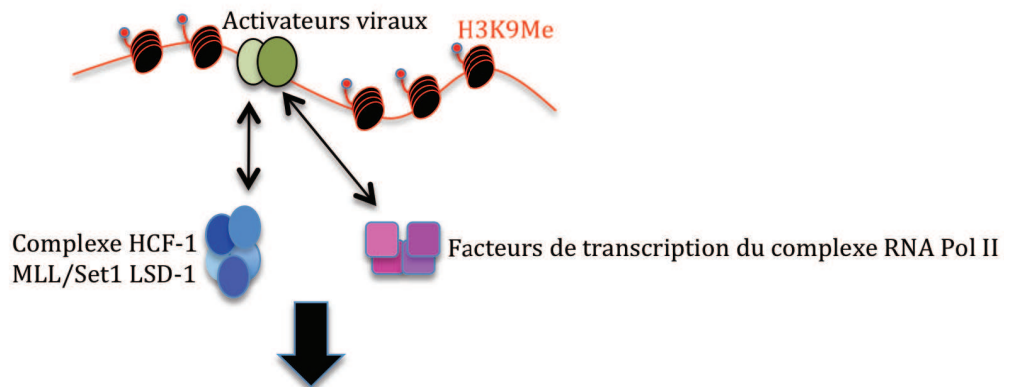
Bien qu'ICP0 soit une protéine très importante dans la réactivation du virus, la protéine VP16, possédant un rôle dans l'établissement du cycle lytique (Voir précédemment), semble également jouer un rôle dans la réactivation du virus *in vivo* (Richard L Thompson, Chris M Preston, et Nancy M Sawtell 2009). Conformément à ceci, la même équipe supposait auparavant qu'ICP0 n'était pas l'élément initiateur de la réactivation mais était cependant nécessaire à la production de particules virales pendant la réactivation (R L Thompson et N M Sawtell 2006). Cette découverte a permis d'envisager la protéine VP16 comme une éventuelle cible de traitements anti-herpétiques (Richard L Thompson et Nancy M Sawtell 2010). D'autres protéines qu'ICP0, par exemple VP16, sont donc nécessaires pour initier la réactivation du virus. VP16 est capable de recruter des facteurs cellulaires tels que la protéine HCF-1 (Host Cell Factor -1) (Simmen et al. 1997). HCF-1 est une protéine faisant partie de complexe de remodelage et de modification épigénétique de la chromatine (Wysocka et al. 2003). Lors de l'initiation de l'infection, HCF-1 recrute les protéines du complexe de modification de la chromatine pour poser des marques euchromatiniennes au

niveau des promoteurs des gènes IE et donc rendre ces gènes plus permissifs à la transcription (Narayanan, Ruyechan, et Kristie 2007) (Figure 10). Il a été prouvé par la suite que HCF-1 était transportée du cytoplasme vers le noyau au niveau des promoteurs des gènes IE lors de la réactivation virale (Whitlow et Kristie 2009) et il a été très logiquement supposé que l'ensemble des protéines du complexe dont HCF-1 fait partie soit également recruté au niveau des promoteurs des gènes IE, pendant la phase de réactivation (Kristie, Liang, et Vogel 2010). Effectivement, il a été montré qu'au moins la déméthylase LSD-1, protéine de ce complexe, faisait partie des protéines impliquées dans la réactivation et induisait la mise en place de marques euchromatiniennes (Liang et al. 2009) HCF-1 interviendrait également dans la réplication du génome viral via son interaction avec une chaperonne d'histone (Asf1b) dans les compartiments de réplication du génome viral. (Peng et al. 2010) Une autre protéine du complexe, MLL1/Set1 est une méthyltransférase ciblant H3 en K4 (Wysocka et al. 2003) et jouerait également un rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes IE en méthylant H3K4 , parallèlement à la déméthylation de H3K9 par LSD-1 ((Kristie, Liang, et Vogel 2010), voir figure 10). Le complexe HCF-1 joue donc un rôle crucial non seulement dans le démarrage de l'infection lytique, mais également dans la réactivation du virus de la phase de latence.

Répression du génome viral



Fixation des activateurs viraux



Activation de la transcription

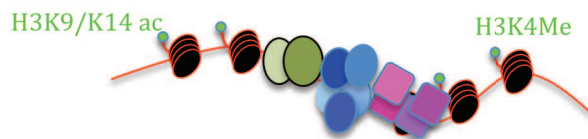


Figure 10: Modèle de régulation transcriptionnelle des gènes IE du virus HSV-1 par le complexe HCF-1 (D'après (Kristie, Liang, et Vogel 2010))

Au début de l'infection, le génome viral est associé à de la chromatine comportant des marques répressives (H3K9me en rouge). Par la suite, les activateurs viraux, tels que VP16, se fixent sur les régions promotrices des gènes IE et recrutent des facteurs de transcription du complexe RNA pol II sur les promoteurs IE. L'activation transcriptionnelle requiert également le recrutement du complexe HCF-1 pour supprimer les marques épigénétiques répressives et établir des marques épigénétiques plus ouvertes (H3K4/K14ac et H3K4me en vert) et ce, de manière parallèle. Il est supposé dans ce modèle que la méthylation et l'acétylation se font de manière coordonnée bien que le complexe acétyltransférase impliqué n'ait pas encore été mis en évidence. Ce modèle concerne aussi bien l'établissement du cycle lytique que la réactivation virale en latence.

7.3 Rôle des protéines de la famille Polycomb dans la régulation de l'expression des gènes viraux

La présence de H3 K27 triMe sur le génome latent (Kwiatkowski, Hilary W Thompson, et Bloom 2009) (Figure 11) suggère la participation des protéines de la famille polycomb, une classe de protéines impliquées dans le dépôt et l'entretien des marques répressives d'histones (Yuri B Schwartz et Pirrotta 2008). H3 K27 triMe est ce que l'on appelle une marque d'hétérochromatine (HC) facultative, c'est à dire une hétérochromatine plus « modelable » transcriptionnellement parlant, qui peut passer d'un statut euchromatique à celui d'hétérochromatine et inversement, plus facilement que l'hétérochromatine dit constitutive, plus rigide et en général transcriptionnellement inactive (pour revue voir (Trojer et Reinberg 2007)). Une autre marque de cette HC facultative est la présence du variant d'histone MacroH2A (Doyen et al. 2006). L'étude de Kwiatkowski et al. montrait que le dépôt et le maintien de ces marques d'hétérochromatine facultative étaient liés à la présence de la protéine Bmi1, un membre du complexe de maintenance PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Cette étude de ChIP du génome latent de virus 17Syn + montrait un enrichissement de Bmi1 au niveau des gènes viraux pendant la latence, particulièrement au niveau des séquences régulatrices du LAT (Kwiatkowski, Hilary W Thompson, et Bloom 2009). Toujours dans cette étude, il est suggéré que la présence du LAT régulerait négativement la présence des marques d'HC facultative sur le génome viral latent. En parallèle à cette étude, un autre groupe essayait de mettre en évidence le lien entre le locus LAT et la présence de marques d'HC facultative, et arrivèrent à la conclusion inverse, à savoir que le locus LAT régulait positivement la présence de marques d'HC facultatives (Cliffe, David A Garber, et David M Knipe 2009). Une explication possible à ces résultats contradictoires est le fait que les souches de virus souris, ainsi que les modes d'infections utilisés n'étaient pas les mêmes dans les deux études, ce qui rend toute comparaison difficile. De plus l'étude de Kwiatkowski et al. comparait des souches mutantes et parentales de plusieurs expériences différentes, alors que Cliffe et al. comparaient des souches mutantes avec des souches complémentées, au sein d'un même expérience.

La seule conclusion valable, si on tient compte de ces deux études, est que le locus LAT régule la formation d'un état chromatinien particulier, favorable à la réactivation du virus.

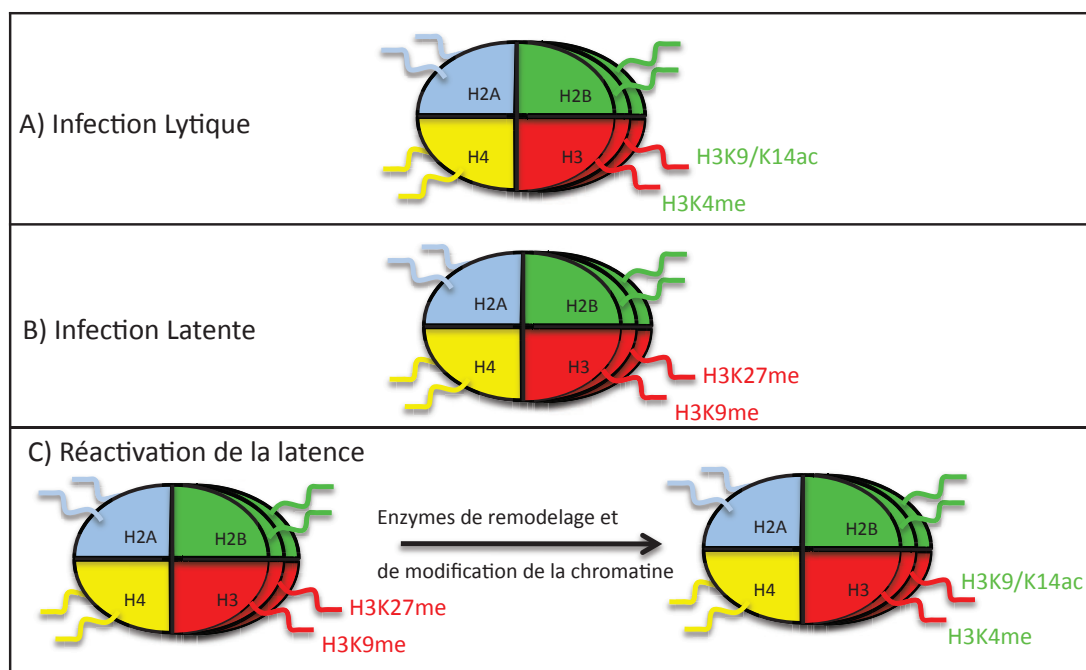


Figure 11: Modifications d'histones sur les gènes lytiques pendant le cycle infectieux du virus HSV-1 (D'après (Placek et Shelley L Berger 2010))

A) Pendant l'infection lytique, les nucléosomes contiennent des modifications chromatinienne caractéristiques d'une chromatine ouverte et permissive transcriptionnellement (en vert): L'acétylation de H3 et la méthylation de H3 en K4. B) Pendant la latence, ces modifications changent en modifications caractéristiques de l'hétérochromatine transcriptionnellement inactive (en rouge): La méthylation de H3 en K9 et K27. C) Modèle de changement des marques épigénétiques pendant la réactivation du virus : Pour passer d'une hétérochromatine fermée à une euchromatine ouverte permettant la réexpression des gènes lytiques, le virus utilise un certain nombre d'enzymes cellulaires de modification et de remodelage de la chromatine, par exemple E2H2, protéine du complexe polycomb, facilitant le passage de la latence à un nouveau cycle lytique productif.

On ne connaît pas encore quel facteur contribue au recrutement de ces protéines polycomb pendant l'établissement de l'infection ni si ce facteur est une protéine virale ou un site de recrutement ARN ou ADN dépendant. L'idée que les protéines du groupe polycomb jouent un rôle dans l'établissement et l'entretien du génome latent est un modèle de latence attrayant puisqu'elle explique comment le génome peut être réprimé d'un part puis réactivé grâce à l'état de sa chromatine. Dès l'entrée du virus dans le noyau, le virus peut s'associer au complexe protéique PRC2, contenant EZH2, seule protéine capable de catalyser la triméthylation de H3K27 (Kirmizis et al. 2004) tout en enlevant simultanément les marques transcriptionnelles permissives. Pour préserver ces marques répressives sur les histones, PRC1 remplace les protéines PRC2 pour s'associer à cette région et pour maintenir la répression établie par PRC2. Ce remplacement de PRC2 par le complexe PRC1 sur le génome a été prouvé grâce à la présence de Bmi1 sur le génome viral pendant la latence

(Kwiatkowski, Hilary W Thompson, et Bloom 2009). Ainsi, une fois que la latence a été établie et le génome viral a été réprimé, seules les protéines du complexe PRC1 restent associées au virus. Un stimulus peut ensuite induire la réactivation du génome viral en déplaçant les complexes PRC1 en permettant ainsi la déméthylation de H3 K27 et donc une réactivation transcriptionnelle (Figure 12).

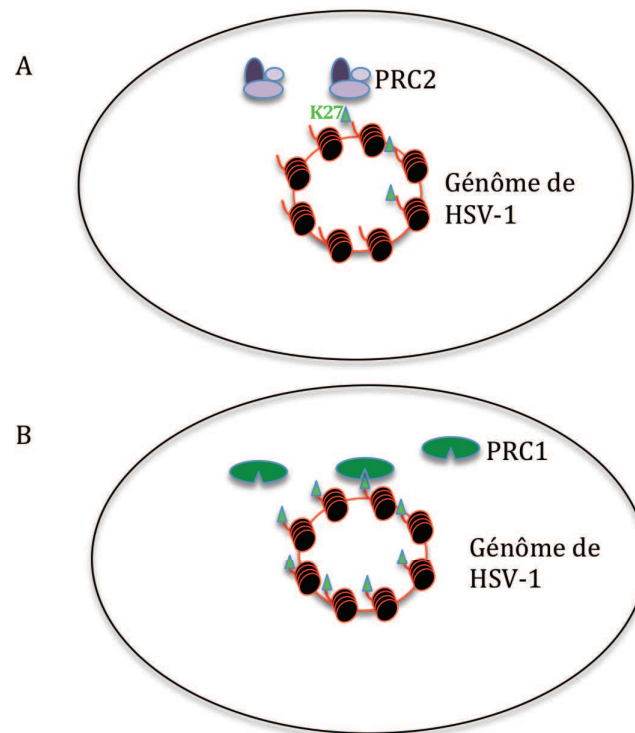


Figure 12: Modèle de la répression du génome viral via le complexe polycomb (D'après (Bloom, Giordani, et Kwiatkowski 2010))

A) Les complexes PRC-2 sont recrutés au niveau du génome viral puis induisent la triméthylation de H3 en K27.

B) PRC1 remplace PRC2 pour maintenir les marques répressives des histones et garder le génome viral transcriptionnellement inactif.

CHAPITRE 2 : LA CHROMATINE

Mon travail de thèse n'a pas la prétention d'être le travail d'un chromatiniste, cependant, un des objectifs de ma thèse est de comprendre l'action de la protéine ICP0 sur la chromatine centromérique. Je vais donc dans ce chapitre aborder de façon non exhaustive certains aspects généraux de la chromatine, qui permettront de donner des clés de compréhension concernant la structure et fonction des centromères que j'aborderai dans le chapitre suivant.

1. GENERALITES

En 1944, Avery, MacLeod et MacCarthy ont mis en évidence le fait que l'ADN est bien le support de l'information héréditaire, en se basant sur l'expérience réalisée par Griffith quelques années plus tôt. (Avery, Macleod, et M McCarty 1944).

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN présent dans le noyau est associé à des protéines structurales, pour former une structure nucléoprotéique appelée chromatine. La plus petite unité répétitive de la chromatine est ce que l'on nomme la particule du cœur du nucléosome. Celle-ci est constituée de 147 pb d'ADN et d'un octamère d'histones comprenant deux copies de chacune des histones de cœur (H2A, H2B, H3 et H4) (Figure 13).

1.1 Les histones

1.1.1 *Les histones de cœur*

Ces histones sont des petites protéines basiques, très riches en résidus lysine et arginine. En effet, les interactions entre l'ADN et les histones sont de type hydrogène, environ la moitié de ces interactions se font entre des lysines et des arginines chargées positivement et le squelette sucre/phosphate de l'ADN chargé négativement (K Luger et al. 1997), (Timothy J Richmond et Davey 2003)). Il n'existe aucun contact entre les bases azotées et les histones, ce qui explique l'absence générale de spécificité de séquence des histones sur l'ADN.

Chacune de ces histones possède une séquence très conservée car les histones sont parmi les protéines les plus conservées évolutivement. Chaque histone est organisée en trois domaines: un domaine central globulaire appelé histone-fold et deux extrémités C- et N-terminales. L'histone fold, composé de trois hélices reliées entre elles par des boucles flexibles constitue un motif de dimérisation, permettant aux histones d'interagir entre elles (H2A-H2B et H3-H4), via des interactions de nature hydrophobe. Ces interactions entre H2A et H2B ainsi qu'entre H3 et H4 sont de type communément désigné comme "poignée de mains" ("handshake") (Arents et al. 1991). De part et d'autre de l'histone fold, chaque histone possède des extrémités N-terminales et C-terminales dont la structure n'est pas connue, et qui se localisent à l'extérieur du nucléosome. Les parties amino-terminales des histones ne participent pas significativement à la structure du nucléosome. En revanche, les queues N terminales se dégagent de la structure compacte formée par les domaines globulaires, ce qui leur confère une grande accessibilité. Ces extrémités sont le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles (Munshi et al. 2009). Ces modifications post-traductionnelles jouent un rôle dans la structure de la chromatine, ou peuvent servir de motifs de reconnaissance à la liaison de facteurs régulateurs de la structuration ou de la transcription de la chromatine et des gènes associés.

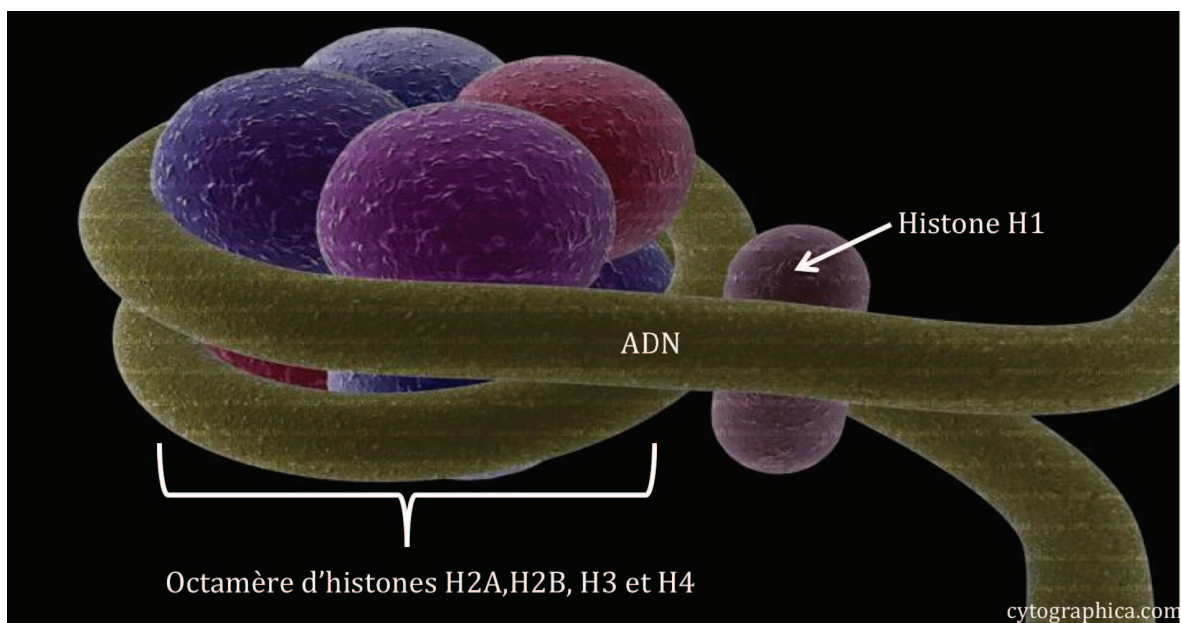


Figure 13: Représentation schématique d'un nucléosome (Joseph Roland 2003 www.cytographica.com)
 Les 4 histones de coeur entourées par le brin d'ADN de 147pb sont représentées ainsi que l'histone de liaison H1 qui augmente le degré de compaction de la chromatine en serrant d'un cran supplémentaire le nucléosome.

1.1.2 Les histones de liaison

La cinquième histone est l'histone de liaison H1. Elle est structurellement différente des histones de cœur. H1 possède une structure tripartite, constituée d'un domaine globulaire central flanqué des extrémités N- et C-terminales mobiles et fortement chargées positivement.

Contrairement aux histones de cœur, l'invalidation de l'histone de liaison n'est pas létale (S Khochbin 2001), mais induit une altération globale de la structure de la chromatine, suggérant un mécanisme de régulation complexe entre histones de liaison et structure chromatinienne ((S Khochbin 2001), (Fan et al. 2005), (Philip J J Robinson et Rhodes 2006)). Le fait que la présence de l'histone H1 sur les centromères n'ait jamais été démontrée à ce jour expliquerait en partie pourquoi la chromatine dans cette région possède une organisation particulière (Sekulic et al. 2010).

1.2 Structuration de la chromatine

Un noyau d'une cellule humaine contient environ 3 milliards de paires de bases d'ADN pour une taille d'environ 10 μ m de diamètre. Il y a donc une nécessité d'organiser la chromatine en plusieurs niveaux structurels. L'ADN inclus dans la particule de cœur est appelé ADN nucléosomal. L'ADN de liaison est l'ADN qui lie les particules de cœur les unes aux autres. Celui-ci est de longueur variable selon le type cellulaire et l'espèce considérée (de 15 à 80 pb). Les particules de cœur se répètent tout les 200 +/- 40 pb dans les différents génomes eucaryotes. La particule de cœur du nucléosome associée à l'histone H1 forme le chromatosome. Ce dernier, flanqué de l'ADN de liaison, forme ce qu'on appelle le nucléosome. Celui-ci permet de compacter l'ADN d'un facteur 5 par rapport à l'ADN nu de départ. L'histone H1 influence donc le degré de compaction de la chromatine (Thoma, Koller, et A Klug 1979) et leur absence induit sa décondensation (J O Thomas et Butler 1980).

La répétition de nucléosomes, espacés régulièrement ou non, conduit à la formation d'un chapelet de nucléosomes appelé communément fibre de 11nm. Cette fibre peut, à son tour, être compactée pour former des niveaux d'organisation supérieurs. Entre la structure finale de la chromatine dans le chromosome mitotique et le chapelet nucléosomal, il a été postulé

un certain nombre de niveaux intermédiaires d'organisation. Le premier niveau est nommé fibre de chromatine de 30 nm ou solénoïde (Figure 14). Dans ces structures très denses, l'ADN est compacté d'un facteur presque 40 par rapport à la situation de la double hélice nue.

Ces structures se forment en conditions physiologiques, on peut donc supposer que ces fibres reflètent l'organisation chromatinienne *in vivo*, mais ceci, de même que l'existence de cette structure *in vivo*, reste encore aujourd'hui une question ouverte.

Les mécanismes de repliement en structures d'ordre supérieur, ainsi que leur régulation, sont encore à l'étude. De manière générale, les modèles proposés suggèrent que la fibre de 30 nm de diamètre forme des boucles d'environ 300 nm elles mêmes se structurant à un niveau supérieur. Pour résumer on peut dire que la chromatine est une structure multi-échelle dont le premier niveau de compaction est le nucléosome.

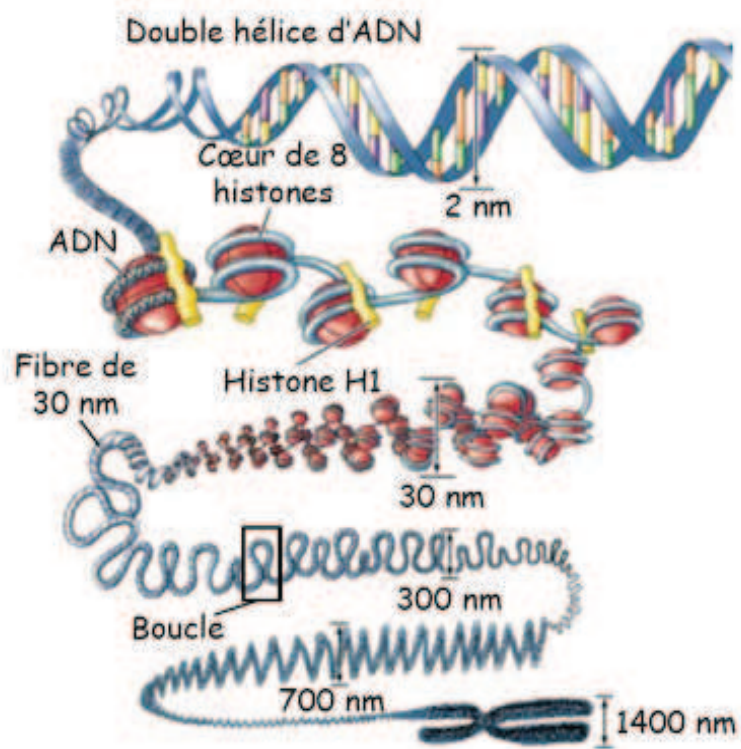


Figure 14. Les différents degrés d'organisation de la chromatine (Hansen 2002)

Schématisation des différents niveaux d'organisation de la chromatine. Le niveau d'organisation de base est le nucléosome. Le diamètre de la fibre chromatinienne est indiqué pour chaque étape. Cette fibre se structure elle-même à différents niveaux, le niveau le moins condensé qui est l'ADN libre, en haut, à la forme la plus condensée qui est le chromosome en métaphase de la mitose, en bas. Pour des raisons de simplification, les queues N-terminales des histones ne sont pas représentées ici.

L'épigénétique :

Epigénétique est un terme introduit en 1942 afin de nommer la branche de la biologie qui étudie les relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, conduisant à l'apparition des phénotypes. Littéralement, le terme épigénétique, par l'utilisation du préfixe « épi », sous-entend que la génétique n'explique pas tout et qu'il est donc nécessaire de chercher des explications au-delà, en addition du code génétique.

1.3 Les modifications post-traductionnelles des histones

Les extrémités N-terminales et, dans une moindre mesure, C-terminales sont les cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ces modifications sont ciblées sur des résidus précis pour chaque histone et sont catalysées, généralement de manière réversible, par des enzymes spécifiques (Figure 15). Au cours de la dernière décennie, il est devenu de plus en plus clair que les modifications post-traductionnelles des histones, seules ou interagissant entre elles, jouent un rôle central dans la régulation d'expression des gènes en modulant, directement ou à l'aide de protéines associées, le taux de compaction de la chromatine (Ng et al. 2009). Ainsi, les modifications les plus étudiées à ce jour se trouvent sur la queue N-terminale des histones telles que, citées dans l'ordre de découverte, l'acétylation (résidus lysines) ((P D Gregory, Wagner, et Hörz 2001), (S Y Roth, Denu, et C D Allis 2001)), la phosphorylation (sérines et thréonines) (pour revue (Cerutti et Casas-Mollano 2009)), la méthylation (lysines et arginines) (Bannister, Schneider, et Kouzarides 2002), mais également l'ubiquitination (Chandrasekharan, Fu Huang, et Sun 2010). Cependant, d'autres modifications ont également été décrites comme l'ADP-ribosylation, la sumoylation, la glycosylation ou la biotinylation.

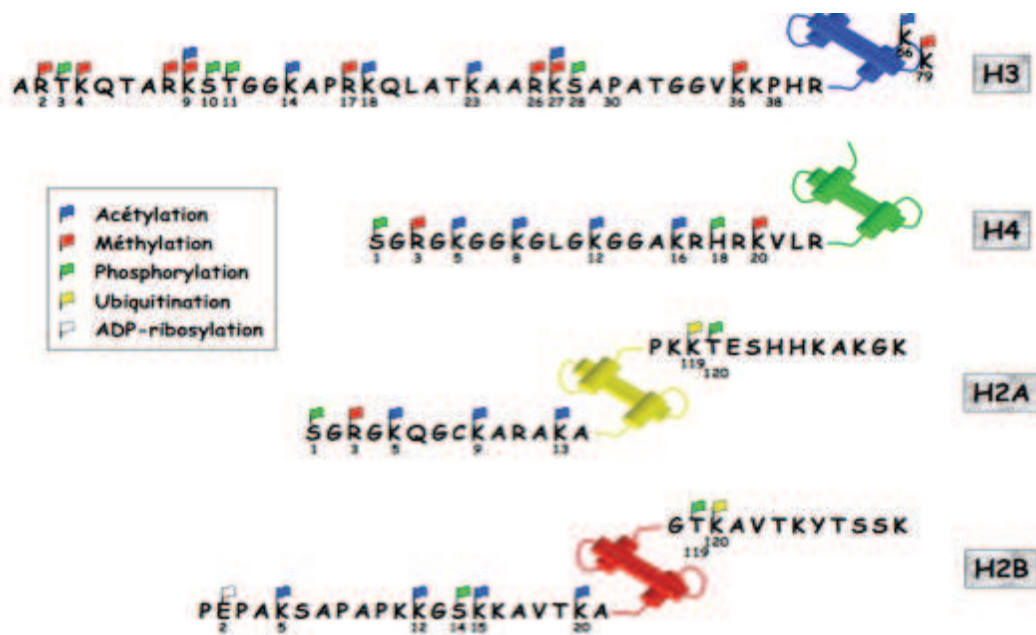


Figure 15. Principales modifications post-traductionnelles des histones (Margueron, Trojer, et Reinberg 2005)

État des lieux des principales modifications post-traductionnelles des histones du cœur nucléosomique chez les mammifères. L'extrémité N-terminale de chaque histone a été détaillée de même que l'extrémité C-terminale des histones H2A et H2B, tandis que le domaine du cœur de l'histone est représenté par le motif HFD. Sont répertoriées les modifications de type acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination et ADP-ribosylation ayant été identifiées *in vivo*. À chacune de ces modifications a été attribué un drapeau de couleur spécifique comme indiqué dans la légende. L'emplacement des acides aminés modifiés par rapport au premier résidu N-terminal est annoté en-dessous de chacun d'eux.

1.3.1 L'acétylation

L'acétylation des histones consiste en un transfert d'un groupement acétyl (CH₃-CO-) à partir d'une molécule d'acétyl-coenzyme A vers le groupement ε-aminé d'un résidu lysine (K), situé dans la queue N-terminale de l'histone (Figure 16). Elle est catalysée par la classe d'enzymes des histone-acétyltransférases (HATs) (Marmorstein et S Y Roth 2001). Les enzymes qui désacétylent les lysines des histones sont appelées les histones désacétylases (HDACs). L'état d'acétylation des histones résulte d'un équilibre entre ces deux types d'enzymes à activités opposées. Chez la plupart des espèces, les principaux sites d'acétylation sont les lysines 9, 14, 18 et 23 de l'histone H3 et les lysines 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4 (B D Strahl et C D Allis 2000). La corrélation entre statut d'acétylation des histones et activité transcriptionnelle, établie depuis bientôt 50 ans, a constitué le premier indice d'une relation directe entre les modifications de la chromatine et les processus liés à l'ADN (ALLFREY, FAULKNER, et MIRSKY 1964). Bien que L'acétylation des histones soit presque invariablement associée à l'activation de la transcription, plusieurs études ont montré que ce lien n'est pas exclusif (Mulholland et al. 2003). En effet, chez la drosophile et

la levure, l'hétérochromatine est acétylée sur la lysine 12 de l'histone H4, ce qui suggère un éventuel rôle de cette modification dans l'extinction génique (M Grunstein 1997). Toutefois, on considère toujours que les HDACs permettent souvent de passer d'une chromatine permissive pour la transcription à une chromatine réprimée (Verdone, Caserta, et Di Mauro 2005).

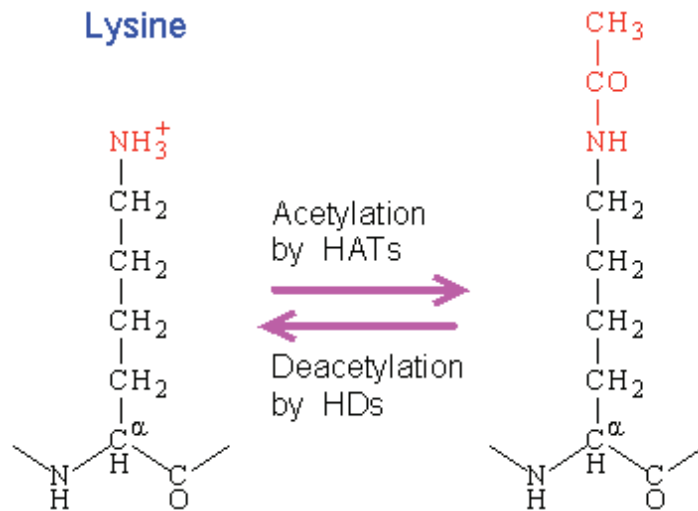


Figure 16. Acétylation et désacétylation d'un résidu Lysine (www.web-books.com)

Les enzymes Histones Acetyl Transférase (HAT) permettent la fixation d'un groupement acétyl (CH₃-CO-) sur la queue N terminale du résidu lysine. Cette modification enzymatique est réversible grâce à l'activité des enzymes histones désacétylases. (HDs)

L'ajout d'un groupe acétyl aux résidus lysines des régions N-terminales des histones, neutralise leurs charges positives et réduit ainsi leur affinité pour l'ADN chargé négativement. Ceci conduit à une chromatine plus flexible (Woodcock 2006) où l'ADN est plus accessible aux facteurs de transcription. Par exemple, le résidu acétylé peut être reconnu spécifiquement par des protéines contenant un bromodomaine, un domaine présent sur plusieurs protéines activatrices de la transcription (Nightingale, O'Neill, et Turner 2006), (Figure 17). Il est généralement admis qu'une chromatine acétylée correspond à un état transcriptionnel actif (Vicki E MacDonald et LeAnn J Howe 2009). La déstabilisation de l'interaction histones/ADN des nucléosomes, et le fait que de nombreuses HATs soient également des coactivateurs transcriptionnels corroborent cette hypothèse. Les nombreux complexes dans lesquels des HATs forment des sous-unités ont également le plus souvent une action activatrice sur la transcription. De manière fort intéressante, bien que les complexes HAT aient de grandes redondances dans leur activité d'acétylation des histones, leurs fonctions diffèrent.

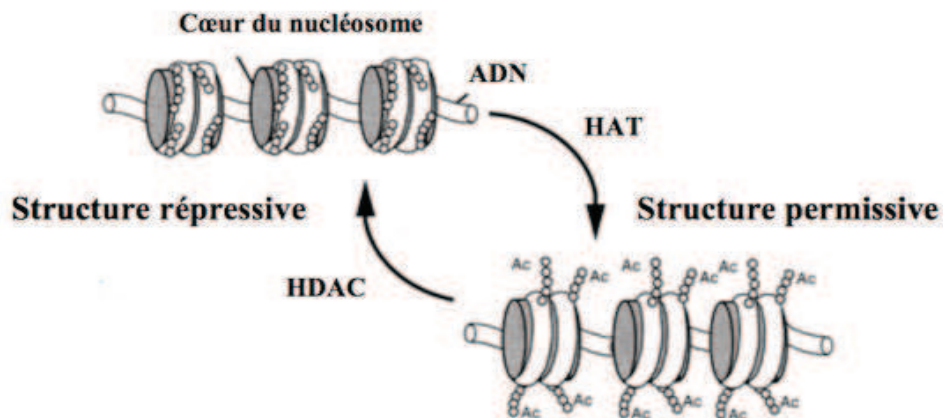


Figure 17. Modèle de régulation de la structure nucléosomique par acétylation réversible des histones (Yoshida et al. 2001)

1.3.2 La phosphorylation

La phosphorylation, catalysée par les histones-kinases, consiste en une réaction de transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP vers un résidu sérine (S) ou thréonine (T). Les résidus Tyrosine (Y) et histidine (H) peuvent également être phosphorylés. La phosphorylation est enlevée par des phosphatases.

L'histone H3 représente le principal substrat de phosphorylation. Presque la moitié des sites connus de phosphorylation des histones se trouve sur H3 et apparait essentiellement au stade mitotique du cycle cellulaire (Houben et al. 2007). Quand elle est phosphorylée, la sérine 10 (S10) de la queue N-terminale de l'histone H3 peut évoquer des effets complètement opposés: cette modification se produit durant la condensation des chromosomes mais aussi lors de l'activation transcriptionnelle. Chez les mammifères, on répertorie en effet quatre résidus pouvant être phosphorylés sur cette histone, T3, S10, T11 et S28, et six sites sur les autres histones du cœur : H2AS1, H2AT120, H2BS14, H2BT119, H4S1 et H4H18. De son côté, l'histone H1 et ses variants peuvent aussi subir diverses réactions de phosphorylation sur différents sites propres à chaque isoforme de H1 (Rundquist et Lindner 2006). Enfin, certains variants d'histones tels que CENP-A ou H2A.X peuvent également être la cible de kinases. La phosphorylation des histones est une modification qui semble corrélée à un plus grand nombre de processus cellulaires comme la condensation et la ségrégation des chromosomes, l'activation de la transcription, la répression des gènes, l'apoptose et la

réparation de l'ADN (Houben et al. 2007). Elle joue en particulier un rôle lors de la mitose, la progression du cycle cellulaire et la régulation de l'expression des gènes (Garcia, Shabanowitz, et Hunt 2005). De manière analogue à la méthylation, elle est impliquée aussi bien dans des processus impliquant une condensation qu'à d'autres liés à une décondensation de la chromatine, ceci dépendant de la position du résidu affecté, mais également du contexte cellulaire. La phosphorylation de H3S10 est la mieux décrite jusqu'à présent. Son intérêt réside dans le fait qu'elle semble avoir deux rôles opposés en fonction de la phase du cycle cellulaire durant laquelle elle a lieu (Prigent et Stefan Dimitrov 2003). Elle est associée à la condensation et à la ségrégation des chromosomes durant la mitose et la méiose. Cette phosphorylation est médiée par les membres de la famille Aurora kinase tels que Aurora B chez les mammifères et la drosophile et Ipl1 kinase chez la levure et les nématodes (Clayton et Mahadevan 2003). En revanche, en interphase, H3S10 joue aussi un rôle important dans l'activation transcriptionnelle chez les eucaryotes. C'est le cas quand la phosphorylation de S10 est induite par des stimuli, tels que des facteurs de croissance ou des inhibiteurs de la synthèse protéique, dont résulte l'activation des cascades de MAP kinases. De plus, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 agirait d'une façon coordonnée avec l'acétylation des lysines 9 et 14 situées sur la même queue N-terminale (Clayton et Mahadevan 2003). Cette interprétation est corrélée avec l'observation biologique concluant que la phosphorylation de S10 favorise l'acétylation de K14 et que ces deux modifications agissent en synergie pour activer la transcription (Khorasanizadeh, 2004).

La kinase ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) induit la phosphorylation de la sérine 139 du variant H2A.X, afin de permettre la réparation de l'ADN ayant subi des cassures doubles brins. Cette modification est requise pour l'accumulation et la rétention des protéines de réparation au niveau du site cassé (Loizou et al. 2006).

1.3.3 La méthylation

La méthylation des histones est une modification plus stable que l'acétylation, qui ne modifie pas la charge globale de l'histone. Contrairement à l'acétylation qui est en général corrélée avec une activation de la transcription, la méthylation des lysines peut être associée soit à une activation soit à une répression transcriptionnelle selon la position du résidu qui se trouve méthylé (Martin et Yi Zhang 2005). La méthylation des histones consiste en une réaction de transfert d'un groupement méthyl à partir d'une molécule donneuse, le S-

adénosine-méthionine (SAM), vers un résidu lysine ou arginine ((Bannister, Schneider, et Kouzarides 2002);(Martin et Yi Zhang 2005)). Ces réactions sont catalysées par des histones méthyltransférases (HMTs) (Figure 18). En ce qui concerne les histones du cœur, H2A, H3 et H4 sont connues comme étant méthylées *in vivo*. L'histone la plus méthylée est H3, suivie de H4 (Santos-Rosa et Caldas 2005).

Les histones méthyltransférases appartiennent à des familles de protéines distinctes: les protéines PRMTs (*protein arginine methyltransferase*) méthylent les arginines, qui sont mono et diméthylées de manière symétrique ou asymétrique (Kouzarides 2007). Il faut noter que les enzymes majeures responsables de la méthylation des protéines sur l'arginine (PRMT) sont classées en deux groupes: les enzymes de type I (PRMT1, PRMT3, CARM1/PRMT4, PRMT6 et PRMT8) et celles de type II (PRMT5 et PRMT7). Les deux types de méthyltransférases induisent une monométhylation des résidus sur l'arginine comme une réaction intermédiaire.

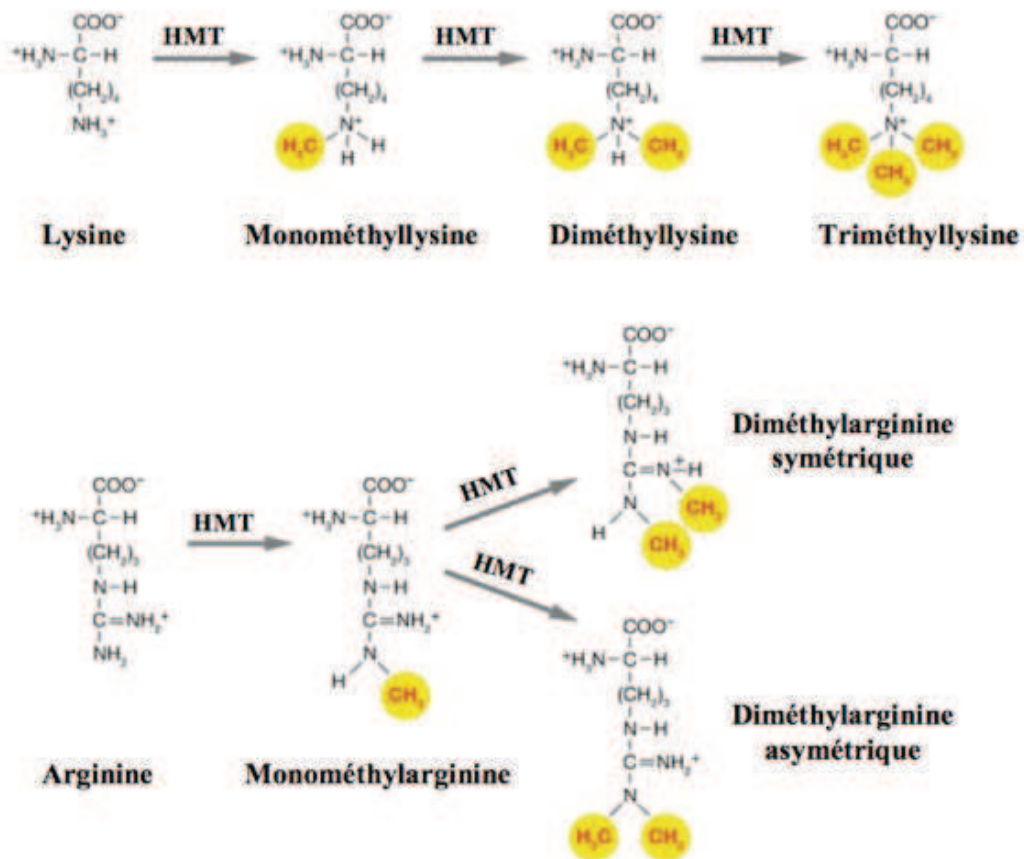


Figure 18 : Formes méthylées des résidus lysines et arginines des histones (Shilatifard 2006)

Les protéines HKMT (*histone lysine methyltransferase*) modifient les lysines, qui peuvent être mono-, di- ou tri- méthylées (Figure 18). Toutes les HKMT possèdent un domaine SET (*Su(var)3-9*, *Enhancer of Zeste*, *Trithorax*) à l'exception de l'enzyme Dot1/Dot1L, ne possédant pas de domaine SET (Martin et Yi Zhang 2005). Les conséquences biologiques de la méthylation d'une lysine sont différentes selon que le résidu modifié se trouve mono-, di-, ou tri-méthylé. Pendant de nombreuses années, la méthylation des histones était considérée comme une marque épigénétique stable et irréversible qui rendait compte du caractère héritable des états ouverts (euchromatine) ou fermés (hétérochromatine) de la chromatine. Cette vision découlait de l'incapacité à mettre en évidence une activité histone déméthylase et des études qui suggéraient que la demi-vie de la méthylation des histones est similaire à celle des histones elles-mêmes (Byvoet et al. 1972). Cependant, des études ont montré que la méthylation pouvait être extrêmement dynamique en identifiant plusieurs protéines qui jouent un rôle dans la déméthylation histonique comme par exemple PADI4 (peptidylarginine désiminase 4 humaine) qui convertit les arginines monométhylées des

histones H3 et H4 en citrulline par déméthylimination (Yanming Wang et al. 2004), les amines oxydases de type LSD1 (lysine-specific demethylase 1) qui régénèrent une lysine et du formaldéhyde (Yujiang Shi et al. 2004). Plus récemment, il a été proposé que la déméthylation des lysines puisse se faire par hydroxylation des groupes méthyles. Cette réaction est catalysée par le domaine JmjC (Tsukada et al. 2006). Il faut noter que trois sites de méthylation des lysines semblent avoir le même effet : H3K4, H3K36 et H3K79 (Martin et Yi Zhang 2005). De plus, la méthylation des histones H3K9me3, H4K20me3 et H3K27me1 joue un rôle fonctionnel important dans la formation de l'hétérochromatine constitutive. La méthylation de H3K27me3 intervient dans de nombreux processus tels que l'inactivation du chromosome X, l'empreinte parentale ou la régulation transcriptionnelle des gènes homéotiques (Stewart *et al.*, 2005). En 2005, Vakoc et al. ont défié l'idée générale qui lie la méthylation de H3K9 à la répression génique. Ils ont montré que les régions codantes de plusieurs gènes activés sont enrichies en histones H3K9 tri-méthylées et en protéines HP1 γ (Vakoc et al. 2005). D'après leurs données publiées, il semblerait que la méthylation de H3K9 produise des effets différents qui varient selon le site de méthylation qu'il soit situé au niveau des promoteurs ou des régions codantes des gènes).

La méthylation peut altérer l'architecture de la chromatine, en condensant ou en relaxant sa structure. Cependant, le groupement méthyl est relativement petit et son addition à une lysine ou une arginine ne permet pas la neutralisation de leur charge positive. Ainsi, il semble improbable que la méthylation seule affecte significativement la structure de la chromatine. D'après les données dans la littérature, l'effet de la méthylation résulte du fait qu'elle constitue un site de recrutement de protéines régulatrices contenant des domaines de fixation comme celles contenant un chromodomaine telles que la protéine hétérochromatinienne répressive HP1 (heterochromatin protein 1) ou la protéine Polycomb (PC) de la drosophile, qui reconnaissent H3K9 et H3K27, alors que la protéine activatrice Chd1 (chromodomain helicase DNA-binding protein 1) reconnaît H3K4. Deux autres motifs sont capables de se lier aux résidus lysines méthylées des histones ont été mis en évidence. Il s'agit du domaine TUDOR qui permet à la protéine p53BP1 (*p53-binding protein 1*) de reconnaître H3K79 diméthylée (Zgheib et al. 2009) et à la protéine Crb2 de reconnaître H4K20 diméthylée (Greeson et al. 2008). Il existe aussi le domaine WD40-*repeat* de l'activateur de transcription WDR5, qui se lie à H3K4 di- et tri-méthylées ((Bannister, Schneider, et Kouzarides 2002), (Bannister, Schneider, et Kouzarides 2002)(Greeson et al. 2008), (Martin et Yi Zhang 2005)). Ainsi la méthylation peut être à la fois une marque d'activation comme une marque de répression de la transcription. A l'inverse des HAT pour

l'acétylation, détaillé précédemment, les PKMTs ont une activité très spécifique pour certains résidus, voire de certaines formes mono-di ou tri méthylées. Il existe également quatre domaines différents de reconnaissance de ces résidus méthylés : le chromodomaine, le domaine WD40 et le domaine PHD reconnaissent les lysines méthylées alors que le domaine TUDOR reconnaît à la fois les lysines et les arginines méthylées. Pour ajouter à la complexité d'interprétation de la méthylation des histones, une même marque peut être reconnue par plusieurs domaines et coder ainsi une information différente en fonction de la lecture qui en est faite, et un même domaine de reconnaissance peut aussi lui apporter deux informations contradictoires en fonction du complexe protéique où il se trouve (Shelley L Berger 2007).

1.3.4 L'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle biochimique nécessitant plusieurs étapes pour aboutir in fine à la fixation covalente d'une ou de plusieurs protéines d'ubiquitine (8 kDa) sur une ou plusieurs lysines de la protéine substrat. La finalité de cette modification est bien souvent la dégradation par le protéasome de la protéine modifiée (Voir précédemment, chapitre ICP0). L'ubiquitination des résidus lysine des histones est particulière car elle ne met en jeu qu'une mono-ubiquitination non-dégradative au niveau des domaines carboxy-terminal des histones H2A et H2B, ((Zhiqian Liu, Oughtred, et Wing 2005); (Osley 2006)). L'ubiquitination de H2B est liée à une activation des gènes et à une élongation de la transcription (Tanny *et al.*, 2007). L'ubiquitination et la déubiquitination peuvent interagir avec la méthylation des résidus lysines des histones et contrôler la régulation transcriptionnelle : la mono-ubiquitination de K123 de H2B est liée à la méthylation H3K4 et H3K79 ((Sun et C David Allis 2002) ; Nakanishi *et al.*, 2009)); par contre la déubiquitination est nécessaire pour la méthylation de H3K36 (Wenlai Zhou *et al.* 2008). Une étude montre qu'un gène de chemokine est réprimé par l'ubiquitination de H2A, via l'inhibition de l'élongation de l'ARN polymérase II (Nakanishi *et al.* 2009). Une autre étude, effectuée chez la levure, montre que la monoubiquitination de l'histone H2B par Rad6/Bre1 est requise pour la méthylation des deux histones H3K4 et H3K79 respectivement par les méthyltransférases Compass et Dot1 (Fierz *et al.* 2011). Dans cette étude, il est montré que les méthylations de H3K4 et H3K79 dépendent uniquement de la monoubiquitination de H2B, indépendamment de toute altération supplémentaire de la séquence de H2B ou du génome. Cette modification n'est donc pas seulement liée à la

dégradation des protéines mais peu aussi représenter une étape dans une voie de signalisation plus complexe. Une étude récente a montré que l'ubiquitination de l'histone H2B induisait une ouverture de la chromatine en rendant la fibre plus accessible et empêchant la formation d'une structure de chromatine d'ordre supérieur (J M de Murcia et al. 1997). L'ubiquitination possède donc un rôle dans le remaniement structural de la fibre de chromatine, ce qui pourrait être un avantage pour le virus HSV-1, qui se servirait de l'E3 ubiquitine ligase ICP0 en tant qu'outil de remodelage de la chromatine.

1.3.5 *Les autres modifications*

L'ADP-ribosylation, est une modification associée à une activation de la transcription. La poly-ADP-ribosylation est une modification post-traductionnelle catalysée par les enzymes MARTs (mono-ADP-ribosyltransférases) et PARPs (poly-ADP-ribose polymérasés). Ces modifications sont mal connues et les conséquences biologiques ne sont pas bien comprises. PARP1, la plus étudiée parmi la famille des PARPs joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires. En particulier, PARP1 est un senseur des dommages à l'ADN, et joue un rôle dans l'organisation spatiale et temporelle de la réparation (J M de Murcia et al. 1997). On sait que l'histone H1 porte diverses modifications post traductionnelles (PTMs), y compris la phosphorylation, la méthylation de la lysine et l'ADP-ribosylation (Villar-Garea et Imhof 2008). Cependant suite à une cassure de l'ADN, les extrémités C- et N-terminales des histones H1 et H2B sont ADP-ribosylées ce qui entraîne une relaxation de la fibre de 30 nm facilitant l'accès au dommage. Une étude récente a montré que des macrodomaines distincts, notamment ceux du variant d'histone Macro H2A1.1, sont recrutés sur des sites PARP1 activés après des dommages à l'ADN effectués au laser (Timinszky et al. 2009).

La biotinylation des résidus lysine (K) sur les histones est médiée par HCS (holocarboxylase synthetase). C'est un nouveau mécanisme capable de réguler la structure de la chromatine et l'expression des gènes. Wijeratne et ses collaborateurs ont montré que la biotinylation de K12 de l'histone H4 (H4K12bio) est un marqueur de l'hétérochromatine et est enrichie dans les répétitions péricentromériques. Cette même équipe a suggéré que H4K12bio est enrichie au niveau des répétitions télomériques et représente une nouvelle marque épigénétique pour la sénescence cellulaire (Wijeratne, Camporeale, et Zemleni 2010).

Conclusion :

L'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination ont été classiquement décrites comme des modifications covalentes des histones. Plus récemment, la sumoylation a été ajoutée à la liste des modifications des histones (Figure 19). Tout d'abord, la sumoylation de l'histone H4 chez les mammifères a été démontrée (Shiio et Eisenman 2003), et révélée par la suite dans les histones chez la levure (Nathan et al. 2006). Dans cet organisme, la sumoylation des histones se produit dans la chromatine et surtout au niveau des régions subtélomériques (Nathan et al. 2006). Bien que la sumoylation des histones canoniques ait lieu essentiellement à l'extrémité N-terminale, la queue C-terminale a été révélée comme substrat pour SUMO dans le variant d'histone H2A.Z chez la levure (Kalocsay, Hiller, et Jentsch 2009). Il semble que la sumoylation du coeur d'histones chez la levure soit en concurrence avec d'autres modifications typiques de l'extrémité N-terminale, comme l'acétylation (Nathan et al. 2006). Toutefois, dans les cellules de mammifères, l'expression de l'histone acétyl-transférase p300 augmente la sumoylation de l'histone H4, suggérant que l'acétylation facilite la sumoylation (Shiio et Eisenman 2003). Le fait que SUMO-H4 soit co-immunoprécipitée avec HDAC1 (histone deacetylases) et HP1 γ ((Shiio et Eisenman 2003);(Nathan et al. 2006)) a permis de suggérer que la sumoylation des histones réprimait la transcription (pour revue voir (Garcia-Dominguez et Reyes 2009)). Cependant, la fonction précise de ces modifications d'histones (biotinylation, sumoylation...) n'est pas encore entièrement connue et reste à élucider.

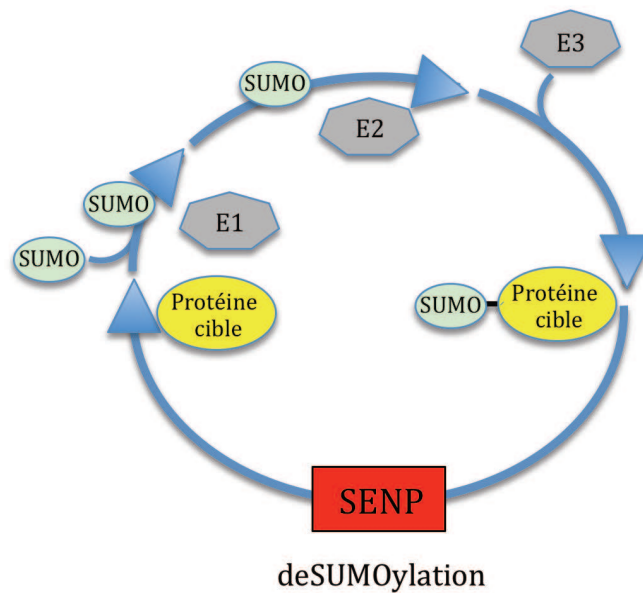


Figure 19: Le cycle enzymatique de sumoylation / désumoylation (D'après (Geiss-Friedlander et Melchior 2007))

La protéine SUMO est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif activé par une enzyme d'activation E1, de façon ATP dépendante. La forme activée de SUMO se lie à une enzyme de conjugaison E2 puis la protéine SUMO est liée de façon covalente à la protéine cible grâce à l'enzyme de liaison E3. Cette réaction est réversible et les enzymes responsables de la désumoylation sont les protéines SENP (SUMO/Sentrin-specific protease).

1.4 Insertion de variants d'histones

Des variants peuvent remplacer au sein du nucléosome une histone conventionnelle, modifiant ainsi sa structure et ses partenaires d'interactions.

Chaque histone, à l'exception de H4, existe sous plusieurs formes protéiques dans la cellule (Figure 20). Ces différentes protéines, appelées variants d'histones, sont codées par des gènes différents. L'incorporation de variants d'histones au sein du nucléosome introduit un degré supplémentaire de complexité. En effet, les variants d'histones peuvent induire des changements de structure du nucléosome et ainsi modifier les interactions entre l'ADN et les protéines. Ainsi, l'incorporation de variants d'histones au sein du nucléosome a pour conséquence de moduler l'accessibilité de l'ADN pour des facteurs de transcription. Il s'agit donc de modifications épigénétiques. De plus, ces variants d'histones sont également la cible de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, ajoutant encore un niveau de complexité au code histone. Contrairement aux histones classiques, l'incorporation des variants d'histones au sein du nucléosome peut avoir lieu en dehors de la phase de réplication de l'ADN. De plus, la localisation et l'expression des variants

d'histones sont finement régulées selon le stade du développement ou le tissu considéré, suggérant qu'ils puissent avoir des fonctions spécifiques très importantes. A l'appui de cette hypothèse, de nombreuses pathologies humaines, telles que l'infertilité ou le cancer, sont associées à la perte de fonction de certains variants d'histones confirmant ainsi leur importance (Boulard et al. 2007).

Je vais maintenant détailler quelques exemples importants de variants d'histones.

1.4.1 H2A

Il existe chez l'homme 4 variants d'histones pour H2A : H2AZ, H2AX, MacroH2A, Bbd auxquels on peut ajouter les variants qui sont exprimés uniquement dans le testicule comme TH2A, H2AL1 et H2AL2. H2AZ est un variant particulièrement conservé au cours de l'évolution, même au regard de H2A. Il exerce une activité à la fois positive et négative sur l'expression des gènes. Pour exemple, chez la levure, H2AZ est associée aux sites d'initiation de la transcription des gènes inactifs. L'éviction de ce variant d'histone serait un processus rapide permettant l'activation des gènes (Guillemette et al. 2005). H2AX est un variant d'histone qui est phosphorylé sur la sérine 139 en réponse à des cassures double brin de l'ADN (Rogakou et al. 1998). H2AX phosphorylée sur la sérine 139 (plus communément appelée gamma-H2AX) est présent au niveau des cassures doubles brins de l'ADN et participe à la réparation de celui-ci, en collaborant avec la machinerie de réparation (Fernandez-Capetillo, Celeste, et Nussenzweig 2003). MacroH2A doit son nom à sa grande taille qui représente 3 fois celle de l'histone classique H2A (Pehrson et Fried 1992). Le variant MacroH2A est localisé en particulier au niveau du chromosome X inactif (Costanzi et Pehrson 1998), également appelé corpuscule de Barr, ou il est associé la répression transcriptionnelle (Perche et al. 2000). Au contraire, H2ABbd (H2A Barr body deficient) comme son nom l'indique est exclu du corpuscule de Barr. On le retrouve plutôt associé aux régions acétylées suggérant qu'il pourrait être associé à l'activation des gènes ((Chadwick et H F Willard 2001); (Angelov et al. 2004)). Enfin, certains variants de l'histone H2A présentent une expression restreinte au testicule TH2A (Testis specific H2A), H2AL1 et H2AL2 (H2A Like 1 et 2) (B J Rao, Brahmachari, et M R Rao 1983); (Govin et al. 2007)).

1.4.2 *H2.B*

Les variants d'histones H2B décrits à ce jour, sont au nombre de 3, TH2B (Testis specific H2B), TSH2B (Testis/Sperm specific H2B) et H2BFWT (H2B Family, member W, Testis specific). Ils présentent une expression restreinte aux cellules de la lignée germinale mâle. Il est important de souligner qu'au cours de la spermatogenèse, la chromatine est profondément réorganisée. En effet, les histones somatiques sont en partie remplacées par des histones spécifiques du testicule, elles mêmes en partie remplacées par des protéines de transition puis par d'autres protéines appelées protamines. Au final, la chromatine des spermatozoïdes est hautement compactée (Sassone-Corsi 2002). Il n'est donc pas surprenant de découvrir des variants d'histones dont l'expression est limitée au testicule.

1.4.3 *H3*

Il existe 3 variants d'histones pour H3: CENH3 (Centromeric H3), H3.3 et H3t (H3 testis specific). CENH3 (ou CENP-A Chez l'homme) est localisé au niveau de régions chromosomiques particulières, les centromères, où il est indispensable à la fonction de celui-ci (Voir chapitre sur les centromères). H3.3 est localisé dans des régions transcriptionnellement actives (Chow et al. 2005). Enfin, une expression restreinte aux cellules de la lignée germinale mâle a été décrite pour le variant H3t (Witt, Albig, et Doenecke 1996).

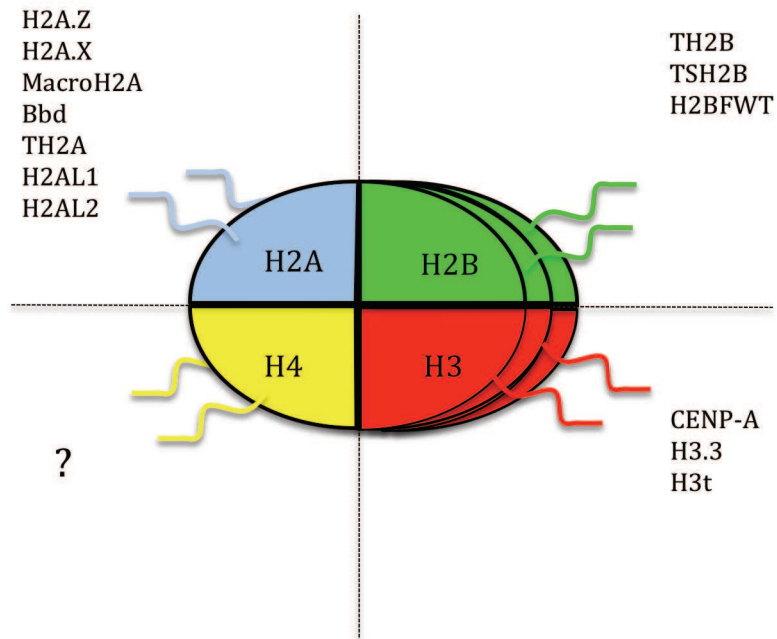


Figure 20: Schématisation d'un nucléosome et des variants des différentes histones le composant

Un nucléosome est composé de 4 histones différentes, chaque histone H2A, H2B, H3 et H4 est présente en deux exemplaires, les queues N-terminales sont également représentées et sont composées de 20 à 30 acides aminés chacune. Les variants connus des différentes histones sont indiqués en marge de chaque protéine.

CHAPITRE 3 : LE CENTROMERE :

STRUCTURE ET FONCTIONS

1. INTRODUCTION

Le centromère est la région du chromosome qui va permettre la ségrégation des chromatides sœurs, du fait de la formation du kinétochore, une structure protéique complexe qui va permettre l'attachement des microtubules sur les chromosomes lors de la mitose ; les microtubules, en se raccourcissant, vont exercer une force de tension sur les kinétochores, et permettre la séparation des chromatides sœurs. (Pour revue, voir (Tomoyuki U Tanaka et Arshad Desai 2008)). Le centromère des cellules humaines a une taille variable selon les chromosomes de 0,1 à 4 Mb.

On peut diviser le centromère en deux régions distinctes, tout d'abord la région centrale ou « central core » qui est composée d'ADN très hautement répété en tandem de type alphaïde I, c'est à dire des multimères de 171 pb, agencés différemment selon les chromosomes. (Figure 21) Cet ADN alphaïde de type I possède une très forte homologie entre les différents monomères, variant de 98 à 99% (M G Schueler et al. 2001). C'est sur cette région centrale que va se former lors de la mitose le kinétochore, c'est la seule partie du centromère qui contient le variant de l'histone H3 centromérique CENP-A. La deuxième région est la région péricentromérique ou péricentromère et borde de part et d'autre la région centrale. Cette région, qui s'étend sur plusieurs mégabases, est également composée d'ADN alphaïde, mais cette fois ci de type II et III. Ces deux types d'ADN ne sont pas aussi hautement répétés que le type I, l'homologie entre les monomères de 171 pb décroît très nettement par rapport à la région centrale, et peut varier de 99% d'homologie entre les séquences, le plus près de la région centrale, jusqu'à seulement 70% d'homologie dans les zones les plus éloignées de la région centrale, et on ne parle plus de séquences hautement répétées mais de séquences monomériques (M G Schueler et al. 2001).

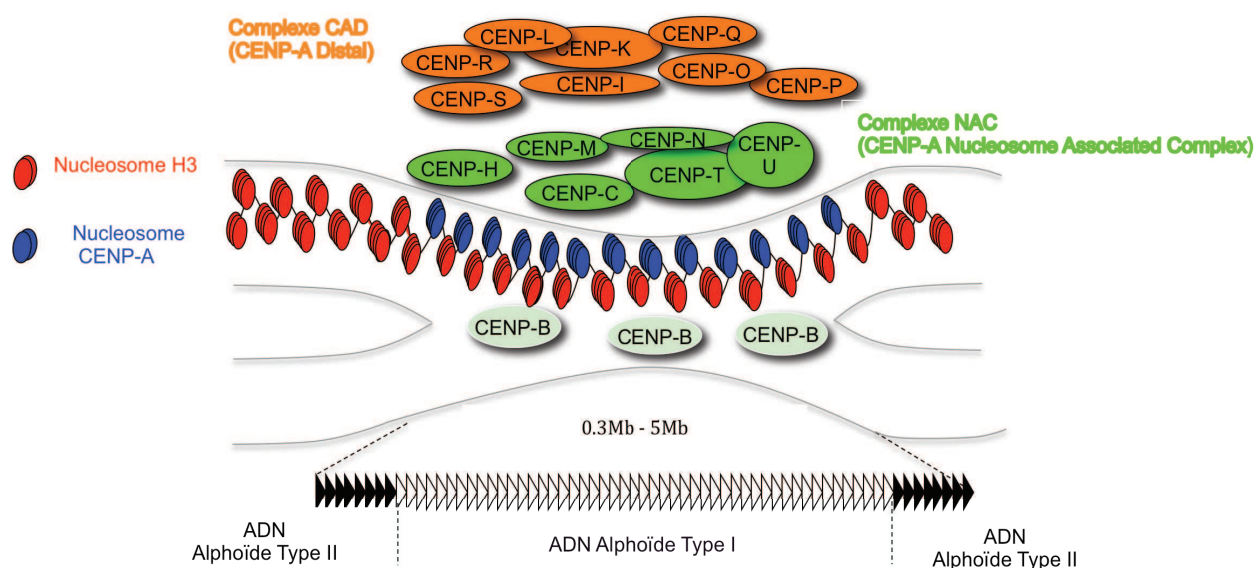


Figure 21. Représentation schématique de la structure linéaire de l'ADN centromérique et péri-centromérique humain :

La région centromérique centrale est composée d'ADN α -satellite de type I (triangles blancs). La chromatine centromérique est composée de nucléosomes contenant CENP-A disposés en alternance avec des nucléosomes contenant l'histone H3. Les régions péri-centromériques possèdent une structure hétérochromatique composée d'ADN α -satellite de type I puis II (triangles noirs) et sont constituées uniquement de nucléosomes contenant l'histone H3. La protéine CENP-B se fixe sur les boîtes CENP-B présentes uniquement dans l'ADN α -satellite de type I.

2. ORGANISATION DE LA SEQUENCE CENTROMERIQUE

Comme indiqué précédemment l'organisation d'ordre supérieur de ces monomères varie d'un centromère à un autre, par exemple pour le centromère du chromosome 21, ce monomère s'organise de manière à former des multimères de 11 fois 171 paires de bases. Cette organisation est valable pour le centromère du chromosome 21 mais chaque chromosome possède son organisation propre des séquences de ses centromères.

Cela dit, seulement l'organisation du centromère du chromosome 21 est bien connue, ceci grâce ou plutôt à cause des nombreuses études génétiques réalisées pour comprendre les mécanismes de la mise en place de la trisomie 21 (Pour revue, voir (Turleau et Vekemans 2010)).

Ces ADN satellites d'ordre supérieurs sont donc encore mal connus mais ils ont été identifiés au niveau des centromères de tous les chromosomes humains, leurs tailles varient de 500kb à 5Mb. Cet ADN d'ordre supérieur a été montré comme important dans le bon fonctionnement du centromère (M G Schueler et al. 2001).

3. STRUCTURE PROTEIQUE ASSOCIEE AU CENTROMERE

Le centromère est défini comme une des structures subcellulaires protéique des plus complexes, possédant pas moins d'une centaine de protéines ayant probablement toutes un rôle à jouer dans la ségrégation des chromosomes, plus ou moins directement et avec des degrés d'importance probablement variables. Dans ce chapitre, je vais présenter en détail certaines des protéines centromériques les plus importantes fonctionnellement et structurellement.

3.1 La protéine CENP-A

Généralités

CENP-A, pour CENtromeric Protein A est la première protéine associée au centromère à avoir été mise en évidence (W C Earnshaw et N Rothfield 1985). Elle a été décrite comme un autoantigène reconnu par l'antisérum humain CREST (Calcinosis, REynaud Syndrome, oesophageal dysmotility, Scleroderma and Telangiectasia). Le Syndrome CREST est une maladie auto-immune dont les patients ont des anticorps anticentromériques circulants.

CENP-A est une protéine de 17KDa. Il a été prouvé par copurification d'histones que CENP-A était en fait une histone H3 centromérique (Palmer et al. 1991). Elle possède une grande similarité dans sa composition en acide aminés avec l'histone H3 et son interaction avec la protéine H4 prouve bien qu'il s'agit d'une protéine de la famille des histones.

CENP-A à un rôle dans la ségrégation des chromatides sœurs, et des mutants nuls pour la protéine sont bloqués en interphase, mais dans de rares cas, les cellules passent en mitose et donnent naissance à des cellules aneuploïdes. Il est intéressant de noter qu'il s'agit d'un phénotype similaire à celui de cellules infectées par HSV-1, (Voir chapitre I.6.2). Il a récemment été prouvé que CENP-A à un rôle dans la réparation des coupures double brin dans l'ADN, grâce à son domaine de localisation aux centromères, qui est nécessaire et

suffisant pour son recrutement sur les régions endommagées (Samantha G Zeitlin et al. 2009).

CENP-A contient un « H3-like » Histone Fold Domain (HFD) comprenant 3 hélices alpha HI, HII et HIII, séparées par 2 « spacers strand » A et B ; ce domaine est nécessaire et suffisant à l'assemblage de la protéine au niveau du centromère (K F Sullivan, Hechenberger, et Masri 1994). CENP-A contient également un domaine unique en N terminal. CENP-A s'associe à tous les centromères, incluant les néocentromères (P E Warburton et al. 1997). Ce variant d'histone H3 est conservé chez *S.cerevisiae* (Cse4, Chromosome Segregation 4) (P B Meluh et al. 1998), *S.pombe* (Cnp1, centromere protein 1) (K Takahashi, E S Chen, et M Yanagida 2000), *C.elegans* (HCP-3, Holocentric Protein-3) (Buchwitz et al. 1999) et la Drosophile (Cid, Centromere identifier) (S Henikoff et al. 2000).

Fonctions possibles de CENP-A

CENP-A possède un rôle dans un point de contrôle cellulaire, le « spindle checkpoint control » (Régnier et al. 2005). Dans des cellules de poulet DT40 KO CENP-A se produit une mauvaise ségrégation des chromosomes après un délai mitotique, possiblement dûe à l'incapacité de la cellule à maintenir la protéine BubR1 au niveau du kinétochore.

Un rôle possible de CENP-A dans la cytokinèse a également été suggéré. CENP-A est phosphorylée en prophase, une fois que H3 l'a été. Cette phosphorylation de H3 est importante pour la condensation des chromosomes, ceci suppose des fonctions différentes (S G Zeitlin et al. 2001).

3.1.1 Les nucléosomes contenant CENP-A

Généralités

Des nucléosomes peuvent être associés *in vitro* à partir d'un milieu contenant CENP-A et les histones H2A, H2B et H4 (K Yoda et al. 2000). CENP-A a également été retrouvée dans des fractions mononucléosomiques (Palmer et al. 1987) et se localise au niveau des centromères fonctionnels au cours du cycle cellulaire (P E Warburton et al. 1997).

In vivo, les nucléosomes contenant CENP-A sont disposés en alternance avec des blocs de nucléosomes contenant l'histone H3, la chromatine résultante est supposée comme cylindrique de manière à ce que CENP-A soit à l'extérieur de ce cylindre, position logique

pour son rôle dans la formation du kinétochore et son interaction avec les microtubules (Michael D Blower, Beth A Sullivan, et Gary H Karpen 2002). Chez la levure, la surexpression de H3 est létale chez des mutants Cse4, ceci supposant donc une compétition entre H3 et Cse4 (Glowczewski et al. 2000).

Les différents modèles d'organisation de la chromatine contenant CENP-A:

Un des challenges actuels dans la recherche concernant CENP-A est de comprendre comment ce variant altère physiquement la chromatine pour définir et maintenir la localisation des centromères sur les chromosomes. En effet, plusieurs études récentes ont permis l'émergence de modèles à priori contradictoires sur la structure de la chromatine contenant CENP-A.

(1) Le modèle le plus conventionnel est celui qui considère la chromatine centromérique comme composée de nucléosomes contenant deux copies de chaque histone, H2A, H2B, H4 et CENP-A ((Camahort et al. 2009), (Conde e Silva et al. 2007), (Foltz et al. 2006) (Palmer et Margolis 1985), (Sekulic et al. 2010), (Shelby, Vafa, et K F Sullivan 1997). Une étude confortant ce modèle a montré que CENP-A a plus tendance à s'associer avec elle même plutôt qu'avec H3, du fait de son affinité supérieure pour elle même, du moins chez la levure (Kingston, Yung, et Singleton 2011). De la même manière que dans les nucléosomes classiques contenant H3, l'ADN s'enroule autour des histones dans le sens gauche (pas d'hélice gauche, (Sekulic et al. 2010)). De plus, les hétérotétramères ainsi formés possèdent des propriétés structurelles particulières. Les octamères ne contenant que du CENP-A sont notamment plus compacts en taille et moins flexibles que leurs contreparties conventionnelles (Figure 22) ((Black et al. 2004), (Black, Brock, et al. 2007), (Sekulic et al. 2010)). Les interactions entre le domaine cible de CENP-A et H4 sont plus rigides que celles entre H3 et H4 mais cela dit l'interaction entre CENP-A et H4 est plus facile à dissocier, ce qui peut contribuer à l'identité du centromère ((Black et al. 2004), (Black, Jansen, et al. 2007), (Conde e Silva et al. 2007), (Sekulic et al. 2010)). Il est donc fort probable que la chromatine contenant CENP-A soit modifiée et structurellement différente de la chromatine canonique. De plus cette étude confirme que la liaison entre les histones CENP-A et H4 est plus forte que la liaison entre H3 et H4.

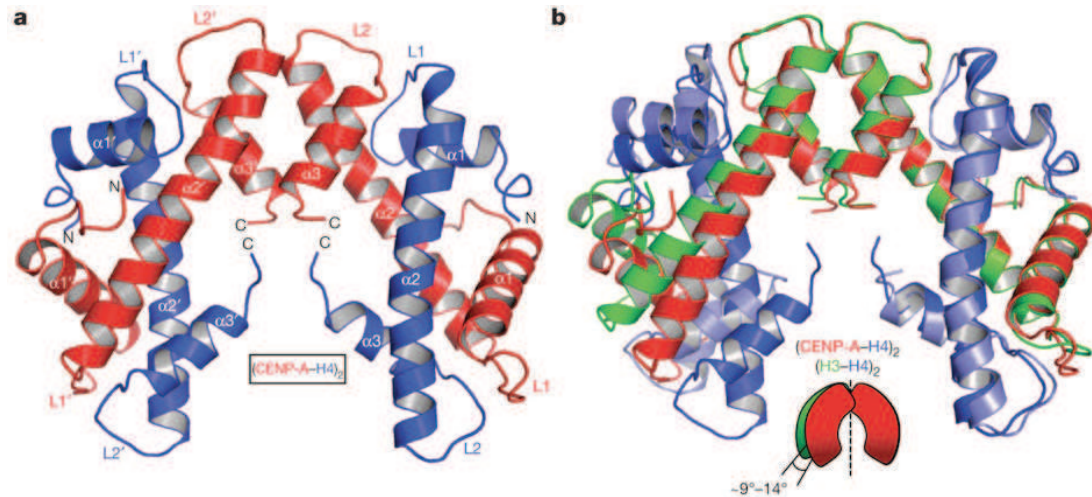


Figure 22 : Structure cristallographique de l'hétérotétramère (CENP-A-H4)₂ ((Sekulic et al. 2010)

a) Représentation structurelle de l'hétérotétramère (CENP-A-H4)₂. Les trois hélices alpha (α ou α' 1, 2 et 3) et les deux boucles (L1 et L2) de chaque histone sont représentées. b) Comparaison des tétramères (CENP-A-H4)₂ et (H3-H4)₂. Les histones H3 et CENP-A sont superposées. La protéine CENP-A est représentée en rouge et H3 en vert. On peut voir que les deux types de tétramères diffèrent dans leur structure tridimensionnelle. En effet, les deux protéines ne se superposent pas exactement et forment un angle de 9 à 14 degrés entre les deuxièmes hélices alpha (α 2).

(2) La chromatine pourrait contenir uniquement des tétrasomes, composés de deux copies de CENP-A et H4, en absence de dimères H2A/H2B (Williams et al. 2009).

(3) La chromatine pourrait être composée d'hémisomes, assemblés sur l'ADN et contenant une seule copie de chaque histone, au lieu des deux trouvées dans les nucléosomes conventionnels (Dalal et al. 2007), (Williams et al. 2009)). De plus, dans ce modèle, l'ADN s'enroulerait de manière inversée autour des histones (pas d'hélice droit) par rapport à la chromatine conventionnelle (pas d'hélice gauche) (Furuyama et Steven Henikoff 2009). Cette différence de vue sur l'enroulement de l'ADN autour des histones entre le groupe de Henikoff et celui de Black est un sujet de controverse active chez les centroméristes.

(4) La chromatine centromérique pourrait être composée de « réversomes » octamériques, possédant la même stœchiométrie que les nucléosomes conventionnels mais avec un pas d'hélice droit, donc inversé par rapport aux nucléosomes classiques (Lavelle et al. 2009).

(5) Les nucléosomes centromériques pourraient être des hexamères, ressemblant aux nucléosomes classiques, mais dans lesquels les dimères de H2A/H2B seraient remplacés par deux molécules Scm3 (l'homologue du chaperon de CENP-A HJURP chez la levure, voir paragraphe dépôt de CENP-A) (Mizuguchi et al. 2007)).

(6) Le dernier modèle envisagerait la présence de trisomes contenant Cse4, H4 et Scm3 (encore chez la levure), induisant un pas d'hélice inversé droit (Furuyama et Steven Henikoff 2009).

L'existence du modèle (4) face aux modèles (5) et (6) impliquant la présence d'un tierce facteur (Scm3), est également sujet à controverse (pour revue voir (Black et Cleveland 2011)).

Les complexes protéiques associés à CENP-A

Récemment deux complexes associés à la protéine CENP-A ont été mis en évidence :

Le NAC pour CENP-A Nucleosome Associated Complex et le CAD pour CENP-A Distal complex (Foltz et al. 2006). Ces deux complexes ont également été définis sous la forme d'un complexe nommé « complexe CENP-H-I » dans une étude parue conjointement (Masahiro Okada et al. 2006) (Pour plus de détails structurels, voir chapitre B.3.4). Ces complexes sont formés d'une dizaine de protéines, et leur formation dépend de la présence de CENP-A. Ces données vont dans le même sens que certaines obtenues précédemment, effectivement l'inactivation de CENP-A chez la levure, le ver, la mouche et la souris perturbe la mitose et la progression du cycle cellulaire et cause la mauvaise localisation de plusieurs protéines centromériques telles que CENP-C, par exemple ((M D Blower et G H Karpen 2001) ; (Howman, Fowler, Newson, Redward, A C MacDonald, Kalitsis, et K H Choo 2000a) ; (L L Moore et M B Roth 2001)). La disruption de l'homologue de CENP-A Cse4 chez la levure *S.cerevisiae* cause une mauvaise ségrégation des chromosomes et un arrêt mitotique (Stoler et al. 1995). Toutes ces données suggèrent que CENP-A est la protéine la plus importante dans le processus de formation du kinétochore. Cependant, la protéine Mis 12 (Mis-segregation 12) n'est pas affectée par un RNAi contre CENP-A ((Goshima et al. 2003), (Kline et al. 2006)). De plus, il a été prouvé récemment dans des cellules humaines que la présence seule de la protéine CENP-A n'était pas suffisante à l'établissement d'un kinétochore fonctionnel mais permettait uniquement le recrutement de trois protéines : CENP-C, CENP-N et Mis 18 (Gascoigne et al. 2011). Par contre la même étude montre que les protéines CENP-C et CENP-T sont suffisantes pour la formation d'un kinétochore fonctionnel de façon ectopique. Ceci présume donc une voie d'assemblage du kinétochore indépendante de CENP-A. La surexpression de CENP-A mène à son incorporation dans les bras chromosomiques et à la formation d'un kinétochore « partiel » contenant CENP-C et quelques protéines du kinétochore mais pas à la formation d'un kinétochore « entier » fonctionnel (Van Hooser et al. 2001).

La présence seule de la protéine CENP-A n'assure donc pas la formation d'un centromère fonctionnel. Pour déterminer exactement quel est l'élément initiateur de la formation d'un centromère, il est nécessaire de comprendre tout d'abord comment la protéine CENP-A est déposée sur les régions centromériques.

Dépôt de CENP-A

Pendant longtemps, il était admis que le dépôt de CENP-A dans la chromatine centromérique se faisait dans une fenêtre de temps différente de celle du dépôt des histones classiques, ((O'Keefe, Henderson, et Spector 1992), (Csink et S Henikoff 1998)). Cela dit, il a été mis en évidence que ce n'était pas le cas chez l'homme, car la réplication de l'ADN centromérique n'est pas restreinte à une fenêtre de temps spécifique pendant la phase S ((Shelby, Monier, et K F Sullivan 2000), (B Sullivan et G Karpen 2001)). De plus, le dépôt de CENP-A peut se faire en dehors de la phase S, en effet la réplication de l'ADN n'est pas nécessaire à l'assemblage de CENP-A et à l'accumulation des ARNm CENP-A et des protéines CENP-A en phase G2. ((Shelby, Vafa, et K F Sullivan 1997) (Shelby, Monier, et K F Sullivan 2000)). Il a été prouvé par la suite que le dépôt de CENP-A néosynthétisée commençait en télophase lors de la mitose et se poursuivait en début de phase G1 exclusivement (Jansen et al. 2007).

Une protéine chaperonne majeure pour le dépôt de CENP-A *in vitro* et *in vivo* est la protéine HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) ((Foltz et al. 2009),(Dunleavy et al. 2009), (Shuaib et al. 2010)). HJURP permet le dépôt de CENP-A au niveau des centromères grâce à un domaine très conservé contenu dans son extrémité N terminale (Shuaib et al. 2010). HJURP est également nécessaire pour la stabilité de la protéine CENP-A au niveau des centromères et pour une bonne ségrégation des chromosomes (Dunleavy et al. 2009). HJURP est également nécessaire et suffisante à la formation de novo d'un kinétochore fonctionnel (Barnhart et al. 2011). L'existence de HJURP avait déjà été suggérée dans des études précédentes, mais était identifiée différemment, au sein de complexes différents ((Fujita et al. 2007), (Perpelescu et al. 2009)). Dans la première étude, il était montré que les protéines de la famille Mis 18 étaient nécessaires à un bon dépôt de CENP-A pendant la fenêtre de temps impartie en fin de mitose et en début de G1 (Fujita et al. 2007). Un indice concernant le mode d'action de ces protéines est venu du fait que le phénotype engendré par la déplétion de Mis18 peut être sauvé par l'inhibiteur de déacétylation Trichostatin A (TSA). Ceci suggère l'existence d'un évènement épigénétique précurseur pendant lequel, un

nucléosome contenant CENP-A, un nucléosome adjacent contenant H3 ou une autre protéine centromérique, est acétylée de manière à marquer le centromère en tant que cible pour l'incorporation de CENP-A. Il est intéressant de savoir que les protéines Mis18 peuvent interagir avec la famille de protéines CAF-1 (Fujita et al. 2007). Ces protéines CAF-1 sont capables de réaliser le dépôt de H3 mais également de CID sur de l'ADN plasmidique *in vitro* chez la drosophile (Furuyama, Dalal, et Steven Henikoff 2006). Chez l'homme le complexe CAF-1 entier co-purifie avec les nucléosomes contenant H3.1 mais pas avec ceux contenant CENP-A (Foltz et al. 2006), ce qui laisse penser que l'évènement initiateur de la formation du centromère en fin de mitose et en G1 fait intervenir un pool distinct de nucléosomes contenant H3, immédiatement adjacents aux nucléosomes contenant CENP-A et déjà spécifiquement modifiés par une diméthylation sur la lysine 4 de H3 (Beth A Sullivan et Gary H Karpen 2004).

Une protéine chez la levure, Scm3, est importante dans l'incorporation de l'homologue de CENP-A dans la chromatine centromérique ((Pidoux et al. 2009), (Williams et al. 2009)). Il a été montré que Scm3 et HJURP possédaient une origine phylogénique commune, notamment car les deux protéines possèdent un domaine en commun (Sanchez-Pulido et al. 2009). Scm3 peut donc être considéré comme l'homologue de HJURP chez la levure.

Le maintien de CENP-A au niveau des centromères est dépendant de la présence d'une famille de petites GTPases (Lagana et al. 2010), mais également de la présence de la diméthylation de H3 en K4, catalysée par l'enzyme LSD-1 (Bergmann et al. 2011), ce qui laisse supposer que des mécanismes épigénétiques sont non seulement impliqués dans le dépôt mais également dans le maintien de CENP-A au niveau des centromères. Ces mécanismes épigénétiques jouent donc un rôle dans l'établissement de ce que l'on appelle l'identité centromérique.

3.1.2 *CENP-A, identité et conservation centromérique*

La chromatine centromérique

La chromatine centromérique se distingue donc par la présence du variant de l'histone H3 CENP-A, indispensable à la formation du centromère, à la fois en interphase et en mitose, pendant laquelle elle permet l'assemblage du kinétochore. (Bien entendu, d'autres protéines sont requises mais la plus importante semble être CENP-A).

Plusieurs observations prouvent que CENP-A est la pierre angulaire de la formation structurale et fonctionnelle du kinétochore, et qu'elle est la protéine la plus importante ou tout du moins une des plus importantes pour l'édification du kinétochore.

La marque épigénétique qui établit la localisation du centromère sur les chromosomes est héritée de façon stable au cours des générations. L'assemblage de la chromatine contenant CENP-A est le meilleur candidat pour être cette marque épigénétique. CENP-A est une protéine conservée depuis très longtemps dans les cellules et il n'y a pas (ou pratiquement pas) de turnover au niveau des centromères pendant la durée du cycle cellulaire ((Hemmerich et al. 2008); (Jansen et al. 2007); (Shelby, Vafa, et K F Sullivan 1997)). Un challenge d'importance pour l'avenir est de déterminer de façon précise les complexes liés à la protéine CENP-A sur la chromatine centromérique au cours des différentes étapes du cycle cellulaire. Ces complexes représentent les candidats les plus sérieux pour une marque épigénétique qui maintient la propagation des centromères et ainsi celle des chromosomes.

Pour que le centromère se forme correctement, il est nécessaire que CENP-A interagisse avec les protéines CENP-C et CENP-N. Le recrutement de ces deux protéines engendrerait celui d'autres protéines du CCAN (Constitutive Centromere Associated Network) (Carroll et al. 2009) (Carroll, Milks, et Straight 2010).

Une étude structurelle a fait apparaître que la région fixant CENP-A dans les centromères humains ne représentait qu'une petite fraction compacte de chromatine à l'intérieur du kinétochore, et qu'il en était de même au niveau des néocentromères (Owen J Marshall, Alan T Marshall, et K H Andy Choo 2008). L'établissement de la chromatine contenant CENP-A ne peut se faire sans la présence du système RNAi et d'hétérochromatine. Par contre, une fois établie, cette chromatine centromérique peut se propager sans besoin d'hétérochromatine (Folco et al. 2008). Cela dit, une étude antérieure montrait que la modification H3K3me3, donc une marque d'hétérochromatine, empêchait le dépôt de CENP-A et ainsi la néoformation de HACs à partir d'ADN alphas (Yasuhide Okamoto et al. 2007). Il ne s'agit cela dit pas du même modèle et du même type d'expériences.

La formation du centromère est donc tributaire de l'emplacement chromatinien et des éléments s'y trouvant, où la première pierre, à savoir CENP-A, sera déposée. Le degré de rigidité des nucléosomes contenant CENP-A, qui est plus grand que pour les nucléosomes classiques, ne semble pas dépendre de la séquence d'ADN mais plutôt du domaine terminal CATD (CENP-A Centromere Targeting Domain) de CENP-A (Black, Brock, et al. 2007). Ce domaine CATD semble d'ailleurs jouer un rôle très important dans la formation du

kinétochore, la ségrégation des chromosomes et la viabilité des cellules puisque lorsque CENP-A est absente dans des cellules humaines et chez la levure (ce qui est létal), il suffit de fusionner H3 avec ce domaine CATD pour restaurer les traits phénotypiques cités auparavant (Black, Jansen, et al. 2007). Donc des propriétés propres à la protéine CENP-A sont également nécessaires, en plus de l'environnement chromatinien, à la définition d'une région centromérique possédant une identité particulière.

Suite à son incorporation dans les chromosomes, CENP-A doit marquer la chromatine comme étant centromérique, en distinguant ainsi le centromère du reste du chromosome. La présence de un ou quelques nucléosomes contenant CENP-A n'est apparemment pas suffisante pour générer un centromère fonctionnel, à l'exception du cas de la levure, où seule une séquence d'ADN est nécessaire à l'identité centromérique. Cette hypothèse est fondée sur deux observations : Premièrement, l'accumulation de CENP-A sur des sites de cassures d'ADN est transitoire (Samantha G Zeitlin et al. 2009). Deuxièmement, lorsque CENP-A est massivement produite, elle se dépose sur les bras des chromosomes, mais ces sites ne recrutent qu'occasionnellement des protéines du kinétochore (Heun et al. 2006).

Les mécanismes qui renforcent l'établissement de l'identité centromérique dépendent probablement de la reconnaissance de CENP-A en tant que marque identitaire originelle.

Ceci peut avoir lieu soit par la reconnaissance de nucléosomes CENP-A par d'autres nucléosomes CENP-A au sein de l'agencement d'ordre supérieur de la chromatine ((Michael D Blower, Beth A Sullivan, et Gary H Karpen 2002), (Ribeiro et al. 2010)), ou bien par la reconnaissance directe des nucléosomes contenant CENP-A par d'autres composants centromériques ((Carroll et al. 2009), (Carroll, Milks, et Straight 2010)). Des études récentes ont permis de découvrir de nouveaux mécanismes qui empêcheraient l'incorporation de CENP-A dans les bras des chromosomes (Ranjitkar et al. 2010). Par exemple, chez la levure, l'ubiquitination de l'E3 ubiquitine ligase Psh1, qui reconnaît spécifiquement CENP-A au niveau du domaine CATD, déclenche la dégradation de la protéine CENP-A non centromérique ((Hewawasam et al. 2010), (Ranjitkar et al. 2010)).

La chromatine péracentromérique

En utilisant le promoteur de Cid de drosophile, il a été possible de mettre en évidence que les histones H3 se déposaient au niveau de l'euchromatine, et CENP-A se dépose au niveau de l'hétérochromatine chez la levure, le ver et l'homme (S Henikoff et al. 2000).

Ceci implique que la présence d'hétérochromatine favorise l'accumulation de CENP-A à son niveau. Cette hétérochromatine péracentromérique est donc un prérequis pour la maintenance centromérique et également pour la formation d'un ordre de répétition supérieur des séquences répétées (S Henikoff, Ahmad, et Malik 2001).

La méthylation spécifique de l'histone H3 en lysine 9 (K9) par les protéines de la famille des méthyltransférases humaines SU(VAR)3-9 permet la création des sites de fixation pour des protéines hétérochromatiques telles que HP1, qui sont impliqués dans l'identification d'états chromatiniens et l'organisation de domaines chromosomiques (T Jenuwein 2001). Ainsi, un signal épigénétique est propagé grâce à cette modification épigénétique.

Ces protéines régulent le silencing épigénétique en induisant et maintenant la condensation chromosomique et se fixent à la protéine H3 méthylée grâce à leur chromodomaine ((Grewal et Jia 2007) (M Lachner et al. 2001)).

3.2 La protéine CENP-B

3.2.1 Généralités

CENP-B est une protéine de 80kDa et 599 acides aminés qui possède à son extrémité N-terminale (aa 1-129) un domaine de liaison à l'ADN centromérique formé de deux domaines hélice-tour-hélice (Y Tanaka et al. 2001). Elle possède également à son extrémité C-terminale (aa 540-599) un domaine de dimérisation constitué de deux hélices alpha organisées de façon antiparallèle (Figure 23) (Tawaramoto et al. 2003). Chacun des domaines hélice-tour-hélice interagit avec un sillon majeur de l'ADN, ceci créant des courbures dans l'axe local de l'ADN de 16 et de 43 degrés (Figure 11). CENP-B est une protéine très conservée parmi les mammifères, particulièrement les domaines N-et C-terminaux qui présentent 100% d'homologie entre l'homme et la souris (Okada et al., 2006).

CENP-B est la seule protéine centromérique pour laquelle il a été démontré une

reconnaissance de l'ADN alphasat. Elle interagit avec une courte séquence de 17 pb, appelée boîte CENP-B, présente dans un monomère d'ADN α -SAT de type I sur deux (Ikeno, H Masumoto, et T Okazaki 1994);(H Masumoto et al. 1989). La boîte CENP-B est présente sur les séquences d'ADN α -SAT de type I de tous les chromosomes sauf du chromosome Y, ce qui reste inexplicable (K Yoda et T Okazaki 1997). La fixation de CENP-B sur l'ADN alphasat est tributaire de la présence de trois sites essentiels dans la boîte CENP-B (Figure 23). De plus, trois motifs CpG sont présents dans un monomère d'ADN α -SAT de 171 pb, et deux d'entre eux sont situés au niveau de la boîte CENP-B. Il est intéressant de noter que la méthylation de ces deux motifs empêche la fixation de CENP-B (Figure 4, (Yoshinori Tanaka, Hitoshi Kurumizaka, et Shigeyuki Yokoyama 2005).

Grâce à sa fixation à l'ADN et à sa dimérisation, CENP-B jouerait un rôle dans l'arrangement de la chromatine centromérique en une structure complexe dont un modèle possible est celui du solénoïde (Figure 24). Dans ce modèle, CENP-B serait capable de relier deux boîtes CENP-B adjacentes ou disposées sur deux brins parallèles du solénoïde (Figure 24) (Muro et al. 1992). Il a été démontré que CENP-B influençait le positionnement des nucléosomes centromériques contenant aussi bien l'histone H3 que la protéine CENP-A. En effet, les courbures de l'ADN ($16^\circ + 43^\circ$, voir figure 23) créées par la fixation de CENP-B, permettent à cette dernière d'adopter une configuration spatiale spécifique importante pour son rôle dans le positionnement des nucléosomes. De ce fait, CENP-B permet de restreindre la mobilité des nucléosomes sur l'ADN, ce qui stabilise la chromatine centromérique ((Yoshinori Tanaka et al. 2005);(K Yoda et al. 1998)).

Récemment une étude chez la levure a montré que l'homologue de CENP-B favorisait le maintien de l'intégrité génomique pendant la réplication en empêchant la fourche de réplication de se bloquer le long de l'ADN des Long Terminal Repeats (LTR) des rétrotransposons contenus dans le génome de la levure (Zaratiegui et al. 2011). Cette nouvelle fonction aurait comme finalité d'empêcher la fourche de rester bloquée trop longtemps et ainsi favoriser la création de recombinaisons homologues dans les LTR concernés. Cette fonction empêche donc les dommages à l'ADN dus aux recombinaisons homologues et préserve donc l'intégrité du génome de la levure. Si un tel rôle dans la préservation du génome est conservé chez l'homme, il n'est alors pas étonnant de trouver une augmentation d'auto-anticorps dirigés contre CENP-B dans certains cancers du poumon (Briasoulis et al. 2008). Si cette protéine est détruite, la stabilité du génome risque d'être perturbée et les risques d'aneuploïdie et donc de cancers seront donc plus importants.

Récemment, un homologue de CENP-B chez la famille de lépidoptères *Spodoptera frugiperda* a été mis en évidence (d' Alençon et al. 2011). Il s'agit d'une découverte intéressante car c'est la première fois que CENP-B est mise en évidence chez des animaux invertébrés mais également car les centromères de cette espèce sont holocentriques, c'est à dire qu'ils représentent la majeure partie des chromosomes. Il s'agit d'une découverte importante pour mieux comprendre l'organisation structurale de tels centromères/chromosomes.

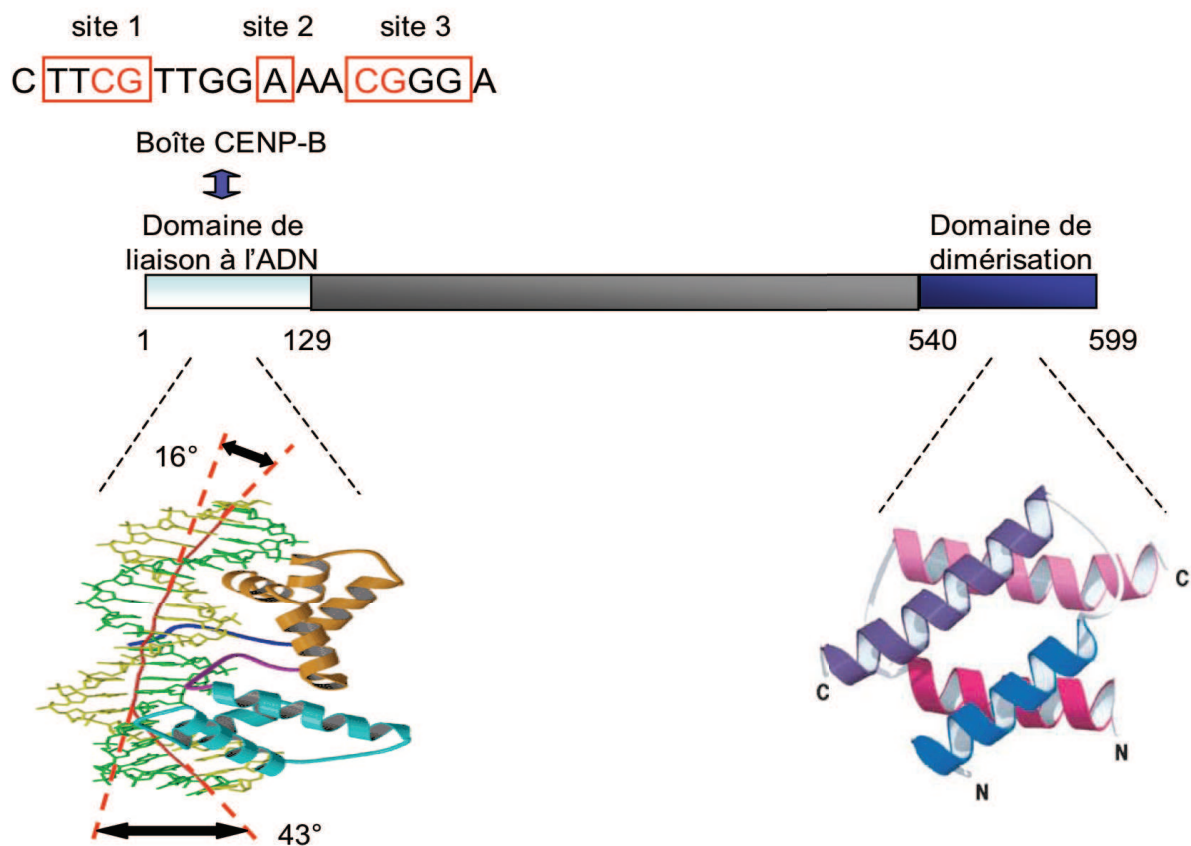


Figure 23. Représentations schématique et cristallographique de la protéine CENP-B et de ses interactions

Les structures cristallographiques des domaines d'interactions majeures sont représentées en dessous de la représentation linéaire. La région de liaison à l'ADN est composée d'un bras terminal (bleu), puis de deux domaines hélice-tour-hélice (orange et cyan) séparés l'un de l'autre par une boucle (magenta). Les deux brins d'ADN sont représentés en vert et en jaune, l'axe local de l'ADN est représenté en rouge. Les courbures créées dans cet axe (pointillés rouges) par la fixation de CENP-B correspondent à des angles de 16° et 43° (doubles flèches noires). La séquence de la boîte CENP-B et les trois sites essentiels pour la fixation de CENP-B sur l'ADN α -satellite (encadrées en rouge) sont également représentés. Dans ces sites, les motifs CpG sont écrits en rouge. L'interaction entre les régions de dimérisation de deux protéines CENP-B est représentée sous le domaine de dimérisation. Chaque région de dimérisation est composée de deux hélices alpha organisées de façon antiparallèle (hélices violette et bleue pour une protéine, rose et rouge pour l'autre) séparées par une boucle.

3.2.2 *Rôle de CENP-B dans la néoformation des centromères*

Seuls les Chromosomes artificiels bactériens (BAC) contenant une boîte CENP-B sont capables de constituer *de novo* des chromosomes artificiels Humains (HACs) indépendants possédant un centromère fonctionnel (Jun-ichirou Ohzeki et al. 2002) (Voir chapitre 3.4). La boîte CENP-B est donc indispensable à la formation de HACs. Cela dit, l'interaction entre CENP-B et la boîte CENP-B n'est pas suffisante car il faut que celle-ci soit présente dans des séquences alphasat de type I. Une caractéristique de l'ADN α -SAT, autre que la présence de boîtes CENP-B, est donc requise pour générer des HACs. Cette caractéristique pourrait être la richesse de la séquence nucléotidique de l'ADN alphasat en bases A/T qui est environ de 60%. Le fait que les seuls points communs entre l'ADN alphasat humain et son homologue chez la souris soient la présence d'une boîte CENP-B et la composition riche en A/T, favorise cette hypothèse (Hiroshi Masumoto, Megumi Nakano, et Jun-Ichirou Ohzeki 2004). Les études sur la boîte CENP-B montrent de façon indirecte l'importance de la protéine CENP-B dans la néoformation des centromères. Récemment, une étude a finalement démontré l'implication directe de CENP-B dans la néoformation des centromères par l'utilisation de cellules murines déficientes pour son expression. Cette étude montre entre autre que la protéine CENP-B est indispensable à l'assemblage de la protéine centromérique majeure CENP-A sur la chromatine centromérique (Masahiro Okada et al. 2006).

3.2.3 *Rôle de CENP-B dans la maintenance épigénétique du centromère*

L'hétérochromatine est un constituant majeur des centromères présente dans les régions péri-centromériques. Elle est caractérisée notamment par la triméthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine en position 9 (K9), par une hypoacétylation générale des histones, et par la présence de la protéine HP1, une des protéines spécifiques de l'hétérochromatine (Fuks 2005). Des données montrent que CENP-B intervient dans la formation de l'hétérochromatine, en favorisant la triméthylation en K9 de l'histone H3 péri-centromérique (Teruaki Okada et al. 2007). Comme mentionné précédemment, elle est également requise pour le recrutement de CENP-A sur la région centrale peu condensée du centromère. Ainsi, CENP-B joue deux rôles apparemment antagonistes dans la modulation épigénétique de la structure chromatinienne centromérique. CENP-B apparaît désormais comme un régulateur

des modifications d'histones. En effet, une première étude chez la levure a démontré que les homologues de CENP-B sont nécessaires pour modifier les niveaux d'acétylation et de méthylation de l'histone H3. Ceci entraîne le recrutement sur la chromatine de la protéine Swi6, l'homologue de HP1 chez la levure, démontrant l'importance des homologues de CENP-B dans la mise en place de l'hétérochromatine péri-centromérique (Nakagawa et al. 2002). L'étude d'Okada et collaborateurs vient appuyer cette hypothèse, cette fois dans un modèle humain (Okada et al., 2006).

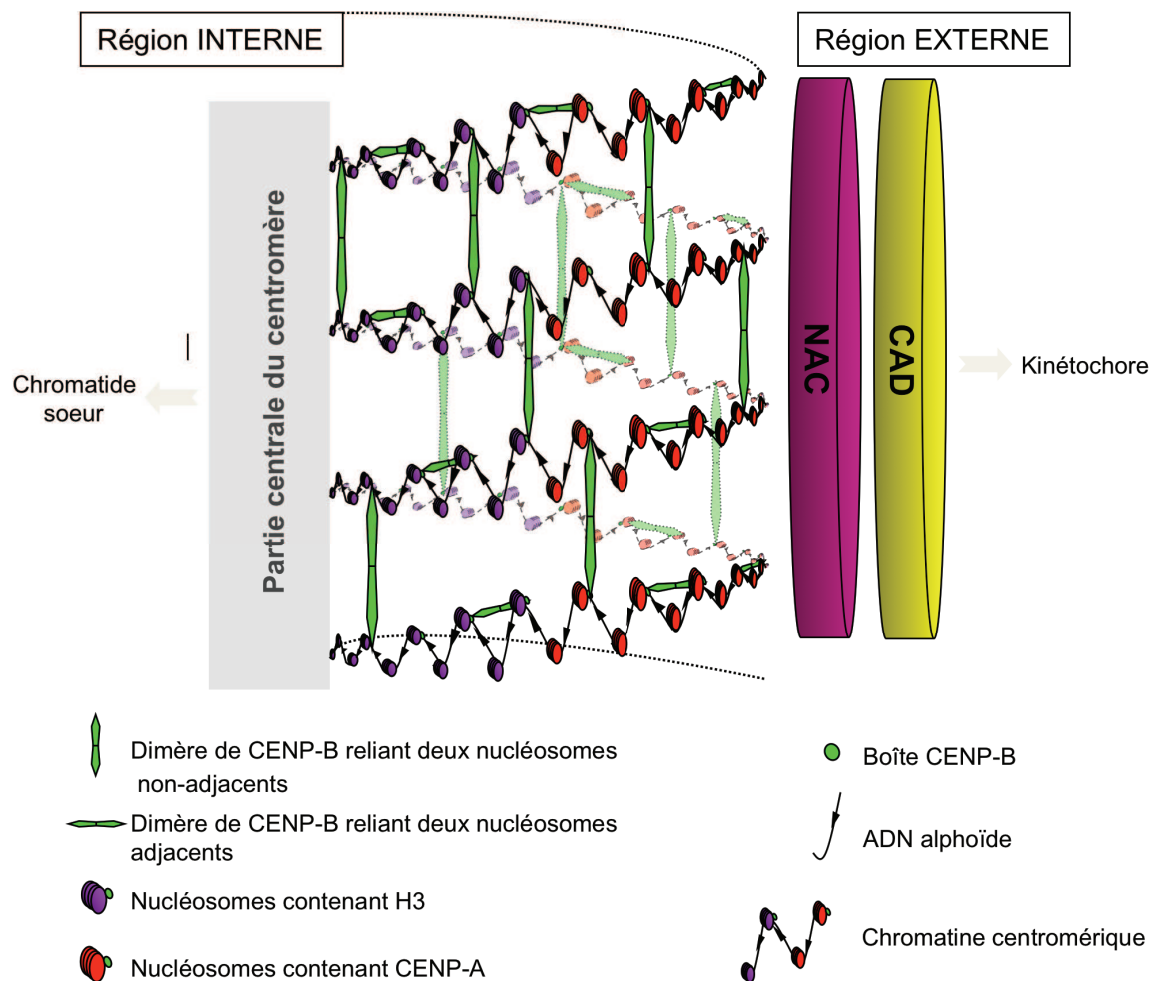


Figure 24: Représentation schématique de la chromatine centromérique et des interactions CENPB/boîte CENP-B

La structure en solénoïde est le modèle actuellement proposé pour représenter la structure 3D de la chromatine centromérique. Cette chromatine est composée de nucléosomes contenant l'histone H3 du côté interne (en vis-à-vis avec l'autre chromatide sœur) et de nucléosomes contenant CENP-A du côté externe (en vis-à-vis avec le CAD et le NAC). Un monomère de 171 pb (flèches noires s'enroulant autour des nucléosomes) sur deux contient une boîte CENP-B. On suppose que les dimères de CENP-B peuvent organiser la chromatine centromérique en liant les nucléosomes deux à deux sur le même tour d'hélice lorsque les boîtes CENP-B sont adjacentes, et sur deux tours d'hélice distincts lorsque les boîtes CENP-B sont superposées.

3.3 La protéine CENP-C

Généralités

CENP-C est une protéine constitutive de 140 kDa et se lie à l'ADN directement grâce à un domaine de liaison à l'ADN (Sugimoto et al. 1994). Ce domaine, situé dans la région centrale se superpose à la région nécessaire à la localisation de la protéine aux centromères (C H Yang et al. 1996). Le domaine proposé comme liant l'ADN *in vitro* a été montré comme nécessaire dans la reconnaissance de l'ADN centromérique *in vivo*, (Politi et al. 2002).

CENP-C est localisée à l'intérieur des kinétochores dans les chromosomes mitotiques (H Saitoh et al. 1992) et est associée avec les centromères actifs pendant le cycle cellulaire. Il y a un pic d'expression de la protéine en phase G1 (Knehr et al. 1996), supposant un rôle de la protéine dans le contrôle du cycle cellulaire. CENP-C est une protéine uniquement présente sur les centromères actifs ((W C Earnshaw et C A Cooke 1989) (B A Sullivan et S Schwartz 1995)).

Elle contient un domaine central responsable de son ciblage au niveau des centromères, un domaine chevauchant celui-ci responsable de la fixation à l'ADN non spécifique ; En C-terminal, elle possède un domaine de dimérisation (Sugimoto et al. 1997).

Une déplétion de la protéine chez *C.elegans* résulte en un phénotype sans formation de kinétochore, avec une incapacité totale pour la cellule de ségréger ses chromosomes en mitose, et une incapacité à recruter les composants centromériques. Une telle déplétion résulte également en un fuseau mitotique instable (Oegema et al. 2001). L'incapacité à séparer les 2 centromères « sœurs » a également été signalée en l'absence de CENP-C (L L Moore et M B Roth 2001).

Le domaine C terminal de CENP-C partage une partie de sa séquence avec la protéine centromérique Mif2 (homologue de CENP-C chez *S.cerevisiae*) (P B Meluh et Koshland 1995). Lorsque Mif2 est mutée, les chromosomes se séparent mal lors de la mitose (M T Brown, Goetsch, et Hartwell 1993). Cependant cette région d'homologie de CENP-C avec Mif2 n'est pas nécessaire pour la localisation de CENP-C aux centromères.

Interactions de CENP-C avec d'autres protéines nucléaires

Chez l'homme, les nucléosomes contenant CENP-A sont capables de former des complexes avec les protéines CENP-B et CENP-C, au niveau des régions de l'ADN alphasatellite contenant des CENP-B boxes. CENP-A est en effet capable d'interagir avec CENP-C, via l'extrémité C terminale de CENP-A (Carroll, Milks, et Straight 2010). CENP-B et CENP-C se localisent sur le même type d'ADN alpha satellite (Type 1), mais au niveau de séquences bien distinctes et non superposées sur les centromères (Politi et al. 2002). Du fait de l'implication de la protéine CENP-A et de la boîte CENP-B dans la formation et le maintien d'une structure centromérique intégrée, on peut fortement supposer, de par sa participation à un complexe avec ces protéines, que CENP-C joue également un rôle dans la formation d'un centromère fonctionnel. Cela dit, la présence de la protéine CENP-C uniquement ne permet pas la formation d'un centromère (T Fukagawa et al. 1999), mais CENP-C est essentielle pour la ségrégation correcte des chromosomes et la survie cellulaire (Kalitsis et al. 1998). En effet la disruption de la protéine mène à un blocage des cellules en mitose et la formation d'irrégularités morphologiques cytoplasmiques et nucléaires. L'injection d'anticorps anti CENP-C dans des cellules induit des retards mitotiques et la formation de kinétochores plus courts et moins nombreux (Tomkiel et al. 1994), mais seulement si ces anticorps sont injectés avant la prophase, ce qui suggère que les anticorps interfèrent avec la localisation de CENP-C aux centromères.

La localisation de CENP-C au niveau des centromères est dépendante de la présence de CENP-A, de CENP-H et de CENP-I dans les cellules DT40 de poulet ((T Fukagawa et al. 2001), (Howman, Fowler, Newson, Redward, A C MacDonald, Kalitsis, et K H Choo 2000b),(Ai Nishihashi et al. 2002)).

Une étude a montré que des siRNAs dirigés contre CENP-C induisaient une mauvaise localisation des protéines CENP-K, CENP-H, CENP-I et CENP-T et une réduction partielle de la quantité de protéine CENP-A au niveau des centromères (Carroll, Milks, et Straight 2010). C'est également dans cette étude qu'il est prouvé que CENP-C se lie directement à la chromatine CENP-A et que, avec la protéine CENP-N, CENP-C constitue le socle triprotéique sur lequel les autres protéines centromériques et kinétochoriales vont s'assembler (Carroll, Milks, et Straight 2010).

Il a été montré que CENP-C interagissait également avec CENP-B, et les domaines nécessaires à cette interaction sont homologues à ceux présents sur Mif 2 (l'homologue de

CENP-C chez *S.cerevisiae*), ce qui aiderait la protéine à se localiser au niveau des centromères, du fait de l'interaction de CENP-B avec la CENP-B box (Nobutaka Suzuki et al. 2004).

CENP-C est un bon candidat pour avoir un rôle dans la reconnaissance de la chromatine centromérique, en effet différentes études structurales et fonctionnelles ont identifiées plusieurs régions de CENP-C chez l'homme qui peuvent se lier à l'ADN directement et qui sont nécessaires pour la localisation de CENP-C aux centromères ((Sugimoto et al. 1994), (Sugimoto et al. 1997), (C H Yang et al. 1996), (Politi et al. 2002) (Trazzi et al. 2002), (Trazzi et al. 2009)).

Récemment une étude a montré que la surexpression des protéines CENP-C et CENP-T dans des cellules humaines était nécessaire et suffisante à la formation d'un kinétochore fonctionnel (Gascoigne et al. 2011).

En dehors des protéines centromériques, CENP-C interagit avec la protéine hDaxx, une protéine à domaine de mort impliquée dans l'apoptose médiée par la voie Fas. Cette interaction pourrait avoir un rôle dans la signalisation cellulaire induite par une défaillance centromérique d'origine structurale ou autre (Pluta, W C Earnshaw, et I G Goldberg 1998).

3.4 La protéine HMIS12

HMis12 se localise au centromère indépendamment de CENP-A. Cette protéine est conservée au cours de l'évolution chez *S. pombe*, *S. cerevisiae* et chez l'homme. Des homologues ont été également décrits chez d'autres mammifères, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* mais pas chez la drosophile (Goshima et al. 2003). HMIS12 se localise sur le centromère au cours du cycle cellulaire. Sa déplétion résulte en une mauvaise ségrégation des chromosomes et par une perte de CENP-I et CENP-H, mais elle n'a aucun effet sur la localisation de CENP-A. Ces résultats montrent que les protéines fondatrices du kinétochore se rassemblent dans un processus complexe d'interaction et d'interdépendance.

3.5 Les protéines du NAC et du CAD

Récemment, deux complexes protéiques associés aux centromères ont été mis en évidence. A eux deux ils sont composés d'une dizaine de protéines, ils ont été mis en évidence par purification TAP-TAG avec la protéine CENP-A (Foltz et al. 2006). Une autre étude, parue conjointement, décrit ces complexes sous le terme de « complexe CENP-H-I » (Masahiro Okada et al. 2006).

Le complexe le plus proximal, appelé CENP-A Nucleosome Associated Complex (ou NAC) est composé des protéines CENP-M, CENP-N, CENP-T, CENP-U et CENP-H et est directement associé à la chromatine contenant CENP-A.

Ce complexe a un rôle dans la ségrégation des chromatides sœurs en mitose, mais les rôles exacts des protéines du complexe ne sont pas encore bien connus, surtout ceux des 3 protéines les plus récemment découvertes, CENP-M, CENP-N et CENP-T.

3.5.1 *CENP-H*

Une des protéines qui a été le plus étudiée est la protéine CENP-H, mise en évidence par Sugata et al. (Sugata, Munekata, et K Todokoro 1999). C'est une protéine constitutive, de 247 acides aminés et qui contient un site de localisation nucléaire (NLS) avec un domaine coiled coil. Elle est capable de se dimériser ce qui laisse présager une fonction biologique associée.

Il a été montré que CENP-H était essentielle pour la viabilité cellulaire et pour l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique (Amaro et al. 2010). Elle est nécessaire pour la localisation de CENP-C, et de CENP-A au niveau des centromères (T Fukagawa et al. 2001) (Masahiro Okada et al. 2009), par contre, en absence de CENP-C, CENP-A et CENP-H localisent correctement au niveau des centromères (Carroll, Milks, et Straight 2010), ce qui laisse supposer que le recrutement de CENP-C se fait en aval de CENP-A et CENP-H.

3.5.2 *CENP-I*

CENP-I est une protéine constitutive de 87KDa, qui colocalise avec CENP-A, -C et -H au cours du cycle cellulaire (Ai Nishihashi et al. 2002). Elle présente une considérable

similarité de séquence avec la protéine Mis6 de *S.Pombe*, protéine requise pour la localisation de Cnp1 au niveau du core centromérique.

En l'absence de CENP-I, les cellules se bloquent en prométaphase avec des chromosomes mal alignés. Certaines cellules peuvent cependant passer la mitose mais sans effectuer la cytokinèse. CENP-I et CENP-H sont nécessaires à la localisation de CENP-C mais pas de CENP-A (Ai Nishihashi et al. 2002). CENP-I semble également être nécessaire à la localisation de CENP-F, MAD-1 et MAD-2 au niveau du kinétochore (Song-Tao Liu et al. 2003), en effet sa déplétion mène à la non présence de ces protéines au niveau du kinétochore.

Okada et ses collaborateurs (Masahiro Okada et al. 2006) ont identifié plusieurs sous-unités du complexe CENP-H-I conservés chez les vertébrés. Ils ont montré que ce complexe est divisé en trois groupes fonctionnels et physiques, contenant CENP-H et CENP-I et neuf autres protéines, dans les cellules de poulet et humaines. Ces protéines ont des fonctions multiples pour faciliter la bonne ségrégation du chromosome. En particulier, ils ont montré que le complexe CENP-H-I contribuait à l'incorporation efficace des CENP-A nouvellement synthétisées sur les centromères. De plus, plusieurs phénotypes observés par la même équipe suggèrent que le complexe CENP-H-I possède également des fonctions autres que l'incorporation de CENP-A. Ceci suggère que les complexes CENP-H-I sont également nécessaires pour l'interaction avec d'autres complexes centromériques et aident à établir un kinétochore fonctionnel. Ces résultats soutiennent l'idée que les complexes CENP-H-I jouent le rôle de marqueur centromérique pour l'incorporation de CENP-A nouvellement synthétisées.

3.5.3 *CENP-N et autres protéines*

CENP-N, une autre protéine du CENP-A NAC est capable de se lier aux nucléosomes CENP-A. CENP-N est nécessaire pour le bon positionnement aux centromères des protéines CENP-I, CENP-H et CENP-K mais également de la protéine CENP-A.

L'importance de la protéine CENP-T et plus particulièrement de sa phosphorylation dans la formation du kinétochore a récemment été mise en évidence (Gascoigne et al. 2011).

Très récemment, 13 nouvelles protéines centromériques ont été découvertes en utilisant une approche protéomique nouvellement mise au point, la Multiclassifier Combinatorial Proteomics (MCCP) (Ohta et al. 2010). Ces protéines sont Ska 3, CENP-Y, CENP-Z et

CENP-27 à CENP-36. Une de ces protéines, CENP-32, apparaît déjà comme étant importante pour l'alignement correct des chromosomes en mitose.

Le centromère apparaît donc comme une structure de plus en plus complexe. La même étude prédit que 97 protéines supplémentaires restaient à être découvertes au niveau du kinétochore, ce qui avec les 13 récemment découvertes, fait doubler le nombre de protéines associées aux centromères déjà connues. Le centromère peut donc être considéré comme une des structures protéiques les plus complexes de la cellule.

3.6 La chromatine péricentromérique

3.6.1 Généralités

Dans cette section je voudrais illustrer brièvement à quel point les péricentromères sont devenus des régions de plus en plus importantes dans la formation et le maintien des centromères :

Les péricentromères sont formés d'hétérochromatine constitutive, la méthylation de H3 sur la lysine 9 (K9) permet le recrutement de la protéine HP1 (heterochromatin protein 1), qui sert à la propagation de cette hétérochromatine en recrutant elle même des méthyltransférases, telle que Suv39h1), qui va méthyler les queues N terminales des histones H3 en K9.

HP1 peut également recruter des DNA methyltransférases, qui vont méthyler l'ADN environnant et de ce fait renforcer la formation de l'hétérochromatine.

Il existe trois sous types de HP1 : HP1 α HP1 β et HP1 γ et sont toutes les 3 associées à l'hétérochromatine, sauf HP1 γ , qui peut également être associée à l'euchromatine. (Pour revue voir (Kwon et Workman 2011)).

Il a été observé que HP1 et l'hétérochromatine étaient présentes dans la chromatine péricentromérique (Maison et al. 2002) confirmant ainsi que la chromatine qui entoure les centromères est bien de l'hétérochromatine. La perte de HP1 α au niveau des péricentromères chez la souris aboutit à des défauts dans la cohésion des centromères et dans la ségrégation des chromosomes pendant la mitose, ceci souligne l'importance pour les chromosomes d'avoir une chromatine péricentromérique structurée correctement (Guenatri et al. 2004). De plus, Quivy et collègues (Quivy et al. 2004) ont prouvé que HP1 α pouvait s'associer avec CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1) au niveau de l'hétérochromatine

péricentromérique. Les auteurs supposent que cette interaction a comme objectif de maintenir la conformation hétérochromatique correcte sur certains loci, de sorte à ce que lorsque ces loci doivent se répliquer, l'organisation hétérochromatique soit conservée. Cette interaction pourrait également avoir un rôle dans l'empêchement d'une propagation de HP1 α aberrante.

Une autre étude réalisée chez la levure par Mellone et collègues (Mellone et al. 2003) montre que lorsque la méthylation de H3K9 est perdue, l'homologue de HP1 chez la levure ne se localise plus correctement sur l'hétérochromatine, et ceci résulte en une mauvaise ségrégation des chromosomes. De ce fait, les localisations de H3K9me et de HP1 au niveau de l'hétérochromatine semblent être des caractéristiques moléculaires conservées au cours de l'évolution.

L'ensemble de ces études démontre que la chromatine péricentromérique est en fait de l'hétérochromatine et que ce type de chromatine semble avoir été conservé au cours de l'évolution, des levures jusqu'aux mammifères. Il y a sûrement plusieurs raisons à cette conservation. Premièrement l'hétérochromatine est plus compacte que l'euchromatine, il apparaît donc logique que la région impliquée dans le maintien de la cohésion entre les chromatides sœurs pendant la mitose soit en mesure de résister aux forces de tension exercées par les microtubules, avant et pendant la séparation physique des chromatides.

Deuxièmement, le péricentromère, comme son nom l'indique, entoure le centromère. Si cette région ne se trouvait pas sous une forme plus compacte que les centromères, alors ceux ci pourraient se propager aux régions alentour, ce qui aurait des conséquences désastreuses sur l'expression des gènes avoisinants, en provoquant également des problèmes de ségrégation des chromosomes. Vu sous cet angle, les péricentromères agissent comme une barrière servant à confiner la chromatine centromérique au niveau d'un locus particulier, et par la même assurer que le locus centromérique ait toujours la même localisation et la même taille au cours des générations.

3.6.2 *Incorporation de l'histone H3.3 au niveau des péricentromères*

Le dépôt de H3.3 implique diverses protéines chaperonne d'histones (Szenker, Ray-Gallet, et Almouzni 2011). Par exemple le régulateur d'histone HIRA fait partie d'un complexe important pour le dépôt de H3.3 *in vitro*. HIRA est requise pour le dépôt de H3.3 pendant la spermiogénèse chez les mouches (Loppin et al. 2005), et probablement chez les souris (Tagami et al. 2004). Un autre complexe associé à H3.3 contient les protéines DAXX

(Death Domain Associated) et ATRX (Alpha-Thalassemia/mental Retardation X-Linked Syndrome). Dans ce complexe, DAXX sert de chaperonne à H3.3 et requiert ATRX pour l'enrichissement en H3.3 au niveau de sites spécifiques tels que les télomères et les péricentromères ((Aaron D Goldberg et al. 2010);(Drané et al. 2010);(Lewis et al. 2010)). ATRX se lie préférentiellement aux éléments répétitifs riches en G, prévus ou connus pour former les structures « G-quadruplex », qui incluent des répétitions satellites télomériques et pericentromériques chez la souris (Martin J Law et al. 2010).

La perte d'ATRX chez l'homme cause des défauts de cohésion de chromosomes qui mènent à une mauvaise ségrégation, (Ritchie et al. 2008) et des mutations dans l'homologue de ATRX chez la drosophile affectent le silencing hétérochromatinien (Emelyanov et al. 2010).

3.7 Les modifications post-traductionnelles des histones centromériques et péricentromériques

La chromatine centromérique (CEN) est ancrée dans l'hétérochromatine et donc on pourrait s'attendre à ce qu'elle contienne des modifications hétérochromatiques des histones. Sullivan et Karpen (Beth A Sullivan et Gary H Karpen 2004) ont démontré que le spectre des modifications des histones de la chromatine centromérique chez l'Homme et chez *Drosophila melanogaster* était distinct de celui trouvé dans l'euchromatine et l'hétérochromatine adjacente. On peut supposer que ce mode distinct de modifications contribue à l'organisation unique du domaine centromérique et à sa structure tridimensionnelle, et / ou à l'information épigénétique qui détermine l'identité centromérique.

Les modifications épigénétiques des histones définissent les différents domaines fonctionnels de la chromatine et, souvent, dans un mode combinatoire. Ces modifications sont donc des indicateurs de la chromatine active ou réprimée. Par exemple, l'acétylation des histones H3 et H4, et la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 sont principalement liées à l'euchromatine et à l'activité transcriptionnelle. La méthylation de H3K4 est généralement associée à la chromatine active transcriptionnellement, alors que la méthylation de H3K9 représente de la chromatine silencieuse. De plus, les différents états de méthylation (mono-, di- ou triméthylation) d'un même résidu d'acide aminé fournissent différents niveaux de régulation épigénétique. Par exemple, la diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3

(H3K4me2) est associée à de la chromatine dite "permissive" qui est ou bien active ou bien potentiellement active. La triméthylation de H3k4me3 est, elle, liée à l'activité transcriptionnelle. Par contre, H3K9me2 ou H3K9me3 marquent respectivement l'hétérochromatine facultative ou constitutive chez les mammifères. La seule modification épigénétique décrite pour CENP-A est la phosphorylation de la sérine 7 par Aurora B (S G Zeitlin, Shelby, et K F Sullivan 2001). Cette modification n'est pas présente chez la souris et il est donc peu probable qu'elle joue un rôle important dans la fonction du centromère. Une autre modification qui caractérise la chromatine centromérique est une modification épigénétique, en l'occurrence une diméthylation, celle de l'histone H3 en lysine 4 (K4). Cette diméthylation est associée en général à une chromatine ouverte mais non active transcriptionnellement (Beth A Sullivan et Gary H Karpen 2004). Une étude effectuée par Sullivan et ses collègues (K F Sullivan, Hechenberger, et Masri 1994) sur la méthylation des histones H3 centromériques chez l'homme et la drosophile, a montré que le marquage de la di ou triméthylation de H3K9 apparaissait uniquement dans les régions péri-centromériques. Ils ont aussi démontré que H3K4me2 pouvait être trouvée dans la chromatine centromérique et colocalisait souvent avec le signal CENP-A. Cependant, elle se trouve en grande partie dans la région centromérique adjacente à la chromatine péri-centromérique. Concernant la modification H3K9me3, elle est présente sur les séquences péri-centromériques situées bien au delà de la chromatine centromérique en comparaison à H3K9me2. Il n'a pas été trouvé d'acétylation de l'histone H3 sur le centromère. Il apparaît donc que la chromatine centromérique soit composée d'une combinaison particulière des modifications d'histones, que les auteurs ont nommé «centrochromatine ».

Il semblerait donc que la chromatine centromérique ne soit pas autant hétérochromatinisée que ce qui était initialement envisagé. En effet, la présence des modifications de H3K4me2 en bordure des centromères indique que la chromatine centromérique est permissive pour la transcription, ce qui pourrait expliquer pourquoi les gènes situés sur les néocentromères puissent encore être transcrits. En 2006, Lam et ses collègues (Lam et al. 2006) ont rapporté des informations concernant la séquence d'ADN centromérique et CENP-A. En effet, leur étude a montré que sur un centromère normal, environ 30-50% de l'ADN α SAT d'ordre supérieur est occupé par CENP-A et H3K4me2, et le reste de la séquence d'ADN α SAT est rassemblé en hétérochromatine facultative (c'est-à-dire contenant H3K9me2) sans CENP-A. De chaque côté de la séquence d'ADN α SAT d'ordre supérieur se trouve le péri-centromère, où on peut trouver la modification H3K9me3 (c'est-à-dire de l'hétérochromatine

constitutive). Lorsque les auteurs ont surexprimé la protéine CENP-A, ils se rendirent compte que CENP-A pouvait envahir l'hétérochromatine voisine. En effet, cette chromatine centromérique s'étendait sur l'ADN α SAT (les signaux H3K4me2 et CENP-A colocalisaient) et la modification H3K9me2 était diminuée dans les régions avoisinantes, sans changer les modifications sur le péricentromère (c'est-à-dire du H3K9me3). Ainsi, il semblerait que lorsqu'un centromère s'étend, il ne chevauche pas avec le péricentromère mais diminue l'hétérochromatine facultative se trouvant sur l'ADN α SAT dans la région intermédiaire (contenant H3K4me2) entre Centromère et Péricentromère. Ces données indiquent que la chromatine centromérique possède une certaine plasticité, mais il semblerait y avoir une barrière qui empêche la propagation plus importante de la chromatine centromérique dans le péricentromère et *vice-versa*. Les auteurs se rendirent compte également qu'il semblerait y avoir également une compétition entre CENP-A et H3 (Lam et al. 2006). La fixation du kinétochore sur une face du centromère et la cohésion interchromatidienne de l'autre devrait normalement conduire à une parité entre CENP-A et H3.

Récemment Mravinac et ses collaborateurs (Mravinac et al. 2009) ont examiné la répartition des histones modifiées dans les régions centromériques de plusieurs chromosomes X. La méthylation de H3 sur la lysine 4 coïncide avec la présence du site DXZ1 (un site alpha satellite d'ordre supérieur) pour la localisation de CENP-A et l'assemblage du kinétochore. Dans cette même étude ils ont montré que la localisation de CENP-A et l'assemblage du kinétochore étaient limités à une portion définie de l'ADN alpha-satellite. Ils ont aussi montré que le centromère X humain contenait plusieurs types de chromatines, et était organisée d'une manière similaire aux petits centromères des eucaryotes.

3.8 Les centromères de Souris (*mus musculus*)

L'organisation du centromère de la souris est nettement différente de celle de l'homme, en effet, il existe certaines différences entre les séquences centromériques et péricentromériques chez la souris). Il existe une relative simplicité de structure en séquences répétées par rapport aux centromères humains : les satellites mineurs sont présents au niveau des centromères et les satellites majeurs sont présents au niveau des péricentromères. Ceci permet d'étudier les centromères de façon beaucoup plus aisée que chez les primates (et particulièrement l'homme) chez qui il n'est pas si simple de

différencier les 2 types de séquences centromériques et péricentromériques. Chez la souris, un seul type de séquence peut être étudié à la fois.

Les chromosomes chez la souris sont dits acrocentriques, c'est à dire que le centromère est situé à une extrémité des chromosomes, et sont donc de fait à proximité des télomères.

3.8.1 Le centromère

Il est composé de séquences riches en AT appelées satellites mineurs et localisées donc à proximité des télomères (Figure 26). L'unité de base de ces répétitions est un monomère de 120 pb s'étalant sur 600kb et présents sur tout les chromosomes (K H Choo 1997). Ils représentent 0,45% du génome murin. Ces monomères présentent une grande homologie de séquence (79% 31/39 nucléotides) entre ses deux moitié de 60 pb (A K Wong et Rattner 1988). Certains monomères possèdent une séquence spécifique de 17 pb reconnaissant la protéine CENP-B et appelée la boîte CENP-B (Voir paragraphe CENP-B). Tous les chromosomes possèdent la boîte CENP-B, excepté le chromosome Y. Cette boîte CENP-B est l'unique séquence conservée entre les rongeurs et les primates.

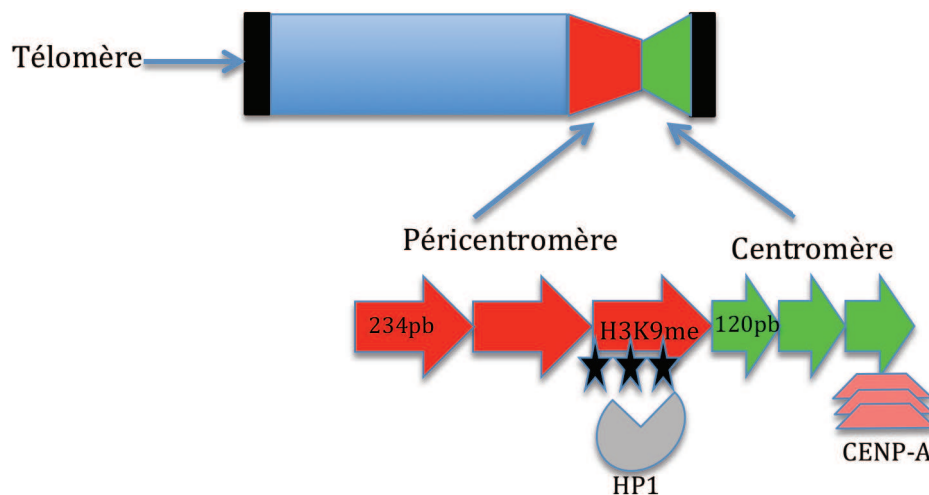


Figure 25: Représentation schématique des centromères de *mus musculus*

Un nucléosome est composé de 4 histones différentes, chaque histone H2A, H2B, H3 et H4 est présente en deux exemplaires, les queues N-terminales sont représentées également et sont composées de 20 à 30 acides aminés chacune. Les variants connus des différentes histones sont indiquées en marge de chaque protéine.

3.8.2 Le péricentromère

Les péricentromères murins sont situés dans la région adjacente des centromères et sont composés de séquences appelées satellites majeurs, également riches en séquences AT. (Figure 12). L'unité de base des satellites majeurs a une taille de 234pb et s'étale sur plus de 6Mb (A K Wong et Rattner 1988). Ces séquences représentent 3% du génome murin (Martens et al. 2005), voir table 1).

| Types de satellites | Séquence |
|---------------------------|--|
| Satellites mineurs 120 pb | GGAAAATGATAAAAACCACACTGTAGAACATATTAG ATGAGTGAGTTACTACTGAAAAACACATTCGTTGGAA ACGGGATTTGTAGAACAGTGTATATCAATGAGTTAC AATGAGAAACAT |
| Satellites majeurs 234 pb | GGACCTGGAATATGGCGAGAAAAGTAAAATCAGC GAAAATGAGAAATACACACTTTAGGACGTGAAATAT GGCGAGGAAAAGTAAAAGTGGAAAATTTAGA AATGTCCACTGTAGGACGTGGAATATGGCAAGAAA ACTGAAAATCATGGAAAATGAGAATCCACTTGAC GACTTGAAAATGACGAAAATCACTAAAAACGTGA AAAATGAGAAATGCACACTGAA |

Table 1: Séquences centromériques et péricentromériques de *M.musculus* (D'après (A K Wong et Rattner 1988))

3.9 Transcription et centromères

Un dogme communément admis concernant les centromères est que cette région ne permet pas la transcription. En effet, plusieurs études ont montré que lorsqu'un gène était déplacé au niveau des centromères ou était à leur niveau, il était dans la plupart des cas réprimé, et aucun transcrit ne pouvait être détecté. De plus, depuis longtemps, les chercheurs ont échoué dans leurs tentatives de démontrer une association physique entre les centromères et les RNA polymérases, ou bien encore de détecter des ARN qui soient d'origine centromériques. Nagaki et collègues (Nagaki et al. 2003) ont cependant montré qu'il existait des gènes non réprimés au niveau des centromères d'*Arabidopsis*, contrairement à ce qui est connu chez l'homme et chez la mouche. Dans les centromères de Maïs, la transcription est aussi possible. Effectivement, des ARNs provenant de retrotransposons centromériques et des répétitions centromériques sont maintenant détectables. En fait près de la moitié des ARNs extraits des cellules sont liés à l'homologue de CENP-A, et les deux brins de la molécule d'ARN sont associés avec cette protéine (Topp, Cathy X Zhong, et Dawe 2004). Les auteurs

proposent que la transcription centromérique pourrait être impliquée dans l'établissement de « l'état centromérique ». De la même manière, Bouzinba-Segard et collègues (Bouzinba-Segard, Guais, et Francastel 2006) ont démontré que des transcrits centromériques pouvaient être détectés dans des cellules de souris également. Ces ARNs sont d'origine centromérique également et ont une taille de 2 à 4 kb. Au cours du temps ces transcrits s'accumulent sous forme de molécules plus petites, atteignant jusqu'à 120 pb seulement dans certains cas, notamment lorsque les cellules sont confluentes. Les auteurs montrent que cette transcription centromérique est régulée au cours du temps et qu'elle doit être liée à des changements d'organisation nucléaire (Ferri et al. 2009). Finalement, lors de conditions de stress ou de différenciation, des transcrits péri-centromériques ont été détectés où ils pourraient participer à l'hétérochromatinisation de ces régions, grâce à un mécanisme encore inconnu (Valgardsdottir et al. 2008).

Il a récemment été découvert que l'ARN est un élément essentiel de l'hétérochromatine constitutive ((Muchardt et al. 2002), (Maison et al. 2002)). Ceci a incité plusieurs groupes à la recherche des transcrits spécifiques susceptibles de participer à la structure de l'hétérochromatine. *S. pombe* est le seul organisme dans lequel un ARN spécifique accomplissant cette fonction a été identifié. En effet, chez *S. pombe*, les petits ARNs double brin (dsRNA) générés par un mécanisme dépendant de RNAi sont impliqués dans l'établissement et le maintien des régions hétérochromatiques. Il a été surprenant de constater que ces ARNs sont codés par les régions péri-centromériques qui ont longtemps été considérées transcriptionnellement silencieuses (pour revue voir (Grewal et Jia 2007)). L'existence d'éléments conservés au sein de l'organisation générale des répétitions centromériques et péri-centromériques chez la levure, la souris et l'homme plaide en faveur d'un rôle conservé des transcrits dérivés des centromères et des péri-centromères à travers ces espèces. À l'appui de cela, des évidences montrent que les séquences centromériques et péri-centromériques sont transcriptionnellement compétentes dans divers contextes biologiques dans les cellules de mammifères. Malgré l'identification des transcrits de l'ADN satellite chez la souris (J Harel et al. 1968), la structure des transcrits centromériques et péri-centromériques est encore mal caractérisée. En effet, la nature répétitive de leur séquence complique fortement leur analyse (pour revue voir (Angeline Eymery, Callanan, et Claire Vourc'h 2009)).

Ferri et ses collaborateurs (Ferri et al. 2009) ont examiné l'implication des transcrits d'ARNs à partir des satellites mineurs murins dans la formation et la fonction des complexes associés

au centromère. Ils ont montré dans leur étude que les niveaux de ces transcrits variaient au cours du cycle cellulaire, atteignant leur niveau maximal dans la phase G2/M. Ces ARNs s'associent avec les protéines du complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex) telles que Aurora B et la Survivine afin de favoriser une interaction spécifique d'Aurora B avec la chromatine CENP-A au début de la mitose. De plus, l'activité kinase d'Aurora B peut être potentialisée par les ARNs des satellites mineurs. Une diminution de l'activité d'Aurora B après une déplétion des ARNs peut être spécifiquement sauvée par la restitution de ces transcrits. Ces données fournissent une nouvelle fonction des transcrits à partir des satellites mineurs en tant que partenaires clés et régulateurs du complexe mitotique Aurora B.

Il existe également des preuves que la transcription des séquences centromériques et péricentromériques joue un rôle dans les principales fonctions génomiques chez la levure (Choi et al. 2011). Chez les mammifères, y compris l'homme, il a été montré que les séquences satellites sont activement transcrites suite à un stress (Angeline Eymery, Callanan, et Claire Vourc'h 2009), mais la signification fonctionnelle de cette expression est encore mal comprise. Pour la première fois, Eymery et ses collaborateurs (Angéline Eymery et al. 2009) ont étudié l'état d'expression des séquences centromériques et péricentromériques. Ils ont analysé leur expression dans une série de cellules et tissus humains normaux et cancéreux. Leurs résultats montrent que l'expression de ces séquences est réprimée dans tous les tissus normaux, sauf dans le testicule, où des transcrits du péricentromère ont été trouvés. De plus, des séquences péricentromériques sont spécifiquement exprimées dans des cellules soumises à un HS (Heat-Shock = choc thermique). Ceci suggère que l'expression des séquences centromériques et péricentromériques pourrait représenter un bon indicateur de la dérégulation épigénétique survenant en réponse aux changements de l'environnement. Ces transcrits pourraient aussi représenter des marqueurs supplémentaires pour la détection des cancers et d'autres maladies liées à une croissance cellulaire anormale.

Valgardsdottir et ses collaborateurs (Valgardsdottir et al. 2008) ont étudié l'expression des transcrits d'ARNs à partir des séquences d'ADN satellite III (SatIII) de l'hétérochromatine péricentromérique, dans des cellules humaines non stressées et dans d'autres en réponse à différentes conditions de stress. En accord avec les données précédentes ((Rizzi et al. 2004) (Jolly et al. 2004)), ils avaient également prouvé que le choc thermique provoquait une augmentation drastique des ARNs SatIII. Il est intéressant de mettre en lien les données concernant la réactivation du virus HSV-1 par choc thermique (Clement et al. 2009) et l'activation transcriptionnelle des séquences péricentromériques. En effet, cette activation

transcriptionnelle pourrait induire la réactivation du génome viral. Les séquences centromériques sont fortement susceptibles d'exercer une influence positive sur la transcription des gènes avoisinants, donc possiblement ceux du génome viral de HSV-1. Notre équipe a en effet pu mettre en évidence un lien très étroit le positionnement du génome de HSV-1 au niveau des centromères et l'expression du transcrit LAT pendant la latence dans une proportion de neurones en latence non négligeable. Ceci pourrait signifier que lors de la latence, le génome viral soit la cible de la répression créée par la chromatine centromérique (d'où l'expression du LAT) et que, lors de la réactivation, par HS par exemple, les modifications induites par ICP0 (notamment) au niveau des centromères (Voir résultats chapitres 1 et 2) auraient pour conséquence d'ouvrir transcriptionnellement la chromatine centromérique pour que cette région puisse être transcrite de nouveau (par propagation épigénétique peut-être).

Les exemples cités ci-dessus montrent que le dogme de non transcription centromérique n'est plus valide. Il semblerait qu'il existe une transcription au niveau du centromère. La transcription ne serait pas aussi importante que celle de l'ARNm à partir de l'ARN Pol II ordinaire, mais elle serait apparemment liée à la formation de l'hétérochromatine. Le fait que la plupart des transcrits centromériques soient rapidement clivés en petits ARNs, tels que les siARN, pourrait expliquer pourquoi il était si difficile de les détecter. En tout cas, le lien précis qui existe entre la chromatine centromérique et la transcription est susceptible de devenir une cible de recherche importante à l'avenir.

3.10 Néocentromères et chromosomes dicentriques

3.10.1 Néocentromères

Au cours de la division cellulaire, le centromère est essentiel pour la stabilité et la bonne ségrégation des chromosomes chez les eucaryotes. Prédire l'endroit et le mécanisme pour la formation du centromère s'avère assez difficile. Normalement, chez la plupart des eucaryotes pluricellulaires, les centromères sont localisés dans des régions chromosomiques spécifiques. Une meilleure compréhension de la structure du centromère humain est importante pour élucider sa fonction et les conditions de leurs formations.

En 1993, la découverte d'un nouveau centromère ectopique chez l'homme (Voullaire et al. 1993) a apporté des informations importantes. Depuis la découverte et la caractérisation du

premier néocentromère, une soixantaine de néocentromères humains distribués largement dans l'ensemble du génome ont été décrits. Les centromères ont été longtemps considérés comme des structures physiquement stables, s'établissant sur des séquences d'ADN α -SAT et entourés par une hétérochromatine péri-centromérique. Ce nouveau centromère ou néocentromère est dépourvu de toutes les caractéristiques de l'ADN centromérique « classique » et est formé dans des régions d'euchromatine. C'est essentiellement un centromère fonctionnel qui apparaît spontanément où aucun centromère n'est censé être, avec des protéines centromériques et des marques épigénétiques nécessaires pour la création d'un complexe structural ADN / protéines fonctionnel. La formation des néocentromères demeure l'un des exemples les plus étonnants de modifications épigénétiques soudaines dans le génome. Les néocentromères humains ont permis d'établir une étude détaillée sur l'organisation de la chromatine centromérique qui n'est pas possible sur les séquences alpha-satellites hautement répétées présentes sur les centromères endogènes (pour revue voir (Owen J Marshall et al. 2008)).

Une autre étude effectuée par Ketel et ses collègues (Ketel et al. 2009) a démontré que *C. albicans* possédait un petit centromère natif et pouvait former des néocentromères quand la séquence d'ADN normale était perdue. Les chromosomes résultants de ces modifications sont propagés de manière stable. Ces néocentromères se forment ou bien très proche de la position du centromère perdu ou bien sur d'autres positions tout au long du bras du chromosome comme sur les télomères. Les néocentromères peuvent se placer sur de nouvelles positions chromosomiques. Cette étude sur la formation et le mouvement de néocentromère chez *C. albicans* a permis l'analyse du mécanisme de l'assemblage et du maintien du centromère nouvellement formé (Ketel et al. 2009).

Des néocentromères ont été détectés chez les enfants ayant un retard de développement ou des anomalies congénitales (G Gimelli et al. 2007). Ils ont également été détectés dans au moins deux types de cancers humains (pour revue voir (Owen J Marshall et al. 2008)). Des données actuelles effectuées chez l'homme et la mouche indiquent que l'activité du néocentromère est acquise par des modifications épigénétiques plutôt que par des modifications de la séquence ADN (pour revue voir (Owen J Marshall et al. 2008)), de plus une étude effectuée chez *S. pombe* montre la forte possibilité qu'un événement épigénétique survienne pour amorcer la formation d'un néocentromère (Ishii et al. 2008).

Malgré toutes ces données, le mécanisme exact de formation des néocentromères chez l'homme est encore assez obscur, cela dit, certains modèles existent (Figure 27).

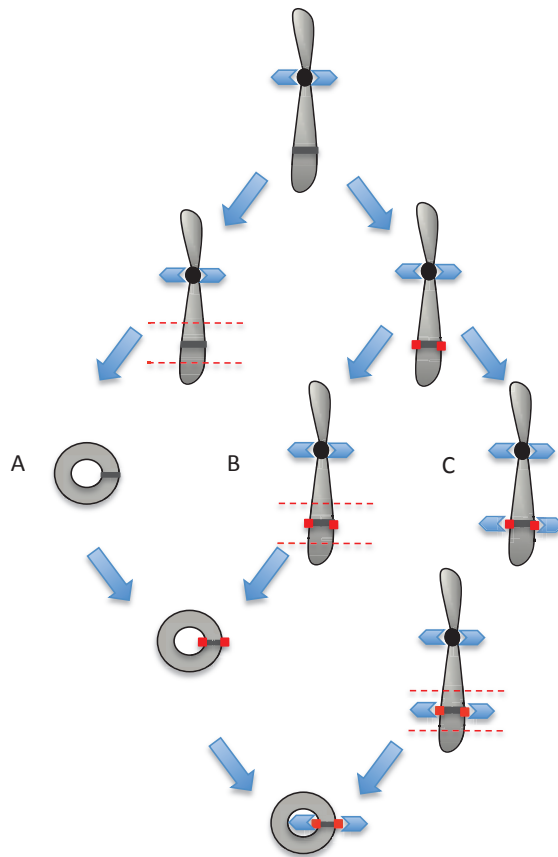


Figure 26: Formation des néocentromères (D'après (Amor et K H Andy Choo 2002))

Les néocentromères humains peuvent se former en mitose ou en méiose, grâce à un mécanisme impliquant très probablement l'acquisition de marques épigénétiques, suivie de la formation d'un kinétochore. Certaines régions chromosomiques sont prédisposées à former des néocentromères, possiblement grâce à la présence de séquences riches en AT, ou des caractéristiques hétérochromatiques. La formation d'un chromosome contenant un néocentromère est dépendante de trois étapes: (1) Le réarrangement chromosomique, avec la génération d'un fragment acentrique (dans cet exemple, le réarrangement est une délétion paracentrique résultant en la formation d'un chromosome réarrangé et d'une boucle néocentromérique). (2) L'acquisition de marques épigénétiques requises pour la formation d'un centromère et (3) la formation d'un kinétochore fonctionnel. Le timing exact de ces événements les uns par rapport aux autres n'est pas connu. Il est possible que le réarrangement chromosomique soit le premier événement (A), suivi de l'acquisition de marques épigénétiques puis formation d'un kinétochore. Une autre possibilité est que le réarrangement chromosomique ait lieu entre l'acquisition des marques épigénétiques et la formation du kinétochore (B), ou, de façon moins probable, le réarrangement chromosomique pourrait succéder à la formation du kinétochore (C).

Saffery et ses collègues (R Saffery, D V Irvine, Griffiths, Kalitsis, Wordeman, et al. 2000) ont démontré que les protéines du kinétochore se liaient de façon identique sur le centromère normal et sur le néocentromère malgré l'absence des séquences α -SAT sur ce dernier. Le même groupe a montré que, dans le cas des néocentromères, la transcription des gènes était

toujours possible (Richard Saffery, Sumer, Sara Hassan, et al. 2003). Cela indique que la formation des néocentromères est régulée de manière à empêcher le chromosome d'être perdu mais sans inhiber la transcription de la séquence sous-jacente, ce qui pourrait être aussi dangereux que l'absence totale d'un centromère.

3.10.2 *Les chromosomes dicentriques*

Un autre défaut d'organisation centromérique est illustré par les chromosomes dicentriques (Figure 28) (chromosomes avec deux centromères, composé à la fois de α SAT et CENPs). Seul un des deux est actif et fonctionnel et possède toutes les protéines centromériques qui lui permettent de subir le contrôle du « check-point » mitotique (R Saffery, D V Irvine, Griffiths, Kalitsis, et K H Choo 2000).

Le mécanisme désignant le centromère actif n'est pas connu à ce jour. Le premier chromosome dicentrique étudié a montré que CENP-A se trouvait sur le centromère actif même si les deux centromères contenaient des séquences d'ADN de type α -SAT (P E Warburton et al. 1997). Comment un centromère peut-il apparaître à un nouvel endroit du chromosome ? L'explication la plus évidente est qu'il y a eu un changement dans la séquence d'ADN par une transposition d'une séquence fonctionnelle à partir d'un centromère préexistant. Suite à l'augmentation de la longueur d'une séquence répétée en tandem, l'ensemble fonctionne comme un centromère. La formation de néocentromères se produit rarement, mais ils constituent probablement un événement important dans le réarrangement de certains chromosomes humains et dans leur évolution (pour revue, voir (Owen J Marshall et al. 2008)).

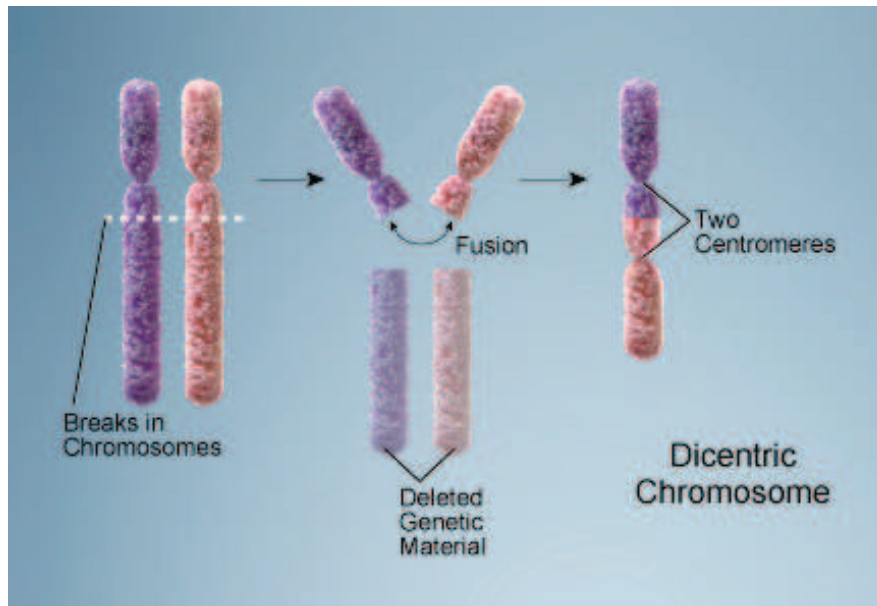


Figure 27: Formation de chromosomes dicentrique (US National library of médecine)

Après la formation de cassures dans les bras des chromosomes rose et violet, ceux-ci vont être capables de fusionner pour donner naissance à un chromosome dicentrique comportant deux centromères.

3.11 La répression génique associée aux centromères

Les dernières découvertes concernant les centromères nous montrent donc qu'au delà de l'assemblage du kinétochore et la division des chromatides au cours de la mitose, ils sont impliqués dans de nombreux mécanismes régulant la physiologie de la cellule. En effet, il est très probable que les centromères aient un autre rôle dans la répression génique. Cela a été suggéré à plusieurs reprises sans vraiment être démontré complètement. Toutefois, quelques données indiquent qu'il existe un lien entre les centromères et les gènes réprimés. Cette fonction des centromères dans la répression des gènes est importante dans la considération de l'association de ces séquences avec le génome viral de HSV-1 comme il sera vu ultérieurement (Voir résultats chapitre 3)

Des associations entre centromères et des nucléoles ont déjà été décrites dans des cellules murines (Haaf, C Steinlein, et Schmid 1990), ainsi que dans d'autres espèces (Ochs et R I Press 1992). L'observation des centromères à la périphérie ou même à l'intérieur du nucléole pourrait être due à l'association de l'hétérochromatine centromérique à des gènes ribosomiques réprimés. Cela pourrait suggérer un rôle des centromères dans la régulation de la transcription.

Il existe aussi des facteurs qui sembleraient induire la répression génique telle que la protéine Ikaros qui est un régulateur de la transcription dans les lymphocytes murins (Georgopoulos, D D Moore, et Derfler 1992). Cette protéine possède un doigt de zinc qui lui confère la capacité de lier l'ADN de façon site spécifique et il est supposé qu'Ikaros recrute les gènes à réprimer vers des foci centromériques (et plus particulièrement péri-centromériques) supposément dédiés à la répression génique ((Brown, Guest, et al. 1997) ; (Cobb et al. 2000)). Ikaros ferait partie d'un complexe plus important dont une autre protéine, Helios, fait partie. Cette protéine jouerait un rôle dans la répression génique associée aux centromères en tant que régulateur de la protéine Ikaros (Hahm et al. 1998). Certains loci des lymphocytes T, tels que *Rag* et *Tdt*, sont réprimés au cours de la différenciation grâce à leur relocalisation au niveau des régions centromériques (Brown, Baxter, et al. 1999). Une autre étude la même année prouvait que les régions centromériques étaient en effet impliquées dans la répression génique (C Francastel et al. 1999) et que cette répression avait un rôle dans la régulation des loci géniques codant la β -Globine (Schübeler et al. 2000) chez l'homme et chez la souris (C Francastel, Magis, et Groudine 2001) (pour revue voir (C Francastel et al. 2000)). L'expression différentielle des différents allèles codants pour les différentes chaînes lourdes d'immunoglobulines dans les lymphocytes B semblent être également soumis à un mécanisme de répression centromérique, faisant intervenir la protéine Ikaros (Skok et al. 2001). Un autre exemple de répression génique concerne le choix de la lignée cellulaire CD4/CD8 au cours de la différenciation immunitaire des thymocytes. Il a été prouvé par FISH que le locus non exprimé (CD4 ou CD8) était associé à de l'hétérochromatine centromérique (plus particulièrement péri-centromérique) au cours du développement immunitaire ((Brown, Baxter, et al. 1999), (Matthias Merckenschlager et al. 2004)). Il s'agit donc d'un mécanisme d'expression différentielle bien conservé au cours de l'évolution dans lequel l'action répressive des centromères joue un rôle majeur.

Plus récemment, un autre exemple de répression, associée aux séquences péri-centromères a été mis en évidence. Il concerne la répression des gènes cibles du facteur d'élongation EF-2, qui se localisent près des péri-centromères lors de la différenciation de cellules musculaires (Guasconi et al. 2010).

Ces exemples indiquent clairement que la répression génique pourrait être contrôlée par le centromère lui-même (Figure 29). Ce mécanisme est loin d'être complètement élucidé, et méritera d'être plus étudié dans le futur. Il pourrait fournir un moyen simple à la cellule pour

réprimer d'une manière sélective des locus particuliers, en attendant le moment de leur réexpression, par un simple déplacement du locus loin du centromère. Il pourrait aussi jouer un rôle essentiel pour l'établissement de la latence lors de l'infection des neurones par le virus herpès simplex de type I (Voir chapitre I et résultats).

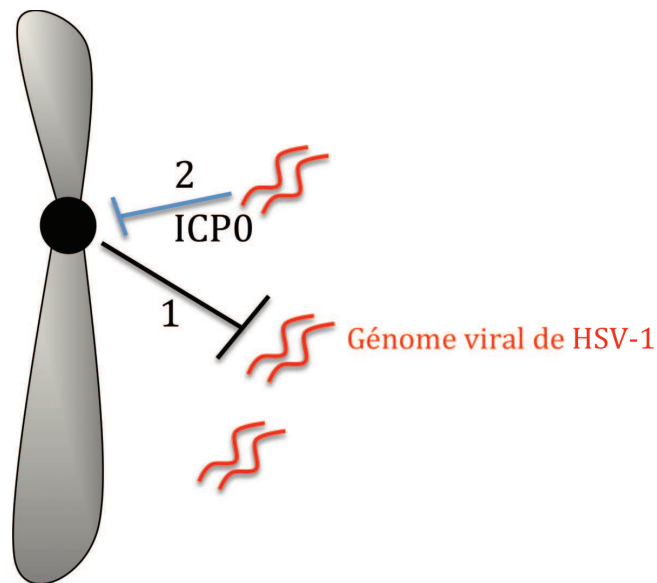


Figure 28: Mécanisme supposé de répression du génome viral de HSV-1 par les centromères et réponse du virus

Dans un premier temps on peut supposer que le génome viral va se localiser au niveau des centromères des cellules épithéliales (lors de la phase très précoce de l'infection), peut être pour s'intégrer ou exercer une action bien spécifique au niveau de cette région. La réponse de la cellule va être de réprimer grâce aux centromères le génome viral (1), par un mécanisme encore inconnu. Pour se défendre de ce mécanisme répressif, le virus aurait mis en place au cours de l'évolution un mécanisme de contre attaque visant à mettre hors d'état ces régions répressives centromériques en induisant la dégradation de la majorité de ses constituants protéiques mais également en induisant la désorganisation de la chromatine centromérique. (2) Cette désorganisation totale est le fruit de l'activité de la protéine ICP0.

4. LES CHROMOSOMES ARTIFICIELS

Les chromosomes artificiels sont des constructions génétiques qui se répliquent et ségrégent indépendamment des chromosomes endogènes, et se maintiennent ainsi au cours des générations ; il en existe trois grands types :

- Les chromosomes artificiels bactériens (en anglais, Bacterial Artificial Chromosomes ou BACs), qui sont circulaires et dérivent de plasmides bactériens.
- Les chromosomes artificiels de levure (en anglais, Yeast Artificial Chromosomes ou YACs) qui sont linéaires

et dérivent des BACs par ajout de séquences de levure tels que des télomères, des origines de réplication, et des marqueurs de sélection. - Les chromosomes artificiels humains (en anglais, Human Artificial Chromosomes ou HACs) qui sont soit linéaires, soit circulaires et sont dérivés des BACs ou des YACs par insertion de séquences chromosomiques humaines, notamment des séquences d'ADN α -SAT et des séquences télomériques.

4.1 Formation de HACs à partir de YACs et de BACs

Historiquement, ce sont les YACs (Murray et Szostak 1983) qui ont été utilisés les premiers pour construire des HACs, mais des études récentes ont montré qu'il est également possible d'utiliser les BACs comme vecteurs d'origine. Il n'y a pas de différence qualitative entre les deux approches, ce qui les différencie est la provenance des séquences (levure ou bactérie) des deux types de vecteurs, et la présence de télomères dans le cas des YACs.

L'ADN alphasat cloné originellement dans le YAC ou le BAC est dérivé des séquences α -SAT de type I du centromère du chromosome 21 humain ; le seul centromère dont la séquence nucléotidique soit entièrement connue. Dans ce centromère, l'ADN alphasat est organisé en unités répétées en tandem, chacune composée de 11 monomères de 171 paires de bases (Figure 30). Une fois cet ADN α -SAT de type I inséré (environ 70-100 kb), les séquences télomériques de levure du YAC linéaire sont remplacées l'une après l'autre par des régions flanquantes. Ces régions flanquantes (bras gauche et droit) contiennent des gènes permettant la sélection en cellules eucaryotes, et surtout des séquences télomériques provenant de chromosomes humains (Ikeno et al. 1998). À la suite de ces recombinaisons homologues (en anglais *retrofitting*) effectuées dans la levure, le YAC modifié est introduit par transfection ou microinjection dans des cellules fibroblastiques humaines HT1080. Les HACs formés à partir de BACs sont généralement circulaires. La formation de HACs à partir de BACs se fait selon un mécanisme encore inconnu, et le clonage des séquences alphasat se fait par cycles répétés, en insérant à chaque cycle l'unité d'ordre supérieur de 11 monomères de 171pb (Jun-ichirou Ohzeki et al. 2002).

Il est impossible d'obtenir des HACs à partir de séquences alphasat de type II, ce qui, est lié à l'absence de la séquence nucléotidique nécessaire à la fixation de la protéine CENP-B (Ikeno et al. 1998).

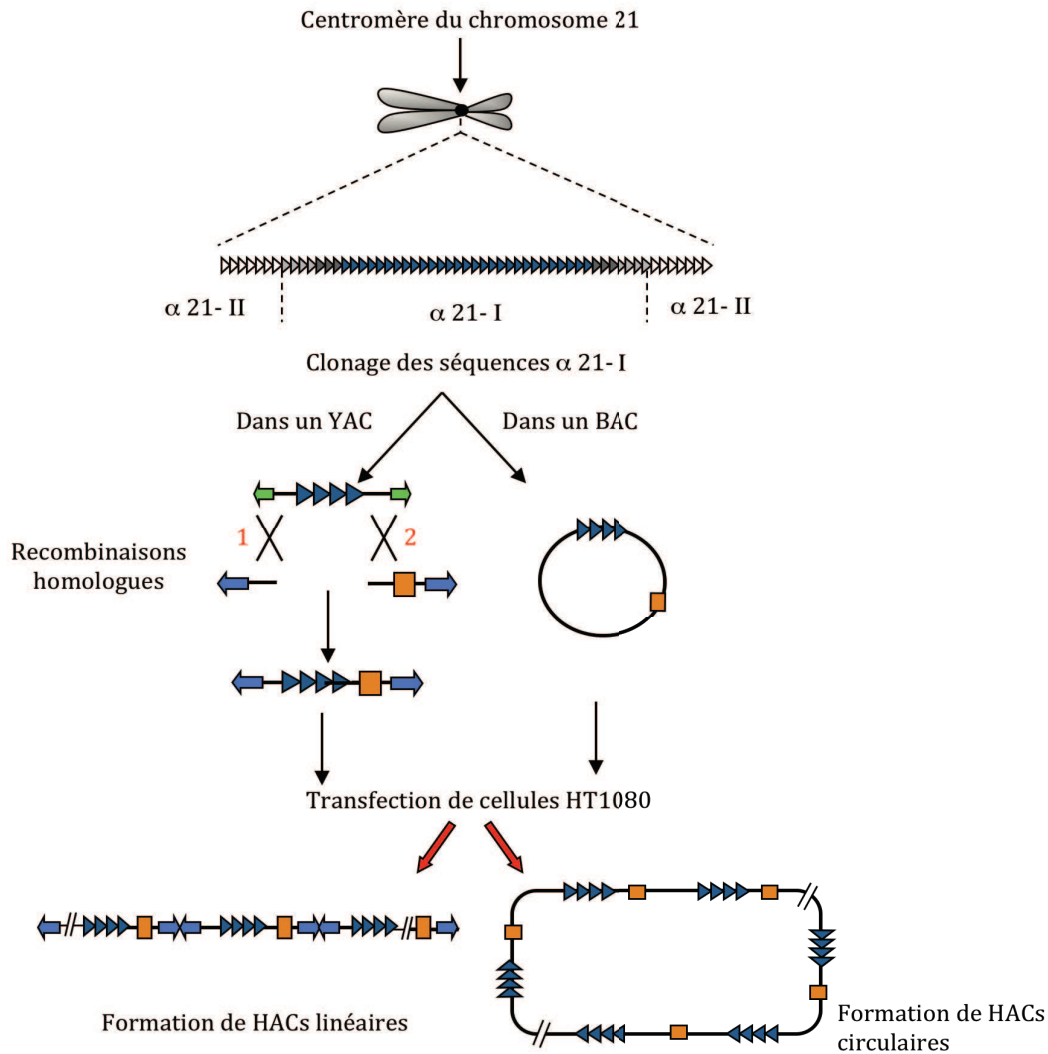


Figure 29: Construction de HACs à partir des séquences α -satellites de type I du chromosome 21

Les séquences d'ADN α -satellites de type I du chromosome 21 (α -21-I) sont clonées dans un YAC ou un BAC.

Concernant les YACs, les étapes de recombinaisons homologues (étapes 1 et 2) permettent de remplacer les séquences télomériques de levure (flèches vertes) par des séquences télomériques humaines (flèches bleues). La région droite flanquante de l'ADN α -satellite contient également un marqueur de sélection (carré orange). Après la transfection de cellules fibroblastiques humaines (HT1080) avec le YAC modifié ou le BAC, les HACs sont formés par amplification du matériel de départ (flèches rouges). Ces HACs sont majoritairement linéaires dans le cas d'YAC amplifié, et majoritairement circulaires dans le cas d'un BAC amplifié. α -21- II représente l'ADN α -SAT de type II.

4.2 Caractéristiques moléculaires des HACs

Dans tous les cas, il se produit une amplification de la construction après son introduction dans la cellule. La construction d'origine, d'une centaine de kilobases, s'organise en concatémères pour former des HACs de plusieurs mégabases. Cette multimérisation se fait par recombinaisons successives, et ne fait jamais intervenir d'acquisition de séquences chromosomiques de l'hôte ((Ikeno et al. 1998);(Masumoto, Nakano, et Jun-Ichirou Ohzeki 2004)). Après transfection, la construction est retrouvée sous deux formes dans le génome de l'hôte; Premièrement la forme extrachromosomique, capable de se répliquer et de se transmettre indépendamment, comme les chromosomes endogènes, on parle dans ce cas de chromosomes artificiels humains ou HACs. Si l'on exclut la perte du chromosome transfecté, la formation d'un HAC (en général un seul) est observée comme événement prédominant dans 30 à 40% des cellules. Dans les autres cas, il y a intégration du YAC ou du BAC dans les chromosomes endogènes, le plus souvent au niveau des télomères, et plus rarement dans les bras des chromosomes; ((Ikeno et al. 1998) (Megumi Nakano et al. 2003)).

Outre leur localisation intra ou extrachromosomique, ce qui différencie les HACs des YACs ou BACs intégrés, est l'assemblage des protéines centromériques sur les deux types de structures. Les protéines centromériques majeures CENP-A, CENP-B, CENP-C et CENP-E sont assemblées sur tous les HACs, mais pas sur les YACs ou BACs intégrés, où seulement un assemblage partiel de ces quatre protéines est observé (Jun-ichirou Ohzeki et al. 2002). De ce fait, seuls les HACs possèdent un centromère fonctionnel. Les HACs ségrégent comme les chromosomes endogènes. Ils sont alignés correctement sur la plaque équatoriale et leur mobilité en anaphase est similaire à celle des chromosomes endogènes, bien que la fréquence d'oscillation sur la plaque équatoriale soit plus importante dans le cas des HACs. La stabilité des HACs dépend de leur taille; plus elle est importante, plus ils sont stables (Tsuduki et al. 2006). Elle dépend également de la structure et de l'organisation générale du chromosome artificiel).

Bien que les HACs puissent être maintenus plusieurs mois dans les lignées cellulaires, les absences de séparation des chromatides soeurs et de retard en anaphase sont toutefois plus fréquentes pour les HACs par rapport aux chromosomes endogènes (M Katharine Rudd et al. 2003).

Le passage d'un état YACs ou BACs intégrés à un état HACs est possible suite à un

mécanisme d'excision qui fait intervenir un réassemblage des protéines centromériques et des événements de rupture chromosomique de l'ADN de l'hôte. Lors de ce processus de reformation des HACs, de l'ADN de l'hôte est souvent associé avec le HAC nouvellement formé ((M Katharine Rudd et al. 2003), (Nakashima et al. 2005)).

4.3 Utilisation des chromosomes artificiels

Les HACs sont un modèle de choix dans l'étude de la néoformation des centromères, car ils permettent d'étudier l'assemblage des protéines centromériques *de novo* sur une séquence connue d'ADN nu. De plus, les études concernant la genèse du centromère sont moins délicates à réaliser à partir de HACs que de chromosomes endogènes qui sont des structures génétiques déjà formées et complexes. Par exemple, un avantage par rapport aux centromères endogènes est la présence de séquences centromériques alphas de type I uniquement, c'est à dire issues de la région core centromérique, et pas de type II ou III, contenues normalement au niveau des péricentromères. Lors d'études qui nécessitent l'utilisation d'outils moléculaires issus de ces séquences alphas de type I, l'analyse des résultats obtenus sera plus facile car les données proviendront uniquement des séquences spécifiques des chromosomes artificiels et pas de plusieurs centromères à la fois ce qui peut rendre confuse l'interprétation des résultats.

Les chromosomes artificiels sont utilisés dans des applications fondamentales comme l'étude de fonction de différentes régions chromosomiques telles que les télomères qui peuvent être clonés dans de telles constructions ou bien des séquences centromériques.

Un autre exemple de l'utilisation des HACs en recherche fondamentale est l'étude de la néoformation des centromères par l'utilisation des HACs, qui a permis de mettre en évidence l'importance d'une part de CENP-B et d'autre part de l'environnement chromatinien dans la formation *de novo* des centromères ((Jun-ichirou Ohzeki et al. 2002); (Masumoto, Nakano, et Jun-Ichirou Ohzeki 2004)).

Les HACs peuvent être également utilisés dans l'étude de la fonction de gènes, par clonage d'une banque d'ADN génomique donnée dans de tels vecteurs. Des expériences de complémentation phénotypique permettent alors d'étudier la fonction et la régulation d'un gène donné, ceci grâce à leur capacité de clonage importante qui permet d'introduire des locus entiers (Heaney et Bronson 2006).

Les HACs, bien qu'outils de recherche fondamentale, sont des outils fréquemment utilisés

en recherche appliquée. Le domaine le plus prometteur d'utilisation des HACs dans cette branche de la recherche est la thérapie génique.

Des complémentations fonctionnelles ont déjà été réalisées avec succès, par exemple pour pallier la déficience du gène *HPRT1* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase 1*) dont le produit est impliqué dans le développement neuronal (Monaco et Moralli 2006).

Tout récemment (Yuichi Iida et al. 2010) un chromosome artificiel humain permettant l'expression conditionnelle du centromère pour effectuer de la thérapie génique a été construit, grâce à un système loxP. Ce nouveau HAC permet l'expression d'un transgène pendant une période donnée, et lorsque cette période est finie il suffira d'induire le HAC à s'autodétruire dans la cellule en dégradant les séquences centromériques contenues dans ces vecteurs. Ce nouveau système de chromosome artificiel est très intéressant car il permet de réduire la toxicité qui pourrait y avoir au niveau des cellules non cibles en évitant la propagation du HAC dans ces cellules et ainsi permettre l'expression du transgène uniquement ou presque dans les cellules cibles.

Récemment une étude a permis de construire un chromosome artificiel contenant le locus entier de 2,4Mb codant la protéine dystrophine humaine, ce qui est un grand pas en avant dans la thérapie contre la myopathie de Duchenne (DMD pour Duchenne Muscular Dystrophy) (Hidetoshi Hoshiya et al. 2009).

OBJECTIFS DE MA THESE

Le premier objectif de ma thèse a été d'approfondir l'étude amorcée par l'équipe concernant la déstabilisation des protéines centromériques sur les centromères endogènes. En effet, il était connu que les protéines CENP-A, -B et -C étaient déstabilisées par ICP0, mais qu'en était-il des autres protéines contenues dans les complexes centromériques multiprotéiques récemment mis en évidence, à savoir le CAD et le NAC ? J'ai donc consacré la première partie de cette étude à déterminer l'impact d'ICP0 sur le devenir des protéines constituant la charpente protéique du centromère interphasique. Si la structure protéique du centromère s'avérait effectivement sévèrement endommagée, nous pouvions nous demander ce qu'il adviendrait de la structure chromatinienne des centromères. Pour répondre à cette question, j'ai utilisé la technique de digestion à la MNase (Micrococcal Nuclease), de manière à déterminer de façon précise les modifications engendrées par ICP0 au niveau de la structure chromatinienne centromérique. Cette technique a été utilisée à la fois sur les centromères endogènes de cellules infectées par différents virus HSV-1, dans des cellules inductibles pour l'expression de différentes formes d'ICP0 mais également sur les structures artificielles HACs.

Le deuxième objectif de ma thèse a été de savoir si l'on pouvait utiliser le chromosome artificiel (HAC) comme un outil d'étude de la déstabilisation des centromères pour étudier la réponse iCDR. Les trois questions relatives à cet objectif ont été : Est-ce qu'ICP0 est capable de se relocaliser sur une structure centromérique artificielle (HAC), si oui, qu'en est-il de son activité déstabilisatrice des protéines CENP sur ces structures ? Et finalement est-ce que la réponse iCDR se déclenche sur les HACs endommagés ?

Enfin, une troisième partie de cette thèse est consacrée à une étude *in vivo* à laquelle j'ai participé. Cette étude a consisté à déterminer dans des neurones issus de ganglion trijumeaux de souris infectées par HSV-1, le positionnement nucléaire des génomes viraux latents vis-à-vis des centromères et l'influence de ce positionnement sur l'expression génique virale.

Je vais maintenant détailler toutes les techniques utilisées au cours de ma thèse puis les résultats obtenus pour chaque objectif de mon étude.

Matériel et Méthodes

1. LIGNEES CELLULAIRES ET SOUCHES VIRALES

1.1 Cellules utilisées

Différents types cellulaires ont été utilisées au cours de ma thèse :

Les cellules HeLa, issues d'un cancer du col de l'utérus, ont été cultivées à 37°C dans du milieu GMEM (Glasgow Modified Eagle's Medium) complémenté en sérum de veau fœtal (10%) et en streptomycine + pénicilline (1%).

Les cellules HeLa exprimant de manière constitutive CENP-H, -M, -N, -O, -P, -Q-GFP (Généreusement fournies par D. Foltz et I. Cheeseman, Ludwig Institute for Cancer Research, San Diego); HeLa TRex (TR, Invitrogen), TRex-ICP0 (TR-ICP0), and TRex-FXE (TR-FXE) ont été cultivées dans du DMEM, contenant 10% de sérum de veau fœtal, de la Glutamine L (1% v/v), et 1% de streptomycine + pénicilline. Pour les cellules T-REX, de la blasticidine a été ajoutée au milieu (5 µg/ml); pour les cellules TR-ICP0 et TR-FXE, de la blasticidine et de la zéocine (100 µg/ml) ont été ajoutées. Les lignées TR-ICP0 et TR-FXE, exprimant de manière stable et inductible les protéines ICP0 et FXE, respectivement, ont été construites en transfectant les cellules T-REX avec un plasmide pcDNA 4/TO (Invitrogen) conçu pour exprimer ICP0 ou FXE. Des clones cellulaires ont ensuite été isolés par sélection à la zéocine. L'expression d'ICP0 ou de FXE a été induite par induction à la tétracycline (1µg/ml) dans le milieu et vérifiée par Western blotting et immunofluorescence. La construction et la validation des lignées HeLa GFP-CENPs fût décrite dans (Foltz et al. 2006).

Les cellules HT1080 sont des cellules fibroblastiques humaines. Les cellules 7C5 HT1-2 (nommées YAC-Ext) et 7C5 HT1-19 (nommées YAC-Int) sont des cellules HT1080, qui contiennent respectivement un chromosome artificiel sous forme indépendante ou intégrée dans le génome. Ce chromosome artificiel est issu de la multimérisation d'un YAC. Les cellules W0210R8 (nommées BAC-Ext) et W0210R1 (nommées BAC-Int) sont également des cellules HT1080 qui contiennent respectivement un chromosome artificiel sous forme indépendante ou intégrée dans le génome. Ce chromosome artificiel est issu de la multimérisation d'un BAC. Ces quatre types de cellules ont été cultivés à 37°C dans du milieu DMEM GLUTAMAX + pyruvate complémenté en sérum de veau fœtal (10%) et en streptomycine + pénicilline (1%). Toutes ces lignées proviennent de l'équipe du Dr Hiroshi

Masumoto de l'université de Nagoya au Japon (Cellules « YAC », (Jun-ichirou Ohzeki et al. 2002), Cellules « BAC » (Ikeno et al. 1998)).

Les cellules NIH 3T3, issues de fibroblastes chez la souris ont été cultivées dans du DMEM complétement en sérum de veau fœtal (10%) et en streptomycine + pénicilline (1%).

1.2 Synchronisation des cellules

Les cellules HT1080 ont été synchronisées en G1/S par un double blocage à la thymidine. Les cellules ont été traitées avec de la thymidine à la concentration finale de 2 mM, pendant 19 heures, puis le milieu a été retiré, les cellules rincées trois fois au PBS 1X puis remises dans du milieu frais pendant 9 heures. Les cellules ont alors subi un deuxième traitement à la thymidine à la concentration finale de 2mM pendant 16 heures, le milieu avec thymidine a alors été retiré, et remplacé par du milieu frais pour permettre aux cellules de repartir dans le cycle cellulaire.

1.3 Infection par HSV-1 et transfections

Les virus utilisés pour les infections sont : HSV-1 17 syn + sauvage (HSV-1 17 syn +) ; un virus délété du gène codant ICP0 : le virus HSV-1 dl1403 (N D Stow et E C Stow 1986); et également un virus codant une forme tronquée dans le domaine RING Finger de la protéine ICP0 : le virus vFXE (Everett, Cross, et Orr 1993). Les cellules ont été infectées à une multiplicité d'infection (M.O.I.) de 10 par cellule (toutes les cellules sont infectées).

Pour le FISH et l'immuno-FISH: la veille de l'infection, les cellules ont été déposées sur lamelles dans des plaques de 24 puits à une concentration de 0,5 à 1×10^5 cellules par ml.

Pour les digestions MNase : la veille de l'infection, les cellules ont été déposées dans des boîtes de diamètre 60mm (pour les cellules HeLa) ou 100mm (pour les cellules HT1080 et NIH 3T3) à une concentration de 3×10^6 cellules par ml.

Pour certaines expériences de FISH et d'immuno-FISH, les cellules ont été transfectées par le plasmide pci110 (de 100 à 400ng) contenant la séquence codante de la protéine ICP0 en utilisant un kit de transfection effectène (Invitrogen)

2. L'HYBRIDATION FLUORESCENTE (FISH : FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION) ET L'IMMUNO-FISH

2.1 Obtention des sondes par PCR

Pour obtenir une sonde qui reconnaisse spécifiquement les centromères des chromosomes 21 et du HAC, un fragment de 1,9 Kb a d'abord été amplifié par PCR, à partir du plasmide p11.4 dans lequel l'ADN centromérique alphasatellite du chromosome 21 a été cloné (Généreusement fourni par H. Masumoto, Université de Nagoya Japon (Ikeno, H Masumoto, et T Okazaki 1994)). Les amorces utilisées (à une concentration finale de 1 μ M) sont les suivantes :

M13 U : 5'GTTGTAAAACGACGGCC 3'

M13 R : 5'CAGGAAACAGCTATGAC 3'

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume final de 50 μ L, en utilisant un master mix PCR Eppendorf 2,5X qui contient la Taq polymérase (1.25 U par réaction) et les dNTPs (à une concentration finale de 200 μ M pour chaque dNTP).Après une étape de 5 min. à 94°C, 28 à 40 cycles de PCR ont été réalisés, chacun des cycles étant composé d'une étape de dénaturation de 30 sec. à 94°C, d'une étape d'hybridation de 30 sec. à 60°C, et d'une étape d'élongation de 1,5 min. à 72°C.

Pour obtenir une sonde reconnaissant spécifiquement les séquences BACs dans les cellules BAC-Ext et BAC-Int, un fragment de 4660 pb a été amplifié par PCR à partir du plasmide pWTR11.32, qui est le BAC qui a été utilisé pour l'obtention de ces deux lignées. Les amorces utilisées (à une concentration finale de 1 μ M) sont les suivantes :

BACS : 5'GCTCGTCGACAGCGACACACTTGCATCGG 3'

BACX: 5'CCCTCGAGTGAGCGAGGAAGCACCAGGG 3'

La Taq polymérase est une TAKARA Z Taq (Takara) utilisée à 0,5 unité par réaction, dans un volume final de 20 μ L (le mix de dNTPs et le tampon 10X spécifiques de l'enzyme sont fournis avec cette dernière et utilisés selon les conditions préconisées par le fournisseur). Après une étape de 4 min. à 95°C, 30 cycles de PCR ont été réalisés, chacun des cycles étant composé d'une étape de dénaturation de 20 sec à 95°C, d'une étape d'hybridation de 10 sec à 55°C, et d'une étape d'élongation d'une minute à 72°C.

2.2 Le Marquage des sondes

2.2.1 La « nick-translation »

Les produits des deux PCR et le plasmide pYAC 5 (servant de matrice pour l'obtention d'une sonde reconnaissant spécifiquement les séquences YAC dans les cellules YAC-Ext) ont été marqués avec du dCTP-Cy3 (visible en fluorescence de 563 à 570nm), du dCTP-Cy5 (visible en fluorescence de 662 à 670 nm) ou du dUTP- biotine, grâce à un kit de « nick-translation » (Roche). Un mélange contenant de 100ng à 2 µg de l'ADN à marquer, du tampon 10X fourni dans le kit, 40µM de dATP, dTTP, dGTP, dCTP et dCTP-Cy3 ou dCTP-Cy5 (ou alors 40 µM de dATP, de dGTP et de dCTP, 20 µM de dTTP et 37,5 µM de dUTP-biotine dans le cas d'un marquage à la biotine), et 0,5 unité de l'enzyme fournie dans le kit, a été incubé trois heures à 15°C. La réaction a ensuite été arrêtée en ajoutant au mélange de l'EDTA à une concentration finale de 37,5µM et en incubant la solution 10 min. à 70°C. L'ADN marqué a ensuite été purifié sur une colonne G50 (GE healthcare), puis l'ADN a été précipité en ajoutant 150 µg d'ADN de sperme de saumon, 0,1 volume de NaOAc 3M pH 8 et 2,5 volumes d'Ethanol 100%.

2.2.2 L'amorçage aléatoire (ou Random Priming)

Une deuxième technique a été utilisée pour marquer les fragments de PCR et le plasmide pYAC5, il s'agit de la technique d'amorçage aléatoire ou « random priming ». Après dénaturation de 100 ng d'ADN pendant 10 min. à 95°C, un mélange contenant 25 µM de dATP, dTTP et dGTP et de dCTP-Cy3 ou de dCTP-Cy5 (ou alors 25µM de dATP, dGTP et dCTP, 20 µM de dTTP et 40µM de dUTP-biotine pour un marquage à la biotine) complété d'un mélange d'héxanucléotides et du fragment de Klenow de l'ADN polymérase, a été ajouté à l'ADN dénaturé et la réaction d'amorçage aléatoire a été effectuée 3 heures à 37°C. La réaction a été arrêtée en ajoutant de l'EDTA à 18 mM de concentration finale et en chauffant 10 min. à 70°C. Le produit de la réaction a ensuite été purifié sur colonne G50 (GE healthcare) et l'ADN a été précipité en ajoutant 100 µg d'ADN de sperme de saumon, 0,1 volume de NaOAc 3M à pH 8, et 2,5 volumes d'éthanol 100%.

2.3 Protocoles de FISH

2.3.1 *Sur chromosomes mitotiques*

Pour le FISH sur les chromosomes mitotiques, après l'étape de fixation au PFA 2% de 5 min., les chromosomes ont été déshydratés par un traitement de 30 min. à 37°C avec une solution 0,1% triton TX100 suivi d'un traitement à l'éthanol 70% pendant 5 min. puis de deux traitements à l'éthanol 100%. La suite du protocole est identique à celui sur cellules interphasiques (voir ci-dessous).

2.3.2 *Sur cellules interphasiques*

Le protocole utilisé sur cellules interphasiques est dérivé de (Solovei et al. 2002). La veille de la manipulation, les cellules ont été mises en culture sur lamelles dans des plaques 24 puits à une concentration de $0,5 \times 10^5$ à $1,5 \times 10^5$ cellules par puit. Après la fixation des cellules par du paraformaldéhyde (PFA) 2% pendant 10 min., les sites potentiels d'hybridation non spécifiques ont été saturés dans du PBS contenant 20 mM de glycine (PBS glycine). Ensuite les cellules ont été perméabilisées dans du PBS contenant 0,5% de triton TX-100, lavées deux fois 5 min. avec du PBS glycine puis rincées deux fois 5 min. dans du tampon standard 2X SSC. Une étape de dénaturation protéique dans sept bains successifs dans du citrate à ébullition a été réalisée dans les cas où le chromosome artificiel devait être visualisé (étape dite d' « unmasking »). Après deux nouveaux rinçages dans le 2X SSC, les protéines associées à l'ADN ont alors été dissociées de l'ADN avec de l'acide chlorhydrique 0,1M pendant cinq min. Les cellules ont ensuite été rincées deux fois 5 min. dans 2X SSC puis incubées deux fois 10 min. dans du 50% formamide-2X SSC. Les cellules ont alors été mises en contact avec 40 à 100 ng de sonde marquée (sans laisser sécher les cellules). Le mélange de la sonde avec du formamide a été préparé dans un volume équivalent de solution FISH (Solution de Dextran sulfate ; Solution de Denhardt 20X ; SSC 20X). Après scellage des lamelles sur des lames à l'aide de « Rubber cement », l'ADN a été dénaturé en chauffant la préparation 3 min. à 75°C, l'hybridation a alors été effectuée en incubant la préparation 16 à 18 heures à 37°C. L'excès de sonde a été éliminé en rinçant la préparation 3 fois 5 min. avec du 2X SSC à 37°C puis 3 fois 5 min. avec du 0,2X SSC, toujours à 37°C.

Pour les sondes marquées avec la biotine (voir ci-dessus), la préparation a été saturée 30 min. avec du 4X SSC/5% lait puis traitée avec de la streptavidine à 0,1 mM marquée avec le fluorochrome Alexa-Fluor 488, dans 4X SSC/5% lait pendant une heure. Pour enlever l'excès de streptavidine, 2 rinçages de 5 min. au 4X SSC, un traitement de 10 min. avec une solution 0,1% triton TX100-2X SSC puis de nouveau deux rinçages de 5 min. au 4X SSC ont été effectués. Après un marquage de l'ADN au Hoechst de 5 min. et 2 rinçages de 5 min. au 4X SSC, la préparation a été montée sur lame avec du milieu de montage Vectashield.

2.3.3 *Sur tissus congelés*

Les coupes de tissus congelées, conservées à -80°C, ont été décongelées, réhydratées dans du PBS 1X et perméabilisées dans du Triton X-100 0,5% pendant 20min. L'étape d'unmasking a été réalisée dans un four à micro-ondes dans du citrate 100mM, et les coupes ont été post-fixées en utilisant une méthode standard faisant intervenir du méthanol / acide acétique, puis séchées pendant 10min à RT. La dénaturation de l'ADN des sondes et des coupes a été réalisée à 80°C pendant 5min, et l'hybridation s'est effectuée pendant la nuit à 37°C. Le mix d'hybridation contenait 30ng de chaque sonde dans 10% dextran, 1X denhardt, 2XSSC, et 50% formamide. Les coupes ont été rincées 3x10min dans du 2XSSC et 3x10min dans du 0.2XSSC à 37°C, puis l'ADN a été marqué au Hoechst 33238 ou avec du ToPro3 (Invitrogen) pendant 10min. Toutes les coupes ont ensuite été montées sous coverslip avec du Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) et conservées à +4°C jusqu'à l'observation.

2.3.4 *Double FISH ADN/ARN sur tissus congelés*

Le FISH ARN a été réalisé selon le protocole décrit précédemment (Maillet, Naas et al. 2006). Les sondes d'ARN simple brin biotinylées ont été préparées par transcription *in vitro* (Ambion) en utilisant les plasmides pSLAT-2, pSLAT-4 and pSLAT-6 comme matrices (plasmides généreusement fournis par S. Efstathiou, Université de Cambridge, UK). Les coupes congelées ont été traitées comme décrit précédemment pour le FISH ADN jusqu'à l'étape de l'Unmasking en utilisant des solutions contenant 2mM RVC (Ribonucleoside vanadyl complex, Euromedex). Les coupes ont été préhybridées dans une solution contenant 50% formamide/2XSSC à 65°C pendant au moins 1H. 50ng de sonde contenue dans 50% formamide, 2XSSC, 10% dextran, 1X denhardt (mix d'hybridation), ont été dénaturés pendant 10 min. à 70°C, avant d'être ajoutées aux cryosections. L'hybridation a été réalisée

sur la nuit à 65°C. Le lendemain, les coupes ont été lavées deux fois 10min avec 50% formamide / 2X SSC, et deux fois 10min avec 2XSSC. La détection s'est effectuée grâce au système de détection TSATM (Tyramide Signal Amplification, Invitrogen) couplé à un colorant AlexaFluor 350, selon les conditions du fournisseur. Le FISH ADN a ensuite suivi à partir de l'étape de post-fixation dans le méthanol / acide acétique.

2.4 Immunofluorescence et immuno-FISH

2.4.1 Sur cellules interphasiques et chromosomes mitotiques

Le même protocole a été utilisé pour les cellules interphasiques et les chromosomes mitotiques, sauf pour ce qui concerne l'étape de perméabilisation qui n'a bien sûr été réalisée que dans le cas des cellules interphasiques.

Après une fixation de la préparation au PFA 2%, pendant 5 à 10 min., les cellules ont été perméabilisées pendant 5 min. avec du PBS contenant 0,5% de triton TX-100. Après 2 lavages au PBS, les préparations ont été saturées au PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal. Après une heure d'incubation avec les anticorps primaires, human ACA, anti-CENP-A, -B, C, -I, et anti ICP0, les préparations ont de nouveau été lavées 2 fois avec du PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal. Les anticorps secondaires de chèvres, GAH (goat anti-human), GAM (goat anti-mouse), ou GAR (goat anti-rabbit) couplés au fluorochrome alexa 488 ont alors été mis au contact des préparations et laissés à incuber 25 min. Dans le cas d'un marquage d'immunofluorescence simple, après deux lavages de 5 min. au PBS, un marquage spécifique de l'ADN de 5 min. au Hoechst a été réalisé, suivi de deux rinçages de 5 min. au PBS, et finalement, les préparations ont été séchées et montées sur lames avec du milieu de montage Vectashield.

Pour l'immuno-FISH, après les deux derniers lavages aux PBS, les préparations ont été post-fixées 5 min. avec du PFA 1%, ensuite 2 lavages de 5 min. au PBS-glycine ont été effectués pour inactiver le PFA 1%. Les protocoles de FISH (voir précédemment) qui suivent l'immunofluorescence, ont démarré directement à l'étape de traitement dans les bains de citrate pour un FISH sur des cellules interphasiques, et à l'étape du traitement de 30 min. au 0,1% triton TX-100 à 37°C pour un FISH sur des chromosomes mitotiques. Les préparations marquées en FISH et Immuno-FISH ont été observées avec un microscope « Imager Z1 » (Zeiss). Les images ont été obtenues avec une caméra numérique CCD (modèle CoolSNAP HQ², Roper scientific) en utilisant le logiciel metaview pour l'analyse

(Molecular Devices). Les images ont alors été transférées dans photoshop pour la présentation finale.

2.4.2 *Sur tissus congelés*

Les coupes congelées ont été traitées comme précédemment jusqu'à l'étape de l'unmasking. Les tissus ont ensuite été incubés pendant 24 heures avec l'anticorps primaire, utilisé à une dilution de 1/100 dans du PBS contenant 3% FBS. Après trois lavages, l'anticorps secondaire a été rajouté pendant 1H (dilution 1/200). Les anticorps secondaires sont conjugués avec de l'Alexafluor (Invitrogen). Suite à l'immunomarquage, les tissus ont été post-fixés dans du PFA, et le FISH ADN a été effectué à partir de l'étape faisant intervenir le mélange méthanol /acide acétique.

Anticorps : Les anticorps utilisés pour l'immunofluorescence (IF) et le Western blotting (WB) sont les suivants: Anticorps monoclonaux de souris (mAbs) anti-ICP0 [11060] (1/1000, IF; 1/10000, WB), anti-CENP-A [3-19] (1µg/ml, WB; Abcam), anti-CENP-B [5E6C1] (généreusement fourni par Hiroshi Masumoto, 1/1000, IF) anticorps polyclonaux de lapin anti-CENP-C (1/1000 IF) anti-CENP-I [5E6C1] (1/1000, IF; 1µg/ml WB; Abcam); anti-CENP-N (Chl4R) purifiés par affinité (1/200, WB, généreusement fournis par P. Meraldi, ETH Zurich), anti-CENP-N (1/100, généreusement fournis par K. Todokoro, RIKEN) ; anti-actin (1µg/ml, WB; Sigma), et anti-ICP0 [R190], (1/500, IF) un sérum auto-immun huACA dirigé contre les protéines centromériques a également été utilisé (1/3000, IF; Antibodies Incorporate). Pour les IF, les anticorps secondaires utilisés ont été des chèvres anti-lapin, anti-souris, et anti-humain couplés a l'AlexaFluor 488, 555, or 647 (1/200; Molecular probes).

3. LA DIGESTION A LA NUCLEASE MICROCOCCALE (OU MNASE POUR MICROCOCCAL NUCLEASE)

Les digestions MNase ont été réalisées soit dans des cellules infectées, soit dans des cellules HeLa TR induites ou non pour l'expression d'ICP0 ou de FXE. Les cellules ont été préparées à une concentration de 3×10^6 cellules par boîte de pétri (1000 mm). Le jour suivant, les cellules HeLa ont été infectées avec le virus approprié à une multiplicité d'infection (M.O.I.) de 10 pendant 3 H; Les cellules HeLa TR ont été induites ou non a la tétracycline ($1\mu\text{g/ml}$) pendant 24 H. Les Cellules ont été trypsinées, rincées au PBS, centrifugées et resuspendues dans 1 ml de tampon 1 (Tris/HCl pH7.5, 15 mM; Sucrose, 0.3M; KCl, 60mM, NaCl, 15 mM; MgCl₂, 5 mM; EGTA, 0.1 mM; DTT, 0.5 mM, Inhibiteurs de protéases), puis 1 ml de tampon 2 (Tris/HCl pH7.5, 15 mM; Sucrose, 0.3M; KCl, 60mM, NaCl, 15 mM; MgCl₂, 5 mM; EGTA, 0.1 mM; DTT, 0.5 mM, NP40, 0.4%; Inhibiteurs de protéases) a été ajouté doucement puis les cellules ont été incubées à 4°C pendant 10 min. Huit ml de tampon 3 (Tris/HCl pH7.5, 15 mM; Sucrose, 1M; KCl, 60mM, NaCl, 15 mM; MgCl₂, 5 mM; EGTA, 0.1 mM; DTT, 0.5 mM, Inhibiteurs de protéases) ont ensuite été ajoutés et les noyaux ont été centrifugés pendant 30 min à 6000g à 4°C. Les supernageants ont été enlevés et les noyaux resuspendus dans du tampon de digestion MNase (Tris/HCl ph 7.5, 15 mM; MgCl₂, 5 mM; CaCl₂, 1mM; Inhibiteurs de protéases) à une concentration d'environ 1000 noyaux/ μl , dans 3 ml. Préincuber les noyaux 2 min. à 37°, puis ajouter 5U of MNase pour $2,5 \times 10^6$ noyaux. Prélever à des temps fixes 3.75×10^5 noyaux et ajouter de l'EDTA à concentration de 0.8 mM pour arrêter la réaction, et incubé sur la glace.

Ajouter à chaque échantillon 1/20 de tampon de digestion de protéines (SDS 10%, protéinase K, $3,75\mu\text{g}/\mu\text{l}$) puis incubé 15-30 minutes à 37°C. Récupérer l'ADN par une extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'EtOH. Reprendre dans de l'eau contenant de la RNase A ($1\mu\text{g/ml}$) et incubé 1 H à 37°C.

Les échantillons ont finalement été dosés au nanodrop (thermo) puis 1 μg de chaque échantillon déposé sur un gel d'agarose ultra pure lors du Southern blot.

4. LE SOUTHERN BLOT

4.1 Migration de l'ADN

Les échantillons de digestion MNase ont été déposés à raison de 1 μ g par puits dans un gel d'agarose ultra pure, coulé dans du TAE 0,5X (1mg/ml BET) à un pourcentage de 1,2%. Les dimensions du gel sont de 15cm x 15cm.

La migration s'est effectuée pendant 17h à un voltage constant de 20 volts.

Les échantillons de produits de digestion de l'ADN génomique ont été déposés à raison de 25 microgrammes par puit dans un gel d'agarose ultra pure, coulé dans du TAE 0,5X (1mg/ml BET) à un pourcentage de 1%. La migration s'est effectuée pendant 17h à un voltage constant de 20 volts.

4.2 Le Transfert

Deux types de transferts ont été utilisés, selon la nature de la sonde radioactive utilisée par la suite.

4.2.1 *Pour une hybridation des séquences spécifiques du chromosome artificiel*

Le transfert a été réalisé par capillarité dans de la soude 0,4N.

L'ADN présent dans le gel a tout d'abord été dénaturé dans 0,275M HCl pendant 30 min. puis rincé et neutralisé dans de la soude 0,4N pendant 2 fois 10 min. sur plateau agitant.

Pendant ce temps la membrane en Nylon (Hybond N +, GE healthcare) a été équilibrée pendant 2 min. dans l'eau puis pendant 10 min. dans du NaOH 0,4N sur plateau agitant.

Le transfert a duré de 16H à 17H dans de la soude 0,4N.

4.2.2 *Pour une hybridation des séquences alphas du chromosome 21*

Un protocole de transfert sous vide a été utilisé :

En utilisant une pompe à vide, le gel a été tout d'abord traité au HCl 0,25N pendant 10 min. puis dénaturé avec un tampon contenant 1,5N NaCl et 0,5N NaOH, pendant 30 min. Le gel a ensuite été neutralisé dans un tampon contenant 1,5M NaCl et 0,5M tris, pendant 15 min.

Le transfert a eu lieu dans du 20 X SSC pendant 2 heures.

Suite au transfert sous vide l'ADN présent sur les membranes a été « cross-linké » à 120 milliJoules d'UV par centimètre carré dans un four à UV (Fisher bioblock scientific).

4.3 Le marquage des sondes radioactives

2 techniques ont été utilisées pour marquer les sondes radioactives, selon la nature de l'ADN à marquer :

4.3.1 *Par amorçage aléatoire (random-priming (Ready to go DNA labelling beads, GE healthcare))*

L'ADN alphasidique (50 ng par réaction) à marquer est tout premièrement dénaturé pendant 10 min. à 95°C, puis l'enzyme et le mix de dNTPs sont ajoutés à l'ADN, ainsi que 50 à 100 microcuries de ³²dCTP radioactif ; après avoir homogénéisé les constituants, la réaction de marquage s'effectue à 37°C pendant 20 min.; Le produit de réaction est incubé pendant 5 min. sur la glace pour arrêter la réaction, puis purifié sur colonne G50 (qiagen).

Suite à l'ajout de 1mg d'ADN de sperme de saumon, le mélange sonde/ADN de sperme de saumon est mélangé à la membrane à hybrider, déjà pré-hybridée dans le tampon d'hybridation (Ambion). L'hybridation se déroule pendant une période de 16-17h à une température constante de 44°C.

4.3.2 *Par Nick Translation (Kit Roche)*

L'ADN amplifié à partir du BAC (100ng) est mélangé aux dNTPS, (dATP, dGTP, dTTP (présents en quantité équivalente dans le mélange)), au tampon 10X et au mix d'enzymes nécessaires à la réaction.

Vingt microcuries (³²dCTP (Hartman Analytic)) sont ajoutés au mélange puis la réaction de nick-translation est réalisée pendant 15 min. à 15°C, la réaction est arrêtée par ajout de l'EDTA à 0,025M, la suite de la réaction est similaire à celle de marquage par « random-priming » à partir de l'étape de 5 min. sur la glace.

Le lendemain, les membranes ont été rincées par 3 traitements successifs de 5 min. avec du 2X SSC-0,5%SDS à 65°C, puis une incubation de 5 min. dans du 0,2X SSC-0,5%SDS à 65°C. Finalement les membranes sont incubées une minute dans du 2X SSC-0,5%SDS à température ambiante avant d'être scellées et exposées sur cassette d'exposition

(Amersham), de 2 heures à plusieurs jours, selon l'intensité du signal. L'écran est par la suite scanné avec un scanner « Typhoon 9400 » (GE healthcare) et l'image numérisée traitée pour la présentation finale avec Photoshop (Adobe) et Image J.

5. L'IMMUNOPRECIPITATION DE CHROMATINE (OU CHIP POUR CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION)

L'ADN a tout d'abord été soniqué par fragmentation au Bioruptor (Diagenode) selon le protocole suivant :

Les cellules ont été fixées au formaldéhyde 2% pendant 5 min. à température ambiante. Après deux rinçages au PBS froid, 5 millions de cellules ont été récupérées dans le tampon de resuspension A (100mM Tris-HCl, pH9,4; 10mM DTT). Après une incubation de 15 min. à température ambiante et une de 15 min. à 30°C, les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse B (10mM EDTA; 0,5mM EGTA ; 10mM HEPES pH6,5 ; 0,25% Triton X-100) pendant 5 min. à 4°C. Les cellules lysées sont ensuite incubées pendant 5 min. à 4°C dans du tampon C (10mM EDTA; 0,5mM EGTA ; 10mM HEPES pH6,5 ; 200mM EGTA) puis D (10mM EDTA ; 50mM Tris-HCL pH8 ; 1% SDS, Cocktail Inhibiteur de protéase (1/25)). Les cellules ont ensuite été soniquées à l'aide d'un bioruptor, dans un volume de 300 µl. Le nombre de cycles de sonication (30 secondes « ON », 30 secondes « OFF ») a varié de 8 à 16. Une fois l'ADN soniqué, il a été soumis à une étape de preclearing, c'est à dire une incubation de 3H30 avec des billes de sépharose couplées à de la protéine G, de manière à se débarrasser du maximum d'ADN non fragmenté et/ou non spécifique en le collant à ces billes. Une fois cette étape réalisée, les billes ont été enlevées puis l'ADN mis en présence de fragments FAB non spécifiques (Rabbit anti Sheep, US biological). Le but de cette étape est également de se débarrasser du bruit de fond via la fixation de l'ADN non spécifique à ces fragments FAB. L'immunoprécipitation s'est ensuite déroulée sur la nuit en utilisant 2 µg d'anticorps anti-CENP-A monoclonal (clone 3-19) ou d'immunoglobulines G (Diagenode) de souris. Suite à cette incubation, 10 µg de billes magnétiques dynabeads (Invitrogen) ont été ajoutés aux complexes anticorps-chromatine et mis à incuber 4H à 4°C en agitation constante. Après l'incubation, les billes ont été rincées 3 fois dans du tampon contenant 250 mM de NaCl; chaque rinçage s'est effectué pendant 5 min. à 4°C sur agitation constante ;

Finalement, les complexes anticorps/protéines/chromatine fixés aux billes ont été élués dans un tampon contenant du SDS 1% et 0,1M de NaHCO₃. Cette étape a été réalisée deux fois, à température ambiante et pendant 15 min. Le produit d'éluion et l'ADN « input » soniqué au départ ont ensuite été soumis à une étape de decrosslinking sur la nuit à 65°C (décrochage des complexes protéines/ADN des anticorps). Les complexes récupérés ont été traités 1H30 avec 50 µg de protéinase K (Sigma) et 1/2000 de RNase A (Sigma). L'ADN issu du produit de réaction a été isolé lors d'une étape d'extraction classique au phénol chloroforme, puis précipité avec 20µg de glycogène, 50µl de NaAc 3M pH 5,2, et 1ml d'éthanol 100%. Après une centrifugation de 15 min. à 14000 rpm à 4°C, les culots ont été rincés dans 1 ml d'éthanol 70% puis resuspendus dans 50 µl d'eau ultrapure et conservés à -20°C pour une qPCR ultérieure.

6. LA PCR QUANTITATIVE (QPCR)

La machine à PCR quantitative utilisée est la «MX3005p» (Stratagène)

Le mix roche 2X est utilisé selon les conditions du fournisseur. Les amorces sont utilisées à une concentration finale de 1 micromolaire.

Le programme utilisé pour tous les couples d'amorces est le suivant :

Dénaturation initiale de 5 min. à 95°C, puis dénaturation de 15 secondes à 95°C, hybridation de 15 secondes à 60°C, élongation de 15 secondes à 72°C, ces trois étapes répétées 40 fois puis un cycle de dissociation final comportant 3 étapes : 30 secondes à 95°C 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 95°C.

Pour l'ADN alphasat, les amorces ont été dessinées selon un consensus des séquences alphasat des différents chromosomes humains (Alexandrov et al. 1993) et sont les suivantes

FSAT1-2 (Forward) : ATTCTGCAAGTGGATATTGGA

RSAT1-2 (Reverse) : CTACAAAAGAGTGTTTCAAACACTGCTC

Pour amplifier un fragment dans le centromère du chromosome 21, des amorces ont été dessinées à partir de ce qui est connu dans la littérature et sont les suivantes (Nakano et al. 2003) :

mCbox-4 (Forward) : GTCTACCTTTTATTTGAATTCCCG

11-10R (Reverse) : AGGGAATGTCTTCCCATAAAAACT

Pour l'ADN répété de type ribosomique 5s, les amorces ont été les suivantes (Nakano et al. 2003) :

5SDNA- F1 (Forward) : CCGGACCCCAAAGGCGCACGCTGG

5SDNA-R1 (Reverse) : TGGCTGGCGTCTGTGGCACCCGCT

Pour l'ADN contrôle du gène GAPDH, les amorces sont les suivantes :

5' GAPDH-1 (Forward) : CACGTAGCTCAGGCCTCAAGA

3' GAPDH-1 (Reverse) : AGGCTGCGGGCTCAATTTAT

7. LE WESTERN BLOTTING

Les cellules HeLa (5x10⁵ cells) dans des boîtes de pétri (35 mm) ont été infectées pendant 6 heures à une M.O.I. de 10 (toutes les cellules sont infectées) par les virus HSV-1 17 syn+, vFXE ou dl1403, en la présence ou pas de l'inhibiteur du protéasome MG132 (2.5µM). Pour les cellules TR, TR-ICP0 and TR-FXE cells, les cellules ont été mises une concentration de 1x10⁶ cellules par boîte de 60 mm, puis le lendemain, la tétracycline a été ajoutée ou pas au milieu pendant 24 heures. 20µg des protéines totales ont été chargées par puit dans des gels de SDS-polyacrylamide (7,5, 10, ou 12,5%) positionnés dans un appareil Bio-Rad Miniprotean. Les gels ont ensuite été transférés sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher et Schnell). Après saturation dans du tampon PBS-0,1% tween 20 (PBST) contenant 5% de BSA pendant 1H, les membranes sont incubées sur la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué dans du PBST avec 5% de BSA. Ensuite, elles ont été lavées au moins trois fois avec du PBST, avant leur incubation en présence de l'anticorps secondaire dilué dans du PBST avec 5% de BSA pendant 1 heure à température ambiante. Après trois lavages au PBST, la membrane est mise en présence du réactif bioluminescent (ECL plus Western Blotting Detection System, Amersham, GE Healthcare) puis exposée sur un film.

Résultats

CHAPITRE 1 : ANALYSE DE LA DESTABILISATION DE LA STRUCTURE PROTEIQUE DES CENTROMERES PAR LA PROTEINE ICP0

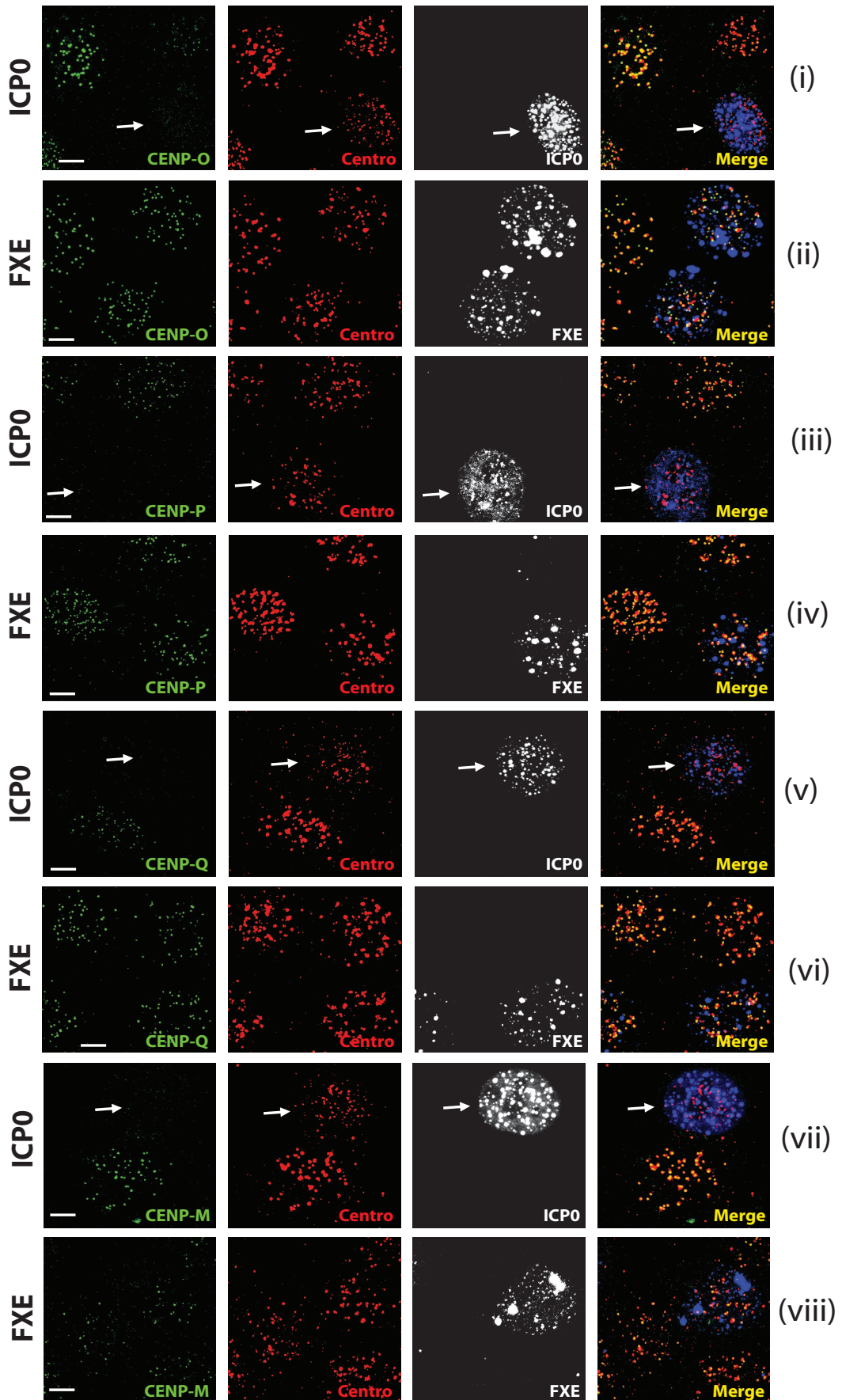
1. DESTABILISATION DES STRUCTURES NAC ET CAD DANS LES CENTROMERE ENDOGENES

1.1 Approche d'immunofluorescence

La déstabilisation des protéines CENP-A, -B et -C par ICP0 a déjà été démontrée dans des études précédentes (Everett et al. 1999), (Patrick Lomonte et Morency 2007), (Patrick Lomonte et Morency 2007). Cependant, comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, ces protéines font partie de structures protéiques beaucoup plus complexes qui ont été appelées NAC (pour CENP-A Nucleosome Associated Complex) et CAD (pour CENP-A Distal Complex) (Voir figure 21 (Foltz et al. 2006)). La question abordée donc a été de savoir si ICP0 était capable d'affecter ces structures. Des cellules exprimant de façon stable des formes étiquetées « EGFP » de différentes protéines constituant des NAC et des CAD (sauf pour CENP-I) ont tout d'abord été utilisées, et dans lesquelles le devenir de la protéine endogène a été analysé. Ces cellules ont été, (i) soit infectées avec un virus HSV-1 sauvage, HSV-1 17 syn+, ou un virus exprimant la forme mutée d'ICP0 dans son domaine RING Finger, vFXE (Figure 30) ; (ii) soit transfectées par des plasmides exprimant ICP0 ou le mutant FXE. Ensuite ces cellules ont été analysées par IF. Les résultats montrent que quel que soit le processus d'expression d'ICP0 (par infection ou par transfection) la présence d'ICP0 fonctionnelle dans la cellule induit la disparition du signal correspondant à la protéine CENP. Le fait que cela se produise également dans un contexte d'expression d'ICP0 par transfection montre que cette disparition de protéine CENPs du centromère est

bien le résultat de l'expression d'ICP0 seule et non de la participation d'autres protéines virales. La disparition de protéines CENPs suite à l'expression d'ICP0 concerne aussi bien des protéines du complexe NAC que du complexe plus distal CAD. Ces résultats montrent donc qu'ICP0 est capable de déstabiliser l'ensemble des complexes protéiques associés aux centromères durant l'interphase. Bien que la disparition de toutes les protéines de ces complexes, n'ait pas été montrée, nous pouvons raisonnablement supposer, vu l'interdépendance qui existe entre ces différentes protéines concernant leur localisation au centromère (Voir introduction chapitre 3), que l'ensemble des protéines centromériques interphasiques sera affecté dans sa localisation suite à l'expression d'ICP0.

A.



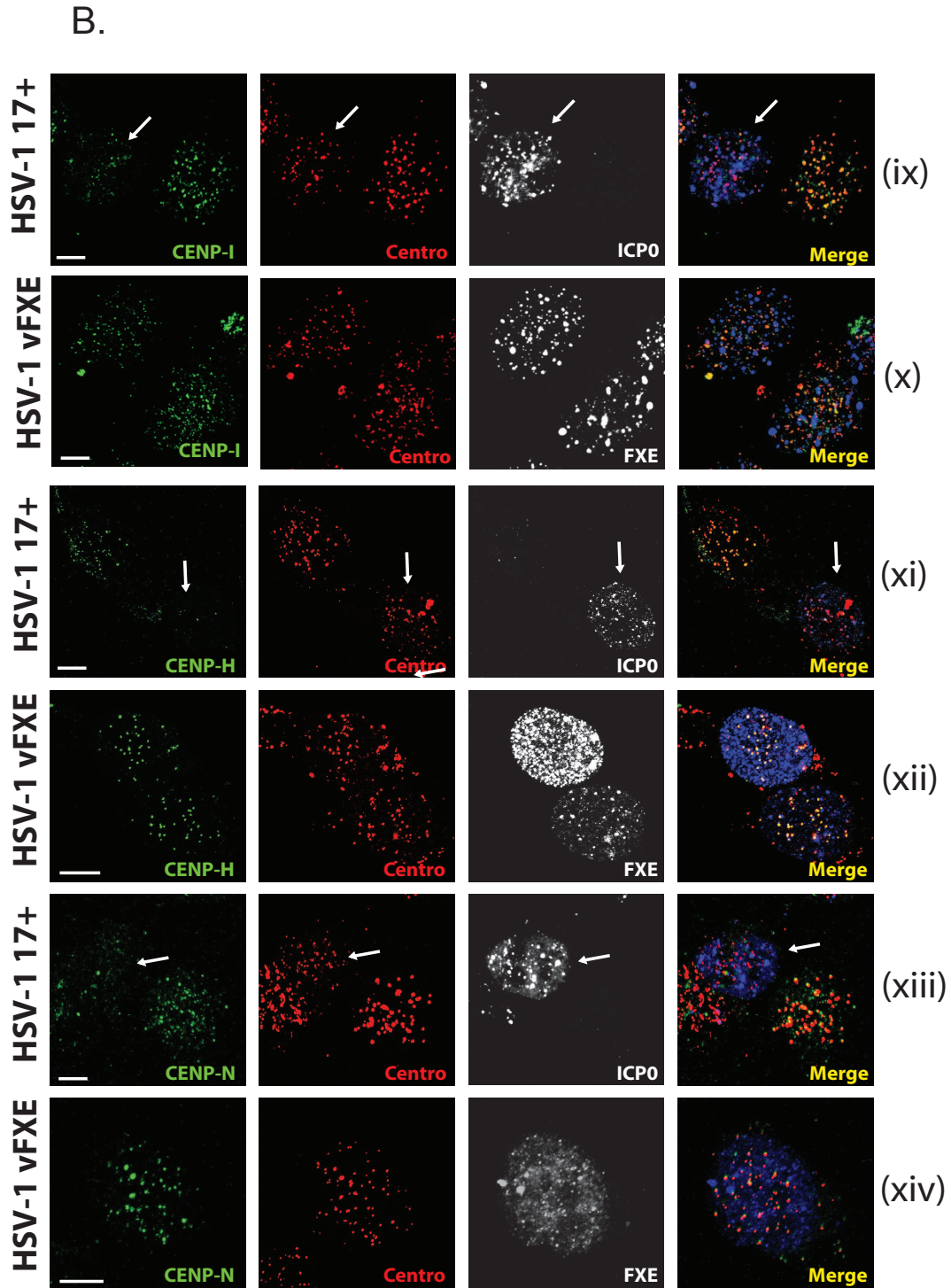


Figure 30: Effet d'ICP0 sur les protéines des NAC et CAD Effet d'ICP0 sur les protéines des CADs CENP-I, O, P, Q, et des NACs CENP-H et M et N dans des cellules transfectées (A) avec un plasmide exprimant ICP0 ou FXE (i-viii) ou infectées (B) par un virus HSV-1 17 syn+ sauvage ou un virus HSV-1 vFXE mutant pour la protéine ICP0 (Forme tronquée non fonctionnelle de la protéine) (ix-xiv). Dans ces expériences d'IF, la protéine d'intérêt CENP est fusionnée à la GFP (sauf CENP-I où la protéine endogène a été détectée) et apparaît en vert, les centromères ont été détectés par un anticorps humain CREST reconnaissant les protéines de centromères (rouge), les protéines ICP0 ou FXE étant marquées en gris (marquage Cy5, signal représenté arbitrairement en gris pour plus de lisibilité). Les flèches pointent les cellules où le signal CENP disparaît dans les cellules exprimant ICP0 (Échelle = 10 µm).

1.2 Approche de Western Blot

La disparition de protéines des centromères suite à l'expression d'ICP0 ne signifie pas que ces protéines subissent une dégradation dépendante du protéasome. Nous avons donc réalisé des expériences de Western blot sur des cellules infectées par les mêmes virus que ceux utilisés pour les analyses en IF, plus un virus supplémentaire n'exprimant pas du tout d'ICP0 (dl1403, mutant ICP0 nul). Les cellules ont été infectées en présence ou non d'un inhibiteur du protéasome, le MG132, afin de déterminer si (i) certaines protéines des NAC et CAD sont dégradées, (ii) si cela dépend d'ICP0, et (iii) si cela dépend également de l'activité du protéasome (Figure 31). Les cellules HeLa ont été infectées pendant 6h de manière à ce que la protéine ICP0 ait le temps d'être bien exprimée, puis de se localiser au niveau des centromères et enfin d'avoir son activité sur les différentes protéines prises en compte (CENP-A, B, C, I, H et N). Le choix d'analyse de ces protéines CENPs spécifiques a été dicté par la disponibilité d'anticorps reconnaissant ces protéines endogènes. La raison pour laquelle nous n'avons pas utilisé les cellules exprimant les formes EGFP des CENPs provient du fait que ces cellules expriment simultanément les formes endogènes et étiquetées des protéines CENPs, cela résulte en un taux de protéine étiquetée trop faible pour être détectable par WB et donc en une incapacité d'utiliser ces cellules pour toute analyse quantitative. En utilisant les anticorps appropriés, nous avons tout d'abord détecté la protéine ICP0 dans les extraits protéiques issus de cellules infectées par le virus sauvage. La forme tronquée (FXE) a également été détectée en Western Blot dans les extraits protéiques issus de cellules infectées par le virus vFXE. Les intensités des bandes correspondantes aux différents signaux protéiques ont été comparées entre les différentes conditions d'infection. Il ressort que ces intensités diminuent (par rapport aux bandes contrôles obtenues lors des conditions de non infection) uniquement dans la condition d'infection avec le virus sauvage et pas dans les autres conditions de contrôles décrites précédemment. Une condition d'infection par le virus sauvage en présence de l'inhibiteur protéasomique MG132 a également été utilisée comme contrôle pour vérifier la dégradation via le protéasome. Les résultats obtenus indiquent que les protéines CENPs sont dégradées grâce à l'action de la protéine ICP0, et plus spécifiquement de son domaine RING Finger et via l'activité du protéasome. Ces résultats démontrent également qu'ICP0 est capable de dégrader des protéines CENPs des différents complexes NAC et CAD. Il est raisonnable d'affirmer que la disparition des différentes protéines des NAC et CAD montrée en IF va résulter en une

dégradation via le protéasome de ces protéines. Ces résultats démontrent donc que suite à sa présence aux centromères intephases, ICP0 va utiliser le complexe protéasomique pour induire la dégradation de l'ensemble des protéines constituant les deux principaux complexes protéiques structurant les centromères durant l'interphase.

Cette dégradation massive des protéines CENP va probablement avoir des conséquences majeures sur la structure de la chromatine centromérique d'autant plus que la protéine CENP-A, située au cœur des nucléosomes centromériques est également détruite. Cette analyse de la déstabilisation de la structure de la chromatine centromérique suite à l'activité d'ICP0 sera décrite dans le chapitre 2 de ces résultats.

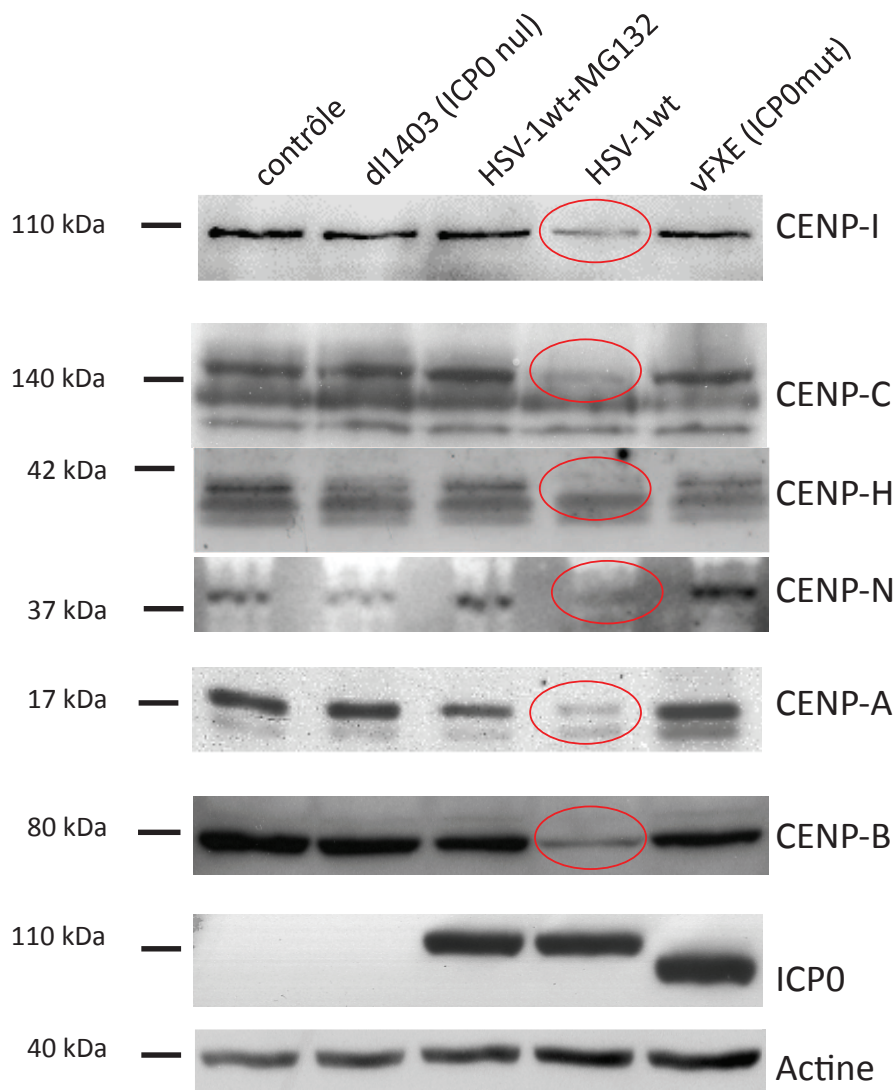


Figure 31: Effet d'ICP0 sur les protéines centromériques associées aux centromères endogènes, analyse de Western Blot:

Expériences de Western Blot dans des cellules HeLa non infectées (première colonne, contrôle), infectées avec un virus mutant nul pour la protéine ICP0 (deuxième colonne, dl1403), infectées avec un virus sauvage en présence d'un inhibiteur du protéasome (troisième colonne, HSV1-wt+MG132), infectées avec un virus sauvage (quatrième colonne, HSV1-wt) et finalement infectées avec un virus mutant dans le domaine E3-ubiquitine ligase d'ICP0 (cinquième colonne, vFXE). Des anticorps dirigés contre la protéine du CAD CENP-I, les protéines du NAC CENP-C, CENP-H et CENP-N, et contre les protéines CENP-A et CENP-B ont été utilisés. La protéine ICP0 a également été détectée ainsi que la protéine actine, utilisée en tant que marqueur de dépôt. La seule condition dans laquelle une diminution du signal protéique est observée est celle de l'infection par le virus sauvage HSV1-wt, ce qui montre bien que c'est la présence d'ICP0 qui est responsable de la dégradation des différentes protéines et ceci, via le protéasome.

2. EFFETS D'ICP0 SUR LES CHROMOSOMES ARTIFICIELS

Un des problèmes majeurs rencontrés dans toute étude concernant les centromères endogènes dans les cellules humaines est leur relative hétérogénéité de structure (Voir Introduction chapitre 3). Lorsqu'il s'agit donc d'analyser de façon spécifique des événements moléculaires, épigénétiques, biologiques, survenant sur les centromères il est très difficile d'obtenir des résultats précis. Dans ce contexte, plusieurs équipes ont développé des outils moléculaires appelés Chromosomes Artificiels (HACs), pour pouvoir aborder des questions précises concernant la structure et la fonction des centromères (Voir Introduction chapitre 3). Dans notre contexte particulier de déstabilisation des centromères par ICP0, il était utile de pouvoir utiliser ces HACs pour comprendre certains événements biologiques liés à l'activité d'ICP0 sur les centromères. Parmi ces événements, notre équipe a montré récemment que la déstabilisation des centromères par ICP0 déclenche une réponse cellulaire appelée iCDR (pour interphase Centromere Damage Response) dont la signification biologique n'est pas encore connue (Voir Introduction, chapitre 1). L'utilisation de HACs, et la possibilité d'étudier des événements épigénétiques particuliers au niveau de ces HACs suite à l'activité d'ICP0, pourrait éclairer sur des modifications particulières que subissent les centromères et leur lien éventuel avec le déclenchement de cette iCDR. J'ai donc entrepris d'étudier les effets d'ICP0 sur les HACs afin de déterminer s'il est possible d'utiliser ces outils comme modèle dans notre domaine d'étude.

2.1 Détection des HACs dans les cellules

2.1.1 Par « polymerase chain réaction » (PCR)

L'objectif a été de confirmer la présence des constructions artificielles dans les cellules HT1080 (fournies par l'équipe du docteur Hiroshi Masumoto de l'université de Nagoya au Japon). La présence des constructions a été testée dans les cellules contenant un chromosome artificiel issu d'une construction YAC (Yeast Artificial Chromosome) : d'une part dans les cellules 7C5H1-2 contenant un chromosome artificiel indépendant du génome, et d'autre part les cellules 7C5H1-19 contenant une construction intégrée dans le génome (la plupart du temps dans le bras court du chromosome 16). La présence du HAC a également été testée dans des cellules contenant un HAC issu d'une construction BAC (Bacterial Artificial Chromosome) : Cellules W0210R-8 contenant le chromosome artificiel

indépendant du génome et les cellules W0210R-1 contenant une construction intégrée dans le génome.

Les amorces testées ont été désignées sur la base de la séquence vectorielle non génomique des deux types de constructions. Un panel de couples d'amorces a été testé et les résultats les plus significatifs ont été obtenus à partir des couples suivants :

Pour les cellules 7C5H1-2 et 7C5H1-19 (cellules YAC) :

Forward : GTTTCGGCGTGGGTATGGTG

Reverse : GAACGCCAGCAAGACGTAGC

Permettant d'amplifier un fragment de 472 pb.

Pour les cellules W0210R-8 et W0210R-1 (Cellules BAC):

Forward : CGTGGATGGAGGAGCAAATTCG

Reverse : CAGCTCGCCAACCAGAACAC

Permettant d'amplifier un fragment de 648 pb.

Les contrôles positifs utilisés ont été les plasmides initiaux ayant servi à la construction des HACS dans les 2 types de lignées : le plasmide pYAC5 et le plasmide pWTR11.32 pour les cellules YAC et BAC, respectivement.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 32 et montrent la présence des constructions dans tous les types de cellules considérées.

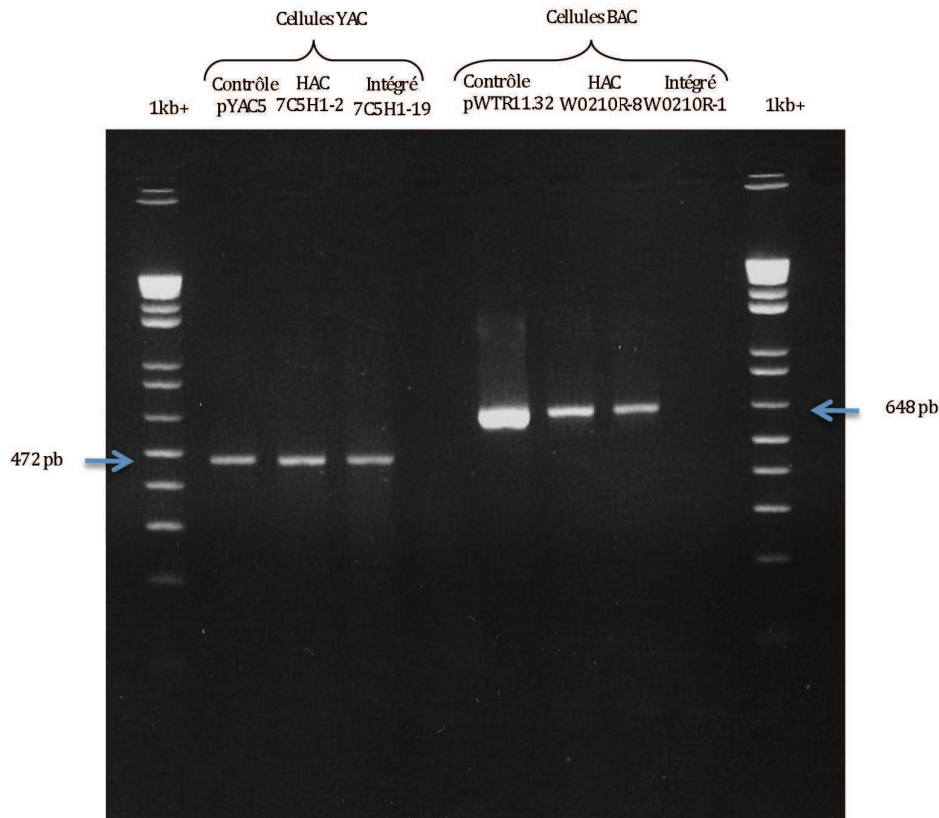


Figure 32: Détection du chromosome artificiel par PCR

Une bande correspondant au produit de PCR amplifié dans les cellules contenant un chromosome artificiel a été détectée dans des cellules contenant : (i) un HAC issu d'un YAC (Partie gauche, bande à 472 pb): contrôle (plasmide pYAC5), cellules 7C5H1-2 (HAC indépendant) et cellules 7C5H1-19 (construction intégrée); (ii) un HAC issu d'un BAC (partie droite, bande à 648pb): contrôle (plasmide pWTR11.32), cellules W0210R-8 (HAC indépendant) et cellules W0210R-1 (construction intégrée).

2.1.2 Par « *Fluorescent In Situ Hybridization* » (FISH)

L'objectif de ces expériences a été de détecter le HAC dans les cellules BAC ou YAC le contenant à l'aide de sondes fluorescentes construites par des techniques de Nick Translation ou de Random Priming (Voir matériel et méthodes). Pour chaque type de HACS contenu dans les cellules, 2 types de sondes ont été construits : un type dit spécifique reconnaissant les séquences vectorielles non génomiques des HACs et un type dit alphoïde, spécifique des séquences répétées centromériques contenues dans les HACs mais également dans la plupart des chromosome endogènes et particulièrement le chromosome 21 (Voir Introduction, chapitre 3). Le but de ces expériences de FISH était de co-localiser ces 2 types de signaux marqués par des fluorochromes différents (du dCTP-Cy3 (visible en fluorescence de 563 à 570 nm), du dCTP-Cy5 (visible en fluorescence de 662 à 670 nm) ou du dUTP-

biotine). Après de multiples essais, la détection de la présence du YAC dans les cellules 7C5H1-2 (HAC indépendant) et cellules 7C5H1-19 (construction intégrée) ne s'est pas avérée concluante (Résultats non montrés). Par contre il a été possible de détecter le HAC dans les cellules W0210R-8 (HAC indépendant) (Figure 33) et les W0210R-1 (construction intégrée, résultats non montrés)

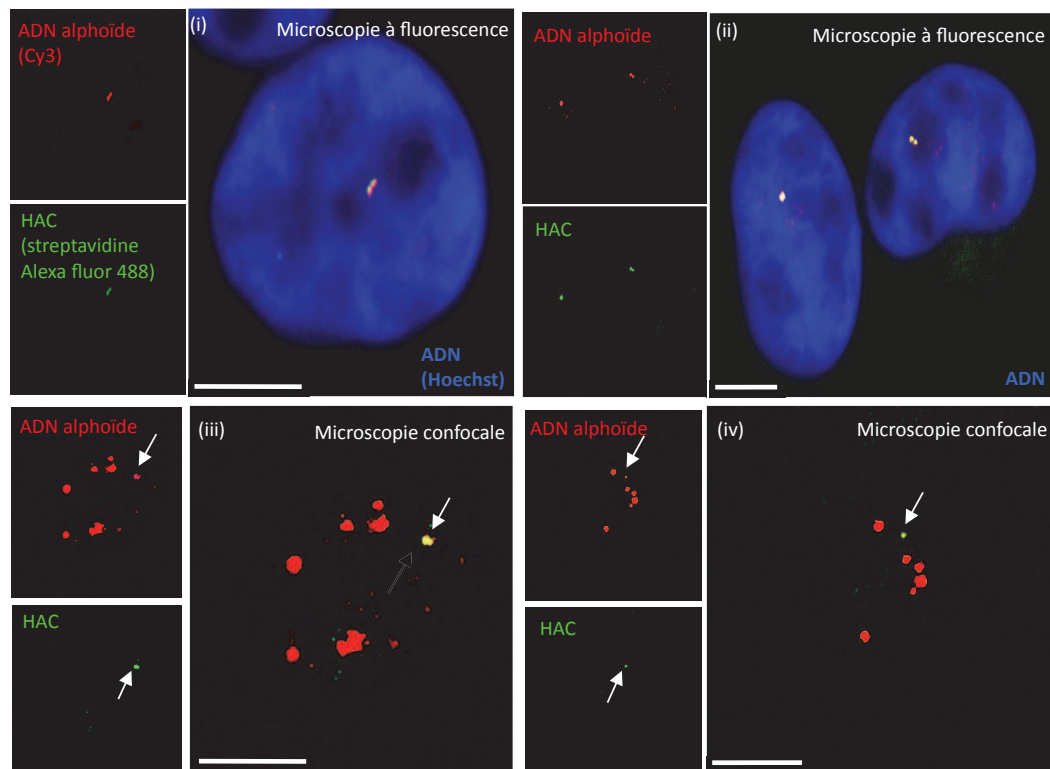


Figure 33: Détection du chromosome artificiel par double FISH dans des cellules HT1080 W0210R-8

Des doubles marquages de FISH ont été réalisés dans des cellules contenant des chromosomes artificiels issus de BAC (cellules HT1080 W0210R-8); Une sonde reconnaissant l'ADN alphaïde, marquée au dCTP-Cy3 (émission dans le rouge) et une sonde reconnaissant spécifiquement les séquences du vecteur BAC, et marquée à la biotine (révélée à la streptavidine-Alexafluor 488, émission dans le vert) ont été utilisées pour ces doubles marquages. Les deux signaux co-localisent précisément ce qui indique la présence d'un HAC. Deux types de microscopes ont été utilisés: un microscope fluorescent (i, ii) et un microscope confocal (iii, iv) pour obtenir une meilleure précision d'image (Echelle = 10µm).

Le protocole de FISH ayant permis de détecter de manière fiable les HACs est issu d'un protocole de FISH 3D (Solovei et al. 2002) et modifié par l'ajout d'une étape de dénaturation protéique supplémentaire dans des bains successifs dans le citrate à ébullition. Cette étape supplémentaire a permis de passer d'une détection plutôt aléatoire et peu fréquente des HACs à une détection quasi systématique et beaucoup plus nette des HACs dans les cellules W0210R-8 par rapport aux W0210R-1. Le chromosome artificiel apparaît

le plus souvent comme un signal unique dont les contours sont bien limités, dans les cellules qui expriment un HAC issu d'un BAC (Cellules W0210R-1 et W0210R-8). Après analyse de ces résultats de détection par FISH il a été décidé d'utiliser les cellules W0210R-8 (HAC indépendant) pour analyser le comportement d'ICP0 vis à vis de ces HACs.

2.2 Détection de la protéine ICP0 sur le chromosome artificiel par Immuno-FISH

L'étape suivante a été de déterminer si la protéine ICP0 était capable de se relocaliser sur les HACs. Pour ce faire, j'ai mis au point la technique d'immuno-FISH pour détecter d'une part la protéine ICP0 à l'aide d'anticorps primaires spécifiques et d'autre part le HAC grâce aux deux sondes précédemment décrites. J'ai tout d'abord détecté la protéine ICP0 sur les centromères endogènes des cellules HT1080, de la même façon que ce qui a déjà été décrit dans d'autres lignées cellulaires mais qui n'avait jamais été visualisé dans ces cellules (Figure 34).

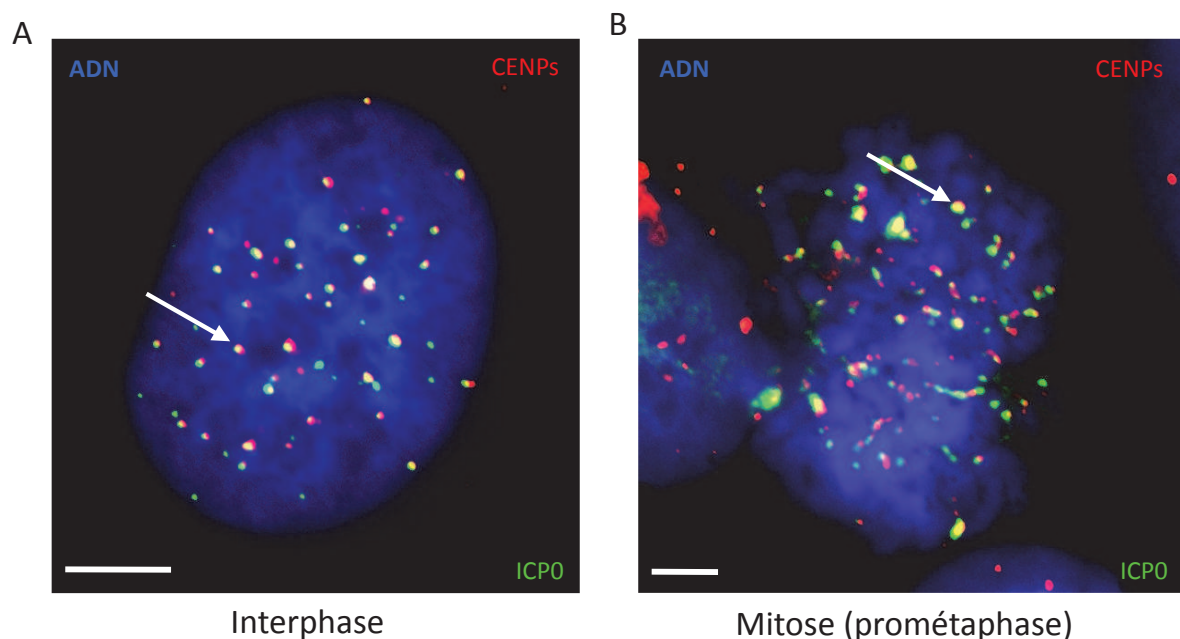


Figure 34: Détection de la protéine ICP0 sur les centromères des cellules HT1080

Doubles marquages de FISH réalisés dans des cellules HT1080 pour détecter les protéines ICP0 (Vert) et centromériques (Rouge, anticorps Human ACA reconnaissant plusieurs épitopes des protéines CENP-A, B et C) dans des cellules interphasiques (A) ou mitotiques (B). Les signaux rouge et vert colocalisent (Flèches) (Echelle = 10 μ m).

J'ai ensuite détecté la protéine ICP0 sur les HACs dans des cellules infectées par le virus HSV-1 sauvage (souche 17syn+). Pour ce faire, des cellules W0210R-8 ont été infectées pendant 2 heures et ensuite traitées par immuno-FISH pour détecter ICP0 et le HAC (Figure

35). Les résultats montrent qu'ICP0 colocalise avec les signaux du HAC et de l'ADN alphas, aussi bien sur les chromosomes mitotiques (résultats non montrés) que dans les noyaux interphasiques. Dans les 2 cas, le signal ICP0 est assez intense. Ainsi, ces expériences ont permis de montrer qu'ICP0 s'accumulait bien sur les HACs. Ceci montre également qu'ICP0 est capable de localiser sur une structure artificielle comprenant des caractéristiques d'un centromère endogène, du point de vue de sa séquence et de sa composition protéique.

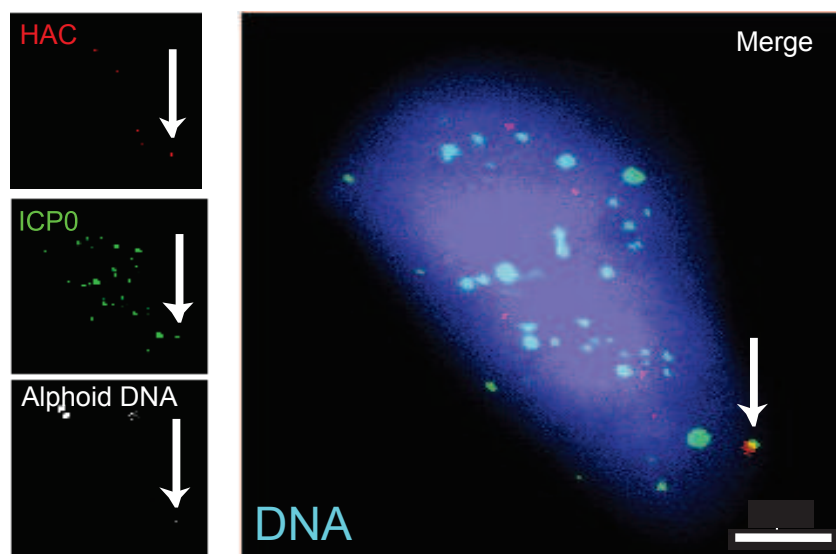


Figure 35: Détection de la protéine ICP0 sur un chromosome artificiel (HAC) issu d'un BAC.

Des marquages d'immuno-FISH ont été réalisés dans des cellules contenant des chromosomes artificiels (en rouge) issus de BAC (cellules HT1080 W0210R8) transfectées par le plasmide exprimant ICP0 (en vert). De manière à confirmer la présence du HAC, un marquage de l'ADN alphas du centromère du chromosome 21 a été réalisé (en gris). Les signaux HAC et ICP0 colocalisent, ce qui prouve bien qu'ICP0 est capable de s'accumuler sur les HACs (Echelle = 10 μ m).

2.2.1 Déstabilisation des Protéines Centromériques (CENPs) associées aux HACs

Dans cette partie du travail j'ai voulu déterminer si ICP0 était capable d'induire la disparition des protéines CENPs associées aux HACs, de façon similaire à ce qui se produit pour les protéines des NAC et CAD des centromères endogènes, montrée dans la première partie de ces résultats et dans les études précédentes ((Everett et al. 1999) ; (P Lomonte, Sullivan, et Everett 2001) ; (Patrick Lomonte et Morency 2007)).

J'ai tout d'abord réalisé des expériences d'Immuno-FISH pour détecter les protéines CENP-A, CENP-B, CENP-C et CENP-I sur les HACs (Figure 36). Ces expériences prouvent que les protéines étudiées sont bien présentes sur les constructions artificielles durant l'interphase

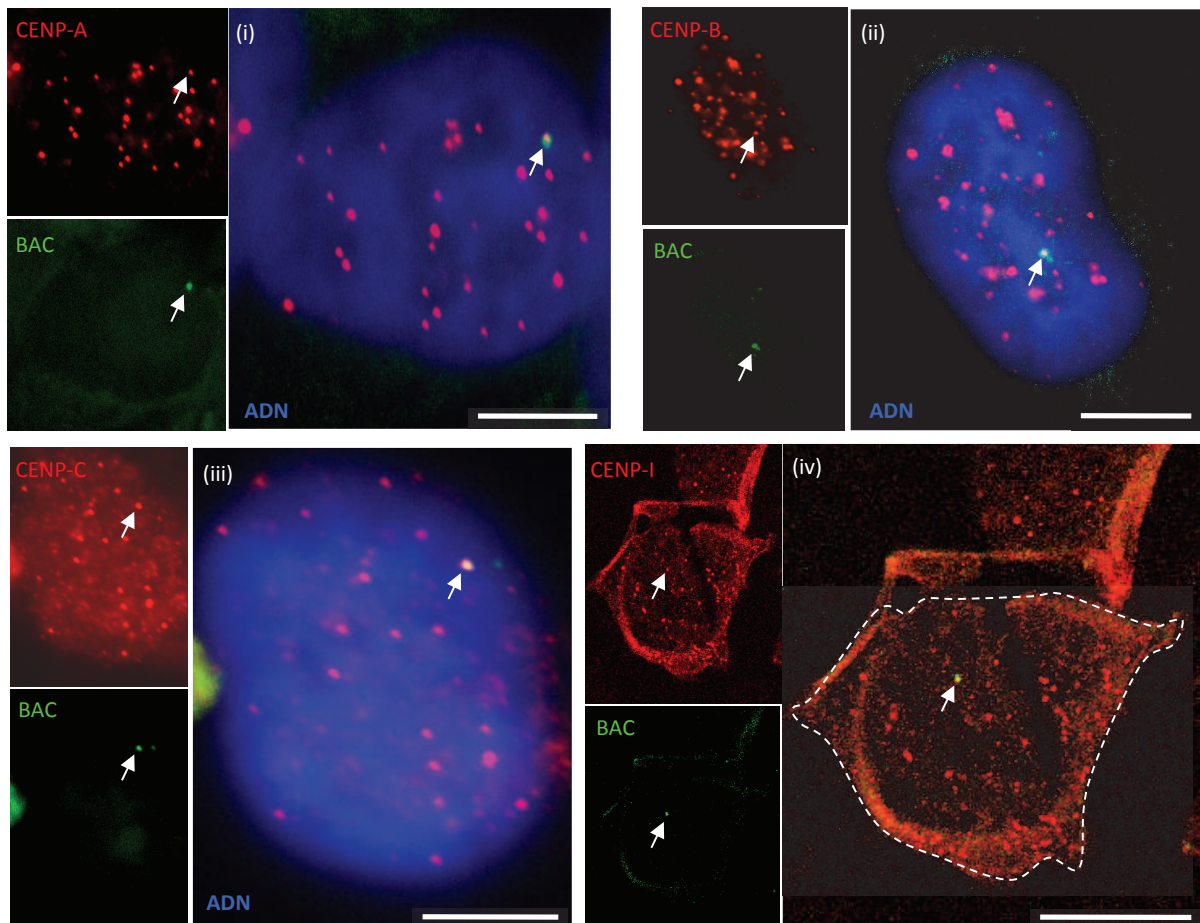


Figure 36: Détection des protéines CENP-A, CENP-B, CENP-C et CENP-I sur le chromosome artificiel par Immuno-FISH

Détection du CENP-A (i) , CENP-B (ii), CENP-C (iii) et CENP-I (iv) avec des anticorps spécifiques révélés avec des anticorps couplés à un fluorochrome émettant dans le vert. Ces signaux colocalisent avec le signal FISH correspondant au vecteur BAC détecté avec une sonde marquée au dCTP-Cy3, (signal rouge) (Echelle = 10µm).

J'ai ensuite utilisé ces cellules pour analyser les effets d'ICP0 sur les protéines CENPs associées aux HACs. Dans les cellules n'exprimant pas ICP0, les signaux correspondant aux différentes protéines CENPs sont localisés au niveau des centromères uniquement. L'expression d'ICP0 induit une diminution voire une disparition complète des signaux correspondant aux CENPs analysées y compris au niveau du HAC (Figures 37-40).

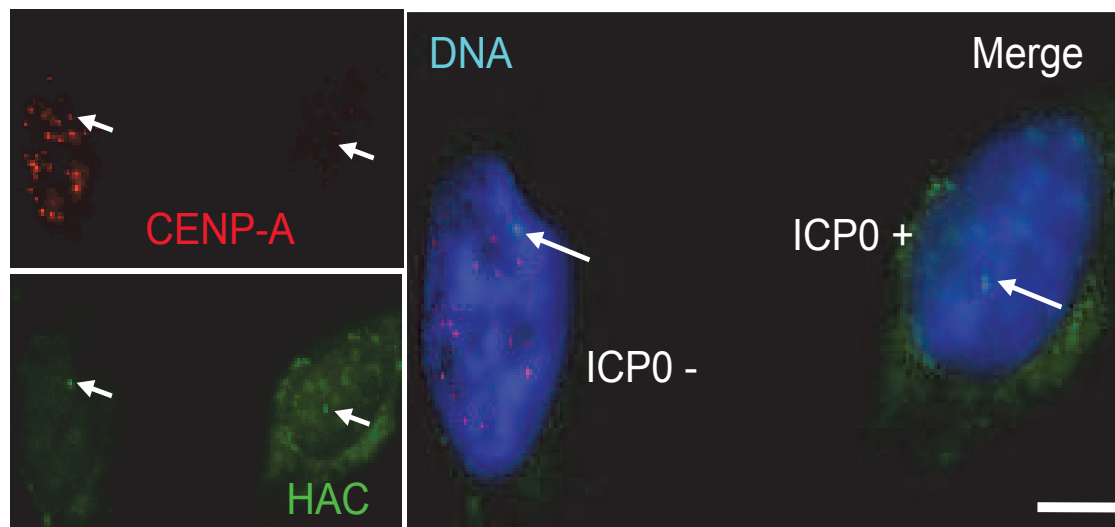


Figure 37: Effet d'ICP0 sur la protéine CENP-A dans des cellules exprimant un HAC

Détection de la protéine CENP-A dans des cellules W0210R-8 transfectées avec le plasmide codant la protéine ICP0. Dans la cellule de droite, qui exprime ICP0 (ICP0+), une diminution complète de la quantité du signal correspondant à CENP-A (en rouge) est observée, à la fois sur les centromères endogènes et le chromosome artificiel (marqué cette fois-ci en vert). Par contre, dans la cellule de gauche, qui n'exprime pas ICP0 (ICP0-) ce n'est pas le cas, et la protéine CENP-A est bien présente sur le HAC (flèche). L'ADN est marqué en bleu. (Echelle = 10µm).

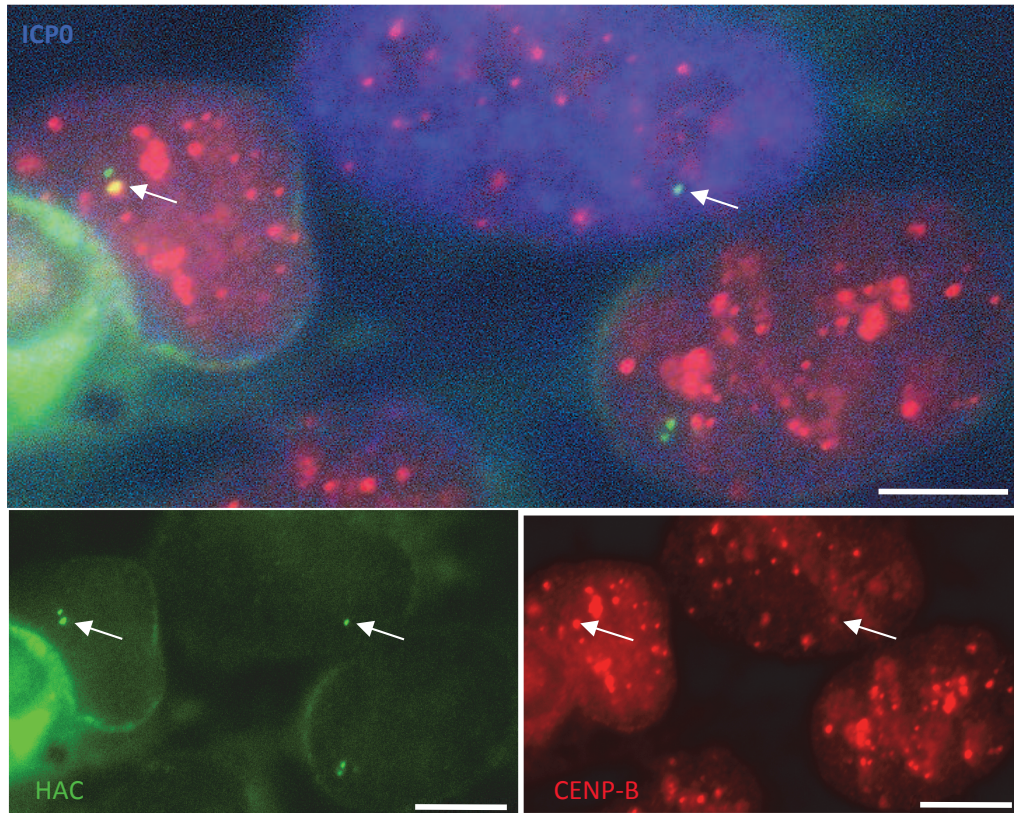


Figure 38: Effet d'ICP0 sur la protéine CENP-B dans des cellules exprimant un HAC

Détection de la protéine CENP-B dans des cellules W0210R-8 transfectées avec le plasmide codant la protéine ICP0. ICP0 est marquée en bleu (Cy5). Dans la cellule du milieu, qui exprime ICP0, une diminution de la quantité du signal correspondant à CENP-B (en rouge) est observée, à la fois sur les centromères endogènes et le chromosome artificiel (marqué en vert) (Echelle = 10 μ m).

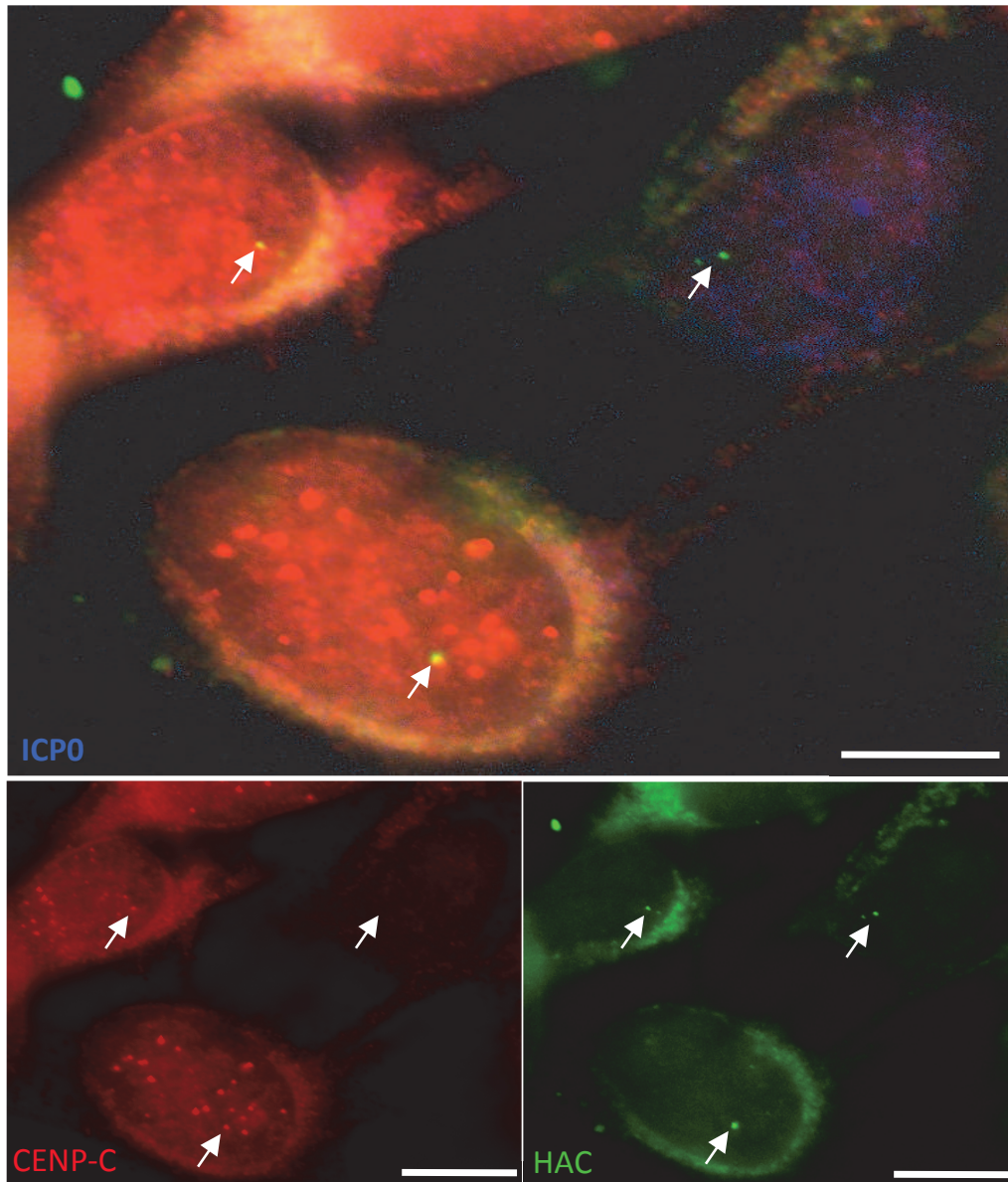


Figure 39: Effet d'ICP0 sur la protéine CENP-C dans des cellules exprimant un HAC

Détection de la protéine CENP-C dans des cellules W0210R-8 transfectées avec le plasmide codant la protéine ICP0. ICP0 est marquée en bleu (Cy5). Dans la cellule de droite, qui exprime ICP0, une diminution de à CENP-C (en rouge) est observée, à la fois sur les centromères endogènes et le chromosome artificiel (en vert). (Echelle = 10 μ m).

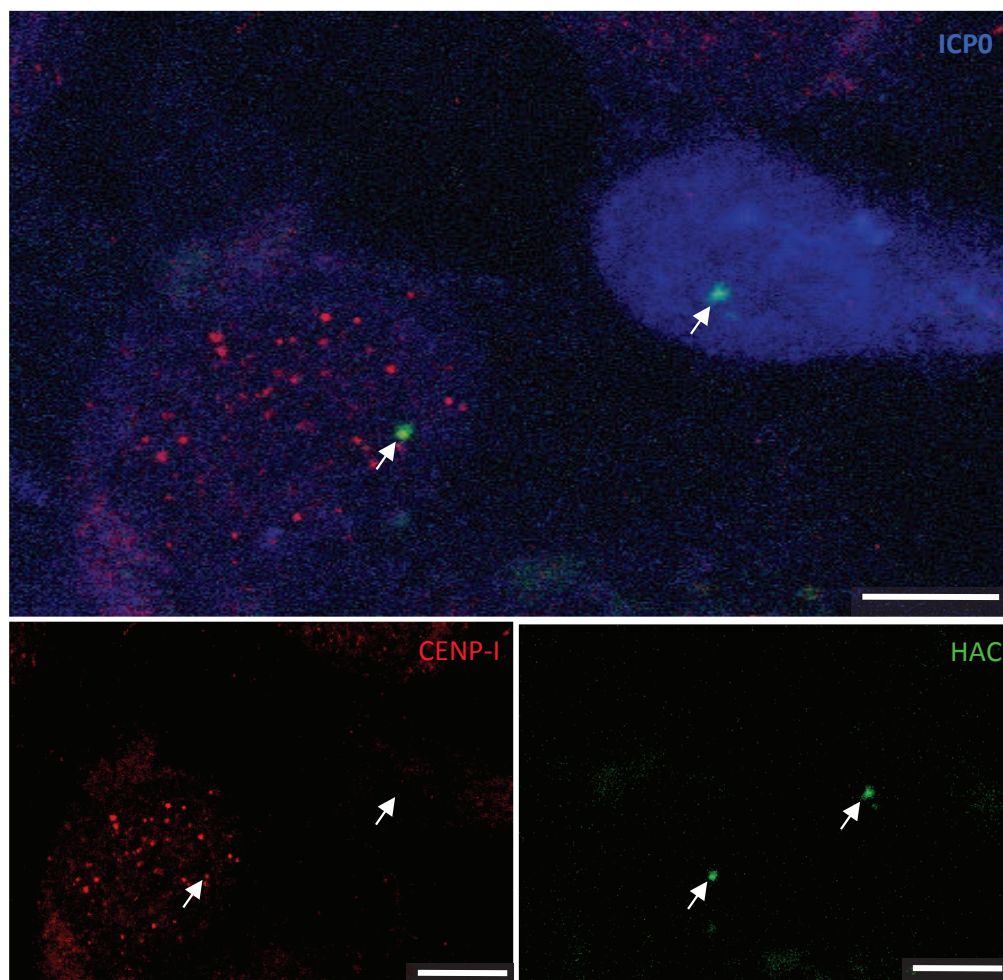


Figure 40: Effet d'ICP0 sur la protéine CENP-I dans des cellules exprimant un HAC

Détection de la protéine CENP-I dans des cellules W0210R-8 transfectées avec le plasmide codant la protéine ICP0. ICP0 est marquée en bleu (Cy5). Dans la cellule de droite, qui exprime ICP0, une diminution de CENP-C (en rouge) est observée, à la fois sur les centromères endogènes et le chromosome artificiel (en vert). (Echelle = 10 μ m).

Un récapitulatif de cette étude sous forme de tableau est présenté (Tableau 1). Ce tableau indique que contrairement à CENP-A, -C et -I, la diminution de la protéine CENP-B au niveau du HAC dans les cellules exprimant ICP0 n'est facilement observée que dans 10 à 20% des cellules. La diminution du signal CENP-B est toujours plus difficile à observer même sur les centromères endogènes. Ceci est possiblement lié soit au positionnement de CENP-B au sein du centromère (plus interne), qui la rend inaccessible à ICP0, soit au fait que CENP-B peut se positionner sur des régions adjacentes au centromère de cœur, qui contiennent la boîte CENP-B dans leur séquence satellite mais sont dépourvues de nucléosomes contenant CENP-A. Ces régions pourraient ne pas être ciblées par ICP0 et donc CENP-B y serait toujours présente ce qui expliquerait que le signal CENP-B ne disparaît jamais complètement. Une autre hypothèse est que la liaison de CENP-B avec la

CENP-B box soit trop forte pour que CENP-B se décroche complètement de l'ADN. Cela dit, la structure précise du HAC étant encore inconnue cette explication pourrait ne pas s'appliquer au HAC. Contrairement à la condition d'infection par le virus sauvage, ces mêmes signaux ne diminuent pas lorsque le virus mutant vFXE a été utilisé (résultats non montrés).

| Protéine | Présence sur le HAC | Proportion de cellules ICP0+ montrant une diminution de la protéine CENP sur le HAC |
|----------|---------------------|---|
| CENP-A | ✓ | 100% |
| CENP-B | ✓ | 10-20% |
| CENP-C | ✓ | 100% |
| CENP-I | ✓ | 100% |

Tableau 1: Bilan de l'effet d'ICP0 sur les protéines CENP présentes sur le HAC

2.2.2 La réponse iCDR sur les HACs

Vu qu'ICP0 conserve son activité déstabilisatrice des centromères au niveau des chromosomes artificiels, la question qui a été logiquement posée a été de savoir si l'iCDR pouvait avoir lieu sur un chromosome artificiel déstabilisé par ICP0. Nous avons donc réalisé des expériences d'immuno-FISH dans le but de détecter les protéines coïline, fibrillarine et SMN au niveau des HACs dans des cellules HT1080 W0210R-8 transfectées avec un plasmide exprimant ICP0. Les résultats obtenus montrent que les protéines coïline et fibrillarine sont capables de se localiser sur le HAC endommagé par ICP0 (Figure 41). En revanche, la protéine SMN n'est pas capable de se relocaliser sur le HAC endommagé dans ces conditions. Les protéines coïline et fibrillarine se repositionnent en multispot sur les centromères endogènes et sur le chromosome artificiel dans environ 20 % des cellules HAC exprimant ICP0.

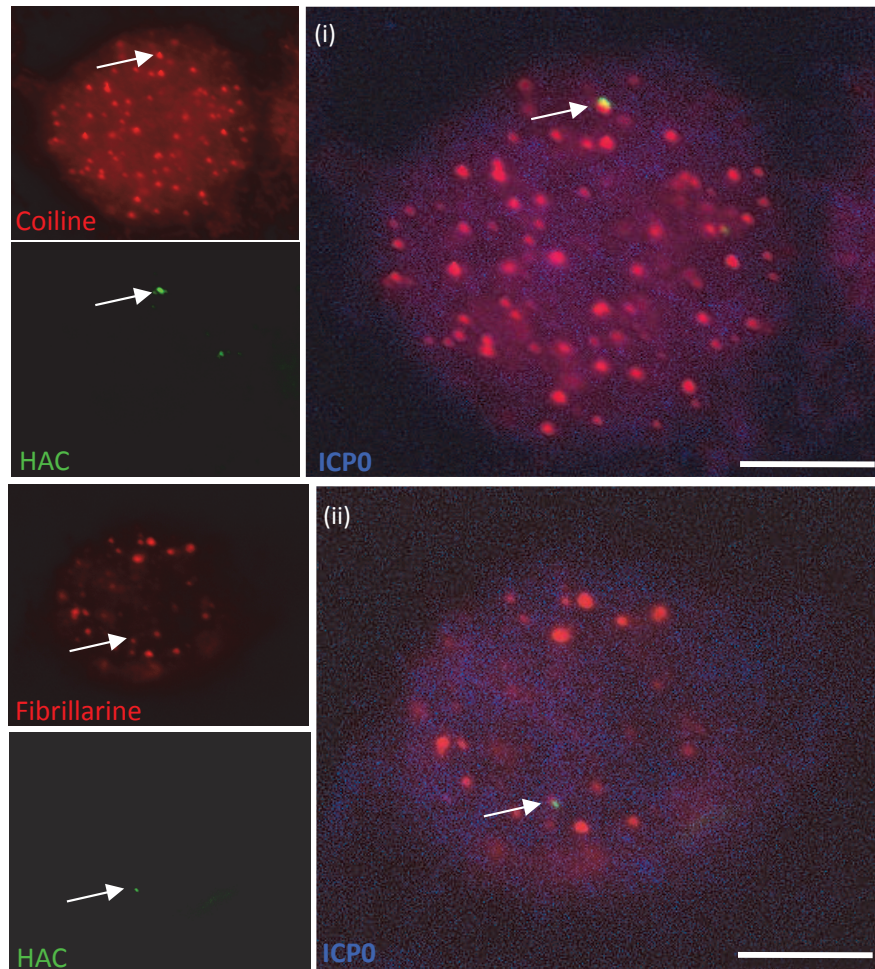


Figure 41: Réponse iCDR sur les chromosomes artificiels

Détection des protéines coïline (i) et fibrillarine (ii) dans des cellules W0210R-8 transfectées avec le plasmide exprimant ICP0. Les protéines intervenant dans la réponse iCDR: coïline, fibrillarine (vert) ainsi qu'ICP0 (bleu) ont été marquées par IF et le chromosome artificiel a été marqué grâce à sa sonde spécifique (vert). La relocalisation des protéines coïline et fibrillarine sur le chromosome artificiel (flèches blanches) est visible (Echelle = 10 μ m).

CHAPITRE 2 : ETUDE DE LA DESTABILISATION DE LA CHROMATINE CENTROMERIQUE PAR LA PROTEINE ICP0

1. ANALYSE PAR DIGESTION A LA NUCLEASE MICROCOCCALE (MNASE)

La technique utilisée pour étudier la structure de la chromatine du point de vue de l'occupation nucléosomique fait appel à la digestion de la chromatine par la nucléase micrococcalle ou MNase (Micrococcal Nuclease) (Figure 42).

Deux approches sont possibles : soit on utilise des concentrations variables de MNase et on fixe un temps constant, cette approche est appelée temps constant/unités variables ; soit on utilise une concentration constante de MNase et on digère la chromatine pendant des temps variables, cette approche est appelée temps variable/unité constante. Après de multiples essais de digestion MNase il a été décidé d'utiliser l'approche temps variable/unité constante pour étudier la conformation de la chromatine centromérique suite à l'activité de la protéine ICP0. Après digestion à la MNase les fragments d'ADN récupérés sont transférés sur une membrane de nitrocellulose chargée positivement puis cette membrane est hybridée par Southern Blot (SB) avec une sonde spécifique des centromères marquée radioactivement au ³²P dCTP afin d'obtenir des informations sur la séquence centromérique étudiée. Cette analyse de digestion à la MNase a été réalisée dans quatre modèles cellulaires différents: trois modèles de cellules humaines : les cellules HT1080 W0210R-8 contenant le chromosome artificiel, des cellules HeLa infectées par le virus HSV-1, et également des cellules HeLa TRex inductibles à la tétracycline pour l'expression de la protéine ICP0 ou de son mutant non fonctionnel tronqué dans le domaine RING Finger, FXE. Des cellules murines NIH 3T3 TRex également inductibles pour l'expression d'ICP0 selon le même principe que les HeLa TRex, ont également été utilisées (Voir matériel et méthodes pour la description des lignées).

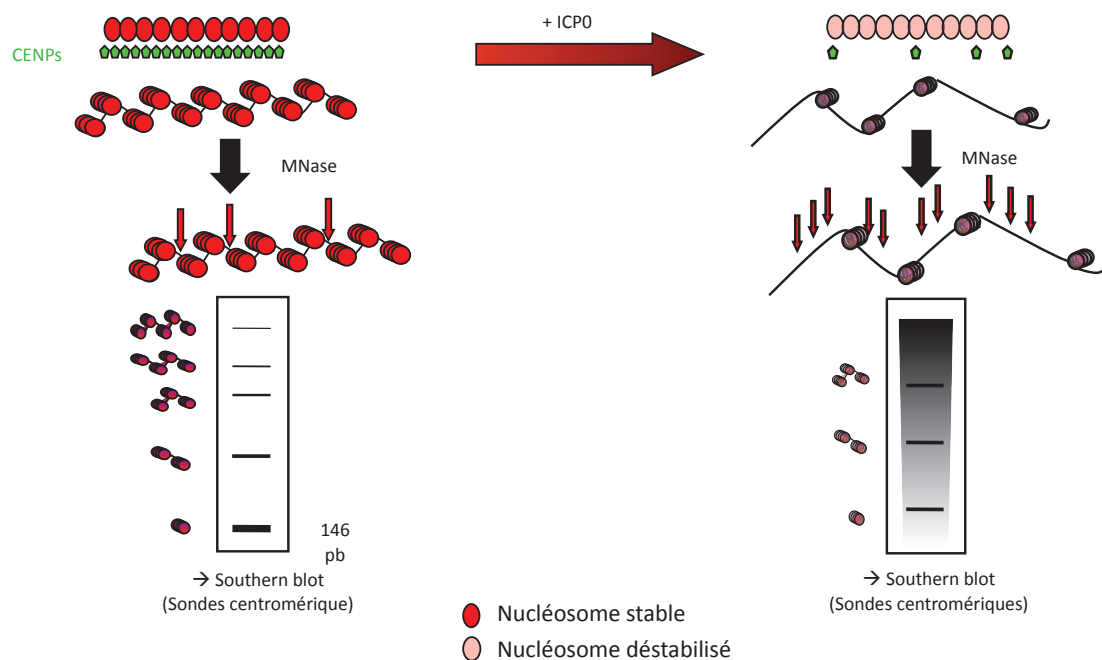


Figure 42: Approche de digestion à la Nucléase micrococcale dans l'étude de la structure de la chromatine centromérique

La Nucléase Micrococcale (MNase) est une enzyme qui coupe entre les nucléosomes et permet d'obtenir des profils de digestion caractéristiques dits « en échelle » (partie gauche) dont les barreaux correspondent aux différentes formes nucléosomiques: mono, di, tri, tetra, etc. Après l'action de la protéine ICP0, qui, comme supposé, déstabilise la structure chromatiniennne, le profil sera modifié, par exemple en un profil de type « smear » ou traînée, caractéristique d'une chromatine déstabilisée (partie droite). Ces profils sont ensuite analysés par Southern Blot avec des sondes spécifiques des centromères.

1.1 Profils MNase dans les cellules HT1080 W0201R-8 contenant un chromosome artificiel

Compte tenu de l'activité d'ICP0 sur les HACs, il était intéressant de tester s'il était possible d'utiliser ces cellules dans des expériences de digestion MNase. La condition *sine qua non* étant de pouvoir détecter des nucléosomes issus du chromosome artificiel par SB dans des cellules HT1080 W0201R-8 traitées par MNase. Avant tout, j'ai testé la fonctionnalité des sondes reconnaissant le HAC en SB sur de l'ADN génomique total de cellules contenant le chromosome artificiel issu d'un BAC. De l'ADN génomique issu des cellules HT1080 W0201R-8 a été digéré par des enzymes de restriction coupant dans le vecteur initial BAC, (Nhe1 et Spe1). Une fois cet ADN digéré, celui-ci il a été mis à migrer sur gel d'agarose à côté de contrôles positifs que sont les plasmides initiaux en question linéarisés: les

plasmides pWTR 11.32 ayant servi à construire les cellules HT1080 W0201R-8 et pBelo BAC qui est le plasmide vide (sans séquence alphanucléotidique).

Une fois le gel migré, l'ADN a été transféré sur membranes de nitrocellulose puis mis en contact avec les différentes sondes reconnaissant normalement les séquences du chromosome artificiel. Le signal obtenu au niveau de l'ADN génomique des cellules contenant le HAC est très faible, bien que l'exposition sur la cassette de révélation ait duré plusieurs jours (Figure 44). Cela dit il est intéressant de noter que les bandes obtenues pour les cellules HT1080 W0210 R8 (BAC+) et pWTR11.32 sont apparemment de la même taille. Ceci montre que le HAC est détectable au moins dans les cellules HT1080 W0210 R8, cependant de manière assez faible.

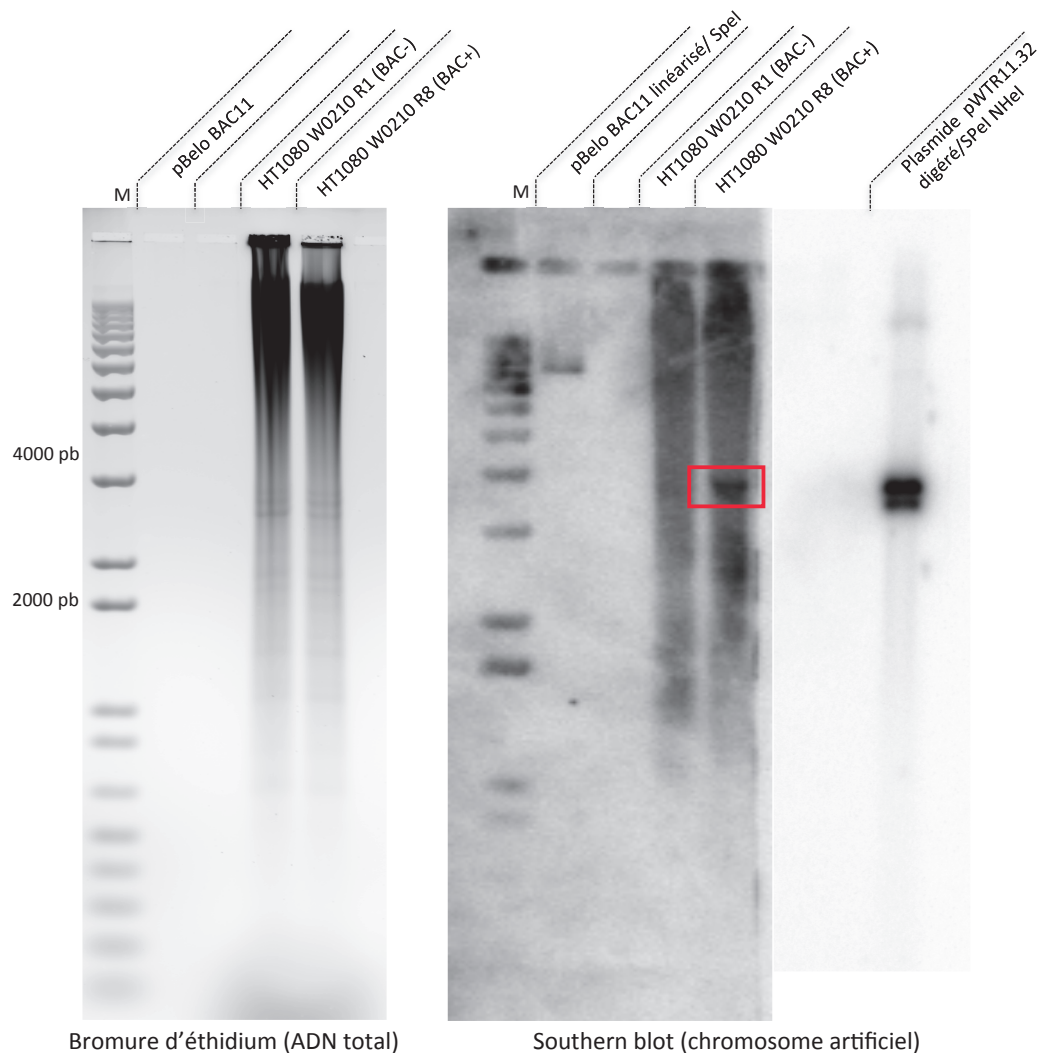


Figure 43: Tests de détection du chromosome artificiel par Southern blotting

Expérience de Southern blotting : Gauche : Gel d'agarose comprenant le plasmide pBeloBAC11 linéarisé et les ADN génomiques totaux des cellules HT1080W0210 R1 (BAC-) et HT1080W0210 R8 (BAC+) digérés par les enzymes NheI et SpeI. Droite : Southern blot correspondant au gel. La sonde utilisée reconnaît spécifiquement le HAC issu d'un BAC. Le plasmide pWTR11.32 digéré et reconnu en Southern blot par la même sonde est tiré d'une autre expérience (dernière colonne).

Digestion MNase du HAC

D'emblée j'ai été confronté à un problème de détection du matériel génétique en SB, car bien que les cellules contiennent le HAC (Voir chapitre PCR), il semblait *a priori* difficile d'obtenir un signal suffisant pour effectuer une étude de digestion MNase et comparer différents profils. En effet au vu des résultats de SB il était attendu que le signal correspondant à la chromatine du HAC digérée par la MNase soit dilué dans les nombreuses bandes obtenues à partir de la chromatine génomique (Figure 44). La figure 43 montre les profils de digestions MNase de la chromatine de cellules HT1080 W0201R-8 c'est à dire

contenant un HAC indépendant, non-infectées (Mock) ou infectées par un virus sauvage (HSV 17syn+), ou un virus muté pour l'expression de la protéine ICP0 (HSV dl1403). La chromatine de chaque lignée a été digérée par la MNase pendant les temps indiqués, avec 5 unités d'enzyme pour 2,5 millions de noyaux. Les profils de digestion de la chromatine totale sont visualisés par un gel coloré au bromure d'éthidium (BET). Ce gel montre que la digestion est correcte, c'est à dire que l'évolution de la digestion au cours du temps grâce à l'accumulation des formes de bas poids moléculaires (mono à penta-nucléosomes) est claire. Par contre, lorsque j'ai réalisé le SB sur ces mêmes profils, je n'ai pu observer aucun signal même après exposition de la membrane pendant plusieurs semaines (à droite). Ce SB est le résultat de l'hybridation avec la sonde reconnaissant le HAC issu d'un BAC. Au vu de cette absence de détection de fragments issus du HAC, je me suis tourné vers l'analyse des profils de digestion de la chromatine issue des centromères endogènes.

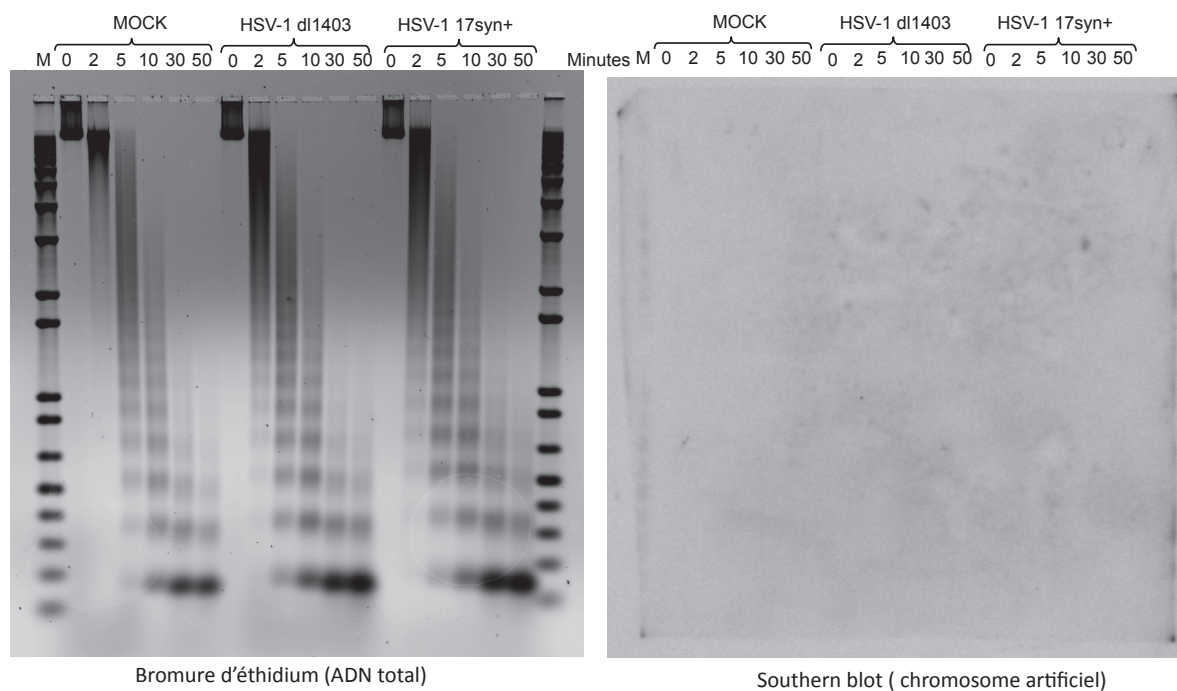


Figure 44: Non détection du HAC digéré par la MNase en Southern blot

Expériences de digestion à la MNase dans des cellules HT1080 W0210R-8 contenant un chromosome artificiel issu d'un BAC. Ces cellules ont été infectées ou non (Mock) avec un virus sauvage (HSV 17 Syn +), ou un virus délété pour la protéine ICP0 (HSV dl1403). À gauche, il s'agit des profils d'ADN totaux marqués au bromure d'éthidium. Ces profils sont normaux, c'est à dire que l'on observe une accumulation des formes de bas poids moléculaires (mononucléosomes essentiellement) plus importante dans les deux conditions d'infection, par rapport à la condition Mock (Voir ultérieurement). Par contre, si l'on regarde ces mêmes profils hybridés avec une sonde reconnaissant spécifiquement les HACs, on ne voit absolument rien, ce qui montre que la limite de détection avec cette sonde a été atteinte en SB, et qu'il est impossible dans ces conditions (5µg d'ADN total déposé par puit) de visualiser le HAC digéré, pourtant contenu dans la masse d'ADN total.

Le HAC reste sans doute une trop petite structure pour être détectée efficacement par des techniques de biologie de la chromatine, comme le Southern blot. Peut-être qu'en isolant le HAC des cellules le contenant et en en faisant migrer suffisamment sur un gel d'agarose, il serait enfin possible de le visualiser et d'analyser sa structure dans le même type d'étude (MNase). Une autre hypothèse est qu'il serait hypersensible à la nucléase micrococcalle, ce qui expliquerait pourquoi même avec une technique très sensible (SB) il n'est pas visible.

1.2 Étude de digestion MNase de la chromatine des centromères endogènes

1.2.1 Validation de la sonde alphanucléotidique humaine

La première chose à faire a été de construire une sonde radioactive qui reconnaît spécifiquement les séquences centromériques humaines issues du chromosome 21 (Voir matériel et méthodes) et de tester sa spécificité sur l'ADN humain. Pour cela, j'ai digéré et fait migrer sur gel d'agarose de l'ADN génomique total de toutes les lignées cellulaires HT1080 et de la lignée cellulaire de souris NIH 3T3 (Figure 45 gauche). J'ai digéré la même quantité d'ADN (5 µg) par l'enzyme EcoR1 car cette enzyme me permettait d'obtenir des profils de digestion reconnaissables en SB. Lorsque le SB a été réalisé sur ces profils de digestion (Figure 45 droite), la sonde radioactive n'a reconnu que les ADN humains (5 premières colonnes) et pas l'ADN murin (dernière colonne) ce qui prouve bien que la sonde d'ADN alphanucléotidique qui allait servir au SB est bien spécifique de l'ADN humain.

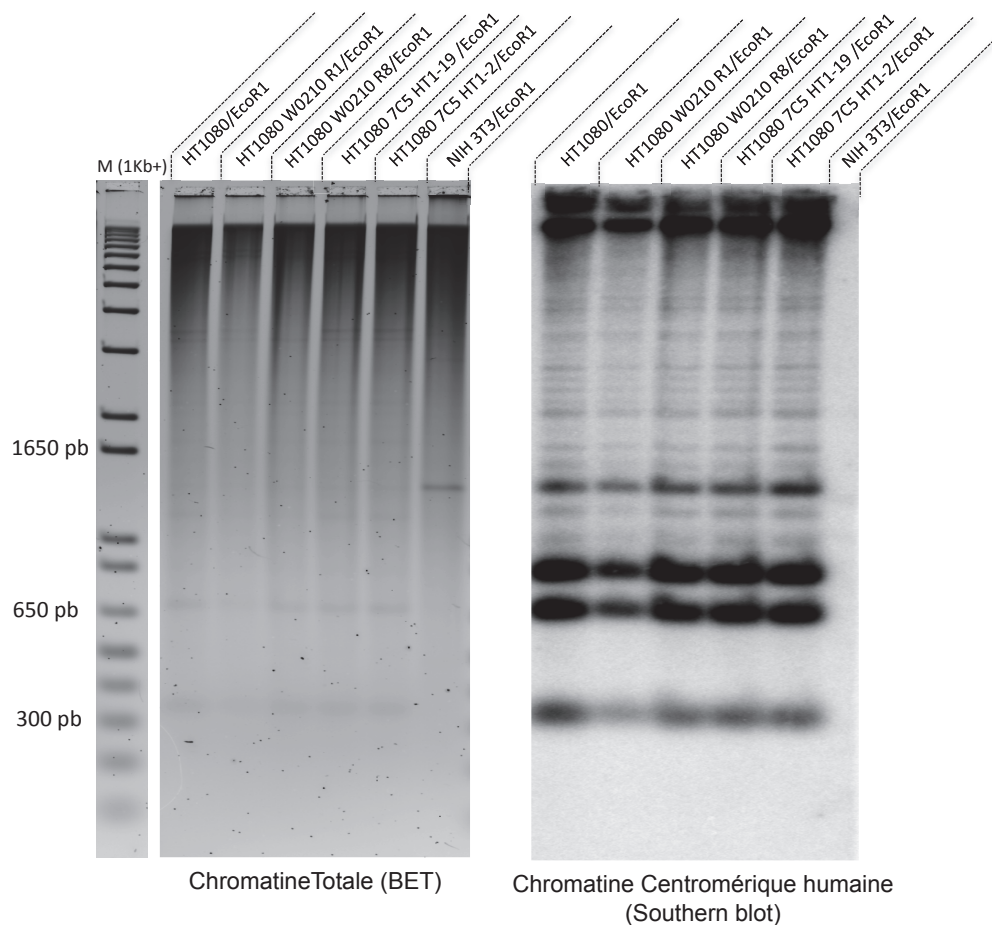


Figure 45: Spécificité pour l'ADN humain de la sonde alphasite issue du chromosome 21

Gauche : Digestion de 5µg d'ADN génomique total de toutes les lignées humaines HT1080 et d'ADN génomique total de la lignée murine NIH 3T3 par l'enzyme EcoR1. Droite : Même profils hybridés en SB avec la sonde alphasite spécifique du chromosome 21 humain après transfert sur membrane.

1.2.2 Analyse de la structure chromatinienne centromérique dans les cellules infectées

Les cellules utilisées sont des HeLa. Deux temps d'infection ont été testés, 3 ou 4 heures, par les virus HSV-1 17 syn+ et par le virus mutant HSV-1 dl1403, un mutant du virus n'exprimant pas la protéine ICP0. Les résultats les plus cohérents ont été obtenus avec la condition à 3 heures d'infection (Analyse verticale, figure 46).

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de profils de digestions sur gel d'agarose ou sur membrane de nitrocellulose (après le transfert). Ces profils ont été quantifiés grâce au logiciel « Image J » et les résultats sont également présentés sous forme de graphiques. Chacune des trois courbes correspond à une condition différente selon le type de cellules considéré. La courbe bleue correspond à la condition non infectée, la courbe noire correspond à la condition d'infection par le virus mutant nul pour la protéine ICP0 (le virus

dl1403), la courbe rouge correspond à la condition d'infection par le virus sauvage. Sur l'axe des abscisses sera représenté, soit le temps écoulé depuis le début de la digestion (« analyse horizontale »), soit les différentes formes nucléosomiques («analyse verticale»). Sur l'axe des ordonnées apparaîtra uniquement l'intensité des régions considérées, mesurée en unités arbitraires.

Comme précisé précédemment, l'analyse du gel d'agarose (BET) à gauche, donc l'ADN génomique total, montre qu'il y a une augmentation sensible de l'accumulation des formes mononucléosomiques au cours du temps pour la condition d'infection avec le virus sauvage HSV-1 17 syn+. Par contre, l'analyse du profil d'hybridation de SB, à droite, montre une situation inverse, c'est à dire une diminution des formes de bas poids moléculaires (très bien visible pour les dinucléosomes) dans la condition d'infection avec le virus sauvage.

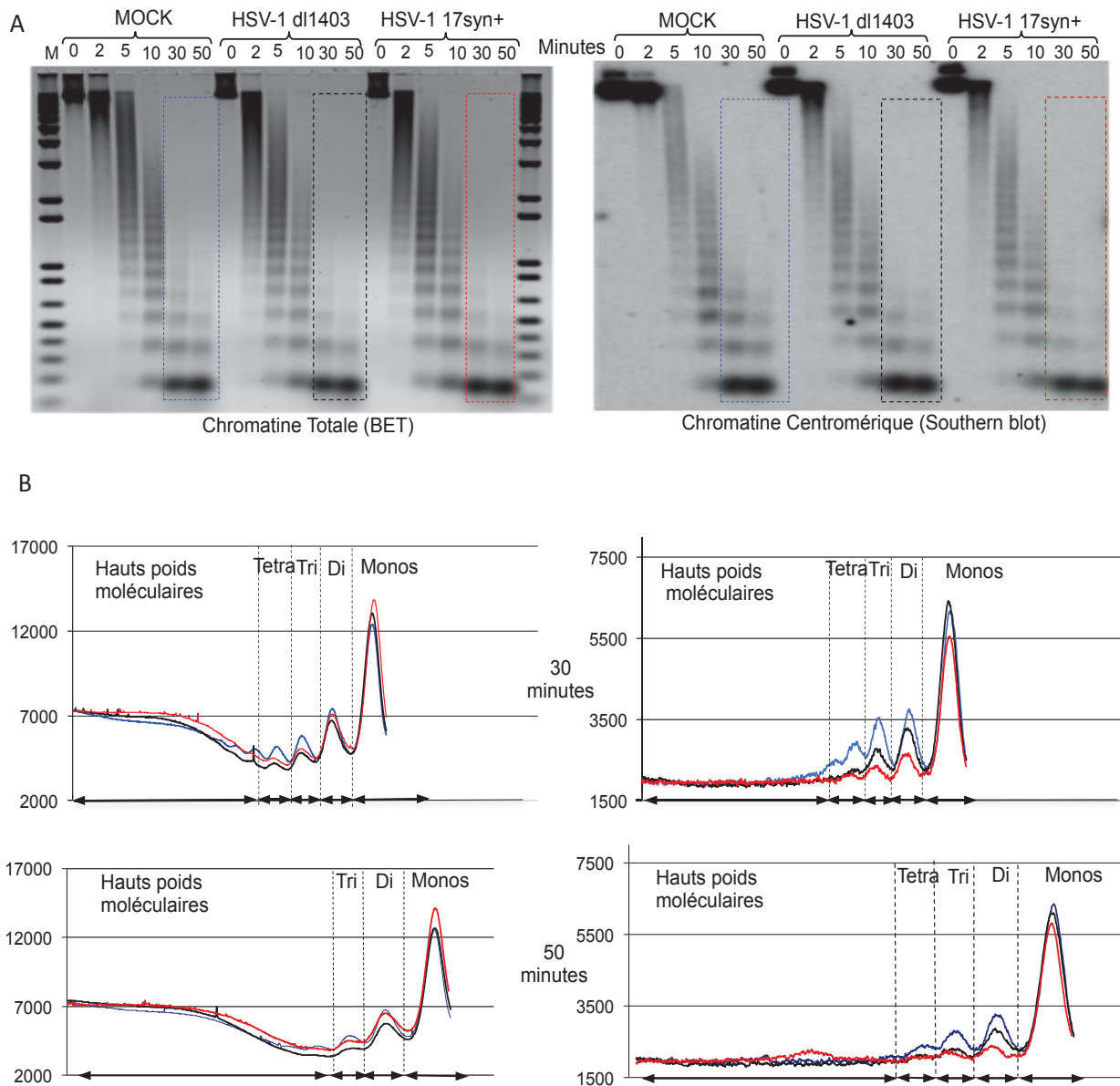


Figure 46 : Déstabilisation de la chromatine centromérique dans des cellules infectées, analyse verticale

A) Gauche : Profils de digestion à la MNase d'ADN issus de cellules non infectées (MOCK) ou infectées par un virus HSV-1 délété de la protéine ICP0 (HSV1-dl1403) ou sauvage (HSV-1 17 syn+). Droite : Même profils hybridé en Southern blot avec une sonde centromérique. B) Quantification de l'accumulation des différentes formes nucléosomiques à 30 et 50 minutes. Chaque courbe correspond à une condition (Bleue : MOCK ; noire : HSV-1-dl1403 ; rouge : HSV-1-17 syn+).

L'analyse quantitative de l'accumulation des mononucléosomes et des dinucléosomes au cours du temps (Analyse horizontale, figure 47), montre que concernant la chromatine totale (graphes du dessus, BET) il n'y a pas de différence significative entre les différentes conditions. Par contre, concernant la chromatine centromérique (graphes du dessous, SB) il

existe un déficit substantiel de ces formes dans les cellules infectées par le virus sauvage par rapport aux cellules non infectées ou les cellules infectées par le virus dl1403.

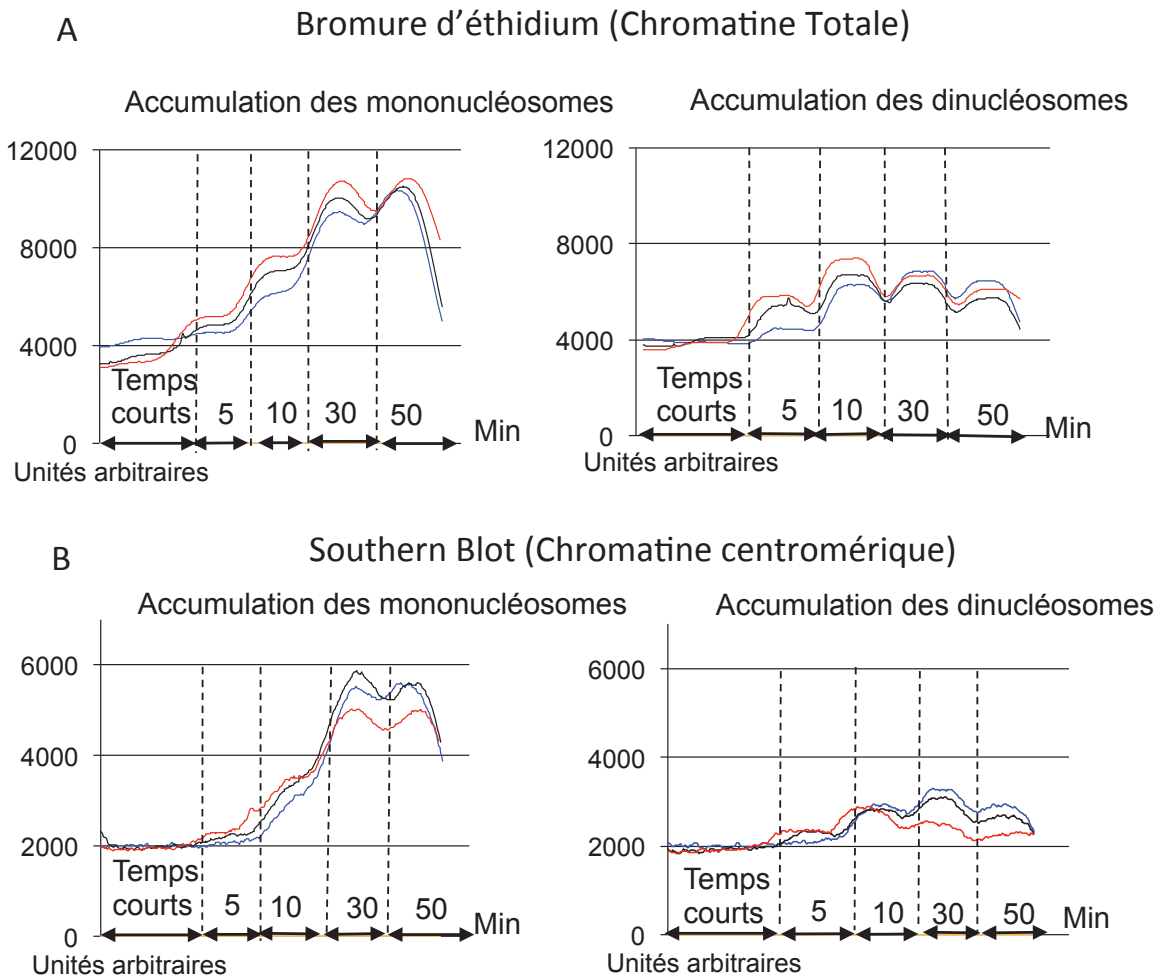


Figure 47: Déstabilisation de la chromatine centromérique dans des cellules infectées, analyse horizontale

Quantification de l'accumulation des formes mono et dinucléosomiques au cours du temps pour les différentes conditions, et pour l'ADN total (A) et centromérique (B). Toutes ces quantifications ont été réalisées par ImageJ, pour l'analyse détaillée de ces résultats, voir texte.

Ces premières analyses suggèrent au moins deux choses : (i) que l'infection en elle même modifie la chromatine cellulaire indépendamment d'ICP0 ce qui se traduit en gel BET par une accumulation plus importante des formes de bas poids moléculaire de la chromatine cellulaire dans les cellules infectées par rapport aux cellules non-infectées; (ii) qu'il existe un déficit des formes de bas poids moléculaires de la chromatine centromérique (SB) au cours du temps lors de l'infection, particulièrement lorsque la protéine ICP0 est présente. Une supposition possible suite à ces premiers résultats de digestion MNase est qu'ICP0 a un rôle dans la désorganisation de la structure chromatinienne centromérique. En effet, le

déficit observé est représentatif d'une organisation nucléosomique différente, les formes de plus bas poids moléculaires sont sous-représentées ce qui laisse présager une vitesse de digestion par l'enzyme plus rapide.

Afin de déterminer de façon rigoureuse la vitesse de digestion de la chromatine par la MNase il faut tenir compte dans ces analyses des ratios de la quantité d'une forme donnée (ex : les mononucléosomes) par rapport à la quantité de l'ensemble des formes de bas poids moléculaire (BPM, mono à tétra-nucléosomes).

Concernant les formes mononucléosomiques, ce rapport est représenté sur les graphiques par les barres vertes, le deuxième rapport calculé est celui entre les dinucléosomes et la totalité des BPM et est représenté par les barres oranges (Figure 48). Le troisième ratio calculé est celui entre les deux précédents, et correspond donc au rapport entre les mono et les dinucléosomes ajustés par rapport aux BPM. Ce ratio (R) donne une appréciation de la vitesse de digestion de la chromatine par l'enzyme MNase. Plus ce rapport est élevé, plus la vitesse de digestion est élevée et plus la chromatine est accessible. Les tableaux sous les graphiques sont des récapitulatifs des vitesses de digestion au cours du temps dans les différentes conditions d'infection ou de non infection.

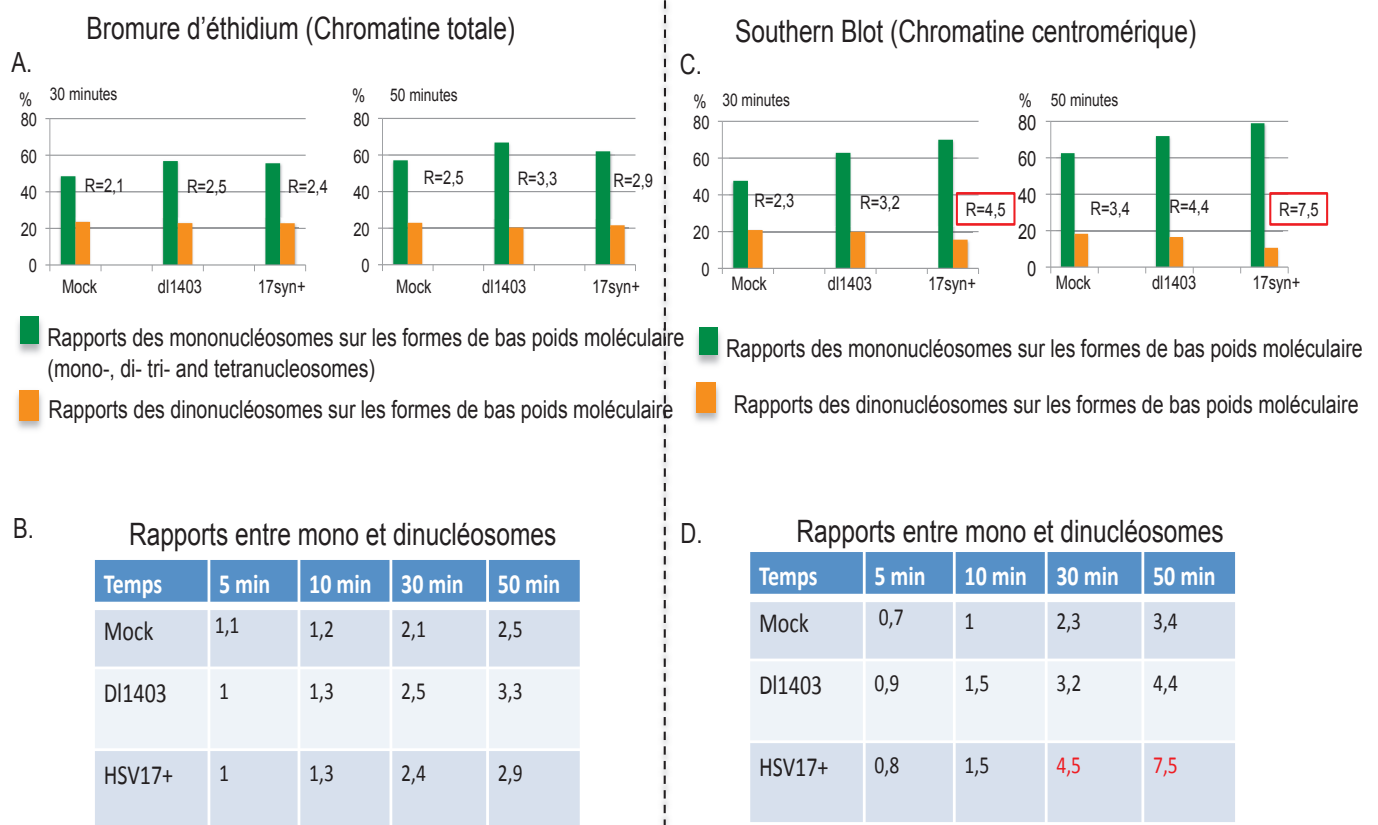


Figure 48: Déstabilisation de la chromatine centromérique dans des cellules infectées, rapports

Rapports en les différentes formes nucléosomiques à 30 et 50 minutes quantifiés par Image J A,C) Les graphes verts correspondent au rapport en les mononucléosomes et les BPM et les graphes oranges correspondent au rapport en les dinucléosomes et les BPM. Le chiffre indiqué à coté de chaque condition correspond au rapport entre les mono et les dinucléosomes et est un indicateur de la vitesse de digestion par la MNase. Cinétiques de digestion à la MNase pour chaque condition d'infection, pour l'ADN total (B) et l'ADN centromérique (D). Les vitesses ont été calculées comme précédemment (rapport mono/dinucléosomes normalisés par rapport aux formes BPM) pour les temps 5, 10, 30 et 50 minutes et compilées sous forme de ces tableaux.

Ces résultats montrent donc que la digestion des séquences centromériques est plus rapide dans les cas d'infection par HSV-1, et plus spécifiquement en présence d'ICP0. Ceci suggère une modification chromatinienne des centromères par ICP0, qui conduit à une accessibilité plus importante de cette chromatine.

Le processus d'infection est un processus complexe qui fait intervenir une multitude de protéines virales dont les activités sont souvent interdépendantes. Afin de confirmer que c'est bien la protéine ICP0 seule qui est à l'origine de la déstabilisation de la chromatine centromérique observée par les tests MNase, j'ai réalisé ces mêmes tests en utilisant des cellules inductibles pour l'expression d'ICP0 ou de son mutant non fonctionnel FXE

(mutant dans le domaine RING Finger nécessaire à l'activité E3 ubiquitine ligase d'ICP0 et à sa localisation centromérique).

1.3 Analyse de la structure chromatinienne centromérique dans les cellules HeLa TRex inductibles pour l'expression d'ICP0

1.3.1 Vérification de la fonctionnalité du système inductible TRex par Western Blot

La première chose que j'ai vérifiée est la fonctionnalité du système inductible dans les cellules HeLa TRex inductibles pour l'expression des protéines ICP0 (TR-ICP0) et FXE (TR-FXE). Pour ce faire, j'ai réalisé des tests de Western Blot et d'immunofluorescence dans le but de déterminer si l'expression de chaque protéine est induite correctement par la tétracycline (24 heures d'induction à la tétracycline (100µg/mL)).

Après avoir induit les cellules HeLa TRex, TR-FXE et TR-ICP0 pendant 24 heures à la tétracycline (100µg/mL), j'ai récupéré les protéines de chaque lignée, induite ou non, et déposé sur un gel d'acrylamide 10µg de protéines par condition (Figure 49). Après transfert des protéines, le WB a été réalisé en utilisant un anticorps spécifique de la protéine ICP0. Les signaux obtenus montrent que les protéines ICP0 et FXE sont exprimées lorsque les cellules sont induites (colonnes 4 et 6). Par contre il n'y a pas d'expression de la protéine lorsque les cellules ne sont pas induites (colonnes 3 et 5) ou dans les cellules témoins (colonnes 1 et 2). Ces résultats montrent que le système est fiable et relativement hermétique par rapport à d'éventuelles fuites d'expression qui sont parfois observées dans ce type de système inductible.

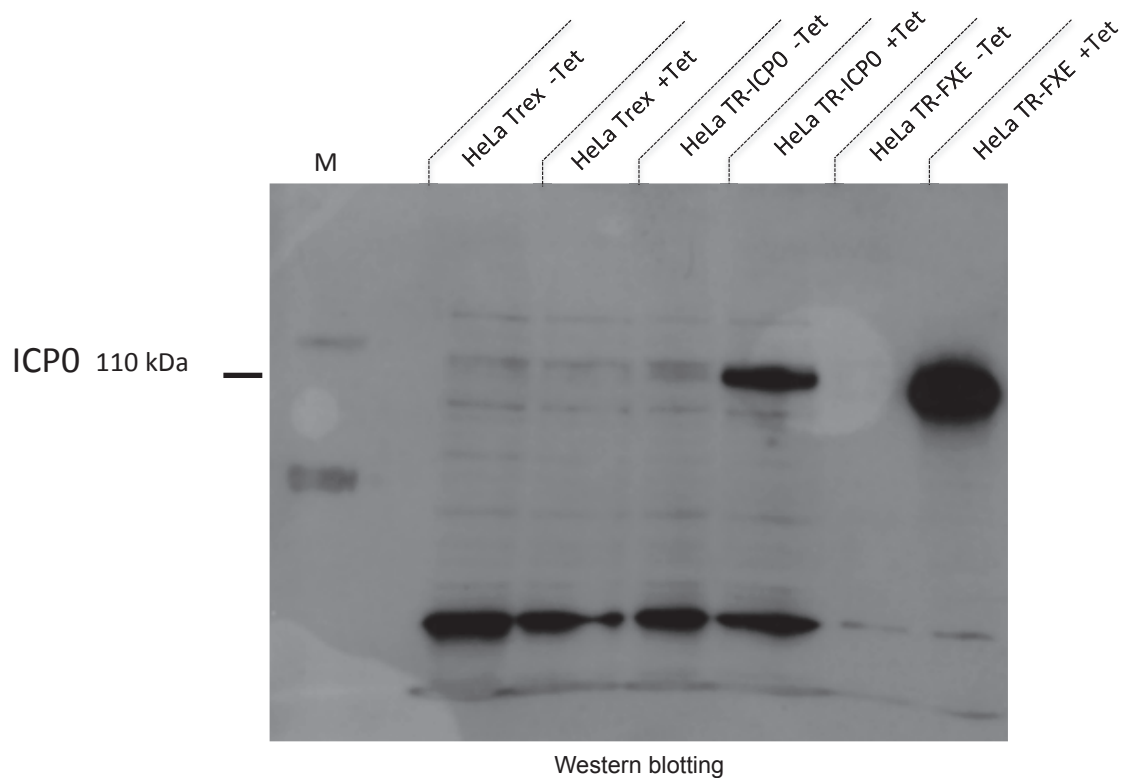


Figure 49: Fonctionnalité du système inductible tétracycline dépendant dans des cellules HeLa TRex

Expériences de Western blot dans des cellules HeLa TRex, TR-FXE, et TR-ICP0 induites ou non à la tétracycline pendant 24H. L'anticorps anti-ICP0 reconnaît bien la protéine ICP0 (de taille de 110 Kda) ou sa forme mutée (légèrement plus courte) uniquement lorsque les cellules sont induites 24h à la tétracycline.

1.3.2 Vérification par Immunofluorescence

J'ai également réalisé des expériences d'immunofluorescence (Figure 50) dans le but de détecter les protéines ICP0 ou FXE (vert) et CENP-A (rouge) dans des cellules HeLa TRex non induites ou induites. Une augmentation du signal ICP0 ou FXE est visible lorsque les cellules sont induites par la tétracycline. Une diminution du signal CENP-A est observée dans les cellules exprimant ICP0 (Figure 50 C), ce qui montre le caractère fonctionnel de la protéine exprimée dans ce système. Par contre dans les deux autres types de cellules, TRex (Figure 50 A) et TR-FXE (Figure 50 B) il n'y a, comme attendu, pas de diminution de CENP-A, ce qui montre que les cellules TR-ICP0 expriment une protéine fonctionnelle.

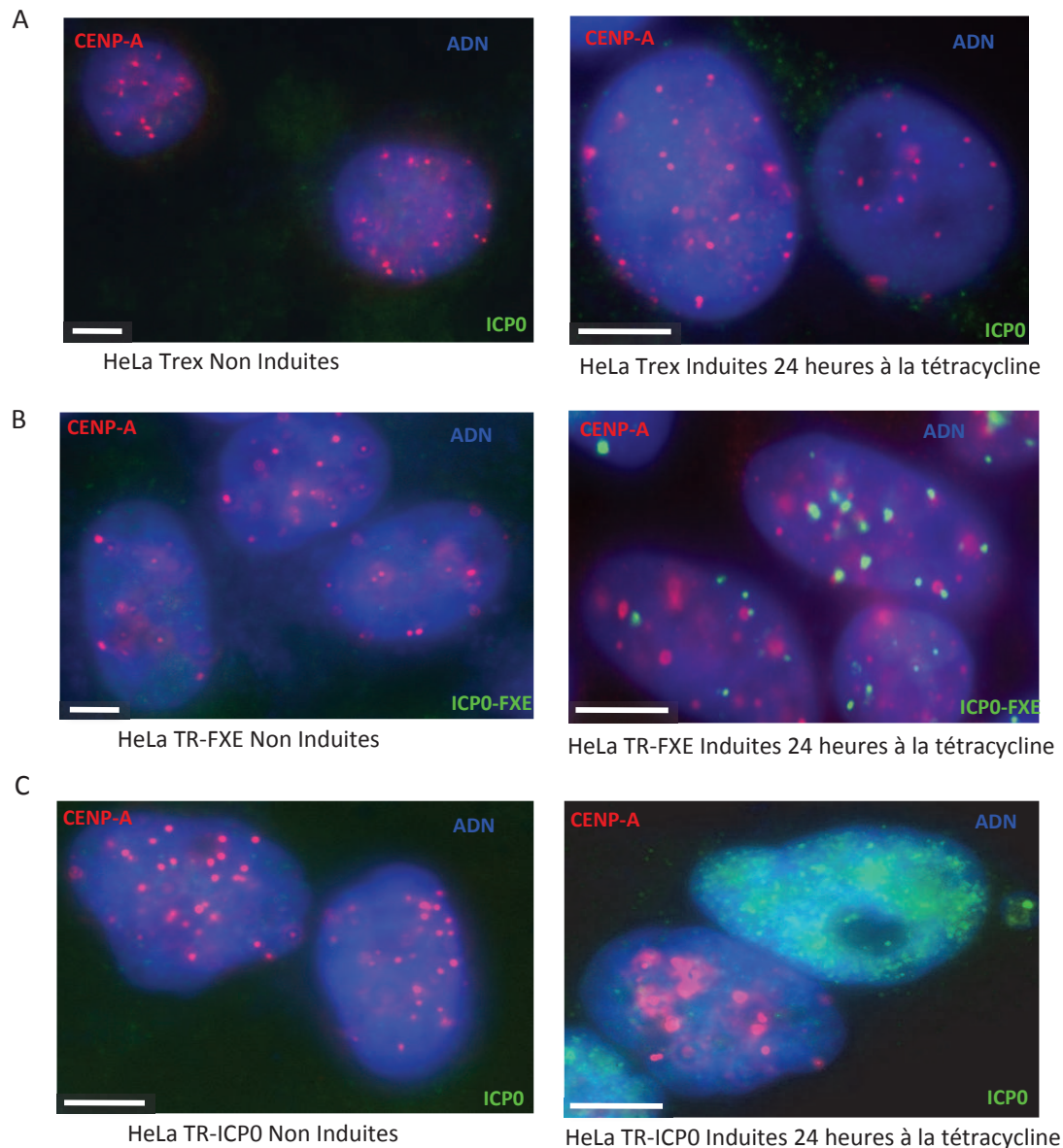


Figure 50: Fonctionnalité du système inductible tétracycline dépendant dans des cellules HeLa TRex

Expériences de doubles marquages d'immunofluorescence dans des cellules HeLa TRex (A), HeLa TR-FXE (B) et HeLa TR-ICP0 (C) non induites (gauche) ou induites 24 heures à la tétracycline (droite). La protéine CENP-A est marquée en rouge (Cy3), la protéine ICP0 en vert (Alexa-Fluor 488), et l'ADN en bleu (Hoechst).

1.3.3 Analyse de la structure chromatiniennne centromérique

Suite à cette vérification du système d'induction, nous avons testé la digestion MNase suivie de transfert et SB dans ces cellules non induites avant de réaliser les mêmes expériences dans des cellules cette fois ci inductibles pour l'expression d'ICP0 ou de son mutant FXE. Ce qu'il ressort de ces expériences préliminaires est qu'il est possible de digérer l'ADN selon les mêmes conditions que dans les cellules HeLa infectées, ce qui

évitait de refaire une mise au point dans les cellules HeLa TRex. Les conditions utilisées sont donc une approche temps variable, unités constantes, même voltage de migration et même technique de transfert et d'hybridation que pour l'ADN issu de cellules HeLa.

Une fois le modèle validé, j'ai réalisé des tests MNase sur les trois types de cellules HeLa TRex (TRex, TR-FXE et TR-ICP0) non induites ou induites pendant 14, 19 ou 24 heures avec 100µg/ml de tétracycline.

Cellules non induites à la tétracycline

Lors des tests de digestion MNase dans les cellules non induites à la tétracycline (Figure 51), tout d'abord sur le gel d'ADN (BET, gauche) une accumulation des formes BPM plus forte pour les cellules HeLa TR-ICP0 est observée, cela dit, les vitesses de digestion (B, rapports mono/dinucléosomes normalisés par rapport aux formes BPM) sont similaires entre les différentes lignées cellulaires HeLa TRex, HeLa TR-FXE et HeLa TR-ICP0. De plus, la vitesse de digestion dans les cellules TR-ICP0 est sensiblement plus faible pour les temps 30 et 50 min. que celles des deux autres lignées. Si l'on analyse maintenant la chromatine centromérique spécifiquement (SB, droite) on observe un léger déficit des formes BPM, spécifiquement pour la condition TR-ICP0. Cela dit, l'effet d'ICP0 sur la chromatine observé dans ces conditions de non induction est bien moins important que celui observé dans des conditions d'induction à la tétracycline (Voir figure 52). Le système inductible TRex est donc fiable pour étudier la déstabilisation des centromères.

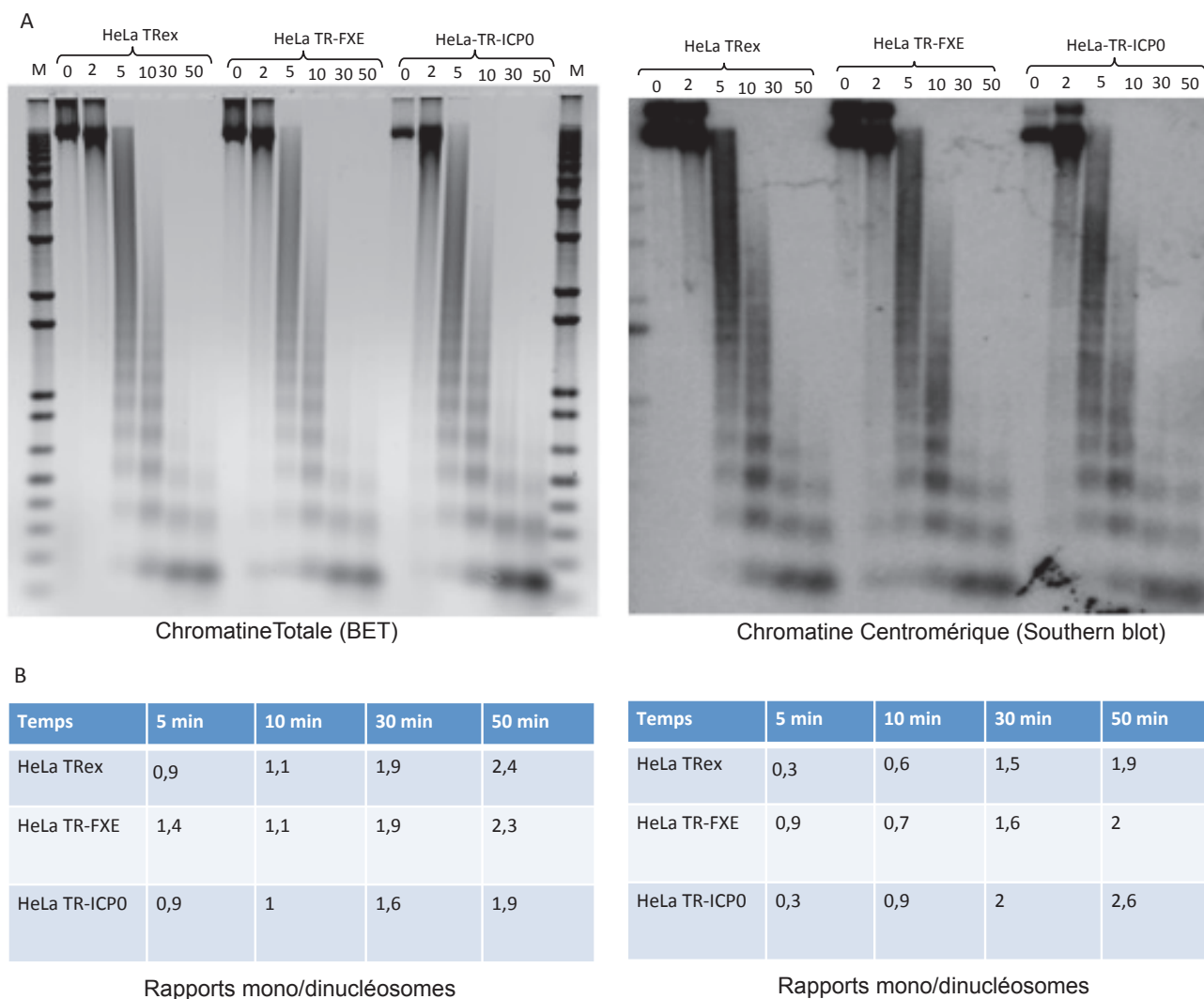


Figure 51: Digestion MNase dans des cellules inducibles HeLa TRex non induites à la tétracycline

A) Gauche : Profils de digestion à la MNase d'ADN issus de cellules inducibles HeLa TRex ou TR-FXE ou TR-ICP0 non induites à la tétracycline. Droite : Même profil hybridé en Southern Blot avec une sonde centromérique. B) Cinétiques de digestion à la MNase pour chaque lignée, pour l'ADN total (gauche) et l'ADN centromérique (droite). Les vitesses ont été calculées comme précédemment (rapport mono/dinucléosomes normalisés par rapport aux formes BPM) pour les temps 5, 10, 30 et 50 minutes et compilées sous forme de ces tableaux.

Cellules induites à la tétracycline

Plusieurs tests de digestion MNase ont été réalisés sur des cellules ayant subi des temps d'inductions à la tétracycline allant de 14 à 24 heures. J'ai finalement opté pour un temps d'induction de 19 heures qui donnait les résultats les plus cohérents. À 19 heures post induction, l'effet de la protéine ICP0 est moins marqué sur l'ADN total, par contre, il est bien visible sur l'ADN centromérique. Sur la figure 52a, j'ai représenté les résultats de la même façon que précédemment, à savoir, pour chaque étape de la manipulation de SB (Gel pour la chromatine totale et membrane pour la chromatine uniquement centromérique) : la

photo du gel ou de la membrane en indiquant par des rectangles de couleur les différentes régions étudiées. Puis, en dessous, les graphiques d'accumulation des différentes formes nucléosomiques dans chaque condition puis l'accumulation des formes mono et dinucléosomiques au cours du temps dans les différentes conditions. En ce qui concerne cette figure tout d'abord, le gel BET (chromatine cellulaire totale) montre une accumulation plus forte des BPM lorsque les cellules sont induites pour l'expression d'ICP0, comparativement aux deux autres conditions. Cette accumulation a été quantifiée à 30 et 50 minutes, et les résultats montrent que la courbe rouge est plus haute que les deux autres pour les mono, di et trinucleosomes à 30 minutes et pour les mononucleosomes à 50 minutes. L'analyse du gel dans le sens horizontal pour observer l'accumulation des formes mono ou dinucléosomiques au cours du temps, montre clairement que la courbe rouge dans les 2 cas est supérieure aux deux autres ce qui correspond bien à ce qui est vu sur le gel. L'analyse de la membrane de SB montre un déficit en formes de bas poids moléculaires dans les cellules TR-ICP0, comparativement toujours aux deux autres conditions. Ce déficit est observé dans les différentes analyses des signaux de SB, et se traduit effectivement par une diminution des courbes rouges par rapport aux 2 autres courbes. Les ratios de digestion entre les différentes formes les uns par rapport aux autres et les différentes vitesses de digestion (Figure 52b) montrent que, pour ce qui concerne la chromatine totale (BET), la vitesse et les différents ratios sont assez stables entre les différentes conditions à 30 ou à 50 minutes. Par contre l'analyse de ces mêmes ratios, cette fois ci obtenus à partir de la chromatine centromérique (SB), montre une nette augmentation de la vitesse de digestion de la chromatine, à 30 et à 50 minutes dans la condition où ICP0 est exprimée comparé aux cellules exprimant FXE ; cette augmentation est d'autant plus importante à 50 minutes.

Ces résultats complémentaires aux résultats d'infection démontrent que c'est bien la protéine ICP0 seule qui est responsable de la désorganisation de la chromatine centromérique, et que cette désorganisation n'est donc pas une conséquence indirecte de l'expression d'autres protéines virales au cours de l'infection.

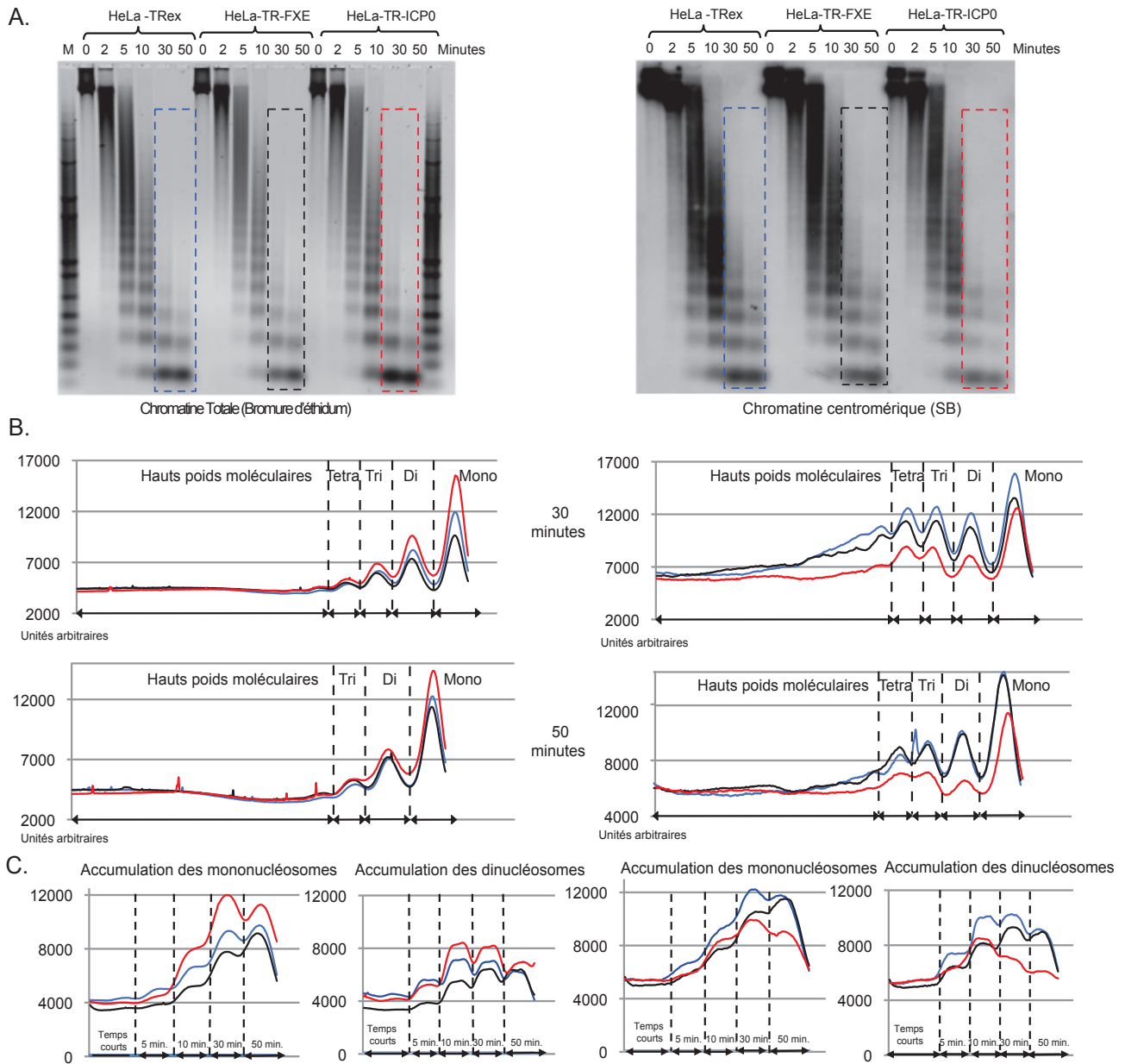


Figure 52a: Déstabilisation de la chromatine centromérique par ICP0 dans des cellules inducibles HeLa TRex.

A) Gauche : Profils de digestion à la MNase d'ADN issus de cellules inducibles HeLa TRex ou TR-FXE ou TR-ICP0 induites 19 heures à la tétracycline. Droite : Même profil hybridé en Southern Blot avec une sonde centromérique. B) Quantification de l'accumulation des différentes formes nucléosomiques à 30 et 50 minutes. Chaque courbe correspond à une condition (Bleue : HeLa TRex ; noire : TR-FXE; rouge : TR-ICP0). C) Quantification de l'accumulation des formes mono et dinucléosomiques au cours du temps pour les différentes conditions, et pour l'ADN total (gauche) et centromérique (droite). Toutes ces quantifications ont été réalisées par ImageJ, pour l'analyse détaillée de ces résultats, voir texte.

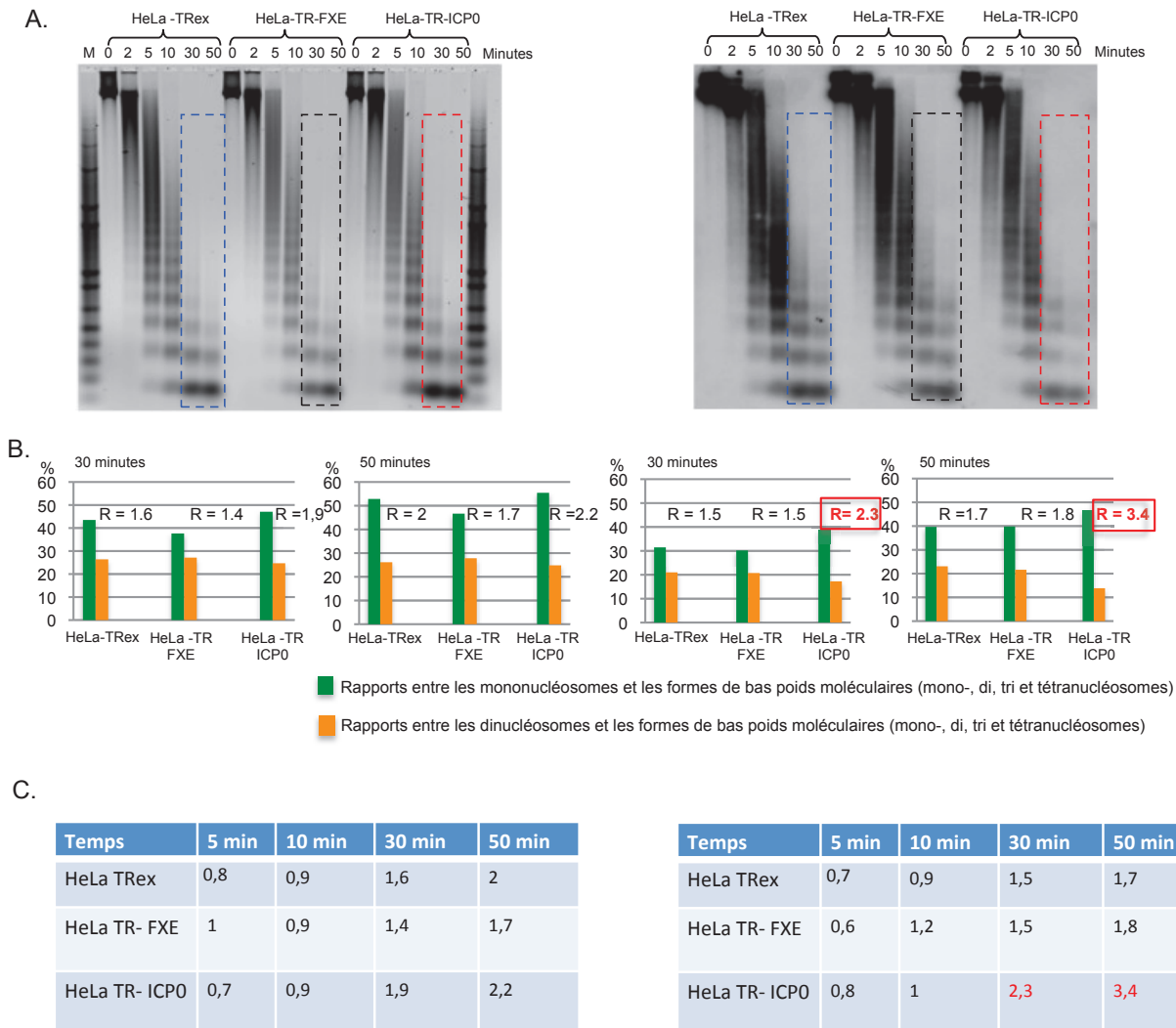


Figure 52b: Déstabilisation de la chromatine centromérique par ICP0 dans des cellules inductibles HeLa TReX.

A) voir 20a. B) Rapports en les différentes formes nucléosomiques à 30 et 50 minutes quantifiés par Image J : Les graphes verts correspondent au rapport en les mononucléosomes et les BPM (mono, di, tri et tetranucléosomes) et les graphes oranges correspondent au rapport en les dinucléosomes et les BPM. Le chiffre indiqué à côté de chaque condition correspond au rapport entre les mono et les dinucléosomes et est un indicateur de la vitesse de digestion par la MNase. C) Cinétiques de digestion à la MNase pour chaque condition, pour l'ADN total (gauche) et centromérique (droite). Les vitesses ont été calculées comme précédemment (rapport mono/dinucléosomes normalisés par rapport aux formes BPM) pour les temps 5, 10, 30 et 50 minutes et compilées sous forme de tableaux

1.4 Digestion MNase dans les cellules de souris NIH3T3 TReX

Suite à cette étude concluante dans les cellules HeLa TReX et notre connaissance de la structure particulièrement avantageuse des séquences centromériques murines, les mêmes expériences chez la souris dans les cellules inductibles NIH-3T3 exprimant soit ICP0 soit

FXE ont été réalisées. La même approche que chez l'homme a été choisie, c'est à dire l'approche unités constantes/ temps variables dans des cellules NIH TRex, NIH TR-FXE et NIH TR-ICP0 induites à la tétracycline pendant 24 heures. Les profils obtenus (Figure 53) ont été transférés sur membrane de nitrocellulose puis hybridés avec deux types de sondes : une sonde reconnaissant les satellites mineurs (région centrale, en bas à gauche) et une sonde reconnaissant les satellites majeurs (péricentromères, en bas à droite). Les résultats obtenus n'ont pas été quantifiés de la même façon que précédemment car ils sont ambigus, et laissent penser qu'il n'y a aucun effet visible d'ICP0 sur la chromatine centromérique, mais plutôt que les effets observés sont non spécifiques.

En effet, si l'on regarde tout d'abord la chromatine totale (en haut), il ne semble pas y avoir de différence flagrante entre les différents profils d'accumulation des différentes formes nucléosomiques. Ensuite, si l'on considère les deux images de SB, la répartition du signal centromérique (à gauche) ou péricentromérique (à droite) est plus importante dans la partie haute des membranes par rapport aux parties basses des membranes (constaté dans plusieurs expériences réalisées de façon indépendantes). Ceci n'est pas commun et intrigant car il n'y a *à priori* aucune raison pour que les sondes s'hybrident plus sur une région de la membrane plutôt qu'une autre. Cette hétérogénéité dans l'hybridation des sondes centromériques laisse penser que les conditions expérimentales ne sont pas adéquates. Cependant, un léger déficit d'accumulation des BPM est observé sur le SB dans les cellules NIH TR-ICP0 avec la sonde péricentromérique, déficit qui n'est pas visible sur la chromatine totale (BET). Si cette différence est réelle, (l'expérience est à reproduire), cela voudrait dire qu'ICP0 a plus tendance à déstabiliser la chromatine des péricentromères par rapport à celle de la région centromérique. Ces données sont intéressantes car elles confirmeraient ce qui a déjà été observé dans les cellules par notre équipe, à savoir qu'ICP0 peut se relocaliser au niveau des péricentromères et également avoir une activité déstabilisatrice à ce niveau (Catez et al. résultats non publiés).

Pour conclure sur ce modèle et les résultats difficilement interprétables obtenus, il est envisageable de penser que les raisons pour lesquelles l'effet d'ICP0 sur les centromères n'est pas autant marqué que chez l'homme sont d'une part que la stabilité de la protéine ICP0 dans cette espèce est plus faible (Catez et al., résultats non publiés) et d'autre part que les conditions d'hybridation des profils avec les sondes centromériques ne sont peut être pas optimales. Ce modèle est néanmoins très intéressant car il permet de reconnaître indépendamment les deux types de régions composant les centromères chez cette espèce.

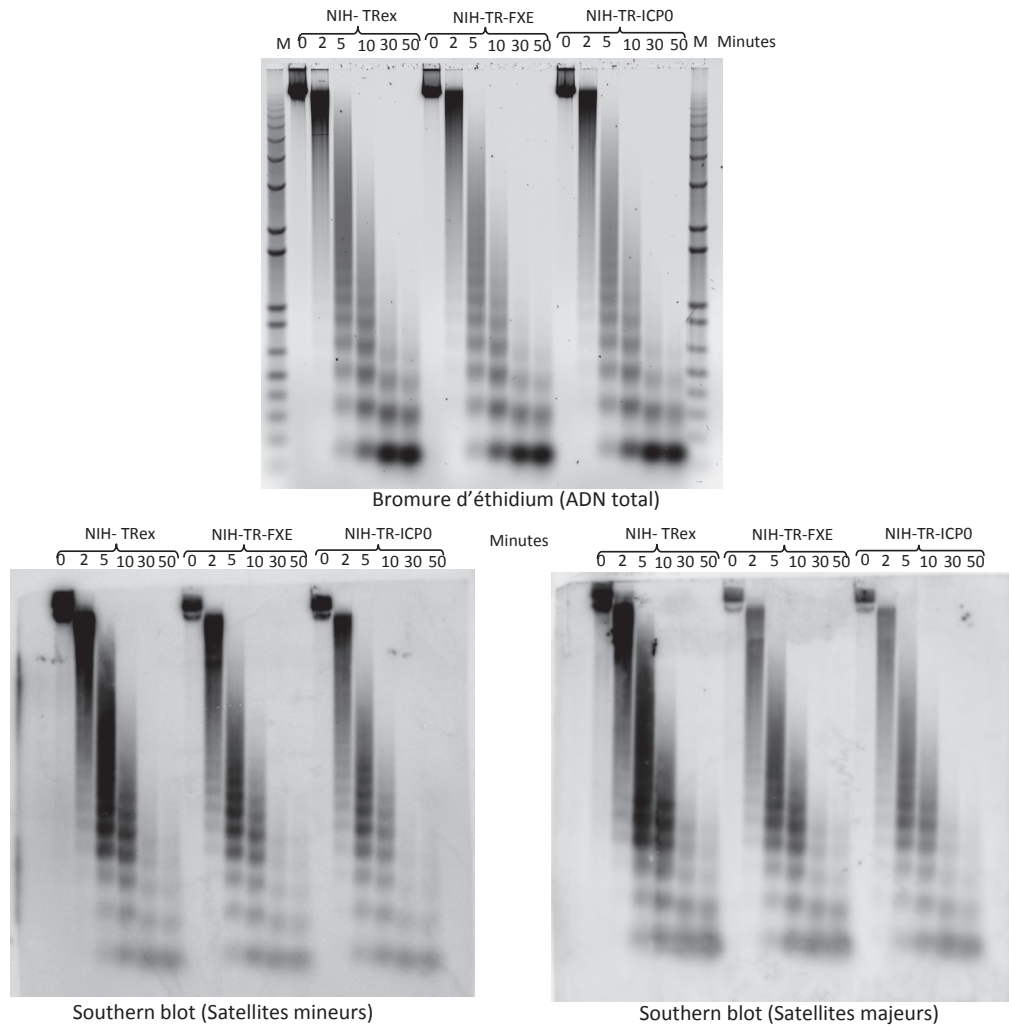


Figure 53 : Digestions MNase dans des cellules de souris NIH TRex

Expériences de digestion à la MNase dans des cellules NIH 3T3 TRex, TR-FXE et TR-ICP0 en utilisant l'approche unités constantes (5U/ 2,5 millions de noyaux)/ Temps variables (0, 2, 5, 10, 30 et 50 minutes)
 L'image du haut représente les profils de digestion d'ADN totaux et ceux du bas les mêmes profils, hybridés avec des sondes centromères (satellites mineurs, à gauche) et péri-centromériques (satellites majeurs, à droite), spécifiques.

2. ANALYSE DE LA STRUCTURE CHROMATINIENNE DES CENTROMERES PAR IMMUNOPRECIPITATION DE CHROMATINE (CHIP)/ PCR QUANTITATIVE

Pour approfondir cette étude sur l'effet d'ICP0 sur la chromatine centromérique, j'ai décidé de tenter de réaliser des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) (Figure 54). Cette approche est une des plus couramment utilisée pour étudier la chromatine, et elle a été utilisée pour tenter de quantifier la présence des différentes histones, classiques ou centromériques, avant et après l'action déstabilisatrice d'ICP0.

Il a déjà été montré par notre équipe que CENP-A était affectée par la présence d'ICP0, par ChIP (Morency et al. 2007). Les mises au point du ChIP ont donc été effectuées majoritairement avec l'anticorps anti-CENP-A. Malheureusement, cette étude de ChIP n'a pas été concluante car il a été impossible de distinguer un signal spécifique avec l'anticorps anti-CENP-A (monoclonal de souris) par rapport aux contrôles effectués avec un anticorps non spécifique des centromères (Immunoglobulines G de souris). Cette difficulté est sans doute liée à la différence de système utilisé (cellules inductibles dans mon étude vs cellules infectées dans l'étude de Morency et al) (Morency et al. 2007). Cependant, cette partie de ma thèse a permis de mettre au point la sonication au Bioruptor et de mettre en évidence les difficultés de travailler sur les séquences centromériques. Par manque de temps, il n'a pas été possible de contourner ces difficultés de manière à obtenir des résultats, mêmes préliminaires, sur la protéine CENP-A, mais ce travail sera poursuivi dans l'équipe.

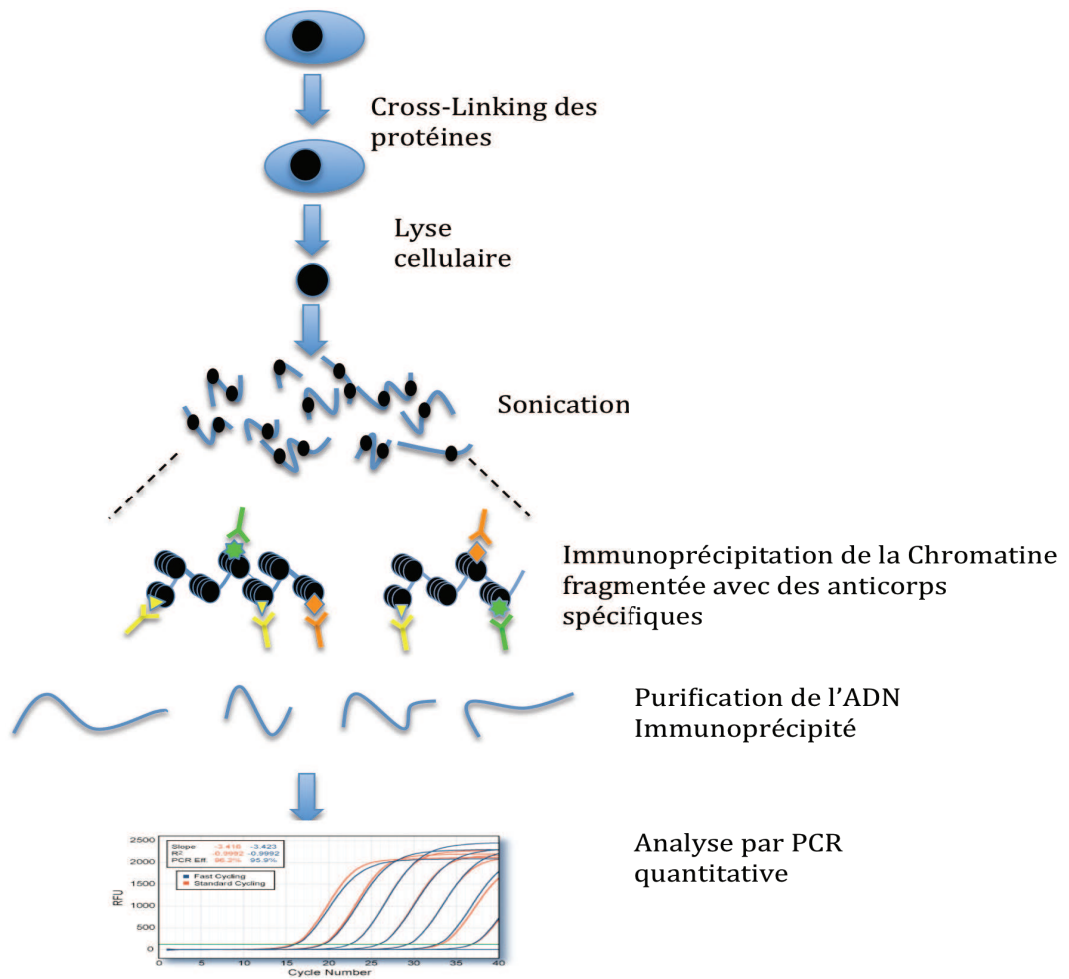


Figure 54: Technique d'immunoprécipitation de chromatine ou ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)

Après fixation et lyse des cellules, la chromatine est fragmentée par sonication puis immunoprécipitée avec des anticorps appropriés, l'ADN est ensuite purifié et utilisé comme matrice pour effectuer de la PCR quantitative. Détermination de couples d'amorces pour détecter le chromosome artificiel dans les cellules BAC par PCR quantitative.

Article 1

Centromere architecture breakdown induced by the viral protein ICP0

Sylvain Gross^{1,2,3}, Frédéric Catez^{1,2,4}, Patrick Lomonte^{1,2,3,*}

1. Virus and Centromere team. Centre de Génétique et Physiologie Moléculaire et Cellulaire CNRS, UMR5534.
2. Université de Lyon 1, F-69000 Lyon, France;
3. Laboratoire d'excellence, Labex DEVweCAN, F-69000 Lyon, France
4. Current address: INSERM U1052, CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000, Lyon, France.

* Correspondence to: patrick.lomonte@univ-lyon1.fr

Summary

The ICP0 E3 ubiquitin ligase viral protein has the unique property to localize at interphase and mitotic centromeres early after infection of cells by the herpes simplex virus type 1 (HSV-1). As a consequence ICP0 induces the proteasomal degradation of several centromeric proteins (CENPs), namely CENP-A, the centromeric histone H3 variant, CENP-B and CENP-C. Following the ICP0-induced centromere modification the cell triggers a specific response to centromeres called interphase Centromere Damage Response (iCDR). The biological significance of the iCDR is still unknown so is the degree of the centromere structural damage induced by ICP0. Interphase centromeres are complex structures made of proximal and distal protein layers closely associated to CENP-A-containing centromeric chromatin. In this study, using several cell lines constitutively expressing GFP-tagged CENPs, we investigated the extent of the centromeric destabilization induced by ICP0. We show that ICP0 provokes to disappearance from the centromeres, and the proteasomal degradation of several CENPs from the NAC (CENP-A nucleosome associated) and CAD (CENP-A distal) complexes. These results imply that the whole centromeric proteinaceous structure is affected by ICP0. We then investigated the nucleosomal occupancy of the centromeric chromatin in ICP0-expressing cells by micrococcal nuclease (MNase) digestions and Southern Blot analyses. ICP0 expression either following infection or in cell lines constitutively expressing ICP0 provokes significant modifications of the centromeric chromatin structure resulting in higher MNase accessibility. These results demonstrate that, in addition to the protein complexes, ICP0 also destabilizes the centromeric chromatin resulting in the complete breakdown of the centromere architecture.

Introduction

The infection of cultured cells by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) induces the destabilization of interphase centromeres, preventing the assembly of the kinetochore and the binding of microtubules during mitosis (1). The factor responsible for this centromere destabilization is the viral protein ICP0. ICP0 is a RING finger nuclear protein with characterized E3 ubiquitin ligase activity (reviewed in (2)). As soon as it enters the nucleus, ICP0 temporarily localizes at centromeres and induces the proteasomal degradation of several essential centromeric proteins (1, 3, 4). As a consequence, cells that express ICP0 just before entering mitosis are stalled in early mitosis, and eventually suffer premature cell division without chromosomal segregation, leading to aneuploidy (1). Although the biological significance of the ICP0-induced centromere destabilization is unclear, from the cellular viewpoint, ICP0 is of exceptional interest as a unique tool for studying centromere structure and the putative cell mechanisms implicated in centromere architectural maintenance. Until recently, it was unknown whether the cell was able to detect centromeric structural defects during interphase. Using ICP0 as a tool to destabilize centromeres, we recently revealed a previously unreported and unexpected cell response (5). This response, that we named iCDR (for interphase centromere damage response), is characterized by the accumulation at damaged centromeres of two proteins of the nuclear domains called Cajal bodies (CBs), coilin and fibrillarin, together with the SMN protein one protein of the CB-associated gemini of Cajal bodies (gems) nuclear domain.

Centromeres are specialized chromosome domains that are responsible for chromosome segregation during meiosis and mitosis. They assemble around repetitive DNA sequences in a complex structure that has yet to be fully elucidated. A simplistic view involves the division of this domain into two areas: the central core region or centromeric chromatin (reviewed in (6)) and the flanking heterochromatic regions, which are called pericentromeres. The protein composition of the central core region varies between interphase and mitosis. In this model, 'constitutive' proteins are permanently associated with the centromere, even during interphase, whereas 'facultative proteins' are recruited only during mitosis to assemble the kinetochore, which is the site of microtubule attachment. As such, the central core region serves as the assembly platform for the kinetochore. A specific feature of the chromatin structure of the human core centromere is that it contains interspersed blocks of nucleosomes that contain histone H3 or CENP-A, a histone H3 variant (7). In addition to histones, six constitutive CENPs (CENP-A, -B, -C, -H, -I, and hMis12), are known as the major components of the interphase centromeric chromatin. However, another set of 11 proteins, associated with the CENP-A-containing nucleosomes, and distributed within two major protein complexes called NAC (CENP-A Nucleosome Associated) and CAD (CENP-A Distal) complex (8), also named "CENP-H-I" complex (9), were described (figure 1).

In the present study we investigated the degree of destabilization of the interphase

centromere by the ICP0 protein. We found that the whole proteinaceous structure comprising proteins from NAC and CAD complexes is destabilized. Following this, we analyzed the centromeric chromatin nucleosome occupancy in cells expressing ICP0 and found that ICP0 was profoundly modifying the centromeric chromatin. Overall, this study demonstrates that the entire centromere architecture is significantly altered by ICP0.

Material and Methods

Cells, viruses and plasmids. HeLa cells were grown at 37C in Glasgow Modified Eagle's Medium (GMEM) containing 10 units/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin, and supplemented with 10% fetal bovine serum.

HeLa cells were grown at 37C in Glasgow Modified Eagle's Medium (GMEM); HeLa cells constitutively expressing GFP-CENP-H, -M, -N, -O, -P, -Q (generous gifts from D. Foltz and I. Cheesman, Ludwig Institute for Cancer Research, San Diego); HeLa TREX (TR, Invitrogen), TREX-ICP0 (TR-ICP0), and TREX-FXE were grown in DMEM. All media were complemented with 10% fetal bovine serum, L-Glutamin (1% v/v), 10 units/ml of penicillin, 100 mg/ml of streptomycin. For T-REX, blasticidin was added to the medium (5 µg/ml); for TR-ICP0 and TR-FXE blasticidin and zeocin (100 µg/ml) were added. TR-ICP0 and TR-FXE cell lines, stably and inducibly expressing ICP0 and FXE, respectively, were constructed by transfecting T-REX cells with a pcDNA 4/TO plasmid (Invitrogen) designed to express ICP0 or FXE. Cell clones were then isolated under zeocin selection. Expression of ICP0 or FXE was induced by addition of tetracycline (1µg/ml) to the medium, and checked by Western blotting and immunocytochemistry. Construction and validation of GFP-CENPs-expressing HeLa was described in (8).

The wild type strain HSV-1 17syn+ (HSV-1wt) is the parental strain used in this study. The viruses dl1403, deleted of ICP0 (10), and vFXE, expressing a non functional ICP0 isoform mutated in its RING finger domain (11) were also used.

The pci110 and pciFXE plasmids expressing ICP0 and FXE proteins, have been described previously (11).

Immunofluorescence and confocal microscopy. Cells were seeded at 1.5x10⁵ cells per well in 24 well plates containing a round coverslip prior immunofluorescence (IF) assay. Cells were treated for IF as described in (5). All samples were examined under a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope. The data from the channels were collected separately, to avoid channel overlap, with four-fold averaging at a resolution of 512x512 pixels using optical slices of 0.8- to 1.0-µm thickness. The microscope used was a Zeiss Axiovert 200M at either 63 (NA 1,25) or 100 (NA 1,3) magnification by

oil-immersion objective lenses. Datasets were processed using LSM 510 software, and then exported in preparation for printing using Adobe Photoshop.

Western blotting. HeLa (5x10⁵ cells) in 35 mm Petri dish were infected for 6 hours at a multiplicity of infection of 10 (all cells are infected) by the virus HSV-1wt, vFXE or dl1403, in the presence or not of proteasome inhibitor MG132 (2.5 μ M). For TR, TR-ICP0 and TR-FXE cells, cells were seeded at 1x10⁶ cells per a 60 mm Petri dish then the following day tetracycline was added or not to the medium for 24 hours. 10 μ g of total proteins were loaded per well of a SDS-polyacrylamide gel, before running, transfer and detection.

Antibodies. Antibodies used for immunofluorescence (IF) and Western blottings (WB) experiments are the following: monoclonal antibodies (mAbs) [11060] anti-ICP0 (1/1000, IF; 1/10000, WB), [3-19] anti-CENP-A (1 μ g/ml, WB; Abcam); rabbit polyclonal antibodies anti-CENP-I (1/1000, IF; 1 μ g/ml WB; Abcam); anti-CENP-N (Chl4R) affinity purified (1/200, WB, A kind gift from P. Meraldi, ETH Zurich), anti-CENP-H (1/100, A kind gift from K. Todokoro, RIKEN) ; anti-actin (1 μ g/ml, WB; Sigma); a human autoimmune serum huACA against centromeric proteins was also used (1/3000, IF; Antibodies Incorporate). For IFs secondary antibodies used were goat anti-rabbit, anti-mouse, and anti-human coupled to AlexaFluor 488, 555, or 647 (1/200; Molecular probes).

Micrococcal nuclease (MNase) digestions. MNase digestions were performed either on infected cells or HeLa TR cells induced or not for the expression of ICP0 or FXE. Cells were seeded at a concentration of 3 x10⁶ cells per petri dish (60 mm diameter). The day after HeLa cells were infected with the appropriate virus at a multiplicity of infection (M.O.I.) of 10 for 3 hours; HeLa TR cells were induced or not with tetracycline (1 μ g/ml) for 24 hours. Cells were trypsinized, washed with PBS, centrifuged, and resuspended in 1 ml of buffer 1 (Tris/HCl pH7.5, 15 mM; Sucrose, 0.3M; KCl, 60mM, NaCl, 15 mM; MgCl₂, 5 mM; EGTA, 0.1 mM; DTT, 0.5 mM, protease inhibitors), then 1 ml of buffer 2 (Tris/HCl pH7.5, 15 mM; Sucrose, 0.3M; KCl, 60mM, NaCl, 15 mM; MgCl₂, 5 mM; EGTA, 0.1 mM; DTT, 0.5 mM, NP40, 0.4%; protease inhibitors) was added gently and cells were incubated at 4°C for 10 min. Height ml of buffer 3 (Tris/HCl pH7.5, 15 mM; Sucrose, 1M; KCl, 60mM, NaCl, 15 mM; MgCl₂, 5 mM; EGTA, 0.1 mM; DTT, 0.5 mM, protease inhibitors) were then added in the bottom of the tube and nuclei were centrifuge for 30 min/6000g at 4°C. Supernatant was removed gently and nuclei were resuspended MNase digestion buffer (Tris/HCl ph 7.5, 15 mM; MgCl₂, 5 mM; CaCl₂, 1mM; protease inhibitors) at an estimated concentration of 1000 nuclei/ μ l in 3 ml. Pre-incubate nuclei 2 min. at 37°C then add 5U of MNase per 3 x 10⁶ nuclei. At fixed time points harvest 3.75 x 10⁵ nuclei and add EDTA at final concentration of 0.8 mM to stop the reaction, incubate on ice.

Add to the samples 1/20 of protein digestion buffer (SDS 10%, proteinase K, 3,75µg/µl) and incubate 15-30 minutes at 37°C. Recover the DNA by a phenol/chlorophorm extraction followed by EtOH precipitation. Resuspend in water containing RNase A (1µg/ml) incubate for 1H. at 37°C.

Southern blot and probe labelling. One µg of DNA/well is migrated for 17H at 20 volts, in an 1.2 % agarose gel (TAE 0.5X, 1mg/ml Ethidium bromide). Then transfer of the DNA on a Nylon membrane (Hybon N +, GE Healthcare) was performed with a vacuum apparatus during 2H. Membrane was UV crossed-linked and kept clean until use for hybridization. Probe for detection of alphoid centromeric DNA was made from a 1.9 Kb fragment amplified by PCR (primer M13 U: 5'gttgtaaaacgacggcc 3' ; M13 R: 5'caggaacagctatgac 3') from the plasmid p11-4 in which the alphoid centromeric sequence of human chromosome 21 was cloned (generous gift from H. Masumoto, Nagoya University, (12). Alphoid DNA (50ng) was denatured during 10 min. at 95°C, then enzyme and dNTPs mix are added (random-priming Ready-to-go DNA labelling beads, GE healthcare), in addition to 50 µCi of ³²dCTP (Hartman Analytic), mixture is incubated for 20 min. at 37°C. Reaction is stopped by incubation on ice for 5 min., then labelled probe is purified on G50 column (Qiagen). Membrane is pre-hybridized in a pre-hybridization solution (Ambion) for 1H at 44°C, then the probe is added together with 1mg of Salmon sperm DNA to the pre-hybridization solution, and hybridization is performed during 16-17H at 44°C. Membrane is washed 3 times 10 min. with 2X SSC-0,5% SDS at 65°C, then once with 0,2X SSC-0,5% SDS at 65°C, then once with 2X SSC-0,5% SDS at room temperature. Membrane is then sealed in a plastic bag and exposed from 2H to 24H to a sensitive screen (Amersham). The screen is then scanned using a "Typhoon 9400" (GE Healthcare), and the numerical image is treated for final presentation using Adobe Photoshop and Image J.

Results

NAC and CAD complexes are destabilized by ICPO. The interphase centromere is a complex structure composed of a specific chromatin containing CENP-A nucleosomes associated to two major protein complexes called NAC and CAD (Figure 1A). To determine whether ICPO could affect the stability of those complexes, we infected or transfected cells and check for the behaviour of specific NAC or CAD-associated CENPs in the presence of functional ICPO and performed immunofluorescence and confocal analysis. Several Hela cell lines constitutively expressing a GFP-tagged CENP (-H, -M, -N, -O, -P, -Q) were used whereas endogenous CENP-I was analyzed. Infection by wilde type (HSV-1wt) led to the disappearance of all the CENPs analyzed (CENP-I, -H, and -N are shown as an example, figure 1Bi to vi), which was not the case when cells were infected by the virus expressing a non-functional ICPO mutated in its RING finger/E3-ubiquitin ligase activity-associated domain (vFXE). To confirm

that this was specifically due to the activity of ICP0 and not to other viral factors, we transfected cells with a plasmid expressing ICP0 or the mutant protein FXE. The expression of ICP0 alone induced the disappearance of the CENP signal (CENP-M, -O, -P, and -Q are shown as an example, figure 1Cvii to xiv), whereas the FXE protein did not. Those data show that ICP0 is able to induce the removal of CENPs whatever they are associated to the NAC or the CAD complex.

ICP0 induced the proteasomal degradation of NAC and CAD-associated CENPs. To verify that the disappearance of the signals corresponding to the various CENPs results from a degradation, cells were infected with HSV-1wt, in the presence or not of proteasomal inhibitor MG132, or by two different ICP0 virus mutants, vFXE, and dl1403 (not expressing ICP0 at all). Only CENPs for which we had suitable antibodies working in Western blot were analyzed. Results showed that CENP-I (CAD-associated) and CENP-H, and -N (NAC-associated) were degraded in an ICP0- and proteasomal-dependant manner (figure 2). CENP-A, already known to sustain ICP0-induced degradation (4) was shown as a control. From these and the IF data it is reasonable to think that ICP0 disrupts the entire proteinaceous structure associated with the interphase centromere.

Centromeric chromatin structure is disrupted by HSV-1 infection. The destabilization by ICP0 of the protein layers associated with interphase centromeres in addition to the degradation of the CENP-A and -B proteins further suggested that the whole centromere chromatin might sustain profound modifications. To confirm this hypothesis we performed MNase digestions and Southern Blot (SB) to analyse centromere chromatin nucleosome occupancy. HeLa cells were infected for 3H with HSV-1wt and dl1403 (not expressing ICP0) viruses, non-infected cells were used as control. Results are presented as digestion profiles of the whole cell chromatin (Ethidium bromide agarose gel before transfer) (figure 3A, left) and of the specific centromeric chromatin (SB) (figure 3A, right). Analyses of the results are presented as graphs below the digestion profiles (for the digestion times 30 min. and 50 min.) (figure 3B). Each curve corresponds to a specific condition (blue, non-infected; black, dl1403-infected; red, HSV-1wt-infected). The X-axis represents the digestion-time (horizontal analysis) or the nucleosomic forms (vertical analysis); the Y-axis is the intensity of the analyzed region (in arbitrary units). Infection by the HSV-1wt shows an accumulation of the whole cell chromatin mononucleosomic forms from 30 min and more obvious at 50 min. of MNase digestion compared to non-infected cells and cells infected with dl1403. Interestingly, the SB shows an opposite situation with a deficit of the low molecular weight (LMW) nucleosomic forms in HSV-1wt infected cells compared to the two other situations. Quantitative analysis of the mono- and dinucleosomes accumulation with time for each condition (horizontal analysis), shows that there is no clear difference concerning the whole cell chromatin (Figure 3C, left panels). Markedly, HSV-1wt

infection led to a substantial deficit of centromere chromatin mono- and di-nucleosomes accumulation compared to non-infected or dl1403-infected cells (figure 3C, right panels). These first sets of data suggest at least two reflexions. First, the infection on its own loosens the cellular chromatin independently of ICP0, which results in a greater accessibility to MNase digestion and to the quicker accumulation of LMW nucleosomes. This observation is in accordance with the HSV-1-induced histone mobilization described by fluorescence recovery after photobleaching approach in a previous study (13). Second, the centromeric chromatin is specifically affected compared to the entire cell chromatin by the expression of ICP0 in the cells. This suggests that ICP0 activity destabilizes the centromeric chromatin. Indeed, the deficit of centromere-associated mono- and di-nucleosomes is a mark of a disorganized nucleosomal structure that could result in a faster digestion speed by the MNase, and an instability of the LMW nucleosomic forms. To precisely determine the MNase digestion speed, ratios between mono- (Figure 3D, green box) or di-nucleosomes (Figure 3D, orange box) and the entire LMW nucleosomic forms quantities must be calculated. Then the ratio between adjusted mono- and di-nucleosomes quantities (R) is determined, which gives an indication of the speed of digestion of the chromatin by the MNase. The higher the ratio, the faster the digestion, the more accessible is the chromatin. Analysis of whole cell chromatin does not show any major changes neither in the speed of accumulation of the mono- and di-nucleotides nor in the ratio between the two forms in mock, dl1403, or HSV-1wt infected cells (Figure 3D, left panels). However centromeric chromatin is characterized by an increase of the mono-nucleosomes and a concomitant decrease of the di-nucleosomes in HSV-1wt, and to a lesser extend in dl1403, infected cells at both 30 and 50 min. of digestion (Figure 3D, right panels). As a result the ratios between adjusted di- and mononucleosomes quantities at 30 min. (R= 4.5) and 50 min. (R= 7.5) were markedly higher in HSV-1wt compared to mock (R= 2.3 and 3.4, respectively for 30 and 50min.) or dl1403 (R= 3.2 and 4.4, respectively for 30 and 50 min.) infected cells. These results demonstrate that the digestion speed of the centromeric chromatin is faster in the infected cells, and more specifically in the presence of ICP0. This suggests that the nucleosomal occupancy of centromeric chromatin is loosened by ICP0.

Centromeric chromatin structure is disrupted by ICP0. Although data obtained from infected cells design ICP0 as the viral protein inducing centromeric chromatin instability, we cannot rule out an indirect effect through other viral partners. To confirm that ICP0 was directly involved in the destabilization of the centromere chromatin structure, we performed MNase digestions on chromatin from ICP0-expressing cells. We constructed cell lines stably expressing ICP0 (TR-ICP0) or FXE (TR-FXE) following induction by tetracycline. Western blot results show that ICP0 or FXE are only expressed after induction (figure 4A). We then verified that ICP0 was functional in those

cells efficiently inducing the disappearance of CENP-A from interphase centromeres (figure 4B, i to ix). No ICP0 staining was visible in TR-ICP0 or TR-FXE cells before tetracycline induction (figure 4B, ii and iii). After induction more than 99.5% of the cells were positive for either ICP0 or FXE staining (figure 4B, vi to ix). Only those cells expressing ICP0 showed a clear disappearance of the CENP-A signal (see left ICP0-expressing cell in figure 4B vi). These data confirmed both the efficiency of the cell lines to express ICP0 or FXE only when tetracycline is added to the medium, and the efficiency of ICP0 to induce the loss of CENP-A (and by extension the other CENPs). MNase digestions performed on chromatin from non-induced cells showed that no major differences in LMW nucleosomic forms accumulation could be seen comparing TR, TR-ICP0, and TR-FXE cell lines (data not shown). Cells were then induced by tetracycline for 19H prior to perform MNase digestions. Results are presented according to those for infected cells with blue, black, and red curves corresponding to TR, TR-FXE, TR-ICP0 cells respectively. The whole cell chromatin digestion (ETB gel) (figure 5A, left panel) shows that mono-nucleosomes accumulate at a higher level in ICP0-expressing cells compared to the TR and TR-FXE (figure 5B left panels for 30 and 50 min. digestions). Similarly to the HSV-1wt-infected cells the SB (figure 5A, right panel) shows a clear deficit of LMW nucleosomic forms in chromatin from TR-ICP0 cells (figure 5B, right panels for 30 and 50 min). Quantitative analysis of the mono- and di-nucleosomes accumulation with time for each condition (horizontal analysis), shows a relative stable situation for the whole cell chromatin (Figure 5C, left panels). As expected, centromeric chromatin mono- and di-nucleosomes accumulation was clearly deficient in ICP0-expressing cells but not in FXE-expressing cells (Figure 5C, right panels). We then calculated the MNase digestion speed similarly to infected cells using the same criteria. Whole cell chromatin is not affected by FXE or ICP0 expression with no major change in the speed of accumulation of the mono- (green graph) and di- (orange graph) nucleotides nor in the ratio between the two forms (Figure 5D, left panels). The data are different for centromeric chromatin with a clear discrepancy in ICP0-expressing cells on the accumulation of mono- and di-nucleosomes at both 30 and 50 min. of digestion (Figure 5D, right panels). The calculated ratios between adjusted di- and mononucleosomes quantities especially at 50 min. ($R= 3.4$) being almost twice the values obtained in TR and TR-FXE cells. These data confirm those obtained from infected cells and demonstrate that ICP0 alone is responsible for the destabilization of the centromeric chromatin.

Discussion

This study demonstrates that the protein ICP0 of HSV-1 is acting as a powerful centromere modifier. HSV-1 through the sole activity of ICP0 is able to induce the disappearance of several CENPs, components of the proteinaceous layers of interphase centromeres. ICP0 induces the

proteasomal degradation of several CENPs whatever they belong to the CAD or NAC complexes. In addition, we were able to show that the centromeric chromatin structure is also greatly affected following ICP0 activity.

Proteins of the NAC and CAD complexes play an essential role in providing a suitable platform for kinetochore assembly. Recently it has been demonstrated that CENP-C and CENP-T two components of the NAC are crucial for the formation of the kinetochore in both human and drosophila cells (14-17). Moreover CENP-C and CENP-N have been shown to directly bind to CENP-A, but not H3-containing nucleosomes (18, 19). ICP0 targets to proteasomal degradation several major components of the centromere, i.e., from the chromatin, CENP-A (4) and inner centromere, CENP-B (3), from the NAC, CENP-C (1), CENP-H and CENP-N (this study), and from the CAD, CENP-I (this study). Therefore, the disappearance of several CENPs of the NAC and CAD could not be explained by the sole degradation a single keystone protein that would lead to the collapse of the entire protein layer. Hence, the ICP0-induced loss of CAD-associated CENP-I, -O, -P, -Q, and NAC-associated CENP-C, -H, -N, -M observed during infection or transfection of GFP-CENPs expressing cells is most likely related to the complete breakdown of the whole proteinaceous structure. Amongst the CENPs targeted to degradation by ICP0, CENP -B and -C have been shown to directly bind alphoid DNA (20-24), and CENP-A is present in the heart of the nucleosome replacing the histone H3 (7, 25, 26). This suggested that ICP0 anti-centromere activity could also destabilize the centromeric chromatin structure. MNase digestions from HSV-1 infected and ICP0-expressing cells confirmed that ICP0 induces profound modifications of the nucleosomal organization of centromeric chromatin. Overall, our data confirm the exceptional activity displayed by HSV-1, through the ICP0 protein, against centromeres structure.

We recently described a new cellular response, named iCDR (for interphase Centromere Damage Response), triggered following ICP0-induced centromere destabilization (5). The iCDR is conserved at least in human and mouse and consists in the accumulation at damaged centromeres of coilin, fibrillarin, and SMN (Survival Motor Neuron) proteins three of the major components of nuclear domains Cajal bodies/gems. The iCDR is not a cellular response to DNA damage, but rather a consequence of centromeric chromatin modifications. Indeed depletion of CENP-B, which is implicated in the positioning of nucleosomes, chromatin epigenetic modifications and DNA methylation (27-29), also triggers coilin relocation at centromeres (5), and El Maalouf et al., unpublished results). Therefore, ICP0-induced centromeric chromatin destabilization is likely to induce epigenetic changes that could stimulate the relocation of specific proteins to the damaged centromere. Although, the answer to this assumption is out of the scope of this study, we have convincing data that show that at least one of the proteins of the iCDR is indeed interacting with modified histones (Sabra et al., unpublished results).

To date HSV-1 remains the only virus known to destabilize centromeres. The challenge remains to understand the reasons for such a specific activity. The easiest explanation would be to evoke a side effect due to the multiple ICP0 activities. This is highly unlikely because several ICP0 homologues of other alphaherpesviruses were shown to provoke the CENP-C disappearance from centromeres, and the equine herpesvirus type 1 ICP0 homologue (Eg63) is able to induce CENP-C proteasomal degradation when expressed from a recombinant HSV-1 virus (30). If evolution has kept such an activity associated with proteins from different viruses, it is reasonable to think that it plays a major role in the biology of these viruses. Another possibility could be that HSV-1 targets a centromere-associated signalling pathway indicating that the cell sustains an undesirable event that, if not under control, could lead to cell death. The interaction of CENP-C with hDaxx, a protein involved in signalling apoptosis, gives some credit to such a hypothesis (31). However, infection of cultured cells at high multiplicity does not require ICP0 and therefore centromere destabilization. On the other hand, low multiplicity infection using ICP0-deleted HSV-1 does not induce substantial apoptosis in infected cells. These two arguments are thus not in favour of a centromere-controlled cell fate, at least in cultured cells. ICP0 could induce centromeres destabilization to provoke the mitotic arrest of infected cells (32). However, this is in total contradiction with the virus biology because HSV-1 requires the cell nucleus for its replication. Moreover, HSV-1 replicates independently of the cell cycle, and the lytic cycle does not depend on a cell arrest at the mitotic phase (33).

Therefore, ICP0-induced centromere inactivation must probably be analyzed in light of an activity of ICP0 not related to lytic infection. After an initial lytic infection in epithelial cells of the upper respiratory track, HSV-1 establishes life-long latency in sensory neuron nuclei of its infected host. From a molecular point of view latent HSV-1 DNA sustains a transcriptional shut down with only a family of non-coding RNA, called LATs (Latency Associated Transcripts) that remains transcribed (for reviews see (34-36)). Reactivation of the virus occurs following different stresses, and ICP0 is essential for full reactivation in a mouse model (37). Using a fluorescent *in situ* hybridization approach specifically developed to detect latent HSV-1 genomes within neuronal tissues, we showed that HSV-1 genomes were not randomly distributed in the nucleus of infected neurons (Catez, Picard et al., unpublished results). Interestingly, a significant proportion of infected neurons displayed HSV-1 genomes co-localizing with centromeres (Catez, Gross et al., unpublished results). Those centromere-associated viral genomes were shown to be constantly negative for the expression of LAT (Catez, Gross et al., unpublished results). This means that during latency it exists a close interplay between transcriptionally inactive HSV-1 genomes and centromeres. It is known from the literature that centromeres are preferential sites of inactive cellular genes deposition in differentiated cells, that could act to maintain heritable silencing of genomic loci (38-46); and for

reviews see (47-49). It is thus intriguing that latent, repressed, HSV-1 genomes are also found at centromeres and that ICP0, which is essential for reactivation, destabilizes these domains. A reasonable hypothesis is thus that ICP0 anti-centromere activity is required to induce optimal reactivation of HSV-1 from latency. We are currently testing this hypothesis.

Acknowledgments

We thank Ian Cheesman and Dan Foltz for GFP-CENPs-expressing cells; Katsuo Todokoro for anti-CENP-H antibody; Patrick Meraldi for anti-CENP-N antibody. This work was funded by the Association pour la Recherche contre le Cancer (grants ARC-7979 and ARC-4910), ANR (grant ANR-05-MIIM-008-01, CENTROLAT), FINOVI foundation, Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC), INCa (EPIPPO program). SG was supported by the French Ministry for Education and Research and the « Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) ». FC and PL are CNRS fellows.

Figure Legends

Figure 1 : ICP0 destabilizes the entire proteinaceous structure of the centromere. (A) Schematic structure of the interphase centromere. (B) Normal HeLa cells (CENP-I detection) or HeLa cells constitutively expressing GFP-tagged CENPs (CENP-H, -N, -M, -O, -P, -Q) were either infected for 4 hours with wild type (HSV-1wt) or mutant virus expressing FXE (vFXE) (i to vi) or transfected with plasmids expressing ICP0 or its RF mutant FXE (vii to xiv). Detection of CENPs proteins ICP0 and centromeres (centro) was performed by immunofluorescence. Bars represent 10 μ m.

Figure 2 : ICP0 induces the proteasomal degradation of CAD- and NAC-associated proteins. Western blot detection of CENPs proteins from NAC, CAD complexes and centromeric chromatin in HeLa cells infected for 6 hours (m.o.i. 10) with wt virus (HSV-1wt) in absence or presence (+MG132) of proteasome inhibitor; ICP0 deleted mutant virus (dl1403, ICP0 null) or mutant virus expressing FXE (vFXE, ICP0mut). ICP0 and actin detections are shown as controls of the infection and protein loading, respectively.

Figure 3: HSV-1 infection destabilizes the structure of centromeric nucleosomes in an ICP0-dependent manner. (A) Micrococcal Nuclease (MNase) digestion patterns in HeLa cells in three conditions : mock infected; infected with an ICP0-null HSV-1 mutant virus (dl1403) and infected with HSV-1wt (17syn+). Left panel: MNase digestion patterns of total DNA. Right panel: Southern blot hybridization of the same profiles using an alphoid DNA probe. (B) Plot of digestion profiles at

30 and 50 minutes of MNase digestion (curves corresponding to the coloured frames in A). Left panel: for total DNA the red curve (HSV-1wt infection) is slightly above the two others for the mononucleosomal form, confirming what can be seen on the gel in A. Right panel: for centromeric chromatin, the red curve (HSV-1wt infection) is systematically below the two others, meaning that there is a deficit of each nucleosomal form in this condition. (C) Quantification of mononucleosomes and dinucleosomes accumulation during MNase digestion. Left panels: for total DNA, mono and dinucleosomes accumulation is similar in all conditions for the latest times of digestion (30 and 50 minutes). Right panels: For centromeric chromatin the curve corresponding to mono- and dinucleosomes accumulation in HSV-1wt-infected cells (red) at the latest times of digestion (30 and 50 minutes) is significantly lower than the two others. (D) Rate of chromatin digestion. The panels give the measures of the relative abundance of mono (green) or dinucleosomes (orange) over the four lowest molecular forms (mono-, di- tri- and tetranucleosomes) at 30 and 50 minutes of MNase digestion. The ratios between mono- and dinucleosomes (R) indicate the rate of digestion of the total chromatin (left panels) or centromeric chromatin (right panels). The higher the ratio, the higher the rate of digestion.

Figure 4 : ICP0-expressing cells are inducing CENP-A loss from centromeres. (A) HeLa-TR, TR-ICP0, and TR-FXE cells were induced (+) or not (-) by tetracycline before performing WB to detect ICP0 or FXE expression. The arrow indicates the ICP0 or FXE signal. Note that the depot of protein from TR-FXE is 10X less than from HeLa-TR and TR-ICP0 due to the very high expression of FXE. (B) Non induced (I to iii) or tetracycline-induced (iv to ix) cells were tested by IF (i) for the expression of ICP0 or FXE (green), (ii) for the CENP-A signal at centromeres. >99.5 % of cells are positive for ICP0 or FXE signals. CENP-A signal disappears in all ICP0-expressing cells. Bars represent 10 μ m.

Figure 5 : ICP0 alone destabilizes the centromere nucleosome structure. (A) Micrococcal Nuclease (MNase) digestion patterns in HeLa-TRex cells in three conditions: normal cells (HeLa-TRex); cells expressing ICP0 Ring Finger mutant FXE (HeLa-TR-FXE); cells expressing ICP0 (HeLa-TR-ICP0). All cells were treated with tetracycline (1 μ g/ml) for 19 hours before analysis. Left panel: MNase digestion patterns of total DNA. Right panel: Southern blot hybridization of the same profiles using an alphoid DNA probe. (B) Plot of digestion profiles at 30 and 50 minutes of MNase digestion (curves corresponding to the coloured frames in A). Left panel: for total DNA the red curve (HSV-1wt infection) is slightly above the two others for the mononucleosomal form, confirming what can be seen on the gel in A. Right panel: for centromeric chromatin, the red curve (HSV-1wt infection) is systematically below the two others, meaning that there is a deficit of each

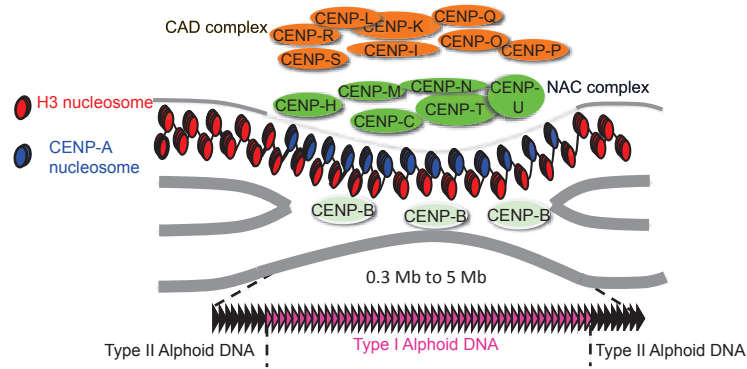
nucleosomal form in this condition. (C) Quantification of mononucleosomes and dinucleosomes accumulation during MNase digestion. Left panels: for total DNA, mono and dinucleosomes accumulation is similar in all conditions for the latest times of digestion (30 and 50 minutes). Right panels: For centromeric chromatin the curve corresponding to mono- and dinucleosomes accumulation in HSV-1wt-infected cells (red) at the latest times of digestion (30 and 50 minutes) is significantly lower than the two others. (D) Rate of chromatin digestion. The panels give the measures of the relative abundance of mono (green) or dinucleosomes (orange) over the four lowest molecular forms (mono-, di- tri- and tetranucleosomes) at 30 and 50 minutes of MNase digestion. The ratios between mono- and dinucleosomes (R) indicate the rate of digestion of the total chromatin (left panels) or centromeric chromatin (right panels). The higher the ratio, the higher the rate of digestion.

References

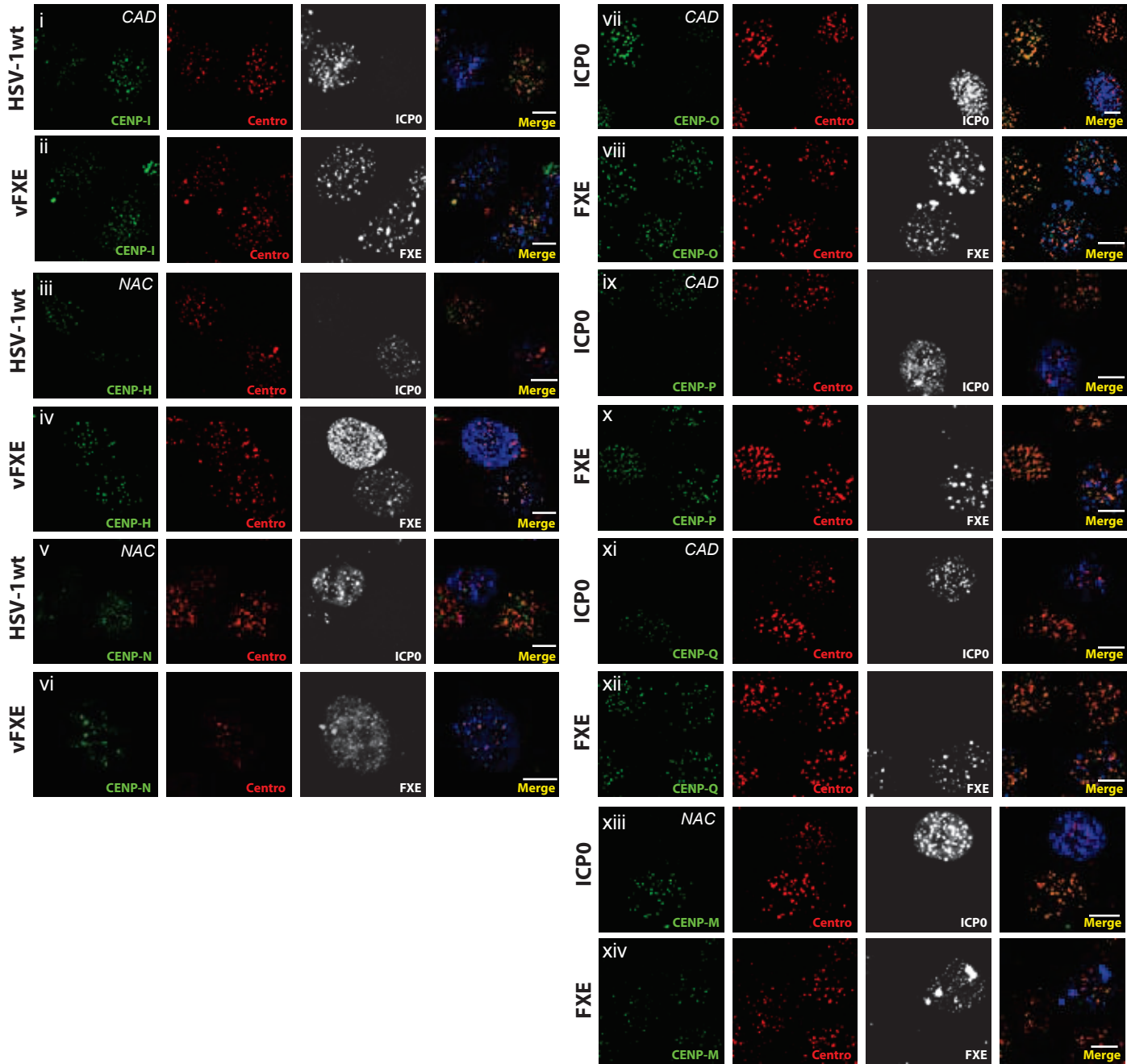
1. Everett, R. D., Earnshaw, W. C., Findlay, J., and Lomonte, P. (1999) *The EMBO journal* **18**, 1526–38.
2. Hagglund, R., and Roizman, B. (2004) *J. Virol.* **78**, 2169–2178
3. LOMONTE, P., and Morency, E. (2007) *FEBS Lett.* **581**, 658–662
4. Lomonte, P. (2000) *Journal of Biological Chemistry* **276**, 5829–5835
5. Morency, E., Sabra, M., Catez, F., Texier, P., and LOMONTE, P. (2007) *J. Cell Biol.* **177**, 757–768
6. Schueler, M. G., and Sullivan, B. A. (2006) *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**, 301–313
7. Blower, M. D., Sullivan, B. A., and Karpen, G. H. (2002) *Dev. Cell* **2**, 319–330
8. Foltz, D. R., Jansen, L. E., Black, B. E., Bailey, A. O., Yates, J. R. 3., and Cleveland, D. W. (2006) *Nature cell biology* **8**, 458–469
9. Okada, M., Cheeseman, I. M., Hori, T., Okawa, K., McLeod, I. X., Yates, J. R. 3., Desai, A., and Fukagawa, T. (2006) *Nature cell biology* **8**, 446–457
10. Stow, N. D., and Stow, E. C. (1986) *The Journal of general virology* **67**, 2571–85.
11. Everett, R. D., Cross, A., and Orr, A. (1993) *Virology* **197**, 751–6.
12. Ikeno, M., Masumoto, H., and Okazaki, T. (1994) *Hum Mol Genet* **3**, 1245–1257
13. Conn, K. L., Hendzel, M. J., and Schang, L. M. (2008) *J. Virol.* **82**, 8629–8646
14. Gascoigne, K. E., Takeuchi, K., Suzuki, A., Hori, T., Fukagawa, T., and Cheeseman, I. M. (2011) *Cell* **145**, 410–422
15. Przewloka, M. R., Venkei, Z., Bolanos-Garcia, V. M., Debski, J., Dadlez, M., and Glover, D. M. (2011) *Curr. Biol.* **21**, 399–405
16. Trazzi, S., Perini, G., Bernardoni, R., Zoli, M., Reese, J. C., Musacchio, A., and Valle, Della, G. (2009) *PloS one* **4**, e5832
17. Hellwig, D., Munch, S., Orthaus, S., Hoischen, C., Hemmerich, P., and Diekmann, S. (2008) *J Biophotonics* **1**, 245–254
18. Carroll, C. W., Milks, K. J., and Straight, A. F. (2010) *J. Cell Biol.* **189**, 1143–1155
19. Carroll, C. W., Silva, M. C., Godek, K. M., Jansen, L. E., and Straight, A. F. (2009) *Nature cell biology* **11**, 896–902
20. Sugimoto, K., Yata, H., Muro, Y., and Himeno, M. (1994) *J Biochem (Tokyo)* **116**, 877–881
21. Politi, V., Perini, G., Trazzi, S., Pliss, A., Raska, I., Earnshaw, W. C., and Valle, Della, G. (2002) *Journal of cell science* **115**, 2317–2327

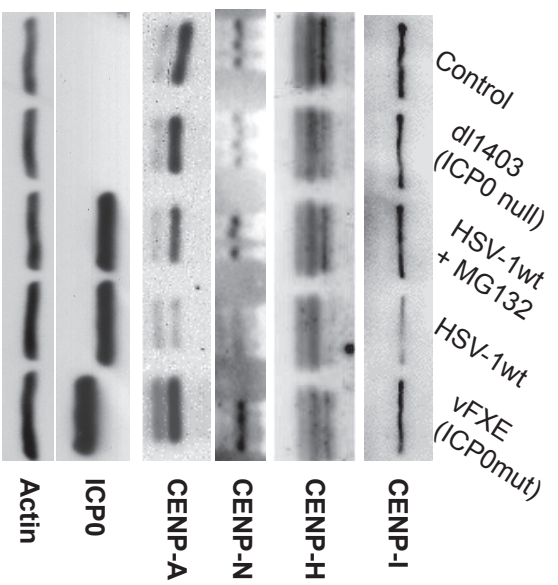
22. Du, Y., Topp, C. N., and Dawe, R. K. (2010) *PLoS genetics* **6**, e1000835
23. Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N., and Okazaki, T. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 1963–1973
24. Yoda, K., Kitagawa, K., Masumoto, H., Muro, Y., and Okazaki, T. (1992) *J. Cell Biol.* **119**, 1413–1427
25. Palmer, D. K., O'Day, K., Wener, M. H., Andrews, B. S., and Margolis, R. L. (1987) *J. Cell Biol.* **104**, 805–815
26. Sullivan, K. F., Hechenberger, M., and Masri, K. (1994) *J. Cell Biol.* **127**, 581–592
27. Tanaka, Y., Tachiwana, H., Yoda, K., Masumoto, H., Okazaki, T., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2005) *The Journal of biological chemistry* **280**, 41609–41618
28. Yoda, K., Ando, S., Okuda, A., Kikuchi, A., and Okazaki, T. (1998) *Genes Cells* **3**, 533–548
29. Okada, T., Ohzeki, J., Nakano, M., Yoda, K., Brinkley, W. R., Larionov, V., and Masumoto, H. (2007) *Cell* **131**, 1287–1300
30. Parkinson, J., and Everett, R. D. (2000) *J. Virol.* **74**, 10006–10017
31. Pluta, A. F., Earnshaw, W. C., and Goldberg, I. G. (1998) *Journal of cell science* **111 (Pt 14)**, 2029–2041
32. Lomonte, P., and Everett, R. D. (1999) *J. Virol.* **73**, 9456–67.
33. Schang, L. M., Rosenberg, A., and Schaffer, P. A. (2000) *J. Virol.* **74**, 2107–2120
34. Wagner, E. K., and Bloom, D. C. (1997) *Clin Microbiol Rev* **10**, 419–43.
35. Preston, C. M. (2000) *The Journal of general virology* **81 Pt 1**, 1–19.
36. Bloom, D. C., Giordani, N. V., and Kwiatkowski, D. L. (2010) *Biochimica et biophysica acta* **1799**, 246–256
37. Halford, W. P., and Schaffer, P. A. (2001) *J. Virol.* **75**, 3240–9.
38. Francastel, C., Walters, M. C., Groudine, M., and Martin, D. I. (1999) *Cell* **99**, 259–269
39. Francastel, C., Magis, W., and Groudine, M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12120–12125
40. Brown, K. E., Guest, S. S., Smale, S. T., Hahm, K., Merckenschlager, M., and Fisher, A. G. (1997) *Cell* **91**, 845–854
41. Brown, K. E., Baxter, J., Graf, D., Merckenschlager, M., and Fisher, A. G. (1999) *Molecular cell* **3**, 207–217
42. Schubeler, D., Francastel, C., Cimborra, D. M., Reik, A., Martin, D. I., and Groudine, M. (2000) *Genes & development* **14**, 940–950
43. Brown, K. E., Amoils, S., Horn, J. M., Buckle, V. J., Higgs, D. R., Merckenschlager, M., and Fisher, A. G. (2001) *Nature cell biology* **3**, 602–606
44. Merckenschlager, M., Amoils, S., Roldan, E., Rahemtulla, A., O'Connor, E., Fisher, A. G., and Brown, K. E. (2004) *The Journal of experimental medicine* **200**, 1437–1444
45. Terranova, R., Sauer, S., Merckenschlager, M., and Fisher, A. G. (2005) *Experimental cell research* **310**, 344–356
46. Guasconi, V., Pritchard, L.-L., Fritsch, L., Mesner, L. D., Francastel, C., Harel-Bellan, A., and Ait-Si-Ali, S. (2010) *Epigenetics* **5**, 704–709
47. Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D. I., and Groudine, M. (2000) *Nature reviews* **1**, 137–143
48. Georgopoulos, K. (2002) *Nat Rev Immunol* **2**, 162–174
49. Fisher, A. G., and Merckenschlager, M. (2002) *Current opinion in genetics & development* **12**, 193–197

A.

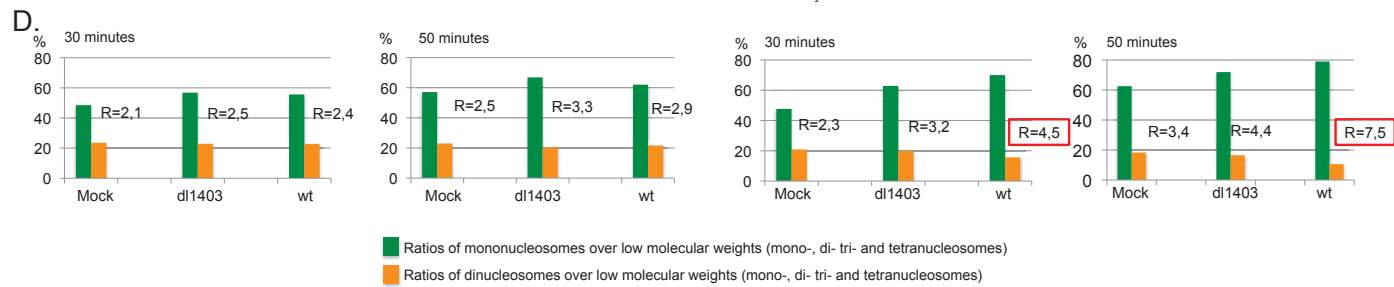
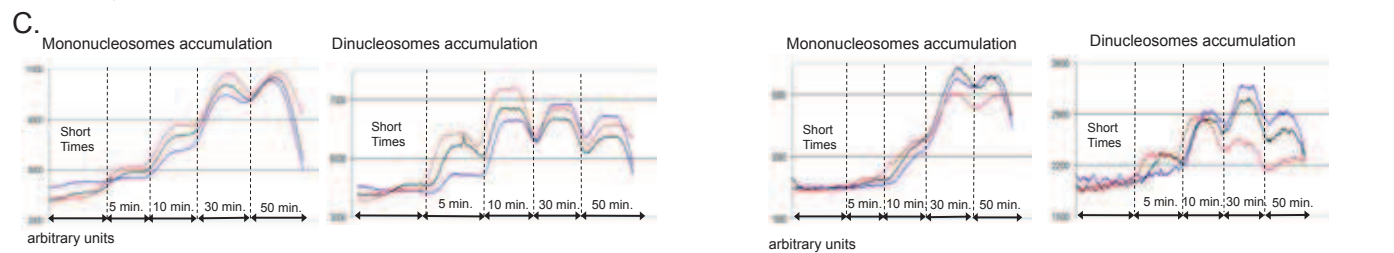
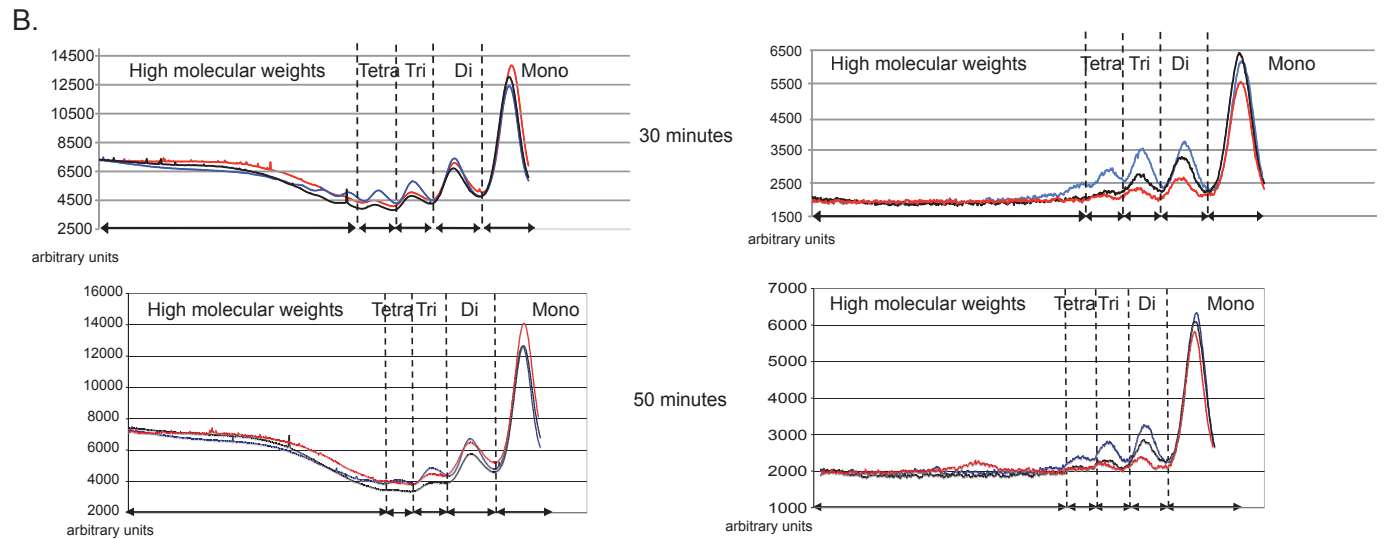
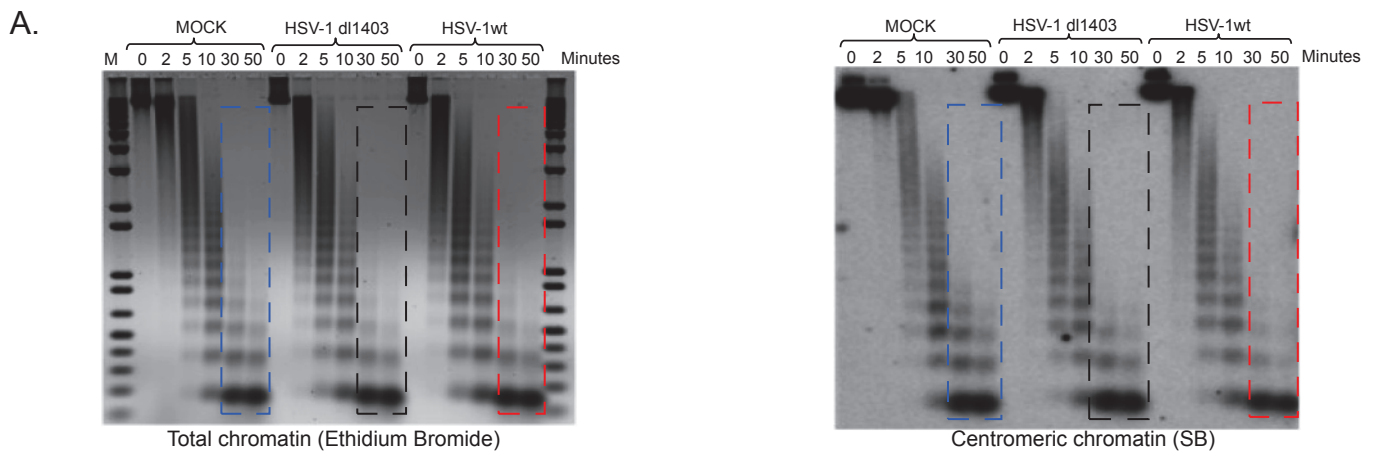


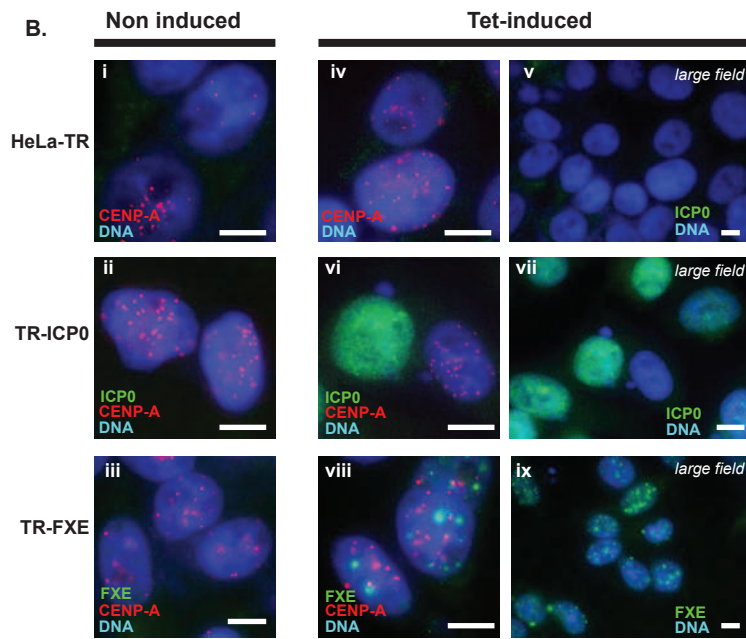
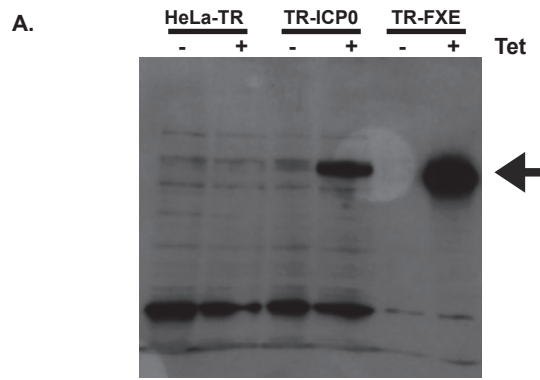
B.

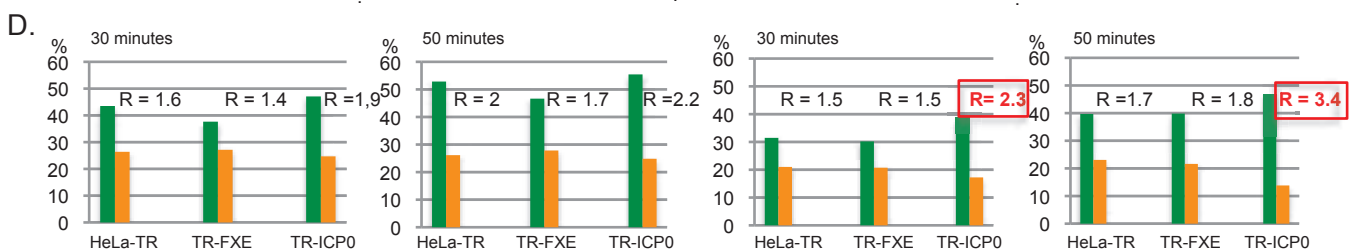
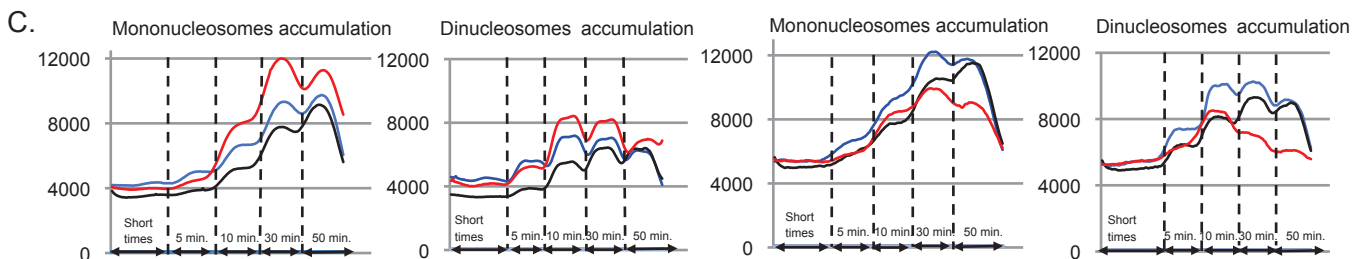
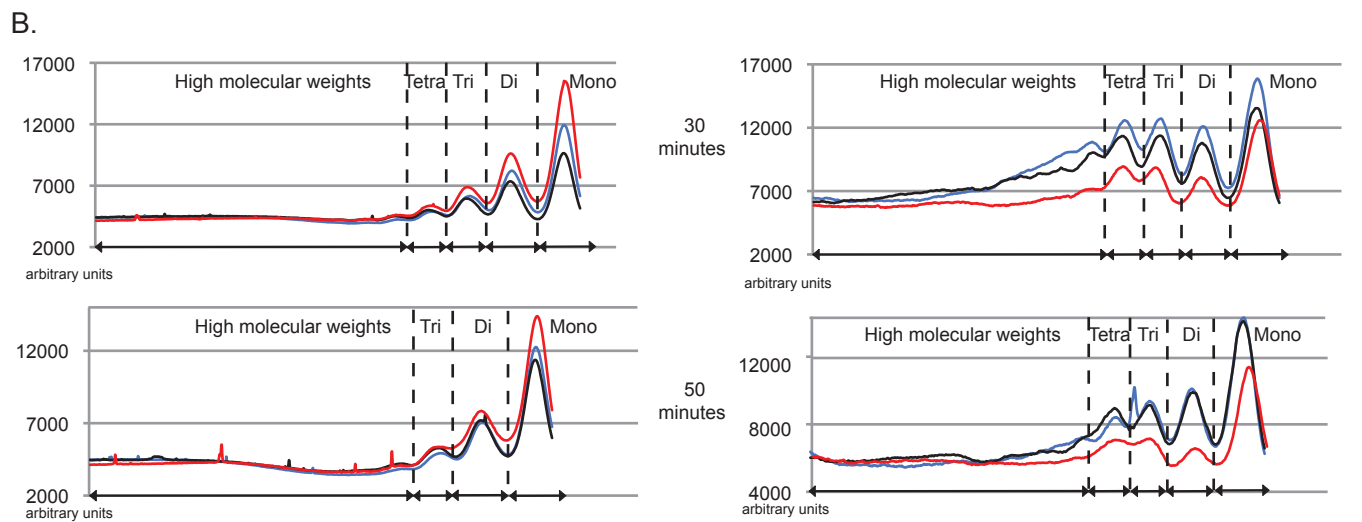
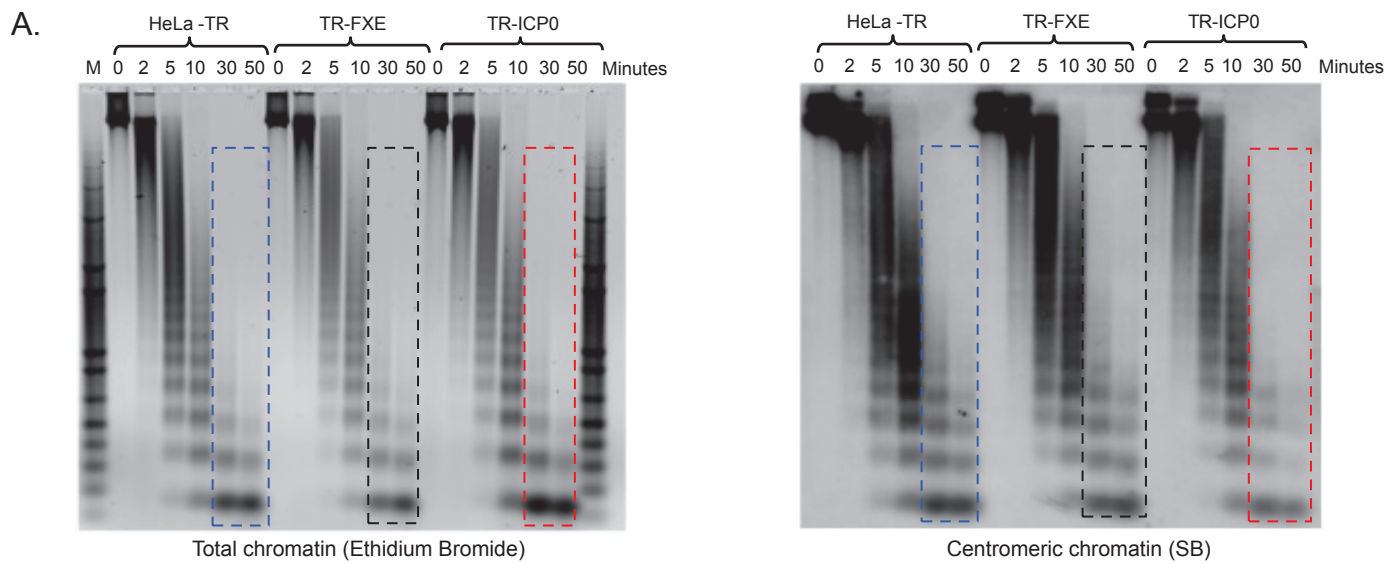




Gross et al. FIGURE 2







■ Ratios of mononucleosomes over low molecular weights (mono-, di- tri- and tetranucleosomes)

■ Ratios of dinucleosomes over low molecular weights (mono-, di- tri- and tetranucleosomes)

CHAPITRE 3 : ANALYSE *IN VIVO* DE LA LOCALISATION ET DE L'EXPRESSION DU GENOME DE HSV-1

Mon travail s'inscrit dans une étude plus vaste menée au laboratoire et qui consiste à comprendre quel serait le rôle des centromères dans la biologie du virus. J'ai eu l'opportunité de participer à cette partie de l'étude et je vais, dans cette introduction, poser les bases de la réalisation de ce travail. Les informations scientifiques, techniques, et les résultats obtenus sont présentés dans l'article, en préparation pour soumission, qui se trouve ci-après.

HSV-1 a donc développé par l'intermédiaire de la protéine ICP0 une activité « anti-centromérique » très efficace. Il est donc raisonnable de penser que cette activité va intervenir à une étape du processus d'infection. Comme mentionné dans l'introduction de cette thèse le virus HSV-1 se caractérise par une infection duale, à savoir, une infection dite « lytique » qui se déroule au niveau des cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur, suivie d'une infection latente dans les neurones sensitifs. Cette phase de latence peut être perturbée par différents stimuli (chaleur, UV, stress hormonal...) ce qui conduit généralement à une réactivation du virus et à l'apparition de symptômes tels que le « bouton de fièvre », voire des kératites, ou plus gravement des encéphalites chez les patients immunodéprimés ((Labetoulle et al. 2000), (Preston 2000), (Bloom, Giordani, et Kwiatkowski 2010)). La dégradation des centromères doit donc intervenir à une de ces étapes pour favoriser le processus infectieux.

La connaissance de la biologie du virus laisse plutôt penser qu'il est très peu probable que cette dégradation de centromères soit importante pour l'infection lytique. En effet, si l'on se réfère à l'infection de cellules en culture, une des conséquences de la déstabilisation des centromères est de bloquer les cellules en phase de mitose (P Lomonte et Everett 1999). Au vu de la biologie du virus il est inconcevable que le virus ait besoin de bloquer la cellule dans une phase où le noyau disparaît, car HSV-1, qui est un virus nucléaire, a besoin d'un noyau intact pour se répliquer. De plus, le virus est capable de se

répliquer dans n'importe quelle phase du cycle cellulaire (à l'exception de la mitose). Il est également difficile d'imaginer que le virus ait besoin de bloquer en mitose les cellules dans lesquelles il est latent, car ces cellules sont des neurones en phase G0 et qui donc ne se répliquent pas. À ce titre, les données d'immuno-FISH présentées dans l'article montrent que, les neurones positifs pour HSV-1 des ganglions trijumeaux et du cerveau de souris infectés en phase aiguë (6 jours post-inoculation du virus) ou en phase de latence (28 jours post-inoculation), ne sont pas dépourvus de la protéine CENP-A. Ceci suggère donc qu'ICP0 n'intervient pas sur la dégradation de CENP-A et donc sur la déstabilisation des centromères pendant ces deux phases. Des données obtenues au laboratoire montrent qu'ICP0 est active dans les cellules de souris au moins sur la protéine CENP-B (Patrick Lomonte et Morency 2007). De plus ICP0 est capable d'affecter la structure du péricentromère des cellules de souris (Catez et al., résultats non publiés).

HSV-1 pourrait donc bloquer une signalisation induite par les centromères suite à l'infection. Par exemple, une signalisation de mort cellulaire ou de blocage de transcription virale. Cette hypothèse n'est pas à exclure, cependant un virus n'exprimant pas ICP0 est toujours capable d'infecter des cellules de façon efficace. Il faut donc chercher une autre activité liée aux centromères et pourrait influencer l'infection par HSV-1.

L'hypothèse qui a donc été privilégiée, est celle qui consiste à penser que les centromères contrôleraient la latence du virus et qu'HSV-1 ait besoin de le déstabiliser pour réactiver de cette phase de latence. Une première raison est à chercher du côté de la biologie du virus à savoir qu'ICP0 est indispensable pour la réactivation du virus dans un modèle murin (Halford et Schaffer 2001). La deuxième raison est d'ordre cellulaire et plus particulièrement dans la biologie des centromères. En effet, il est bien connu que les centromères créent un environnement plutôt répressif du point de vue transcriptionnel (voir Introduction chapitre 3). Des études ont donc été réalisées qui ont montré que dans certaines lignées hématopoïétiques et cellules musculaires le positionnement nucléaire de certains loci géniques pouvait changer en fonction de leur activité transcriptionnelle. À savoir les loci réprimés ont plutôt tendance à se rapprocher *en trans* des centromères/péricentromères alors que les mêmes loci lorsqu'ils sont exprimés sont éloignés de ces structures ((C Francastel et al. 1999),(C Francastel, Magis, et Groudine 2001), (K E Brown et al. 1997), (K E Brown et al. 1999), (Schübeler et al. 2000), (K E Brown et al. 2001), (Merkenschlager et al. 2004), (Terranova et al. 2005), (Guasconi et al. 2010); et pour

revues voir (C Francastel et al. 2000), (Georgopoulos 2002), (Fisher 2002)). Puisque le génome viral subit une répression transcriptionnelle quasi complète durant la latence et que la réactivation est caractérisée par une reprise de cette activité d'expression de gènes viraux, alors il peut être envisagé que les génomes viraux subissent une répression via un positionnement aux centromères et qu'ICP0 lorsqu'elle est produite suite à un stress cible ces centromères pour « libérer » les génomes HSV-1 de l'emprise des centromères.

La première chose à montrer était donc que le positionnement des génomes virus latent n'était pas aléatoire et pouvait être associé aux centromères. Les données de FISH de l'article établissent qu'en effet une partie significative des neurones porteurs de HSV-1 latent montre des génomes viraux co-localisant spécifiquement avec les centromères (mais pas avec les péricentromères). Il y a bien entendu des nuances par rapport aux profils viraux et au positionnement nucléaire de ces génomes, mais je vous invite à vous reporter à l'article pour avoir plus de détails.

La deuxième chose à montrer était que ces génomes viraux associés aux centromères étaient transcriptionnellement inactifs. Durant la phase de latence le virus transcrit une famille d'ARNs non-codant appelés LAT (pour Latency Associated Transcripts, voir Introduction chapitre 1). Il se trouve que ces ARNs sont issus d'un transcrit primaire de 8,3kb qui est très instable et qui est maturé en un ARN de 2kb de type intron stable et en de nombreux miRNAs ((Umbach et al. 2008), (Jurak et al. 2010), (Preston 2000)). La détection de cet ARN de 8,3 kb est donc la marque de génomes viraux actifs du point de vue transcriptionnel. Les résultats obtenus montrent de façon claire que les génomes viraux associés aux centromères sont constamment négatifs pour l'expression de ce LAT.

Nous ne connaissons pas la relation de cause à effet entre l'association aux centromères et la répression. Autrement dit nous ne savons pas si les génomes viraux sont réprimés parce qu'ils sont associés aux centromères ou s'ils sont associés aux centromères parce qu'ils sont réprimés. Cela dit, il peut y avoir dans un même neurone plusieurs génomes viraux dont certains ne sont pas associés aux centromères et qui sont négatifs pour l'expression du LAT. Cela veut dire que même si les centromères participent à la répression virale, d'autres facteurs, probablement épigénétiques, sont impliqués dans cette répression. Reste à savoir si les génomes qui réactivent sont ceux positionnés sur les centromères. Nous n'avons pas encore cette réponse mais les études pour répondre à cette question importante sont prévues.

Article 2

Physical association of latent HSV-1 genomes with centromeres correlates with viral transcriptional repression

Frédéric Catez^{1,2,6}, Sylvain Gross^{1,2,3}, Marc Labetoulle^{4,5}, and Patrick Lomonte^{1,2,3}

1. Virus and Centromere team. Centre de Génétique et Physiologie Moléculaire et Cellulaire CNRS, UMR5534.
2. Université de Lyon 1, F-69000 Lyon, France;
3. Laboratoire d'excellence, Labex DEVweCAN, F-69000 Lyon, France
4. Institut de Virologie Moléculaire et Structurale, CNRS-UPR-3296, Gif-sur-Yvette, France;
5. Ophthalmology Dept, Hopital Bicêtre, APHP, Université Paris-Sud
6. Current address: INSERM U1052, CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000, Lyon, France.

* Correspondence to: patrick.lomonte@univ-lyon1.fr

Abstract

The mammalian nucleus is organized in chromosome territories and discrete nuclear domains that participate in the control of gene expression. Several human viruses, among which herpes simplex virus type 1 (HSV-1), establish life-long persistent infection in the host, in the course of which viral genomes are stored in the nucleus of the host cell in a non-integrated form. It is anticipated that nuclear domains play a significant role in the biology of those viruses however *in vivo* data are missing. Using neuronal tissues from HSV-1 latently infected mice, we show by fluorescent in situ hybridization that HSV-1 adopts two major patterns in the nucleus of infected neurons, called single and multiple. Within the multiple pattern HSV-1 frequently associates with centromeres. We looked at the expression of the non-coding RNA Latency Associated Transcript (LAT) encoded by HSV-1 during latency, and found that HSV-1 genomes associated with centromeres were silent for its expression. In conclusion, we provide evidence for an involvement of centromeres in HSV-1 biology, and put forward a potential chromatin-dependent trans-repression mechanism for HSV-1 gene silencing during latency.

Introduction

Nuclear architecture and more specifically non-random nuclear organization of genetic loci is, together with transcription factors and chromatin epigenetic, a key determinant of gene expression (Misteli, 2005; Spector, 2003; Baxter et al., 2002; Sexton et al., 2007). Nuclear domains whatever they are from chromatin or proteinaceous origin, have been widely involved in gene regulation (Misteli, 2005; Bernardi and Pandolfi, 2007; Ching et al., 2005). Centromeres and peri-centromeric heterochromatin are the site of strong gene repression activity (Fisher and Merckenschlager, 2002; Elgin and Grewal, 2003). This repression is called Position Effect Variegation (PEV), when centromere compartments contribute *in cis* to the transcriptional repression of adjacent chromosomal regions (for a review see Dillon and Festenstein, 2002). This repression can also propagate *in trans* from the centromere of a chromosome to the genic region of another chromosome. Such a mechanism has been demonstrated for the repression of the brown gene of the drosophila and several specific genes of the mammalian lymphoid and erythroid lineages (Francastel et al., 1999; 2001; Brown et al., 1997; 1999; Schubeler et al., 2000; Brown et al., 2001; Merckenschlager et al., 2004; Georgopoulos, 2002; Fisher and Merckenschlager, 2002), but also in muscle cells (Terranova et al., 2005; Guasconi et al., 2010). In addition, the presence at centromeres of several repressors such as Ikaros or TIF-1 is in accordance with these observations, and suggests the existence of selective mechanisms capable to recruit particular genic loci to the proximity of the centromeres to induce their repression (Cammass et al., 2002; Georgopoulos, 2002; Matsuda et al., 2001).

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is a neurotropic, persistent, human virus characterized, after an initial productive infection, by long periods of transcriptional quasi-inactivity called latency (Wagner and Bloom, 1997; Preston, 2000; Bloom et al., 2010). After multiplication of the virus in epithelial cells, HSV-1 enters the axonal termini of sensory neurons, migrates to the ganglia, and delivers its 152kb double-stranded linear DNA in the neuron nucleus. Hence, the viral DNA circularizes and remains in a quiescent episomal state until putative reactivation following appropriate stimuli. Only one locus, called latency-associated transcripts (LAT), remains transcribed under a primary unstable 8.3kb nuclear non-coding RNA (ncRNA) (Stevens et al., 1987; Dobson et al., 1989; Mitchell et al., 1990; Zwaagstra et al., 1990; Devi-Rao et al., 1991). Quickly after transcription the 8.3kb-LAT sustains a maturation into a stable 2kb-LAT intron (Farrell et al., 1991; Wagner et al., 1988b; 1988a), and several miRNAs (Umbach et al., 2008; Jurak et al., 2010). Spontaneously, or under the influence of triggering factors (immunosuppression, steroids therapy, trauma, UV

irradiations ...), the virus can reactivate and re-enter a lytic cycle, inducing clinically detectable symptoms such as “cold sore”, keratitis, or encephalitis in immuno-compromised patients.

HSV-1 has developed a strong “anti-centromeric” activity. Early during infection of cultured cells, the viral nuclear E3-ubiquitin ligase ICP0 protein temporarily localizes at centromeres and induces the proteasomal degradation of several centromeric proteins, provoking the complete breakdown of both the proteinaceous and chromatin structures of interphase centromeres (Everett et al., 1999; Lomonte, 2000; Lomonte and Morency, 2007). Nevertheless, ICP0 stimulates the replicative cycle at the onset of a new infection and is essential to induce full reactivation of HSV-1 from latency (Russell et al., 1987; Harris et al., 1989; Halford and Schaffer, 2001; Everett et al., 2004). It is highly unlikely that the reasons for an ICP0-induced centromeres destabilisation, is to provoke the mitotic arrest of infected cells (Lomonte and Everett, 1999). Indeed, HSV-1 is capable to replicate independently of the cell cycle (Schang et al., 2000), and the lytic cycle does not depend on a cell arrest at the mitotic phase. This suggests that HSV-1 targets centromeres, not to control their activity towards chromosomes segregation, but rather to control an activity more particularly present in differentiated cells. Precisely, HSV-1 establishes latency in neurons, therefore in cells at the ultimate stage of differentiation and that do not divide. The most reasonable hypothesis is thus to postulate that ICP0 would affect some centromeric properties that are linked to the repression of gene expression.

We hypothesized that HSV-1 genome silencing during latency might be mediated by a physical association of HSV-1 genomes with cellular centromeres. Thus, we developed a FISH based method to visualize HSV-1 genomes intranuclear localization, by high-resolution fluorescence imaging, in trigeminal ganglia of latently infected mice. Using this method, we detected HSV-1 genomes in TG of mice from 6 days to 3 month post-infection. The intranuclear pattern of HSV-1 genomes differs from neuron to neuron and can be categorized into 2 groups that correlate with genome copy numbers. Through the co-detection of HSV-1 and mouse satellite DNA, we show that HSV-1 latent genomes closely associate with centromeres in a significant subset of neurons. The association of HSV-1 genomes with centromeres does not directly correlate with the expression of the 2kb-LAT ncRNA. However, a fine analysis of the nascent 8.3kb-LAT using high resolution RNA/DNA-FISH indicates that the genomes transcribing LATs are not those associated with centromeres. In conclusion, we provide evidence for an involvement of centromeres in HSV-1 latency and put forward a potential chromatin-dependent trans-repression mechanism for HSV-1 gene silencing during

latency.

Results and Discussion

I- Centromere proteinaceous structure is not altered in HSV-1 latently infected TG neurons.

Centromeres are well-characterized targets of HSV-1 ICP0 activity. Several studies, in infected and ICP0-expressing cultured cells, provided evidences of an ICP0-induced degradation of several CENPs (CENP-A, -B, -C, -H, -N and -I) belonging to both the proximal and distal centromeric protein complexes of interphase centromeres (Everett et al., 1999; Lomonte, 2000; Lomonte and Morency, 2007; Foltz et al., 2006; Okada et al., 2006). Additionally, using cell lines stably expressing CENPs fused to GFP we recently found that HSV-1 induced a disappearance of an additional set of 5 CENPs (CENP-K, -O, -P, -Q and -M) (Gross et al., unpublished results). ICP0 activity on centromeres is rapid (within 2 hours post-infection) and has been observed in various cell types. However, *in vivo* data collected on infected animals are still missing. A growing set of evidences indicates that expression and activity of IE genes, to which ICP0 belongs, might be differentially regulated in neuronal cells both in cultured cells and in animals (Hsu and Everett, 2001; Proenca et al., 2011). This neuron-specific transcriptional regulation of lytic genes is believed to be part of the mechanism involved in establishment and maintenance of latency. We sought to verify if centromeres were altered in HSV-1 positive neurons from infected mice. We first analyzed mouse TG neurons during the acute phase of infection in the course of which HSV-1 initiates either establishment of latency or lytic replicative cycle. Using immuno-FISH approach we could distinguish non-infected and infected neurons, and observe CENP-A labeling in these cells. Consistently with previous observations, CENP-A was found at the periphery of pericentromeric heterochromatin aggregates (also called chromocenters) both in neuronal and accessory cells. In most infected neurons, HSV-1 genomes distribution appeared as few nuclear spots. This pattern was reminiscent of that observed during latency (named profile 1, Fig 1Ai), and was different from replication compartment observed in cultured cells. In all these neurons, CENP-A was detected with intensity similar to non-infected neighbor neurons. Less frequently, we observed neurons in which HSV-1 seemed to undergo replicative cycle (profile 2, Fig. 1Aii). Indeed, these neurons displayed a very strong HSV-1 FISH signal, in the form of large aggregates that were similar to replication compartments observed in cultured cells. Additionally, the so-called annexation of the chromosomal space by HSV-1 genome

was observed (Fig 1Aii) (Monier et al., 2000). In these neurons, CENP-A was still clearly detected, and CENP-A signal intensity was similar to non-infected neurons. These data supported that CENP-A is not degraded during establishment of latency in TG-infected neurons. This was further confirmed in brain neurons in which only lytic cycles could be observed (Fig. 1Aiii). In all infected brain neurons, CENP-A was present at level, and with patterns identical to non-infected surrounding neurons.

Next, we asked whether CENP-A distribution was affected in latently infected neurons. During latency, HSV-1 genomes adopt two main patterns, either as a single spot or as multiple spots that we named "single" and "multiple" patterns, respectively (Fig 1 C, and Catez et al. submitted). No difference in CENP-A pattern was noticed when comparing non-infected and infected neurons, whether they contained HSV-1 as single or multiple pattern.

The absence of CENP-A degradation in infected neurons *in vivo* is not likely due to the mouse origin of the tissue since ICP0-induced degradation of several CENPs was previously observed in mouse cells (Lomonte and Morency, 2007, and data not shown). Several studies using reporter genes placed under control of ICP0 promoter, and IHC indicate that ICP0 is expressed in TG neurons during acute phase of infection (Thompson et al., 2003; Proenca et al., 2011). These studies did not address whether ICP0 is properly localized and fully functional in these neurons, however at least one study showed that ICP0 does not localize in nuclei of infected primary neurons (Chen et al., 2000). Although, HSV-1 infects TG neurons, initiates replicative and latency cycles, and expresses, at least to some extent, ICP0 gene, CENP-A remains present on centromeres. Given the importance of CENP-A in centromere structure maintenance we thus conclude that centromeres of infected neurons do not sustain structural modifications

II- Latent HSV-1 genomes localize at centromeres in TG neurons

Our team recently developed the *in situ* detection of HSV-1 genome in mouse tissues during latency (Catez et al., submitted). As mentioned above, HSV-1 genome distribution in neuron nuclei is not random, and appears as single and multiple patterns. HSV-1 genomes were not systematically found at the periphery of the nucleus, either we observed equatorial optical sections by wide-field microscopy or Z-stacks by confocal microscopy, thus excluding a preferential association with the nuclear envelope (Figures herein and data not shown). We then focused on centromeres and pericentromeres. In a first set of experiments we detected both centromeres and pericentromeres using probes specific for the centromeric minor satellites and the pericentromeric major satellites. These sequences are well conserved

between chromosomes, therefore a single probe allows for the detection of centromeres or pericentromeres of all chromosomes. Dual-color DNA FISH revealed that pericentromeres of TG neurons form 2 to 5 aggregates corresponding to the chromocenters observed by Hoechst DNA staining (Figure S1 and (Guenatri et al., 2004)). Centromeres formed clusters located at the surface of pericentromeres. These observations are consistent with previous descriptions of the centromeres and pericentromeres in cultured mouse cells, and neuronal cells (Guenatri et al., 2004; Manuelidis, 1984). In most neurons, regardless of their size, centromere and pericentromere clusters were in the inner part of the nucleus, adjacent to the nucleolus, and rarely associated with the nuclear envelop. This pattern was not an artifact due to the approach applied, as in accessory cells surrounding the neurons, centromere/pericentromere clusters were more numerous, and frequently associated with the nuclear envelop (not shown). We analyzed the association of latent HSV-1 genomes with centromeres and pericentromeres by dual-color DNA FISH, using our HSV-1 probe, a minor satellite probe, and Hoechst DNA staining. We found that HSV-1 genome frequently co-localized with minor satellite, while rarely associating with pericentromeres alone (Figure 2A-B). HSV-1 genomes in the single pattern co-localized with centromeres in only 11.8% of neurons, a value that increased up to 41.6% of neurons when in a multiple-spot pattern (n=1865 neurons in 3 mice). In contrast, frequency of association with pericentromeres remained low with 4.6% (range 2.1% to 5.0%) and 9.42% (range 6.23% to 12.6%) of single and multiple pattern-containing neurons, respectively (n=1249 neurons in 2 mice) (Figure 2B). The association of HSV-1 genomes with centromeres did not appear to be an artifact due to the higher density of HSV-1 signal in the multiple-spot pattern, for the following reasons: (i) centromere and HSV-1 signals were mainly colocalized rather than adjacent (see Figure 2A, bottom right image, Figure 1C and D), (ii) HSV-1 genomes positioning adjacent to pericentromeres did not increase concomitantly with the increase with HSV1 signal density, (iii) co-detection of HSV-1 with telomeres did not result in any colocalizing signal, even though each cell contains twice as much telomeres as centromeres, and that telomeres are closely positioned to centromeres in acrocentric mouse chromosomes. Finally, we used an immuno-FISH approach, staining HSV-1 and CENP-A protein and showed that CENP-A colocalized with HSV-1 on minor satellite sequences (Figures 2C and 2D). These data demonstrate that the HSV-1-associated centromeric loci are likely functional centromeres.

Our data thus show that HSV-1 selectively associate with centromeres in about one third of infected neurons, a behavior that cannot be attributed to random positioning. Interestingly, a recent study showed that centromeric and pericentromeric nuclear regions are preferential residence sites for foreign DNA delivered using virus like particles (Bishop et

al., 2006). Our study supports the view that centromeres are docking sites for foreign DNA delivered via viral particles. Significantly, we demonstrate that virus genome association with centromeres occurs with a natural, unmodified virus, in an *in vivo* infection model in mouse, thus excluding that such interaction is an experimental artifact.

III- HSV-1 association with centromeres prevents LAT locus expression.

Next we addressed the potential functional relevance of the virus/centromere interaction. Because HSV-1 latency is characterized by a strong, almost complete silencing of HSV-1 genome and because centromeres have been linked with gene silencing activity, we focused on HSV-1 gene expression. During latency, the Latency Associated Transcript locus is the only abundantly expressed viral gene, producing a primary (or nascent) unstable 8.3kb non-coding RNA. Primary 8.3kb-LAT is transcribed by RNA Pol II, polyadenylated, spliced, and processed into several miRNAs. A particularity of the 8.3kb-LAT is that, after splicing, the resulting intron (called 2kb-LAT) remains stable in neuron nuclei in the form of a lariat used as a maker of HSV-1 latency (Figure 3A).

To correlate HSV-1 intranuclear distribution with LAT expression, we developed a dual RNA/DNA-FISH assay using probes to detect HSV-1 genomes and the 2kb-LAT, (LAT-4 probe, Figure 3A and 3B). In latently infected TG neurons, 2kb-LAT was detected in 24.7 ± 9.6 % of the infected neurons, consistent with previous data obtained using different techniques (Mehta et al., 1995; Sawtell, 1997, Catez submitted). More precisely, 2kb-LAT expression correlates with the HSV-1 pattern, since only $8.6 \pm 6.9\%$ of the neurons containing the single pattern expressed LAT, while $43.3 \pm 13.8\%$ of neurons containing the multiple patterns were LAT positive. Intriguingly, the proportion of LAT positive neurons in each pattern was within the range of the proportion of neurons showing HSV-1 association with centromeres. However, such simple correlation could not be confirmed in a cell-to-cell analysis (data not shown), demonstrating that HSV-1 association with centromeres did not drive the overall expression of the 2kb-LAT.

Because the large majority of LAT expressing neurons contained numerous copies of HSV-1 genome, the detection of the stable 2kb-LAT did not address the transcriptional status of individual HSV-1 genomes, and in particular genomes associated with centromeres. We thus performed another set of dual RNA/DNA-FISH assay, using an RNA probe detecting the nascent 8.3kb-LAT as a marker of active transcription from the HSV-1 genomes (LAT-5 probe, Figure 3C and 3D). In these assays, the 8.3kb-LAT was associated with at least one HSV-1 genome spot in every LAT positive nucleus (Figure 3D). In all the observed neurons, the nascent 8.3kb-LAT RNA was never associated with viral genomes that co-localized with

centromeres (Figure 3E). Conversely, none of the HSV-1 genome associated with centromeres was found in close proximity to the nascent 8.3kb-LAT RNA. This suggests that centromeres are nuclear domains that do not favor LAT locus transcription.

In this study we show that HSV-1 genomes associate with the host neuron centromeres during the latency stage. HSV-1 genomes were found associated or more frequently colocalizing with centromeric probes and CENP-A, strongly suggesting that these viral genomes are docked to functional centromeres. We want to emphasize that the association occurs with the centromere itself, and not only with the pericentromere, which distinguish the current set of data from most other publications relating pericentromeric association (Francastel et al., 1999; 2001; Brown et al., 1997; 1999; Schubeler et al., 2000; Brown et al., 2001; Merckenschlager et al., 2004; Guasconi et al., 2010). We observed the association of HSV-1 with centromeres in a large fraction of the neurons, and we excluded a random event. Bishop and colleagues have previously shown that foreign DNA delivered by polyomavirus-like particle, also localized at centromeres (Bishop et al., 2006). Our data further support that centromeres represent docking sites for virus genomes, in a biologically relevant context and in an *in vivo* model. Together, with the fact that HSV-1 induces centromeres destabilization via ICP0, this study reinforces the hypothesis that centromeres of the host cell play a role in the infection process. As exposed in the introduction, several arguments allow excluding that HSV-1 targets centromeres to control or alter mitosis progression, and advocate that HSV-1 targets another function of centromeres. One of the function that has been clearly attributed to centromeres is the control of gene expression, which involves the gene silencing activity of the adjacent pericentromeric heterochromatin (Georgopoulos, 2002; Fisher and Merckenschlager, 2002). Accordingly, we show that centromere-associated HSV-1 genomes do not express LAT RNA. Our data additionally indicate that centromere association is unlikely to be the sole mechanism controlling LAT expression. For instance we identified PML nuclear bodies as other nuclear domains to which HSV-1 genomes are associated, and which induce a LAT silencing (Catez et al., submitted).

Centromere destruction is driven by ICP0 protein, and requires ICP0 E3 ubiquitin ligase activity. ICP0 protein induces the complete breakdown of the centromeric proteins complexes. In cultured cells, the activity of ICP0 results in the degradation or the centromeric release of at least 10 CENPs and in alteration of the centromeric chromatin (Everett et al., 1999; Lomonte, 2000; Lomonte and Morency, 2007). The consequences of ICP0 activity on centromeres are significant and are not random. Moreover, we have found that ICP0 is able

to localize at synthetic centromeres present in human artificial chromosomes (HAC), and to induce the degradation of associated CENPs (Gross et al. unpublished results). These observations support that targeting of ICP0 to centromeres is highly specific, and selective of the centromere identity. Together, these observations raise the possibility that HSV-1 had found a selective advantage in targeting centromeres.

Because centromeres destruction is induced by ICP0, one might postulate that centromeres play a role in stages of infection that requires ICP0 activity. Mainly, ICP0 is required to initiate the replicative cycle at the onset of a new infection and during the initiation of reactivation. We propose that centromeres might represent a particular nuclear environment that favors transcriptional events occurring during the initiation of reactivation. Undergoing work should bring evidence to support such a hypothesis. More generally, the literature provides several examples of cellular genomic DNA being localized next to and regulated by the centromeric nuclear environment, and viral genomes are likely to be similarly controlled.

Acknowledgments: We thank S. Efstathiou for reagents; H. Masumoto and S. Khochbin for helpful discussion, L. Francelle, and N. Ahmar for technical support. This work was funded by the CNRS (ATIP program to PL), ANR (grant ANR-05-MIIM-008-01, CENTROLAT) FINOVI foundation, ARC (grants 7979 and 4910), Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC), INCa (EIPRO program). SG was supported by the French Ministry for Education and Research and the FRM foundation. FC and PL are CNRS fellows.

Materials & methods.

Virus strains. Wild-type HSV-1 strain SC16 (Hill et al., 1975) was used. Stocks were generated in rabbit skin cell (RSC) monolayers and the viral titers were determined as previously described (Labetoulle et al., 2003).

Mice and virus inoculation. Virus inoculation and animal care were as previously described (Maillet et al., 2006). Briefly, six-week-old inbred female BALB/c mice (Janvier Breeding, Le Genest Saint Ile, France), were inoculated with 10^6 PFU of the SC16 virus, injected into the upper-left lip of the mice. Mice were observed daily for clinical signs of ocular infection from 0 to 28 days post-inoculation (dpi). All animal experiments have been performed in compliance with our institutional and national guidelines, in accordance with the European Community Council Directive 86/609/EEC.

Frozen sections. Frozen sections of mouse TG were performed as previously described (Labetoulle et al., 2003). Mice were anesthetized at 6 or 28 dpi, and before tissue dissection, mice were perfused intracardially with a solution of 4% formaldehyde, 20% sucrose in 1X PBS. The whole head or individual TG were prepared as previously described, and 10 μ m frontal sections were collected in three parallel series, and stored at -80°C .

DNA-FISH. DNA-FISH probes for telomeres were LNA-oligonucleotides directly labeled with fluorochromes as previously described (Draskovic et al., 2009). For centromeric minor satellite, centromeric DNA was amplified by PCR using the following primers (MS 24C, 5'-ACTCATCTAATATGTTCTACAGTG-3'; MS box 1, 5'-AAAACACATTCGTTGGAAACGGG-3') (Ikeno et al., 1998). For HSV-1 probes, cosmids 14, 28 and 56 (Cunningham and Davison, 1993) comprising a total of ~ 90 kb of HSV-1 genome (see Fig. 3A) were produced. All probes were labeled by Nick translation (Roche Diagnostic) with dCTP-Cy3 or biotin-11-dUTP (GE Healthcare), and stored in 100% formamid (Sigma-Aldrich). DNA-FISH procedure was adapted from Solovei I. et al. (Solovei et al., 2007). Frozen sections stored at -80°C were thawed, rehydrated in 1X PBS and permeabilized in 0,5% Triton X-100. Heat based unmasking was performed in 100mM citrate buffer, and sections were post-fixed using a standard methanol / acetic acid procedure, and dried for 10min at RT. DNA denaturation of section and probe was performed for 5min at 80°C , and hybridization was carried out overnight at 37°C . Hybridization mix contained 30ng of each probe in 10% dextran, 1X denhardt, 2XSSC, 50% formamid. Sections were washed 3x10min in 2XSSC and 3x10min in 0.2XSSC at 37°C , and nuclei were stained with Hoechst 33238 or ToPro3 (Invitrogen). All sections were mounted under coverslip using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) and stored at $+4^{\circ}\text{C}$ until observation.

Immuno-DNA FISH. Frozen sections were treated as described above up to the unmasking step. Tissues were then incubated for 24h with the primary antibody anti-mouse CENP-A (Cell Signaling Technology) at 1/100 dilution in PBS containing 3% FBS. After 3 washes, the secondary antibody was applied for 1h at 1/200 dilution. Secondary antibodies were AlexaFluor conjugated (Invitrogen). Following immuno-staining, tissues were post-fixed in PFA, and DNA-FISH was carried out from the methanol / acetic acid step.

Dual RNA/DNA-FISH. RNA FISH was performed as described previously (3). Biotinylated single-strand RNA probes were prepared by *in vitro* transcription (Ambion) using plasmids pSLAT-4 and pSLAT-5 as template (see Fig.3A) (Kind gift of S. Efsthathiou, University of Cambridge, UK). Frozen sections were treated as described for the DNA-FISH up to the unmasking step, using solutions containing 2mM RVC (Ribonucleoside vanadyl complex, Euromedex). Sections were pre-hybridized in 50% formamid/2XSSC at 65°C for at least 1h. 50ng of RNA probe in 50% formamide, 2XSSC, 10% dextran, 1X Denhardt (hybridization mix), were denatured 10min at 70°C, before being applied to the sections. Hybridization was carried out at 65°C. Sections were washed twice 10min with 50% formamide/2X SSC, and twice 10min with 2XSSC. Detection was performed using TSATM technology (Invitrogen) coupled to an AlexaFluor 350 dye, according to manufacturer guidelines. DNA-FISH procedure followed starting from the methanol / acetic acid post-fixation step.

Microscopy and imaging. Observations and most images were collected on an inverted CellObserver (Zeiss), using a PlanApochromat x100 N.A. 1.4 objective and a CoolSnap HQ2 from Molecular Dynamics (Ropper Scientific). Images were collected as Z-stacks spanning the entire thickness of the neuron, and Z-projected using ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U.S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://imagej.nih.gov/ij/>). When indicated, confocal images were collected on a Zeiss LSM 510 using a PlanApochromat x63 N.A. 1.4 objective, except for figure 2E collected on a Zeiss LSM 780.

Legend to figures

Figure 1. Centromeres are not destabilized in HSV-1 infected neurons during latency.

A, Mice were infected with HSV-1 SC16 strain at the lip and sacrificed 6 days post-infection (dpi) corresponding to the acute phase of latency establishment. TG frozen section were prepared and stained by immuno-DNA-FISH for the detection of HSV-1 genome and CENP-

A. The images show neurons containing the two types of HSV-1 pattern found during acute phase. The right image shows HSV-1 in a pattern similar to replicative cycle. Boxed areas are enlarged in insets. **B**, Same experiment as above. Image shows infected neurons in a brain section. Note that in all cases, CENP-A signal is similar to non-infected neurons. **C**. Mice have been infected as above, and sacrificed at 28dpi, i.e. during latency. TG sections were processed identically, for the detection of HSV-1 genome and CENP-A. Scale bar is $5\mu\text{m}$.

Figure 2. HSV-1 genomes associate with centromeres during latency.

A, Colocalisation of HSV-1 genomes with telomeres and centromeres. TG sections of latently infected mice (28dpi) were stained by dual color FISH for the co-detection of HSV-1 genome and telomeres or centromeres. The boxed areas show single channel images. Arrowheads show HSV-1 signal perfectly co-localizing with minor satellite signal. Scale bar = $5\mu\text{m}$. **B**, Occurrence of association of HSV-1 genomes with centromeres or with pericentromeres only, i.e. genomes presents at the surface of pericentromeres that did not associate with centromeres. With the increase in HSV-1 spot density (single <less than 10 spots <more than 10 spots), we observed an increase in centromere association but no increase of pericentromere association. **C-D**. TG sections of latently infected mice (28dpi) were stained by immuno-FISH for the co-detection of HSV-1 genome and CENP-A protein. The images show that several of HSV-1 genome spots perfectly co-localize with CENP-A signal, at the surface of pericentromeres. Scale bar = $5\mu\text{m}$.

Figure 3. Centromeres prevents HSV-1 LAT expression.

A, Schematic representation of HSV-1 genome and the Latency Associated Transcript locus. LAT is transcribed as a 8.3kb unstable primary transcript, and spliced. The 2kb-LAT RNA intron remains as a stable lariat in the neuron nucleus, and is a marker of HSV-1 latency. The RNA and DNA-FISH probes used in this study are indicated in grey. **B**, Detection of HSV-1 genomes and the stable 2kb-LAT RNA by RNA/DNA-FISH, in latently infected mouse TG sections. The nucleus is depicted as a dashed line. Scale bar is $5\mu\text{m}$. **C**, Quantification of neurons expressing 2kb-LAT within populations of neurons containing HSV-1 genome in single and multiple patterns. $n=2$ mice. **D**, TG sections of latently infected mice were subjected to a triple labeling for the co-detection of HSV-1 genome, nascent 8.3kb-LAT RNA, centromeric minor satellite. The boxed area enlarged in single channel in the inset shows HSV-1 genomes associated with the nascent 8.3kb-LAT RNA but not with centromeres. Conversely the centromere associated HSV-1 genomes are not associated with the 8.3kb-

LAT RNA. This image is representative of the mutually exclusive association of HSV-1 genome with either the 8.3kb LAT-RNA or the minor satellite sequences.

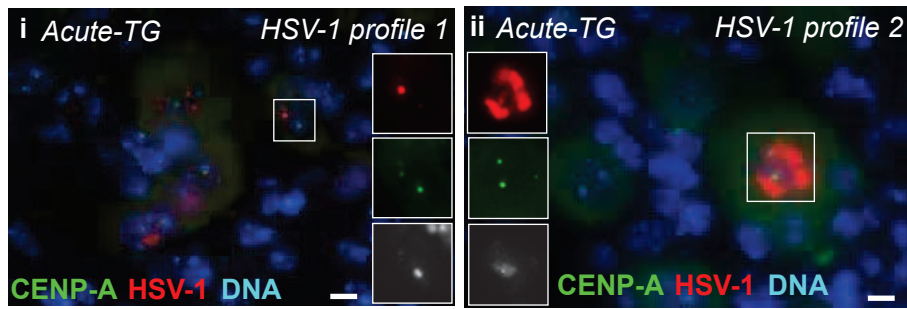
References

- Baxter, J., Merkenschlager, M., and Fisher, A. G. (2002). Nuclear organisation and gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 372–376.
- Bernardi, R., and Pandolfi, P. P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature reviews* *8*, 1006–1016.
- Bishop, C. L., Ramalho, M., Nadkarni, N., May Kong, W., Higgins, C. F., and Krauzewicz, N. (2006). Role for centromeric heterochromatin and PML nuclear bodies in the cellular response to foreign DNA. *Molecular and cellular biology* *26*, 2583–2594.
- Bloom, D. C., Giordani, N. V., and Kwiatkowski, D. L. (2010). Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochimica et biophysica acta* *1799*, 246–256.
- Brown, K. E., Guest, S. S., Smale, S. T., Hahm, K., Merkenschlager, M., and Fisher, A. G. (1997). Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* *91*, 845–854.
- Brown, K. E., Baxter, J., Graf, D., Merkenschlager, M., and Fisher, A. G. (1999). Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Molecular cell* *3*, 207–217.
- Brown, K. E., Amoils, S., Horn, J. M., Buckle, V. J., Higgs, D. R., Merkenschlager, M., and Fisher, A. G. (2001). Expression of alpha- and beta-globin genes occurs within different nuclear domains in haemopoietic cells. *Nature cell biology* *3*, 602–606.
- Cammas, F., Oulad-Abdelghani, M., Vonesch, J. L., Huss-Garcia, Y., Chambon, P., and Losson, R. (2002). Cell differentiation induces TIF1beta association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *Journal of cell science* *115*, 3439–3448.
- Catez, F., Picard, C., Held, K., Gross, S., Rousseau, A., Theil, D., Sawtell, N., Labetoulle, M., and Lomonte, P. PML/PML-nuclear bodies are transcriptional repressors of herpesvirus-associated non-coding RNA. Submitted
- Chen, X. P., Li, J., Mata, M., Goss, J., Wolfe, D., Glorioso, J. C., and Fink, D. J. (2000). Herpes simplex virus type 1 ICP0 protein does not accumulate in the nucleus of primary neurons in culture. *J. Virol.* *74*, 10132–10141.
- Ching, R. W., Dellaire, G., Eskiw, C. H., and Bazett-Jones, D. P. (2005). PML bodies: a meeting place for genomic loci? *Journal of cell science* *118*, 847–854.
- Cunningham, C., and Davison, A. J. (1993). A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology* *197*, 116–124.
- Devi-Rao, G. B., Goodart, S. A., Hecht, L. M., Rochford, R., Rice, M. K., and Wagner, E. K. (1991). Relationship between polyadenylated and nonpolyadenylated herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts. *J. Virol.* *65*, 2179–2190.
- Dillon, N., and Festenstein, R. (2002). Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet* *18*, 252–258.
- Dobson, A. T., Sederati, F., Devi-Rao, G., Flanagan, W. M., Farrell, M. J., Stevens, J. G., Wagner, E. K., and Feldman, L. T. (1989). Identification of the latency-associated transcript promoter by expression of rabbit beta-globin mRNA in mouse sensory nerve ganglia latently infected with a recombinant herpes simplex virus. *J. Virol.* *63*, 3844–3851.
- Draskovic, I., Arnoult, N., Steiner, V., Bacchetti, S., LOMONTE, P., and Londoño-Vallejo, A. (2009). Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 15726–15731.
- Elgin, S. C., and Grewal, S. I. (2003). Heterochromatin: silence is golden. *Curr. Biol.* *13*, R895–8.
- Everett, R. D., Boutell, C., and Orr, A. (2004). Phenotype of a herpes simplex virus type 1 mutant that fails to express immediate-early regulatory protein ICP0. *J. Virol.* *78*, 1763–1774.
- Everett, R. D., Earnshaw, W. C., Findlay, J., and Lomonte, P. (1999). Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110. *The EMBO journal* *18*, 1526–38.
- Farrell, M. J., Dobson, A. T., and Feldman, L. T. (1991). Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 790–794.

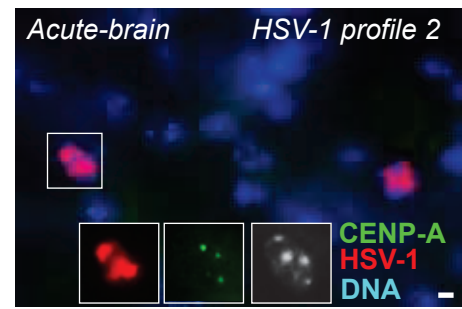
- Fisher, A. G., and Merckenschlager, M. (2002). Gene silencing, cell fate and nuclear organisation. *Current opinion in genetics & development* 12, 193–197.
- Foltz, D. R., Jansen, L. E., Black, B. E., Bailey, A. O., Yates, J. R. 3., and Cleveland, D. W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nature cell biology* 8, 458–469.
- Francastel, C., Walters, M. C., Groudine, M., and Martin, D. I. (1999). A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. *Cell* 99, 259–269.
- Francastel, C., Magis, W., and Groudine, M. (2001). Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12120–12125.
- Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2, 162–174.
- Guasconi, V., Pritchard, L.-L., Fritsch, L., Mesner, L. D., Francastel, C., Harel-Bellan, A., and Ait-Si-Ali, S. (2010). Preferential association of irreversibly silenced E2F-target genes with pericentromeric heterochromatin in differentiated muscle cells. *Epigenetics* 5, 704–709.
- Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C., and Almouzni, G. (2004). Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J. Cell Biol.* 166, 493–505.
- Halford, W. P., and Schaffer, P. A. (2001). ICP0 is required for efficient reactivation of herpes simplex virus type 1 from neuronal latency. *J. Virol.* 75, 3240–9.
- Harris, R. A., Everett, R. D., Zhu, X. X., Silverstein, S., and Preston, C. M. (1989). Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 reactivates latent herpes simplex virus type 2 in an in vitro latency system. *J. Virol.* 63, 3513–5.
- Hill, T. J., Field, H. J., and Blyth, W. A. (1975). Acute and recurrent infection with herpes simplex virus in the mouse: a model for studying latency and recurrent disease. *The Journal of general virology* 28, 341–353.
- Hsu, W. L., and Everett, R. D. (2001). Human neuron-committed teratocarcinoma NT2 cell line has abnormal ND10 structures and is poorly infected by herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 75, 3819–3831.
- Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., Nakano, M., Saitoh, K., Hoshino, H., McGill, N. I., Cooke, H., and Masumoto, H. (1998). Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat Biotechnol* 16, 431–439.
- Jurak, I., Kramer, M. F., Mellor, J. C., van Lint, A. L., Roth, F. P., Knipe, D. M., and Coen, D. M. (2010). Numerous conserved and divergent microRNAs expressed by herpes simplex viruses 1 and 2. *J. Virol.* 84, 4659–4672.
- Labetoulle, M., Maillet, S., Efstathiou, S., Dezelee, S., Frau, E., and Lafay, F. (2003). HSV1 latency sites after inoculation in the lip: assessment of their localization and connections to the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 217–225.
- Lomonte P, Sullivan KF, Everett RD. (2000). Degradation of Nucleosome-associated Centromeric Histone H3-like Protein CENP-A Induced by Herpes Simplex Virus Type 1 Protein ICP0. *Journal of Biological Chemistry* 276, 5829–5835.
- Lomonte, P., and Everett, R. D. (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, 9456–67.
- Lomonte, P., and Morency, E. (2007). Centromeric protein CENP-B proteasomal degradation induced by the viral protein ICP0. *FEBS Lett.* 581, 658–662.
- Maillet, S., Naas, T., Crepin, S., Roque-Afonso, A. M., Lafay, F., Efstathiou, S., and Labetoulle, M. (2006). Herpes simplex virus type 1 latently infected neurons differentially express latency-associated and ICP0 transcripts. *J. Virol.* 80, 9310–9321.
- Manuelidis, L. (1984). Different central nervous system cell types display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 3123–3127.
- Matsuda, E., Agata, Y., Sugai, M., Katakai, T., Gonda, H., and Shimizu, A. (2001). Targeting of Kruppel-associated box-containing zinc finger proteins to centromeric heterochromatin. Implication for the gene silencing mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 276, 14222–14229.
- Mehta, A., Maggioncalda, J., Bagasra, O., Thikkavapuru, S., Saikumari, P., Valyi-Nagy, T., Fraser, N. W., and Block, T. M. (1995). In situ DNA PCR and RNA hybridization detection of herpes simplex virus sequences in trigeminal ganglia of latently infected mice. *Virology* 206, 633–640.
- Merckenschlager, M., Amoils, S., Roldan, E., Rahemtulla, A., O'Connor, E., Fisher, A. G., and Brown,

- K. E. (2004). Centromeric repositioning of coreceptor loci predicts their stable silencing and the CD4/CD8 lineage choice. *The Journal of experimental medicine* *200*, 1437–1444.
- Misteli, T. (2005). Concepts in nuclear architecture. *Bioessays* *27*, 477–487.
- Mitchell, W. J., Lirette, R. P., and Fraser, N. W. (1990). Mapping of low abundance latency-associated RNA in the trigeminal ganglia of mice latently infected with herpes simplex virus type 1. *The Journal of general virology* *71* (Pt 1), 125–132.
- Monier, K., Armas, J. C., Etteldorf, S., Ghazal, P., and Sullivan, K. F. (2000). Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nature cell biology* *2*, 661–665.
- Okada, M., Cheeseman, I. M., Hori, T., Okawa, K., McLeod, I. X., Yates, J. R. 3., Desai, A., and Fukagawa, T. (2006). The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nature cell biology* *8*, 446–457.
- Preston, C. M. (2000). Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *The Journal of general virology* *81 Pt 1*, 1–19.
- Proenca, J. T., Coleman, H. M., Nicoll, M. P., Connor, V., Preston, C. M., Arthur, J., and Efsthathiou, S. (2011). An investigation of HSV promoter activity compatible with latency establishment reveals VP16 independent activation of HSV immediate early promoters in sensory neurones. *The Journal of general virology*.
- Russell, J., Stow, N. D., Stow, E. C., and Preston, C. M. (1987). Herpes simplex virus genes involved in latency in vitro. *The Journal of general virology* *68* (Pt 12), 3009–3018.
- Sawtell, N. M. (1997). Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. *J. Virol.* *71*, 5423–5431.
- Schang, L. M., Rosenberg, A., and Schaffer, P. A. (2000). Roscovitine, a specific inhibitor of cellular cyclin-dependent kinases, inhibits herpes simplex virus DNA synthesis in the presence of viral early proteins. *J. Virol.* *74*, 2107–2120.
- Schubeler, D., Francastel, C., Cimbara, D. M., Reik, A., Martin, D. I., and Groudine, M. (2000). Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes & development* *14*, 940–950.
- Sexton, T., Schober, H., Fraser, P., and Gasser, S. M. (2007). Gene regulation through nuclear organization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 1049–1055.
- Solovei, I., Grasser, F., and Lanctôt, C. (2007). FISH on Histological Sections. *CSH Protoc* *2007*, pdb.prot4729.
- Spector, D. L. (2003). The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev Biochem* *72*, 573–608.
- Stevens, J. G., Wagner, E. K., Devi-Rao, G. B., Cook, M. L., and Feldman, L. T. (1987). RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science (New York, N.Y)* *235*, 1056–1059.
- Terranova, R., Sauer, S., Merckenschlager, M., and Fisher, A. G. (2005). The reorganisation of constitutive heterochromatin in differentiating muscle requires HDAC activity. *Experimental cell research* *310*, 344–356.
- Thompson, R. L., Shieh, M. T., and Sawtell, N. M. (2003). Analysis of herpes simplex virus ICP0 promoter function in sensory neurons during acute infection, establishment of latency, and reactivation in vivo. *J. Virol.* *77*, 12319–12330.
- Umbach, J. L., Kramer, M. F., Jurak, I., Karnowski, H. W., Coen, D. M., and Cullen, B. R. (2008). MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* *454*, 780–783.
- Wagner, E. K., Devi-Rao, G., Feldman, L. T., Dobson, A. T., Zhang, Y. F., Flanagan, W. M., and Stevens, J. G. (1988a). Physical characterization of the herpes simplex virus latency-associated transcript in neurons. *J. Virol.* *62*, 1194–1202.
- Wagner, E. K., Flanagan, W. M., Devi-Rao, G., Zhang, Y. F., Hill, J. M., Anderson, K. P., and Stevens, J. G. (1988b). The herpes simplex virus latency-associated transcript is spliced during the latent phase of infection. *J. Virol.* *62*, 4577–4585.
- Wagner, E. K., and Bloom, D. C. (1997). Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clin Microbiol Rev* *10*, 419–43.
- Zwaagstra, J. C., Ghiasi, H., Slanina, S. M., Nesburn, A. B., Wheatley, S. C., Lillycrop, K., Wood, J., Latchman, D. S., Patel, K., and Wechsler, S. L. (1990). Activity of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) promoter in neuron-derived cells: evidence for neuron specificity and for a large LAT transcript. *J. Virol.* *64*, 5019–5028.

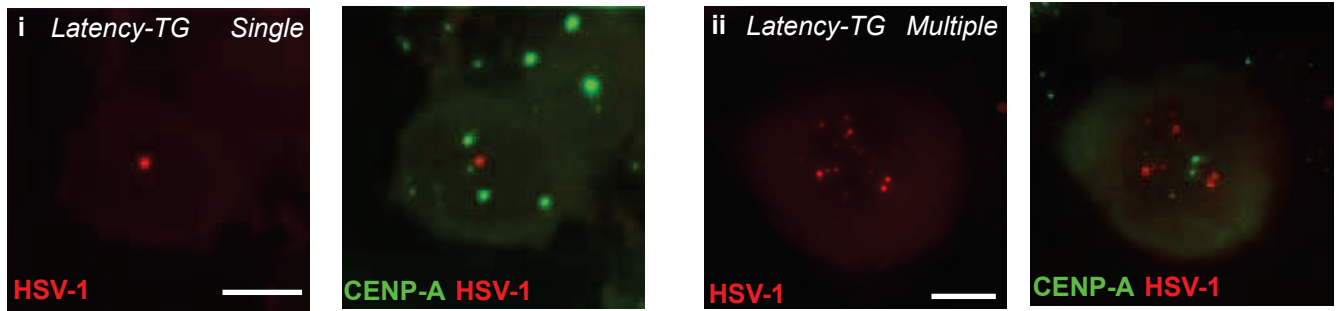
A.



B.



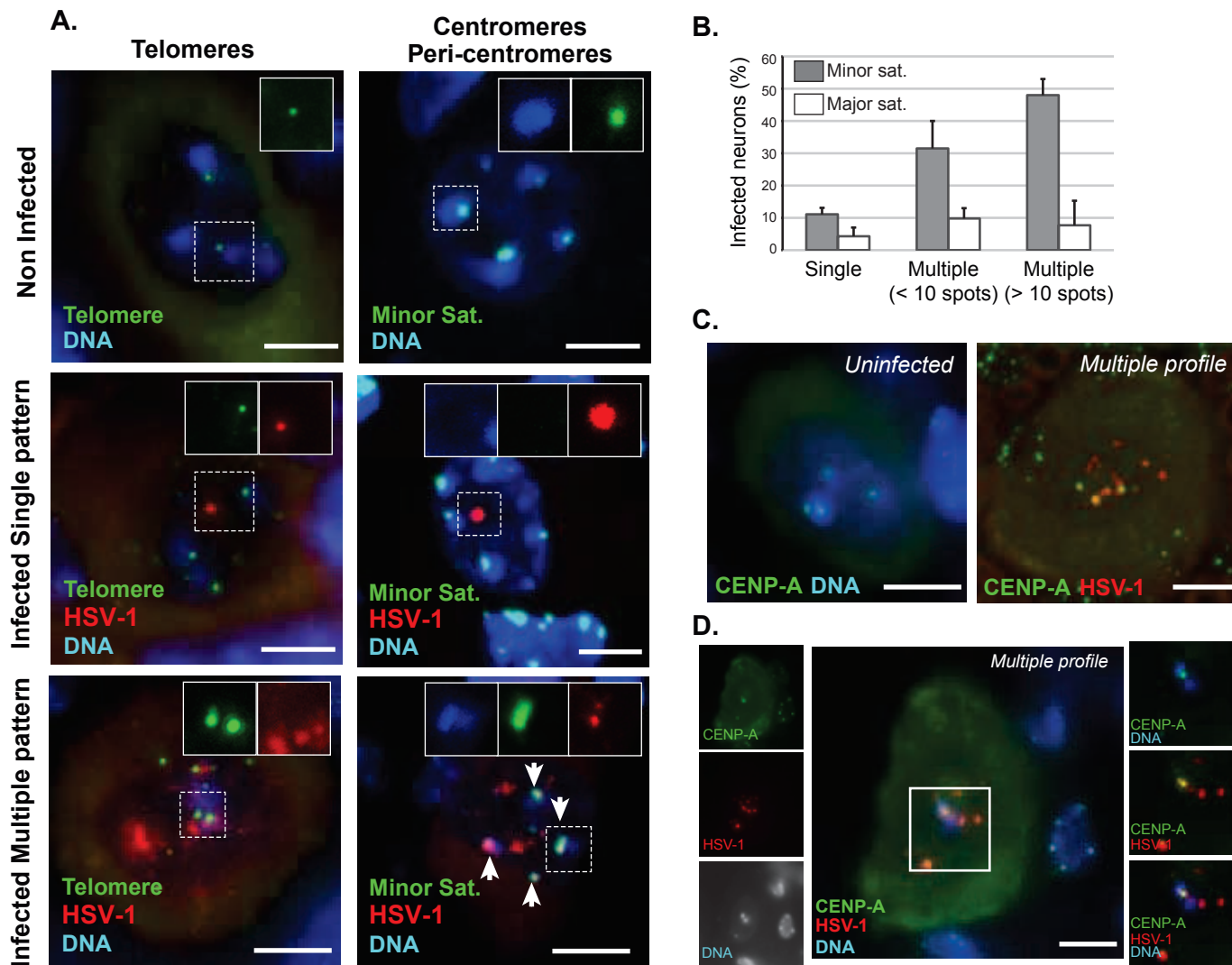
C.



Catez et al.

Figure 1.

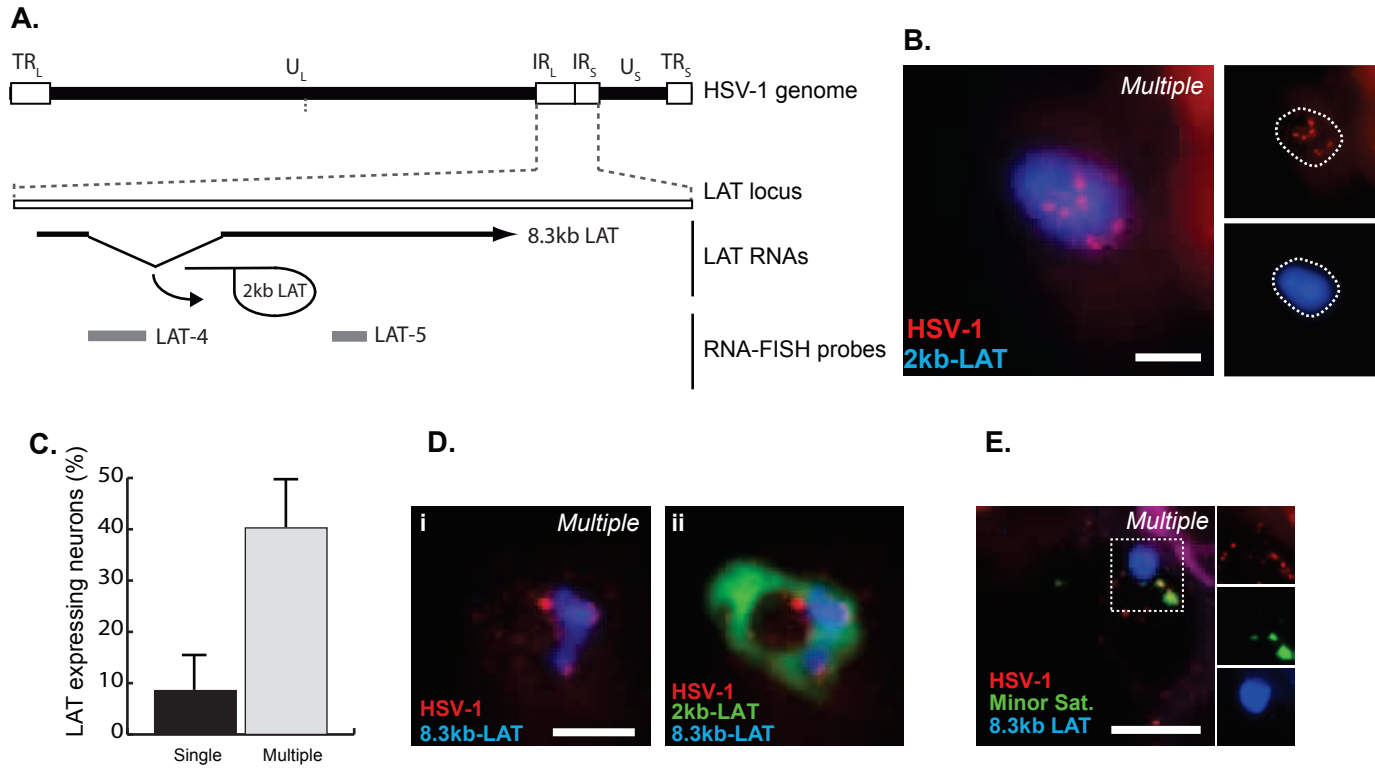
Centromeres are not destabilized in HSV-1 infected neurons during latency



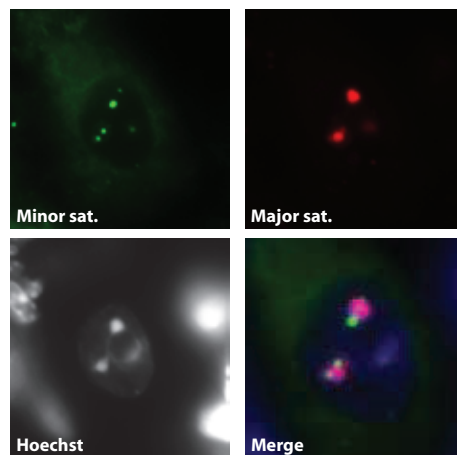
Catez et al.

Figure 2.

HSV-1 genomes associate with centromeres during latency



Catez et al.
Figure 3.
 Centromeres prevent HSV-1 LAT expression



Intranuclear organization of centromeres and pericentromeres in mouse neuronal tissues.

Centromeres and pericentromeres were detected by DNA FISH using probes specific for respectively the minor and major satellite sequences (Ikeno et al. 1998. *Nat. Biotechnol* 16 (5) 431-439). Illustration of the organization of pericentromeres and centromeres in neurons of TGs. Pericentromeres (major sat.) of several chromosomes aggregate into 2 to 5 clusters, that are frequently found next to the nucleolus. Centromeres (minor sat.) are located at the surface of the pericentromeres. This organisation is similar to the one previously described in cultured cells (Guenatri et al. 2004), and the number and organisation of pericentromeric aggregates are consistent with previous studies (Manuelidis and Borden, *Chromosoma* 1988).

Catez et al.
Supplemental Figure S1.

Discussion Générale et Conclusion

DISCUSSION GENERALE

Chromosomes artificiels et identité centromérique

Les résultats obtenus sur les HACs montrent plusieurs choses. Premièrement, qu'ICP0, non seulement cible une structure artificielle ayant les propriétés des centromères endogènes, mais qu'en plus cette activité d'ICP0 sur les HACs a du sens du point de vue biologique, car la cellule est capable d'y répondre, via l'iCDR, tout comme sur les centromères endogènes. Deuxièmement, que la réponse iCDR peut cibler une structure artificielle possédant certains constituants de l'identité centromérique tels que les protéines CENPs et les séquences alphanucléotidiques. Cette réponse semble donc bel et bien spécifique des centromères. Troisièmement, le fait que seul 20% des cellules exprimant ICP0 montrent une iCDR sur le HAC est à rapprocher des 20% de cellules qui montrent une diminution de CENP-B. En effet, Morency et al (Morency, Sabra, et al. 2007) ont montré que la disparition de CENP-B pourrait être impliquée dans le déclenchement de l'iCDR. Ces résultats sont également confirmés dans une étude récente de l'équipe (El Maalouf et al. résultats non publiés). Les HACs semblent donc également confirmer cette hypothèse. Il est cependant techniquement compliqué de montrer dans la même cellule la présence d'ICP0, la diminution de CENP-B, le marquage iCDR via la coïline par exemple et le marquage HAC par FISH.

Le fait qu'ICP0 se relocalise sur le HAC, qui est composé essentiellement de chromatine et de protéines centromériques, indique que c'est la présence d'au moins un de ces 2 constituants qui est responsable de l'attraction d'ICP0 aux centromères. La chromatine, les protéines CENPs, font partie de ce que l'on peut définir sous le terme d'identité centromérique. L'accumulation d'ICP0 aux centromères est donc la conséquence directe de la présence de ces 2 constituants de l'identité centromérique et n'est donc pas le résultat d'un processus aléatoire qui fait qu'ICP0, de part son expression importante, se verrait relocalisée par hasard au niveau des centromères. Cela dit la présence d'ICP0 sur les HACs ne dépend sûrement pas uniquement de la présence de ces deux constituants, qui sont nécessaires mais pas suffisants à la localisation d'ICP0 aux centromères.

Un autre argument allant dans le sens qu'ICP0 ne se localise donc pas aux centromères par hasard vient d'expériences réalisées au sein de notre équipe. Il a été montré que dans des neurones infectés en latence qu'une fraction significative de génomes d'HSV-1 co-localisait avec les centromères (voir résultats chapitre 3). Le génome viral de façon similaire à ICP0,

semble donc également être attiré par le centromère. Qui est l'instigateur de cette attraction, la cellule ou le virus ? C'est une question passionnante qui est une des thématiques principales de l'équipe. Je discuterai de cet aspect ultérieurement.

La localisation d'ICP0 sur le HAC montre que celui-ci peut être utilisé en tant qu'outil fiable dans la compréhension des activités d'ICP0 car même si ICP0 est la seule protéine que nous ayons détectée dessus, qu'en est-il des autres protéines transactivatrices d'HSV-1, telle que VP16 ? En effet, il a été montré par exemple que VP16 jouait un rôle très important dans la sortie de la phase de latence (Thompson, Preston, et Sawtell 2009). Est-il possible qu'elle se relocalise également sur le HAC ? Pour réaliser une telle étude, il faudrait construire tout d'abord un modèle cellulaire de latence virale (quiescence) dans des cellules qui contiennent également un HAC, ce qui n'existe pas encore. Dans un premier temps, le devenir du HAC dans un tel modèle serait analysé (co-localise-t-il avec les génomes viraux ?) ce qui permettrait de savoir si c'est uniquement grâce aux centromères que le génome d'HSV-1 se dirige sur eux ou si il y a d'autres régions chromosomiques par exemple les péricentromères, impliquées dans le repositionnement du génome d'HSV-1 sur les centromères. Ensuite, il serait alors possible de déterminer quels sont les éléments nécessaires à la présence de chaque protéine virale sur le HAC lors d'un processus de réactivation, de manière à établir une cinétique d'apparition des différents transactivateurs viraux sur le HAC.

Un autre résultat très important est la capacité d'ICP0 à induire l'iCDR sur les HACs car ceci permet donc d'envisager d'utiliser les chromosomes artificiels comme modèle d'étude de l'iCDR. Une étude intéressante à réaliser qui serait dans la continuité de mon projet de thèse concernant la déstabilisation des centromères par ICP0 serait la suivante :

Dans des cellules exprimant à la fois un HAC et la protéine ICP0 de manière inductible, il serait envisageable d'étudier de la même façon qu'au cours de ma thèse (mêmes techniques d'Immuno-FISH, de Micrococcal Nuclease (MNase), de Southern Blot, et d'Immunoprécipitation de chromatine combinée à de la PCR quantitative), non seulement la déstabilisation du chromosome artificiel mais également sa reformation. Il faudrait d'abord construire des cellules contenant le chromosome artificiel et le système d'induction d'ICP0 à la tétracycline. Les cellules seraient premièrement synchronisées, puis l'expression d'ICP0 serait induite en phase G1/S, pour ensuite vérifier la reformation du centromère en phase S/G2 du centromère. Si c'est le cas, les cellules devraient avoir passé la phase de mitose correctement. Cette étude permettrait d'en savoir plus sur la capacité des différentes protéines intervenant dans la iCDR de participer à la reformation d'un HAC, et de manière

extrapolable, du centromère endommagé. Ce genre d'études nous informerait sur l'implication de l'iCDR dans la reformation d'un centromère fonctionnel (capable d'assembler le kinétochore et de permettre la ségrégation du HAC) qui a été déstabilisé par ICP0.

L'iCDR détectée sur les HACs n'implique pas la protéine SMN. Ceci pourrait être dû à l'absence sur le HAC de la modification épigénétique qui pourrait attirer SMN sur la chromatine centromérique endogène (Sabra et al. article en préparation). Le fait que SMN ne se relocalise pas sur le HAC peut cependant être considéré comme un avantage car nous sommes donc en la possession d'un modèle unique pour étudier les éléments responsables de la relocalisation de la protéine SMN sur les centromères endommagés, en utilisant comparativement les centromères endogènes, sur lesquels SMN va se relocaliser et les HACs.

Un résultat obtenu au cours de ma thèse concerne la présence de la protéine CENP-I sur les HACs, ce qui n'avait jamais été montré. Ceci veut dire qu'une protéine du complexe CAD (CENP-A Distal Complex), donc la couche de protéines externes, est présente sur le HAC. On peut penser que si CENP-I est présente, les autres protéines du complexe le seront. D'autre part, le complexe CENP-H-I serait nécessaire à la localisation, sur les centromères, de la protéine CENP-A nouvellement synthétisée (Masahiro Okada et al. 2006). La protéine CENP-I donc une protéine qui servirait de point de repère pour une localisation correcte du centromère sur les chromosomes. La présence de CENP-I sur ce HAC étant conservée, il serait intéressant de vérifier si CENP-A se localise sur le HAC grâce à CENP-I, par exemple par des études d'inactivation de CENP-I par siRNA. CENP-I est également nécessaire à la présence de différentes protéines du kinétochore pendant la mitose (Song-Tao Liu et al. 2003). Le kinétochore sera donc susceptible de s'assembler sur la plateforme protéique centromérique pendant la mitose et ainsi d'accueillir les microtubules lors de la ségrégation du HAC. Ceci explique donc pourquoi les HAC ségrégent de la même façon que les chromosomes endogènes (Tsuduki et al. 2006).

Déstabilisation de structures protéiques et chromatinienne des centromères par ICP0

Déstabilisation des NAC et CAD

L'étude de la déstabilisation des protéines du NAC et du CAD par ICP0 vient compléter les études pionnières concernant la déstabilisation des protéines CENP-A, -B et -C par cette même protéine (R D Everett, Earnshaw, et al. 1999), (P Lomonte, Sullivan, et R D Everett 2001), (Patrick Lomonte et Morency 2007). Il s'agit d'un développement intéressant sur l'effet d'ICP0 sur l'architecture protéique des centromères. L'idée que l'on peut se faire lorsque l'on analyse les résultats concernant les protéines est que le virus « cherche » à se faire une brèche, voire même une ouverture complète pour pénétrer à l'intérieur même de la structure du centromère. Beaucoup des protéines du NAC et du CAD jouent un rôle dans l'établissement du kinétochore fonctionnel et d'une bonne ségrégation des chromatides sœurs lors de la division cellulaire. Il n'est donc pas étonnant de constater que lorsque les cellules sont infectées par un virus sauvage, elles se retrouvent souvent bloquées en pseudo-prométaphase, un phénotype similaire à celui obtenu dans des cellules où certaines protéines du NAC et CAD ont été inactivées par siRNA, comme par exemple CENP-A, CENP-M, CENP-T (Foltz et al. 2006) et CENP-H (Amaro et al. 2010). De plus il existe une interdépendance entre les protéines CENPs pour leur localisation centromérique, comme par exemple la structuration des complexes NAC et CAD, qui dépend de la présence de la protéine CENP-A (Foltz et al. 2006). Ce degré de complexité doit être pris en compte lorsque l'on analyse la disparition des CENPs médiée par ICP0. En effet, comment être sûr (pour les protéines dont la dégradation n'a pas été confirmée en WB) que la disparition d'une CENP du centromère soit induite par sa dégradation induite par ICP0 et non pas la conséquence de la disparition d'une autre protéine, importante dans la mise en place de la structure protéique centromérique, comme montré pour CENP-A, CENP-H, CENP-N (T Fukagawa et al. 2001) (Foltz et al. 2006) (Masahiro Okada et al. 2009), (Carroll, Milks, et Straight 2010). Cela dit, toutes les protéines testées en WB pour leur dégradation par ICP0 sont bien dégradées par l'activité E3 ubiquitine ligase d'ICP0. Nous pouvons donc fortement supposer qu'il en est de même pour toutes les protéines associées aux centromères.

Si nous devons analyser cinétiquement la déstructuration des centromères par ICP0, il serait intuitif de placer la destruction des protéines des CADs et NACs avant celle de la

chromatine. La première induirait la seconde, et la protéine CENP-A serait impliquée dans les deux, cette protéine faisant à la fois office d'histone et de CENP. Mais cette hypothèse demande à être confirmée par une analyse de microscopie en temps réel (time lapse), par exemple. En effet, même si cette hypothèse « extérieur vers intérieur » en cascade est tentante, nous pouvons également envisager un modèle dans lequel la protéine ICP0 induirait la dégradation des protéines CENPs et des protéines chromatiniennes, en colonisant simultanément les différentes couches de protéines. Cela dit vu la taille d'ICP0 (775aa, 110 kDa) il paraît plus raisonnable de penser que la déstabilisation des protéines des CADs et NACs se produit avant pour faire de l'espace à la protéine et la laisser progresser vers la chromatine.

Déstabilisation de la chromatine centromérique

L'analyse des données de digestion à la MNase dans les cellules infectées montre plusieurs choses. Premièrement, la vitesse de digestion de la chromatine totale (BET) est relativement stable entre les trois conditions, si ce n'est une légère augmentation de cette vitesse dans les deux conditions d'infections par rapport à la condition de non infection. Ceci veut dire qu'il existe un léger effet de l'infection sur la structure de la chromatine totale. Cet effet a déjà été décrit par K Conn et al. en utilisant d'autres méthodes d'analyses (Fluorescent Recovery After Photobleaching ou FRAP). Les auteurs ont montré que la structure générale de la chromatine cellulaire était désorganisée suite à l'infection par HSV-1, via une démobilisation plus importante des histones contenues dans cette chromatine dans les cellules infectées (Conn, Hendzel, et Schang 2008). Ceci pourrait être en lien avec une hypothèse couramment rependue au sein de la communauté de l'HSV-1 et qui est que le but de la désorganisation de la chromatine de l'hôte serait de recruter des histones pour nucléosomer le génome du virus, qui arrive nu dans la cellule hôte. Il s'agirait en fait d'un transfert d'histones des chromosomes de la cellule hôte vers le génome d'HSV-1 (Pour revue voir (Kutluay et Triezenberg 2009)). Chromatinisé, le génome viral serait ainsi moins vulnérable aux enzymes de dégradation de l'ADN nu et serait ainsi en mesure de se répliquer pour assurer la survie du virus. Deuxièmement, l'analyse spécifique de la chromatine centromérique montre qu'il existe dans les cellules infectées par le virus sauvage une augmentation significative (plus de 2X) de la vitesse de digestion de la chromatine par rapport aux cellules non infectées ou infectées par le virus dl1403. Troisièmement, on constate également et logiquement que les rapports Mononucléosomes/ BPM sont plus

importants dans les deux conditions d'infection par rapport à la condition non infectée et inversement que les rapports Dinucléosomes/ BPM sont plus faibles. Ceci étant logique vu que les formes mononucléosomiques sont issues de la digestion des formes dinucléosomiques. Ces résultats montrent donc que la digestion des séquences centromériques est plus rapide dans les cas d'infection par HSV-1, et plus spécifiquement en présence d'ICP0. Ceci suggère une modification chromatiniennne des centromères par ICP0, qui conduit à une accessibilité plus importante de cette chromatine.

Le processus d'infection est un processus complexe qui fait intervenir une multitude de protéines virales dont les activités sont souvent interdépendantes. Donc comment être sûr que ce soit bien la protéine ICP0 qui soit responsable de la déstructuration de la chromatine ? Pour répondre à cette question, nous avons un modèle de cellules humaines qui expriment de manière inductible la protéine ICP0 ou sa forme tronquée FXE (Cellules HeLa TR-FXE ou TR-ICP0). Nous avons utilisé ces cellules de la même façon que les cellules HeLa pour des tests de digestion à la MNase. Les résultats obtenus montrent que c'est uniquement dans la condition où ICP0 est exprimée (et pas lorsque la protéine FXE mutante est exprimée) que la chromatine centromérique est déstabilisée significativement (vitesse de digestion 2X plus importante par rapport aux cellules contrôles qui n'expriment pas ICP0). En effet, l'accumulation des différentes formes nucléosomiques de bas poids moléculaires, pour un même temps donné, est plus importante lorsqu'ICP0 est exprimée. De même, l'accumulation des mono et dinucléosomes au cours du temps est plus importante, toujours dans cette condition, et finalement, la vitesse de digestion de la chromatine, calculée grâce aux rapports mono/dinucléosomes est plus importante dans cette condition pour les temps 30 et 50 minutes, notamment. Ces résultats indiquent bien que c'est uniquement la protéine ICP0 qui est responsable de la déstabilisation de la chromatine centromérique.

Implications des résultats dans le contexte viral

ICP0 induit la dégradation via le protéasome des protéines CENP-A,-B,-C,-H-I et -N (résultats de WB) et la disparition des protéines CENP-O,-P,-Q,-M (Résultats d'IF). La raison de cette dégradation massive n'est pas connue et ICP0 est l'unique exemple d'une protéine virale induisant une telle déstructuration. Comme indiqué précédemment, la déstabilisation des protéines centromériques peut être expliquée par le fait que le virus se fasse une brèche

dans la structure protéique des centromères pour ainsi atteindre la chromatine centromérique, pour des raisons qui seront discutées plus tard.

La découverte de la déstructuration de la chromatine par ICP0 est un grand pas en avant dans le domaine d'étude de l'interaction entre les virus et la cellule hôte. Un argument qui corrobore cette déstabilisation de la chromatine centromérique par HSV-1 vient d'une étude relativement ancienne qui a montré que les séquences alphas centromériques étaient plus propices à la recombinaison lorsque les cellules étaient infectées par HSV-1 que lorsqu'elles ne l'étaient pas (Hwang et Shillito 1991). Ces résultats suggéraient que les séquences alphas étaient plus accessibles à la machinerie de recombinaison dans les cellules infectées par HSV-1. Mon étude permet de mieux comprendre les raisons potentielles de cette meilleure recombinaison.

Le génome du virus HSV-1 est-il capable de s'intégrer dans celui des cellules hôtes ? Est-il possible que toute cette activité d'ICP0 ait pour seul et unique objectif de faire de la place au niveau des centromères pour y intégrer son génome. Sans protéines pour « barrer la route » au génome et avec une chromatine désorganisée, donc très accessible, une telle possibilité est envisageable. En effet, il a été montré que les génomes des virus herpétiques MDV (Marek's disease virus) et HHV-6 (human herpesvirus 6) étaient capables de s'intégrer au niveau des régions télomériques (Kaufer, Jarosinski, et Osterrieder 2011). Il n'est donc pas impossible que le virus HSV-1 puisse s'intégrer au niveau de régions répétées, peut-être centromériques. Le virus pourrait de cette manière se défendre d'un éventuel mécanisme antiviral impliquant les centromères, en détruisant ces structures, et en s'intégrant dans ces régions. J'aborderai la problématique de la répression centromérique induite sur le génome d'HSV-1 ultérieurement.

Un autre argument qui expliquerait une action d'ICP0 sur les centromères, est la présence aux centromères de petits ARN non codants. Il est admis que les ARNs non codants et notamment les siRNAs ont un rôle de défense antivirale chez les plantes, les insectes et même les mammifères (pour revues voir (van Rij et Andino 2006) (van Rij 2008)). Est-il possible d'envisager également un rôle des siRNAs qui seraient issus des centromères, dans la réponse antivirale anti-HSV-1 dans les cellules humaines ? Si c'était le cas cela pourrait expliquer un rôle d'ICP0 lors de l'infection lytique, car ce genre de réponse aurait sûrement lieu au tout début de l'infection. Cependant l'existence de ce type de siRNA chez les mammifères reste à prouver. Bien qu'il ait été démontré que de la transcription d'ARN non codant pouvait être associée aux centromères ((Bouzinba-Segard, Guais, et Claire Francastel 2006), (Ferri et al. 2009), (Angeline Eymery, Callanan, et Vourc'h 2009),

(Angéline Eymery et al. 2009)) la formation de siRNA à partir de ces transcrits reste à prouver définitivement (Tatsuo Fukagawa et al. 2004).

ICP0 possède plusieurs types d'activités, notamment la déstabilisation des composants des corps PML (Roger D Everett et al. 2006) , la régulation de la protéine USP-7 (Canning et al. 2004), la régulation de différents complexes ou enzymes de modifications épigénétiques, comme Co-Rest (Roizman 2011) ou les HADCs (Lomonte et al. 2004). ICP0 régule l'expression de protéines impliquées dans la voie de défense immunitaire liée à l'IFN (Melroe et al. 2007), et elle régule également l'expression de p53 (Boutell et Roger D Everett 2003). Ces activités d'ICP0 jouent prioritairement un rôle pour contrecarrer la réponse cellulaire antivirale déclenchée dès les premières étapes de l'infection et sont à relier à l'échappement du virus de la réponse immunitaire IFN ou TLR dépendante. Il n'y a pour l'instant aucun élément qui permet de penser que l'activité déstabilisatrice des centromères fasse partie de ce type de réponses. En effet, nos résultats obtenus *in vivo*, dans les neurones infectés, montrent que l'infection n'a pas d'effet sur le devenir de la protéine CENP-A, et par conséquent sur la structure des centromères, que ce soit en phase lytique ou latente. Des transcrits d'ICP0 sont détectables dans ces cellules nerveuses. La non disparition de CENP-A pourrait donc s'expliquer par le fait qu'ICP0 ne subirait pas de régulation post-traductionnelle qui lui permettrait de rejoindre le noyau. À ce titre une étude a montré qu'ICP0 ne serait pas présente dans les noyaux de neurones primaires en culture après une infection par HSV-1 (Chen et al. 2000). Cette incapacité d'ICP0 à se localiser dans les noyaux des neurones serait un facteur prédisposant à l'établissement de la latence suite à une infection par HSV-1.

Il est donc envisageable qu'ICP0 induise la déstabilisation des centromères lors de la réactivation du virus.

Nous avons démontré dans l'étude *in vivo* que le génome d'HSV-1 était associé aux centromères pendant la latence dans un nombre significatif de neurones. Nous avons également démontré qu'il existait un lien entre cette association et l'expression du locus LAT (par la détection de l'ARN primaire LAT 8,3 kb). En effet, nous observons que ce locus n'est jamais exprimé à partir des génomes HSV-1 associés aux centromères. Ceci pourrait s'expliquer de deux manières, soit par un positionnement aux centromères de génomes HSV-1 réprimés, soit par une répression transcriptionnelle des génomes HSV-1 dû à leur positionnement aux centromères, En effet, il est connu suite à d'études réalisées dans différents systèmes cellulaires, que les centromères pourraient induire une activité répressive

sur des loci géniques (voir Introduction chapitre 3) ((C Francastel, Walters, Groudine, et al. 1999), (C Francastel, Magis, et Groudine 2001), (K E Brown et al. 1997), (K E Brown, Baxter, et al. 1999), (Schübeler, C Francastel, Cimborá, et al. 2000), (K E Brown et al. 2001), (Merkenschlager et al. 2004), (Terranova et al. 2005), (Guasconi et al. 2010); et pour revues voir (C Francastel et al. 2000), (Georgopoulos 2002), (Fisher 2002)). Il est donc envisageable que cela puisse se produire au niveau des génomes HSV-1 latents.

Il existe différents profils d'expression des génomes viraux dans les cellules nerveuses infectées en latence : le profil dit « single » ou un seul génome viral est détectable et un profil « multiple » ou plusieurs génomes sont visibles. Si l'on compare l'association du génome viral avec les centromères en fonction du profil d'expression single ou multiple des génomes viraux, il apparaît que ceux-ci s'associent plus favorablement aux centromères lorsque le profil est multiple. Pour être sûr que cette association ne soit pas le fruit du hasard lié au nombre important de génomes dans l'environnement cellulaire, des contrôles ont été fait dans le but de détecter les génomes et les séquences télomériques. Dans ce cas là, les génomes, même dans le cas de profils multiples, ne s'associent pas aux télomères. Ceci prouve bien que les génomes d'HSV-1 ne s'associent pas aléatoirement aux centromères pendant l'infection et que cette association a sûrement un rôle à jouer dans la répression induite par les séquences centromériques sur le virus HSV-1.

Cette étude *in vivo* constitue un grand pas en avant dans la biologie du virus HSV-1 car elle suggère fortement que l'expression du génome viral peut être contrôlée par les centromères, ce qui n'avait jamais été montré auparavant.

Implications des résultats dans le contexte cellulaire : La réponse iCDR

L'iCDR est comme mentionné auparavant une réponse de la cellule à une déstabilisation des centromères interphasiques. ICP0 n'induit pas de cassures à l'ADN de manière générale et à l'ADN centromérique plus particulièrement ((Morency et al. 2007), (Lilley et al. 2010)). L'iCDR n'est donc pas une réponse aux dommages de l'ADN mais plutôt à la désorganisation de la chromatine et en particulier la chromatine centromérique.

Cette désorganisation pourrait être la conséquence d'un déficit non contrôlé de nucléosomes sur la fibre d'ADN (auquel cas il serait intéressant de chercher des homologies de fonctions ou de structures entre ICP0 et des facteurs de remodelage de la chromatine tels que les constituants de la famille SWI/SNF ou ISW). Cela pourrait être également la

conséquence de modifications épigénétiques des histones qui attireraient les protéines de l'iCDR au niveau des centromères déstabilisés ? Cette première étude sur la déstabilisation de la chromatine par ICP0 demande maintenant à être approfondie par des études qui détermineront plus précisément la nature des modifications mises en jeu dans le déclenchement de l'iCDR. Ces modifications ne sont très probablement pas les mêmes pour chaque protéine impliquée dans l'iCDR. Nous savons par exemple que ce sont plutôt des modifications épigénétiques qui sont responsables de la relocalisation centromérique de SMN (Sabra et al., article en préparation). Pour la relocalisation de la coïline, il faudrait apparemment une disparition de CENP-B du centromère ((Morency et al. 2007) et El Maalouf et al. résultats non publiés)). Des études de CHIP sont en cours dans notre équipe afin de déterminer la nature de ces modifications. Si l'hypothèse d'une désorganisation de la chromatine s'avérait confirmée, alors le rôle de l'iCDR serait de réorganiser correctement la chromatine centromérique après de sévères modifications engendrées, par exemple par ce que nous pouvons nommer des stress chromatiniens encore mal connus (hormis bien sur celui provoqué par ICP0). De la même façon que les UV par exemple, l'alcool ou le tabac ont des effets sur la séquence même de la fibre d'ADN en altérant sa séquence, en induisant des dommages physiques telles que des cassures ou autres réarrangements, il doit exister des formes de stress biologiques, ou physico-chimiques responsables de la désorganisation de la structure de la chromatine Existe-t-il d'autres réponses similaires à l'iCDR, mais spécifiques aux différentes régions du génome, tels que les télomères ou bien de l'euchromatine ? Pour savoir ceci, il est nécessaire de caractériser plus en détail cette réponse, et en particulier les différents acteurs protéiques impliqués dans cette réponse.

La survie du virus dépend bien sûr de la régulation de son expression pendant la latence mais également et surtout de la survie du virus en phase lytique, qui elle même dépend de la capacité de la cellule à rester en vie. Des liens potentiels entre l'iCDR et la mort cellulaire programmée ou apoptose ont été mis en évidence au sein de l'équipe. En effet une étude montre que la coïline est impliquée dans le contrôle de la voie mitochondriale de l'apoptose (Patrick Lomonte, communication personnelle). L'hypothèse est donc que selon la capacité de la cellule à réparer ou non le centromère endommagé par un stress, la signalisation induite par l'iCDR ne serait pas la même et pourrait aboutir soit à une réparation soit à la mort cellulaire. Ceci laisse supposer qu'il existerait un seuil de déstabilisation centromérique et/ou chromatiniens en deçà duquel la cellule va tenter de réparer ses centromères, et au delà duquel la cellule abandonne la « bataille » et se suicide.

Peut-on envisager un mécanisme de réparation plus général concernant la chromatine ? Nous ne devrions alors plus définir l'iCDR comme « l'interphase Centromere Damage Response » mais comme « l'interphase Chromatin Damage Response ». Actuellement des études au sein de notre équipe visent à établir s'il s'agit effectivement d'un mécanisme plus général. Le but de ces expériences est de déterminer si les trois protéines impliquées dans l'iCDR sont relocalisées au niveau d'autres régions que les centromères, par exemple les télomères endommagés. Si ce n'était pas le cas, ceci signifierait qu'il existe donc une activité associée à la désorganisation des centromères qui va provoquer le recrutement des protéines de l'iCDR. Il est également possible que ce soit une particularité des séquences centromériques elles-mêmes, comme par exemple la présence d'une protéine centromérique comme CENP-A ou de marques épigénétiques spécifiques des séquences centromériques comme la diméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4.

Nous supposons qu'il existe bien sûr plus de protéines impliquées dans l'iCDR que les 3 mises en évidence. Une autre thématique de travail de l'équipe est de mettre en évidence différents partenaires physiques et fonctionnels de ces protéines. La réparation des centromères demeure encore une énigme, et la caractérisation plus précise de la réponse iCDR serait un grand pas en avant dans ce domaine.

Une cinétique de l'apparition des différentes protéines au cours du temps au niveau des centromères endommagés serait également intéressante à réaliser par une approche de time-lapse, c'est également un projet envisagé par notre équipe. Cette étude pourrait être combinée à une étude de l'interdépendance entre les différentes protéines dans l'iCDR. Ceci permettrait de déterminer les rôles respectifs de chaque protéine dans cette réponse. L'iCDR serait donc une façon de lutter contre l'instabilité centromérique et ainsi d'éviter les risques d'aneuploïdies et de cancers. Il s'agit donc d'une réponse primordiale pour la cellule qui doit surveiller en permanence l'état de ses centromères au même titre que la surveillance télomérique telle que celle effectuée par la télomérase, et la surveillance mitotique via le « mitotic checkpoint ».

CONCLUSION

Mon travail de thèse s'inscrit aussi bien dans le contexte de la virologie que celui de la biologie cellulaire. En effet, si l'on analyse tout d'abord les avancées dans le domaine de la virologie, on peut constater qu'elles sont significatives, notamment en ce qui concerne la détection en imagerie du génome de HSV-1, et la mise en évidence d'un lien entre le positionnement de ces génomes aux centromères et l'établissement de la latence. En ce qui concerne plus particulièrement ICP0, la découverte d'une activité de désorganisation de la chromatine associée à cette protéine est également un grand pas en avant dans la compréhension des événements moléculaires qui ont lieu pendant l'infection, et plus particulièrement lors de la réactivation du virus, cette fois ci. Ma thèse a donc permis d'éclairer plusieurs aspects différents de la biologie du virus, à différents moments de son cycle biologique.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, ce travail a permis de confirmer l'hypothèse que la réponse iCDR était liée à une désorganisation de la chromatine des centromères interphasiques. Ce type de réponse, spécifique de la chromatine, n'avait jusqu'alors jamais été mis en évidence. Nous pouvons dorénavant parler de dommages chromatiniens lorsque nous évoquons les dommages au matériel génétique de manière globale. C'est donc une avancée significative car l'iCDR est une réponse vitale pour la cellule qui lui permet de préserver son matériel génétique au cours des générations, en permettant à la chromatine centromérique d'être organisée correctement. Etant donnée la complexité des centromères, il y a probablement d'autres mécanismes que l'iCDR impliqués dans la signalisation de leurs défaillances. Cette étude a donc permis d'établir un nouveau panel d'études possibles dans le domaine de la biologie des centromères.

Des études sont en cours pour mieux comprendre le lien entre le positionnement du génome viral et sa répression, et également le mécanisme de l'iCDR.

Références Bibliographiques

- Allfrey, V G, R Faulkner, et A E Mirsky. 1964. « Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51 (mai): 786-794.
- d' Alençon, Emmanuelle, Nicolas Nègre, Slavica Stanojic, Benjamin Allassoeur, Sylvie Gimenez, Alexandre Léger, Adly Abd-Alla, Sylvie Juliant, et Philippe Fournier. 2011. « Characterization of a CENP-B homolog in the holocentric Lepidoptera *Spodoptera frugiperda* ». *Gene* (juin 25). doi:10.1016/j.gene.2011.06.007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21712078>.
- Alexandrov, I A, L I Medvedev, T D Mashkova, L L Kisselev, L Y Romanova, et Y B Yurov. 1993. « Definition of a new alpha satellite suprachromosomal family characterized by monomeric organization ». *Nucleic Acids Research* 21 (9) (mai 11): 2209-2215.
- Amaro, Ana C, Catarina P Samora, René Holtackers, Enxiu Wang, Isabel J Kingston, Maria Alonso, Michael
- Amelio, Antonio L, Nicole V Giordani, Nicole J Kubat, Jerome E O'neil, et David C Bloom. 2006. « Deacetylation of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer and a decrease in LAT abundance precede an increase in ICP0 transcriptional permissiveness at early times postexplant ». *Journal of Virology* 80 (4) (février): 2063-2068. doi:10.1128/JVI.80.4.2063-2068.2006.
- Amelio, Antonio L, Peterjon K McAnany, et David C Bloom. 2006. « A chromatin insulator-like element in the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript region binds CCCTC-binding factor and displays enhancer-blocking and silencing activities ». *Journal of Virology* 80 (5) (mars): 2358-2368. doi:10.1128/JVI.80.5.2358-2368.2006.
- Amor, David J, et K H Andy Choo. 2002. « Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study ». *American Journal of Human Genetics* 71 (4) (octobre): 695-714. doi:10.1086/342730.
- Angelov, Dimitar, André Verdel, Woojin An, Vladimir Bondarenko, Fabienne Hans, Cécile-Marie Doyen, Vassily M Studitsky, et al. 2004. « SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays ». *The EMBO Journal* 23 (19) (octobre 1): 3815-3824. doi:10.1038/sj.emboj.7600400.
- Antrobus, Robin, et Chris Boutell. 2008. « Identification of a novel higher molecular weight isoform of USP7/HAUSP that interacts with the Herpes simplex virus type-1 immediate early protein ICP0 ». *Virus Research* 137 (1) (octobre): 64-71. doi:10.1016/j.virusres.2008.05.017.
- Arents, G, R W Burlingame, B C Wang, W E Love, et E N Moudrianakis. 1991. « The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22) (novembre 15): 10148-10152.
- Avery, OT, C M Macleod, et M Mccarty. 1944. « Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii ». *The Journal of Experimental Medicine* 79 (2) (février 1): 137-158.
- Bailey, Daniel, et Peter O'Hare. 2002. « Herpes simplex virus 1 ICP0 co-localizes with a SUMO-specific protease ». *The Journal of General Virology* 83 (Pt 12) (décembre): 2951-2964.
- Ballas, Nurit, et Gail Mandel. 2005. « The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes ». *Current Opinion in Neurobiology* 15 (5) (octobre): 500-506. doi:10.1016/j.conb.2005.08.015.

- Bannister, Andrew J, Robert Schneider, et Tony Kouzarides. 2002. « Histone methylation: dynamic or static? » *Cell* 109 (7) (juin 28): 801-806.
- Barnhart, Meghan C, P Henning J L Kuich, Madison E Stellfox, Jared A Ward, Emily A Bassett, Ben E Black, et Daniel R Foltz. 2011. « HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore ». *The Journal of Cell Biology* 194 (2) (juillet 25): 229-243. doi:10.1083/jcb.201012017.
- Berger, Shelley L. 2007. « The complex language of chromatin regulation during transcription ». *Nature* 447 (7143) (mai 24): 407-412. doi:10.1038/nature05915.
- Bergmann, Jan H, Mariluz Gómez Rodríguez, Nuno M C Martins, Hiroshi Kimura, David A Kelly, Hiroshi Masumoto, Vladimir Larionov, Lars E T Jansen, et William C Earnshaw. 2011. « Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore ». *The EMBO Journal* 30 (2) (janvier 19): 328-340. doi:10.1038/emboj.2010.329.
- Black, Ben E, Melissa A Brock, Sabrina Bédard, Virgil L Woods Jr, et Don W Cleveland. 2007. « An epigenetic mark generated by the incorporation of CENP-A into centromeric nucleosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (12) (mars 20): 5008-5013. doi:10.1073/pnas.0700390104.
- Black, Ben E, Daniel R Foltz, Srinivas Chakravarthy, Karolin Luger, Virgil L Woods Jr, et Don W Cleveland. 2004. « Structural determinants for generating centromeric chromatin ». *Nature* 430 (6999) (juillet 29): 578-582. doi:10.1038/nature02766.
- Black, Ben E, Lars E T Jansen, Paul S Maddox, Daniel R Foltz, Arshad B Desai, Jagesh V Shah, et Don W Cleveland. 2007. « Centromere identity maintained by nucleosomes assembled with histone H3 containing the CENP-A targeting domain ». *Molecular Cell* 25 (2) (janvier 26): 309-322. doi:10.1016/j.molcel.2006.12.018.
- Black, Ben E, et Don W Cleveland. 2011. « Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes ». *Cell* 144 (4) (février 18): 471-479. doi:10.1016/j.cell.2011.02.002.
- Bloom, David C, Nicole V Giordani, et Dacia L Kwiatkowski. 2010. « Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1799 (3-4) (avril): 246-256. doi:10.1016/j.bbagr.2009.12.001.
- Blower, M D, et G H Karpen. 2001. « The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions ». *Nature Cell Biology* 3 (8) (août): 730-739. doi:10.1038/35087045.
- Blower, Michael D, Beth A Sullivan, et Gary H Karpen. 2002. « Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans ». *Developmental Cell* 2 (3) (mars): 319-330.
- Boulard, Mathieu, Philippe Bouvet, Tapas K Kundu, et Stefan Dimitrov. 2007. « Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease ». *Sub-Cellular Biochemistry* 41: 71-89.
- Boutell, Chris, Mary Canning, Anne Orr, et Roger D Everett. 2005. « Reciprocal activities between herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0, a ubiquitin E3 ligase, and ubiquitin-specific protease USP7 ». *Journal of Virology* 79 (19) (octobre): 12342-12354. doi:10.1128/JVI.79.19.12342-12354.2005.
- Boutell, Chris, Seth Sadis, et Roger D Everett. 2002. « Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro ». *Journal of Virology* 76 (2) (janvier): 841-850.
- Boutell, Chris, et Roger D Everett. 2003. « The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) regulatory protein ICP0 interacts with and Ubiquitinates p53 ». *The Journal of*

- Biological Chemistry* 278 (38) (septembre 19): 36596-36602. doi:10.1074/jbc.M300776200.
- . 2004. « Herpes simplex virus type 1 infection induces the stabilization of p53 in a USP7- and ATM-independent manner ». *Journal of Virology* 78 (15) (août): 8068-8077. doi:10.1128/JVI.78.15.8068-8077.2004.
- Bouzinba-Segard, Haniaa, Adeline Guais, et Claire Francastel. 2006. « Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (23) (juin 6): 8709-8714. doi:10.1073/pnas.0508006103.
- Briasoulis, Evangelos, Konstantinos Kamposioras, Vasilis Tzovaras, George Pafitanis, Angeliki Kostoula, Anestis Mavridis, et Nicholas Pavlidis. 2008. « CENP-B specific anti-centromere autoantibodies heralding small-cell lung cancer. A case study and review of the literature ». *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 60 (2) (mai): 302-306. doi:10.1016/j.lungcan.2007.09.014.
- Brown, K E, S Amois, J M Horn, V J Buckle, D R Higgs, M Merckenschlager, et A G Fisher. 2001. Kostoula, Anestis Mavridis, et Nicholas Pavlidis. 2008. « CENP-B specific anti-centromere autoantibodies herald *Nature Cell Biology* 3 (6) (juin): 602-606. doi:10.1038/35078577.
- Brown, K E, J Baxter, D Graf, M Merckenschlager, et A G Fisher. 1999. « Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division ». *Molecular Cell* 3 (2) (février): 207-217.
- Brown, K E, S S Guest, S T Smale, K Hahm, M Merckenschlager, et A G Fisher. 1997. « Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin ». *Cell* 91 (6) (décembre 12): 845-854.
- Brown, M T, L Goetsch, et L H Hartwell. 1993. « MIF2 is required for mitotic spindle integrity during anaphase spindle elongation in *Saccharomyces cerevisiae* ». *The Journal of Cell Biology* 123 (2) (octobre): 387-403.
- Bruni, R, B Fineschi, W O Ogle, et B Roizman. 1999. « A novel cellular protein, p60, interacting with both herpes simplex virus 1 regulatory proteins ICP22 and ICP0 is modified in a cell-type-specific manner and is recruited to the nucleus after infection ». *Journal of Virology* 73 (5) (mai): 3810-3817.
- Buchwitz, B J, K Ahmad, L L Moore, M B Roth, et S Henikoff. 1999. « A histone-H3-like protein in *C. elegans* ». *Nature* 401 (6753) (octobre 7): 547-548. doi:10.1038/44062.
- Byvoet, P, G R Shepherd, J M Hardin, et B J Noland. 1972. « The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 148 (2) (février): 558-567.
- Camahort, Raymond, Manjunatha Shivaraju, Mark Mattingly, Bing Li, Shima Nakanishi, Dongxiao Zhu, Ali Shilatifard, Jerry L Workman, et Jennifer L Gerton. 2009. « Cse4 is part of an octameric nucleosome in budding yeast ». *Molecular Cell* 35 (6) (septembre 24): 794-805. doi:10.1016/j.molcel.2009.07.022.
- Canning, Mary, Chris Boutell, Jane Parkinson, et Roger D Everett. 2004. « A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7 ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (37) (septembre 10): 38160-38168. doi:10.1074/jbc.M402885200.
- Carroll, Christopher W, Kirstin J Milks, et Aaron F Straight. 2010. « Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly ». *The Journal of Cell Biology* 189 (7) (juin 28): 1143-1155. doi:10.1083/jcb.201001013.
- Carroll, Christopher W, Mariana C C Silva, Kristina M Godek, Lars E T Jansen, et Aaron F Straight. 2009. « Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A

- nucleosomes by CENP-N». *Nature Cell Biology* 11 (7) (juillet): 896-902. doi:10.1038/ncb1899.
- Cavazzana-Calvo, M, S Hacein-Bey, G de Saint Basile, F Gross, E Yvon, P Nusbaum, F Selz, et al. 2000. « Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease ». *Science (New York, N.Y.)* 288 (5466) (avril 28): 669-672.
- Cerutti, Heriberto, et J Armando Casas-Mollano. 2009. « Histone H3 phosphorylation: universal code or lineage specific dialects? » *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society* 4 (2) (février 16): 71-75.
- Chadwick, B P, et H F Willard. 2001. « A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome ». *The Journal of Cell Biology* 152 (2) (janvier 22): 375-384.
- Chandrasekharan, Mahesh B, Fu Huang, et Zu-Wen Sun. 2010. « Histone H2B ubiquitination and beyond: Regulation of nucleosome stability, chromatin dynamics and the trans-histone H3 methylation ». *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society* 5 (6) (août 16): 460-468. doi:10.4161/epi.5.6.12314.
- Chao, Wendy, Khanh D Huynh, Rebecca J Spencer, Lance S Davidow, et Jeannie T Lee. 2002. « CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice ». *Science (New York, N.Y.)* 295 (5553) (janvier 11): 345-347. doi:10.1126/science.1065982.
- Chelbi-Alix, M K, L Pelicano, F Quignon, M H Koken, L Venturini, M Stadler, J Pavlovic, L Degos, et H de Thé. 1995. « Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells ». *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 9 (12) (décembre): 2027-2033.
- Chelbi-Alix, M K, et H de Thé. 1999. « Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins ». *Oncogene* 18 (4) (janvier 28): 935-941. doi:10.1038/sj.onc.1202366.
- Chen, Qi, Lan Lin, Sheryl Smith, Jing Huang, Shelley L Berger, et Jumin Zhou. 2007. « CTCF-dependent chromatin boundary element between the latency-associated transcript and ICP0 promoters in the herpes simplex virus type 1 genome ». *Journal of Virology* 81 (10) (mai): 5192-5201. doi:10.1128/JVI.02447-06.
- Chen, S H, M F Kramer, P A Schaffer, et D M Coen. 1997. « A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus ». *Journal of Virology* 71 (8) (août): 5878-5884.
- Cheung, P, B Panning, et J R Smiley. 1997. « Herpes simplex virus immediate-early proteins ICP0 and ICP4 activate the endogenous human alpha-globin gene in nonerythroid cells ». *Journal of Virology* 71 (3) (mars): 1784-1793.
- Choi, Eun Shik, Annelie Strålfors, Araceli G Castillo, Mickaël Durand-Dubief, Karl Ekwall, et Robin C Allshire. 2011. « Identification of noncoding transcripts from within CENP-A chromatin at fission yeast centromeres ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (26) (juillet 1): 23600-23607. doi:10.1074/jbc.M111.228510.
- Choo, K H. 1997. « Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation ». *American Journal of Human Genetics* 61 (6) (décembre): 1225-1233. doi:10.1086/301657.
- Chow, Cheok-Man, Andrew Georgiou, Henrietta Szutorisz, Alexandra Maia e Silva, Ana Pombo, Isabel Barahona, Elise Dargelos, Claudia Canzonetta, et Niall Dillon. 2005. « Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division ». *EMBO Reports* 6 (4) (avril): 354-360. doi:10.1038/sj.embor.7400366.
- Clayton, Alison L, et Louis C Mahadevan. 2003. « MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation ». *FEBS Letters* 546 (1) (juillet 3): 51-58.

- Clement, Christian, Partha S Bhattacharjee, Herbert E Kaufman, et James M Hill. 2009. « Heat-induced reactivation of HSV-1 in latent mice: upregulation in the TG of CD83 and other immune response genes and their LAT-ICP0 locus ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50 (6) (juin): 2855-2861. doi:10.1167/iovs.08-2430.
- Clement, Christian, Partha S Bhattacharjee, Manish Kumar, Timothy P Foster, Hilary W Thompson, et James M Hill. 2011. « Upregulation of mouse genes in HSV-1 latent TG after butyrate treatment implicates the multiple roles of the LAT-ICP0 locus ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (3) (mars): 1770-1779. doi:10.1167/iovs.09-5019.
- Cliffe, Anna R, David A Garber, et David M Knipe. 2009. « Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters ». *Journal of Virology* 83 (16) (août): 8182-8190. doi:10.1128/JVI.00712-09.
- Cliffe, Anna R, et David M Knipe. 2008. « Herpes simplex virus ICP0 promotes both histone removal and acetylation on viral DNA during lytic infection ». *Journal of Virology* 82 (24) (décembre): 12030-12038. doi:10.1128/JVI.01575-08.
- Cobb, B S, S Morales-Alcelay, G Kleiger, K E Brown, A G Fisher, et S T Smale. 2000. « Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding ». *Genes & Development* 14 (17) (septembre 1): 2146-2160.
- Conde e Silva, Natalia, Ben E Black, Andrei Sivolob, Jan Filipinski, Don W Cleveland, et Ariel Prunell. 2007. « CENP-A-containing nucleosomes: easier disassembly versus exclusive centromeric localization ». *Journal of Molecular Biology* 370 (3) (juillet 13): 555-573. doi:10.1016/j.jmb.2007.04.064.
- Conn, Kristen L, Michael J Hendzel, et Luis M Schang. 2008. « Linker histones are mobilized during infection with herpes simplex virus type 1 ». *Journal of Virology* 82 (17) (septembre): 8629-8646. doi:10.1128/JVI.00616-08.
- Costanzi, C, et J R Pehrson. 1998. « Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals ». *Nature* 393 (6685) (juin 11): 599-601. doi:10.1038/31275.
- Csink, A K, et S Henikoff. 1998. « Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats ». *Trends in Genetics: TIG* 14 (5) (mai): 200-204.
- Cuchet, Delphine, René Ferrera, Patrick Lomonte, et Alberto L Epstein. 2005. « Characterization of antiproliferative and cytotoxic properties of the HSV-1 immediate-early ICP0 protein ». *The Journal of Gene Medicine* 7 (9) (septembre): 1187-1199. doi:10.1002/jgm.761.
- Cuchet, Delphine, Amanda Sykes, Armel Nicolas, Anne Orr, Jill Murray, Hüseyin Sirma, Joerg Heeren, Alexander Bartelt, et Roger D Everett. 2011. « PML isoforms I and II participate in PML-dependent restriction of HSV-1 replication ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 2) (janvier 15): 280-291. doi:10.1242/jcs.075390.
- Dalal, Yamini, Hongda Wang, Stuart Lindsay, et Steven Henikoff. 2007. « Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase Drosophila cells ». *PLoS Biology* 5 (8) (août): e218. doi:10.1371/journal.pbio.0050218.
- Daubeuf, Sandrine, Divyendu Singh, Yaohong Tan, Hongiu Liu, Howard J Federoff, William J Bowers, et Khaled Tolba. 2009. « HSV ICP0 recruits USP7 to modulate TLR-mediated innate response ». *Blood* 113 (14) (avril 2): 3264-3275. doi:10.1182/blood-2008-07-168203.
- Deshmane, S L, et N W Fraser. 1989. « During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure ». *Journal of Virology* 63 (2) (février): 943-947.

- Doyen, Cécile-Marie, Woojin An, Dimitar Angelov, Vladimir Bondarenko, Flore Mietton, Vassily M Studitsky, Ali Hamiche, Robert G Roeder, Philippe Bouvet, et Stefan Dimitrov. 2006. « Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (3) (février): 1156-1164. doi:10.1128/MCB.26.3.1156-1164.2006.
- Drané, Pascal, Khalid Ouararhni, Arnaud Depaux, Muhammad Shuaib, et Ali Hamiche. 2010. « The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3 ». *Genes & Development* 24 (12) (juin 15): 1253-1265. doi:10.1101/gad.566910.
- Dressler, G R, D L Rock, et N W Fraser. 1987. « Latent herpes simplex virus type 1 DNA is not extensively methylated in vivo ». *The Journal of General Virology* 68 (Pt 6) (juin): 1761-1765.
- Dunleavy, Elaine M, Danièle Roche, Hideaki Tagami, Nicolas Lacoste, Dominique Ray-Gallet, Yusuke Nakamura, Yataro Daigo, Yoshihiro Nakatani, et Geneviève Almouzni-Pettinotti. 2009. « HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres ». *Cell* 137 (3) (mai 1): 485-497. doi:10.1016/j.cell.2009.02.040.
- Döhner, Katinka, André Wolfstein, Ute Prank, Christophe Echeverri, Denis Dujardin, Richard Vallee, et Beate Sodeik. 2002. « Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport ». *Molecular Biology of the Cell* 13 (8) (août): 2795-2809. doi:10.1091/mbc.01-07-0348.
- Earnshaw, W C, et C A Cooke. 1989. « Proteins of the inner and outer centromere of mitotic chromosomes ». *Genome / National Research Council Canada = Génome / Conseil National De Recherches Canada* 31 (2): 541-552.
- Earnshaw, W C, et N Rothfield. 1985. « Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma ». *Chromosoma* 91 (3-4): 313-321.
- Emelyanov, Alexander V, Alexander Y Konev, Elena Vershilova, et Dmitry V Fyodorov. 2010. « Protein complex of Drosophila ATRX/XNP and HP1a is required for the formation of pericentric beta-heterochromatin in vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (20) (mai 14): 15027-15037. doi:10.1074/jbc.M109.064790.
- Everett, R D. 2000a. « ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 22 (8) (août): 761-770. doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<761::AID-BIES10>3.0.CO;2-A.
- . 2000b. « ICP0 induces the accumulation of colocalizing conjugated ubiquitin ». *Journal of Virology* 74 (21) (novembre): 9994-10005.
- Everett, R D, A Cross, et A Orr. 1993. « A truncated form of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 is expressed in a cell type dependent manner ». *Virology* 197 (2) (décembre): 751-756. doi:10.1006/viro.1993.1651.
- Everett, R D, W C Earnshaw, J Findlay, et P Lomonte. 1999. « Specific destruction of kinetochore protein CENP-C and disruption of cell division by herpes simplex virus immediate-early protein Vmw110 ». *The EMBO Journal* 18 (6) (mars 15): 1526-1538. doi:10.1093/emboj/18.6.1526.
- Everett, R D, M Meredith, A Orr, A Cross, M Kathoria, et J Parkinson. 1997. « A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein ». *The EMBO Journal* 16 (7) (avril 1): 1519-1530. doi:10.1093/emboj/16.7.1519.
- Everett, R D, et G G Maul. 1994. « HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML ». *The EMBO Journal* 13 (21) (novembre 1): 5062-5069.

- Everett, Roger D. 2004. « Herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 does not protect cyclins D1 and D3 from degradation during infection ». *Journal of Virology* 78 (18) (septembre): 9599-9604. doi:10.1128/JVI.78.18.9599-9604.2004.
- Everett, Roger D, Chris Boutell, Carol McNair, Louise Grant, et Anne Orr. 2010. « Comparison of the biological and biochemical activities of several members of the alphaherpesvirus ICP0 family of proteins ». *Journal of Virology* 84 (7) (avril): 3476-3487. doi:10.1128/JVI.02544-09.
- Everett, Roger D, Carlos Parada, Philippe Gripon, Hüseyin Sirma, et Anne Orr. 2008. « Replication of ICP0-null mutant herpes simplex virus type 1 is restricted by both PML and Sp100 ». *Journal of Virology* 82 (6) (mars): 2661-2672. doi:10.1128/JVI.02308-07.
- Everett, Roger D, Marie-Laure Parsy, et Anne Orr. 2009. « Analysis of the functions of herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 that are critical for lytic infection and derepression of quiescent viral genomes ». *Journal of Virology* 83 (10) (mai): 4963-4977. doi:10.1128/JVI.02593-08.
- Everett, Roger D, Sabine Rechter, Peer Papior, Nina Tavalai, Thomas Stamminger, et Anne Orr. 2006. « PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0 ». *Journal of Virology* 80 (16) (août): 7995-8005. doi:10.1128/JVI.00734-06.
- Eymery, Angeline, Mary Callanan, et Claire Vourc'h. 2009. « The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription ». *The International Journal of Developmental Biology* 53 (2-3): 259-268. doi:10.1387/ijdb.082673ae.
- Eymery, Angéline, Béatrice Horard, Michèle El Atifi-Borel, Geneviève Fourel, François Berger, Anne-Laure Vitte, Arnaud Van den Broeck, et al. 2009. « A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells ». *Nucleic Acids Research* 37 (19) (octobre): 6340-6354. doi:10.1093/nar/gkp639.
- Fan, Yuhong, Tatiana Nikitina, Jie Zhao, Tomara J Fleury, Riddhi Bhattacharyya, Eric E Bouhassira, Arnold Stein, Christopher L Woodcock, et Arthur I Skoultchi. 2005. « Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation ». *Cell* 123 (7) (décembre 29): 1199-1212. doi:10.1016/j.cell.2005.10.028.
- Ferenczy, Michael W, et Neal A DeLuca. 2011. « Reversal of heterochromatic silencing of quiescent herpes simplex virus type 1 by ICP0 ». *Journal of Virology* 85 (7) (avril): 3424-3435. doi:10.1128/JVI.02263-10.
- Fernandez-Capetillo, Oscar, Arkady Celeste, et André Nussenzweig. 2003. « Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 2 (5) (octobre): 426-427.
- Ferri, Federica, Haniaa Bouzinba-Segard, Guillaume Velasco, Florent Hubé, et Claire Francastel. 2009. « Non-coding murine centromeric transcripts associate with and potentiate Aurora B kinase ». *Nucleic Acids Research* 37 (15) (août): 5071-5080. doi:10.1093/nar/gkp529.
- Fierz, Beat, Champak Chatterjee, Robert K McGinty, Maya Bar-Dagan, Daniel P Raleigh, et Tom W Muir. 2011. « Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction ». *Nature Chemical Biology* 7 (2) (février): 113-119. doi:10.1038/nchembio.501.
- Fisher, Amanda G. 2002. 9. doi:10.1038/nchembio.501. aya Bar-Degan, *Nature Reviews Immunology* 2 (12) (diews G. 2002. 9. doi:10.1038/nchembio.5

- Folco, Hernan Diego, Alison L Pidoux, Takeshi Urano, et Robin C Allshire. 2008. « Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres ». *Science (New York, N.Y.)* 319 (5859) (janvier 4): 94-97. doi:10.1126/science.1150944.
- Foltz, Daniel R, Lars E T Jansen, Aaron O Bailey, John R Yates 3rd, Emily A Bassett, Stacey Wood, Ben E Black, et Don W Cleveland. 2009. « Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP ». *Cell* 137 (3) (mai 1): 472-484. doi:10.1016/j.cell.2009.02.039.
- Foltz, Daniel R, Lars E T Jansen, Ben E Black, Aaron O Bailey, John R Yates 3rd, et Don W Cleveland. 2006. « The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex ». *Nature Cell Biology* 8 (5) (mai): 458-469. doi:10.1038/ncb1397.
- Francastel, C, W Magis, et M Groudine. 2001. , Aaron O Bailey, John R Yates 3rd, et Don W Clt precedes target gene activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (21) (octobre 9): 12120-12125. doi:10.1073/pnas.211444898.
- Francastel, C, D Sch: 12120-12125. doi:10.1073/pnas.211444898. rancastel, C, tmentalization and gene activity ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (2) (novembre): 137-143. doi:10.1038/35040083.
- Francastel, C, M C Walters, M Groudine, et D I Martin. 1999. . rancastel, C, tmentalization andudine, et D I Martin. 1999. . prevents its localization close to centrometric heterochromatin ». *Cell* 99 (3) (octobre 29): 259-269.
- Freemont, P S. 2000. « RING for destruction? » *Current Biology: CB* 10 (2) (janvier 27): R84-87.
- Fujita, Yohta, Takeshi Hayashi, Tomomi Kiyomitsu, Yusuke Toyoda, Aya Kokubu, Chikashi Obuse, et Mitsuhiro Yanagida. 2007. « Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1 ». *Developmental Cell* 12 (1) (janvier): 17-30. doi:10.1016/j.devcel.2006.11.002.
- Fukagawa, T, Y Mikami, A Nishihashi, V Regnier, T Haraguchi, Y Hiraoka, N Sugata, K Todokoro, W Brown, et T Ikemura. 2001. « CENP-H, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells ». *The EMBO Journal* 20 (16) (août 15): 4603-4617. doi:10.1093/emboj/20.16.4603.
- Fukagawa, T, C Pendon, J Morris, et W Brown. 1999. « CENP-C is necessary but not sufficient to induce formation of a functional centromere ». *The EMBO Journal* 18 (15) (août 2): 4196-4209. doi:10.1093/emboj/18.15.4196.
- Fuks, François. 2005. « DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes ». *Current Opinion in Genetics & Development* 15 (5) (octobre): 490-495. doi:10.1016/j.gde.2005.08.002.
- Fukuyo, Yayoi, Nobuo Horikoshi, Alexander M Ishov, Saul J Silverstein, et Takuma Nakajima. 2011. « The herpes simplex virus immediate-early ubiquitin ligase ICP0 induces degradation of the ICP0 repressor protein E2FBP1 ». *Journal of Virology* 85 (7) (avril): 3356-3366. doi:10.1128/JVI.02105-10.
- Furuyama, Takehito, Yamini Dalal, et Steven Henikoff. 2006. « Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (16) (avril 18): 6172-6177. doi:10.1073/pnas.0601686103.
- Furuyama, Takehito, et Steven Henikoff. 2009. « Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils ». *Cell* 138 (1) (juillet 10): 104-113. doi:10.1016/j.cell.2009.04.049.
- Garber, D A, S M Beverley, et D M Coen. 1993. « Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel

- electrophoresis ». *Virology* 197 (1) (novembre): 459-462. doi:10.1006/viro.1993.1612.
- Garber, D A, P A Schaffer, et D M Knipe. 1997. « A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1 ». *Journal of Virology* 71 (8) (août): 5885-5893.
- Garcia, Benjamin A, Jeffrey Shabanowitz, et Donald F Hunt. 2005. « Analysis of protein phosphorylation by mass spectrometry ». *Methods (San Diego, Calif.)* 35 (3) (mars): 256-264. doi:10.1016/j.ymeth.2004.08.017.
- Garcia-Dominguez, Mario, et Jose C Reyes. 2009. « SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1789 (6-8) (août): 451-459. doi:10.1016/j.bbagr.2009.07.001.
- Gascoigne, Karen E, Kozo Takeuchi, Aussie Suzuki, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, et Iain M Cheeseman. 2011. « Induced Ectopic Kinetochores Bypasses the Requirement for CENP-A Nucleosomes ». *Cell* 145 (3) (avril 29): 410-422. doi:10.1016/j.cell.2011.03.031.
- Geiss-Friedlander, Ruth, et Frauke Melchior. 2007. « Concepts in sumoylation: a decade on ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (12) (décembre): 947-956. doi:10.1038/nrm2293.
- Georgopoulos, Katia. 2002. « Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros ». *Nature Reviews. Immunology* 2 (3) (mars): 162-174. doi:10.1038/nri747.
- Georgopoulos, K, D D Moore, et B Derfler. 1992. « Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment ». *Science (New York, N.Y.)* 258 (5083) (octobre 30): 808-812.
- Gerasimova, Tatiana I, Elissa P Lei, Ashley M Bushey, et Victor G Corces. 2007. « Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in Drosophila ». *Molecular Cell* 28 (5) (décembre 14): 761-772. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.024.
- Gimelli, G, R Giorda, S Beri, S Gimelli, et O Zuffardi. 2007. « A large aneuploid invdup(3)(q22.3qter) marker chromosome characterized by array-CGH in a child with malformations, mental retardation, ambiguous genitalia and Blaschko's lines ». *European Journal of Medical Genetics* 50 (4) (août): 264-273. doi:10.1016/j.ejmg.2007.04.003.
- Giordani, Nicole V, Donna M Neumann, Dacia L Kwiatkowski, Partha S Bhattacharjee, Peterjon K McAnany, James M Hill, et David C Bloom. 2008. « During herpes simplex virus type 1 infection of rabbits, the ability to express the latency-associated transcript increases latent-phase transcription of lytic genes ». *Journal of Virology* 82 (12) (juin): 6056-6060. doi:10.1128/JVI.02661-07.
- Glowczewski, L, P Yang, T Kalashnikova, M S Santisteban, et M M Smith. 2000. « Histone-histone interactions and centromere function ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (15) (août): 5700-5711.
- Goldberg, Aaron D, Laura A Banaszynski, Kyung-Min Noh, Peter W Lewis, Simon J Elsaesser, Sonja Stadler, Scott Dewell, et al. 2010. « Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions ». *Cell* 140 (5) (mars 5): 678-691. doi:10.1016/j.cell.2010.01.003.
- Goshima, Gohta, Tomomi Kiyomitsu, Kinya Yoda, et Mitsuhiro Yanagida. 2003. « Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway ». *The Journal of Cell Biology* 160 (1) (janvier 6): 25-39. doi:10.1083/jcb.200210005.
- Govin, Jérôme, Emmanuelle Escoffier, Sophie Rousseaux, Lauriane Kuhn, Myriam Ferro, Julien Thévenon, Raffaella Catena, et al. 2007. « Pericentric heterochromatin

- reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 176 (3) (janvier 29): 283-294. doi:10.1083/jcb.200604141.
- Greeson, Nikole T, Roopsha Sengupta, Ahmad R Arida, Thomas Jenuwein, et Steven L Sanders. 2008. « Di-methyl H4 lysine 20 targets the checkpoint protein Crb2 to sites of DNA damage ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (48) (novembre 28): 33168-33174. doi:10.1074/jbc.M806857200.
- Gregory, P D, K Wagner, et W Hörz. 2001. « Histone acetylation and chromatin remodeling ». *Experimental Cell Research* 265 (2) (mai 1): 195-202. doi:10.1006/excr.2001.5187.
- Grewal, Shiv I S, et Songtao Jia. 2007. « Heterochromatin revisited ». *Nature Reviews. Genetics* 8 (1) (janvier): 35-46. doi:10.1038/nrg2008.
- Grondin, B, et N DeLuca. 2000. « Herpes simplex virus type 1 ICP4 promotes transcription preinitiation complex formation by enhancing the binding of TFIID to DNA ». *Journal of Virology* 74 (24) (décembre): 11504-11510.
- Grunstein, M. 1997. « Histone acetylation in chromatin structure and transcription ». *Nature* 389 (6649) (septembre 25): 349-352. doi:10.1038/38664.
- Gu, Haidong, Yu Liang, Gail Mandel, et Bernard Roizman. 2005. « Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (21) (mai 24): 7571-7576. doi:10.1073/pnas.0502658102.
- Guasconi, Valentina, Linda-Louise Pritchard, Lauriane Fritsch, Larry D Mesner, Claire Francastel, Annick Harel-Bellan, et Slimane Ait-Si-Ali. 2010. « Preferential association of irreversibly silenced E2F-target genes with pericentromeric heterochromatin in differentiated muscle cells ». *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society* 5 (8) (décembre): 704-709. doi:10.4161/epi.5.8.13025.
- Guenatri, Mounia, Delphine Bailly, Christèle Maison, et Geneviève Almouzni. 2004. « Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin ». *The Journal of Cell Biology* 166 (4) (août 16): 493-505. doi:10.1083/jcb.200403109.
- Guillemette, Benoît, Alain R Bataille, Nicolas Gévry, Maryse Adam, Mathieu Blanchette, François Robert, et Luc Gaudreau. 2005. « Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning ». *PLoS Biology* 3 (12) (décembre): e384. doi:10.1371/journal.pbio.0030384.
- Haaf, T, C Steinlein, et M Schmid. 1990. « Nucleolar transcriptional activity in mouse Sertoli cells is dependent on centromere arrangement ». *Experimental Cell Research* 191 (1) (novembre): 157-160.
- Hacein-Bey-Abina, Salima, Christof von Kalle, Manfred Schmidt, Françoise Le Deist, Nicolas Wulffraat, Elisabeth McIntyre, Isabelle Radford, et al. 2003. « A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency ». *The New England Journal of Medicine* 348 (3) (janvier 16): 255-256. doi:10.1056/NEJM200301163480314.
- Hagglund, Ryan, et Bernard Roizman. 2002. « Characterization of the novel E3 ubiquitin ligase encoded in exon 3 of herpes simplex virus-1-infected cell protein 0 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (12) (juin 11): 7889-7894. doi:10.1073/pnas.122246999.
- Hahm, K, B S Cobb, A S McCarty, K E Brown, C A Klug, R Lee, K Akashi, I L Weissman, A G Fisher, et S T Smale. 1998. « Helios, a T cell-restricted Ikaros family member

- that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin ». *Genes & Development* 12 (6) (mars 15): 782-796.
- Halford, W P, et P A Schaffer. 2001. « ICP0 is required for efficient reactivation of herpes simplex virus type 1 from neuronal latency ». *Journal of Virology* 75 (7) (avril): 3240-3249. doi:10.1128/JVI.75.7.3240-3249.2001.
- Hansen, Jeffrey C. 2002. « Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions ». *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 31: 361-392. doi:10.1146/annurev.biophys.31.101101.140858.
- Hardy, W R, et R M Sandri-Goldin. 1994. « Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect ». *Journal of Virology* 68 (12) (décembre): 7790-7799.
- Harel, J, N Hanania, H Tapiero, et L Harel. 1968. « RNA replication by nuclear satellite DNA in different mouse cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 33 (4) (novembre 25): 696-701.
- Harris, R A, R D Everett, X X Zhu, S Silverstein, et C M Preston. 1989. « Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 reactivates latent herpes simplex virus type 2 in an in vitro latency system ». *Journal of Virology* 63 (8) (août): 3513-3515.
- Heaney, Jason D, et Sarah K Bronson. 2006. « Artificial chromosome-based transgenes in the study of genome function ». *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 17 (8) (août): 791-807. doi:10.1007/s00335-006-0023-9.
- Hemmerich, Peter, Stefanie Weidtkamp-Peters, Christian Hoischen, Lars Schmiedeberg, Indri Erliandri, et Stephan Diekmann. 2008. « Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells ». *The Journal of Cell Biology* 180 (6) (mars 24): 1101-1114. doi:10.1083/jcb.200710052.
- Henikoff, S, K Ahmad, J S Platero, et B van Steensel. 2000. « Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2) (janvier 18): 716-721.
- Henikoff, S, K Ahmad, et H S Malik. 2001. « The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 293 (5532) (août 10): 1098-1102. doi:10.1126/science.1062939.
- Herrera, Francisco J, et Steven J Triezenberg. 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 (18) (septembre): 9689-9696. doi:10.1128/JVI.78.18.9689-9696.2004.
- Heun, Patrick, Sylvia Erhardt, Michael D Blower, Samara Weiss, Andrew D Skora, et Gary H Karpen. 2006. « Mislocalization of the Drosophila centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores ». *Developmental Cell* 10 (3) (mars): 303-315. doi:10.1016/j.devcel.2006.01.014.
- Hewawasam, Geetha, Manjunatha Shivaraju, Mark Mattingly, Swaminathan Venkatesh, Skylar Martin-Brown, Laurence Florens, Jerry L Workman, et Jennifer L Gerton. 2010. « Psh1 is an E3 ubiquitin ligase that targets the centromeric histone variant Cse4 ». *Molecular Cell* 40 (3) (novembre 12): 444-454. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.014.
- Hobbs, W E, 2nd, et N A DeLuca. 1999. « Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP0 ». *Journal of Virology* 73 (10) (octobre): 8245-8255.
- Hoshiya, Hidetoshi, Yasuhiro Kazuki, Satoshi Abe, Masato Takiguchi, Naoyo Kajitani, Yoshinori Watanabe, Toko Yoshino, et al. 2009. « A highly stable and nonintegrated

- human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (2) (février): 309-317. doi:10.1038/mt.2008.253.
- Houben, Andreas, Dmitri Demidov, Ana D Caperta, Raheleh Karimi, Francesco Agueci, et Liudmila Vlasenko. 2007. « Phosphorylation of histone H3 in plants--a dynamic affair ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1769 (5-6) (juin): 308-315. doi:10.1016/j.bbaexp.2007.01.002.
- Howman, E V, K J Fowler, A J Newson, S Redward, A C MacDonald, P Kalitsis, et K H Choo. 2000a. « Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (3) (février 1): 1148-1153.
- . 2000b. « Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (3) (février 1): 1148-1153.
- Huertas, D, S Howe, A McGuigan, et C Huxley. 2000. « Expression of the human CFTR gene from episomal oriP-EBNA1-YACs in mouse cells ». *Human Molecular Genetics* 9 (4) (mars 1): 617-629.
- Iida, Yuichi, Jung-Hyun Kim, Yasuhiro Kazuki, Hidetoshi Hoshiya, Masato Takiguchi, Masahiro Hayashi, Indri Erliandri, et al. 2010. « Human artificial chromosome with a conditional centromere for gene delivery and gene expression ». *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 17 (5) (octobre): 293-301. doi:10.1093/dnares/dsq020.
- Ikeno, M, B Grimes, T Okazaki, M Nakano, K Saitoh, H Hoshino, N I McGill, H Cooke, et H Masumoto. 1998. « Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes ». *Nature Biotechnology* 16 (5) (mai): 431-439. doi:10.1038/nbt0598-431.
- Ikeno, M, H Masumoto, et T Okazaki. 1994. « Distribution of CENP-B boxes reflected in CREST centromere antigenic sites on long-range alpha-satellite DNA arrays of human chromosome 21 ». *Human Molecular Genetics* 3 (8) (août): 1245-1257.
- Ishii, Kojiro, Yuki Ogiyama, Yuji Chikashige, Saeko Soejima, Fumie Masuda, Tatsuyuki Kakuma, Yasushi Hiraoka, et Kohta Takahashi. 2008. « Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction ». *Science (New York, N.Y.)* 321 (5892) (août 22): 1088-1091. doi:10.1126/science.1158699.
- Jackson, Sara A, et Neal A DeLuca. 2003. « Relationship of herpes simplex virus genome configuration to productive and persistent infections ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13) (juin 24): 7871-7876. doi:10.1073/pnas.1230643100.
- Jansen, Lars E T, Ben E Black, Daniel R Foltz, et Don W Cleveland. 2007. « Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 176 (6) (mars 12): 795-805. doi:10.1083/jcb.200701066.
- Jenuwein, T. 2001. « Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases ». *Trends in Cell Biology* 11 (6) (juin): 266-273.
- Jolly, Caroline, Alexandra Metz, Jérôme Govin, Marc Vigneron, Bryan M Turner, Saadi Khochbin, et Claire Vourc'h. 2004. « Stress-induced transcription of satellite III repeats ». *The Journal of Cell Biology* 164 (1) (janvier 5): 25-33. doi:10.1083/jcb.200306104.
- Jones, Clinton. 2003. « Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency ». *Clinical Microbiology Reviews* 16 (1) (janvier): 79-95.
- Jurak, Igor, Martha F Kramer, Joseph C Mellor, Alison L van Lint, Frederick P Roth, David M Knipe, et Donald M Coen. 2010. « Numerous conserved and divergent

- microRNAs expressed by herpes simplex viruses 1 and 2 ». *Journal of Virology* 84 (9) (mai): 4659-4672. doi:10.1128/JVI.02725-09.
- Kalamvoki, Maria, et Bernard Roizman. 2009. « ICP0 enables and monitors the function of D cyclins in herpes simplex virus 1 infected cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (34) (août 25): 14576-14580. doi:10.1073/pnas.0906905106.
- . 2010. « Circadian CLOCK histone acetyl transferase localizes at ND10 nuclear bodies and enables herpes simplex virus gene expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (41) (octobre 12): 17721-17726. doi:10.1073/pnas.1012991107.
- Kalitsis, P, K J Fowler, E Earle, J Hill, et K H Choo. 1998. « Targeted disruption of mouse centromere protein C gene leads to mitotic disarray and early embryo death ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (3) (février 3): 1136-1141.
- Kalocsay, Marian, Natalie Jasmin Hiller, et Stefan Jentsch. 2009. « Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break ». *Molecular Cell* 33 (3) (février 13): 335-343. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.016.
- Kang, Hyojeung, et Paul M Lieberman. 2009. « Cell cycle control of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency transcription by CTCF-cohesin interactions ». *Journal of Virology* 83 (12) (juin): 6199-6210. doi:10.1128/JVI.00052-09.
- Kawaguchi, Y, R Bruni, et B Roizman. 1997. « Interaction of herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 with elongation factor 1delta: ICP0 affects translational machinery ». *Journal of Virology* 71 (2) (février): 1019-1024.
- Kawaguchi, Y, C Van Sant, et B Roizman. 1997. « Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 interacts with and stabilizes the cell cycle regulator cyclin D3 ». *Journal of Virology* 71 (10) (octobre): 7328-7336.
- Kawaguchi, Y, M Tanaka, A Yokoyama, G Matsuda, K Kato, H Kagawa, K Hirai, et B Roizman. 2001. « Herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 functionally interacts with cellular transcription factor BMAL1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4) (février 13): 1877-1882. doi:10.1073/pnas.041592598.
- Kazuki, Y, H Hoshiya, M Takiguchi, S Abe, Y Iida, M Osaki, M Katoh, et al. 2011. « Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis ». *Gene Therapy* 18 (4) (avril): 384-393. doi:10.1038/gt.2010.147.
- Ketel, Carrie, Helen S W Wang, Mark McClellan, Kelly Bouchonville, Anna Selmecki, Tamar Lahav, Maryam Gerami-Nejad, et Judith Berman. 2009. « Neocentromeres form efficiently at multiple possible loci in *Candida albicans* ». *PLoS Genetics* 5 (3) (mars): e1000400. doi:10.1371/journal.pgen.1000400.
- Khochbin, S. 2001. « Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function ». *Gene* 271 (1) (juin 13): 1-12.
- Kingston, Isabel J, Jasmine S Y Yung, et Martin R Singleton. 2011. « Biophysical characterization of the centromere-specific nucleosome from budding yeast ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (5) (février 4): 4021-4026. doi:10.1074/jbc.M110.189340.
- Kirmizis, Antonis, Stephanie M Bartley, Andrei Kuzmichev, Raphael Margueron, Danny Reinberg, Roland Green, et Peggy J Farnham. 2004. « Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27 ». *Genes & Development* 18 (13) (juillet 1): 1592-1605. doi:10.1101/gad.1200204.

- Kline, Susan L, Iain M Cheeseman, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, et Arshad Desai. 2006. « The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation ». *The Journal of Cell Biology* 173 (1) (avril 10): 9-17. doi:10.1083/jcb.200509158.
- Knehr, M, M Poppe, D Schroeter, W Eickelbaum, E M Finze, U L Kiesewetter, M Enulescu, M Arand, et N Paweletz. 1996. « Cellular expression of human centromere protein C demonstrates a cyclic behavior with highest abundance in the G1 phase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (19) (septembre 17): 10234-10239.
- Kouzarides, Tony. 2007. « Chromatin modifications and their function ». *Cell* 128 (4) (février 23): 693-705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Kristie, Thomas M, Yu Liang, et Jodi L Vogel. 2010. « Control of alpha-herpesvirus IE gene expression by HCF-1 coupled chromatin modification activities ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1799 (3-4) (avril): 257-265. doi:10.1016/j.bbagr.2009.08.003.
- Kubat, Nicole J, Antonio L Amelio, Nicole V Giordani, et David C Bloom. 2004. « The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription ». *Journal of Virology* 78 (22) (novembre): 12508-12518. doi:10.1128/JVI.78.22.12508-12518.2004.
- Kutluay, Sebla B, Sarah L DeVos, Jennifer E Klomp, et Steven J Triezenberg. 2009. « Transcriptional coactivators are not required for herpes simplex virus type 1 immediate-early gene expression in vitro ». *Journal of Virology* 83 (8) (avril): 3436-3449. doi:10.1128/JVI.02349-08.
- Kutluay, Sebla B, et Steven J Triezenberg. 2009. « Role of chromatin during herpesvirus infections ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1790 (6) (juin): 456-466. doi:10.1016/j.bbagen.2009.03.019.
- Kwiatkowski, Dacia L, Hilary W Thompson, et David C Bloom. 2009. « The polycomb group protein Bmi1 binds to the herpes simplex virus 1 latent genome and maintains repressive histone marks during latency ». *Journal of Virology* 83 (16) (août): 8173-8181. doi:10.1128/JVI.00686-09.
- Kwon, So Hee, et Jerry L Workman. 2011. « HP1c casts light on dark matter ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (4) (février 15): 625-630.
- LaBoissière, S, et P O'Hare. 2000. « Analysis of HCF, the cellular cofactor of VP16, in herpes simplex virus-infected cells ». *Journal of Virology* 74 (1) (janvier): 99-109.
- Labetoulle, M. 2004. « [The latest in herpes simplex keratitis therapy] ». *Journal Français D'ophtalmologie* 27 (5) (mai): 547-557.
- Labetoulle, M, P Auquier, H Conrad, A Crochard, M Daniloski, S Bouée, A El Hasnaoui, et J Colin. 2005. « Incidence of herpes simplex virus keratitis in France ». *Ophthalmology* 112 (5) (mai): 888-895. doi:10.1016/j.ophtha.2004.11.052.
- Lacasse, Jonathan J, et Luis M Schang. 2010. « During lytic infections, herpes simplex virus type 1 DNA is in complexes with the properties of unstable nucleosomes ». *Journal of Virology* 84 (4) (février): 1920-1933. doi:10.1128/JVI.01934-09.
- Lachner, M, D O'Carroll, S Rea, K Mechtler, et T Jenuwein. 2001. « Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins ». *Nature* 410 (6824) (mars 1): 116-120. doi:10.1038/35065132.
- Lagana, Anaïck, Jonas F Dorn, Valérie De Rop, Anne-Marie Ladouceur, Amy S Maddox, et Paul S Maddox. 2010. « A small GTPase molecular switch regulates epigenetic centromere maintenance by stabilizing newly incorporated CENP-A ». *Nature Cell Biology* 12 (12) (décembre): 1186-1193. doi:10.1038/ncb2129.

- Lallemand-Breitenbach, Valérie, et Hugues de Thé. 2010. « PML nuclear bodies ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5) (mai 1): a000661. doi:10.1101/cshperspect.a000661.
- Lam, Ai Leen, Christopher D Boivin, Caitlin F Bonney, M Katharine Rudd, et Beth A Sullivan. 2006. « Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (11) (mars 14): 4186-4191. doi:10.1073/pnas.0507947103.
- Lampson, Andrew D McAinsh, et Patrick Meraldi. 2010. « Molecular control of kinetochore-microtubule dynamics and chromosome oscillations ». *Nature Cell Biology* 12 (4) (avril): 319-329. doi:10.1038/ncb2033.
- Lavelle, Christophe, Pierre Recouvreur, Hua Wong, Aurélien Bancaud, Jean-Louis Viovy, Ariel Prunell, et Jean-Marc Victor. 2009. « Right-handed nucleosome: myth or reality? » *Cell* 139 (7) (décembre 24): 1216-1217; author reply 1217-1218. doi:10.1016/j.cell.2009.12.014.
- Law, Martin J, Karen M Lower, Hsiao P J Voon, Jim R Hughes, David Garrick, Vip Viprakasit, Matthew Mitson, et al. 2010. « ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner ». *Cell* 143 (3) (octobre 29): 367-378. doi:10.1016/j.cell.2010.09.023.
- Leib, D A, D M Coen, C L Bogard, K A Hicks, D R Yager, D M Knipe, K L Tyler, et P A Schaffer. 1989. « Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency ». *Journal of Virology* 63 (2) (février): 759-768.
- Leinbach, S S, et W C Summers. 1980. « The structure of herpes simplex virus type 1 DNA as probed by micrococcal nuclease digestion ». *The Journal of General Virology* 51 (Pt 1) (novembre): 45-59.
- Lentine, A F, et S L Bachenheimer. 1990. « Intracellular organization of herpes simplex virus type 1 DNA assayed by staphylococcal nuclease sensitivity ». *Virus Research* 16 (3) (juillet): 275-292.
- Lewis, Peter W, Simon J Elsaesser, Kyung-Min Noh, Sonja C Stadler, et C David Allis. 2010. « Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (32) (août 10): 14075-14080. doi:10.1073/pnas.1008850107.
- Liang, Yu, Jodi L Vogel, Aarthi Narayanan, Hua Peng, et Thomas M Kristie. 2009. « Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks alpha-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency ». *Nature Medicine* 15 (11) (novembre): 1312-1317. doi:10.1038/nm.2051.
- Lilley, Caroline E, Mira S Chaurushiya, Chris Boutell, Roger D Everett, et Matthew D Weitzman. 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 (6) (juin): e1002084. doi:10.1371/journal.ppat.1002084.
- Lilley, Caroline E, Mira S Chaurushiya, Chris Boutell, Sebastien Landry, Junghae Suh, Stephanie Panier, Roger D Everett, Grant S Stewart, Daniel Durocher, et Matthew D Weitzman. 2010. « A viral E3 ligase targets RNF8 and RNF168 to control histone ubiquitination and DNA damage responses ». *The EMBO Journal* 29 (5) (mars 3): 943-955. doi:10.1038/emboj.2009.400.
- Liu, Song-Tao, James C Hittle, Sandra A Jablonski, Michael S Campbell, Kinya Yoda, et Tim J Yen. 2003. « Human CENP-I specifies localization of CENP-F, MAD1 and

- MAD2 to kinetochores and is essential for mitosis ». *Nature Cell Biology* 5 (4) (avril): 341-345. doi:10.1038/ncb953.
- Liu, Zhiqian, Rose Oughtred, et Simon S Wing. 2005. « Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (7) (avril): 2819-2831. doi:10.1128/MCB.25.7.2819-2831.2005.
- Loizou, Joanna I, Rabih Murr, Martin G Finkbeiner, Carla Sawan, Zhao-Qi Wang, et Zdenko Herceg. 2006. « Epigenetic information in chromatin: the code of entry for DNA repair ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (7) (avril): 696-701.
- Lomonte, P, K F Sullivan, et R D Everett. 2001. « Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0 ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (8) (février 23): 5829-5835. doi:10.1074/jbc.M008547200.
- Lomonte, P, et R D Everett. 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 ». *Journal of Virology* 73 (11) (novembre): 9456-9467.
- Lomonte, Patrick, Joëlle Thomas, Pascale Texier, Cécile Caron, Saadi Khochbin, et Alberto L Epstein. 2004. « Functional interaction between class II histone deacetylases and ICP0 of herpes simplex virus type 1 ». *Journal of Virology* 78 (13) (juillet): 6744-6757. doi:10.1128/JVI.78.13.6744-6757.2004.
- Lomonte, Patrick, et Eric Morency. 2007. « Centromeric protein CENP-B proteasomal degradation induced by the viral protein ICP0 ». *FEBS Letters* 581 (4) (février 20): 658-662. doi:10.1016/j.febslet.2007.01.027.
- Lopez, P, C Van Sant, et B Roizman. 2001. « Requirements for the nuclear-cytoplasmic translocation of infected-cell protein 0 of herpes simplex virus 1 ». *Journal of Virology* 75 (8) (avril): 3832-3840. doi:10.1128/JVI.75.8.3832-3840.2001.
- Loppin, Benjamin, Emilie Bonnefoy, Caroline Anselme, Anne Laurençon, Timothy L Karr, et Pierre Couble. 2005. « The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus ». *Nature* 437 (7063) (octobre 27): 1386-1390. doi:10.1038/nature04059.
- Luger, K, A W Mäder, R K Richmond, D F Sargent, et T J Richmond. 1997. « Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution ». *Nature* 389 (6648) (septembre 18): 251-260. doi:10.1038/38444.
- Lukashchuk, Vera, et Roger D Everett. 2010. « Regulation of ICP0-null mutant herpes simplex virus type 1 infection by ND10 components ATRX and hDaxx ». *Journal of Virology* 84 (8) (avril): 4026-4040. doi:10.1128/JVI.02597-09.
- MacDonald, Vicki E, et LeAnn J Howe. 2009. « Histone acetylation: where to go and how to get there ». *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society* 4 (3) (avril 1): 139-143.
- Macnab, S, et A Whitehouse. 2009. « Progress and prospects: human artificial chromosomes ». *Gene Therapy* 16 (10) (octobre): 1180-1188. doi:10.1038/gt.2009.102.
- Mador, N, D Goldenberg, O Cohen, A Panet, et I Steiner. 1998. « Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts suppress viral replication and reduce immediate-early gene mRNA levels in a neuronal cell line ». *Journal of Virology* 72 (6) (juin): 5067-5075.
- Mador, Nurith, Amos Panet, et Israel Steiner. 2002. « The latency-associated gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) interferes with superinfection by HSV-1 ». *Journal of Neurovirology* 8 Suppl 2 (décembre): 97-102. doi:10.1080/13550280290167920.
- Maison, Christèle, Delphine Bailly, Antoine H F M Peters, Jean-Pierre Quivy, Danièle Roche, Angela Taddei, Monika Lachner, Thomas Jenuwein, et Geneviève Almouzni.

2002. « Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component ». *Nature Genetics* 30 (3) (mars): 329-334. doi:10.1038/ng843.
- Margueron, Raphael, Patrick Trojer, et Danny Reinberg. 2005. « The key to development: interpreting the histone code? » *Current Opinion in Genetics & Development* 15 (2) (avril): 163-176. doi:10.1016/j.gde.2005.01.005.
- Maringer, Kevin, et Gillian Elliott. 2010. « Recruitment of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 to the virus particle ». *Journal of Virology* 84 (9) (mai): 4682-4696. doi:10.1128/JVI.00126-10.
- Marmorstein, R, et S Y Roth. 2001. « Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis ». *Current Opinion in Genetics & Development* 11 (2) (avril): 155-161.
- Marshall, E. 1999. « Gene therapy death prompts review of adenovirus vector ». *Science (New York, N.Y.)* 286 (5448) (décembre 17): 2244-2245.
- Marshall, Owen J, Anderly C Chueh, Lee H Wong, et K H Andy Choo. 2008. « Neocentromeres: new insights into centromere structure, disease development, and karyotype evolution ». *American Journal of Human Genetics* 82 (2) (février): 261-282. doi:10.1016/j.ajhg.2007.11.009.
- Marshall, Owen J, Alan T Marshall, et K H Andy Choo. 2008. « Three-dimensional localization of CENP-A suggests a complex higher order structure of centromeric chromatin ». *The Journal of Cell Biology* 183 (7) (décembre 29): 1193-1202. doi:10.1083/jcb.200804078.
- Martens, Joost H A, Roderick J O'Sullivan, Ulrich Braunschweig, Susanne Opravil, Martin Radolf, Peter Steinlein, et Thomas Jenuwein. 2005. « The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome ». *The EMBO Journal* 24 (4) (février 23): 800-812. doi:10.1038/sj.emboj.7600545.
- Martin, Cyrus, et Yi Zhang. 2005. « The diverse functions of histone lysine methylation ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (11) (novembre): 838-849. doi:10.1038/nrm1761.
- Masumoto, H, M Ikeno, M Nakano, T Okazaki, B Grimes, H Cooke, et N Suzuki. 1998. « Assay of centromere function using a human artificial chromosome ». *Chromosoma* 107 (6-7) (décembre): 406-416.
- Masumoto, H, H Masukata, Y Muro, N Nozaki, et T Okazaki. 1989. « A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite ». *The Journal of Cell Biology* 109 (5) (novembre): 1963-1973.
- Masumoto, Hiroshi, Megumi Nakano, et Jun-Ichirou Ohzeki. 2004. « The role of CENP-B and alpha-satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 12 (6): 543-556. doi:10.1023/B:CHRO.0000036593.72788.99.
- McGeoch, D J. 1987. « The genome of herpes simplex virus: structure, replication and evolution ». *Journal of Cell Science. Supplement 7*: 67-94.
- Mellone, Barbara G, Leslie Ball, Noriyuki Suka, Michael R Grunstein, Janet F Partridge, et Robin C Allshire. 2003. « Centromere silencing and function in fission yeast is governed by the amino terminus of histone H3 ». *Current Biology: CB* 13 (20) (octobre 14): 1748-1757.
- Melroe, Gregory T, Lindsey Silva, Priscilla A Schaffer, et David M Knipe. 2007. « Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction ». *Virology* 360 (2) (avril 10): 305-321. doi:10.1016/j.virol.2006.10.028.

- Meluh, P B, P Yang, L Glowczewski, D Koshland, et M M Smith. 1998. « Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae* ». *Cell* 94 (5) (septembre 4): 607-613.
- Meluh, P B, et D Koshland. 1995. « Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C ». *Molecular Biology of the Cell* 6 (7) (juillet): 793-807.
- Meredith, M, A Orr, M Elliott, et R Everett. 1995. « Separation of sequence requirements for HSV-1 Vmw110 multimerisation and interaction with a 135-kDa cellular protein ». *Virology* 209 (1) (mai 10): 174-187. doi:10.1006/viro.1995.1241.
- Merkenschlager, Matthias, Shannon Amoils, Esther Roldan, Amin Rahemtulla, Eric O'connor, Amanda G Fisher, et Karen E Brown. 2004. « Centromeric repositioning of coreceptor loci predicts their stable silencing and the CD4/CD8 lineage choice ». *The Journal of Experimental Medicine* 200 (11) (décembre 6): 1437-1444. doi:10.1084/jem.20041127.
- Mizuguchi, Gaku, Hua Xiao, Jan Wisniewski, M Mitchell Smith, et Carl Wu. 2007. « Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes ». *Cell* 129 (6) (juin 15): 1153-1164. doi:10.1016/j.cell.2007.04.026.
- Monaco, Z Larin, et D Moralli. 2006. « Progress in artificial chromosome technology ». *Biochemical Society Transactions* 34 (Pt 2) (avril): 324-327. doi:10.1042/BST20060324.
- Monier, K, J C Armas, S Etteldorf, P Ghazal, et K F Sullivan. 2000. « Annexation of the interchromosomal space during viral infection ». *Nature Cell Biology* 2 (9) (septembre): 661-665. doi:10.1038/35023615.
- Moore, L L, et M B Roth. 2001. « HCP-4, a CENP-C-like protein in *Caenorhabditis elegans*, is required for resolution of sister centromeres ». *The Journal of Cell Biology* 153 (6) (juin 11): 1199-1208.
- Morency, Eric, Mirna Sabra, Frédéric Catez, Pascale Texier, et Patrick Lomonte. 2007. « A novel cell response triggered by interphase centromere structural instability ». *The Journal of Cell Biology* 177 (5) (juin 4): 757-768. doi:10.1083/jcb.200612107.
- Mravinac, Brankica, Lori L Sullivan, Jason W Reeves, Christopher M Yan, Kristen S Kopf, Christine J Farr, Mary G Schueler, et Beth A Sullivan. 2009. « Histone modifications within the human X centromere region ». *PloS One* 4 (8): e6602. doi:10.1371/journal.pone.0006602.
- Muchardt, Christian, Marie Guilleme, Jacob-S Seeler, Didier Trouche, Anne Dejean, et Moshe Yaniv. 2002. « Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha ». *EMBO Reports* 3 (10) (octobre): 975-981. doi:10.1093/embo-reports/kvf194.
- Muggeridge, M I, et N W Fraser. 1986. « Chromosomal organization of the herpes simplex virus genome during acute infection of the mouse central nervous system ». *Journal of Virology* 59 (3) (septembre): 764-767.
- Mulholland, Niveen M, Sara K Snyder, Sarah S Kolla, et Catharine L Smith. 2003. « Chromatin-dependent regulation of the MMTV promoter by cAMP signaling is mediated through distinct pathways ». *Experimental Cell Research* 287 (2) (juillet 15): 361-373.
- Munshi, Anjana, Gowhar Shafi, Nishat Aliya, et Akka Jyothy. 2009. « Histone modifications dictate specific biological readouts ». *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 36 (2) (février): 75-88. doi:10.1016/S1673-8527(08)60094-6.

- de Murcia, J M, C Niedergang, C Trucco, M Ricoul, B Dutrillaux, M Mark, F J Oliver, et al. 1997. « Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14) (juillet 8): 7303-7307.
- Muro, Y, H Masumoto, K Yoda, N Nozaki, M Ohashi, et T Okazaki. 1992. « Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box ». *The Journal of Cell Biology* 116 (3) (février): 585-596.
- Murphy, Eain, Jirí Vaníček, Harlan Robins, Thomas Shenk, et Arnold J Levine. 2008. « Suppression of immediate-early viral gene expression by herpesvirus-coded microRNAs: implications for latency ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (14) (avril 8): 5453-5458. doi:10.1073/pnas.0711910105.
- Murray, A W, et J W Szostak. 1983. « Construction of artificial chromosomes in yeast ». *Nature* 305 (5931) (septembre 15): 189-193.
- Nagaki, Kiyotaka, Paul B Talbert, Cathy Xiaoyan Zhong, R Kelly Dawe, Steven Henikoff, et Jiming Jiang. 2003. « Chromatin immunoprecipitation reveals that the 180-bp satellite repeat is the key functional DNA element of Arabidopsis thaliana centromeres ». *Genetics* 163 (3) (mars): 1221-1225.
- Nagel, Claus-Henning, Nina Albrecht, Kristijana Milovic-Holm, Lakshmikanth Mariyanna, Britta Keyser, Bettina Abel, Britta Weseloh, Thomas G Hofmann, Martha M Eibl, et Joachim Hauber. 2011. « Herpes Simplex Virus Immediate-Early Protein ICP0 Is Targeted by SIAH-1 for Proteasomal Degradation ». *Journal of Virology* 85 (15) (août): 7644-7657. doi:10.1128/JVI.02207-10.
- Nakagawa, Hiromi, Joon-Kyu Lee, Jerard Hurwitz, Robin C Allshire, Jun-Ichi Nakayama, Shiv I S Grewal, Katsunori Tanaka, et Yota Murakami. 2002. « Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications ». *Genes & Development* 16 (14) (juillet 15): 1766-1778. doi:10.1101/gad.997702.
- Nakanishi, Shima, Jung Shin Lee, Kathryn E Gardner, Jennifer M Gardner, Yoh-hei Takahashi, Mahesh B Chandrasekharan, Zu-Wen Sun, et al. 2009. « Histone H2BK123 monoubiquitination is the critical determinant for H3K4 and H3K79 trimethylation by COMPASS and Dot1 ». *The Journal of Cell Biology* 186 (3) (août 10): 371-377. doi:10.1083/jcb.200906005.
- Nakano, Megumi, Yasuhide Okamoto, Jun-ichirou Ohzeki, et Hiroshi Masumoto. 2003. « Epigenetic assembly of centromeric chromatin at ectopic alpha-satellite sites on human chromosomes ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 19) (octobre 1): 4021-4034. doi:10.1242/jcs.00697.
- Nakashima, Hiroshi, Megumi Nakano, Ryoko Ohnishi, Yasushi Hiraoka, Yasufumi Kaneda, Akio Sugino, et Hiroshi Masumoto. 2005. « Assembly of additional heterochromatin distinct from centromere-kinetochore chromatin is required for de novo formation of human artificial chromosome ». *Journal of Cell Science* 118 (Pt 24) (décembre 15): 5885-5898. doi:10.1242/jcs.02702.
- Narayanan, Aarthi, William T Ruyechan, et Thomas M Kristie. 2007. « The coactivator host cell factor-1 mediates Set1 and MLL1 H3K4 trimethylation at herpesvirus immediate early promoters for initiation of infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (26) (juin 26): 10835-10840. doi:10.1073/pnas.0704351104.
- Nathan, Dafna, Kristin Ingvarsdottir, David E Sterner, Gwendolyn R Bylebyl, Milos Dokmanovic, Jean A Dorsey, Kelly A Whelan, et al. 2006. « Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with

- positive-acting histone modifications ». *Genes & Development* 20 (8) (avril 15): 966-976. doi:10.1101/gad.1404206.
- Negorev, Dmitri G, Olga V Vladimirova, Alexey Ivanov, Frank Rauscher 3rd, et Gerd G Maul. 2006. « Differential role of Sp100 isoforms in interferon-mediated repression of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein expression ». *Journal of Virology* 80 (16) (août): 8019-8029. doi:10.1128/JVI.02164-05.
- Negorev, Dmitri G, Olga V Vladimirova, et Gerd G Maul. 2009. « Differential functions of interferon-upregulated Sp100 isoforms: herpes simplex virus type 1 promoter-based immediate-early gene suppression and PML protection from ICP0-mediated degradation ». *Journal of Virology* 83 (10) (mai): 5168-5180. doi:10.1128/JVI.02083-08.
- Neumann, Donna M, Partha S Bhattacharjee, Nicole V Giordani, David C Bloom, et James M Hill. 2007. « In vivo changes in the patterns of chromatin structure associated with the latent herpes simplex virus type 1 genome in mouse trigeminal ganglia can be detected at early times after butyrate treatment ». *Journal of Virology* 81 (23) (décembre): 13248-13253. doi:10.1128/JVI.01569-07.
- Ng, S S, W W Yue, U Oppermann, et R J Klose. 2009. « Dynamic protein methylation in chromatin biology ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66 (3) (février): 407-422. doi:10.1007/s00018-008-8303-z.
- Nicosia, M, J M Zabolotny, R P Lirette, et N W Fraser. 1994. « The HSV-1 2-kb latency-associated transcript is found in the cytoplasm comigrating with ribosomal subunits during productive infection ». *Virology* 204 (2) (novembre 1): 717-728. doi:10.1006/viro.1994.1587.
- Nightingale, Karl P, Laura P O'Neill, et Bryan M Turner. 2006. « Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code ». *Current Opinion in Genetics & Development* 16 (2) (avril): 125-136. doi:10.1016/j.gde.2006.02.015.
- Nishihashi, Ai, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Toshimichi Ikemura, Vinciane Regnier, Helen Dodson, William C Earnshaw, et Tatsuo Fukagawa. 2002. « CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells ». *Developmental Cell* 2 (4) (avril): 463-476.
- Ochs, R L, et R I Press. 1992. « Centromere autoantigens are associated with the nucleolus ». *Experimental Cell Research* 200 (2) (juin): 339-350.
- Oegema, K, A Desai, S Rybina, M Kirkham, et A A Hyman. 2001. « Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans* ». *The Journal of Cell Biology* 153 (6) (juin 11): 1209-1226.
- Ohzeki, Jun-ichirou, Megumi Nakano, Teruaki Okada, et Hiroshi Masumoto. 2002. « CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA ». *The Journal of Cell Biology* 159 (5) (décembre 9): 765-775. doi:10.1083/jcb.200207112.
- Okada, Masahiro, Iain M Cheeseman, Tetsuya Hori, Katsuya Okawa, Ian X McLeod, John R Yates 3rd, Arshad Desai, et Tatsuo Fukagawa. 2006. « The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres ». *Nature Cell Biology* 8 (5) (mai): 446-457. doi:10.1038/ncb1396.
- Okada, Masahiro, Katsuya Okawa, Toshiaki Isobe, et Tatsuo Fukagawa. 2009. « CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-A in cooperation with FACT and CHD1 ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (18) (septembre): 3986-3995. doi:10.1091/mbc.E09-01-0065.
- Okada, Teruaki, Jun-ichirou Ohzeki, Megumi Nakano, Kinya Yoda, William R Brinkley, Vladimir Larionov, et Hiroshi Masumoto. 2007. « CENP-B controls centromere

- formation depending on the chromatin context ». *Cell* 131 (7) (décembre 28): 1287-1300. doi:10.1016/j.cell.2007.10.045.
- Okamoto, Yasuhide, Megumi Nakano, Jun-ichirou Ohzeki, Vladimir Larionov, et Hiroshi Masumoto. 2007. « A minimal CENP-A core is required for nucleation and maintenance of a functional human centromere ». *The EMBO Journal* 26 (5) (mars 7): 1279-1291. doi:10.1038/sj.emboj.7601584.
- Osley, Mary Ann. 2006. « Regulation of histone H2A and H2B ubiquitylation ». *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 5 (3) (septembre): 179-189. doi:10.1093/bfgp/ell022.
- O'Keefe, R T, S C Henderson, et D L Spector. 1992. « Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences ». *The Journal of Cell Biology* 116 (5) (mars): 1095-1110.
- Paladino, Patrick, Susan E Collins, et Karen L Mossman. 2010. « Cellular localization of the herpes simplex virus ICP0 protein dictates its ability to block IRF3-mediated innate immune responses ». *PloS One* 5 (4): e10428. doi:10.1371/journal.pone.0010428.
- Palmer, D K, K O'Day, H L Trong, H Charbonneau, et R L Margolis. 1991. « Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (9) (mai 1): 3734-3738.
- Palmer, D K, K O'Day, M H Wener, B S Andrews, et R L Margolis. 1987. « A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones ». *The Journal of Cell Biology* 104 (4) (avril): 805-815.
- Palmer, D K, et R L Margolis. 1985. « Kinetochores recognized by human autoantibodies are present on mononucleosomes ». *Molecular and Cellular Biology* 5 (1) (janvier): 173-186.
- Pehrson, J R, et V A Fried. 1992. « MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region ». *Science (New York, N.Y.)* 257 (5075) (septembre 4): 1398-1400.
- Peng, Hua, Mauricio L Nogueira, Jodi L Vogel, et Thomas M Kristie. 2010. « Transcriptional coactivator HCF-1 couples the histone chaperone Asf1b to HSV-1 DNA replication components ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (6) (février 9): 2461-2466. doi:10.1073/pnas.0911128107.
- Perche, P Y, C Vourc'h, L Konecny, C Souchier, M Robert-Nicoud, S Dimitrov, et S Khochbin. 2000. « Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density ». *Current Biology: CB* 10 (23) (novembre 30): 1531-1534.
- Perpelescu, Marinela, Naohito Nozaki, Chikashi Obuse, Hua Yang, et Kinya Yoda. 2009. « Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex ». *The Journal of Cell Biology* 185 (3) (mai 4): 397-407. doi:10.1083/jcb.200903088.
- Pidoux, Alison L, Eun Shik Choi, Johanna K R Abbott, Xingkun Liu, Alexander Kagansky, Araceli G Castillo, Georgina L Hamilton, et al. 2009. « Fission yeast Scm3: A CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin ». *Molecular Cell* 33 (3) (février 13): 299-311. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.019.
- Placek, Brandon J, Jing Huang, Jennifer R Kent, Jean Dorsey, Lyndi Rice, Nigel W Fraser, et Shelley L Berger. 2009. « The histone variant H3.3 regulates gene expression during lytic infection with herpes simplex virus type 1 ». *Journal of Virology* 83 (3) (février): 1416-1421. doi:10.1128/JVI.01276-08.

- Placek, Brandon J, et Shelley L Berger. 2010. « Chromatin dynamics during herpes simplex virus-1 lytic infection ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1799 (3-4) (avril): 223-227. doi:10.1016/j.bbagr.2010.01.012.
- Pluta, A F, W C Earnshaw, et I G Goldberg. 1998. « Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death ». *Journal of Cell Science* 111 (Pt 14) (juillet 30): 2029-2041.
- Politi, Valeria, Giovanni Perini, Stefania Trazzi, Artem Pliss, Ivan Raska, William C Earnshaw, et Giuliano Della Valle. 2002. « CENP-C binds the alpha-satellite DNA in vivo at specific centromere domains ». *Journal of Cell Science* 115 (Pt 11) (juin 1): 2317-2327.
- Poon, Alice P W, Yu Liang, et Bernard Roizman. 2003. « Herpes simplex virus 1 gene expression is accelerated by inhibitors of histone deacetylases in rabbit skin cells infected with a mutant carrying a cDNA copy of the infected-cell protein no. 0 ». *Journal of Virology* 77 (23) (décembre): 12671-12678.
- Preston, C M. 2000. 12671-12678.nard Roizman. 2003. « Herpes simplex virus 1 gene expression i*The Journal of General Virology* 81 (Pt 1) (janvier): 1-19.
- Prigent, Claude, et Stefan Dimitrov. 2003. « Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? » *Journal of Cell Science* 116 (Pt 18) (septembre 15): 3677-3685. doi:10.1242/jcs.00735.
- Quivy, Jean-Pierre, Danièle Roche, Doris Kirschner, Hideaki Tagami, Yoshihiro Nakatani, et Geneviève Almouzni. 2004. « A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication ». *The EMBO Journal* 23 (17) (septembre 1): 3516-3526. doi:10.1038/sj.emboj.7600362.
- Ranjitkar, Prerana, Maximilian O Press, Xianhua Yi, Richard Baker, Michael J MacCoss, et Sue Biggins. 2010. « An E3 ubiquitin ligase prevents ectopic localization of the centromeric histone H3 variant via the centromere targeting domain ». *Molecular Cell* 40 (3) (novembre 12): 455-464. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.025.
- Rao, B J, S K Brahmachari, et M R Rao. 1983. « Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis ». *The Journal of Biological Chemistry* 258 (22) (novembre 25): 13478-13485.
- Ribeiro, Susana Abreu, Paola Vagnarelli, Yimin Dong, Tetsuya Hori, Bruce F McEwen, Tatsuo Fukagawa, Cristina Flors, et William C Earnshaw. 2010. « A super-resolution map of the vertebrate kinetochore ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (23) (juin 8): 10484-10489. doi:10.1073/pnas.1002325107.
- Richmond, Timothy J, et Curt A Davey. 2003. « The structure of DNA in the nucleosome core ». *Nature* 423 (6936) (mai 8): 145-150. doi:10.1038/nature01595.
- Ritchie, Kieran, Claudia Seah, Jana Moulin, Christian Isaac, Frederick Dick, et Nathalie G Bérubé. 2008. « Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects ». *The Journal of Cell Biology* 180 (2) (janvier 28): 315-324. doi:10.1083/jcb.200706083.
- Rizzi, Nicoletta, Marco Denegri, Ilaria Chiodi, Margherita Corioni, Rut Valgardsdottir, Fabio Cobianchi, Silvano Riva, et Giuseppe Biamonti. 2004. « Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (2) (février): 543-551. doi:10.1091/mbc.E03-07-0487.
- Robinson, Philip J J, et Daniela Rhodes. 2006. « Structure of the “30 nm” chromatin fibre: a key role for the linker histone ». *Current Opinion in Structural Biology* 16 (3) (juin): 336-343. doi:10.1016/j.sbi.2006.05.007.

- Rogakou, E P, D R Pilch, A H Orr, V S Ivanova, et W M Bonner. 1998. « DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10) (mars 6): 5858-5868.
- Roizman, B, et R J Whitley. 2001. « The nine ages of herpes simplex virus ». *Herpes: The Journal of the IHMF* 8 (1) (mars): 23-27.
- Roizman, Bernard. 2011. « The Checkpoints of Viral Gene Expression in Productive and Latent Infection: the Role of the HDAC/CoREST/LSD1/REST Repressor Complex ». *Journal of Virology* 85 (15) (août): 7474-7482. doi:10.1128/JVI.00180-11.
- Roth, S Y, J M Denu, et C D Allis. 2001. « Histone acetyltransferases ». *Annual Review of Biochemistry* 70: 81-120. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.81.
- Rudd, M Katharine, Robert W Mays, Stuart Schwartz, et Huntington F Willard. 2003. « Human artificial chromosomes with alpha satellite-based de novo centromeres show increased frequency of nondisjunction and anaphase lag ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (21) (novembre): 7689-7697.
- Rundquist, Ingemar, et Herbert H Lindner. 2006. « Analyses of linker histone--chromatin interactions in situ ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 84 (4) (août): 427-436. doi:10.1139/o06-071.
- Régnier, Vinciane, Paola Vagnarelli, Tatsuo Fukagawa, Tatiana Zerjal, Elizabeth Burns, Didier Trouche, William Earnshaw, et William Brown. 2005. « CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1 ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (10) (mai): 3967-3981. doi:10.1128/MCB.25.10.3967-3981.2005.
- Saffery, R, D V Irvine, B Griffiths, P Kalitsis, L Wordeman, et K H Choo. 2000. « Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins ». *Human Molecular Genetics* 9 (2) (janvier 22): 175-185.
- Saffery, R, D V Irvine, B Griffiths, P Kalitsis, et K H Choo. 2000. « Components of the human spindle checkpoint control mechanism localize specifically to the active centromere on dicentric chromosomes ». *Human Genetics* 107 (4) (octobre): 376-384.
- Saffery, Richard, Huseyin Sumer, Sara Hassan, Lee H Wong, Jeffrey M Craig, Kazuo Todokoro, Melissa Anderson, Angela Stafford, et K H Andy Choo. 2003. « Transcription within a functional human centromere ». *Molecular Cell* 12 (2) (août): 509-516.
- Saira, Kazima, You Zhou, et Clinton Jones. 2007. « The infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 (bICP0) induces degradation of interferon response factor 3 and, consequently, inhibits beta interferon promoter activity ». *Journal of Virology* 81 (7) (avril): 3077-3086. doi:10.1128/JVI.02064-06.
- Saitoh, H, J Tomkiel, C A Cooke, H Ratrie 3rd, M Maurer, N F Rothfield, et W C Earnshaw. 1992. « CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate ». *Cell* 70 (1) (juillet 10): 115-125.
- Sanchez-Pulido, Luis, Alison L Pidoux, Chris P Ponting, et Robin C Allshire. 2009. « Common ancestry of the CENP-A chaperones Scm3 and HJURP ». *Cell* 137 (7) (juin 26): 1173-1174. doi:10.1016/j.cell.2009.06.010.
- Santos-Rosa, Helena, et Carlos Caldas. 2005. « Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 41 (16) (novembre): 2381-2402. doi:10.1016/j.ejca.2005.08.010.

- Sassone-Corsi, Paolo. 2002. « Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5576) (juin 21): 2176-2178. doi:10.1126/science.1070963.
- Sch6 (5576) (juin 21): 2176-2178. doi:10.1126/science.1070963.transcriptional regulation in spermatogenesis ». P-A chaperones Scm3 and HJURP ». ponent of the human inner kinetochore plate ». nhibits beta interferon promoter act*Genes & Development* 14 (8) (avril 15): 940-950.
- Schueler, M G, A W Higgins, M K Rudd, K Gustashaw, et H F Willard. 2001. « Genomic and genetic definition of a functional human centromere ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5540) (octobre 5): 109-115. doi:10.1126/science.1065042.
- Schwartz, Yuri B, et Vincenzo Pirrotta. 2008. « Polycomb complexes and epigenetic states ». *Current Opinion in Cell Biology* 20 (3) (juin): 266-273. doi:10.1016/j.ceb.2008.03.002.
- Sekulic, Nikolina, Emily A Bassett, Danielle J Rogers, et Ben E Black. 2010. « The structure of (CENP-A-H4)₂ reveals physical features that mark centromeres ». *Nature* 467 (7313) (septembre 16): 347-351. doi:10.1038/nature09323.
- Shelby, R D, K Monier, et K F Sullivan. 2000. « Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication ». *The Journal of Cell Biology* 151 (5) (novembre 27): 1113-1118.
- Shelby, R D, O Vafa, et K F Sullivan. 1997. « Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites ». *The Journal of Cell Biology* 136 (3) (février 10): 501-513.
- Shi, Yujiang, Fei Lan, Caitlin Matson, Peter Mulligan, Johnathan R Whetstine, Philip A Cole, Robert A Casero, et Yang Shi. 2004. « Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1 ». *Cell* 119 (7) (décembre 29): 941-953. doi:10.1016/j.cell.2004.12.012.
- Shiio, Yuzuru, et Robert N Eisenman. 2003. « Histone sumoylation is associated with transcriptional repression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (23) (novembre 11): 13225-13230. doi:10.1073/pnas.1735528100.
- Shilatifard, Ali. 2006. « Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression ». *Annual Review of Biochemistry* 75: 243-269. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142422.
- Shuaib, Muhammad, Khalid Ouararhni, Stefan Dimitrov, et Ali Hamiche. 2010. « HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (4) (janvier 26): 1349-1354. doi:10.1073/pnas.0913709107.
- Simmen, K A, A Newell, M Robinson, J S Mills, G Canning, R Handa, K Parkes, N Borkakoti, et R Jupp. 1997. « Protein interactions in the herpes simplex virus type 1 VP16-induced complex: VP16 peptide inhibition and mutational analysis of host cell factor requirements ». *Journal of Virology* 71 (5) (mai): 3886-3894.
- Simpson-Holley, Martha, Joel Baines, Richard Roller, et David M Knipe. 2004. « Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery ». *Journal of Virology* 78 (11) (juin): 5591-5600. doi:10.1128/JVI.78.11.5591-5600.2004.
- Skok, J A, K E Brown, V Azuara, M L Caparros, J Baxter, K Takacs, N Dillon, et al. 2001. « Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes ». *Nature Immunology* 2 (9) (septembre): 848-854. doi:10.1038/ni0901-848.

- Sobol, Paul T, et Karen L Mossman. 2006. « ICP0 prevents RNase L-independent rRNA cleavage in herpes simplex virus type 1-infected cells ». *Journal of Virology* 80 (1) (janvier): 218-225. doi:10.1128/JVI.80.1.218-225.2006.
- Solovei, Irina, Antonio Cavallo, Lothar Schermelleh, Françoise Jaunin, Catia Scasselati, Dusan Cmarko, Christoph Cremer, Stanislav Fakan, et Thomas Cremer. 2002. « Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH) ». *Experimental Cell Research* 276 (1) (mai 15): 10-23. doi:10.1006/excr.2002.5513.
- Sorokin, A V, E R Kim, et L P Ovchinnikov. 2009. « Proteasome system of protein degradation and processing ». *Biochemistry. Biokhimiia* 74 (13) (décembre): 1411-1442.
- Spencer, C A, M E Dahmus, et S A Rice. 1997. « Repression of host RNA polymerase II transcription by herpes simplex virus type 1 ». *Journal of Virology* 71 (3) (mars): 2031-2040.
- Stoler, S, K C Keith, K E Curnick, et M Fitzgerald-Hayes. 1995. « A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis ». *Genes & Development* 9 (5) (mars 1): 573-586.
- Strahl, B D, et C D Allis. 2000. « The language of covalent histone modifications ». *Nature* 403 (6765) (janvier 6): 41-45. doi:10.1038/47412.
- Sugata, N, E Munekata, et K Todokoro. 1999. « Characterization of a novel kinetochore protein, CENP-H ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (39) (septembre 24): 27343-27346.
- Sugimoto, K, K Kuriyama, A Shibata, et M Himeno. 1997. « Characterization of internal DNA-binding and C-terminal dimerization domains of human centromere/kinetochore autoantigen CENP-C in vitro: role of DNA-binding and self-associating activities in kinetochore organization ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 5 (2) (avril): 132-141.
- Sugimoto, K, H Yata, Y Muro, et M Himeno. 1994. « Human centromere protein C (CENP-C) is a DNA-binding protein which possesses a novel DNA-binding motif ». *Journal of Biochemistry* 116 (4) (octobre): 877-881.
- Sullivan, B A, et S Schwartz. 1995. « Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres ». *Human Molecular Genetics* 4 (12) (décembre): 2189-2197.
- Sullivan, B, et G Karpen. 2001. « Centromere identity in *Drosophila* is not determined in vivo by replication timing ». *The Journal of Cell Biology* 154 (4) (août 20): 683-690. doi:10.1083/jcb.200103001.
- Sullivan, Beth A, et Gary H Karpen. 2004. « Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (11) (novembre): 1076-1083. doi:10.1038/nsmb845.
- Sullivan, K F, M Hechenberger, et K Masri. 1994. « Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere ». *The Journal of Cell Biology* 127 (3) (novembre): 581-592.
- Sun, Zu-Wen, et C David Allis. 2002. « Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast ». *Nature* 418 (6893) (juillet 4): 104-108. doi:10.1038/nature00883.
- Suzuki, M, S Okuyama, S Okamoto, K Shirasuna, T Nakajima, T Hachiya, H Nojima, S Sekiya, et K Oda. 1998. « A novel E2F binding protein with Myc-type HLH motif

- stimulates E2F-dependent transcription by forming a heterodimer ». *Oncogene* 17 (7) (août 20): 853-865. doi:10.1038/sj.onc.1202163.
- Suzuki, Nobutaka, Megumi Nakano, Naohito Nozaki, Shin-ichiro Egashira, Tuneko Okazaki, et Hiroshi Masumoto. 2004. « CENP-B interacts with CENP-C domains containing Mif2 regions responsible for centromere localization ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (7) (février 13): 5934-5946. doi:10.1074/jbc.M306477200.
- Szenker, Emmanuelle, Dominique Ray-Gallet, et Geneviève Almouzni. 2011. « The double face of the histone variant H3.3 ». *Cell Research* 21 (3) (mars): 421-434. doi:10.1038/cr.2011.14.
- Tagami, Hideaki, Dominique Ray-Gallet, Geneviève Almouzni, et Yoshihiro Nakatani. 2004. « Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis ». *Cell* 116 (1) (janvier 9): 51-61.
- Takahashi, K, E S Chen, et M Yanagida. 2000. « Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast ». *Science (New York, N.Y.)* 288 (5474) (juin 23): 2215-2219.
- Tanaka, Tomoyuki U, et Arshad Desai. 2008. « Kinetochore-microtubule interactions: the means to the end ». *Current Opinion in Cell Biology* 20 (1) (février): 53-63. doi:10.1016/j.ceb.2007.11.005.
- Tanaka, Y, O Nureki, H Kurumizaka, S Fukai, S Kawaguchi, M Ikuta, J Iwahara, T Okazaki, et S Yokoyama. 2001. « Crystal structure of the CENP-B protein-DNA complex: the DNA-binding domains of CENP-B induce kinks in the CENP-B box DNA ». *The EMBO Journal* 20 (23) (décembre 3): 6612-6618. doi:10.1093/emboj/20.23.6612.
- Tanaka, Yoshinori, Hitoshi Kurumizaka, et Shigeyuki Yokoyama. 2005. « CpG methylation of the CENP-B box reduces human CENP-B binding ». *The FEBS Journal* 272 (1) (janvier): 282-289. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04406.x.
- Tanaka, Yoshinori, Hiroaki Tachiwana, Kinya Yoda, Hiroshi Masumoto, Tsuneko Okazaki, Hitoshi Kurumizaka, et Shigeyuki Yokoyama. 2005. « Human centromere protein B induces translational positioning of nucleosomes on alpha-satellite sequences ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (50) (décembre 16): 41609-41618. doi:10.1074/jbc.M509666200.
- Tawaramoto, Maki S, Sam-Yong Park, Yoshinori Tanaka, Osamu Nureki, Hitoshi Kurumizaka, et Shigeyuki Yokoyama. 2003. « Crystal structure of the human centromere protein B (CENP-B) dimerization domain at 1.65-Å resolution ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (51) (décembre 19): 51454-51461. doi:10.1074/jbc.M310388200.
- Terranova, Rémi, Stephan Sauer, Matthias Merckenschlager, et Amanda G Fisher. 2005. « The reorganisation of constitutive heterochromatin in differentiating muscle requires HDAC activity ». *Experimental Cell Research* 310 (2) (novembre 1): 344-356. doi:10.1016/j.yexcr.2005.07.031.
- Thoma, F, T Koller, et A Klug. 1979. « Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin ». *The Journal of Cell Biology* 83 (2 Pt 1) (novembre): 403-427.
- Thomas, Clare E, Anja Ehrhardt, et Mark A Kay. 2003. « Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy ». *Nature Reviews. Genetics* 4 (5) (mai): 346-358. doi:10.1038/nrg1066.
- Thomas, J O, et P J Butler. 1980. « Size-dependence of a stable higher-order structure of chromatin ». *Journal of Molecular Biology* 144 (1) (novembre 25): 89-93.

- Thompson, R L, et N M Sawtell. 2001. « Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival ». *Journal of Virology* 75 (14) (juillet): 6660-6675. doi:10.1128/JVI.75.14.6660-6675.2001.
- . 2006. « Evidence that the herpes simplex virus type 1 ICP0 protein does not initiate reactivation from latency in vivo ». *Journal of Virology* 80 (22) (novembre): 10919-10930. doi:10.1128/JVI.01253-06.
- Thompson, Richard L, Chris M Preston, et Nancy M Sawtell. 2009. « De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from HSV latency in vivo ». *PLoS Pathogens* 5 (3) (mars): e1000352. doi:10.1371/journal.ppat.1000352.
- Thompson, Richard L, et Nancy M Sawtell. 2010. « Therapeutic implications of new insights into the critical role of VP16 in initiating the earliest stages of HSV reactivation from latency ». *Future Medicinal Chemistry* 2 (7) (juillet): 1099-1105. doi:10.4155/fmc.10.197.
- Timinszky, Gyula, Susanne Till, Paul O Hassa, Michael Hothorn, Georg Kustatscher, Bianca Nijmeijer, Julien Colombelli, et al. 2009. « A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (9) (septembre): 923-929. doi:10.1038/nsmb.1664.
- Tomazin, R, N E van Schoot, K Goldsmith, P Jugovic, P Sempé, K Früh, et D C Johnson. 1998. « Herpes simplex virus type 2 ICP47 inhibits human TAP but not mouse TAP ». *Journal of Virology* 72 (3) (mars): 2560-2563.
- Tomkiel, J, C A Cooke, H Saitoh, R L Bernat, et W C Earnshaw. 1994. « CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase ». *The Journal of Cell Biology* 125 (3) (mai): 531-545.
- Topp, Christopher N, Cathy X Zhong, et R Kelly Dawe. 2004. « Centromere-encoded RNAs are integral components of the maize kinetochore ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45) (novembre 9): 15986-15991. doi:10.1073/pnas.0407154101.
- Trazzi, Stefania, Roberto Bernardoni, Daniel Diolaiti, Valeria Politi, William C Earnshaw, Giovanni Perini, et Giuliano Della Valle. 2002. « In vivo functional dissection of human inner kinetochore protein CENP-C ». *Journal of Structural Biology* 140 (1-3) (décembre): 39-48.
- Trazzi, Stefania, Giovanni Perini, Roberto Bernardoni, Monica Zoli, Joseph C Reese, Andrea Musacchio, et Giuliano Della Valle. 2009. « The C-terminal domain of CENP-C displays multiple and critical functions for mammalian centromere formation ». *PLoS One* 4 (6): e5832. doi:10.1371/journal.pone.0005832.
- Trojer, Patrick, et Danny Reinberg. 2007. « Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? ». *Molecular Cell* 28 (1) (octobre 12): 1-13. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.011.
- Tsuduki, Tomohiro, Megumi Nakano, Nao Yasuoka, Saeko Yamazaki, Teruaki Okada, Yasuhide Okamoto, et Hiroshi Masumoto. 2006. « An artificially constructed de novo human chromosome behaves almost identically to its natural counterpart during metaphase and anaphase in living cells ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (20) (octobre): 7682-7695. doi:10.1128/MCB.00355-06.
- Tsukada, Yu-ichi, Jia Fang, Hediye Erdjument-Bromage, Maria E Warren, Christoph H Borchers, Paul Tempst, et Yi Zhang. 2006. « Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins ». *Nature* 439 (7078) (février 16): 811-816. doi:10.1038/nature04433.
- Turleau, Catherine, et Michel Vekemans. 2010. « [Trisomy 21: fifty years between medicine and science] ». *Médecine Sciences: M/S* 26 (3) (mars): 267-272. doi:10.1051/medsci/2010263267.

- Umbach, Jennifer L, Maria A Nagel, Randall J Cohrs, Donald H Gilden, et Bryan R Cullen. 2009. « Analysis of human alphaherpesvirus microRNA expression in latently infected human trigeminal ganglia ». *Journal of Virology* 83 (20) (octobre): 10677-10683. doi:10.1128/JVI.01185-09.
- Umbach, Jennifer L, Kening Wang, Shuang Tang, Philip R Krause, Erik K Mont, Jeffrey I Cohen, et Bryan R Cullen. 2010. « Identification of viral microRNAs expressed in human sacral ganglia latently infected with herpes simplex virus 2 ». *Journal of Virology* 84 (2) (janvier): 1189-1192. doi:10.1128/JVI.01712-09.
- Umbach, Jennifer Lin, Martha F Kramer, Igor Jurak, Heather W Karnowski, Donald M Coen, et Bryan R Cullen. 2008. « MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs ». *Nature* 454 (7205) (août 7): 780-783. doi:10.1038/nature07103.
- Vakoc, Christopher R, Sean A Mandat, Benjamin A Olenchock, et Gerd A Blobel. 2005. « Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin ». *Molecular Cell* 19 (3) (août 5): 381-391. doi:10.1016/j.molcel.2005.06.011.
- Valgardsdottir, Rut, Ilaria Chiodi, Manuela Giordano, Antonio Rossi, Silvia Bazzini, Claudia Ghigna, Silvano Riva, et Giuseppe Biamonti. 2008. « Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells ». *Nucleic Acids Research* 36 (2) (février): 423-434. doi:10.1093/nar/gkm1056.
- Van Hooser, A A, I I Ouspenski, H C Gregson, D A Starr, T J Yen, M L Goldberg, K Yokomori, W C Earnshaw, K F Sullivan, et B R Brinkley. 2001. « Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 19) (octobre): 3529-3542.
- Van Sant, C, R Hagglund, P Lopez, et B Roizman. 2001. « The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and possesses in vitro E3 ubiquitin ligase activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (15) (juillet 17): 8815-8820. doi:10.1073/pnas.161283098.
- Van Sant, C, Y Kawaguchi, et B Roizman. 1999. « A single amino acid substitution in the cyclin D binding domain of the infected cell protein no. 0 abrogates the neuroinvasiveness of herpes simplex virus without affecting its ability to replicate ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (14) (juillet 6): 8184-8189.
- Verdone, Loredana, Micaela Caserta, et Ernesto Di Mauro. 2005. « Role of histone acetylation in the control of gene expression ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 83 (3) (juin): 344-353. doi:10.1139/o05-041.
- Villar-Garea, Ana, et Axel Imhof. 2008. « Fine mapping of posttranslational modifications of the linker histone H1 from *Drosophila melanogaster* ». *PloS One* 3 (2): e1553. doi:10.1371/journal.pone.0001553.
- Voullaire, L E, H R Slater, V Petrovic, et K H Choo. 1993. « A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite, satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? ». *American Journal of Human Genetics* 52 (6) (juin): 1153-1163.
- Wade-Martins, R, R E White, H Kimura, P R Cook, et M R James. 2000. « Stable correction of a genetic deficiency in human cells by an episome carrying a 115 kb genomic transgene ». *Nature Biotechnology* 18 (12) (décembre): 1311-1314. doi:10.1038/82444.
- Wang, Qing-Yin, Changhong Zhou, Karen E Johnson, Robert C Colgrove, Donald M Coen, et David M Knipe. 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 (44) (novembre 1): 16055-16059. doi:10.1073/pnas.0505850102.
- Wang, Yanming, Joanna Wysocka, Joyce Sayegh, Young-Ho Lee, Julie R Perlin, Lauriebeth Leonelli, Lakshmi S Sonbuchner, et al. 2004. « Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination ». *Science (New York, N.Y.)* 306 (5694) (octobre 8): 279-283. doi:10.1126/science.1101400.
- Warburton, P E, C A Cooke, S Bourassa, O Vafa, B A Sullivan, G Stetten, G Gimelli, et al. 1997. « Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres ». *Current Biology: CB* 7 (11) (novembre 1): 901-904.
- Whitlow, Zackary, et Thomas M Kristie. 2009. « Recruitment of the transcriptional coactivator HCF-1 to viral immediate-early promoters during initiation of reactivation from latency of herpes simplex virus type 1 ». *Journal of Virology* 83 (18) (septembre): 9591-9595. doi:10.1128/JVI.01115-09.
- Wijeratne, Subhashinee S K, Gabriela Camporeale, et Janos Zemleni. 2010. « K12-biotinylated histone H4 is enriched in telomeric repeats from human lung IMR-90 fibroblasts ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (4) (avril): 310-316. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.01.010.
- Williams, Jessica S, Takeshi Hayashi, Mitsuhiro Yanagida, et Paul Russell. 2009. « Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin ». *Molecular Cell* 33 (3) (février 13): 287-298. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.017.
- Witt, O, W Albig, et D Doenecke. 1996. « Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene ». *Experimental Cell Research* 229 (2) (décembre 15): 301-306. doi:10.1006/excr.1996.0375.
- Wong, A K, et J B Rattner. 1988. « Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse ». *Nucleic Acids Research* 16 (24) (décembre 23): 11645-11661.
- Woodcock, Christopher L. 2006. « Chromatin architecture ». *Current Opinion in Structural Biology* 16 (2) (avril): 213-220. doi:10.1016/j.sbi.2006.02.005.
- Wu, D Y, G V Kalpana, S P Goff, et W H Schubach. 1996. « Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1 ». *Journal of Virology* 70 (9) (septembre): 6020-6028.
- Wysocka, Joanna, Michael P Myers, Carol D Laherty, Robert N Eisenman, et Winship Herr. 2003. « Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1 ». *Genes & Development* 17 (7) (avril 1): 896-911. doi:10.1101/gad.252103.
- Yang, C H, J Tomkiel, H Saitoh, D H Johnson, et W C Earnshaw. 1996. « Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C ». *Molecular and Cellular Biology* 16 (7) (juillet): 3576-3586.
- Yao, F, et P A Schaffer. 1994. « Physical interaction between the herpes simplex virus type 1 immediate-early regulatory proteins ICP0 and ICP4 ». *Journal of Virology* 68 (12) (décembre): 8158-8168.
- Yoda, K, S Ando, S Morishita, K Houmura, K Hashimoto, K Takeyasu, et T Okazaki. 2000. « Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (13) (juin 20): 7266-7271. doi:10.1073/pnas.130189697.

- Yoda, K, S Ando, A Okuda, A Kikuchi, et T Okazaki. 1998. « In vitro assembly of the CENP-B/alpha-satellite DNA/core histone complex: CENP-B causes nucleosome positioning ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 3 (8) (août): 533-548.
- Yoda, K, et T Okazaki. 1997. « Site-specific base deletions in human alpha-satellite monomer DNAs are associated with regularly distributed CENP-B boxes ». *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology* 5 (3) (mai): 207-211.
- Yoshida, M, R Furumai, M Nishiyama, Y Komatsu, N Nishino, et S Horinouchi. 2001. « Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 48 Suppl 1 (août): S20-26.
- Zaratiegui, Mikel, Matthew W Vaughn, Danielle V Irvine, Derek Goto, Stephen Watt, Jürg Bähler, Benoit Arcangioli, et Robert A Martienssen. 2011. « CENP-B preserves genome integrity at replication forks paused by retrotransposon LTR ». *Nature* 469 (7328) (janvier 6): 112-115. doi:10.1038/nature09608.
- Zeitlin, S G, C M Barber, C D Allis, K F Sullivan, et K Sullivan. 2001. « Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G2/M ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 4) (février): 653-661.
- Zeitlin, S G, R D Shelby, et K F Sullivan. 2001. « CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis ». *The Journal of Cell Biology* 155 (7) (décembre 24): 1147-1157. doi:10.1083/jcb.200108125.
- Zeitlin, Samantha G, Norman M Baker, Brian R Chapados, Evi Soutoglou, Jean Y J Wang, Michael W Berns, et Don W Cleveland. 2009. « Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37) (septembre 15): 15762-15767. doi:10.1073/pnas.0908233106.
- Zgheib, Omar, Kristopher Pataky, Juergen Brugger, et Thanos D Halazonetis. 2009. « An oligomerized 53BP1 tudor domain suffices for recognition of DNA double-strand breaks ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (4) (février): 1050-1058. doi:10.1128/MCB.01011-08.
- Zhang, Y, et C Jones. 2001. « The bovine herpesvirus 1 immediate-early protein (bICP0) associates with histone deacetylase 1 to activate transcription ». *Journal of Virology* 75 (20) (octobre): 9571-9578. doi:10.1128/JVI.75.20.9571-9578.2001.
- Zhang, Yange, Yunquan Jiang, Vicki Geiser, Joe Zhou, et Clinton Jones. 2006. « Bovine herpesvirus 1 immediate-early protein (bICP0) interacts with the histone acetyltransferase p300, which stimulates productive infection and gC promoter activity ». *The Journal of General Virology* 87 (Pt 7) (juillet): 1843-1851. doi:10.1099/vir.0.81766-0.
- Zhou, Changhong, et David M Knipe. 2002. « Association of herpes simplex virus type 1 ICP8 and ICP27 proteins with cellular RNA polymerase II holoenzyme ». *Journal of Virology* 76 (12) (juin): 5893-5904.
- Zhou, Wenlai, Ping Zhu, Jianxun Wang, Gabriel Pascual, Kenneth A Ohgi, Jean Lozach, Christopher K Glass, et Michael G Rosenfeld. 2008. « Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation ». *Molecular Cell* 29 (1) (janvier 18): 69-80. doi:10.1016/j.molcel.2007.11.002.
- Zhu, X X, J X Chen, C S Young, et S Silverstein. 1990. « Reactivation of latent herpes simplex virus by adenovirus recombinants encoding mutant IE-0 gene products ». *Journal of Virology* 64 (9) (septembre): 4489-4498.

Study of the protein and chromatin structures destabilization of centromeres by the herpes simplex virus type 1 protein ICP0

The *Herpes Simplex type 1* (HSV-1) virus possesses a bimodal mode of infection. It can either replicate in an active way during the lytic cycle, or it can infect neurons and stay in latency. HSV-1 reactivates from latently infected neurons for re-establishing a lytic infection. A major viral protein implicated in reactivation is ICP0. It is a nuclear E3 ubiquitin-ligase, which has the particularity to induce the proteasome-mediated degradation of several constitutive centromeric proteins. This activity severely destabilizes the interphase centromere. My team has discovered a novel cellular response triggered by the destabilization of centromeres by ICP0, called iCDR (interphase Centromere Damage Response). The general aim of my thesis is to determine the centromere structural modifications induced by ICP0 that can trigger the iCDR and probably the reactivation. I was able to demonstrate that ICP0 affected the entire proteinaceous structure of interphase centromeres. Following this, I showed by micrococcal nuclease (MNase) digestion approach that the nucleosomal organization of centromeric chromatin was significantly affected by ICP0. An *in vivo* study in nervous tissues coming from latently infected mice enabled to show a co-localization between latent HSV-1 genomes and centromeres. This co-localisation is linked to a transcriptional repression of the virus. The results of my thesis show that the destabilization of centromere by ICP0 correlates with a role of the centromeres during latency. This strongly suggests an implication of centromere destabilization in the ICP0-controlled reactivation process.

Etude de la déstabilisation des structures protéique et chromatinienne des centromères par la protéine ICP0 du virus Herpes Simplex de Type 1 (HSV-1)

Le virus *Herpes Simplex de type 1* (HSV-1) possède un mode d'infection particulier dit bimodal. Il peut soit se répliquer de manière active lors d'une phase dite lytique soit migrer dans les neurones et rester en latence. Il peut réactiver pour rétablir une infection lytique. Une protéine virale majeure dans la réactivation de HSV-1 est ICP0. C'est une protéine nucléaire à activité E3 ubiquitine ligase, qui possède la particularité d'induire la dégradation par le protéasome de plusieurs protéines centromériques constitutives, ce qui provoque une déstabilisation du centromère interphasique. Mon équipe a découvert une réponse cellulaire à l'instabilité centromérique, induite par la protéine ICP0, et nommée iCDR (pour interphase Centromere Damage Response.). L'objectif général de ma thèse est de déterminer les modifications structurales que subissent les centromères endommagés par ICP0 à l'origine de l'iCDR et probablement de la réactivation. J'ai pu démontrer qu'ICP0 affectait toute la structure protéique étroitement associée aux centromères durant l'interphase. Suite à ces résultats, j'ai pu démontrer, par des analyses de digestion de chromatine à la nucléase micrococcocale (MNase), que l'occupation nucléosomique de la chromatine centromérique suite à l'activité d'ICP0 était affectée de façon significative. Une étude *in vivo* effectuée à partir de tissus nerveux provenant de souris infectées de manière latente, a permis de démontrer une co-localisation entre les génomes HSV-1 latents et les centromères. Cette co-localisation est associée à une répression transcriptionnelle du virus. Les résultats de ma thèse montrent donc que les effets d'ICP0 sur la déstabilisation des centromères sont en relation avec un rôle de ces centromères durant la latence. Ceci suggère fortement une implication de la déstabilisation des centromères dans le processus de réactivation contrôlé par ICP0.

Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire, virologie

Mots-clés : HSV-1, ICP0, protéines centromériques (CENPs), centromère, chromatine

Intitulé et adresse de l'U.F.R ou du laboratoire : Équipe « Virus et centromères » dirigée par Patrick Lomonte dans le centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire (CG ϕ MC). CNRS UMR-5534. Université Claude Bernard Lyon 1. 16 rue Raphaël Dubois 69622 Villeurbanne Cedex