

Interaction des ARNS rétroviraux antisens avec la déméthylase spécifique de la Lysine 1

Auteur : Dupont, Clotilde

Promoteur(s) : Willems, Luc

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2017-2018

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/5157>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

INTERACTION DES ARNS RETROVIRAUX ANTISENS AVEC LA DEMETHYLASE SPECIFIQUE DE LA LYSINE 1

CLOTILDE DUPONT

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

ANNEE ACADEMIQUE 2017-2018

PROMOTEUR : LUC WILLEMS

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique¹ de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

¹ L'autorité académique est représentée par le promoteur, membre du personnel enseignant de GxABT (L.Willems)

INTERACTION DES ARNS RETROVIRAUX ANTISENS AVEC LA DEMETHYLASE SPECIFIQUE DE LA LYSINE 1

CLOTILDE DUPONT

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

ANNEE ACADEMIQUE 2017-2018

PROMOTEUR : LUC WILLEMS

Institution d'accueil

Le présent travail de fin d'études a été réalisé au sein du *Laboratory of cellular and molecular epigenetics* faisant partie du département de recherche GIGA-cancer, situé à Liège (Liège université – GIGA institute).

Remerciements

Par ces quelques mots, je tiens à remercier toutes les personnes ayant pris part à la réalisation de ce projet d'étude, quelle que soit leur contribution.

En premier lieu, je voudrais remercier Monsieur Willems, mon promoteur, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon travail de fin d'études dans son équipe, au sein du GIGA.

Je souhaite également remercier le professeur Chatelain pour avoir pris le temps de m'écouter et de me conseiller.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe du laboratoire d'épigénétique pour leur accueil, leurs conseils, leurs encouragements mais aussi pour avoir pris le temps de m'expliquer les techniques nécessaires à mon apprentissage. Plus particulièrement, je remercie Madame Hélène Gazon pour son encadrement tout au long de ce travail.

J'aimerais aussi remercier Clotilde pour ses conseils et son écoute. Isaline et Gaëlle, mes « collègues », ainsi que Estelle, pour leur bonne humeur et les discussions échangées le temps de quelques trajets.

Je remercie également mes amies pour leur soutien et leurs encouragements. Leslie pour tous ces blocus passés à se motiver l'une l'autre. Clémentine pour avoir été une super partenaire de travail et pour m'avoir toujours supportée pendant ces longues années d'études. Marie, Valentine, Joanna, Coralie, Mégane et Virginie pour tous ces petits moments partagés qui m'ont permis de changer d'air.

Enfin, le meilleur pour la fin, merci à mes parents, mon frère et mon compagnon pour m'avoir soutenue tout au long de ces années d'études. Ça n'a pas toujours été facile mais vous étiez toujours là pour m'aider à tenir le coup.

Résumé

Les virus HTLV (*Human T-cell leukemia virus*) et BLV (*Bovine leukemia virus*) sont des rétrovirus étroitement apparentés du genre Deltarétrovirus. Tous deux sont à l'origine de maladies hématologiques agressives et fatales ayant pour cibles les lymphocytes T (HTLV) et B (BLV). En outre, HTLV est également responsable d'une maladie inflammatoire (HAM/TSP). Ces virus ont pour particularité qu'ils présentent une période de latence au cours de laquelle les individus sont considérés comme porteurs asymptomatiques. Notre hypothèse de travail postule que les transcrits antisens sont impliqués dans la répression de la transcription sens, ce qui constitue une piste quant aux mécanismes associés à l'évasion immunitaire. Les objectifs de ce travail consistent à évaluer (1) l'interaction entre les ARNs rétroviraux antisens et la déméthylase spécifique de la lysine 1 (LSD1) et (2) leur effet sur la transactivation du promoteur viral par la protéine Tax. Les résultats révèlent l'existence d'une interaction entre LSD1 et les ARNs antisens de BLV et HTLV-2, ainsi qu'un effet répresseur de LSD1 et l'ARN antisens de HTLV-1 sur la transactivation du promoteur LTR. Ces recherches sont destinées à mieux comprendre les mécanismes associés à la latence virale.

Abstract

The viruses HTLV (Human T-cell leukemia virus) and BLV (Bovine leukemia virus) are closely related retroviruses classified in the genus Deltaretrovirus. Both are responsible for aggressive and fatal haematological diseases that target T-cells (HTLV) or B-cells (BLV). In addition, HTLV is also responsible for an inflammatory disease (HAM/TSP). Those viruses have the particular feature of having a latency stage during which individuals are considered as asymptomatic carriers. Our working hypothesis postulates that antisense transcripts are involved in the repression of the sense transcription, which constitutes a path of the mechanisms associated to immune escape. The objectives of this study are to evaluate (1) the interaction between the antisense retroviral RNAs and the lysine specific demethylase 1 (LSD1) and (2) their effect on the transactivation of the viral promoter by the viral protein Tax. Results show the existence of an interaction between LSD1 and the BLV/HTLV-2 antisense RNAs and a repressor effect of LSD1 and HTLV-1 antisense RNA on the transactivation of the LTR promoter. This research aims to lead to a better understanding of the mechanisms associated with viral latency.

Liste des abréviations

%	Pourcent
°C	Degrés Celsius
µg	Micro gramme
µM	Micro molaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
AO	Domaine amine-oxydase
APH2	Antisens protein HTLV-2
ARN	Acide ribonucléique
AS RNA	ARN antisens BLV
ATL	Leucémie à cellules T de l'adulte
BCA	Acide bicinchoninique
BLV	Bovine leukemia virus
BSA	Albumin fraktion
CA	Capside
CD4+	Lymphocytes T CD4+
CD8+	Lymphocytes T CD8+
cDNA	ADN complémentaire
CH2O	Formaldéhyde
cm	Centimètre
CO2	Dioxyde de carbone
CoREST/REST	Complexe répresseur de transcription
Ct	Cycle seuil (en PCR)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Désoxyribonucléotides
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffer Saline
Ezh2	Enhancer zeste homologue 2
FAD	Cofacteur flavine-adénine dinucléotide
FBS	Fetal bovine serum
FT	Facteur de transcription
FW	Forward
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
H3K27me3	Triméthylation de la lysine 27 située à l'extrémité N-terminal de l'histone 3
H3K4me1/2	Mono ou diméthylation de la lysine 4 située à l'extrémité N-terminal de l'histone 3
H3K9me1/2	Mono ou diméthylation de la lysine 9 située à l'extrémité N-terminal de l'histone 3
HAM/TSP	Myélopathie associée à HTLV-1/ Paraparésie spastique tropicale
HBZ	HTLV-1 bZIP factor
HIV	Human immunodeficiency virus
HOTAIR	Hox transcript antisens RNA
HTLV-1/2	Human T-cell leukemia virus 1 ou 2

IN	Intégrase
LB	Bouillon lysogène
lncRNA	Long ARN non codant
LP	Lymphocytose permanente
LSD1	Lysine-specific histone demethylase
LTR	Long terminal repeat
MA	Matrice
ml	Millilitre
MLL	Complexe coactivateur de la lysine méthyltransférase en lignée mixte leucémique
ncRNA	ARN non codant
nm	Nanomètre
NuRD	Complexe de remodelage et déacétylation du nucléosome
O ₂	Dioxygène
PLB	Passive lysis buffer
Polarité +/-	Polarité positive /négative
PRC2	Polycomb repressive complex
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
Rev	Reverse
RIP	RNA-immunoprecipitation
RT	Reverse transcriptase
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SU	Protéine de surface
TBS	Tris-Buffered saline
TBST	TBS + Tween 1%
TM	Protéine transmembranaire

Liste des figures

Figure 1 - Classification des rétrovirus selon le <i>Fenner and White's Medical Virology</i>	3
Figure 2 - Représentation de l'organisation du génome rétroviral, avec BLV pour exemple de rétrovirus complexe.....	3
Figure 3 - Structure générale du virion.	4
Figure 4 - Illustration des états de la chromatine.	11
Figure 5 - Mécanisme de déméthylation d'une lysine monométhylée par LSD1.....	12
Figure 6 - Modélisation de l'interaction de HOTAIR avec des complexes régulateurs épigénétiques.....	14
Figure 7 - Illustration de l'interaction entre l'ADN et la membrane de Silice.....	18
Figure 8 - Composition des gels d'électrophorèse par Western Blot	20
Figure 9 - Représentation du complexe d'immunoprécipitation	23
Figure 10 - Schématisation du processus d'immunoprécipitation d'ARN.....	23
Figure 11 - Principe d'expérimentation en vue de tester l'expression de la protéine LSD1.....	28
Figure 12 - Expression et quantification du modulateur épigénétique LSD1, sous forme protéique, dans les cellules HEK293T.	29
Figure 13 - Quantification relative de l'ARNm du modulateur épigénétique LSD1 et des ARNs antisens exprimés.	30
Figure 14 - Principe de l'immunoprécipitation d'ARN..	31
Figure 15 - Expression du modulateur épigénétique LSD1 dans les cellules HEK293T après immunoprécipitation d'ARN.....	32
Figure 16 - Interaction des ARNs rétroviraux avec LSD1.....	33
Figure 17 - Principe des expérimentations en essais luciférase.	34
Figure 18 - Essais du rapporteur luciférase pour l'activation du promoteur LTR dans les cellules CHO-K1-LTR.	35
Figure 19 - Méthode d'immunoprécipitation de la chromatine combinée au séquençage pour la détection de modifications d'histones.....	39
Figure 20 - Méthode d'isolation de la chromatine par purification de l'ARN.....	40

Table des matières

<i>Objectifs du travail de fin d'études</i>	1
<i>Introduction</i>	2
1. Rétrovirus.....	2
1.1. Structure.....	3
1.2. Cycle de réplication	4
2. ARN rétroviraux antisens	5
2.1. HTLV.....	6
2.2. BLV	9
3. Les modulateurs épigénétiques	10
3.1. LSD1.....	11
3.2. HOTAIR	13
<i>Matériel et méthodes</i>	15
1. Outils.....	15
1.1. Lignées cellulaires et culture	15
1.2. Plasmides	15
1.3. Amorces	16
2. Amplification de plasmides	17
2.1. Cultures bactériennes.....	17
2.2. Pré-culture	18
2.3. Midi culture	18
2.4. Extraction d'ADN plasmidique	18
2.5. Quantification	18
3. Étude de l'effet de l'expression des ARNs antisens sur l'expression du modulateur épigénétique LSD1	19
3.1. Ensemencement et transfection	19
3.2. Analyse par Western Blot	19
Extraction et dosage protéique.....	19
Migration, transfert et révélation des protéines	20
4. Traitement des cellules et étude d'interaction (RIP).....	22
4.1. Ensemencement et transfection	22
4.2. Traitement par UV-crosslinking.....	22
4.3. Immunoprécipitation d'ARN (RIP)	22
Préparation de l'immunoprécipitation.....	22
Réaction d'immunoprécipitation (RIP)	24
4.4. Analyse par Western Blot	24
4.5. Analyse par RT-qPCR.....	24
Extraction ARN	25
Transcription inverse.....	25
Quantification relative par qPCR	26
5. Essais luciférase	27
5.1. Ensemencement et transfection	27
5.2. Lecture par luminométrie	27
<i>Résultats</i>	28
1. Expression du modulateur épigénétique LSD1.....	28
1.1. Analyse de l'expression de LSD1 sous sa forme protéique suite à l'expression des ARNs antisens rétroviraux	28
1.2. Analyse de l'expression de l'ARNm de LSD1 suite à l'expression des ARNs antisens rétroviraux	29

2. RNA-immunoprécipitation : interaction protéine-ARN	30
2.2. Hypothèse d'interaction.....	32
3. Essais luciférase	33
<i>Discussion</i>	36
<i>Conclusion</i>	40

Objectifs du travail de fin d'études

Les rétrovirus HTLV et BLV sont tous deux responsables de maladies agressives ayant une issue fatale pour l'hôte infecté. La plupart des individus sont des porteurs asymptomatiques pendant la majeure partie de leur vie, ce qui correspond à la phase de latence caractéristique de ces virus. Toutefois les mécanismes qui y sont associés sont encore méconnus. Par ailleurs, ces deux virus codent pour des transcrits antisens auxquels un rôle de lncRNA semble pouvoir être associé en raison de leur localisation principalement nucléaire et d'un faible taux de traduction observé. L'hypothèse selon laquelle ces transcrits seraient responsables de modifications épigénétiques, et donc du phénomène de latence virale, par interaction avec des facteurs tels que des modulateurs épigénétiques peut être avancée.

Dès lors, le premier objectif de ce travail consistait à déterminer si il existe ou non une interaction entre les ARNs rétroviraux antisens et un modulateur épigénétique connu pour sa capacité à induire la répression de l'expression des gènes, l'histone déméthylase spécifique de la lysine 1 (LSD1). Pour y répondre, des analyses par Western Blot et RT-qPCR ont été réalisées sur des cellules traitées par UV-crosslinking en vue d'analyser les complexes protéine-ARN formés.

D'autre part, le second objectif portait sur l'analyse de l'effet induit sur la transactivation du promoteur LTR par la protéine Tax, lorsque celle-ci est exprimée en présence de l'ARN antisens HBZ et/ou de la protéine LSD1. Dans l'intention d'y répondre, des essais luciférase ont été conduits sur des cellules dont le génome présente une construction particulière : un promoteur LTR associé au gène rapporteur de la luciférase.

Introduction

1. Rétrovirus

Les virus sont des agents biologiques infectieux qui utilisent les mécanismes de transcription de la cellule hôte afin de se répliquer. Certains virus s'intègrent dans le génome hôte. C'est notamment le cas de la famille des *Retroviridae* (De Brogniez and Willems 2016). C'est en 1904 que fut décrit le premier rétrovirus. De manière générale, il a pu être établi que le matériel génétique primaire des virus appartenant à cette famille se présente sous forme d'ARN simple brin. Dès lors, la caractéristique commune aux rétrovirus est leur capacité à réaliser la transcription inverse. Cette idée selon laquelle le matériel génétique ARN peut être rétro-transcrit en ADN a complètement chamboulé les concepts préexistants sur la transmission génétique. En effet, il avait été établi que la conversion de l'ADN en ARN était une étape unidirectionnelle (Karn 2001). En outre, une attention particulière a été portée à l'étude des rétrovirus en raison de leur implication dans le développement de cancers. En effet, ceux-ci sont associés à de graves maladies autant chez l'homme que chez les animaux, tels que le syndrome d'immunodéficience acquise (AIDS) ou encore la paraparésie spastique tropicale (connue aussi sous le nom de myélopathie associée).

La famille des rétrovirus est subdivisée en sept genres, répartis en deux sous-familles. On retrouve notamment le virus du sida (HIV) du genre *Lentivirus* mais également le virus T-lymphotropique humain (HTLV) et le virus de la leucémie bovine (BLV) du genre *Deltaretrovirus*, auxquels nous nous intéresserons plus particulièrement par la suite (Burrell et al., 2017). La classification en genre se base sur la morphologie des virions, la stratégie de répllication, etc. En d'autres termes, les rétrovirus sont classés selon leur degré d'évolution.

Subfamily Orthoretrovirinae	
Genus	Examples of Species
<i>Alpharetrovirus</i>	Avian leukosis virus; Rous sarcoma virus
<i>Betaretrovirus</i>	Mouse mammary tumor virus
<i>Gammaretrovirus</i>	Murine leukemia virus; feline leukemia virus; Moloney murine sarcoma virus
<i>Deltaretrovirus</i>	Bovine leukemia virus; human T-lymphotropic virus 1 and 2; simian T-lymphotropic virus 1 and 2
<i>Epsilonretrovirus</i>	Walleye dermal sarcoma virus
<i>Lentivirus</i>	Human immunodeficiency virus 1 and 2; simian immunodeficiency virus; feline immunodeficiency virus; equine infectious anemia; bovine immunodeficiency virus; caprine arthritis encephalitis virus; visna virus
Subfamily Spumaretrovirinae	
<i>Spumavirus</i>	Simian foamy virus

Figure 1 - Classification des rétrovirus selon le *Fenner and White's Medical Virology*
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123751560000230>

1.1. Structure

Le provirus comprend deux régions identiques et non-codantes à ses extrémités 5' et 3', appelées *long terminal repeat* (LTR). Ces régions sont subdivisées en trois parties : U3, R, U5 (Barbeau and Mesnard 2011). Par ailleurs, on distingue deux classes de rétrovirus selon leur niveau d'organisation. Les rétrovirus dit « simples » ne présentent que les quatre principales régions codantes (*gag*, *pro*, *pol* et *env*), alors que ceux dit « complexes » présentent également des séquences codantes pour d'autres gènes (De Brogniez and Willems 2016).

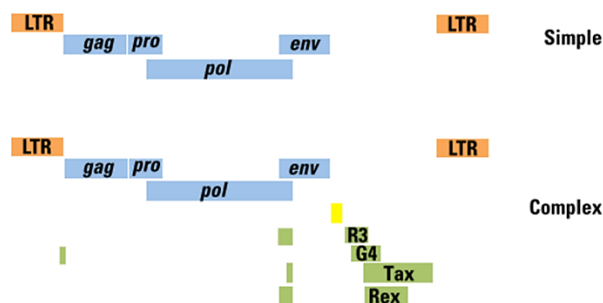


Figure 2 - Représentation de l'organisation du génome rétroviral, avec BLV pour exemple de rétrovirus complexe. (De Brogniez and Willems 2016) <http://boutique.oie.int/extrait/11debrognez133142.pdf>

Les principales régions codantes communes aux formes simples et complexes sont impliquées dans la production des protéines de structure du virion. En outre, le gène *gag* est responsable de la synthèse des protéines constitutives de la matrice (MA), de la capsidie (CA), ainsi que de la nucléocapsidie (NC). C'est une protéase codée par le gène *pro*, qui est responsable du

clivage des protéines. Quant au gène *pol*, il contient l'information nécessaire à la synthèse de deux enzymes primordiales : la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Enfin, les protéines de surface (SU) et les protéines transmembranaires (TM), qui une fois associées à des éléments de la membrane de la cellule hôte forment l'enveloppe virale, sont synthétisées à partir du gène *env*.

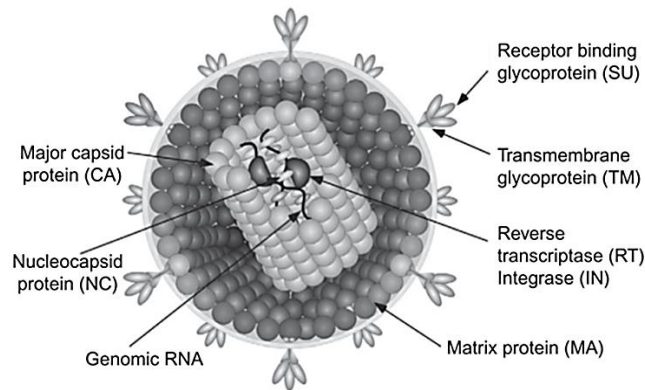


Figure 3 - Structure générale du virion. La capsidie enveloppant les deux copies d'acide ribonucléique se présente sous forme icosaédrique. De plus, les Deltaretrovirus auxquels cette étude s'intéresse, présentent un noyau cylindrique. (MacLachlan, Dubovi et al., 2017)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128009468000143>

Une particule virale de 80 à 100 nm de diamètre et un génome ARN de 7 à 12 kb sont caractéristiques des virus à enveloppe de la famille des *Retroviridae*.

1.2. Cycle de réplication

Le cycle de réplication peut être considéré comme constitué de quatre phases distinctes : l'infection, la transcription inverse et l'intégration, l'expression des gènes viraux et enfin, l'assemblage du virus et sa maturation (Karn 2001).

La pénétration du virus dans la cellule hôte est initiée par l'adsorption des glycoprotéines SU de l'enveloppe virale à la surface de la membrane cellulaire et l'établissement d'interactions spécifiques avec des récepteurs situés sur la membrane. Ces liaisons entraînent des modifications de conformation des protéines SU et TM, permettant ainsi la fusion avec la membrane et la libération du matériel génétique dans le cytoplasme cellulaire.

La transcription inverse de l'ARN rétroviral en ADN double brin est catalysée par la RT. Un premier brin d'ADN complémentaire (cDNA) est donc synthétisé. Suite à cela, l'activité RNaseH de l'enzyme permet d'éliminer le brin d'ARN parent afin que puisse avoir lieu la synthèse du double brin. C'est à ce moment-là qu'a également lieu la synthèse des extrémités LTR. Dès lors, l'ADN viral nouvellement constitué est transféré vers le noyau où il peut former un complexe avec l'enzyme IN ainsi que d'autres protéines cellulaires. L'intégration

de l'ADN viral conduit à une association stable du génome viral (appelé provirus) au génome hôte, permettant ainsi sa transcription. Certains rétrovirus infectent uniquement les cellules en division car ils dépendent des perturbations imposées à la membrane nucléaire pour pouvoir pénétrer dans le noyau, alors que d'autres utilisent des voies actives de transport.

Une fois intégré, le provirus tire parti des mécanismes de transcription de la cellule hôte. C'est alors que le promoteur LTR 5' entre en jeu, puisque c'est là que se trouve le site d'initiation de la transcription ainsi que différents éléments de régulation.

Finalement, les protéines constitutives (MA, CA, NC) ainsi que l'ARN génomique et les enzymes, se rassemblent pour former le virion. Celui-ci est alors libéré dans le milieu extracellulaire par « bourgeonnement » à travers des domaines membranaires appelés radeaux lipidiques.

(De Brogniez and Willems 2016; Burrell, Howard, and Murphy 2017; Karn 2001; MacLachlan et al. 2017; Nisole and Saïb 2004)

Toutefois, il existe une phase supplémentaire bien particulière dans le cycle de vie des rétrovirus : l'infection latente. En effet, certains individus infectés peuvent rester des porteurs asymptomatiques pendant plusieurs années avant que la maladie ne se déclare. Cela est dû au fait que sous certaines conditions, le provirus est bien présent dans le génome des cellules mais reste transcriptionnellement inactif. Il n'y a donc pas production de particules virales et on parle alors de cellules « réservoirs ». Après stimulation, la transcription peut être à nouveau activée (Zhang, Ma, Jing et al., 2018).

Enfin, de récentes avancées ont permis de montrer qu'outre l'implication d'une majeure partie de protéines dans le processus de régulation du cycle des virus, un nombre croissant de longs ARNs non codants (lncRNAs) a été identifié comme intervenant dans le processus (Z. Wang, Zhao, and Zhang 2017).

2. ARN rétroviraux antisens

Par définition, la transcription sens correspond à la synthèse d'un transcrite similaire au brin sens (polarité +), l'ARN sens. Par opposition, la transcription antisens correspond dès lors à la synthèse d'un transcrite similaire au brin antisens (polarité -), l'ARN antisens (Douceron et al., 2010). Si les mécanismes et rôles associés aux ARNs et protéines résultants de la transcription sens sont assez bien connus de nos jours, il n'en est pas de même pour la transcription

antisens. Pourtant, la découverte des transcrits antisens chez HIV et HTLV-1 ne date pas d'hier (Landry et al. 2007; Larocca et al. 1989; Miller 1988). Bien que controversé pendant des années, ce mécanisme de transcription est aujourd'hui reconnu pour bien des virus, tels que HTLV-2, BLV et d'autres également (Briquet et al., 2001; Durkin et al., 2016; Halin et al., 2009; Rasmussen et al., 2010).

La transcription antisens est rendue possible grâce à la présence de cadres de lecture ouverts (ORF – *open reading frame*) sur le brin de polarité négative. De plus, des études ont permis de démontrer le caractère bidirectionnel des promoteurs LTR, dès lors capables d'induire la transcription sens et antisens (Arpin-André et al., 2014). Par conséquent, la transcription sens est initiée au LTR 5' alors que la transcription antisens est, elle, initiée à partir du LTR 3'.

En outre, il a été reconnu que la transcription antisens peut influencer l'expression des gènes par la production de ncRNAs. Certains ARNs antisens ont d'ailleurs déjà été identifiés comme acteurs dans des mécanismes épigénétiques de répression des gènes. C'est notamment le cas de HOTAIR, un long ARN antisens non codant (Bhan & Mandal, 2015; Egger et al., 2004; Pelechano & Steinmetz, 2013). Il apparaît également que la plupart des ARNs antisens sont souvent présents au niveau du noyau des cellules infectées, ce qui suggère une fonction de lncRNA et donc un rôle dans la régulation épigénétique des gènes. On observe aussi une alternance entre transcription sens et antisens, la présence d'ARNs antisens concordant généralement avec un état de latence du virus (Gazon et al. 2018; Zhang et al. 2018). Par ailleurs, il n'est plus à prouver que ces lncRNAs peuvent jouer un rôle dans le cycle de vie du virus, notamment par le biais du maintien de la latence virale mais aussi en étant antagonistes de la réponse immunitaire de l'hôte (Z. Wang, Zhao, and Zhang 2017).

2.1. HTLV

Le virus T-lymphotropique humain 1 (HTLV-1) est le premier rétrovirus humain découvert en 1980. La transmission dans les zones endémiques se fait principalement par transfert de cellules infectées de la mère à l'enfant par l'allaitement maternel ou par contacts sexuels.

Il existe également un autre type, HTLV-2, apparenté au virus HTLV-1 (Burrell, Howard, and Murphy 2017; Gillet, Kettmann, and Willems 2007; Matsuoka and Jeang 2007). Bien qu'ils soient étroitement liés d'un point de vue structure du génome, ces deux rétrovirus présentent des répartitions géographiques, des propriétés pathogéniques ou encore des manifestations cliniques différentes (Ciminale et al., 2014; Paiva & Casseb, 2015).

Le virus HTLV-1 est endémique dans de nombreuses parties du monde. On le retrouve notamment au Sud-Ouest du Japon, dans certaines îles des Caraïbes mais aussi en Afrique Centrale et Afrique du Sud ainsi qu'en Amérique du Sud et Australo-Mélanésie. HTLV-2 quant à lui est plus répandu chez les populations autochtones d'Amérique et certaines tribus pygmées en Afrique. Mais il est surtout très présent dans les zones urbaines aux États-Unis, en Europe et en Amérique latine où on retrouve des consommateurs de drogues. Tous deux sont également assez répandus parmi la population indigène Brésilienne avec toutefois une prédominance de HTLV-2 (Burrell, Howard, and Murphy 2017; Paiva and Casseb 2015).

Par ailleurs, HTLV-1 et 2 infectent les lymphocytes T. Plus précisément, HTLV-1 est dirigé contre les CD4+ alors que HTLV-2 est plutôt dirigé contre les CD8+ (Ciminale et al. 2014). Si HTLV-2 est rarement considéré comme pathogénique, HTLV-1 est quant à lui responsable de la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) et d'une maladie neurodégénérative, la myélopathie associée à HTLV ou paraparésie spastique tropicale (HAM/TSP). L'ATL peut être subdivisée en cinq stades. La majorité des personnes infectées resteront au stade 1, c'est-à-dire des porteurs asymptomatiques. Bien qu'ils ne présentent aucun signes cliniques, ils n'en restent pas moins capables de transmettre le virus. Le stade 2 est un stade pré-leucémique, suivi du stade 3 correspondant à une ATL chronique. Les stades 4 et 5 correspondent respectivement à l'établissement du lymphome et d'une ATL aiguë. Seul 1 à 2% des patients progresseront vers une ATL (Kannian and Green 2010). Malheureusement pour ces derniers, il s'agit d'une leucémie très agressive et qui tend à résister aux traitements chimiothérapeutiques classiques, ne laissant alors qu'une mince chance de survie d'environ 2 ans. Pour en revenir à la HAM/TSP, il s'agit d'une maladie induisant la paralysie des membres inférieurs. Celle-ci est due à une inflammation chronique du système nerveux central probablement liée à la présence de CD4+ infectés au niveau de la moelle épinière. Les symptômes caractéristiques sont notamment la rigidité des jambes dont découle une démarche anormale, ainsi qu'un dysfonctionnement urinaire (Gillet, Kettmann, and Willems 2007).

Le virus HTLV-2 a quant à lui été associé, dans certains cas, à de l'encéphalomyélopathie chronique dont les symptômes sont similaires à la HAM/TSP. Son implication dans d'autres troubles neurologiques reste toutefois discutable (Kannian and Green 2010). Il est vraisemblablement aussi responsable de l'augmentation du nombre de lymphocytes et de plaquettes (Ciminale et al. 2014; Kannian and Green 2010).

HTLV-1 code pour deux principaux transcrits sens et antisens : Tax1 et HBZ (*HTLV-1 bZIP factor*). La protéine Tax1 est impliquée dans plusieurs processus tels que la transactivation du promoteur LTR par recrutement de facteurs de transcription ou encore le processus de transformation des cellules. HBZ quant à elle serait capable d'inhiber la synthèse de Tax1, de contrer des voies de signalisation activées par Tax1 mais aussi de promouvoir la prolifération cellulaire. Une corrélation négative est effectivement observée entre la production de HBZ et la production de protéines sens (Tax1, gag, pro, pol, env). En outre, HBZ semble avoir une fonction bimodale, c'est-à-dire aussi bien sous forme de polypeptide que sous forme d'acide nucléique. Cela a notamment été prouvé grâce à l'utilisation de mutants dont le codon d'initiation a été modifié de façon à ne plus permettre la traduction. De plus, l'ARN est principalement localisé au niveau du noyau, laissant suggérer un rôle épigénétique et le fait qu'il soit plus abondant que la forme protéique sous-entend que c'est sous cette forme que HBZ agit principalement (Barbeau and Mesnard 2011; Gazon et al. 2018; Matsuoka and Jeang 2007).

Par ailleurs, l'ARN antisens est toujours identifié dans les cellules ATL contrairement à l'ARN sens qui, la plupart du temps, est non identifié. Tax1 étant l'antigène dominant produit par HTLV-1, son activation expose les cellules infectées à une forte réponse immune de la part de l'individu infecté, contrairement à HBZ qui est faiblement immunogénique. Les recherches ont montré que la production de Tax1 fluctue au cours du temps et est détectée en l'absence de HBZ. Il semblerait que la production initiale de Tax1 soit indispensable à l'induction de la transformation cellulaire. Toutefois, la seule solution permettant aux cellules infectées de survivre est le *silencing* de la transcription sens, par exemple, en activant la transcription antisens. Dès lors, il peut être supposé que HBZ joue un rôle dans l'évasion immunitaire, permettant alors le maintien de l'état leucémique des cellules infectées (Gazon et al. 2018; Kannian and Green 2010).

Chez HTLV-2, deux transcrits sens et antisens ont également été identifiés : respectivement Tax2 et APH2 (*antisens protein HTLV-2*). Les rôles associés à Tax2 sont similaires à ceux de Tax1 alors que APH2 est légèrement différente de HBZ. En effet, APH2 contribue aussi à l'inactivation de la transcription sens mais, en accord avec le fait que HTLV-2 n'est pas associé à un développement leucémique, cette protéine n'est pas capable d'induire la prolifération des cellules. Par contre, tout comme HBZ, APH2 tend à s'accumuler sous forme d'ARN dans le noyau et est systématiquement retrouvée dans les cellules infectées (Barbeau and Mesnard 2011; Barbeau, Peloponese, and Mesnard 2013; Ciminale et al. 2014).

2.2. BLV

Le virus de la leucémie bovine (BLV) qui a été identifié et caractérisé pour la première fois en 1969, est un virus apparenté au virus HTLV et dont l'hôte naturel est le bovin. Il est par ailleurs utilisé comme modèle animal pour comprendre les mécanismes associés à HTLV. Concrètement, la transmission se fait par le biais de contacts avec des fluides corporels contenant des cellules infectées, tels que du lait ou encore du sang. La transmission de la mère infectée à son veau a lieu au moment de l'ingestion du lait ou du colostrum. En effet, un très faible pourcentage de transmission transplacentaire ou lors de la mise bas a été observé (MacLachlan et al. 2017).

BLV représente un problème économique majeur. La perte de bétail engendrée, le coût des moyens de gestion mis en œuvre ne sont en effet pas négligeables. D'un point de vue distribution, il semblerait que le virus ait été éradiqué en Europe de l'Ouest, Australie et Nouvelle Zélande. Cependant, il est toujours bien présent dans la majeure partie des pays de l'Europe de l'Est. De même, des foyers d'infection sont encore identifiés aux États-Unis d'Amérique, ainsi qu'en Amérique du Sud. Concernant les pays Asiatiques, la situation est un peu moins connue. Quant aux pays du Moyen-Orient, il semblerait que le niveau d'infection soit globalement faible à l'exception de certains pays tels que la Turquie ou l'Iran (Rodríguez et al. 2011).

En outre, BLV est responsable d'une maladie hématologique touchant principalement les lymphocytes B. Trois stades peuvent être distingués : une phase asymptomatique, une phase de lymphocytose permanente (LP) et enfin, une phase tumorale. Il est estimé que environ 70% des animaux infectés resteront des porteurs asymptomatiques. Mais pour le tiers restant, l'infection évolue vers la phase suivante, la lymphocytose caractérisée par une prolifération de lymphocytes B. Cette augmentation conduit à un dérèglement voire une inversion du ratio de lymphocytes T/B dans le fluide sanguin. Cette phase est généralement stable mais dans de rares cas, elle peut conduire à la phase tumorale finale. Le développement de tumeurs lymphoïdes survient généralement chez des individus adultes et mène indubitablement à la mort de l'animal (Gillet, Kettmann, and Willems 2007; Rodríguez et al. 2011).

Lors de l'infection, le génome de BLV code pour les protéines de structures normales mais également pour deux transcrits viraux : Tax à partir du LTR 5' et l'ARN antisens (AS RNA) à partir du LTR 3'. Globalement, la régulation de l'expression sens et antisens ressemble à celle de HTLV-1 puisque ces deux virus sont similaires. Toutefois, l'ARN antisens de BLV ne

semble pas être prédisposé à la traduction et on lui attribue plutôt un rôle de lncRNA étant donné sa tendance à être retenu au niveau du noyau. Il a par ailleurs été remarqué que les transcrits et protéines produits à partir du LTR 5' sont généralement indétectables au niveau des tumeurs, contrairement aux transcrits antisens. L'hypothèse avancée est que l'expression des gènes viraux est aléatoire, résultat de modifications génétiques et épigénétiques induisant le *silencing* des gènes (Durkin et al., 2016; Gazon et al., 2018; Safari et al., 2017). Là où BLV diffère de HTLV-1, c'est qu'il est capable de générer des microARNs. Ceux-ci sont abondamment exprimés dans les cellules leucémiques et semblent jouer un rôle dans la réplication virale, la persistance et l'induction de pathogenèse (Barez et al. 2015).

3. Les modulateurs épigénétiques

Les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes leur permettant d'échapper à l'immunosurveillance de leur hôte. Les récentes études portant sur l'implication de l'épigénétique dans l'évasion immunitaire ont permis de mettre en avant le rôle clé joué par les modulateurs épigénétiques (Dunn and Rao 2017).

L'épigénétique est définie comme une branche de la biologie qui étudie les variations d'expression des gènes qui ne sont pas codées par l'ADN et qui sont héréditaires d'un point de vue mitotique et/ou méiotique mais qui n'entraînent pas de modifications de la séquence ADN. Les modifications le plus couramment énoncées sont la méthylation de l'ADN, les modifications des histones (notamment la méthylation et l'acétylation) ainsi que l'inactivation des gènes par association à un ncRNA (Dupont et al., 2009; Egger et al., 2004). En outre, il s'agit de processus naturels et essentiels, participant au maintien de la stabilité du génome et permettant la régulation de l'expression des gènes (activation ou répression de certaines fonctions) mais lorsqu'ils se produisent de manière inappropriée, cela peut engendrer de sérieux problèmes. En effet, de nombreuses maladies peuvent en découler comme c'est le cas pour de multiples cancers mais aussi des maladies cardiovasculaires (Dupont, Armant, and Brenner 2009; Weinhold 2006).

Les modificateurs épigénétiques sont des gènes dont les produits (les modulateurs épigénétiques) sont responsables des modifications épigénétiques (Feinberg et al., 2016). Bon nombre de ces modulateurs épigénétiques tels que Ezh2 (*enhancer zeste homologue 2*) et LSD1 (*lysine-specific histone demethylase 1*) sont souvent surexprimés dans le cas des cancers. Si l'on prend pour exemple Ezh2, il s'agit d'une enzyme méthyltransférase H3K27me3 (histone 3, lysine 27, triméthylation) associée au PRC2 (*polycomb repressive*

complex) et impliquée dans la répression de la transcription (Simon and Lange 2008). Par ailleurs, ces enzymes sont également capables d'interagir avec de longs ARNs non codants (lncRNAs) tel que HOTAIR (*Hox transcript antisens RNA*), ceux-ci servant alors de « guide » et permettant l'établissement des modifications d'histones selon un modèle précis (Tsai et al. 2010).

En réponse aux signaux épigénétiques, la régulation de la transcription consiste donc à activer ou inactiver les gènes. La chromatine passe alors alternativement d'un état à un autre : fermé (hétérochromatine) ou ouvert (euchromatine) (Dunn and Rao 2017).

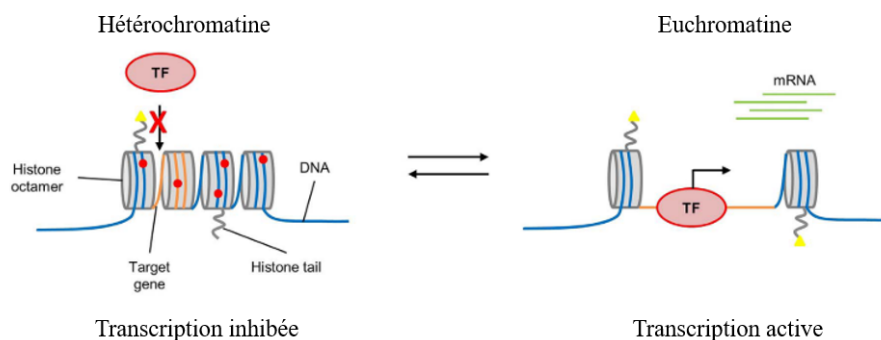


Figure 4 - Illustration des états de la chromatine. L'hétérochromatine correspond à un signal répressif puisque l'accès aux facteurs de transcription (FT) est rendu impossible de par sa compaction. On parle alors de gene silencing. Par opposition, l'euchromatine, de par sa structure ouverte correspond à un état de transcription active. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589017301116>

Dès lors, les cellules cancéreuses ont développé différentes stratégies d'évasion immunitaire, notamment en tirant parti de mécanismes de régulation épigénétique. La répression de l'expression de molécules telles que des antigènes associés aux tumeurs fait partie de ces stratégies (Dunn and Rao 2017). Toutefois, la nature réversible des modifications épigénétiques en fait une cible intéressante pour les traitements thérapeutiques. Selon la nature de l'effet induit par les modifications, ils visent généralement soit d'une part les molécules responsables des modifications, soit d'autre part, les molécules qui suppriment ces modifications.

3.1. LSD1

L'histone déméthylase spécifique de la lysine 1, LSD1 (connue aussi comme KDM1A, BHC110, AOF2), fut la première protéine associée à une activité enzymatique déméthylase. Située dans le noyau, elle est capable de supprimer un ou deux groupements méthyle situés

sur la lysine 4 ou 9 de l'histone 3 (H3K4me1/2 et H3K9me1/2). LSD1 est donc impliquée dans des processus épigénétiques de répression de l'expression des gènes (Zheng et al. 2012).

La protéine de 90 kDa fait donc partie de la famille des déméthylases lysine-spécifiques (LSD). Elle est caractérisée d'une part par un domaine de type amine-oxydase (AO) et d'autre part par un domaine SWIRM spécifique aux protéines associées à la chromatine. Son activité catalytique est dirigée par le domaine AO qui utilise un mécanisme d'oxydation dépendant du cofacteur flavine-adénine dinucléotide (FAD). Le domaine AO est subdivisé en deux sous-domaines : l'un étant un site de liaison non-covalente du FAD, l'autre un site de reconnaissance et de liaison du substrat. Le domaine SWIRM est quant à lui impliqué dans les interactions protéine-protéine. L'espace disponible entre les deux domaines permet des interactions supplémentaires (Højfeldt, Agger, and Helin 2013; Maiques-Diaz and Somervaille 2016). En outre, LSD1 interagit avec de nombreux complexes protéiques, parmi lesquels on retrouve le complexe répresseur de transcription (CoREST), le complexe de remodelage et déacétylation du nucléosome (NuRD) mais aussi le complexe coactivateur de la lysine méthyltransférase en lignée mixte leucémique (MLL). L'intérêt de certaines de ces interactions réside dans le fait qu'elles sont essentielles pour permettre à LSD1 de déméthyle le nucléosome (Maiques-Diaz and Somervaille 2016).

La réaction catalytique de déméthylation correspond à l'oxydation du groupement méthyl de l'histone 3 par transfert d'un anion hydrogène présent sur le groupement N-méthyl du FAD (réduction du FAD). Cette réaction a pour produit un cation iminium instable et sensible à l'hydrolyse. Après hydrolyse, on obtient du formaldéhyde d'une part (CH₂O) et le résidu déméthylé d'autre part. Le FAD réduit peut ensuite être réoxydé par réaction avec l'oxygène présent, libérant ainsi du H₂O₂ (Maiques-Diaz and Somervaille 2016; Zheng et al. 2012).

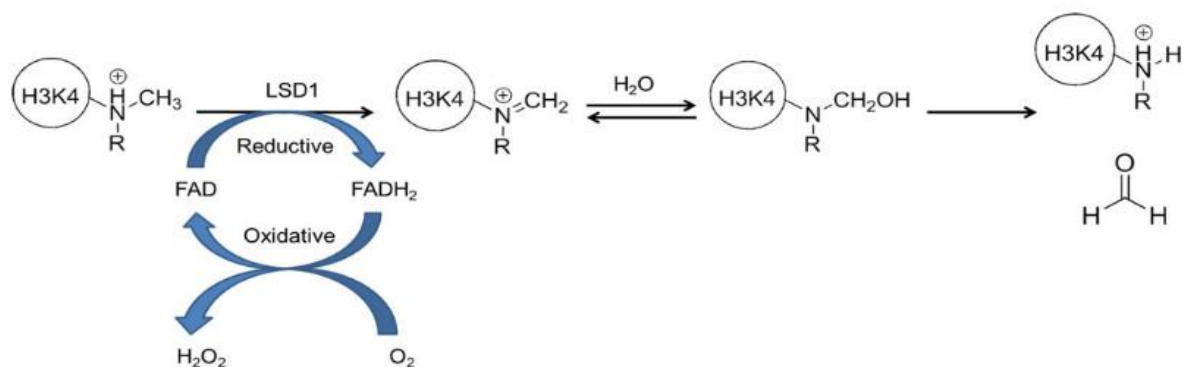


Figure 5 - Mécanisme de déméthylation d'une lysine monométhylée par LSD1. (Zheng et al. 2012)

LSD1 semble avoir de nombreux rôles biologiques. Pour citer quelques exemples, la protéine et son ARNm sont notamment fortement exprimés au niveau des cellules souches où ils jouent un rôle majeur dans le maintien de la pluripotence des cellules au travers du contrôle de la méthylation H3K4. Elle intervient également dans l'émergence des cellules souches hématopoïétiques mais apparaît surtout comme un important régulateur de la prolifération des cellules souches neuronales et du développement neuronal. Son importance dans le développement est telle que si un dérèglement survient, cela peut engendrer des troubles neurologiques voire même s'avérer létal au stade embryonnaire. Toutefois, une surexpression de LSD1 dans les cellules tumorales lui confère également un rôle moins bénéfique dans le développement de maladies comme le cancer. Selon certaines études, il apparaît que ce type de comportement serait lié à des mutations des gènes codants pour des enzymes impliquées dans la modification d'histones, telle que LSD1 (Hayward and Cole 2016; Højfeldt, Agger, and Helin 2013; Maiques-Diaz and Somervaille 2016).

3.2. HOTAIR

Environ 80% du génome humain est composé de séquences fonctionnelles ne codant pas pour des protéines. Parmi ces séquences, on distingue des séquences codantes pour des transcrits qui ne seront jamais traduits. Par définition, on parle alors d'ARNs non codants (ncRNAs). Il existe trois classes de ncRNAs selon leur longueur : courts (20-50 nucléotides), moyens (50 à 200 nucléotides) et longs (>200 nucléotides). Selon les études menées sur ces ARNs, ils jouent un rôle déterminant pour la régulation des gènes, le maintien de l'intégrité du génome, la différenciation cellulaire ou encore dans la dynamique de la chromatine. Toutefois, un dérèglement de leurs fonctionnalités est associé à des troubles tels que des cancers, des problèmes neurologiques ou même des dysfonctionnements immunitaires. Cela a notamment été observé dans le cas de HOTAIR, un long ARN non codant (lncRNA) (Bhan and Mandal 2014, 2015).

C'est dans les années 1980 qu'ont été découverts les premiers lncRNAs. Bien que ceux-ci présentent de nombreux avantages de par leur transcription rapide et leurs fonctions régulatrices, les chercheurs leur accordent maintenant une attention toute particulière en raison de leur importance dans les maladies (régulation des gènes, modifications épigénétiques). HOTAIR (*HOX antisens intergenic RNA*) est l'un de ces lncRNAs. Long de 2,2 kb, il est transcrit à partir du brin antisens d'un groupe de gènes (HOXC) présent sur le chromosome 12 (Bhan and Mandal 2014, 2015). Comme d'autres lncRNAs, il joue le rôle de

surface de liaison pour l'assemblage de régulateurs épigénétiques, permettant ainsi la combinaison de modifications d'histones selon un modèle spécifique sur les gènes cibles (Tsai et al. 2010).

En outre, HOTAIR prend part aux mécanismes de régulation épigénétique des gènes et joue un rôle clé dans différentes voies cellulaires grâce à son interaction avec les complexes PRC2 et CoREST/REST. Pour rappel, ces complexes multiprotéiques contiennent respectivement Ezh2 et LSD1. En d'autres termes, HOTAIR est capable de recruter à la fois une histone méthylase H3K27me3 et une histone déméthylase H3K4me1/2, H3K9me1/2 afin de coordonner leurs fonctions et induire la répression de l'expression des gènes cibles (Hajjari and Salavaty 2015; Tsai et al. 2010). Ainsi, les recherches menées ont permis d'identifier des sites de liaison distincts pour ces deux complexes. En effet, à l'extrémité 5', on observe la liaison avec PRC2. Tandis que la liaison avec CoREST/REST se fait à l'extrémité 3' (Bhan and Mandal 2015; Hajjari and Salavaty 2015; Tsai et al. 2010).



Figure 6 - Modélisation de l'interaction de HOTAIR avec des complexes régulateurs épigénétiques. À l'extrémité 5', l'interaction avec PRC2 permet d'induire la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3. De même, à l'extrémité 3', l'interaction avec le complexe LSD1 permet la déméthylation de la lysine 4 ou 9 de l'histone 3. (Bhan and Mandal 2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.07.001>

Matériel et méthodes

1. Outils

1.1. Lignées cellulaires et culture

HEK293T est une lignée cellulaire issue de cellules embryonnaires rénales humaines (ATCC, CRL-3216), CHO-K1-LTR est une lignée issue de cellules d'ovaires de hamster chinois (ATCC, CCL-61) dont le génome a été modifié de façon à y intégrer le promoteur LTR du virus HTLV-1, couplé au gène rapporteur de la luciférase *Firefly* (Okada and Jeang 2002).

Les HEK293T et CHO-K1-LTR ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) supplémenté avec 10% de *fetal bovine serum* (FBS, Gibco) et 1% d'un mélange pénicilline-streptomycine (Pen-Strep. 10 000 U Penicillin/ml ; 10 000 U Streptomycin/ml, Lonza BioWhittaker).

Les cellules ont été maintenues en culture dans un incubateur à 37°C, avec un apport en CO₂ de 5%.

1.2. Plasmides

Afin de réaliser des transfections, divers plasmides ont été utilisés. Le modulateur épigénétique LSD1 présente un tag « HA », largement utilisé comme marqueur afin de faciliter la détection et l'isolation des protéines. La plupart des plasmides contiennent également un ou plusieurs gènes de résistance à un antibiotique.

Par ailleurs, il convient de préciser que les plasmides utilisés pour l'expression des ARNs antisens de HTLV-1 et 2 présentent une modification du codon d'initiation ATG. En effet, le premier nucléotide a été remplacé par une base thymine, ne permettant dès lors que la transcription.

Tableau 1 - Présentation de la liste des plasmides utilisés

Plasmides	Correspondances	Description supplémentaire
pCMV_HA_LSD1	Vecteur d'expression de la protéine LSD1	Promoteurs SR α et SV Gènes de résistance à l'ampicilline et néomycine
pCMV_HA	Tag HA (N-terminal)	Promoteur CMV Gène de résistance à l'ampicilline
pME_HBZ_TTG	Vecteur d'expression de l'ARN antisens HBZ (HTLV-1)	Promoteurs SV40 et SR α Gènes de résistance à l'ampicilline et néomycine HBZ cloné par EcoRI sur pME_18.S_vide
pCMV_ Δ ATG_APH	Vecteur d'expression de l'ARN antisens APH2 (HTLV-2)	Promoteurs CMV et SV40 Gènes de résistance à l'ampicilline et néomycine
pBLV_WT344	Vecteur d'expression de l'ARN antisens de BLV	Gène de résistance à l'ampicilline Séquence provirale complète
pSG5_Tax	Vecteur d'expression de la protéine virale Tax	Promoteurs SV40 et T7 Gènes de résistance à l'ampicilline Tax cloné par EcoRI/BamHI
pSG5_vide	Vecteur vide	Promoteurs SV40 et T7 Gènes de résistance à l'ampicilline
pME_18.S_vide	Vecteur vide	Promoteurs SV40 et SR α Gène de résistance à l'ampicilline
pcDNA_IRES_GFP	Vecteur d'expression de la protéine fluorescente	Promoteurs CMV et SV40 Gènes de résistance à l'ampicilline et néomycine

1.3. Amorces

Afin de réaliser des analyses par PCR quantitative, différentes amorces ont été nécessaires. Parmi celles-ci, on trouve notamment des amorces permettant la détection de gènes de ménage, c'est-à-dire dont l'expression ne varie pas entre les échantillons.

Pour chaque gène à analyser, deux solutions (amorces FW et amorces Rev) de concentration 3 μ M ont été préparées à partir des solutions stock (Eurogentec) et conservées à -20°C.

Tableau 2 - Présentation de la liste des amorces utilisées lors des analyses par RT-qPCR

Gènes correspondants	Séquences des amorces	
HPRT	Fw	AAG GGC ATA TCC TAC AAC AAA C
	Rev	GGT CAG GCA GTA TAA TCC AAA G
U1	Fw	ATA CTT ACC TGG CAG GGG AG
	Rev	CAG GGG GAA AGC AAC GCA
HBZ	Fw	CTG TGC TTG ACG GTT TGC TA
	Rev	CCT CTT TCT CCC GCT CTT TT
APH2	Fw	CCC CAA GAC TAT TTT AGG AGA TTG C
	Rev	CCG ATC CCG ACC CCA GAG
AS BLV	Fw	TTT CGA ACG GGC ACT ACA G
	Rev	CTT CTG GTG CCG CTA ACT C
LSD1	Fw	GCT CGG GGC TCT TAT TCC TA
	Rev	CCC AAA AAC TGG TCT GCA AT

2. Amplification de plasmides

2.1. Cultures bactériennes

Les DH5 α constituent une souche de *Escherichia coli* fréquemment utilisée pour des opérations de transformations bactériennes et d'amplifications de clones plasmidiques. Dans notre cas, celles-ci avaient été rendues chimio-compétentes. Environ 1 μ g d'ADN a été ajouté à la suspension bactérienne pour la transformation. Après 30 minutes d'incubation sur glace, la suspension bactérienne a été placée alternativement dans un bain-marie à 42°C puis à nouveau sur glace afin de fluidiser la membrane (formation de pores) et de permettre l'incorporation de l'ADN. Ensuite, du milieu nutritif (*SOC Outgrowth Medium*, New England BioLabs) a été ajouté avant de placer la suspension dans un incubateur (Innova 4300, Excella E25) pour une durée de 1 heure minimum (37°C, 250 RPM).

Après incubation, environ 50 μ l de suspension ont été étalés sur une boîte de pétri ensuite placée à l'incubateur à 37°C pour la nuit (Heraeus Weiss Technik). La croissance bactérienne est réalisée sous des conditions de sélection par antibiotique (*Ampicillin sodium salt*, Sigma-

Aldrich). Le milieu de culture utilisé correspond à du « bouillon lysogène » supplémenté (*LB medium*, Roth + antibiotique 1% + agar 14 g/L).

2.2. Pré-culture

Une colonie isolée a été prélevée et mise en suspension dans du milieu de culture dans un tube. La suspension a, à nouveau, été placée à 37°C pour la nuit (250 RPM).

2.3. Midi culture

Le contenu de la pré-culture a été transféré dans un erlenmeyer contenant 250 ml de milieu LB liquide supplémenté avec 1% d'antibiotique et placé à l'incubateur pour la nuit (37°C, 250 RPM).

2.4. Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction des ADN amplifiés a été réalisée selon le protocole du kit de purification *Plasmid DNA purification* (Macherey-Nagel). Il s'agit d'une méthode d'isolation sur colonne échangeuse d'anions avec résine de Silice.

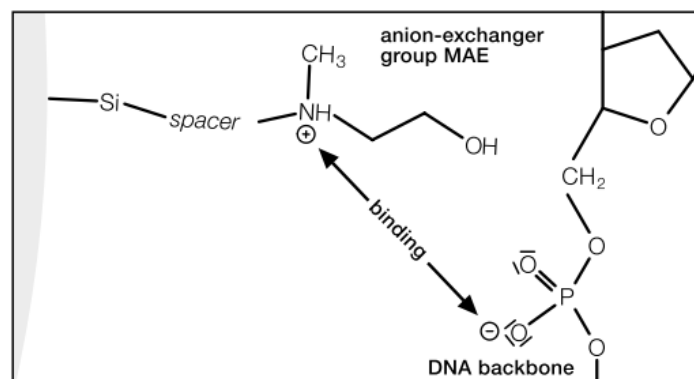


Figure 7 - Illustration de l'interaction entre l'ADN et la membrane de Silice. La charge positive des groupements méthyl-hydroxyethyl-amino (MAE) permet la liaison forte des résidus phosphate de l'ADN, chargés négativement. Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel)

2.5. Quantification

La détermination du rendement en ADN et de sa qualité a été réalisée par mesure de son absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific).

3. Étude de l'effet de l'expression des ARNs antisens sur l'expression du modulateur épigénétique LSD1

3.1. Ensemencement et transfection

L'ensemencement des HEK293T requiert un minimum de $5 \cdot 10^6$ cellules par boîte de pétri de diamètre 10 cm. Une boîte de pétri par condition a été préparée. Leur transfection a été réalisée selon le protocole du kit *ProFection Mammalian Transfection System* (Promega) par ajout de 8 μ g de chaque plasmide par boîte de pétri. Il s'agit d'un système de transfection au phosphate de calcium permettant à l'ADN plasmidique de former un précipité capable de se fixer à la membrane cellulaire et d'être incorporé par endocytose.

3.2. Analyse par Western Blot

Environ 48 heures après transfection, les cellules ont été trypsinées (Trypsin EDTA, Lonza BioWhittaker), récoltées et lavées au PBS (*Phosphate Buffer Saline*, DPBS - Gibco). L'analyse par Western Blot a pour objectif d'observer si l'expression des ARNs rétroviraux provoque ou non une modification de l'expression de la protéine.

Extraction et dosage protéique

Le culot cellulaire a été lysé à l'aide de tampon RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1%, Désoxycholate de sodium 0,5%, SDS 1%, Tris pH8 50 mM) auquel est ajouté un inhibiteur de protéase (*Halt Protease & Phosphatase inhibitor cocktail - 100X*, Thermo Scientific) à raison de 1X. Ce tampon a été choisi car il est plus approprié pour l'extraction des protéines nucléaires. Ainsi, les échantillons ont été placés sur roue rotative à 4°C pendant 20 minutes. Au besoin, la viscosité a pu être réduite par homogénéisation à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 21G. Le surnageant a été récupéré après centrifugation (4°C, 10 minutes, 14 000 RPM).

Un dosage des protéines totales a été réalisé selon le protocole *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific). Le dosage fonctionne sur base d'une détection colorimétrique liée à la réduction de l'ion Cu^{2+} en ion Cu^{1+} . L'acide bicinchoninique (BCA) est un réactif ayant la particularité de former un complexe pourpre lorsqu'il est en présence de cuivre. Afin de déterminer la concentration en protéines des échantillons, une droite d'étalonnage a été réalisée à partir des mesures d'absorbance d'une série de dilutions de concentrations connues en albumine de sérum bovin (BSA - *Albumin Fraktion*, Roth), tel que décrit dans le kit. L'absorbance a été mesurée à 562 nm (Perkin Elmer Victor X3).

Pour ce faire, des prélèvements de lysats ont été déposés dans une plaque 96 puits. Ensuite, le réactif correspondant à un mélange de réactifs (50A :1B) a été ajouté avant de placer la plaque préalablement protégée de la lumière à l'incubateur (37°C, 1 heure minimum).

Les échantillons ont été préparés conformément à l'équation de la droite obtenue, de façon à contenir chacun 40 µg de protéines.

Équation 1 - Équation de la droite d'étalonnage permettant les calculs de concentrations

$$\text{Absorbance} = \frac{\Delta y}{\Delta x} * \text{Concentration protéique} + b$$

Migration, transfert et révélation des protéines

Du bleu de Laemmli (LB 5X : Tris-Cl pH6,8 250 mM, SDS 10%, glycérol 50%, β-mercaptoéthanol 25%, bleu de bromophénol 0,04%) a été ajouté aux échantillons (1X) et ceux-ci ont été chauffés à 95°C sous agitation (500 RPM) pendant 5 minutes (Thermal Shake lite, VWR). Le SDS contenu dans le colorant dénature la structure des protéines, leur conférant ainsi une charge apparente négative. Le poids moléculaire devient alors le seul facteur de séparation lors de la migration.

La migration des échantillons a été réalisée sur gel d'électrophorèse (*running gel* 8% ; *stacking gel* 4% - figure 8 : composition) sous l'action d'un courant électrique de 100 à 120 volts, jusqu'à la sortie du front de migration (Power Pac HC, Bio-Rad). Le choix du pourcentage en acrylamide du *running gel* se fait sur base du poids moléculaire de la protéine cible.

Solution pour 2 mini-gels (RUNNING GELS)

RUNNING GELS (1,5mm)

	5%	6%	8%	10%	12%	15%	20%
H2O	7,57	7,04ml	5,99 ml	4,92 ml	3,86 ml	2,26 ml	0 ml
Glycérol	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Tris 1,5M pH 8,8	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
SDS 10%	160 µl	160 µl	160 µl	160 µl	160 µl	160 µl	160 µl
Acrylamide 30/0,8%	2,67 ml	3,2 ml	4,27 ml	5,33 ml	6,4 ml	8 ml	10,66 ml
APS 10%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Temed	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Solution pour 4 mini-gels (STACKING GELS)

	4%
H2O	6,1 ml
Tris 0,5M pH 6,8	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
Acrylamide 30/0,8%	1,3 ml
APS 10%	100 µl
Temed	10 µl

Figure 8 - Composition des gels d'électrophorèse par Western Blot

En outre, les protéines ainsi séparées ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (*Amersham Protran 0.45 μ m NC – Nitrocellulose blotting membrane*, GE Healthcare Life Science) par le biais de l'application d'un courant électrique de 110 volts pendant 1 heure 15 minutes. Afin de s'assurer de la qualité du transfert, les membranes ont été contrôlées par révélation au Rouge Ponceau (Ponceau 0,1%, acide acétique 5%) puis rincées à l'eau distillée. Elles sont ensuite lavées au TBST, une solution saline tamponnée à pH 7,5 (TBS Tween 1X – pour 5 L : Tris 30,25 g, NaCl 43,8 g, Tween 5 ml, porter au trait avec de l'eau distillée).

Une solution de BSA (TBST 5% BSA) a ensuite été utilisée afin de bloquer les sites de liaison non-spécifiques entre anticorps et protéines. Le temps d'incubation est d'au moins 1 heure. Par la suite, les membranes ont été incubées pour la nuit (4°C) dans la solution de blocage contenant les anticorps primaires dilués.

Le lendemain, les membranes ont été lavées trois fois (5 minutes) au TBST avant d'être incubées pendant 1 heure à température ambiante, en présence de la solution de blocage supplémentée avec les anticorps secondaires, anti-espèce des anticorps primaires, couplés à la peroxydase. Enfin, les membranes sont à nouveau lavées puis conservées dans du TBST.

Tableau 3 - Présentation des différents anticorps utilisés lors des Western Blot

Anticorps primaires	Espèce d'origine	Référence	Dilution
Anti-HA	rabbit	Abcam	1/4000
Anti-tubuline	mouse	Abcam	1/10 000
Anticorps secondaires			Dilution
Anti-rabbit	mouse	Cell signaling technology	1/3000
Anti-mouse	rabbit	Dako	1/1000

Finalelement, afin de révéler la membrane (Image Quant LAS 4000 mini), celle-ci a été mise en présence d'un substrat de réaction fournit par le kit *Pierce ECL Western Blot* (Thermo Scientific). En effet, la peroxydase de Raifort conjuguée aux anticorps secondaires permet une détection par chimiluminescence des protéines liées spécifiquement lorsqu'elle est en présence du substrat de réaction. Ce dernier contient du luminol dont l'oxydation, catalysée par la peroxydase, engendre la production d'un signal lumineux qui est alors proportionnel à la quantité de catalyseur. Sous-entendu, proportionnel donc à la quantité de protéines.

À l'aide du logiciel Image Studio Lite, l'intensité de luminescence de la protéine dans chaque échantillon a pu être évaluée. Les valeurs ont été calculées sur base de l'intensité de luminescence de la tubuline et ensuite normalisées par rapport au contrôle positif.

4. Traitement des cellules et étude d'interaction (RIP)

4.1. Ensemencement et transfection

L'ensemencement et la transfection des HEK293T utilisées pour cette partie ont été réalisés tel que précédemment décrit au point 3.1 de cette section. Quatre boîtes par conditions ont été préparées.

4.2. Traitement par UV-crosslinking

Environ 48 heures après transfection, les cellules ont été traitées sur glace. À cette fin, le milieu de culture a été remplacé par du DPBS froid puis les cellules ont été irradiées avec 2500 mJ de rayons UV afin de former des complexes ARN-protéines (UV Stratalinker 2400, Stratagene). Ce traitement consiste en la formation d'un lien covalent entre les protéines et les ARNs qui sont très proches.

Les cellules ont ensuite été récupérées à l'aide de racloirs, lavées et enfin lysées à l'aide d'un tampon PLB ajouté à volume égal au culot cellulaire (KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, Hepes pH7 10 mM, NP-40 0,5%, RNase inhibiteur 100 U/ml, inhibiteur de protéase 1X). Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide de seringues munies d'une aiguille de 21G et conservés à -80°C.

4.3. Immunoprécipitation d'ARN (RIP)

L'immunoprécipitation est une technique qui, à l'aide d'anticorps spécifiques, permet la précipitation d'une protéine particulière. On parle d'immunoprécipitation de ribonucléotides lorsque celle-ci est utilisée afin d'isoler un complexe protéines-ARN.

Préparation de l'immunoprécipitation

En outre, les complexes protéines-ARN ont été isolés à l'aide de billes magnétiques *Chip-Grade protein A/G Magnetic Beads* (Thermo Scientific) (35 µl par échantillon), auxquelles ont été associés les anticorps spécifiques dirigés contre le tag HA de la protéine cible. Un contrôle a également été réalisé par préparation de billes associées à des anticorps IgG de

même espèce que l'anticorps anti-HA. Les figures 9 et 10 illustrent le principe de l'immunoprécipitation d'ARN.

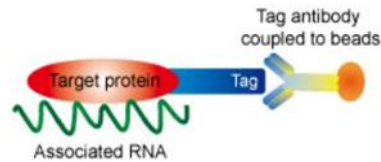


Figure 9 - Représentation du complexe d'immunoprécipitation

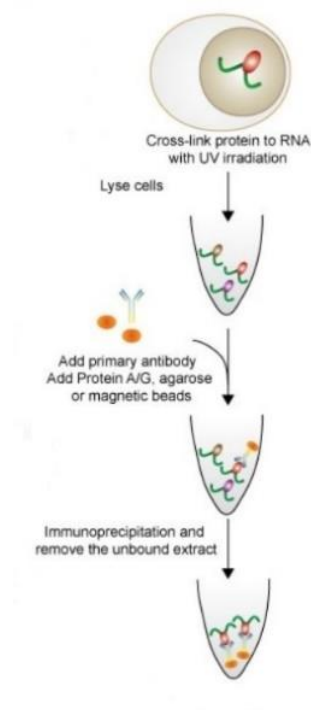


Figure 10 - Schématisation du processus d'immunoprécipitation d'ARN

Pour ce faire, les billes, préalablement lavées avec du tampon NT2 (Tris pH7,4 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 3 mM, NP-40 0,05%, porté au trait avec de l'eau distillée), ont été incubées 2 heures en présence des anticorps (5µg) dilués dans du NT2 afin que ceux-ci puissent se lier. Après incubation, les billes ont à nouveau été lavées puis conservées sur glace dans du tampon de RIP (NT2 supplémenté – pour 850 µl : RNase inhibiteur 200 U, 10 µl de DTT 100 mM, 30 µl d'EDTA 0,5M, 2 µl de VRC, complété avec du NT2).

De même, les échantillons de lysats décongelés ont été centrifugés puis le surnageant a été incubé en présence de billes (10 μ l) et d'anticorps IgG (1 μ g) dans l'objectif d'éliminer les molécules susceptibles d'interférer lors de l'étape d'immunoprécipitation. L'incubation a été réalisée à 4°C sur roue rotative, pendant 30 minutes. Après incubation, les lysats ont été récupérés et les billes éliminées.

Réaction d'immunoprécipitation (RIP)

Les billes liées aux anticorps ont été ajoutées à 150 μ l de lysats et incubées sur roue rotative pour la nuit (4°C).

Parallèlement à cela, du lysat a été prélevé afin d'être utilisé comme contrôle (= input). 40 μ l de lysat ont été prélevés et préparés en vue d'être utilisés comme contrôles de Western Blot et 15 μ l ont été prélevés comme contrôles ARN pour la RT-qPCR. En effet, ceux-ci contiennent alors toutes les protéines et tous les ARNs présents dans la cellule lors de la lyse cellulaire.

Après 24 heures d'incubation, les billes ont été lavées au NT2. Lors du dernier lavage, 50 μ l de suspension ont été prélevés pour l'analyse par Western Blot. Les billes restantes sont utilisées pour l'analyse par RT-qPCR.

4.4. Analyse par Western Blot

En outre, du bleu de Laemmli a été ajouté aux échantillons input ainsi qu'aux échantillons de RIP. Ceux-ci ont ensuite été chauffés à 95°C sous agitation (500 RPM) pendant 10 minutes avant d'être centrifugés (4°C, 14 000 RPM). Le déroulement du western blot a ensuite été réalisé tel que présenté précédemment.

L'objectif ici n'étant plus de réaliser une étude comparative des quantités de protéines présentes mais bien de vérifier que l'immunoprécipitation a permis de sélectionner les protéines d'intérêts.

4.5. Analyse par RT-qPCR

Tout comme pour l'analyse par Western Blot, la présence des ARNs cibles a été mesurée dans les échantillons d'input et les échantillons de RIP. Cette analyse a pour objectif de déterminer s'il existe ou non une interaction entre le modulateur épigénétique cible et l'un des ARNs rétroviraux antisens.

Extraction ARN

En vue de l'analyse par PCR quantitative, les ARNs présents dans les input ainsi que dans le lysat de RIP ont été purifiés. Cette étape comprend la digestion des protéines à l'aide d'un tampon contenant de la protéinase K (pour 150 μ l : 117 μ l de NT2, 15 μ l de SDS 10%, 18 μ l de protéinase K 20 mg/ml), permettant alors de casser le lien formé lors de l'UV-crosslinking. Pour cela, les échantillons auxquels le tampon a été ajouté sont incubés 30 minutes à 55°C sous agitation (500 RPM).

L'extraction à proprement parlé a été réalisée selon un protocole inspiré du protocole d'extraction au Qiazol (*Qiazol Lysis reagent, Quick start protocol* - Qiagen). Deux étapes d'extraction liquide-liquide au chloroforme (Sigma-Aldrich) ont été réalisées. La méthode est basée sur la séparation des molécules en fonction de leur solubilité dans deux liquides non miscibles (phase aqueuse et phase organique). Après récupération de la phase aqueuse, l'ARN a été purifié par ajout d'alcool (VWR chemicals) et de glycogène (Thermo Scientific). Le glycogène est en effet un polymère inerte et insoluble dans l'isopropanol et l'éthanol. Dès lors, il est capable de piéger l'ARN présent et de former un précipité visible après centrifugation, facilitant ainsi la manipulation de l'échantillon par la suite. L'incubation en présence de glycogène a été réalisée pendant une nuit, à -80°C en présence d'isopropanol. Le lendemain, après centrifugation (14 000 RPM, 4°C, 10 min) et élimination du surnageant, une deuxième phase de précipitation a été réalisée par incubation 10 minutes en présence d'éthanol.

Finalement, après une nouvelle centrifugation (14 000 RPM, 4°C, 10 min), le surnageant a été éliminé et l'ARN dilué dans de l'eau *nucléase-free* (Invitrogen UltraPure Distilled Water DNase/RNase Free) et conservé à -80°C.

Transcription inverse

La transcription inverse consiste à convertir l'ARN extrait en un brin d'ADN alors appelé ADN complémentaire (cDNA) par le biais de la transcriptase inverse, enzyme responsable de cette conversion. On l'utilise en biologie moléculaire afin de préparer les échantillons pour l'étape de PCR. La transcription inverse a été réalisée selon le protocole du kit *FastGene Scriptase II* (Nippon Genetics EUROPE).

Quantification relative par qPCR

L'analyse par PCR quantitative a été réalisée à l'aide d'un *thermocycler* (Light Cycler 480, Roche) permettant de contrôler la réaction en temps réel grâce à une caméra. Cet appareil contrôle également les paliers de température afin de répéter les cycles.

Tableau 4 - Protocole de qPCR

<i>Étape</i>	<i>Paliers</i>		<i>Nombre de cycle</i>
Pré-incubation	5 min	95°C	1
Amplification	15 sec	95°C	45
	20 sec	60°C	
	40 sec	72°C	
Courbe de fusion	5 sec	95°C	1
	1 min	65°C	
		97°C	
Refroidissement	30 sec	40°C	1

Dès lors, les différents gènes présents dans les échantillons ont été amplifiés à l'aide des amorces préalablement présentées au point 1.3. En effet, les mélanges correspondants contiennent chacun des amorces sens et antisens, ainsi que du tampon Takyon (Eurogentec). C'est dans ce dernier que se trouvent notamment l'ADN polymérase, les désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) ainsi que du SYBR Green, un colorant fluorescent qui a la particularité de réagir avec l'ADN double brin. Ainsi, lors de l'amplification, le SYBR Green émet un signal qui est alors détecté par l'appareil et est proportionnel au nombre de copies. Les résultats correspondent alors au nombre de cycles (*Ct*, *Cycle Threshold*) réalisés lorsque la courbe PCR croise la droite correspondant à une valeur seuil de signal fluorescent.

En outre, les valeurs de *Ct* obtenues doivent être normalisées par rapport à la quantité relative d'un gène de contrôle, ici U1.

Équation 2 - Équation de normalisation

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{contrôle endogène}}$$

La quantification relative, ou *Fold Change*, exprime la variation d'expression d'un gène entre différentes conditions.

Équation 3 - Expression de la quantification relative d'un gène

$$Quantification\ relative = 2^{-(\Delta Ct)}$$

5. Essais luciférase

Cette partie a pour objectif d'évaluer l'effet de l'ARN antisens de HTLV-1 et de la protéine LSD1 sur la transactivation du promoteur LTR.

5.1. Ensemencement et transfection

Les cellules CHO-K1-LTR ont été placées en culture dans des plaques 6 puits à raison de $1,5 \cdot 10^5$ cellules par puits. La transfection a été réalisée selon le protocole du kit *Polyplus transfection - jetPRIME in vitro DNA & siRNA transfection reagent* (Polyplus). Le réactif jetPrime enveloppe l'ADN (1 µg de chaque plasmide par puits), formant ainsi un complexe capable d'interagir avec la membrane afin d'être incorporé par endocytose.

5.2. Lecture par luminométrie

Le milieu de culture a été éliminé afin de laver les cellules au DPBS froid. Du tampon de lyse *passive lysis buffer* (PLB, 5X) préalablement dilué (1X) a ensuite été ajouté à raison de 250 µl par puit. Après une incubation sur balancelle de 15 minutes, 20 µl de surnageant ont été prélevés par puit et placés dans les tubes de lecture. Enfin, 50 µl de *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II) ont ensuite été ajoutés dans les tubes juste au moment de placer ceux-ci dans l'appareil de lecture. Le tampon de lyse et le réactif LAR II sont fournis dans le kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega).

La quantification du signal luminescent est réalisée sur une période de temps de 10 secondes à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB 9507, Berthold). En outre, c'est l'association de la luciférase avec de la luciférine qui est à l'origine du signal. En effet, le complexe formé par ces deux protéines catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine par le dioxygène (O₂), celle-ci va alors émettre des photons lorsqu'elle passera de l'état excité à l'état stable.

Résultats

1. Expression du modulateur épigénétique LSD1

1.1. Analyse de l'expression de LSD1 sous sa forme protéique suite à l'expression des ARNs antisens rétroviraux

La première étape de l'étude consistait à déterminer si l'expression des différents ARNs rétroviraux pouvait entraîner une variation d'expression de la protéine LSD1. Pour cela, les cellules HEK293T ont été préparées et traitées tel que précédemment expliqué au point 3 de la section « Matériel et méthodes ». Le principe de la manipulation est illustré à la figure 11 ci-dessous.

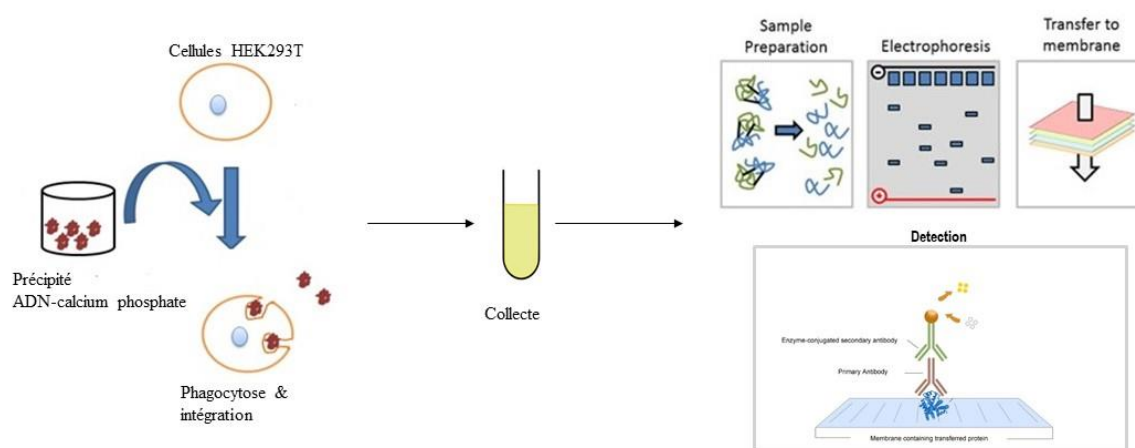


Figure 11 - Principe d'expérimentation en vue de tester l'expression de la protéine LSD1. Les cellules ont été transfectées par la technique de précipitation au phosphate de calcium avec le vecteur d'expression pCMV_HA_LSD1 combiné ou non au vecteur d'expression de l'un des ARNs rétroviraux (pME_HBZ_TTG, APH_ΔATG, pBLV_WT344). 48h après transfection, les lysats protéiques ont été analysés par Western Blot en utilisant un anticorps primaire anti-HA.

Le tableau 4 présente les conditions de transfections qui ont été appliquées dans le cadre de cette manipulation.

Tableau 5 - Représentation des conditions de transfection appliquées

Combinaison	Contrôle négatif	Contrôle positif	1	2	3
Plasmides	pCMV_HA pCDNA_IRES_GFP	pCMV_HA_LSD1 pME_18.S_vide	pCMV_HA_LSD1 pME_HBZ_TTG	pCMV_HA_LSD1 pBLV_WT344	pCMV_HA_LSD1 pCMV_ΔATG_APH

Les résultats de l'analyse des lysats protéiques par western blot sont illustrés à la figure 12. Le panneau A montre la surexpression de la protéine LSD1 dans tous les échantillons transfectés, tel qu'il était attendu. Comparativement au contrôle positif « LSD1 » fixé à 100% dans le panneau B, une variation d'expression de la protéine est observée dès lors qu'un ARN antisens est également exprimé par les cellules. Une diminution de 19% est observée lorsque l'ARN de HBZ est exprimé. De même, une diminution de 6% est également observée lorsque l'ARN antisens de BLV est exprimé. Par ailleurs, une forte diminution de 71% est constatée dans le cas de l'ARN de APH2.

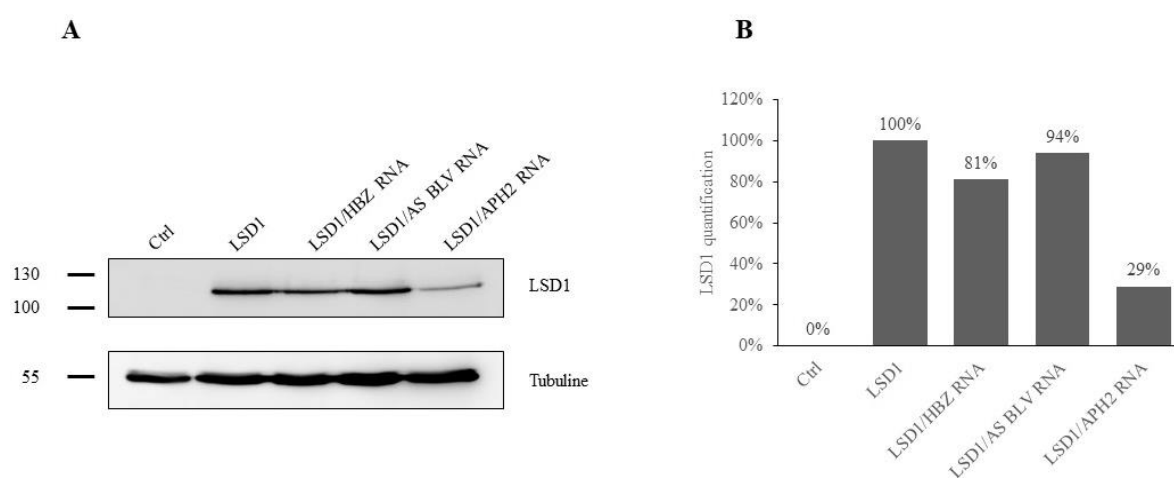


Figure 12 - Expression et quantification du modulateur épigénétique LSD1, sous forme protéique, dans les cellules HEK293T. Les cellules ont été transfectées avec le vecteur d'expression pCMV_HA_LSD1 combiné ou non au vecteur d'expression de l'un des ARNs rétroviraux (pME_HBZ_TTG, pCMV_ΔATG_APH, pBLV_WT344). 48h après transfection, les lysats protéiques ont été analysés par Western Blot. (A) La protéine LSD1 a été révélée à l'aide d'un anticorps primaire anti-HA. La tubuline a été utilisée comme témoin de charge et révélée à l'aide d'un anticorps primaire anti-tubuline. Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase étaient dirigés contre l'espèce d'origine des anticorps primaires (respectivement anti-rabbit et anti-mouse). Les membranes ont été révélées à l'aide du système Pierce ECL Western Blot. (B) L'intensité de luminescence de LSD1 et de la tubuline a été mesurée pour chaque échantillon. Un rapport entre les intensités LSD1 et tubuline a été calculé. Ces rapports ont été normalisés par rapport au contrôle positif « LSD1 » défini arbitrairement à 100%. Les données présentées correspondent à une expérience, représentative de trois.

1.2. Analyse de l'expression de l'ARNm de LSD1 suite à l'expression des ARNs antisens rétroviraux

Les résultats de l'analyse par qPCR sont présentés à la figure 13. Le panneau A montre une variation de la quantité relative d'ARNm de LSD1 présent dans les échantillons. Les panneaux B, C et D montrent la quantité relative de chaque ARN antisens. En outre, le panneau B montre que l'ARN recherché est présent uniquement dans l'échantillon correspondant. Il en est de même pour les deux autres panneaux, C et D.

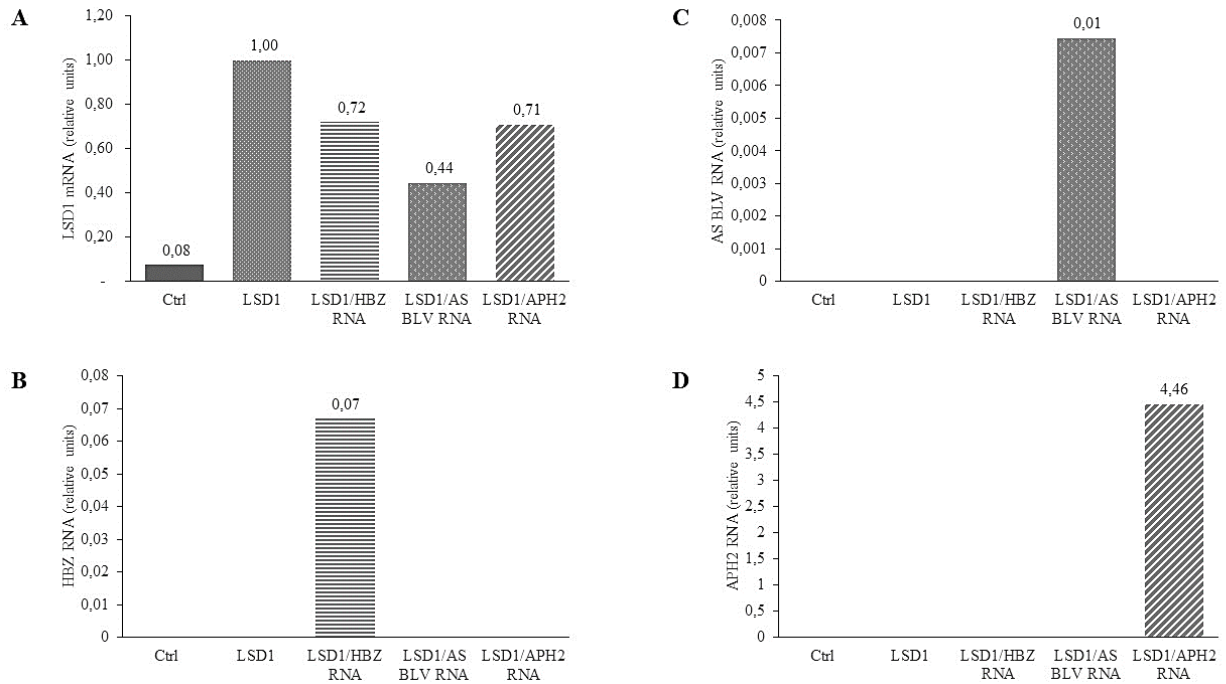


Figure 13 - Quantification relative de l'ARNm du modulateur épigénétique LSD1 et des ARNs antisens exprimés. Les cellules ont été transfectées avec le vecteur d'expression pCMV_HA_LSD1 combiné ou non au vecteur d'expression de l'un des ARNs rétroviraux (pME_HBZ_TTG, pCMV_ΔATG_APH, pBLV_WT344). 48h après transfection, l'ARN total a été extrait puis analysé par RT-qPCR. La quantification relative a été obtenue par normalisation des résultats par rapport à la quantité de transcrits du gène de ménage endogène HPRT. La quantité relative de transcrits a été évaluée pour chaque échantillon : (A) l'ARNm de LSD1, (B) l'ARN antisens de HTLV-1, (C) l'ARN antisens de BLV et (D) l'ARN antisens de HTLV-2. Les résultats présentés correspondent à une expérience, représentative de trois.

2. RNA-immunoprécipitation : interaction protéine-ARN

Cette étude avait pour premier objectif d'évaluer si il existe une interaction entre les ARNs rétroviraux antisens et la déméthylase spécifique de la lysine 1 (LSD1). Afin d'y répondre, les cellules HEK293T ont été traitées tel que mentionné au point 4 de la section « Matériel et méthodes ». Le principe de l'immunoprécipitation d'ARN (RIP) est présenté à la figure 14.

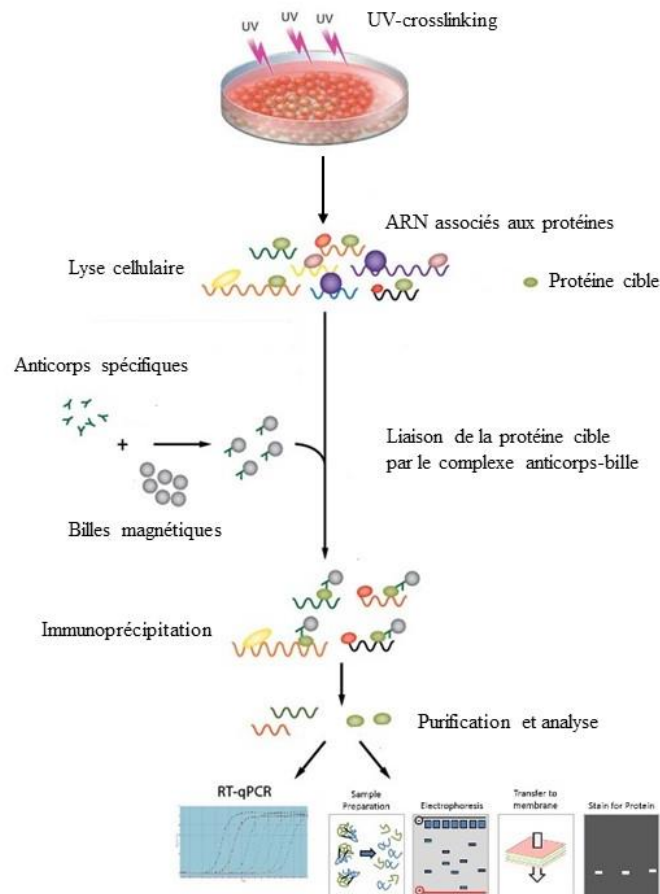


Figure 14 - Principe de l'immunoprécipitation d'ARN. Les cellules sont irradiées avec des rayons UV afin de former des liens covalents entre les protéines et les ARNs interagissant (UV-crosslinking). L'immunoprécipitation est ensuite réalisée à l'aide de billes magnétiques dont la surface est associée à des anticorps anti-HA, permettant de ne précipiter que les complexes contenant la protéine cible. Une fois les complexes purifiés, les protéines présentes peuvent être analysées par Western Blot tandis que l'ARN peut être analysé par RT-qPCR.

Le tableau 6 illustre les conditions de transfection appliquées.

Tableau 6 - Représentation des conditions de transfection appliquées

Combinaison	Contrôle	1	2	3
Plasmides	pCMV_HA_LSD1 pME_18.S_vide	pCMV_HA_LSD1 pME_HBZ_TTG	pCMV_HA_LSD1 pBLV_WT344	pCMV_HA_LSD1 pCMV_ΔATG_APH

2.1. Validation de l'immunoprécipitation

La lecture de la luminescence de la membrane permet de montrer la présence ou l'absence de la protéine LSD1 dans les échantillons pré- et post-immunoprécipitation d'ARN. La figure 15 montre que la protéine LSD1 est présente dans les échantillons avant immunoprécipitation

(input) ainsi que dans les échantillons traités avec des anticorps anti-HA. En revanche, LSD1 n'est pas présente dans les échantillons traités avec des anticorps irrelevantes (anti-IgG).

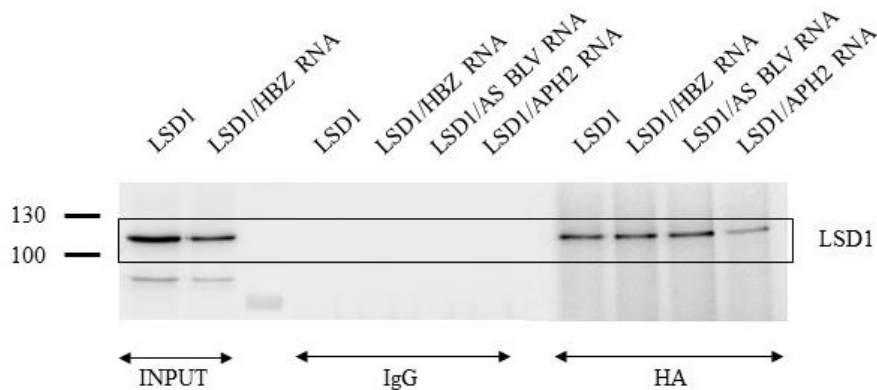


Figure 15 - Expression du modulateur épigénétique LSD1 dans les cellules HEK293T après immunoprécipitation d'ARN. Les cellules ont été transfectées avec le vecteur d'expression pCMV_HA_LSD1 combiné ou non au vecteur d'expression de l'un des ARNs rétroviraux (pME_HBZ_TTG, pCMV_ΔATG_APH, pBLV_WT344). 48h après transfection, les cellules ont été traitées par UV-crosslinking. Après lyse, les échantillons ont été divisés en trois pour l'analyse des inputs et du RIP avec des anticorps anti-IgG ou anti-HA. Les protéines présentes dans les échantillons avant et après immunoprécipitation d'ARN ont été analysées par Western Blot et révélées à l'aide d'anticorps primaires anti-HA et d'anticorps secondaires anti-rabbit couplés à la peroxydase.

2.2. Hypothèse d'interaction

L'analyse par RT-qPCR des ARNs présents dans les échantillons d'immunoprécipitation permet d'identifier ceux potentiellement impliqués dans une interaction avec la protéine LSD1. Les résultats sont présentés à la figure 16. Les données sont issues d'une expérience, représentative de trois.

Les données concernant l'ARN de HBZ montrent que le gène n'a pas été détecté, que ce soit dans les échantillons d'immunoprécipitation par anti-Ha ou anti-IgG. Par contre, les données relatives à l'ARN antisens de BLV et l'ARN de APH2 montrent quant à elles la présence des transcrits dans les échantillons d'immunoprécipitation.

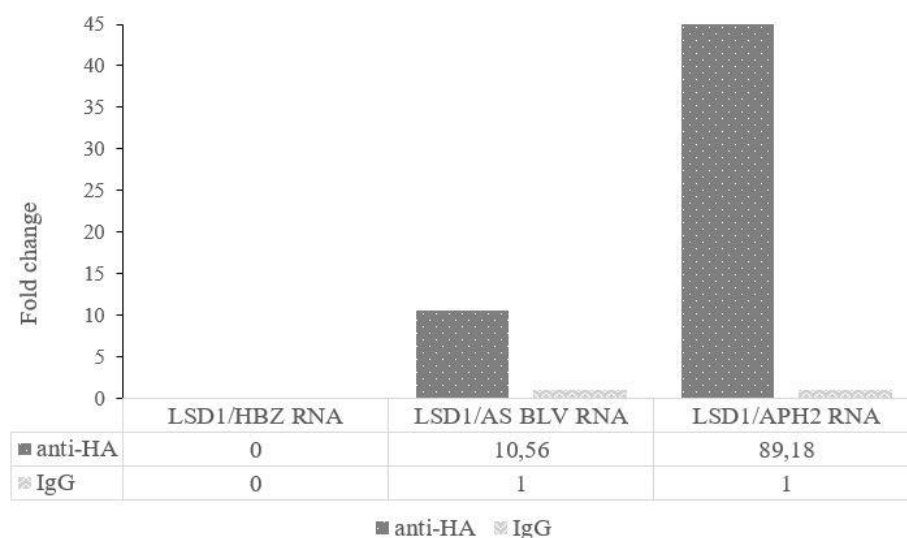


Figure 16 - Interaction des ARNs rétroviraux avec LSD1. Les cellules ont été transfectées avec le vecteur d'expression pCMV_HA_LSD1 combiné ou non au vecteur d'expression de l'un des ARNs rétroviraux (pME_HBZ_TTG, pCMV_ΔATG_APH, pBLV_WT344). 48h après transfection, les cellules ont été traitées par UV-crosslinking. Après lyse, les échantillons ont été divisés en trois pour l'analyse des inputs et du RIP avec des anticorps anti-HA ou anti-IgG. Les ARNs immunoprécipités ont été analysés par RT-qPCR. La quantification relative a été obtenue par normalisation des résultats par rapport à la quantité de transcrits du gène de ménage endogène U1. Le fold change est établi par calcul du rapport entre la quantité de transcrits dans les échantillons immunoprécipités par anti-HA et dans les échantillons immunoprécipités par anti-IgG. Les résultats présentés correspondent à une expérience, représentative de deux.

3. Essais luciférase

Enfin, cette étude avait également pour objectif la détermination de l'effet de l'ARN antisens HBZ et de LSD1 sur la transactivation du promoteur LTR par la protéine virale Tax. Afin d'y répondre, des cellules CHO-K1-LTR contenant un LTR stablement intégré en amont du gène rapporteur de la luciférase *Firefly* dans le génome de cellules CHO-K1 ont été cultivées selon les conditions expliquées au point 5 de la section « Matériel et méthodes ». La figure 17 présente le principe de l'expérience, tandis que le tableau 7 illustre les conditions de transfection appliquées.

Les résultats obtenus ci-dessous découlent de huit expériences réalisées de manière indépendantes, exprimées sous forme de moyennes corrigées par l'erreur standard de la moyenne. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7. Les données statistiques qui en découlent ont été obtenues suite à la réalisation de tests t de Student pairé unilatéral.

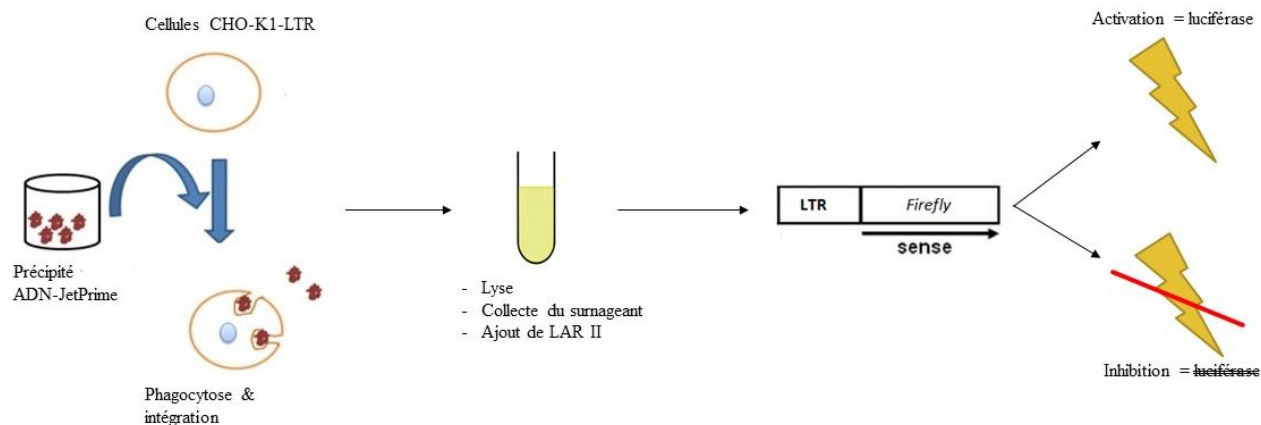


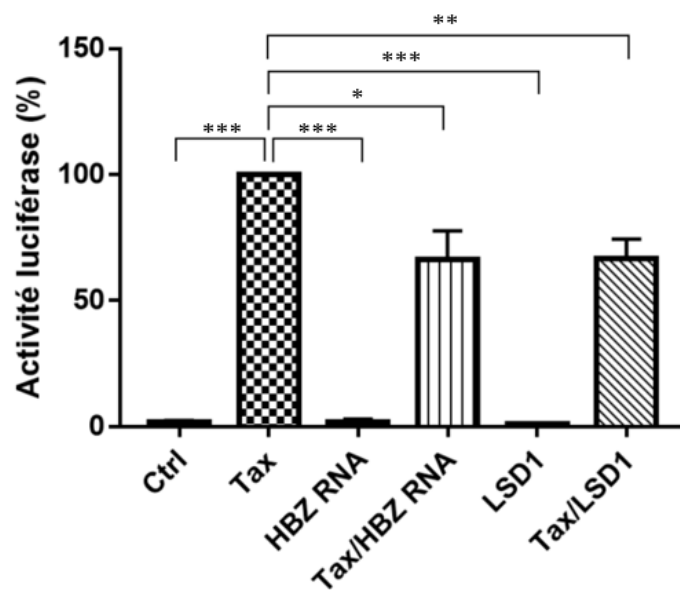
Figure 17 - Principe des expérimentations en essais luciférase. Les cellules ont été transfectées au JetPrime avec les vecteurs d'expression pSG5_Tax, pCMV_HA_LSD1 et pME_TTG_HBZ. 48h après transfection, les cellules ont été lysées. Du surnageant a été mélangé avec du substrat LARII afin de permettre l'analyse de l'activité luciférase par luminométrie.

Tableau 7 - Représentation des conditions de transfection appliquées en plaques 6 puits. Chaque condition a été appliquée en duplicat.

Plaques	Combinaison	Contrôle	1	2
	Plaques 1	Plasmides	pME_18.S_vide pcDNA_IRES_GFP	pSG5_Tax pME_18.S_vide
Plaques 2	Combinaison	3	4	5
	Plasmides	pME_HBZ_TTG pSG5_Tax	pCMV_HA_LSD1 pSG5_vide	pCMV_HA_LSD1 pSG5_Tax

Les résultats présentés à la figure 18 montrent une faible activité luciférase dans le cas du contrôle, correspondant à l'activité basale en l'absence de transactivation de la transcription par Tax. Par ailleurs, un niveau basal est également mesuré lorsque les vecteurs exprimant l'ARN de HBZ et LSD1 sont transfectés seuls. En présence de Tax, l'activité luciférase est fortement induite ($p\text{-value} < 0,001$). La transactivation par Tax est réduite en présence des vecteurs de l'ARN de HBZ et de la protéine LSD1.

Dans le cas de la combinaison Tax/TTG, les résultats montrent en effet une différence significative comparativement à la transactivation par Tax (66,38 %, $p\text{-value} = 0,01$). Une différence très significative de la transactivation par Tax est également observée en présence de LSD1 (66,5 %, $p\text{-value} = 0,002$).



	Ctrl	Tax	HBZ RNA	Tax/HBZ RNA	LSD1	Tax/LSD1
Moyenne (%)	1,625	100	1,875	66,38	0,875	66,5
SEM	0,8647	0	1,093	11,27	0,3504	7,894

Figure 18 - Essais du rapporteur luciférase pour l'activation du promoteur LTR dans les cellules CHO-K1-LTR. Les cellules ont été transfectées avec les vecteurs d'expression pSG5_Tax, pCMV_HA_LSD1 et pME_TTG_HBZ. 48h après transfection, les cellules ont été lysées et analysées par luminométrie en présence de substrat LARII. Ce réactif permet la réaction d'oxydation de la luciférase responsable de l'émission de photons. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'activité observée pour Tax, celle-ci étant définie arbitrairement comme égale à 100%. Les moyennes obtenues sont corrigées par l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les données statistiques ont été obtenues par la réalisation d'un test t de Student pairé. Les * signifient que les valeurs présentent des différences significatives (*, p-value < 0,05), très significative (**, p-value < 0,01) ou très hautement significative (***, p-value < 0,001).

Discussion

Depuis de nombreuses années, une attention particulière a été portée aux rétrovirus en raison de leur implication dans le développement de cancers. C'est notamment le cas des virus HTLV et BLV, deux rétrovirus étroitement apparentés et responsables de maladies hématologiques potentiellement mortelles. Bien que non présent dans nos régions, le virus HTLV-1 est endémique dans de nombreuses zones du monde. Et si la plupart des individus infectés resteront porteurs asymptomatiques, ils n'en restent pas moins capables de transmettre le virus. Le but de ce travail est de comprendre les mécanismes associés aux ARNs viraux antisens (i.e. transcrits à partir du LTR 3'). Ces ARNs antisens étant présents majoritairement dans le noyau, il est possible qu'ils jouent un rôle de ncRNAs et soient impliqués dans la régulation de l'expression des gènes au travers de modifications épigénétiques. En conséquence, nous nous sommes intéressés à l'interaction de trois ARNs rétroviraux antisens (HBZ, BLV AS et APH2) avec une protéine responsable de modifications épigénétiques, la méthylase spécifique de la lysine 1 ainsi qu'aux conséquences sur l'activité du promoteur LTR. Si l'existence de tels mécanismes chez ces virus venait à être confirmée, la nature réversible des modifications épigénétiques pourrait constituer une voie d'intérêt pour le développement de nouveaux traitements thérapeutiques.

Un premier résultat de ce travail montre une diminution de l'expression de LSD1 en présence des ARNs antisens (figure 13). Il se peut que ces diminutions soient liées à la mobilisation de la machinerie de transcription au profit de la transcription des vecteurs d'expression des ARNs antisens rétroviraux. En effet, les lncRNAs peuvent agir à différents niveaux sur la régulation de l'expression des gènes. Ils peuvent notamment servir de voie de signalisation permettant d'indiquer des informations de régulation du gène ou encore interagir directement avec des facteurs de transcription afin de les recruter (Fang and Fullwood 2016; Kornienko et al. 2013; K. C. Wang and Chang 2012). La forte diminution d'expression de LSD1 sous sa forme protéique (figure 12) en présence de l'ARN de APH2 peut quant à elle être liée à une modification des étapes d'export hors du noyau ou de l'épissage de son ARNm. Ainsi l'épissage est un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle qui intervient avant la traduction et qui est souvent dérégulé dans certaines affections (Oltean and Bates 2014). Un lncRNA peut être impliqué dans l'épissage de l'ARNm en liant les facteurs d'épissage. C'est le cas notamment du MALAT1 (*metastasis-associated long adenocarcinoma transcript 1*) qui lie et influence la distribution de protéines régulatrices riches en sérine/arginine (SR). De plus,

des études ont montrés que l'étape d'exportation de l'ARNm vers le cytoplasme est dépendante de l'étape d'épissage. Le spliceosome, lui-même recruté par les protéines SR, est responsable du recrutement d'un facteur d'export appelé Aly. Si il y a interférence au niveau de recrutement des facteurs d'épissage ou du facteur d'export, cela peut interférer avec l'export de l'ARNm et donc sa traduction en protéine. (Dykes and Emanuelli 2017; Reed 2003; Reed and Hurt 2002; Yoon, Abdelmohsen, and Gorospe 2013). D'autres recherches ayant identifié des lncRNAs au niveau du compartiment cytoplasmique suggèrent des fonctions additionnelles comme la régulation par interaction avec les ribosomes. Il semblerait que certains lncRNAs soient capables d'interagir par appariement partiel de séquences homologues avec des ARNm, formant ainsi un complexe macromoléculaire capable d'interagir à son tour avec des facteurs de répression de la traduction. C'est notamment le cas du lincRNA-p21. D'autres, comme le lncRNA BC1, sont capables d'inhiber l'assemblage du complexe d'initiation de par leur fonction de leurre (Pircher, Gebetsberger, and Polacek 2014; Yoon, Abdelmohsen, and Gorospe 2013). Il convient cependant de souligner que tous ces mécanismes dépendent étroitement du type cellulaire et des niveaux d'expression. Nos résultats obtenus dans des lignées transfectées par des vecteurs d'expression doivent donc être validés dans des modèles biologiques pertinents.

Comme le montrent les résultats des essais rapporteurs luciférase (figure 18), il existe une différence significative entre le niveau de transactivation du LTR en présence de Tax seul et le niveau de transactivation lorsque Tax et l'ARN de HBZ sont exprimés par les cellules. Ce qui indique l'intervention de l'ARN de HBZ dans des mécanismes de régulation. Les lncRNAs sont connus pour leurs multiples fonctions moléculaires, notamment en tant que signal ou leurre. Il se peut que l'ARN de HBZ remplisse l'une de ces fonctions et interfère avec la voie de régulation des gènes soit en imitant un signal de régulation de la transcription, soit en séquestrant des facteurs de transcription (Fang and Fullwood 2016; K. C. Wang and Chang 2012). D'autre part, il est également possible que l'ARN de HBZ intervienne comme plateforme d'assemblage d'autres complexes responsables de la modification d'histones.

Concernant l'effet répressif de LSD1 sur la transactivation du LTR, les modifications des histones entraînées par sa présence touchent plus régulièrement les promoteurs et amplificateurs activement transcrits. Ce qui expliquerait qu'il y ait une diminution très significative de l'expression de la luciférase (figure 18). D'autre part, s'il n'existe pas d'interaction entre l'ARN de HBZ et LSD1, cela n'exclut pas que celui-ci puisse interagir avec d'autres complexes responsables de modifications épigénétiques. Ainsi, les résultats du

laboratoire obtenus par Hélène Gazon indiquent que HBZ interfère avec HOTAIR qui interagit notamment avec Ezh2 et LSD1. Il est donc intéressant d'évaluer si les modifications épigénétiques liées à l'activité de l'ARN de HBZ et à l'activité déméthylase de LSD1 sont complémentaires ou antagonistes.

Bien que l'existence potentielle d'une interaction ait pu être mise en évidence entre LSD1 et les ARNs antisens de BLV et HTLV-2, cela ne permet pas de comprendre les mécanismes impliqu es. Ainsi, s'il est reconnu que les lncRNAs jouent un rôle clé en tant que régulateurs de l'état de la chromatine notamment par leur association à des complexes protéiques responsables de modifications épigénétiques, la nature de ces interactions et les sites cibl es sont bien souvent inconnus (Chu et al. 2011; Chu, Quinn, and Chang 2012). Par exemple, LSD1 interagit avec d'autres complexes tels que le PRC2 et pourrait en moduler l'activité.

Afin d'approfondir nos connaissances des mécanismes impliqu es, l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) coupl e au s quenc age (ChIP-seq) est une technique tout à fait indiqu e afin d'évaluer la nature d'une modification de la chromatine (Lennartsson and Ekwall 2009; Milne, Zhao, and Hess 2009). Le principe, en partie illustr e à la figure 19, consiste tout d'abord à fragmenter la chromatine présente dans l'échantillon. Les fragments sont ensuite purifi es par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps spécifiques à une modification d'histone (i.e. H3K4me1/2 et H3K9me1/2 pour LSD1) avant d'être analys es par s quenc age. Les schémas de modifications épigénétiques pr sent es par les histones constituent un code important à la base de la régulation de l'état de la chromatine et permettent la régulation des processus d'utilisation de l'ADN. D'où l'importance de les connaître et de mieux en comprendre les conséquences. La réalisation de cette méthode et l'analyse du niveau de modifications d'histones par rapport à un contrôle devrait permettre d'identifier si l'interaction entraîne l'activation ou non de la fonction de LSD1.

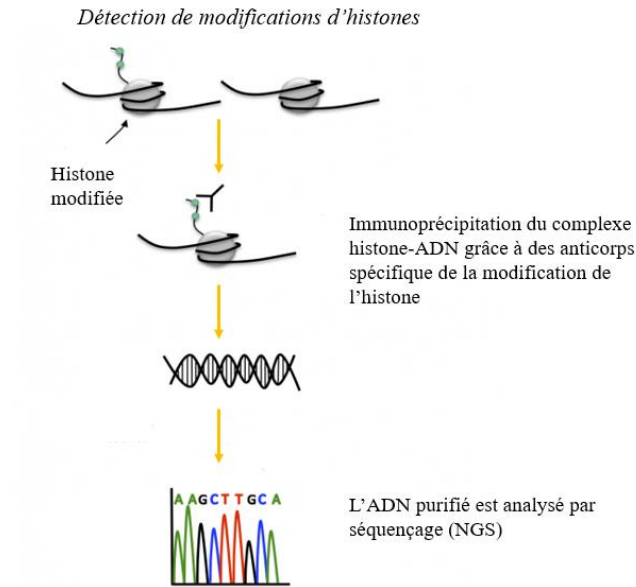


Figure 19 - Méthode d'immunoprécipitation de la chromatine combinée au séquençage pour la détection de modifications d'histones. <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/functional-genomics-ii-common-technologies-and-data-analysis-methods/histone-modifications>

Par ailleurs, une autre méthode mettant en œuvre l'isolation de la chromatine permettrait d'identifier la localisation précise du site de liaison du complexe ARN-protéine sur l'ADN. Il s'agit de l'isolation de la chromatine par purification de l'ARN (ChIRP) (Chu et al. 2011; Chu, Quinn, and Chang 2012). Ceci permettrait de mettre en lumière quels sont les gènes cibles, par l'établissement d'une carte des sites de liaisons. De plus, il semblerait que les lncRNAs soient capables d'agir de deux manières, en *cis* sur les gènes du chromosome qui comporte le gène dont ils sont issus, ou en *trans* sur des gènes plus distants c'est-à-dire sur d'autres chromosomes (Kornienko et al. 2013). Le principe du ChIRP est basé sur l'affinité du lncRNA avec la protéine et la chromatine (figure 20). Après *crosslinking*, la chromatine contenue dans l'échantillon est fragmentée. L'étape suivante constitue l'étape clé et consiste à hybrider des sondes marquées à la biotine sur l'ARN. L'immunoprécipitation est ensuite réalisée à l'aide de billes magnétiques de streptavidine, présentant une affinité pour la biotine. Après purification, l'ADN peut être séquencé.

Les expériences de ChIP et de ChIRP devraient donc permettre d'identifier les sites d'interaction entre les ARNs antisens et les modifications des nucléosomes liées à LSD1.

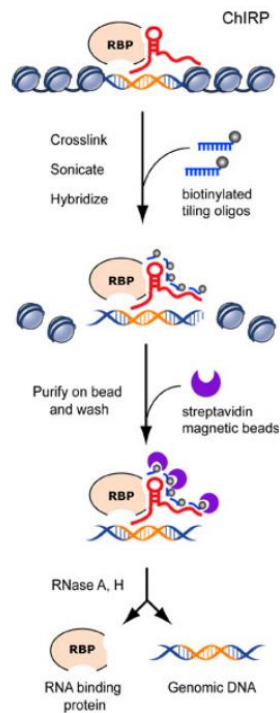


Figure 20 - Méthode d'isolation de la chromatine par purification de l'ARN. (Chu et al. 2011) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3249421/>

Conclusion

Pour conclure, ce travail de fin d'études a permis de montrer par la technique d'immunoprécipitation de l'ARN, qu'il existe potentiellement une interaction entre les ARNs antisens de HTLV-2 et BLV et la déméthylase spécifique de la lysine 1. Par ailleurs, les essais rapporteurs de luciférase ont révélé un effet répresseur de LSD1 et de l'ARN de HBZ sur la transactivation du promoteur LTR par Tax. Ces résultats devraient permettre de mieux comprendre le rôle des ARNs antisens dans l'infection par les rétrovirus.

Bibliographie

- Arpin-André, Charlotte et al. 2014. “Construction of a Reporter Vector for Analysis of Bidirectional Transcriptional Activity of Retrovirus LTR.” *Plasmid* 74: 45–51.
- Barbeau, Benoit, and Jean-Michel Mesnard. 2011. “Making Sense out of Antisense Transcription in Human T-Cell Lymphotropic Viruses (HTLVs).” *Viruses* 3(12): 456–68. <http://www.mdpi.com/1999-4915/3/5/456/>.
- Barbeau, Benoit, Jean Marie Peloponese, and Jean Miche Mesnard. 2013. “Functional Comparison of Antisense Proteins of HTLV-1 and HTLV-2 in Viral Pathogenesis.” *Frontiers in Microbiology* 4(AUG): 1–8.
- Barez, Pierre Yves et al. 2015. “Recent Advances in BLV Research.” *Viruses* 7(11): 6080–88.
- Bhan, Arunoday, and Subhrangsu S. Mandal. 2014. “Long Noncoding RNAs: Emerging Stars in Gene Regulation, Epigenetics and Human Disease.” *ChemMedChem Reviews*: 1–26.
- . 2015. “LncRNA HOTAIR: A Master Regulator of Chromatin Dynamics and Cancer.” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1856(1): 151–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.07.001>.
- Briquet, Sylvie, Jennifer Richardson, Christine Vanhée-Brossollet, and Catherine Vaquero. 2001. “Natural Antisense Transcripts Are Detected in Different Cell Lines and Tissues of Cats Infected with Feline Immunodeficiency Virus.” *Gene* 267(2): 157–64.
- De Brogniez, A., and L. Willems. 2016. “Viruses within Animal Genomes.” *OIE Revue Scientifique et Technique* 35(1): 133–42. <http://boutique.oie.int/extrait/11debrogniez133142.pdf>.
- Burrell, Christopher J., Colin R. Howard, and Frederick A. Murphy. 2017. “Chapter 23 - Retroviruses.” In *Fenner and White’s Medical Virology*, , 317–44. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123751560000230>.
- Chu, Ci et al. 2011. “Genomic Maps of LincRNA Occupancy Reveal Principles of RNA-Chromatin Interactions.” *Molecular Cell* 44(4): 667–78.
- Chu, Ci, Jeffrey Quinn, and Howard Y. Chang. 2012. “Chromatin Isolation by RNA Purification (ChIRP).” *Journal of Visualized Experiments* (61): 1–6. <http://www.jove.com/video/3912/>.
- Ciminale, Vincenzo, Francesca Rende, Umberto Bertazzoni, and Maria G. Romanelli. 2014. “HTLV-1 and HTLV-2: Highly Similar Viruses with Distinct Oncogenic Properties.” *Frontiers in Microbiology* 5(JULY): 1–9.
- Douceron, Estelle, Anne Sophie Kuhlmann, Madeleine Duc Dodon, and Renaud Mahieux. 2010. “Pas de Sens Interdit Pour La Transcription Virale.” *Virologie* 14(3): 193–202.
- Dunn, Jennifer, and Sudha Rao. 2017. “Epigenetics and Immunotherapy: The Current State of Play.” *Molecular Immunology* 87(May): 227–39. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589017301116>.
- Dupont, Cathérine (Ph.D), D. Randall (Ph.D) Armant, and Carol A. (Ph.D) Brenner. 2009. “Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective.” *Seminars in Reproductive Medicine* 27(5): 351–57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2791696/pdf/nihms160913.pdf>.
- Durkin, Keith et al. 2016. “Characterization of Novel Bovine Leukemia Virus (BLV) Antisense Transcripts by Deep Sequencing Reveals Constitutive Expression in Tumors and Transcriptional Interaction with Viral MicroRNAs.” *Retrovirology* 13(1): 1–16.
- Dykes, Iain M., and Costanza Emanuelli. 2017. “Transcriptional and Post-Transcriptional Gene Regulation by Long Non-Coding RNA.” *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 15(3): 177–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.005>.
- Egger, Gerda, Gangning Liang, Ana Aparicio, and Peter A. Jones. 2004. “Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy.” *Nature* 429(May): 457–63.

- [http://128.111.114.12/coursepages/06fall/INT94EI-Reich/dl/Jones epigenetics and human disease.pdf](http://128.111.114.12/coursepages/06fall/INT94EI-Reich/dl/Jones%20epigenetics%20and%20human%20disease.pdf).
- Fang, Yiwen, and Melissa J. Fullwood. 2016. "Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-Coding RNAs in Cancer." *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 14(1): 42–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.09.006>.
- Feinberg, Andrew P, Michael A Koldobskiy, and Anita Göndör. 2016. "Epigenetic Modulators, Modifiers and Mediators in Cancer Aetiology and Progression." *Nature Reviews Genetics* 17(5): 284–99.
- Gazon, Hélène et al. 2018. "How Does HTLV-1 Undergo Oncogene-Dependent Replication Despite a Strong Immune Response?" *Frontiers in Microbiology* 8(January): 1–6. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02684/full>.
- Gillet, Nicolas, Richard Kettmann, and Luc Willems. 2007. "Homologies Entre Les Deux Rétrovirus BLV et HTLV-1 et Développement D'une Nouvelle Approche Thérapeutique Basée Sur La Levée de La Latence Virale." *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment* 11(2): 151–57.
- Hajjari, Mohammadreza, and Abbas Salavaty. 2015. "HOTAIR: An Oncogenic Long Non-Coding RNA in Different Cancers." *Cancer biology & medicine* 12(1): 1–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859406> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4383848>.
- Halin, Marilène et al. 2009. "Human T-Cell Leukemia Virus Type 2 Produces a Spliced Antisense Transcript Encoding a Protein That Lacks a Classic BZIP Domain but Still Inhibits Tax2-Mediated Transcription." *Blood* 114(12): 2427–38.
- Hayward, D., and P. A. Cole. 2016. "LSD1 Histone Demethylase Assays and Inhibition." *Methods in Enzymology* 573: 261–78.
- Højfeldt, Jonas W., Karl Agger, and Kristian Helin. 2013. "Histone Lysine Demethylases as Targets for Anticancer Therapy." *Nature Reviews Drug Discovery* 12(12): 917–30.
- Kannian, Priya, and Patrick L. Green. 2010. "Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis." *Viruses* 2(9): 2037–77.
- Karn, J. 2001. "Retroviruses." *Encyclopedia of Genetics*: 1701–6. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122270800016153>.
- Kornienko, Aleksandra E, Philipp M Guenzl, Denise P Barlow, and Florian M Pauler. 2013. "Gene Regulation by the Act of Long Non-Coding RNA Transcription." *BMC Biol* 11(59).
- Landry, Sébastien et al. 2007. "Detection, Characterization and Regulation of Antisense Transcripts in HIV-1." *Retrovirology* 4: 1–16.
- Larocca, David, Lorraine A. Chao, Marian H. Seto, and Terence K. Brunck. 1989. "Human T-Cell Leukemia Virus Minus Strand Transcription in Infected T-Cells." *Biochemical and Biophysical research communications* 163(2): 1006–13. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X8992322X?via%3Dihub>.
- Lennartsson, Andreas, and Karl Ekwall. 2009. "Histone Modification Patterns and Epigenetic Codes." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1790(9): 863–68.
- MacLachlan, N. James et al. 2017. "Chapter 14 – Retroviridae." In *Fenner's Veterinary Virology*, Elsevier, 269–97. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128009468000143>.
- Maiques-Diaz, Alba, and Tim C.P. Somerville. 2016. "LSD1: Biologic Roles and Therapeutic Targeting." *Epigenomics* 8(8): 1103–16.
- Matsuoka, Masao, and Kuan-Teh Jeang. 2007. "Human T-Cell Leukaemia Virus Type 1 (HTLV-1) Infectivity and Cellular Transformation." *Nature Reviews Cancer* 7(4): 270–80. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2111>.
- Miller, Roger H. 1988. "Human Immunodeficiency Virus May Encode a Novel Protein on the

- Genomic DNA Plus Strand.” *Science, New Series* 239(4846): 1420–22.
- Milne, Thomas A, Keji Zhao, and Jay L Hess. 2009. “Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) for Analysis of Histone Modifications and Chromatin-Associated Proteins.” *Methods in Molecular Biology* 538: 409–23. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-418-6>.
- Nisole, Sébastien, and Ali Saïb. 2004. “Early Steps of Retrovirus Replicative Cycle.” *Retrovirology* 1: 1–20.
- Okada, M, and K T Jeang. 2002. “Differential Requirements for Activation of Integrated and Transiently Transfected Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Long Terminal Repeat.” *J Virol* 76(24): 12564–73.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12438582.
- Oltean, S., and D. O. Bates. 2014. “Hallmarks of Alternative Splicing in Cancer.” *Oncogene* 33(46): 5311–18. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2013.533>.
- Paiva, Arthur, and Jorge Casseb. 2015. “Review Origin and Prevalence of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (Htlv-1) and Type 2 (Htlv-2) Among Indigenous Populations in the Americas.” *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 57(1): 1–13.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000100001>.
- Pelechano, Vicent, and Lars M. Steinmetz. 2013. “Gene Regulation by Antisense Transcription.” *Nature Reviews Genetics* 14(12): 880–93.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3594>.
- Pircher, Andreas, Jennifer Gebetsberger, and Norbert Polacek. 2014. “Ribosome-Associated NcRNAs: An Emerging Class of Translation Regulators.” *RNA Biology* 11(11): 1335–39.
- Rasmussen, M. H. et al. 2010. “Antisense Transcription in Gammaretroviruses as a Mechanism of Insertional Activation of Host Genes.” *Journal of Virology* 84(8): 3780–88. <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02088-09>.
- Reed, Robin. 2003. “Coupling Transcription, Splicing and mRNA Export.” *Current Opinion in Cell Biology* 15(3): 326–31.
- Reed, Robin, and Ed Hurt. 2002. “A Conserved mRNA Export Machinery Coupled to Pre-MRNA Splicing.” *Cell* 108(4): 523–31.
- Rodríguez, Sabrina M. et al. 2011. “Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV.” *Viruses* 3(7): 1210–48.
- Safari, Roghaiyeh et al. 2017. “Cis-Drivers and Trans-Drivers of Bovine Leukemia Virus Oncogenesis.” *Current Opinion in Virology* 26: 15–19.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.012>.
- Simon, Jeffrey A., and Carol A. Lange. 2008. “Roles of the EZH2 Histone Methyltransferase in Cancer Epigenetics.” *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 647(1–2): 21–29.
- Tsai, Miao-chih et al. 2010. “Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes.” *Science* 329(5992): 689–93.
- Wang, Kevin C., and Howard Y. Chang. 2012. “Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs.” *Molecular Cell* 43(6): 904–14.
- Wang, Ziqiang, Yiwan Zhao, and Yaou Zhang. 2017. “Viral LncRNA: A Regulatory Molecule for Controlling Virus Life Cycle.” *Non-coding RNA Research* 2(1): 38–44.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468054016300294>.
- Weinhold, Bob. 2006. “Epigenetics : The Science of Change.” *Environmental Health Perspectives* 114(3): 160–67.
- Yoon, Je Hyun, Kotb Abdelmohsen, and Myriam Gorospe. 2013. “Posttranscriptional Gene Regulation by Long Noncoding RNA.” *Journal of Molecular Biology* 425(19): 3723–30.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.11.024>.

Zhang, Xu et al. 2018. "Non - Coding RNAs and Retroviruses." *Retrovirology*: 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s12977-018-0403-8>.

Zheng, Yi-Chao et al. 2012. "A Systematic Review OfHistone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors." *Medicinal Research Reviews* 29(6): 1292–1327.