

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

IMPACT DU TRANSACTIVATEUR VP16 DU VIRUS HERPÈS SIMPLEX 1 SUR LA PROTÉINE CELLULAIRE UPSTREAM BINDING FACTOR

Par

Gauthier Alfonsi

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Patrick Labonté
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Examineur externe

Guy Lemay
Département de microbiologie, infectiologie et
immunologie
Université de Montréal

Directrice de recherche

Angela Pearson
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

RÉSUMÉ

Le virus herpès simplex 1 (HSV-1) est un virus ADN double brin qui infecte les cellules épithéliales et neuronales humaines. Notre laboratoire a découvert que l'infection par HSV-1 déclenche la relocalisation de plusieurs protéines nucléolaires, dont *Upstream Binding Factor* (UBF), un facteur de transcription de l'ARN polymérase I pouvant également être impliqué dans la stimulation de la transcription de l'ARN polymérase II. UBF se relocalise des nucléoles aux compartiments de réplication virale et colocalise avec l'ADN viral. Nous avons montré que UBF inhibe la réplication de HSV-1. La protéine virale structurale VP16 fait partie du tégument de HSV-1, une couche entre la capsid et l'enveloppe du virus qui est constituée de protéines virales et cellulaires pouvant agir avant la décapsidation et l'expression des gènes viraux. VP16 est un facteur de transcription des gènes viraux immédiats-précoces qui recrute une série de facteurs de transcription aux promoteurs viraux via son domaine d'activation acide. Des résultats préliminaires suggèrent que VP16 peut affecter la colocalisation de UBF avec l'ADN viral. Nous émettons l'hypothèse que VP16 inhibe l'activité antivirale de UBF.

Premièrement, nous avons étudié si le domaine transactivateur de VP16 interagit avec UBF. Les protéines recombinantes glutathion S-transférase (GST) et GST fusionné au domaine transactivateur de VP16 (GST-VP16AD) ont été exprimées en bactérie et immobilisées sur des billes glutathion-sépharose. Un extrait de protéines cellulaires totales a été préparé à partir de cellules HeLa. Cet extrait a été traité avec de la nucléase micrococcale pour dégrader les acides nucléiques et empêcher ces derniers de médier des interactions non spécifiques entre le domaine transactivateur de VP16 et UBF. Nous avons testé si UBF de l'extrait cellulaire interagissait spécifiquement avec le domaine d'activation de VP16 dans un essai d'interactions protéines-protéines de type « GST pull-down ». Nous avons élué les protéines adsorbées aux matrices d'affinité, puis nous avons fait un immunobuvardage ciblant UBF. Nous avons également réalisé un contrôle positif en ciblant par immunobuvardage *TATA box binding protein* (TBP). En effet, TBP est recruté par le domaine transactivateur de VP16, et notre hypothèse suggère qu'il existe une interaction entre ce domaine de VP16 et UBF. Nous avons détecté TBP dans l'extrait de protéines cellulaires totales ainsi que dans les éluats de billes, plus intensément pour GST-VP16AD que pour GST. UBF a été détecté dans l'extrait de protéines cellulaires totales mais pas dans les éluats, ce qui suggère que UBF ne se lie pas au domaine transactivateur de VP16 en absence d'autres protéines virales.

Deuxièmement, nous avons cherché à déterminer si la surexpression de VP16 module la localisation intracellulaire de UBF. Nous avons généré des vecteurs permettant de surexprimer VP16 pleine longueur et une version mutée de VP16 avec une délétion C-terminale des acides aminés 423 à 490 qui enlève le domaine de transactivation. L'expression de VP16 avec et sans domaine de transactivation en contexte de transfection transitoire de cellules HeLa a été validé par immunobuvardage de protéines. Nous avons transfecté de manière transitoire des cellules HeLa pour surexprimer UBF seule, VP16 seule, ou pour surexprimer simultanément UBF et VP16. Les cellules ont été traitées pour visualiser les protéines VP16 et UBF par immunofluorescence indirecte au microscope confocal. VP16 exprimé de manière ectopique est détecté principalement dans le cytoplasme. Nous avons constaté qu'en surexprimant uniquement UBF, la protéine est principalement détectée dans le noyau. En revanche, en surexprimant simultanément VP16 pleine longueur, une grande portion de UBF est détectée dans le cytoplasme. Un résultat préliminaire suggère que UBF soit également localisée majoritairement dans le cytoplasme quand les cellules surexpriment simultanément une version mutée de VP16 sans domaine transactivateur.

Nos résultats montrent que la surexpression de VP16 peut affecter la localisation intracellulaire de UBF en absence d'autres protéines virales. Bien que UBF endogène ne soit pas relocalisé au cytoplasme en contexte d'infection, ces résultats suggèrent que UBF et VP16 puissent interagir. Le domaine de transactivation de VP16 est connu pour interagir avec plusieurs facteurs de transcription afin de moduler l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase II. Néanmoins, l'effet de VP16 sur la localisation intracellulaire de UBF exprimée de manière ectopique ne semble pas dû à l'interaction du domaine d'activation de VP16 avec celle-ci. Cela suggère que VP16 pourrait affecter la localisation de UBF dans la cellule hôte via une interaction médiée par une partie de la protéine autre que le domaine de transactivation. Des travaux futurs pourront élucider le domaine de VP16 nécessaire pour cette interaction, ainsi que l'impact fonctionnel de cette interaction.

Mots clés : Virus herpès simplex ; défense antivirale ; échappement viral ; relation hôte-virus ; VP16 ; UBF

ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV-1) is a double-stranded DNA virus that infects human epithelial and neuronal cells. Our laboratory found that HSV-1 infection triggers the relocalization of several nucleolar proteins, including Upstream Binding Factor (UBF), an RNA polymerase I transcription factor that may also be involved in the stimulation of RNA polymerase II transcription. UBF relocalizes from nucleoli to viral replication compartments and colocalizes with viral DNA. We have shown that UBF inhibits HSV-1 replication. The viral structural protein VP16 is part of HSV-1 tegument, a layer between the capsid and the envelope of the virus, which is composed of viral and cellular proteins that can act prior to decapsidation and viral gene expression. VP16 is an immediate-early viral transcriptional activator that recruits various transcription factors to viral promoters via its acidic activation domain. Preliminary results suggest that VP16 may affect the colocalization of UBF with viral DNA. We hypothesize that VP16 inhibits the antiviral activity of UBF.

Firstly, we studied if the transactivator domain of VP16 interacts with UBF. Recombinant glutathione S-transferase (GST) and GST fused with the transactivation domain of VP16 (GST-VP16AD) were expressed in bacteria and immobilized on glutathione-sepharose beads. A whole cell protein extract was prepared from HeLa cells. This extract was treated with micrococcal nuclease to degrade nucleic acids and prevent them from mediating nonspecific interactions between UBF and the transactivation domain of VP16. We tested if UBF from the whole cell extract interacted specifically with the activation domain of VP16 in a GST pull-down assay. We eluted proteins that were adsorbed to GST and GST-VP16 affinity matrices and then performed a western blot targeting UBF. We also included a positive control by testing for TATA box binding protein (TBP). Indeed, TBP is known to be recruited by the transactivation domain of VP16, and our hypothesis suggests that there is an interaction between this domain of VP16 and UBF. We detected TBP in the whole cell extract as well as in the eluates of the affinity beads, more intensely for GST-VP16AD than for GST. UBF was detected in the whole cell extract but not in the eluates, suggesting that UBF does not bind to the transactivation domain of VP16 in the absence of other viral proteins.

Secondly, we tested if overexpression of VP16 modulates the intracellular localization of UBF. We generated vectors to overexpress full-length VP16 and a mutated version of VP16 with a C-terminal deletion of amino acids 423 to 490 that removes the transactivation domain. Expression of VP16 with and without transactivation domain in the context of transient transfection of HeLa cells was validated by western blot. We transiently transfected HeLa cells to overexpress UBF alone, VP16 alone, or to simultaneously overexpress UBF and VP16. Cells were treated to visualize VP16 and UBF by indirect immunofluorescence using a confocal microscope. Overexpressed VP16 was detected mainly in the cytoplasm. When UBF was overexpressed alone, we found that it was localized mainly in the nucleus. In contrast, when UBF was simultaneously overexpressed with full-length VP16, a large portion of UBF was detected in the cytoplasm. A preliminary result suggests that UBF was also localized mainly in the cytoplasm when cells overexpressed simultaneously a mutated version of VP16 without a transactivation domain.

Our results show that overexpression of VP16 can affect the intracellular localization of UBF in the absence of other viral proteins. Although endogenous UBF is not relocalized to the cytoplasm in the context of infection, these results suggest that UBF and VP16 may interact. The transactivation domain of VP16 is known to interact with several transcription factors in order to modulate the transcriptional activity of RNA polymerase II. Nevertheless, the effect of VP16 on the intracellular localization of ectopically expressed UBF does not seem to be mediated by an interaction with the activation domain of VP16. This result suggests that VP16 could affect the localization of UBF in the host cell via an interaction mediated by a domain other than the transactivation domain. Future work may identify the domain of VP16 required for this interaction, as well as the functional impact of this interaction.

Keywords: Herpes simplex virus; antiviral defense; viral escape; host-virus relation; VP16; UBF

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
1 INTRODUCTION	1
1.1 Virus herpès simplex 1.....	1
1.1.1 Taxonomie.....	1
1.1.2 Épidémiologie	1
1.1.3 Structure du virion	2
1.1.4 Cycle de réplication lytique.....	3
1.2 Protéine virale VP16	6
1.2.1 Structure	6
1.2.2 Induction de la transcription des gènes viraux immédiats-précoces.....	8
1.2.2.1 Recrutement des facteurs de transcription.....	9
1.2.3 Régulation de l'assemblage et de la maturation des virions	10
1.2.4 Implication de VP16 dans le passage de l'état latent à l'état lytique.....	10
1.3 Protéine cellulaire Upstream Binding Factor	11
1.3.1 Structure et isoformes	11
1.3.2 Initiation de la transcription de l'ADN ribosomal	12
1.3.3 Remodelage de la chromatine de l'ADN ribosomal.....	12
1.3.4 Régulation de l'ARN polymérase II.....	12

1.3.5	Interactions connues avec des virus	13
1.3.5.1	Virus oncogéniques	13
1.3.5.2	Autres virus.....	14
1.4	Réponses cellulaires antiherpétiques et échappement viral	15
1.4.1	Corps nucléaires de la protéine de la leucémie promyélocytaire	15
1.4.2	Protéine 16 inductible par l'interféron	15
1.4.3	Récepteurs analogues au gène I inductible par l'acide rétinoïque.....	16
1.4.4	Guanosine monophosphate-adénosine monophosphate cyclique synthase — stimulateur des gènes de l'interféron	16
1.4.5	Autres protéines cellulaires participant à la réponse innée antivirale	17
1.4.6	Stratégies d'évasion de l'immunité innée du virus herpès simplex 1	18
2	PROBLÉMATIQUE	21
3	MÉTHODOLOGIE	23
3.1	Cellules et virus.....	23
3.2	Production d'un extrait de protéines cellulaires totales	23
3.3	Préparation des matrices d'affinités associées à la protéine glutathion S-transférase fusionnée ou non au domaine transactivateur de VP16	24
3.4	GST pull-down	25
3.5	Immunobuvardage de protéines.....	25
3.6	Clonage des vecteurs d'expression mammifère de VP16 avec et sans domaine de transactivation.....	26
3.7	Transfection	28
3.8	Immunofluorescence indirecte et détection par microscopie confocale	29
4	RÉSULTATS	31
4.1	Tests d'interaction entre UBF et le domaine transactivateur de VP16	31
4.2	Impact de VP16 sur la localisation intracellulaire de UBF surexprimé	35

5	DISCUSSION	41
5.1	Comment la protéine cellulaire UBF pourrait inhiber la transcription des gènes viraux immédiats-précoces et précoces ?.....	41
5.2	Comment la protéine virale VP16 pourrait contrecarrer l'effet antiviral de UBF ?	43
6	CONCLUSION	47
7	BIBLIOGRAPHIE	49

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Schéma de la structure de HSV-1	2
Figure 1.2 : Schéma du génome de HSV-1	3
Figure 1.3 : Schéma du cycle viral lytique de HSV-1	5
Figure 1.4 : Schéma de la structure primaire de VP16	6
Figure 1.5 : Représentation de la structure 3D du domaine <i>core</i> de VP16	7
Figure 1.6 : Schéma de la structure primaire de UBF1 et UBF2	11
Figure 4.1 : Schéma de GST et GST-VP16AD	31
Figure 4.2 : Expression de GST et GST-VP16AD	32
Figure 4.3 : Protéines GST et GST-VP16AD immobilisées sur les matrices d'affinités	33
Figure 4.4 : Immunobuvardage de protéines des éluats du GST pull-down	34
Figure 4.5 : Vecteurs d'expression de VP16 avec et sans domaine transactivateur	35
Figure 4.6 : Expression de VP16WT ou VP16delAD par les cellules HeLa transfectées.....	36
Figure 4.7 : Localisation de UBF surexprimé en contexte de cotransfection avec VP16WT	37
Figure 4.8 : Quantification de la localisation de UBF surexprimé en contexte de cotransfection avec VP16WT	38
Figure 4.9 : Localisation de UBF surexprimé en contexte de cotransfection avec VP16delAD ...	39
Figure 6.1 : Modèle de l'impact de VP16 sur UBF durant une infection par HSV-1	48

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 : Amorces utilisées pour séquencer les vecteurs d'expression de VP16WT et VP16delAD	28
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACB	<i>Affinity chromatography buffer</i>
ATRX	<i>Alpha-thalassemia mental retardation syndrome x-linked protein</i>
CaCl ₂	<i>Calcium dichloride</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CREB	<i>Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein</i>
cGAS	<i>Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate synthase</i>
DAI	<i>DNA-dependent activator of interferon regulatory factors</i>
DAXX	<i>Death-associated protein 6</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	<i>Dithiothréitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethyleneglycoltetraacetic Acid</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FKBP5	<i>Tacrolimus (FK506) binding protein 5</i>
GST	<i>Glutathion S-transférase</i>
GST-VP16AD	<i>GST fusionné au domaine de transactivation de VP16</i>
HCF-1	<i>Host cell factor 1</i>
HEPES	<i>Hydroxyéthylpipérazineéthane sulfonique</i>
HFF	<i>Human foreskin fibroblasts</i>
HMG	<i>High mobility group</i>
hpt	<i>Heures post-transfection</i>
Hsp90 α	<i>Heat-shock protein 90α</i>
HSV-1	<i>Herpes simplex virus 1</i>
IFI	<i>Interferon inducible protein</i>
IFIT3	<i>Interferon inducible protein with tetratricopeptide repeats 3</i>
IKK	<i>Nuclear factor-kB inhibitor kinase</i>
IPTG	<i>Isopropylthiogalactopyranoside</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factors</i>
IRL	<i>Internal repeat long</i>
IRS	<i>Internal repeat short</i>
IRSI	<i>Insulin receptor substrate-1</i>
LB	<i>Luria broth</i>

Mal	<i>MyD88 adaptor-like protein</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation associated protein 5</i>
MED17	<i>Mediator complex subunit 17</i>
MED25	<i>Mediator complex subunit 25</i>
MgCl ₂	<i>Magnesium Chloride</i>
MORC3	<i>Microrchidia family CW-type zinc finger 3</i>
MxB	<i>Myxovirus resistance protein B</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NaCl	<i>Sodium Chloride</i>
NCS	<i>Newborn Calf Serum</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
NuA4	<i>Nucleosomal acetyltransferase of histone H4</i>
OAS	<i>2',5'-oligoadenylate synthase</i>
OCT-1	<i>Octamer binding protein 1</i>
PACT	<i>Protein activator of the interferon induced protein kinase</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCAF	<i>p300/CBP-associated factor</i>
PC4	<i>Positive cofactor 4</i>
PKR	<i>Protéine kinase R</i>
PML	<i>Promyelocytic leukaemia</i>
PMSF	<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
P/S	<i>Pénicilline et streptomycine</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inductible gene 1</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
SAGA	<i>Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SP100	<i>Speckled Protein 100</i>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
SWI/SNF	<i>Switch/sucrose non-fermenting</i>
TAF	<i>TATA box associated factors</i>

TBK1	<i>TRAF family member associated NF-κB activator binding kinase 1</i>
TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20</i>
TFII	<i>Transcription factor II</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factors</i>
Tris-HCl	<i>Tris-hydrochloride</i>
TRL	<i>Terminal repeat long</i>
TRS	<i>Terminal repeat short</i>
UBF	<i>Upstream binding factor</i>
UCE	<i>Upstream control element</i>
UL	<i>Unique long</i>
US	<i>Unique short</i>
USP14	<i>Ubiquitin-specific protease 14</i>
Vhs	<i>Virion host shutoff protein</i>
VP16WT	VP16 de type sauvage
VP16delAD	VP16 sans domaine de transactivation
ZAP	<i>Zinc finger antiviral protein</i>

1 INTRODUCTION

1.1 Virus herpès simplex 1

1.1.1 Taxonomie

Selon le Comité international de taxonomie des virus, la famille des *Herpesviridae* fait partie du domaine des *Duplodnaviria*, du règne des *Heunggongvirae*, de l'embranchement des *Peploviricota*, de la classe des *Herviviricetes* et de l'ordre des *Herpesvirales*. Cette famille comprend neuf virus humains et est subdivisée en trois sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae* (Walker et al., 2020).

La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* inclut les virus herpès humains de type 1, 2 et 3. Les virus herpès humains de type 1 et 2, ou virus herpès simplex 1 (HSV-1) et 2, font partie du genre des *Simplexvirus*. Le virus herpès humain de type 3 fait partie du genre des *Varicellovirus* et est plus connu sous le nom de virus varicelle-zona. La sous-famille des *Betaherpesvirinae* inclut les virus herpès humains de type 5, 6A, 6B et 7. Le virus herpès humain de type 5 ou cytomégalovirus humain appartient au genre des *Cytomegalovirus*. Les virus humains de type 6A, 6B et 7 font partie du genre des *Roseolovirus*. La sous-famille des *Gammaherpesvirinae* comprend les virus herpès humains de type 4 et 8 qui sont oncogéniques. Le virus herpès humain de type 4 ou virus d'Epstein-Barr appartient au genre des *Lymphocryptovirus*. Le virus herpès humain de type 8 induit le sarcome de Kaposi et fait partie du genre des *Rhadinovirus*.

1.1.2 Épidémiologie

Les infections herpétiques orolabiales sont principalement causées par HSV-1 et les infections herpétiques génitales par HSV-2, bien que les deux virus puissent être à l'origine des deux types d'infections. La prévalence de HSV-1 diffère selon le lieu, le statut économique et l'âge. Moins de 70 % de la population américaine et japonaise entre vingt et quarante ans est séropositive à HSV-1, alors que plus de 95 % de la population chinoise, sénégalaise et costaricaine l'est. Les principales pathologies engendrées par HSV-1 sont des lésions cutanées, des kératites herpétiques (environ trois-cent-mille cas par an diagnostiqués aux États-Unis) pouvant rendre aveugle, et des encéphalites herpétiques hémorragique (environ un cas pour deux-cent-mille personnes aux États-Unis) pouvant entraîner la mort. HSV-1 entre en latence, et peut être réactivé à cause du rayonnement ultraviolet, du stress émotionnel ou physique, de la fièvre, des menstruations ou de l'immunosuppression (Roizman et al., 2013; Whitley et al., 2016). Ce mémoire va se concentrer sur l'infection lytique de HSV-1.

1.1.3 Structure du virion

HSV-1 est un virus enveloppé, possédant à sa surface plus de dix glycoprotéines et plusieurs protéines membranaires non glycosylées (Figure 1.1) (Whitley *et al.*, 2016).

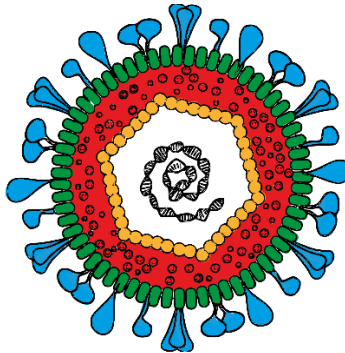


Figure 1.1 : Schéma de la structure de HSV-1

HSV-1 est un virus enveloppé (en vert) à ADN double brins (en noir) avec une capside icosaédrique (en orange). Il possède entre sa capside et son enveloppe un tégment (en rouge), constitué de protéines virales et cellulaires. Le virion possède des glycoprotéines à sa surface (en bleu).

HSV-1 possède une capside icosaédrique. VP5, la principale protéine de la capside, forme des capsomères pentagonaux sur les sommets et des capsomères hexagonaux sur les faces. Ces capsomères sont reliés entre eux par les protéines VP19C et VP23. Des hexamères de la protéine VP26 sont associés aux capsomères hexagonaux de VP5. Il existe également un capsomère portail constitué de douze exemplaires de la protéine UL6, par lequel le génome viral entre et sort de la capside (Roizman *et al.*, 2013).

Le génome viral de HSV-1 est un ADN bicaténaire faisant 152 000 paires de bases et codant plus de 80 gènes (Knipe *et al.*, 2021). Ce génome est constitué de deux séquences uniques, une séquence longue (UL) et une séquence courte (US). Chacune de ces deux séquences est encadrée par des régions répétées terminales (TRL et TRS) et internes (IRL et IRS). Il y a une copie de la séquence « a » à chaque extrémité du génome, et une copie à la jonction entre IRL et IRS (Figure 1.2) (Watanabe *et al.*, 2018).



Figure 1.2 : Schéma du génome de HSV-1

Le génome viral de HSV-1 fait 152 000 paires de bases. Il est constitué d'une séquence unique longue (UL) et d'une séquence unique courte (US). En vert, des régions répétées (TRL, IRL, IRS et TRS) encadrent les deux séquences uniques. En bleu, une copie de la séquence « a » est présente à chaque extrémité du génome ainsi qu'à la jonction entre IRL et IRS.

Les gènes de HSV-1 sont classés en trois groupes selon le moment où ils sont exprimés durant le cycle viral : les gènes viraux immédiats-précoces, précoces et tardifs (Watanabe *et al.*, 2018).

Entre la capside et l'enveloppe, HSV-1 possède un tégument constitué de plusieurs protéines virales et cellulaires (Loret *et al.*, 2008). Ces protéines étant présentes dans le virion, elles peuvent agir dès l'entrée du virus dans la cellule hôte avant l'expression des gènes viraux. Les protéines tégumentaires sont divisées entre une couche interne proche de la capside et une couche externe plus proche de l'enveloppe (Crump, 2018).

1.1.4 Cycle de réplication lytique

Les virions libres vont initier un nouveau cycle lytique en se fixant via ses glycoprotéines gB et gC aux protéoglycanes à héparane sulfate présentes à la surface des cellules cibles. Cette liaison réversible permet d'augmenter la concentration de virions à la surface des cellules. La glycoprotéine gD va ensuite établir des liaisons irréversibles avec plusieurs récepteurs cellulaires dont les nectines 1 et 2, les sulfates d'héparane 3-O-sulfatés et le récepteur des facteurs de nécrose tumorale *herpesvirus entry mediator*. Le virus va alors entrer dans la cellule cible, soit en fusionnant son enveloppe avec la membrane plasmique, soit en étant endocyté. Dans les deux cas, la capside et les protéines tégumentaires vont se retrouver dans le cytoplasme (Whitley *et al.*, 2016). Certaines protéines tégumentaires vont agir directement à ce niveau comme *virion host shutoff* (vhs) qui en dégradant des ARN messagers va affecter l'immunité innée (voir section 1.4.6). D'autres protéines tégumentaires comme VP16 vont agir dans le noyau (voir section 1.2). La capside est transportée jusqu'au noyau via les microtubules, et la décapsidation va avoir lieu au niveau des pores nucléaires. Dans le noyau le génome viral va se circulariser et être chromatinisé (Whitley *et al.*, 2016). En outre, des compartiments de réplication virale constitués de protéines virales et cellulaires vont se former autour des génomes viraux (Randall *et al.*, 1986). Ces compartiments sont le siège de l'expression des gènes viraux, de la

réplication du génome viral et de l'encapsidation. Les gènes viraux immédiats-précoces sont les premiers à être transcrits. Après leur transcription, les ARN messagers vont être transloqués dans le cytoplasme pour être traduits puis les protéines vont entrer dans le noyau pour promouvoir la transcription des autres gènes viraux. Vient ensuite l'expression des gènes viraux précoces, dont les produits retournent dans le noyau après traduction pour participer à la réplication du génome viral. Les protéines virales UL9 et ICP8 vont se lier aux origines de réplication du génome viral et recruter la polymérase et ses facteurs associés. Une hélicase pour séparer les deux brins d'ADN et une primase pour synthétiser de courts segments d'ARN servant d'amorce pour l'ADN polymérase II seront également mobilisés, ce qui donne au génome une forme de thêta (θ). Durant la réplication, le génome va adopter une conformation de cercle roulant, où l'ADN viral se déroule sous forme d'une succession de génomes viraux liés les uns à la suite des autres, le concatémère (Roizman *et al.*, 2013). Enfin, les gènes viraux tardifs sont les derniers gènes viraux à être exprimés, et ils codent entre-autres pour des protéines structurales. Les protéines de la capsidite et quelques protéines tégmentaires vont être transloquées au noyau, le reste des protéines tégmentaires va rester dans le cytoplasme après leur traduction, et les glycoprotéines vont s'insérer dans la membrane de vésicules dérivées du réseau transgolgien (Whitley *et al.*, 2016). L'assemblage de la capsidite se déroule dans le noyau, ainsi que l'encapsidation à travers le capsomère portail d'une copie de génome viral par virion. La protéine UL25 bouche le portail pour empêcher que le génome ne ressorte (Cockrell *et al.*, 2009). La capsidite va s'entourer de quelques protéines virales dans le noyau puis va acquérir une première enveloppe à la membrane nucléaire interne. Le virus se retrouve enveloppé entre les deux membranes du noyau, puis va fusionner son enveloppe avec la membrane nucléaire externe pour se retrouver désenveloppé dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme, le virion va finir de constituer son tégment, puis va acquérir sa deuxième enveloppe à partir de la membrane d'une vésicule dérivée du réseau transgolgien et quitter la cellule par exocytose (Whitley *et al.*, 2016) (Figure 1.3). Après avoir libéré une multitude de virions, la cellule finit par être lysée.

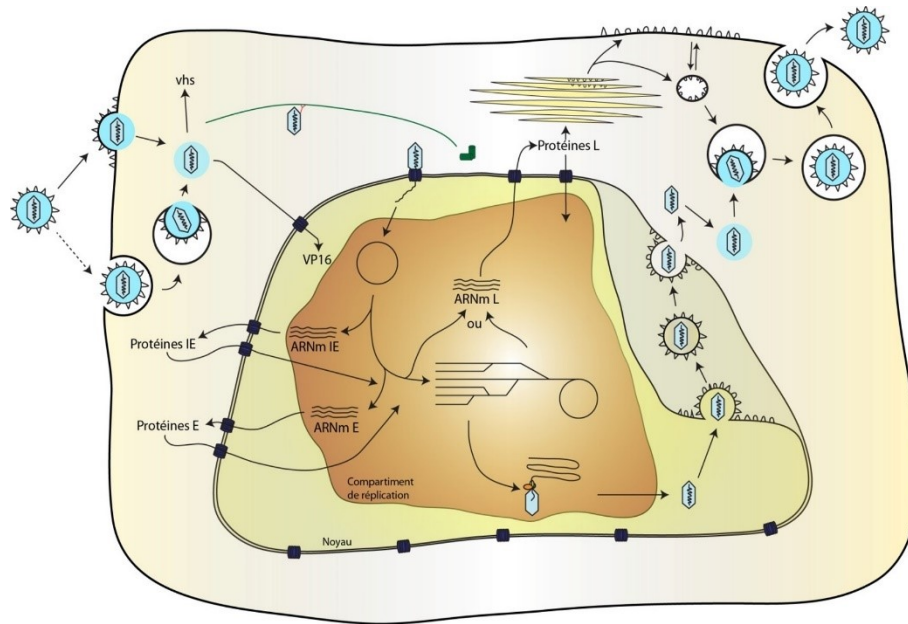


Figure 1.3 : Schéma du cycle viral lytique de HSV-1 (tirée de Bertrand 2011)
© 2011, Luc Bertrand

Le virion peut entrer dans une cellule hôte en étant endocyté ou en fusionnant son enveloppe avec la membrane plasmique cellulaire. Certaines protéines virales tégumentaires vont agir dans le cytoplasme comme vhs qui dégrade les ARN messagers afin de contrecarrer l'immunité innée. D'autres protéines tégumentaires vont agir dans le noyau comme le transactivateur VP16. La capsidation va se diriger vers le noyau via les microtubules. La décapsidation a lieu au niveau des pores nucléaires. Le génome viral va se circulariser dans le noyau, et un compartiment de réplication virale constitué de protéines virales et cellulaires va se former autour de celui-ci. Les gènes viraux immédiats-précoces (IE) sont alors exprimés, suivi des gènes viraux précoces (E) impliqués dans la réplication du génome viral, et des gènes tardifs (L) codant entre autres pour les protéines structurales. Après l'encapsidation dans les compartiments de réplication virale, la capsidation va agréger quelques protéines tégumentaires autour du noyau et être transloquée dans le cytoplasme en étant enveloppée puis désenveloppée. Dans le cytoplasme, le virion va finir d'acquies ses protéines tégumentaires puis sera exocyté.

1.2 Protéine virale VP16

Ce projet de maîtrise s'intéresse plus particulièrement à une protéine tégmentaire de HSV-1, VP16, qui a la capacité de promouvoir par transactivation la transcription virale par l'ARN polymérase II.

1.2.1 Structure

La protéine virale VP16, également nommée vmw65 ou α -TIF, est une protéine virale tégmentaire de 65 kDa (Campbell *et al.*, 1984) constituée de 490 acides aminés (Dalrymple *et al.*, 1985).

Elle est constituée d'un domaine *core* de l'acide aminé 49 à l'acide aminé 403 (Liu *et al.*, 1999), et d'un domaine acide transactivateur en position C-terminale à partir de l'acide aminé 412 (Triezenberg *et al.*, 1988) (Figure 1.4).

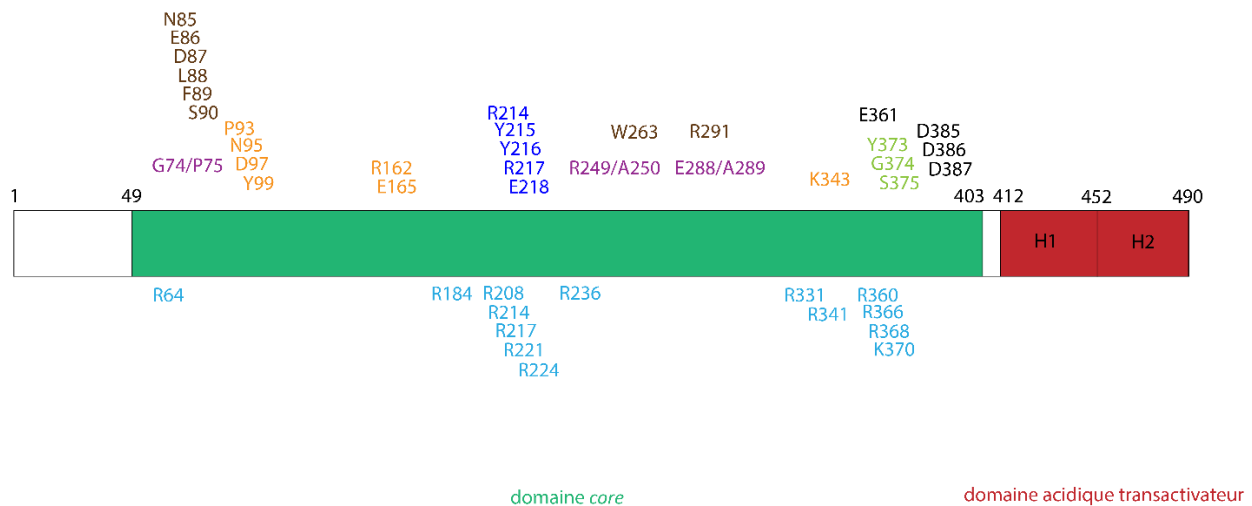


Figure 1.4 : Schéma de la structure primaire de VP16

La portion verte correspond au domaine *core*, et la portion rouge au domaine acide transactivateur. Le domaine transactivateur est constitué d'une région proximale H1 et d'une région distale H2. Les chiffres correspondent aux acides aminés de VP16. Au-dessus de VP16, les résidus en orange et en marron sont des résidus conservés qui stabilisent la structure tertiaire du domaine *core*. Les résidus en orange sont reliés entre eux comme les résidus en marron. Les résidus en bleu foncé sont des résidus conservés du domaine *core* de VP16 situés à la surface de la protéine en trois dimensions. Les résidus en violet sont impliqués dans l'assemblage du virion. Les résidus en vert se lient à OCT-1, et les résidus en noir interagissent avec HCF-1. Les résidus en bleu clair en-dessous de VP16 sont proposés de participer à la liaison à l'ADN.

Le domaine transactivateur en position C-terminale possède une région proximale H1 (acides aminés 412-452) et une région distale H2 (acides aminés 453-490). Ces deux sous-domaines participent à l'induction de la transcription des gènes viraux immédiats-précoces en recrutant des cofacteurs différents (Ikeda *et al.*, 2002; Regier *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1993).

Le domaine *core* de VP16 est constitué de onze hélices « α » et de six feuilletts « β ». La structure en trois dimensions du domaine *core* a la forme d'un siège (Figure 1.5). Le segment entre les résidus 146 et 247 forme le dossier (en vert), le segment 248-323 l'assise (en bleu) et les segments 49-145 et 324-412 la surface supérieure (en rouge et en jaune). La section entre les résidus 350 et 394 est désordonnée, ce qui signifie qu'elle adopte sa conformation en trois dimensions uniquement lors de son association avec d'autres macromolécules (Liu *et al.*, 1999).

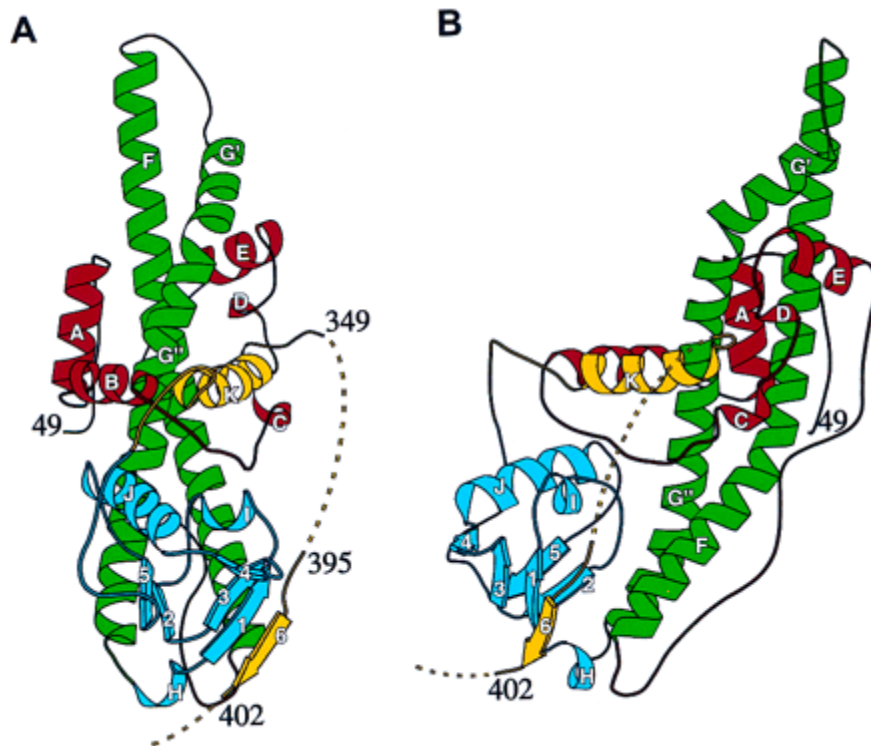


Figure 1.5 : Représentation de la structure 3D du domaine *core* de VP16 (tirée de Liu 1999)
© 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Le domaine *core* de VP16 comprend onze hélices « α » représentées par des torsades allant de « A » à « J », et six feuilletts « β » matérialisés par des flèches allant de 1 à 6. L'image « A » représente une vue de face, et l'image « B » une vue du côté droit. La portion allant du résidu 49 à 145 est rouge, verte entre 146 et 247, bleue entre 248 et 323, et jaune entre 324 et 412. Les traits en pointillés, s'étendant du résidu 350 au 394 et du résidu 403 au 412, montrent des sections désordonnées.

Cette structure tertiaire du domaine *core* est stabilisée par une série de résidus conservés reliés entre eux par des interactions intramoléculaires. Les résidus P93, N95, D97, Y99, R162, E165 et K343 forment un réseau reliant le dossier et la surface supérieure du domaine *core*. Les résidus N85 à S90, W263 et R291 forment un réseau reliant la surface supérieure et l'assise. Il y a d'autres acides aminés conservés du domaine *core* de VP16, les résidus R214 à E218 qui sont situés à la surface de VP16 (Liu *et al.*, 1999).

VP16 a la capacité de s'associer avec les protéines cellulaires *host cell factor 1* (HCF-1), *octamer binding protein 1* (OCT-1) et l'ADN viral pour former un complexe induit par VP16. Les résidus R64, R184, R208, R214, R217, R221, R224, R236, R331, R341, R360, R366, R368 et K370 sont impliqués dans la liaison de VP16 à l'ADN. Les résidus E361, D385, D386, D387 interagissent avec HCF-1. Les résidus Y373, G374, S375 sont cruciaux pour la fixation à OCT-1 (Babb *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 1997). Les résidus G74/P75, R249/A250 et E288/289 sont impliqués dans l'assemblage du virion (Ace *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1999).

Le domaine *core* est conservé entre les homologues de VP16 dans différents virus, alors que pour le domaine transactivateur sa longueur et sa position (HSV, CHV, EHV en C-ter et BHV, VZV en N-ter) peuvent varier (Cohen *et al.*, 1994; Fan *et al.*, 2020; Tyack *et al.*, 2006; Wysocka *et al.*, 2003).

1.2.2 Induction de la transcription des gènes viraux immédiats-précoces

VP16 est un transactivateur des gènes viraux immédiats-précoces (Campbell *et al.*, 1984; Dalrymple *et al.*, 1985). VP16 étant localisée dans le tégument de HSV-1, cette protéine peut agir directement suite à la décapsidation sans avoir besoin d'être exprimée par la cellule infectée. VP16 n'étant pas dotée d'un signal de localisation nucléaire, elle va être transportée au noyau en se liant via son domaine *core* à la protéine cellulaire HCF-1, connue pour être impliquée dans la prolifération cellulaire (Gerster *et al.*, 1988; La Boissiere *et al.*, 1999; Wysocka *et al.*, 2003). Le domaine *core* de VP16 s'associe également avec la protéine cellulaire *heat-shock 90α* (Hsp90α), qui peut atteindre le noyau avec sa fonction chaperonne et dont l'absence entraîne une dégradation de VP16 par l'autophagosome (Wang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2018). En outre, la protéine virale tégumentaire pUL14 est requise pour un transport nucléaire efficace de VP16 (Yamauchi *et al.*, 2008).

Dans le noyau, VP16 va former le complexe induit par VP16 en s'associant avec HCF-1 et le facteur de transcription cellulaire OCT-1 (Stern *et al.*, 1991). HCF-1 participe à la stabilisation de ce complexe (Gerster *et al.*, 1988; Wysocka *et al.*, 2003). Bien que le domaine *core* de VP16 puisse se lier faiblement à l'ADN, c'est OCT-1 qui va se fixer à la séquence TAATGARAT (R pour purine) du promoteur des gènes viraux immédiats-précoces (Fan *et al.*, 2020 ; Spector *et al.*, 1991).

1.2.2.1 Recrutement des facteurs de transcription

Après que le complexe induit par VP16 se soit fixé au promoteur des gènes viraux immédiats-précoces, VP16 va promouvoir la transcription de ces gènes viraux par l'ARN polymérase II. Pour ce faire, VP16 va recruter de nombreux facteurs de transcription via son domaine de transactivation, dont les facteurs généraux de transcription TFIIA (Kobayashi *et al.*, 1995), TFIIB (Lin *et al.*, 1991), TFIID (Klemm *et al.*, 1995; Stringer *et al.*, 1990; Uesugi *et al.*, 1997), TFIIF (Zhu *et al.*, 1994a) et TFIIF (Langlois *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 1994). Le domaine transactivateur de VP16 interagit également avec la protéine cellulaire *Positive cofactor 4* (PC4 ou p15), qui a la capacité de se lier à l'ADN et de réguler la transcription de l'ARN polymérase II (Fukuda *et al.*, 2004; Garavís *et al.*, 2017; Ge *et al.*, 1994; Kretschmar *et al.*, 1994). En outre, le complexe médiateur, qui sert d'interface entre l'ARN polymérase II et les facteurs de transcription liés à l'ADN, voit ses sous-unités 17 (MED17 ou TRAP80) et 25 (MED25 ou ARC92/AC1D1) recrutées par le domaine transactivateur de VP16 (Allen *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 1999; Jeffery *et al.*, 2020; Mittler *et al.*, 2003; Vojnic *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2004). De surcroît, le domaine transactivateur de VP16 se lie aux acétyltransférases d'histones p300, *cyclic adenosine monophosphate-response element binding protein* (CREB)-*binding protein* (CBP) et *p300/CBP-associated factor* (PCAF) (Ikeda *et al.*, 2002; Kundu *et al.*, 2000; Tumber *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000). Le domaine transactivateur de VP16 interagit avec le complexe *Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase* (SAGA) qui acétyle préférentiellement l'histone H3, ainsi qu'avec le complexe *nucleosomal acetyltransferase of histone H4* (NuA4) (Culbertson *et al.*, 2021; Utley *et al.*, 1998; Vignali *et al.*, 2000). Le complexe *switch/sucrose non-fermenting* (SWI/SNF), connu pour remodeler la chromatine par l'intermédiaire d'un mécanisme ATP-dépendant, est également recruté par le domaine transactivateur VP16 (Gutiérrez *et al.*, 2007; Memedula *et al.*, 2003; Neely *et al.*, 1999; Sikorski *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017).

Néanmoins, les cofacteurs de transcription p300, CBP, PCAF, GCN5 et les sous-unités ATPase catalytiques de SWI/SNF BRM et Brg-1 ne sont pas requis pour l'expression des gènes viraux immédiats-précoces du virus HSV-1 (Kutluay *et al.*, 2009).

HCF-1 possède également un domaine de transactivation qui coopère avec celui de VP16 pour promouvoir la transcription virale (Luciano et al., 2002).

1.2.3 Régulation de l'assemblage et de la maturation des virions

Après l'assemblage de la capsidie dans le noyau, les virions poursuivent leur maturation en agrégeant des protéines virales tégmentaires autour de la capsidie (Whitley *et al.*, 2016). VP16 est présente autour de la capsidie dans le noyau avant le premier enveloppement (Naldinho-Souto *et al.*, 2006). VP16 ne peut pas se fixer directement à la capsidie et s'y associe via l'intermédiaire de la protéine tégmentaire VP1/2 (Coller *et al.*, 2007). L'incorporation de VP16 pourrait aussi continuer dans le cytoplasme (Crump, 2018; Fan *et al.*, 2020).

Après que la capsidie ait quitté le noyau, les trois protéines tégmentaires VP16, VP1/2 et pUL37 promeuvent le transport de la nucléocapsidie via les microtubules jusqu'au vésicules dérivées du réseau transgolgien, dont la membrane est constellée de glycoprotéines (dont gB, gD et gH) et de protéines virales du tégment externe pouvant être liées par VP16 (Fan et al., 2020; Gross *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2010; Kamen *et al.*, 2005; Laine et al., 2015; Sandbaumhüter et al., 2013; Zhu *et al.*, 1994b). Suite à ces interactions, les nucléocapsides recouvertes de protéines tégmentaires vont bourgeonner dans les vésicules dérivées du réseau transgolgien, desquelles les virions enveloppés vont quitter la cellule par exocytose.

1.2.4 Implication de VP16 dans le passage de l'état latent à l'état lytique

En plus de l'infection lytique présentée précédemment, HSV-1 peut entrer en latence. Lors de la réactivation, VP16 est exprimée en absence de ICP0, ICP4 et de synthèse virale, et cette synthèse *de novo* de VP16 initie la sortie de latence et démarre un cycle lytique (Thompson *et al.*, 2009).

1.3 Protéine cellulaire Upstream Binding Factor

La protéine virale VP16 peut affecter la colocalisation entre le génome entrant de HSV-1 et la protéine cellulaire UBF (Ouellet Lavallée *et al.*, en révision). UBF est connue pour inhiber la réplication de HSV-1 (Ouellet Lavallée *et al.*, 2015).

1.3.1 Structure et isoformes

La protéine cellulaire *Upstream Binding Factor* (UBF) est codée par le gène *UBTF* localisé sur le chromosome 17q21 (Jones *et al.*, 1995).

UBF est constituée d'un domaine de dimérisation en position N-terminale (O'Mahony *et al.*, 1992), de six boîtes *high mobility group* (HMG) permettant à UBF de se lier à l'ADN (Hisatake *et al.*, 1991) et d'un domaine acide transactivateur en position C-terminale (Jantzen *et al.*, 1990) (Figure 1.6). Le domaine de dimérisation fait 110 acides aminés et il est constitué de quatre hélices « α » (Lai *et al.*, 1996). Les six boîtes HMG font entre soixante-quatre et soixante-huit acides aminés (Justilien *et al.*, 2020) et sont constituées de trois hélices « α » (Xu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003).

UBF possède deux isoformes décrits, le premier de 764 acides aminés (UBF1) et le second de 727 acides aminés (UBF2) (O'Mahony *et al.*, 1991). Les deux isoformes sont issus d'un épissage alternatif de l'exon 8 correspondant aux acides aminés de la position 221 à 257, situés dans la boîte HMG2 de UBF1 mais absents de UBF2 (Chan *et al.*, 1991; Hisatake *et al.*, 1991) (Figure 1.6).

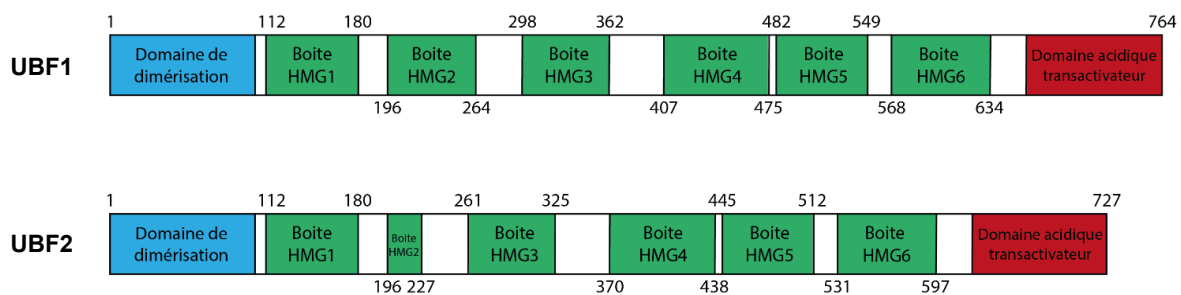


Figure 1.6 : Schéma de la structure primaire de UBF1 et UBF2

La portion bleue correspond au domaine de dimérisation, les six portions vertes aux six boîtes HMG, et la portion rouge au domaine acide transactivateur. Les chiffres correspondent aux acides aminés de UBF. Les acides aminés 221 à 257 de la boîte HMG2 de UBF1 sont absents chez UBF2.

1.3.2 Initiation de la transcription de l'ADN ribosomal

UBF participe à l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase I des gènes de l'ADN ribosomal codant les ARN ribosomaux 28S, 18S et 5.8S. L'ADN ribosomal est localisé dans le nucléole, un sous-compartiment du noyau n'étant pas délimité par une membrane mais par l'hétérochromatine péri-nucléolaire. Le nucléole comprend des centres fibrillaires (où l'ADN ribosomal est transcrit en ARN ribosomal), entourés de composants fibrillaires denses (où la maturation des pré-ARN ribosomaux a lieu). Autour de ces composants fibrillaires denses se trouvent de nombreux composants granulaires, où les pré-ribosomes sont assemblés (Pederson, 2011; Tiku *et al.*, 2018).

Pour initier la transcription de l'ADN ribosomal par l'ARN polymérase I, UBF va se lier à deux segments du promoteur des gènes ribosomaux, le domaine *core* et l'*upstream control element* (UCE). Un autre facteur de transcription, le complexe SL-1, constitué d'une *TATA box binding protein* (TBP) et de cinq *TATA box associated factors* (TAF) va se fixer au segment UCE (Villacís *et al.*, 2018). SL-1 est recruté par le domaine C-terminal phosphorylé de UBF (Tuan *et al.*, 1999). UBF et SL-1 vont alors recruter l'ARN polymérase I et des facteurs associés comme la topoisomérase II α et RRN3, permettant ainsi l'ARN polymérase I de transcrire les séquences répétées de l'ADN ribosomal en ARN ribosomal (Villacís *et al.*, 2018).

1.3.3 Remodelage de la chromatine de l'ADN ribosomal

UBF se lie à l'ADN via ses boîtes HMG, et n'a pas besoin de reconnaître de séquences spécifiques pour le faire (O'Sullivan *et al.*, 2002), permettant notamment à UBF de promouvoir la décondensation de la chromatine dans la région codante de l'ADN ribosomal pour promouvoir sa transcription (Potapova *et al.*, 2019).

UBF se dimérise lorsqu'il se lie à l'ADN, et forme des boucles entre cent-dix et cent-soixante-dix nucléotides appelées enhancesomes (Stefanovsky *et al.*, 1996).

1.3.4 Régulation de l'ARN polymérase II

En plus de son rôle dans le nucléole avec l'ADN ribosomal et l'ARN polymérase I, il existe un nombre limité d'exemples où UBF a été impliqué dans la stimulation de la transcription de l'ARN polymérase II. UBF se lie avec le facteur de transcription de l'ARN polymérase II *lymphoid enhancer factor 1* dans le noyau des cellules humaines et ensemble ils activent le promoteur de la cycline D1 (Grueneberg *et al.*, 2003). UBF promeut également la transcription des gènes d'histones par l'ARN polymérase II (Sanij *et al.*, 2015).

1.3.5 Interactions connues avec des virus

La protéine cellulaire UBF est mobilisée lors de diverses infections par des virus oncogéniques ou non. Dans certains cas nous observons que UBF a un effet proviral via l'augmentation de la quantité de ribosomes disponibles pour traduire les ARN messagers en protéines virales. Toutefois, UBF a un effet antiviral sur HSV-1.

1.3.5.1 Virus oncogéniques

La protéine virale E2 du papillomavirus humain 8 colocalise avec UBF sur les chromosomes mitotiques, mais aucune interaction directe ni interaction fonctionnelle n'a encore été détectée (Poddar *et al.*, 2009). La protéine E7 du papillomavirus humain 16 se lie à UBF et augmente la phosphorylation de UBF1, ce qui stimule la transcription de l'ADN ribosomal (Dichamp *et al.*, 2014).

UBF se lie à une région indispensable du génome du virus de l'hépatite B impliquée dans la promotion de la recombinaison (Kajino *et al.*, 2001). La protéine virale HBx stimule l'expression de UBF avec l'aide du facteur de transcription c-Myc. UBF coopère avec HBx pour stimuler la prolifération cellulaire et la tumorigenèse (Rajput *et al.*, 2015).

La protéine *core* du virus de l'hépatite C augmente l'association de UBF et de l'ARN polymérase I avec le promoteur de l'ARN ribosomal. La protéine *core* promeut la phosphorylation de UBF, qui est nécessaire pour recruter la machinerie de l'ARN polymérase I (Kao *et al.*, 2004). La protéine virale non structurale 5A stimule la phosphorylation de UBF et promeut la transcription par l'ARN polymérase I (Raychaudhuri *et al.*, 2009).

L'antigène grand T du virus simien 40 stimule la phosphorylation de UBF, stimulant ainsi la transcription des gènes ribosomaux (Zhai *et al.*, 1999). Dans les cellules transformées par le virus simien 40, le substrat 1 du récepteur de l'insuline (IRS1) est transloqué du cytoplasme et de la membrane plasmique vers le noyau. IRS1 interagit avec UBF1 et promeut sa phosphorylation (DeAngelis *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2003; Tu *et al.*, 2002).

Lors d'une infection par le cytomegalovirus, à six heures post-infection UBF est transloqué du nucléole à une localisation diffuse dans le noyau, ce qui coïncide avec une hausse transitoire des niveaux de pré-ARN ribosomal. En absence de la protéine virale pUL31, le cytomegalovirus échoue à transloquer UBF, mais il n'y a pas de colocalisation entre UBF et pUL31 (Westdorp *et al.*, 2017).

1.3.5.2 Autres virus

UBF est transloqué dans les compartiments de réplication virale de l'adénovirus humain 2, où il promeut la réplication virale, sans réduction de la synthèse d'ARN ribosomal ou de changement de la localisation de l'ARN polymérase I (Lawrence *et al.*, 2006). UBF est accumulé dans les compartiments de réplication tardive de l'adénovirus humain 5 et dans les corps de post-réplication induits par le virus où les génomes viraux répliqués s'accumulent (Genoveso *et al.*, 2020).

Le virus de l'immunodéficience humaine renforce la phosphorylation de UBF des cellules tubulaires (Rehman *et al.*, 2012).

Le poliovirus 1 inhibe la transcription de UBF, ce qui entraîne une baisse de la transcription de l'ADN ribosomal (Banerjee *et al.*, 2005).

Durant une infection par HSV, UBF est transloqué du nucléole vers les compartiments de réplication virale qui se forment dans le noyau des cellules infectées autour des génomes viraux (Lymberopoulos *et al.*, 2010; Stow *et al.*, 2009). UBF inhibe la transcription virale et colocalise avec le génome viral (Ouellet Lavallée *et al.*, 2015; Ouellet Lavallée *et al.*, en révision). UBF colocalise également durant l'infection par HSV-1 avec un senseur ADN des virus herpès, la protéine 16 inductible par l'interféron (IFI16) (Lum *et al.*, 2019).

1.4 Réponses cellulaires antiherpétiques et échappement viral

La protéine cellulaire UBF a un effet inhibiteur sur la réplication de HSV-1, et nous supposons que la protéine VP16 contrecarre cette inhibition. Afin d'établir des analogies avec cette relation supposée, voici une liste de protéines cellulaires connues pour entraver le cycle viral de HSV-1, complétée d'une liste de protéines virales pouvant contrecarrer les défenses antivirales.

1.4.1 Corps nucléaires de la protéine de la leucémie promyélocytaire

Après être entré dans le noyau, le génome de HSV-1 colocalise avec des corps nucléaires de la protéine de la leucémie promyélocytaire (PML) (Everett *et al.*, 2005). Les corps nucléaires PML sont des organites sans membrane, délimités par une couche de protéines PML entourant des dizaines d'autres protéines cellulaires comme *speckled protein 100* (Sp100), *death-associated protein 6* (DAXX) et *alpha-thalassemia mental retardation syndrome x-linked protein* (ATRX) (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2010; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2018). Les protéines PML, Sp100, DAXX et ATRX ont un effet antiviral (Everett *et al.*, 2008; Full *et al.*, 2019; Lukashchuk *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2022).

La protéine cellulaire *Microrchidia family CW-type zinc finger 3* (MORC3) est relocalisée au niveau des génomes de HSV-1 au début de l'infection, et contribue à la relocalisation au niveau des génomes viraux de composants des corps nucléaires PML, les protéines PML, Sp100 et DAXX. De surcroît, MORC3 a un effet antiviral (Sloan *et al.*, 2016). MORC3 aurait également un effet répresseur sur IFN-I. Ainsi, quand MORC3 est dégradé par la protéine virale ICP0, l'effet répresseur sur IFN-I est aboli, ce qui augmente la réponse antivirale (Gaidt *et al.*, 2021).

1.4.2 Protéine 16 inductible par l'interféron

IFI16 peut détecter le génome viral de HSV-1 à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, puis recrute STING pour déclencher une réponse interféron bêta antivirale (Horan *et al.*, 2013; Unterholzner *et al.*, 2010). La détection du génome viral dans le cytoplasme est possible car la capsid y est ubiquitinyllée puis dégradée par le protéasome (Horan *et al.*, 2013). La détection du génome viral dans le noyau et dans le cytoplasme se fait par deux isoformes différents de IFI16 (Li *et al.*, 2021).

1.4.3 Récepteurs analogues au gène I inductible par l'acide rétinoïque

Les senseurs d'acides nucléiques du gène I inductible par l'acide rétinoïque (RIG-I) et la protéine 5 associée à la différenciation du mélanome (MDA5) font partie de la famille des récepteurs analogues à RIG-I (RLR). RIG-I reconnaît l'ARN double brins dont la terminaison est phosphorylée (cette terminaison est épissée chez les mammifères), et MDA5 reconnaît les longs ARN double brins. Ainsi activés, RIG-I et MDA5 vont se fixer à la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS). MAVS va recruter la kinase 1 liée à l'activateur du facteur nucléaire kB (NF- κ B) associé à un membre de la famille des facteurs associés au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TBK1), et la kinase de l'inhibiteur du facteur nucléaire kB (IKK). TBK1 et IKK vont à leur tour activer entre autres le facteur de régulation de l'interféron 3 (IRF3) et NF- κ B. Cette cascade de signalisation va déboucher sur la stimulation de la production d'interférons de type 1 et de type 3 (Banoth *et al.*, 2018).

RIG-I et MDA5 sont impliqués dans l'immunité innée contre HSV-1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris et dans les cellules HeLa (Choi *et al.*, 2009). La production d'interférons β et λ 1 pour contrecarrer une infection par HSV-1 est médiée uniquement par MDA5 dans les macrophages (Melchjorsen *et al.*, 2010).

1.4.4 Guanosine monophosphate-adénosine monophosphate cyclique synthase — stimulateur des gènes de l'interféron

La guanosine monophosphate-adénosine monophosphate cyclique (cGAMP) synthase (cGAS) est un senseur d'ADN cytosolique. Suite à cette reconnaissance, cGAS va synthétiser cGAMP, ce qui va activer le stimulateur des gènes de l'interféron (STING), une protéine adaptatrice localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Les kinases IKK et TBK1 seront alors recrutées, débouchant sur l'activation de la voie de l'interféron de type I (Banoth *et al.*, 2018).

La décapsidation de HSV-1 se déroule au niveau des pores nucléaires, et les gènes viraux sont répliqués et exprimés dans le noyau (Whitley *et al.*, 2016). Toutefois, dans les macrophages, une partie des capsides de HSV-1 sont ubiquitinylées dans le cytosol et dégradées par le protéasome, ce qui libère du génome viral auquel cGAS peut se lier pour inhiber l'infection virale (Horan *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2019). En outre, dans des fibroblastes embryonnaires de souris, cGAS peut détecter de l'ADN mitochondrial libéré dans le cytosol par des mitochondries endommagées durant l'infection de HSV-1 (West *et al.*, 2015).

1.4.5 Autres protéines cellulaires participant à la réponse innée antivirale

En se liant à de l'ARN viral bicaténaire, la protéine kinase R (PKR) active IKK et la kinase induisant le NF- κ B (NIK), ce qui entraîne la libération de NF- κ B et promeut la réponse immunitaire innée antivirale contre HSV-1 (Taddeo *et al.*, 2003; Zamanian-Daryoush *et al.*, 2000).

En réponse à diverses infections virales, les cellules infectées expriment de la tétherine, une protéine cellulaire localisée dans la membrane plasmique, dans le réseau transgolgien et dans des endosomes (Le Tortorec *et al.*, 2011). Dans le cas de HSV-1, la tétherine bloque la libération des particules virales en maintenant les particules virales matures à la surface de la cellule (Blondeau *et al.*, 2013).

La protéine de recombinaison méiotique 8 (REC8) joue un rôle dans l'immunité innée contre HSV-1 notamment en promouvant l'activation de IRF3 et de la voie de signalisation de NF- κ B, en ciblant et interagissant avec MAVS et STING, et en promouvant le recrutement de TBK1 à MAVS et STING (Chen *et al.*, 2022).

Le gène 15 stimulé par l'interféron (ISG15) a un effet antiviral contre HSV-1 (Lenschow *et al.*, 2007). ISG15 possède deux domaines analogues à l'ubiquitine qui lui permettent de ISGyler diverses protéines en s'y fixant pour promouvoir l'immunité antivirale (El-Asmi *et al.*, 2020; Mirzalieva *et al.*, 2022).

L'activateur des facteurs de régulation de l'interféron dépendant de l'ADN (DAI) reconnaît l'ADN viral bicaténaire et recrute TBK1 et IRF3, ce qui induit la production de l'interféron de type I ayant un effet antiviral sur HSV-1 (Takaoka *et al.*, 2007). En outre, DAI se lie aux protéines kinases 1 et 3 interagissant avec les récepteurs (RIP1 et RIP3) pour promouvoir la nécroptose (Guo *et al.*, 2018; Pham *et al.*, 2013).

La protéine B de résistance aux myxovirus (MxB) a un effet antiviral contre HSV-1 en inhibant la décapsidation du génome viral entrant et sa translocation au noyau (Crameri *et al.*, 2018; Schilling *et al.*, 2018).

L'optineurine, un récepteur de l'autophagie, limite la propagation de HSV-1 en ciblant et conduisant à la dégradation par autophagie deux protéines virales, le transactivateur VP16 et la glycoprotéine B (Ames *et al.*, 2021).

Le récepteur minéralocorticoïde inhibe la réplication de HSV-1 avec d'autres membres de la voie de signalisation des minéralocorticoïdes comme la protéine chaperonne HSP90 α et une immunophiline, la protéine 5 de liaison au tacrolimus (FKBP5). L'expression du récepteur des minéralocorticoïdes est accrue durant l'infection, en impliquant VP16 et l'interféron (Haas *et al.*, 2018).

L'inactivation de la protéase 14 spécifique de l'ubiquitine (USP14) inhibe la réplication du virus de la pseudorange du cochon, qui est membre de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* comme HSV-1 (Ming *et al.*, 2021; Pellett *et al.*, 2013). L'inactivation de USP14 stimule une cascade de signalisation débouchant sur la dégradation par autophagie médiée par le séquestosome de VP16 (Ming *et al.*, 2021).

1.4.6 Stratégies d'évasion de l'immunité innée du virus herpès simplex 1

La protéine virale immédiate-précoce ICP0 possède une activité ubiquitine ligase E3, ce qui lui permet de catalyser l'association d'ubiquitine avec des résidus de lysine de protéines cibles, entraînant ainsi la dégradation de ces cibles par le protéasome (Van Sant *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2021). Ainsi, il peut dégrader plusieurs protéines cellulaires impliquées dans l'immunité antivirale comme PML, Sp100, ATRX, MORC3, IFI16, MyD88 et Mal (Chelbi-Alix *et al.*, 1999; Jan Fada *et al.*, 2020; Jurak *et al.*, 2012; Lanfranca *et al.*, 2014; Orzalli *et al.*, 2012; Sloan *et al.*, 2016; van Lint *et al.*, 2010). ICP0 catalyse également la dégradation de deux protéines impliquées dans l'autophagie, l'optineurine et le séquestosome, et ce indépendamment de son activité ubiquitine ligase E3 (Waisner *et al.*, 2019).

VP16 inhibe la production d'interféron β en inhibant l'activation de NF- κ B et en empêchant IRF3 de recruter son coactivateur CBP (Xing *et al.*, 2013). La protéine virale UL24 inhibe également l'activation de NF- κ B, mais pas celle de IRF3 (Xu *et al.*, 2017).

La protéine virale ICP34.5 se lie à TBK1, l'empêchant ainsi de phosphoryler et d'activer IRF3 (Verpooten *et al.*, 2009). VP11/12 inhibe également TBK1 (You *et al.*, 2019). VP1/2 inhibe l'activité de IRF3 en dégradant TRAF3, une protéine que TBK1 doit recruter pour phosphoryler IRF3 (Wang *et al.*, 2013). VP1/2 a aussi la capacité de désubiquitinyler STING, entravant ainsi l'activation de TBK1 et de IRF3 (Bodda *et al.*, 2020). ICP34.5 inhibe la translocation de STING du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, contrecarrant ainsi l'immunité innée antivirale (Pan *et al.*, 2018).

La protéine virale pUS3 inhibe l'expression de TLR3 (Peri *et al.*, 2008). pUS3 inhibe également la polyubiquitinylation du facteur 6 associé à TRAF6, une protéine adaptatrice des TLR, et hyper-phosphoryle p65, la sous unité de NF- κ B, ce qui bloque l'induction de l'interféron β (Sen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

La protéine virale pUS11 se fixe à RIG-I et à MDA5 pour inhiber leur interaction avec MAVS (Xing *et al.*, 2012). pUS11 se fixe aussi à la protéine activatrice PACT pour empêcher l'activation de PKR, et à de l'ARN viral bicaténaire pour bloquer l'activation de PKR et de l'enzyme 2',5'-oligoadénylate synthase (OAS) (Ishioka *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2007).

La protéine virale pUL37 bloque l'activité enzymatique de cGAS en la déamidant (Zhang *et al.*, 2018).

La protéine virale VP22 interagit avec le senseur d'ADN cytosolique « absent dans le mélanome 2 » (AIM2) et empêche son oligomérisation, bloquant ainsi l'activation de l'inflammasome (Maruzuru *et al.*, 2018). VP22 interagit également avec le senseur d'ADN cytosolique cGAS pour inhiber son activité enzymatique (Huang *et al.*, 2018).

La protéine virale tégmentaire Vhs dégrade les ARN messagers de nombreuses protéines cellulaires afin d'inhiber leur activité antivirale dont ATRX, IFI16, PKR, la viperine, la protéine antivirale à doigt de zinc (ZAP), cGAS, TLR2, TLR3, RIG-I, MDA5, IFIT3 et la tétherine (Jiang *et al.*, 2016; Jurak *et al.*, 2012; Orzalli *et al.*, 2012; Sciortino *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2011; Zenner *et al.*, 2013).

2 PROBLÉMATIQUE

Durant l'infection par HSV-1, la protéine nucléolaire UBF est transloquée au nucléoplasme où elle colocalise avec les compartiments de réplication virale, là où se déroule la transcription des gènes viraux, la réplication du génome viral et l'encapsidation (LyMBERopoulos *et al.*, 2010). Notre laboratoire a également découvert que l'inhibition de UBF conduit à une augmentation de la transcription de gènes viraux immédiats-précoces et précoces ainsi que de la production de nouvelles particules virales (Ouellet Lavallée *et al.*, 2015), alors que la surexpression de UBF inhibe la formation des compartiments de réplication virale (Ouellet Lavallée *et al.*, en révision). De surcroît, UBF colocalise avec les génomes viraux entrant. Cette colocalisation diminue quand la multiplicité de l'infection (MOI) augmente. La MOI correspond au nombre de particules virales infectieuses par cellule susceptible à l'infection. Néanmoins, en utilisant un virus mutant dont la protéine virale VP16 est dépourvue de domaine transactivateur au lieu d'un virus de type sauvage, l'augmentation de la MOI n'a pas d'impact sur la colocalisation entre UBF et le génome viral entrant (Ouellet Lavallée *et al.*, en révision).

Nous avons émis l'hypothèse que VP16 inhibe l'activité antivirale UBF.

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons testé si le domaine transactivateur de VP16 interagit avec UBF, ainsi que l'impact de VP16 sur la localisation intracellulaire de UBF exprimé de manière ectopique.

3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Cellules et virus

Deux lignées cellulaires ont été utilisées durant notre projet de recherche, les cellules épithéliales humaines HeLa et les cellules épithéliales de singe vert Vero. Les deux lignées cellulaires ont été cultivées à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ avec du *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contenant 50 unités/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine (P/S). Le milieu de culture des cellules HeLa a été complété avec 8 % de sérum de veau foetal (FBS), et celui des cellules Vero avec 5 % de sérum de veau nouveau-né (NCS). La souche KOS de HSV-1 a été propagée dans des cellules Vero (Lymberopoulos *et al.*, 2007), et les cellules HeLa ont été utilisées pour toutes les autres expériences.

3.2 Production d'un extrait de protéines cellulaires totales

Un extrait de protéines cellulaires totales a été produit essentiellement comme chez Sopta *et al.* (1985). L'équivalent de 15 flacons T175 avec une confluence de 100 % a été utilisé, soit un total de $1,4 \times 10^8$ cellules HeLa. Lors des passages cellulaires, les cellules restantes ont été lavées avec du PBS, puis le PBS a été retiré et les cellules ont été congelées à -80 °C. Lors de la préparation de l'extrait de protéines, toutes les cellules ont été décongelées sur glace en ajoutant dix fois le volume de cellules de tampon de resuspension (10 mM trisaminométhane-chlorure d'hydrogène (Tris-HCl) pH 7,5 ; 1 mM acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ; 5 mM dithiothréitol (DTT) ; inhibiteurs de protéases cOmplete mini (Roche 11836153001)). Les cellules ont ensuite été homogénéisées manuellement et lentement avec un *dounce homogenizer* (vingt allers-retours avec le piston le plus épais puis vingt allers-retours avec le piston le plus fin). Dix fois le volume de cellules de tampon de précipitation ont été ajoutés (50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM chlorure de magnésium (MgCl₂) ; 2 mM DTT ; 25 % sucrose ; 50 % glycérol). 2,5 fois le volume de cellules de solution saturée de sulfate d'ammonium (saturation évaluée à 20 °C) ont été ajoutés graduellement à 4 °C sous agitation. Le tout a été agité 30 min à 4 °C, puis ultracentrifugé pendant 3 h à 37500 rpm et à 4 °C avec le rotor Beckman Ti70. Le surnageant a été récolté puis inséré à l'aide d'une seringue dans deux cassettes Slide-A-Lyser 10K de Pierce 66810. Une première dialyse a été effectuée jusqu'au lendemain à 4 °C contre 4 L de tampon de dialyse pré-refroidi (10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 1 mM DTT ; 80 mM chlorure de sodium (NaCl) ; 10 % glycérol ; inhibiteur de protéases : 100 µg/ml fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF)). Une deuxième

dialyse a été réalisée pendant 3 h contre du tampon de dialyse frais. L'extrait de protéines cellulaires totales ainsi obtenu a été aliquoté dans cinq tubes Eppendorf contenant 25 µl et 44 tubes Eppendorf contenant 1,3 ml avant d'être congelé à - 80 °C.

3.3 Préparation des matrices d'affinités associées à la protéine glutathion S-transférase fusionnée ou non au domaine transactivateur de VP16

Des bactéries Rosetta DE3 ont été transformées avec le vecteur pGEX-3X exprimant la glutathion S-transférase (GST) ou avec un vecteur dérivé de pGEX-3X exprimant GST fusionné au domaine de transactivation de VP16 (GST-VP16AD). Ces bactéries ont été inoculées dans 25 ml de milieu *Luria broth* (LB) contenant 100 µg/ml d'ampicilline puis incubées toute la nuit à 37 °C sous agitation. Le lendemain, 20 ml de culture bactérienne inoculée la veille ont été mélangés avec 200 ml de milieu LB frais contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les bactéries ont été incubées à 37 °C pendant approximativement 1 h jusqu'à atteindre une densité optique située entre 0,5 et 0,6 à une longueur d'onde de 550 nm. Ensuite, l'induction de l'expression des protéines recombinantes a été démarrée en ajoutant 0,4 mM d'isopropylthiogalactopyranoside (IPTG). À 3 h post-induction, les bactéries ont été centrifugées à 4 800 rpm pendant 20 min à 4 °C, puis resuspendues avec 4 ml de tampon de sonication (1 X tampon phosphate salin (PBS) ; 10 % glycérol ; 1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 0,9 M NaCl ; inhibiteurs de protéases sans EDTA cComplete mini (Roche 11836170001)). Les bactéries ont alors été lysées 30 s par sonication (amplitude 35 % ; *pulse on* 0,2 s ; *pulse off* 0,8 s). Le lysat a été centrifugé à 10 000 rpm pendant 15 min à 4 °C avec la microcentrifugeuse Eppendorf 5415R, puis 1 % Triton X-100 a été ajouté. Les protéines contenues dans les lysats bactériens ont été adsorbées par rotation pendant 20 min à 4 °C à des billes de glutathion-sépharose préalablement lavées avec du PBS contenant 1 % Triton X-100. Après adsorption, les billes ont été lavées une fois avec du PBS puis deux fois avec du PBS 1 M NaCl. Les billes GST et GST-VP16AD ont enfin été resuspendues dans deux volumes de PBS pour un volume de billes puis conservées à 4 °C.

3.4 GST pull-down

L'extrait de protéines cellulaires totales a été complété avec 5 mM de chlorure de calcium (CaCl_2) puis a été traité 30 min à 4 °C avec de la nucléase micrococcale pour digérer les acides nucléiques (Huang *et al.*, 1986). La digestion a été stoppée en ajoutant 25 mM d'acide éthylèneglycoltétracétique (EGTA) (Jost *et al.*, 1999). L'essai d'interaction protéine-protéine a été réalisé essentiellement comme décrit auparavant (Pearson *et al.*, 1997). Les billes GST et GST-VP16AD ont été équilibrées 15 min à 4 °C dans le tampon de dialyse de l'extrait de protéines cellulaires totales sans PMSF puis elles ont été centrifugées à 2000 rpm pendant 1 min à 4 °C. Ensuite, en duplicat, 7 μl de billes GST et GST-VP16AD ont été incubées avec 1,5 ml d'extrait de protéines cellulaires totales traité avec de la nucléase micrococcale qui a été inactivée avec 25 mM d'EGTA. Le tout a été incubé 2 h à 4 °C en rotation puis les billes ont été lavées deux fois avec du tampon de chromatographie d'affinité (ACB) 0,1 M NaCl (10 mM acide hydroxyéthylpipérazineéthane sulfonique (HEPES) pH 7,5 ; 1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 10 % glycérol ; 0,1 M NaCl ; 0,5 % triton X-100). Les protéines adsorbées aux billes ont été éluées une première fois pendant 30 min à 4 °C en rotation avec du tampon ACB 0,5 M NaCl, puis une seconde fois avec 0,1 % de dodécylsulfate de sodium (SDS) pendant 5 min à température ambiante pour éviter la précipitation du détergeant.

3.5 Immunobuvardage de protéines

Les échantillons de protéines ont été mélangés avec du colorant de charge et du β -mercaptoéthanol, chauffés à 95 °C pendant 5 min puis migrés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) avec 10 % de polyacrylamide à 120 V pendant 1 à 2 h. Les protéines ont été transférées du gel vers une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) pendant 30 min à 16 V à l'aide du Trans-Blot Semi-Dry de Bio-Rad.

Pour la figure 4.4, la membrane a été bloquée le lendemain du transfert pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec de la solution saline Tris tamponnée et Tween-20 (TBS-T) + 3 % BLOT-QuickBloquer Reagent, puis a été lavée avec TBS-T. La membrane a été coupée en deux, sous la bande de 50 kDa du marqueur de taille, puis les deux morceaux ont été incubés 1 h à température ambiante sous agitation avec des anticorps primaires dilués 1:500 dans TBS-T + 0,2 % gélatine (un anticorps de lapin anti-UBF (Sigma HPA006385) pour le haut de la membrane, et un anticorps de lapin anti-TBP (New England Biolabs 44059S) pour le bas de la membrane).

Les deux morceaux de la membrane ont été lavés avec TBS-T, incubés 45 min sous agitation avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch 111035003) dilué 1:5000 dans TBS-T + 3 % BLOT-QuickBloquer Reagent, puis les deux morceaux de la membrane ont été lavés avec du TBS. Enfin, la révélation a été réalisée en recouvrant la membrane avec du substrat pour la peroxydase. Ce substrat était composé à moitié de solution de peroxyde et à moitié de solution de renforcement du luminol (Promega W1001).

Pour la figure 4.6, la membrane a été bloquée toute la nuit à 4 °C sous agitation avec un tampon de blocage (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 50 mM NaCl ; 2,5 mM EDTA ; 0,1 % Tween-20) puis lavée avec du TBS-T. La membrane a ensuite été incubée pendant 1 h sous agitation avec un anticorps de souris ciblant le domaine N-terminal de VP16 (Abcam AB110226) dilué 1:500 dans du TBS-T 0,2 % gélatine, puis a été lavée avec du TBS-T. La membrane a alors été incubée pendant 45 min avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris conjuguée à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch 115035003) dilué 1:5000 dans du TBS-T 0,2 % gélatine, puis lavée dans du TBS.

Enfin, la révélation a été réalisée avec du substrat de peroxydase tel qu'indiqué ci-dessus.

Les membranes des deux immunobuvardages de protéines ont été observées avec l'instrument Azure Sapphire, et les figures ont été préparées avec Adobe Illustrator.

Pour les figures 4.2 et 4.3, suite à l'électrophorèse, le gel a été coloré avec du bleu de Coomassie pendant 15 min, puis a été plongé plusieurs heures dans une solution de décoloration (10 % acide acétique ; 10 % méthanol) avant d'être numérisé avec l'instrument Azure 200.

3.6 Clonage des vecteurs d'expression mammifère de VP16 avec et sans domaine de transactivation

Le cadre de lecture ouvert de VP16 pleine longueur (VP16WT) a été amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) avec 0,4 ng/µl de génome viral de la souche KOS de HSV-1, une amorce sens (5'-gggccATGGACCTCTTGGTCGAC-3'), une amorce anti-sens (5'-aaggctcgagCTA CCCACCGTACTCGTC-3') et la polymérase Q5 (New England Biolabs M0491). La longueur du gène VP16 amplifié par PCR ($1,5 \times 10^3$ paires de bases) a été contrôlée en faisant migrer un dixième du volume total du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % pendant 75 min à 80 V. Le produit PCR non migré a été purifié avec un kit PCR *clean-up* (Macherey-Nagel 740609), l'élution a été effectuée avec de l'eau distillée, puis l'ADN ainsi purifié a été dosé à l'aide

d'un NanoDrop (Thermo Scientific ND-ONE-W). Ce fragment d'ADN contenant le gène de VP16 a été doublement digéré toute une nuit à 37 °C avec les enzymes de restriction NcoI (NEB R0193) et XhoI (NEB 0146) en présence du tampon CutSmart (NEB B7204S), puis le produit de la digestion a été purifié avec un kit PCR *clean-up* (Macherey-Nagel 740609). Le vecteur d'expression pTandem-1 (Novagen 71283) a également été doublement digéré avec NcoI et XhoI dans du tampon CutSmart, puis le produit de digestion a été contrôlé par électrophorèse pendant 45 min, et le produit de digestion non migré a été purifié avec un kit de miniprep (Omega Bio-Tek D6942). Le vecteur pTandem digéré et l'insert VP16 digéré ont été ligaturés au ratio 1:6 toute une nuit à température ambiante avec la T4 ligase (NEB M0202) dans du tampon T4 ligase (NEB B0202). Le plasmide pTandem-VP16WT ainsi obtenu a été transformé dans des bactéries compétentes *E. coli* DH5 α . Douze colonies positives ont été inoculées dans du milieu LB avec 50 μ g/ml d'ampiciline puis le plasmide a été purifié par miniprep (Sigma NA1111). Les douze clones ont subi une digestion diagnostique avec NcoI et XhoI, et les quatre clones où l'on a observé deux bandes correspondant à pTandem ($3,5 \times 10^3$ paires de bases) et à VP16 ($1,5 \times 10^3$ paires de bases) ont été envoyés à Génome Québec pour contrôler l'absence de mutation par séquençage de Sanger (Tableau 3.1).

Pour obtenir le vecteur exprimant VP16 sans domaine de transactivation (VP16delAD), le vecteur d'expression pTandem-VP16WT a été digéré avec les enzymes SacI (NEB R0156) et XhoI dans du tampon CutSmart. Le vecteur digéré a été migré par électrophorèse à 80 V pendant 80 min sur gel d'agarose 1 %, puis purifié avec kit d'extraction sur gel (Sigma NA1111) et élué avec de l'eau distillée. Les extrémités du vecteur digéré ont été modifiées avec la T4 ADN polymérase (NEB M0203L). La réaction a été stoppée au bout de 15 min à 12 °C en ajoutant 10 mM EDTA et en chauffant 20 min à 75 °C. Le vecteur a été purifié avec un kit PCR *clean-up* (Macherey-Nagel 740609), puis ligaturé avec la T4 ligase en présence de tampon T4. Le vecteur ligaturé a été transformé dans des bactéries compétentes *E. coli* DH5 α , puis vingt-quatre colonies compétentes ont été inoculées dans du milieu LB avec de l'ampicilline et traitées avec un kit miniprep (Bio Basic BS614). Les vingt-quatre clones ont subi une digestion diagnostique avec NcoI et SphI (NEB R0182) en présence du tampon CutSmart, puis ont été migrés par électrophorèse à 90 V pendant 90 min. Trois colonies où l'on a observé une bande correspondant à pTandem-VP16delAD ($4,8 \times 10^3$ paires de bases) ont été envoyées à Génome Québec pour confirmer la délétion du domaine transactivateur de VP16 (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Amorces utilisées pour séquencer les vecteurs d'expression de VP16WT et VP16delAD

Direction	Séquence
Sens	5'- CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG -3'
Sens	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
Sens	5'- GCT CTC TCG TTT CTT CCA CG -3'
Sens	5'- TAT GGT GTT GAT TCG GGC GA -3'
Sens	5'- TGG CTC ACC TCA AGC GTA TT -3'
Antisens	5'- GCC GAA AAC AAA TCC TCG TTC C -3'
Antisens	5'- CGC AGC ATT TCT CCC AGG T -3'
Antisens	5'- TCG CCC GAA TCA ACA CCA -3'
Antisens	5'- TGC TCG TCA AGA AGA CAG GG -3'
Antisens	5'- TCC TTC CGA GTG AGA GAC AC -3'
Antisens	5'- AGC GTT CGC ATG TTT CAG -3'

3.7 Transfection

Pour la figure 4.6, des puits de plaque 6-puits ont étéensemencées avec 1×10^5 cellules HeLa dans du DMEM avec 8 % FBS et P/S. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec du PBS, puis transfectées avec 1 μ g par puits de vecteur d'expression et 1 mg/ml de l'agent de transfection polyéthylèneimine (Sigma-Aldrich 408727) au ratio 3:1 (Hsu *et al.*, 2012) le tout dilué dans du DMEM sans sérum ni antibiotique. Les cellules ont été incubées pendant 6 h, puis le milieu de culture a été remplacé par du DMEM avec 8 % FBS et P/S. Les cellules ont été lysées 24 h ou 48 h plus tard avec du tampon de dosage de radioimmunoprécipitation (RIPA) (25 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 500 mM NaCl ; 1 % Triton X-100 ; 0,5 % désoxycholate de sodium ; inhibiteurs de protéases cOmplete mini de Roche 11836153001). Les lysats de deux puits transfectés avec le même plasmide ont été combinés puis concentrés pendant près de 2 h au SpeedVac.

Pour les figures 4.7 à 4.9, une lamelle a été déposée dans chaque puits de plaque de 24 puits. Chaque puits a étéensemencé avec $2,5 \times 10^4$ cellules HeLa dans du DMEM avec 8 % FBS et P/S. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec du PBS, puis transfectées avec 250 ng par puits de vecteur d'expression et de l'agent de transfection polyéthylèneimine au ratio 3:1, le tout dilué dans du DMEM sans sérum ni antibiotique. Les cellules ont été incubées pendant 6 h, puis le milieu de culture a été remplacé par du DMEM avec 8 % FBS et P/S. Les cellules ont ensuite été fixées 10 min à température ambiante avec 2 % de paraformaldéhyde. La figure 4.7 montre des cellules fixées 48 h post-transfection. La figure 4.8 quantifie des cellules fixées 24 h et 48 h post-transfection. Les cellules transfectées avec le vecteur exprimant VP16delAD ont été fixées 24 h post-transfection.

3.8 Immunofluorescence indirecte et détection par microscopie confocale

Les cellules fixées ont été perméabilisées pendant 10 min à température ambiante sous agitation avec 0,1 % Triton X-100, lavées, puis bloquées pendant 30 min à température ambiante sous agitation avec solution de blocage (20 % NCS ; 0,5 % Tween-20). Les lamelles ont été sorties des puits et déposées face vers le bas sur une goutte d'anticorps primaire, puis incubées pendant 1 h dans une chambre humidifiée à 37 °C. VP16 a été ciblée avec un anticorps de souris dirigé contre le domaine N-terminal de VP16 (Abcam AB110226) et UBF avec un anticorps de lapin anti-UBF (Sigma HPA006385). Les lamelles ont été réintroduites dans des puits neufs pour être lavées avec du PBS, puis elles ont été déposées face vers le bas sur une goutte d'anticorps secondaire et incubées pendant 1 h dans une chambre humidifiée à 37 °C. L'anticorps anti-VP16 a été ciblé avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris conjugué au fluorophore Alexa 568 (Invitrogen A11031), et l'anticorps anti-UBF avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué au fluorophore Alexa 488 (Invitrogen A11008). Les lamelles ont été réintroduites dans des puits neufs pour être lavées avec du PBS, puis les cellules ont été marquées avec 300 nM de diamidinophénylindole pour visualiser les noyaux au microscope confocal. Les lamelles ont été montées sur des lames en verre avec 10 µl de ProLong Gold (Invitrogen P36934).

Le lendemain, le marquage a été contrôlé à l'aide d'un microscope à épifluorescence Axio Observer Z1 (objectif 63X, 1.4 NA). Les lames ont ensuite été observées au Service de microscopie confocale du centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie de l'INRS avec un microscope confocal Zeiss LSM 780 ayant un laser multiligne à argon à 458/488/514 nm, un laser DPSS à 561 nm et un laser HeNe à 633 nm. Les images ont été exportées avec le logiciel Zen 3.3 *blue edition* et les figures ont été assemblées avec Adobe Illustrator.

4 RÉSULTATS

4.1 Tests d'interaction entre UBF et le domaine transactivateur de VP16

La protéine cellulaire UBF a un effet inhibiteur sur la transcription des gènes viraux immédiats-précoces et précoces par l'ARN polymérase II (Ouellet Lavallée *et al.*, 2015). Le domaine C-terminal transactivateur de VP16 stimulant la transcription de l'ARN polymérase II via des interactions protéine-protéine, nous avons cherché à savoir si ce domaine de VP16 inhibe l'activité antivirale de UBF via des interactions protéine-protéine.

Pour tester cette interaction *in vitro* nous avons réalisé un essai de type « GST pull-down ». Pour cette expérience nous avons besoin d'un extrait de protéines cellulaires totales à partir de cellules HeLa, et les protéines recombinantes glutathion S-transférase (GST) et GST fusionnées au domaine transactivateur de VP16 (GST-VP16AD) (Figure 4.1).



Figure 4.1 : Schéma de GST et GST-VP16AD

La protéine GST est située au-dessus de la protéine GST-VP16AD. Le domaine GST est représenté en vert, et le domaine transactivateur de VP16 en rouge, lui-même subdivisé entre une région proximale H1 et une région distale H2. Les chiffres correspondent aux acides aminés.

Le domaine transactivateur de VP16 interagit avec de multiples protéines se liant à l'ADN comme TBP. UBF ayant également la capacité de se lier à l'ADN, le risque d'une interaction non spécifique entre UBF et VP16 médiée par des acides nucléiques existe. Pour éviter cela, l'extrait de protéines cellulaires totales a été traité avec de la nucléase micrococcalle. Le tampon utilisé pour la dialyse de l'extrait de protéines cellulaires totales contenait 80 mM de NaCl pour s'assurer que la nucléase soit active. La protéine GST a été produite dans un système d'expression bactérien avec le vecteur d'expression pGEX-3X et une induction par IPTG. GST-VP16AD a été produite dans le même système d'expression avec un vecteur dérivé de pGEX-3X où la séquence

codant le domaine transactivateur de VP16 a été ajoutée en aval et dans le même cadre de lecture que celui codant GST.

Pour s'assurer d'utiliser un temps d'induction optimal, nous avons prélevé 1 ml de culture bactérienne avant induction ainsi que 1 h, 2 h et 3 h post-induction. Après centrifugation, les culots ont été resuspendus dans 25 µl de tampon de chargement pour protéines contenant du β-mercaptoéthanol. Les protéines ont été migrées par SDS-PAGE, dont voici une photo du gel coloré au bleu de Coomassie. Pour les bactéries transformées avec pGEX-3X, nous observons une bande à 26 kDa après induction qui est absente avant induction. Pour les bactéries transformées avec pGST-VP16AD, c'est une bande à 36 kDa que nous observons après mais pas avant induction. Cela signifie que notre induction a fonctionné et que les bactéries transformées ont synthétisé les protéines pleine longueur (Figure 4.2).

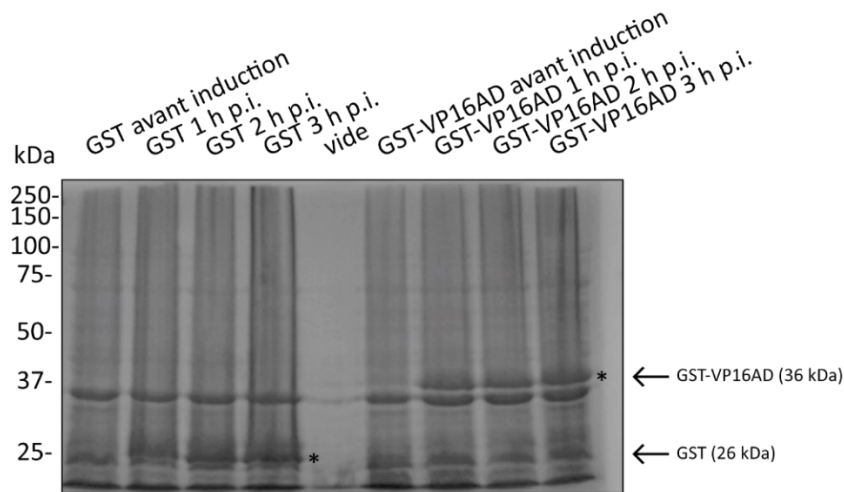


Figure 4.2 : Expression de GST et GST-VP16AD

Des lysats de bactéries transformées avec pGEX-3X ou pGST-VP16AD ont été migrés avant ou après induction avec de l'IPTG sur un gel 10 % polyacrylamide. Après migration, ce gel a été coloré au bleu de Coomassie. L'astérisque au milieu du gel montre la position de la bande correspondant à la protéine GST, et l'astérisque au bord droit du gel montre la position de la bande correspondant à la protéine GST-VP16AD.

Après avoir été exprimées, les protéines GST et GST-VP16AD présentes dans les lysats des bactéries ont été adsorbées à des matrices d'affinité glutathion-sépharose. Nous avons fait migrer par SDS-PAGE les protéines adsorbées aux billes, ainsi qu'un gradient avec différentes quantités d'albumine de sérum bovin (BSA) pour pouvoir évaluer la concentration de GST et GST-VP16AD adsorbée aux billes. Après la migration, le gel a été coloré au bleu de Coomassie. Nous observons bien une bande intense à 26 kDa pour les billes GST et une bande intense à 36 kDa pour les billes GST-VP16AD (Figure 4.3). La bande GST est approximativement deux fois plus intense

que la bande GST-VP16AD, ce qui signifie que la concentration des protéines sur les billes GST est approximativement le double de celle sur les billes GST-VP16. La bande GST-VP16AD a une intensité similaire à celle de 8 μg de BSA. Comme nous avons déposé 7 μl de billes sur le gel, nous pouvons en déduire qu'il y a approximativement 2 μg de GST et 1,2 μg de GST-VP16AD par μl de billes, donc le même ordre de grandeur.

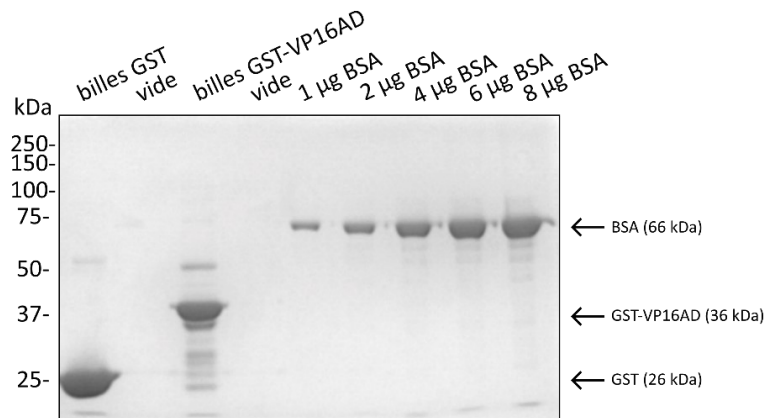


Figure 4.3 : Protéines GST et GST-VP16AD immobilisées sur les matrices d'affinités

Les protéines adsorbées aux matrices d'affinités ainsi que différentes concentrations de BSA ont été migrées par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE avec 10 % d'acrylamide. Après la migration, le gel a été coloré avec du bleu de Coomassie. Les positions des marqueurs de poids moléculaire sont indiquées à la gauche du gel. Les positions des diverses protéines ainsi que leur poids moléculaire sont indiquées à la droite du gel.

Après avoir préparé l'extrait de protéines cellulaires totales traité avec la nucléase micrococciale et les billes GST et GST-VP16AD, nous avons réalisé l'essai de type « GST pull-down ». Pour ce faire, nous avons incubé des billes GST-VP16AD, ainsi que des billes GST en guise de témoin négatif, avec de l'extrait de protéines cellulaires totales pour tester si UBF peut être précipité spécifiquement avec les billes GST-VP16AD.

Les protéines contenues dans les éluats ont été analysées par immunobuvardage. Nous observons deux bandes aux alentours des 100 kDa dans l'extrait cellulaire, ce qui est cohérent avec la taille des deux isoformes de UBF qui sont des protéines cellulaires (O'Mahony *et al.*, 1991). Nous n'observons pas de bande aux alentours des 100 kDa pour les éluats du GST pull-down, ce qui suggère que UBF n'interagit pas avec le domaine de transactivation de VP16 en absence d'autres protéines virales (expérience réalisée deux fois) (Figure 4.4). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que UBF aurait pu être détecté dans l'éluat GST-VP16AD si l'intensité du marquage était plus forte.

Nous avons ciblé TBP comme contrôle positif, TBP étant un facteur de transcription recruté par le domaine transactivateur de VP16 (Stringer *et al.*, 1990). Nous observons une bande à 38 kDa pour les protéines cellulaires totales, ce qui est cohérent car TBP est une protéine cellulaire. Nous observons également une bande plus intense pour l'élué au SDS des billes GST-VP16 par rapport aux billes GST, ce qui est cohérent car TBP interagit avec le domaine de transactivation de VP16 (Figure 4.4). Cette intensité accrue de la bande TBP pour les billes GST-VP16AD ne peut pas être expliquée par une différence dans la quantité de protéines immobilisées sur la colonne, car la concentration de GST sur les billes (environ 2 µg / µl de billes) est un peu plus élevée que pour GST-VP16AD (environ 1,2 µg / µl de billes).

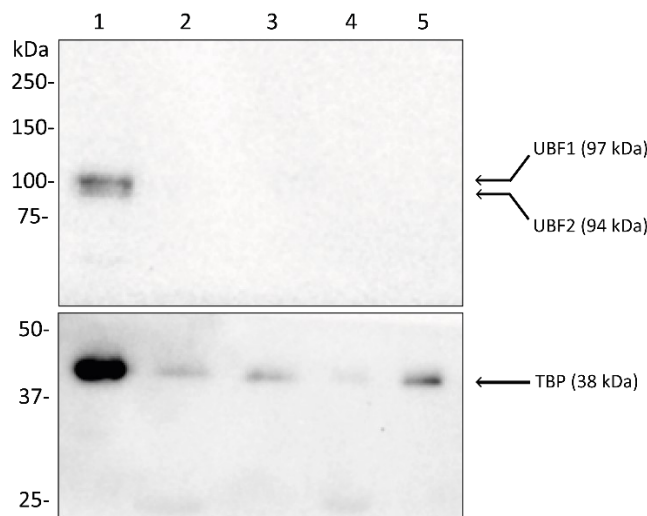


Figure 4.4 : Immunobuvardage de protéines des éluats du GST pull-down

Les protéines immobilisées sur les matrices d'affinités ont été éluées successivement avec du tampon ACB contenant 0,5 M NaCl et ensuite avec 0,1 % SDS.

1 : extrait de protéines cellulaires totales

2 : protéines adsorbées à des billes GST puis éluées avec 0,5 M NaCl

3 : protéines adsorbées à des billes GST-VP16AD puis éluées avec 0,5 M NaCl

4 : protéines adsorbées à des billes GST puis éluées avec 0,1 % SDS

5 : protéines adsorbées à des billes GST-VP16AD puis éluées avec 0,1 % SDS

4.2 Impact de VP16 sur la localisation intracellulaire de UBF surexprimé

Notre deuxième objectif a été de déterminer si la surexpression de VP16 module la localisation intracellulaire de UBF, et ce en réalisant des transfections transitoires.

Nous avons construit des vecteurs d'expression mammifère permettant d'exprimer la protéine virale VP16 pleine longueur (VP16WT), ainsi qu'une version mutée sans domaine de transactivation (VP16delAD) (Figure 4.5). Le vecteur d'expression de UBF a déjà été conçu par notre laboratoire (Ouellet Lavallée *et al.*, en révision).

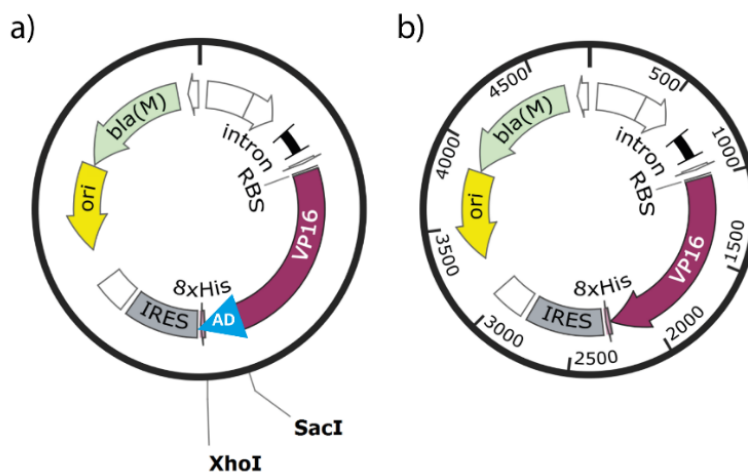


Figure 4.5 : Vecteurs d'expression de VP16 avec et sans domaine transactivateur

(a) Le domaine acide transactivateur de VP16WT est représenté par une pointe de flèche bleue.
(b) Le vecteur exprimant VP16delAD a été obtenu en retirant la séquence codant pour le domaine de transactivation avec les enzymes de restriction SacI et XhoI.

Pour contrôler si les cellules HeLa transfectées avec ces vecteurs surexpriment VP16 à la taille attendue, nous avons récolté les cellules après un et deux jours de transfection. Nous avons utilisé comme contrôle négatif des cellules transfectées sans plasmide, et comme contrôle positif des cellules Vero infectées durant 18 h avec la souche KOS de HSV-1. Nous détectons une bande intense à 65 kDa dans le lysat de cellules infectées qui correspond à VP16WT. Nous retrouvons cette bande de 65 kDa chez les cellules transfectées avec le vecteur codant pour VP16WT, ce qui confirme que ces cellules expriment VP16WT à la taille attendue. Les cellules transfectées avec le vecteur codant pour VP16delAD expriment également la protéine VP16delAD à la taille attendue car une bande de 57 kDa est présente.

Enfin, chez les cellules transfectées sans plasmide nous ne détectons pas les bandes présentes dans les cellules transfectées avec les vecteurs exprimant VP16WT ou VP16delAD (Figure 4.6). C'est cohérent car VP16 est une protéine virale, qui n'est donc pas censée être exprimée par des cellules non infectées avec HSV-1 ni transfectées avec un vecteur d'expression de VP16.

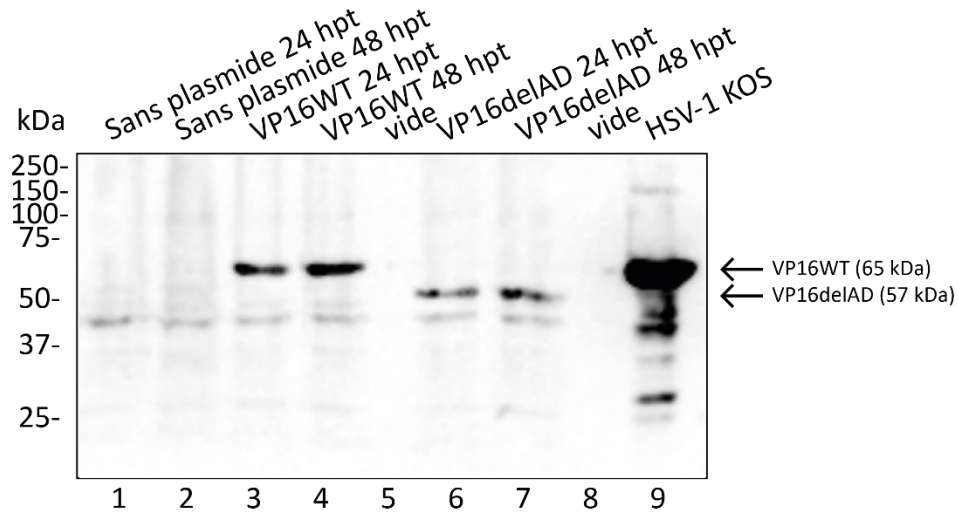


Figure 4.6 : Expression de VP16WT ou VP16delAD par les cellules HeLa transfectées

Immunobuvardage de protéines à partir de lysats de cellules HeLa transfectées de manière transitoire ou infectées.

- 1 : protéines récoltées 24 h post-transfection (hpt) à partir de cellules transfectées sans vecteur plasmidique
- 2 : protéines récoltées 48 hpt à partir de cellules transfectées sans vecteur plasmidique
- 3 : protéines récoltées 24 hpt à partir de cellules transfectées avec un vecteur d'expression de VP16 pleine longueur (VP16WT)
- 4 : protéines récoltées 48 hpt à partir de cellules transfectées avec un vecteur d'expression de VP16WT
- 5 et 8 : puits vides
- 6 : protéines récoltées 24 hpt à partir de cellules transfectées avec un vecteur d'expression de VP16 sans domaine transactivateur (VP16delAD)
- 7 : protéines récoltées 48 hpt à partir de cellules transfectées avec un vecteur d'expression de VP16delAD
- 9 : protéines récoltées 18 h post-infection à partir de cellules infectées avec la souche KOS de HSV-1

Nous avons ensuite cotransfecté de façon transitoire les cellules HeLa avec les vecteurs codant pour UBF et VP16WT, puis nous avons marqué les cellules par immunofluorescence indirecte et les avons observées au microscope confocal (Figure 4.7). Pour nous assurer d'observer un signal spécifique, des cellules transfectées sans plasmide ont été observées, ainsi que des cellules marquées uniquement avec les anticorps secondaires couplés aux fluorophores.

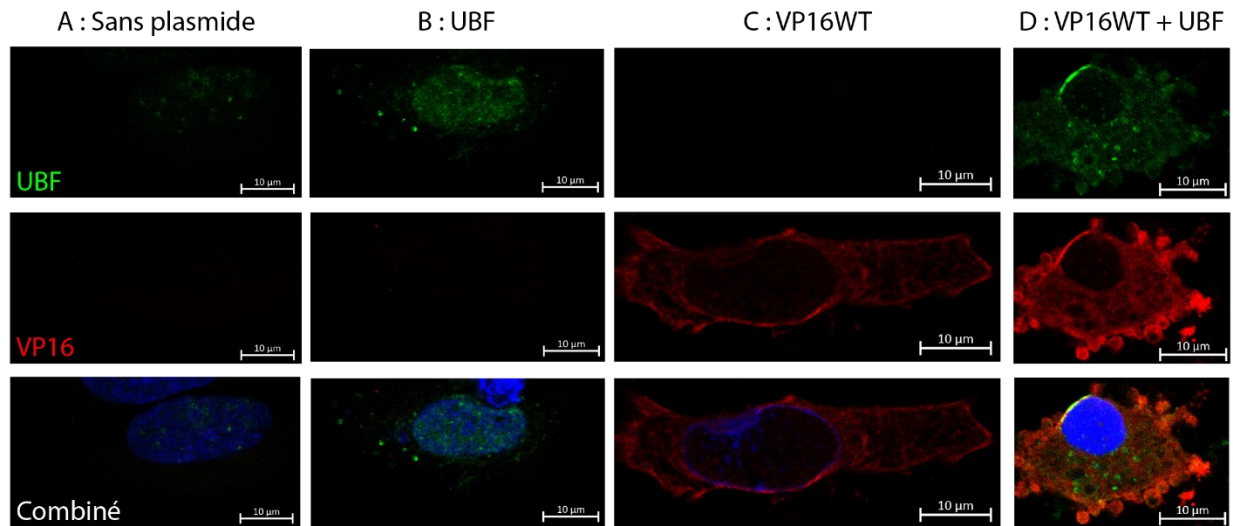


Figure 4.7 : Localisation de UBF surexprimé en contexte de cotransfection avec VP16WT

Images de microscopie confocale de cellules HeLa transfectées de façon transitoire puis marquées par immunofluorescence. UBF est coloré en vert, VP16 en rouge et le noyau en bleu.

A : une cellule transfectée sans plasmide

B : une cellule surexprimant uniquement UBF

C : une cellule surexprimant uniquement VP16WT

D : une cellule surexprimant simultanément VP16WT et UBF

Le taux de transfection n'étant pas de 100 %, lors d'une cotransfection nous pouvons observer sur une même lamelle des cellules exprimant uniquement UBF et d'autres surexprimant les deux protéines. Nous avons quantifié la localisation de UBF exprimé de manière ectopique dans les cellules cotransfectées avec un vecteur exprimant UBF et un vecteur exprimant VP16WT. Sur les 87 cellules que nous avons observées surexprimant uniquement UBF, la protéine est détectée majoritairement dans le noyau chez approximativement deux tiers des cellules. En revanche, UBF est principalement détecté dans le cytoplasme pour trois quarts des 19 cellules surexprimant UBF et VP16WT simultanément que nous avons analysées. La coexpression de VP16WT a donc mené à un changement de la localisation intracellulaire de UBF exprimé de manière ectopique (Figure 4.8).

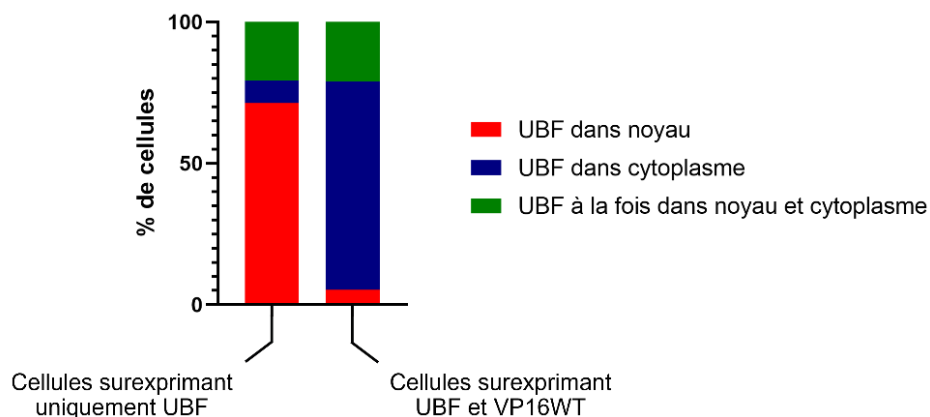


Figure 4.8 : Quantification de la localisation de UBF surexprimé en contexte de cotransfection avec VP16WT

Ce graphique montre la répartition des cellules surexprimant UBF selon la localisation de cette surexpression, et en fonction de la coexpression avec VP16WT. La barre de gauche correspond aux cellules cotransfectées avec les vecteurs d'expression de UBF et VP16WT mais ne surexprimant *in fine* que UBF. La barre de droite correspond aux cellules cotransfectées avec les vecteurs d'expression de UBF et VP16WT et surexprimant les deux protéines.

Nous avons ensuite testé si le domaine de transactivation était nécessaire pour observer l'impact de VP16 sur la localisation de UBF. Nous avons pour cela cotransfecté des cellules avec des vecteurs d'expression de UBF et de VP16delAD. Nous avons ensuite marqué ces cellules par immunofluorescence puis nous les avons étudiées au microscope confocal. Nous avons pu observer quelques cellules surexprimant simultanément UBF et VP16delAD, où nous détectons principalement UBF exprimé de manière ectopique dans le cytoplasme, bien que le signal ait pu être saturé (Figure 4.9).

En définitive, quand UBF est surexprimée seule elle est principalement détectée dans le noyau, alors que cette protéine cellulaire est majoritairement détectée dans le cytoplasme quand elle est surexprimée simultanément avec la protéine virale VP16. Un résultat préliminaire nous suggère que cet effet puisse exister même si VP16 est dépourvue de son domaine transactivateur.

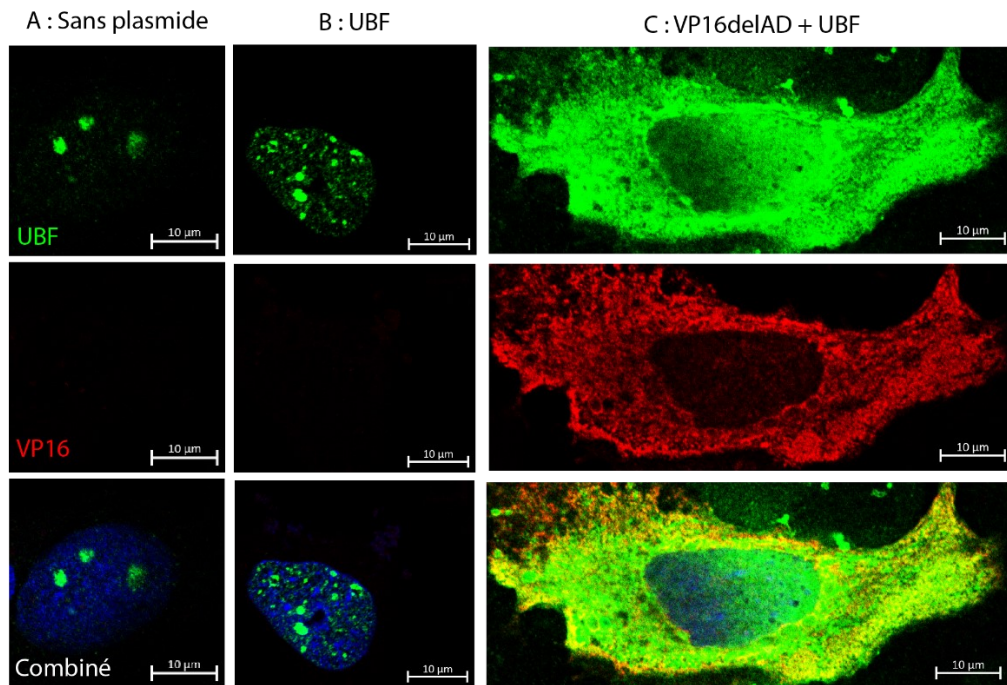


Figure 4.9 : Localisation de UBF surexprimé en contexte de cotransfection avec VP16delAD

Images de microscopie confocale de cellules HeLa transfectées de façon transitoire puis marquées par immunofluorescence. UBF est coloré en vert, VP16 en rouge et le noyau en bleu.

A : une cellule transfectée sans plasmide

B : une cellule surexprimant uniquement UBF

C : une cellule surexprimant simultanément VP16delAD et UBF

5 DISCUSSION

Pour comprendre comment HSV-1, et plus spécifiquement VP16, peut contrecarrer l'activité antivirale de UBF, il sera important de connaître le mécanisme précis par lequel UBF freine la réplication virale.

5.1 Comment la protéine cellulaire UBF pourrait inhiber la transcription des gènes viraux immédiats-précoces et précoces ?

Durant l'infection par HSV-1, les génomes viraux entrent dans le noyau des cellules infectées. Dans le noyau, les génomes viraux s'associent avec des nucléosomes, et autour de ces génomes viraux, des protéines virales et cellulaires vont former des compartiments de réplication virale où se déroule la transcription, la réplication et l'encapsidation (Roizman *et al.*, 2013; Whitley *et al.*, 2016). Notre laboratoire a observé que la protéine nucléolaire UBF est transloquée aux compartiments de réplication virale dans le nucléoplasme suite à l'infection de cellules HeLa par HSV-1 (Lymberopoulos *et al.*, 2010). UBF est un facteur de restriction virale car son inhibition augmente la production de nouvelles particules virales et la transcription de gènes viraux immédiats-précoces et précoces, alors que la surexpression de UBF bloque la formation des compartiments de réplication virale dans des cellules HeLa (Ouellet Lavallée *et al.*, 2015; Ouellet Lavallée *et al.*, en révision). Dans des cellules de fibrosarcome humain HT1080 et des fibroblastes embryonnaires de souris NIH-3T3, il semble que l'isoforme UBF2 a plus de liens avec l'ARN polymérase II que UBF1 (Grueneberg *et al.*, 2003; Sanij *et al.*, 2015). Toutefois, la surexpression dans des cellules HeLa des deux isoformes de UBF séparément après avoir inhibé UBF endogène a eu le même effet inhibiteur sur la formation des compartiments de réplication virale (Ouellet Lavallée *et al.*, en révision).

Notre laboratoire a également découvert que UBF colocalise avec les génomes viraux entrants. Cette colocalisation n'est pas médiée par des protéines virales car le génome viral a été introduit par transfection dans des cellules HeLa avec un chromosome bactérien artificiel, en présence d'acide phosphonoacétique qui bloque la réplication du génome viral (Ouellet Lavallée *et al.*, en révision).

Les boîtes HMG de UBF ayant la capacité de se lier à l'ADN ribosomal sans avoir à reconnaître de séquence spécifique (O'Sullivan *et al.*, 2002; Potapova *et al.*, 2019), UBF pourrait possiblement se lier au génome viral via ces mêmes boîtes HMG et entraîner un encombrement stérique entravant la transcription des gènes viraux immédiats-précoces et précoces. Il se pourrait également que UBF freine la transcription virale en recrutant des facteurs de répression au niveau du génome viral.

Pour déterminer si UBF se lie au génome viral, nous pourrions réaliser une immunoprécipitation de la chromatine ciblant UBF en transfectant du génome viral avec un chromosome artificiel bactérien en présence d'acide phosphonoacétique. Si UBF se lie au génome viral, des fragments du génome viral où UBF s'est fixé seront immunoprécipités. Un contrôle négatif serait réalisé en parallèle avec des anticorps non spécifiques pour aucune protéine de la chromatine. Si des fragments du génome viral sont immunoprécipités, ils pourront être identifiés par séquençage de nouvelle génération pour identifier avec plus de précision les sites de fixation de UBF sur le génome viral. Comme nous savons que UBF se lie à l'ADN ribosomal, nous nous attendons à identifier des fragments d'ARN ribosomal lors du séquençage de nouvelle génération. Notre laboratoire a observé que suite à l'infection par HSV-1 de cellules Vero, une partie de UBF demeure lié à l'ADN ribosomal (Lymberopoulos *et al.*, 2010).

En outre, UBF colocalise en contexte non infectieux et infectieux dans des fibroblastes de prépuce humain (HFF) avec IFI16, une autre protéine cellulaire inhibant l'infection par HSV-1. En contexte infectieux, UBF et IFI16 colocalisent avec la protéine virale ICP4, un constituant des compartiments de réplication virale (Lum *et al.*, 2019). IFI16 forme des filaments dans les compartiments de réplication virale au début de l'infection dans des cellules HFF. Ces filaments colocalisent avec les protéines cellulaires PML et Sp100, des constituants des corps nucléaires PML connus pour leur effet inhibiteur sur l'infection par HSV-1 (Merkl *et al.*, 2019). Cependant, IFI16 n'influence pas le recrutement des corps nucléaires PML aux génomes viraux dans des cellules HFF immortalisées (Alandijany *et al.*, 2018). De futures expérimentations sont nécessaires pour mieux comprendre les interactions entre les diverses protéines nucléaires de la cellule inhibant l'infection par HSV-1.

5.2 Comment la protéine virale VP16 pourrait contrecarrer l'effet antiviral de UBF ?

Notre laboratoire a découvert que la colocalisation entre UBF et le génome viral diminue si le même nombre de cellules est infecté avec plus de particules virales infectieuses (Ouellet Lavallée *et al.*, en révision). Cette expérience ayant été réalisée dans des cellules HeLa en présence d'acide phosphonoacétique qui inhibe la réplication du génome viral, nous avons émis l'hypothèse qu'une protéine virale agissant avant cette étape inhibe la colocalisation entre UBF et le génome viral entrant. Les protéines tégumentaires entrent dans cette catégorie, comme VP16. De surcroît, VP16 et UBF sont tous les deux des facteurs de transcription, et VP16 stimule la transcription virale en recrutant divers facteurs de transcription via son domaine transactivateur.

Notre laboratoire a observé que la colocalisation entre UBF et le génome viral n'est pas affectée par une hausse de la multiplicité de l'infection si un virus mutant qui exprime VP16 sans domaine de transactivation est utilisé.

Pour déterminer si UBF et le domaine transactivateur de VP16 interagissent, un essai de type « GST pull-down » a été réalisé durant ce projet de maîtrise entre les protéines GST et GST-VP16AD et de l'extrait de protéines totales de cellules HeLa ayant préalablement été traité avec de la nucléase micrococcale pour dégrader les acides nucléiques. Le domaine transactivateur de VP16 recrutant plusieurs facteurs de transcription cellulaires ayant la capacité de se lier à l'ADN comme TFIID dans les cellules HeLa, et UBF ayant également cette capacité dans les cellules HeLa, la présence d'acides nucléiques aurait pu médier une interaction indirecte entre UBF et le domaine transactivateur de VP16 (O'Sullivan *et al.*, 2002; Stringer *et al.*, 1990).

La figure 4.4 suggère que le domaine transactivateur de VP16 ne s'associe pas à UBF en absence du reste de la protéine VP16 et des autres protéines virales. La présence de TBP dans l'éluat de la matrice de GST-VP16AD nous confirme que la matrice était fonctionnelle. Notre laboratoire a précédemment établi que le domaine transactivateur de VP16 peut interférer dans la colocalisation entre UBF et le génome viral en contexte infectieux dans des cellules HeLa (Ouellet Lavallée *et al.*, en révision). Cela signifie que cette relation a été observée en présence des autres protéines virales, qui étaient absentes lors de l'essai de type « GST pull-down ». Nous ne pouvons donc pas écarter la possibilité d'une interaction indirecte entre VP16 et UBF médiée par d'autres protéines virales.

Avant d'entamer ce projet, nous avons prévu de tester si l'inhibition de la formation des compartiments de réplication virale suite à la surexpression de UBF était contrecarrée par la surexpression simultanée de VP16. Pour augmenter le taux de cotransfection, nous avons prévu de générer un vecteur contenant la séquence codante de VP16 et celle de UBF. C'est pour cela que nous avons utilisé le vecteur pTandem qui contient deux sites de clonage multiple, avec un site d'entrée interne du ribosome en amont de la deuxième séquence codante afin de permettre sa traduction. Les cellules devaient ensuite être infectées puis observées au microscope confocal après que les protéines VP16, UBF et ICP8 aient été marquées par immunofluorescence. La protéine virale ICP8 est un constituant des compartiments de réplication virale. Toutefois, au cours de nos expériences, nous avons découvert que UBF surexprimée est séquestrée dans le cytoplasme en contexte de surexpression simultanée avec VP16, un phénomène qui n'est pas observé avec ces deux protéines endogènes en contexte d'infection. Ce ne serait donc pas possible d'évaluer l'impact de VP16 sur l'inhibition de la réplication de HSV-1 par cette stratégie.

Pour tester cette hypothèse, nous pourrions surexprimer VP16 avec ou sans domaine de transactivation dans des cellules HeLa, infecter les cellules pendant 5 h puis les observer au microscope confocal après avoir marqué par immunofluorescence indirecte UBF endogène, VP16 et ICP8, un constituant des compartiments de réplication virale. Selon notre hypothèse, nous nous attendrions à ce que la surexpression de VP16 promeuve la formation des compartiments de réplication virale, et possiblement inhibe l'expression de UBF endogène.

Une partie de notre hypothèse initiale était que le domaine transactivateur de VP16 interférerait directement dans la colocalisation entre UBF et le génome viral, ce qui contrecarrerait l'effet antiviral de UBF. Notre laboratoire avait observé de la protéine UBF libre (c'est-à-dire qui n'est pas colocalisée avec l'ADN viral) même à une MOI de 20, ce qui signifie que la baisse de la colocalisation entre UBF et le génome viral lorsque la MOI augmente n'est pas due à un excès de génomes viraux par rapport à la protéine UBF libre (Ouellet Lavallée *et al.*, en révision). Nous savons que l'inhibition de UBF entraîne une augmentation de la transcription des gènes viraux immédiats-précoces et précoces dans les cellules HeLa (Ouellet Lavallée *et al.*, 2015), et que le domaine transactivateur de VP16 recrute une série de facteurs de transcription pour stimuler la transcription des gènes viraux immédiats-précoces (Fan *et al.*, 2020; Hirai *et al.*, 2010). Nous pouvons donc envisager que UBF colocalise avec les gènes viraux immédiats-précoces et précoces, et qu'une augmentation de la MOI avec un virus dont la protéine VP16 possède un domaine de transactivation entraîne le recrutement de plus de facteurs de transcription au niveau

des gènes viraux immédiats-précoces et précoces, conduisant ainsi à un encombrement stérique diminuant la colocalisation entre UBF et le génome viral.

Pour tester si la surexpression de VP16 affecte la colocalisation entre UBF et le génome viral, nous pourrions surexprimer VP16 avec ou sans domaine de transactivation dans des cellules HeLa en les transfectant, puis infecter les cellules en présence d'acide phosphonoacétique pour bloquer la synthèse d'ADN viral. Le génome viral entrant serait alors marqué par hybridation fluorescente *in situ*, et les protéines UBF et VP16 par immunofluorescence indirecte. La colocalisation entre UBF et le génome viral pourrait alors être quantifiée à partir d'images de microscopie confocale *z-stack* des cellules ainsi traitées.

Nous avons découvert que la surexpression simultanée de UBF et VP16 séquestre UBF dans le cytoplasme après sa traduction. En outre, un résultat préliminaire nous suggère que le domaine transactivateur de VP16 ne serait pas nécessaire pour bloquer la translocation de UBF surexprimée du cytoplasme au noyau après sa traduction. Pour confirmer expérimentalement si VP16 et UBF colocalisent en contexte de cotransfection, une quantification de la colocalisation entre les deux protéines pourrait être réalisée. Cette quantification pourrait également permettre d'évaluer si la colocalisation est affectée par la délétion du domaine transactivateur de VP16. En outre, pour des analyses subséquentes, nous pourrions transfecter en parallèle des cellules HeLa avec un vecteur exprimant VP16 avec ou sans domaine transactivateur et les observer à l'aveugle, c'est-à-dire sans savoir avec quel plasmide les cellules ont été transfectées. Ainsi, nous pourrions écarter d'éventuels biais de l'observateur lors de l'utilisation du microscope confocal.

La localisation de UBF pourrait également être étudiée en contexte de surexpression simultanée avec des mutants de VP16 ayant des délétions en amont du domaine transactivateur. Si une de ces délétions empêche VP16 de séquestrer UBF dans le cytoplasme, cela suggérerait que la portion de VP16 qui a été enlevée puisse interagir avec UBF. Un des domaines de VP16 candidat pour interagir avec UBF est le domaine *core*, connu pour recruter les protéines cellulaires HCF-1 et OCT-1 (voir section 1.2). HCF-1 permet à VP16 d'atteindre le noyau après que la capsid et les protéines tégmentaires soient arrivées dans le cytoplasme, et OCT-1 établit la liaison avec le promoteur des gènes viraux immédiats-précoces.

6 CONCLUSION

Au regard des précédentes études et des résultats obtenus lors de ce projet de recherche, notre modèle a évolué. Initialement, nous pensions que VP16 contrecarrait l'effet inhibiteur de UBF sur la transcription des gènes viraux en se liant directement à cette protéine cellulaire via son domaine transactivateur.

Toutefois, nos résultats nous suggèrent que le domaine transactivateur de VP16 seul n'interagit pas avec UBF en présence des autres protéines cellulaires et en absence des autres protéines virales. Nous avons également observé que UBF est majoritairement détectée dans le noyau quand elle est surexprimée seule, tandis qu'elle est observée principalement dans le cytoplasme quand les cellules surexpriment simultanément UBF et VP16 pleine longueur. Un résultat préliminaire suggère que même sans domaine transactivateur, VP16 peut empêcher UBF surexprimé simultanément d'atteindre le noyau.

Dans notre modèle actualisé, VP16 atteint le nucléoplasme et pourrait interagir avec la protéine UBF qui été transloquée du nucléole aux compartiments de réplication virale. Cette interaction serait médiée par une autre partie de VP16 que le domaine transactivateur, possiblement le domaine *core*. Cependant, le domaine d'activation de VP16 serait critique pour que VP16 puisse inhiber l'activité répressive de UBF. En interagissant avec UBF, VP16 l'empêcherait de se lier au génome viral et d'entraver l'accès à l'ARN polymérase II des gènes viraux immédiats-précoces et précoces. En outre, après s'être associée avec HCF-1 et OCT-1 via son domaine *core*, VP16 recruterait avec son domaine transactivateur une série de facteurs de transcription de l'ARN polymérase II au niveau du promoteur des gènes viraux immédiats-précoces. En cas d'infection avec un plus grand nombre de particules virales infectieuses pour le même nombre de cellule, l'activité transcriptionnelle serait plus intense et la chromatine plus décondensée, ce qui pourrait limiter la colocalisation entre UBF et le génome viral.

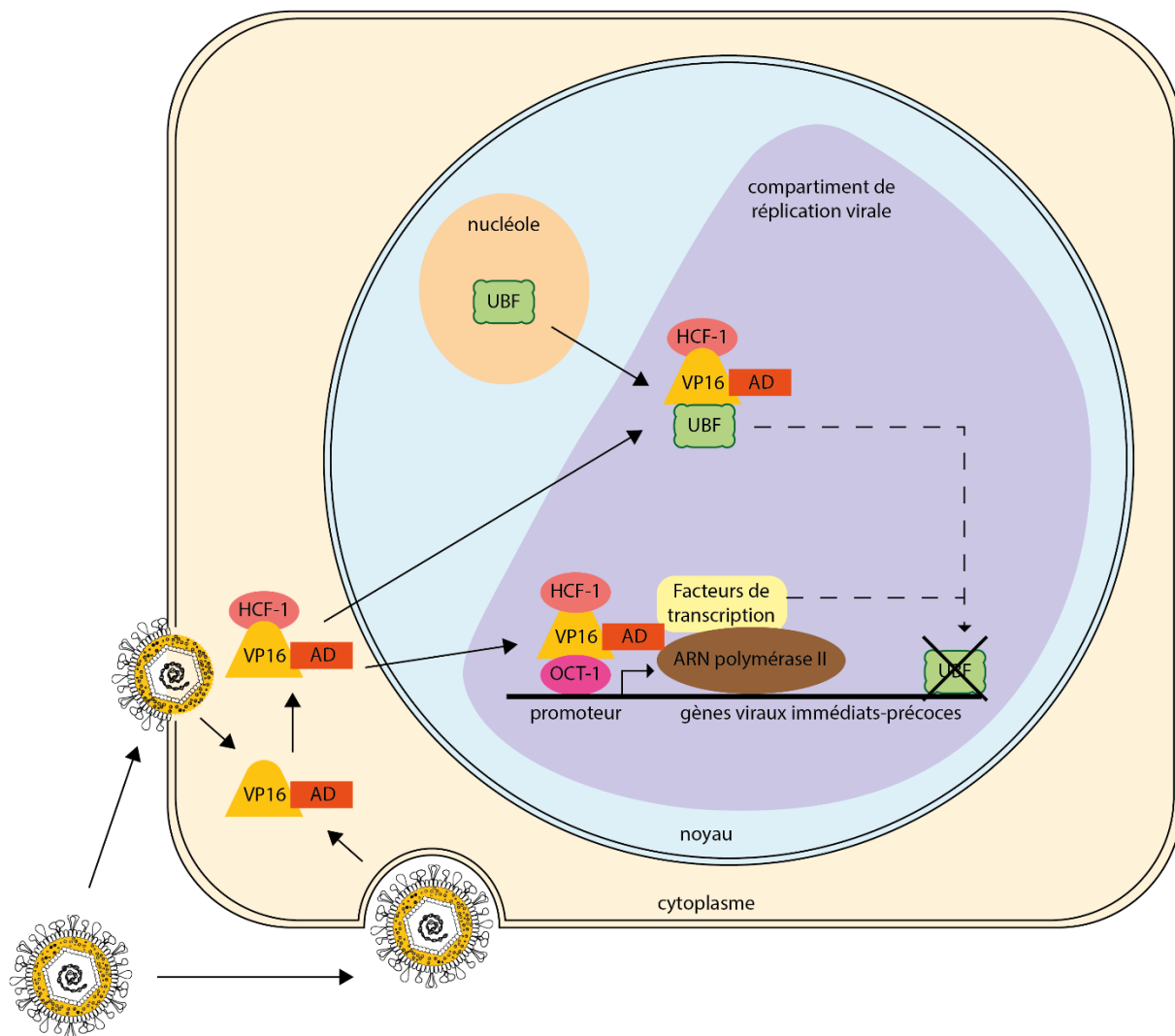


Figure 6.1 : Modèle de l'impact de VP16 sur UBF durant une infection par HSV-1

Suite à l'entrée de HSV-1, la protéine virale téguementaire VP16 se retrouve dans le cytoplasme. Elle va s'associer avec la protéine cellulaire HCF-1 qui va lui permettre d'atteindre le noyau. Dans les compartiments de réplication virale, nous supposons que VP16 se lie à UBF via son domaine core, empêchant ainsi UBF de se lier au génome viral et d'inhiber la transcription virale par l'ARN polymérase II. De surcroît, le domaine acide transactivateur (AD) de VP16 recrute des facteurs de transcription de l'ARN polymérase II pour promouvoir la transcription des gènes viraux immédiats-précoces, ce qui diminue la colocalisation entre UBF et le génome viral et affecte l'activité antivirale de UBF.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Alandijany T, Roberts APE, Conn KL, Loney C, McFarlane S, Orr A, Boutell C (2018) Distinct temporal roles for the promyelocytic leukaemia (PML) protein in the sequential regulation of intracellular host immunity to HSV-1 infection. *PLoS pathogens* 14(1):e1006769-e1006769.
- Allen BL, Taatjes DJ (2015) The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16(3):155-166.
- Ames J, Yadavalli T, Suryawanshi R, Hopkins J, Agelidis A, Patil C, Fredericks B, Tseng H, Valyi-Nagy T, Shukla D (2021) OPTN is a host intrinsic restriction factor against neuroinvasive HSV-1 infection. *Nature communications* 12(1):5401-5401.
- Babb R, Huang CC, Aufiero DJ, Herr W (2001) DNA recognition by the herpes simplex virus transactivator VP16: a novel DNA-binding structure. *Molecular and Cellular Biology* 21(14):4700-4712.
- Banerjee R, Weidman MK, Navarro S, Comai L, Dasgupta A (2005) Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. *The Journal of general virology* 86(Pt 8):2315-2322.
- Banoth B, Cassel SL (2018) Mitochondria in innate immune signaling. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 202:52-68.
- Bertrand L (2011) *Identification et caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine UL24 du virus de l'herpès simplex 1*. Doctorat en virologie et immunologie (Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, Québec). 193 p.
- Blondeau C, Pelchen-Matthews A, Mlcochova P, Marsh M, Milne RSB, Towers GJ (2013) Tetherin Restricts Herpes Simplex Virus 1 and Is Antagonized by Glycoprotein M. *Journal of virology* 87(24):13124-13133.
- Bodda C, Reinert LS, Fruhwürth S, Richardo T, Sun C, Zhang B-c, Kalamvoki M, Pohlmann A, Mogensen TH, Bergström P, Agholme L, O'Hare P, Sodeik B, Gyrd-Hansen M, Zetterberg H, Paludan SR (2020) HSV1 VP1-2 deubiquitinates STING to block type I interferon expression and promote brain infection. *Journal of Experimental Medicine* 217(7):e20191422.
- Campbell ME, Palfreyman JW, Preston CM (1984) Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *Journal of Molecular Biology* 180(1):1-19.
- Chan EKL, Imai H, Hamel JC, Tan EM (1991) Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. *Journal of Experimental Medicine* 174(5):1239-1244.
- Chelbi-Alix MK, de Thé H (1999) Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18(4):935-941.
- Chen S, Liu Q, Zhang L, Ma J, Xue B, Li H, Deng R, Guo M, Xu Y, Tian R, Wang J, Cao W, Yang Q, Wang L, Li X, Liu S, Yang D, Zhu H (2022) The Role of REC8 in the Innate Immune Response to Viral Infection. *Journal of virology* 96(6):e0217521.
- Choi MK, Wang Z, Ban T, Yanai H, Lu Y, Koshiba R, Nakaima Y, Hangai S, Savitsky D, Nakasato M, Negishi H, Takeuchi O, Honda K, Akira S, Tamura T, Taniguchi T (2009) A selective

contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(42):17870-17875.

Cockrell SK, Sanchez ME, Erazo A, Homa FL (2009) Role of the UL25 protein in herpes simplex virus DNA encapsidation. *Journal of virology* 83(1):47-57.

Cohen JI, Seidel K (1994) Varicella-zoster virus (VZV) open reading frame 10 protein, the homolog of the essential herpes simplex virus protein VP16, is dispensable for VZV replication in vitro. *Journal of virology* 68(12):7850-7858.

Coller KE, Lee JI-H, Ueda A, Smith GA (2007) The Capsid and Tegument of the Alphaherpesviruses Are Linked by an Interaction between the UL25 and VP1/2 Proteins. *Journal of virology* 81(21):11790-11797.

Cramer M, Bauer M, Caduff N, Walker R, Steiner F, Franzoso FD, Gujer C, Boucke K, Kucera T, Zbinden A, Münz C, Fraefel C, Greber UF, Pavlovic J (2018) MxB is an interferon-induced restriction factor of human herpesviruses. *Nature communications* 9(1):1980.

Crump C (2018) Virus Assembly and Egress of HSV. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1045:23-44.

Culbertson SJ, Shogren-Knaak MA (2021) Mechanisms of stimulation of SAGA-mediated nucleosome acetylation by a transcriptional activator. *Biochemistry and Biophysical Reports* 25:100884.

Dalrymple MA, McGeoch DJ, Davison AJ, Preston CM (1985) DNA sequence of the herpes simplex virus type 1 gene whose product is responsible for transcriptional activation of immediate early promoters. *Nucleic Acids Research* 13(21):7865-7879.

DeAngelis T, Chen J, Wu A, Prisco M, Baserga R (2006) Transformation by the simian virus 40 T antigen is regulated by IGF-I receptor and IRS-1 signaling. *Oncogene* 25(1):32-42.

Dichamp I, Séité P, Agius G, Barbarin A, Beby-Defaux A (2014) Human papillomavirus 16 oncoprotein E7 stimulates UBF1-mediated rDNA gene transcription, inhibiting a p53-independent activity of p14ARF. *PLoS one* 9(5):e96136-e96136.

El-Asmi F, McManus FP, Brantis-de-Carvalho CE, Valle-Casuso JC, Thibault P, Chelbi-Alix MK (2020) Cross-talk between SUMOylation and ISGylation in response to interferon. *Cytokine* 129:155025.

Everett RD, Murray J (2005) ND10 Components Relocate to Sites Associated with Herpes Simplex Virus Type 1 Nucleoprotein Complexes during Virus Infection. *Journal of virology* 79(8):5078-5089.

Everett RD, Parada C, Gripon P, Sirma H, Orr A (2008) Replication of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Is Restricted by both PML and Sp100. *Journal of virology* 82(6):2661-2672.

Fan D, Wang M, Cheng A, Jia R, Yang Q, Wu Y, Zhu D, Zhao X, Chen S, Liu M, Zhang S, Ou X, Mao S, Gao Q, Sun D, Wen X, Liu Y, Yu Y, Zhang L, Tian B, Pan L, Chen X (2020) The Role of VP16 in the Life Cycle of Alphaherpesviruses. *Frontiers in microbiology* 11:1910-1910.

Fukuda A, Nakadai T, Shimada M, Tsukui T, Matsumoto M, Nogi Y, Meisterernst M, Hisatake K (2004) Transcriptional coactivator PC4 stimulates promoter escape and facilitates transcriptional synergy by GAL4-VP16. *Molecular and Cellular Biology* 24(14):6525-6535.

Full F, Ensser A (2019) Early Nuclear Events after Herpesviral Infection. *Journal of clinical medicine* 8(9):1408.

- Gaidt MM, Morrow A, Fairgrieve MR, Karr JP, Yosef N, Vance RE (2021) Self-guarding of MORC3 enables virulence factor-triggered immunity. *Nature* 600(7887):138-142.
- Garavís M, Calvo O (2017) Sub1/PC4, a multifaceted factor: from transcription to genome stability. *Current Genetics* 63(6):1023-1035.
- Ge H, Roeder RG (1994) Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell* 78(3):513-523.
- Genoveso MJ, Hisaoka M, Komatsu T, Wodrich H, Nagata K, Okuwaki M (2020) Formation of adenovirus DNA replication compartments and viral DNA accumulation sites by host chromatin regulatory proteins including NPM1. *The FEBS Journal* 287(1):205-217.
- Gerster T, Roeder RG (1988) A herpesvirus trans-activating protein interacts with transcription factor OTF-1 and other cellular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85(17):6347-6351.
- Gross ST, Harley CA, Wilson DW (2003) The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology* 317(1):1-12.
- Grueneberg DA, Pablo L, Hu K-Q, August P, Weng Z, Papkoff J (2003) A Functional Screen in Human Cells Identifies UBF2 as an RNA Polymerase II Transcription Factor That Enhances the β -Catenin Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology* 23(11):3936-3950.
- Guo H, Gilley RP, Fisher A, Lane R, Landsteiner VJ, Ragan KB, Dovey CM, Carette JE, Upton JW, Mocarski ES, Kaiser WJ (2018) Species-independent contribution of ZBP1/DAI/DLM-1-triggered necroptosis in host defense against HSV1. *Cell Death & Disease* 9(8):816.
- Guo H, Shen S, Wang L, Deng H (2010) Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. *Protein & Cell* 1(11):987-998.
- Gutiérrez JL, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL (2007) Activation domains drive nucleosome eviction by SWI/SNF. *EMBO Journal* 26(3):730-740.
- Haas JG, Weber J, Gonzalez O, Zimmer R, Griffiths SJ (2018) Antiviral activity of the mineralocorticoid receptor NR3C2 against Herpes simplex virus Type 1 (HSV-1) infection. *Scientific reports* 8(1):15876-15876.
- Hirai H, Tani T, Kikyo N (2010) Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA. *The International Journal of Developmental Biology* 54(11-12):1589-1596.
- Hisatake K, Nishimura T, Maeda Y, Hanada K, Song CZ, Muramatsu M (1991) Cloning and structural analysis of cDNA and the gene for mouse transcription factor UBF. *Nucleic Acids Research* 19(17):4631-4637.
- Horan KA, Hansen K, Jakobsen MR, Holm CK, Søbby S, Unterholzner L, Thompson M, West JA, Iversen MB, Rasmussen SB, Ellermann-Eriksen S, Kurt-Jones E, Landolfo S, Damania B, Melchjorsen J, Bowie AG, Fitzgerald KA, Paludan SR (2013) Proteasomal Degradation of Herpes Simplex Virus Capsids in Macrophages Releases DNA to the Cytosol for Recognition by DNA Sensors. *The Journal of Immunology* 190(5):2311.
- Hsu CYM, Uludağ H (2012) A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. *Nature Protocols* 7(5):935-945.
- Huang J, You H, Su C, Li Y, Chen S, Zheng C (2018) Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein VP22 Abrogates cGAS/STING-Mediated Antiviral Innate Immunity. *Journal of virology* 92(15).
- Huang SY, Garrard WT (1986) Temperature-dependent cleavage of chromatin by micrococcal nuclease near the nucleosome center. *FEBS Letters* 199(1):89-91.

Ikeda K, Stuehler T, Meisterernst M (2002) The H1 and H2 regions of the activation domain of herpes simplex virion protein 16 stimulate transcription through distinct molecular mechanisms. *Genes Cells* 7(1):49-58.

Ishioka K, Ikuta K, Sato Y, Kaneko H, Sorimachi K, Fukushima E, Saijo M, Suzutani T (2013) Herpes simplex virus type 1 virion-derived US11 inhibits type 1 interferon-induced protein kinase R phosphorylation. *Microbiology and Immunology* 57(6):426-436.

Ito M, Yuan CX, Malik S, Gu W, Fondell JD, Yamamura S, Fu ZY, Zhang X, Qin J, Roeder RG (1999) Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. *Molecular Cell* 3(3):361-370.

Jan Fada B, Kaadi E, Samrat SK, Zheng Y, Gu H (2020) Effect of SUMO-SIM Interaction on the ICP0-Mediated Degradation of PML Isoform II and Its Associated Proteins in Herpes Simplex Virus 1 Infection. *Journal of virology* 94(12):e00470-00420.

Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R (1990) Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 344(6269):830-836.

Jeffery HM, Weinzierl ROJ (2020) Multivalent and Bidirectional Binding of Transcriptional Transactivation Domains to the MED25 Coactivator. *Biomolecules* 10(9):1205.

Jiang Z, Su C, Zheng C (2016) Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein UL41 Counteracts IFIT3 Antiviral Innate Immunity. *Journal of virology* 90(24):11056-11061.

Jones KA, Black DM, Griffiths BL, Solomon E (1995) Localization of the human RNA polymerase I transcription factor gene (UBTF) to the D17S183 locus on chromosome 17q21 and construction of a long-range restriction map of the region. *Genomics* 30(3):602-604.

Jost JP, Siegmann M, Thiry S, Jost YC, Benjamin D, Schwarz S (1999) A re-investigation of the ribonuclease sensitivity of a DNA demethylation reaction in chicken embryo and G8 mouse myoblasts. *FEBS Letters* 449(2-3):251-254.

Jurak I, Silverstein LB, Sharma M, Coen DM (2012) Herpes simplex virus is equipped with RNA- and protein-based mechanisms to repress expression of ATRX, an effector of intrinsic immunity. *Journal of virology* 86(18):10093-10102.

Justilien V, Lewis KC, Meneses KM, Jamieson L, Murray NR, Fields AP (2020) Protein kinase Ci promotes UBF1-ECT2 binding on ribosomal DNA to drive rRNA synthesis and transformed growth of non-small-cell lung cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 295(24):8214-8226.

Kajino K, Yamamoto T, Hayashi J, Umeda T, Takahara T, Hino O (2001) Recombination hot spot of hepatitis B virus genome binds to members of the HMG domain protein family and the Y box binding protein family; implication of these proteins in genomic instability. *Intervirology* 44(5):311-316.

Kamen DE, Gross ST, Girvin ME, Wilson DW (2005) Structural basis for the physiological temperature dependence of the association of VP16 with the cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H. *Journal of virology* 79(10):6134-6141.

Kao CF, Chen SY, Lee YH (2004) Activation of RNA polymerase I transcription by hepatitis C virus core protein. *Journal of Biomedical Science* 11(1):72-94.

Klemm RD, Goodrich JA, Zhou S, Tjian R (1995) Molecular cloning and expression of the 32-kDa subunit of human TFIID reveals interactions with VP16 and TFIIB that mediate transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(13):5788-5792.

Knipe DM, Heldwein EE, Mohr IJ, Sodroski CN (2021) Herpes Simplex Viruses: Mechanisms of Lytic and Latent Infection. *Fields Virology*, Howley PM, Knipe DM (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 7e édition Vol 2. p 235-296.

Kobayashi N, Boyer TG, Berk AJ (1995) A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIIID-promoter complex assembly. *Molecular and Cellular Biology* 15(11):6465-6473.

Kretzschmar M, Kaiser K, Lottspeich F, Meisterernst M (1994) A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* 78(3):525-534.

Kundu TK, Palhan VB, Wang Z, An W, Cole PA, Roeder RG (2000) Activator-dependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300. *Molecular Cell* 6(3):551-561.

Kutluay SB, DeVos SL, Klomp JE, Triezenberg SJ (2009) Transcriptional coactivators are not required for herpes simplex virus type 1 immediate-early gene expression in vitro. *Journal of virology* 83(8):3436-3449.

La Boissiere S, Hughes T, O'Hare P (1999) HCF-dependent nuclear import of VP16. *The EMBO Journal* 18(2):480-489.

Lai JS, Herr W (1997) Interdigitated residues within a small region of VP16 interact with Oct-1, HCF, and DNA. *Molecular and Cellular Biology* 17(7):3937-3946.

Lai Y-S, Tseng H-B, Hu C-H (1996) The Dimerization Domain of Upstream Binding Factor Contains Multiple Helical Structures. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220(3):816-823.

Laine RF, Albecka A, van de Linde S, Rees EJ, Crump CM, Kaminski CF (2015) Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. *Nature communications* 6:5980-5980.

Lallemand-Breitenbach V, de Thé H (2010) PML nuclear bodies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(5):a000661-a000661.

Lallemand-Breitenbach V, de Thé H (2018) PML nuclear bodies: from architecture to function. *Current Opinion in Cell Biology* 52:154-161.

Lanfranca MP, Mostafa HH, Davido DJ (2014) HSV-1 ICP0: An E3 Ubiquitin Ligase That Counteracts Host Intrinsic and Innate Immunity. *Cells* 3(2).

Langlois C, Mas C, Di Lello P, Jenkins LMM, Legault P, Omichinski JG (2008) NMR Structure of the Complex between the Tfb1 Subunit of TFIIH and the Activation Domain of VP16: Structural Similarities between VP16 and p53. *Journal of the American Chemical Society* 130(32):10596-10604.

Lawrence FJ, McStay B, Matthews DA (2006) Nucleolar protein upstream binding factor is sequestered into adenovirus DNA replication centres during infection without affecting RNA polymerase I location or ablating rRNA synthesis. *Journal of Cell Science* 119(12):2621.

Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, Wolff T, Osiak A, Levine B, Schmidt RE, García-Sastre A, Leib DA, Pekosz A, Knobeloch K-P, Horak I, Virgin HW (2007) IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(4):1371-1376.

Li D, Xie L, Qiao Z, Zhu J, Yao H, Qin Y, Yan Y, Chen Z, Ma F (2021) IFI16 Isoforms with Cytoplasmic and Nuclear Locations Play Differential Roles in Recognizing Invaded DNA Viruses. *The Journal of Immunology* 207(11):2699.

- Lin Y-S, Ha I, Maldonado E, Reinberg D, Green MR (1991) Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* 353(6344):569-571.
- Liu Y, Gong W, Huang CC, Herr W, Cheng X (1999) Crystal structure of the conserved core of the herpes simplex virus transcriptional regulatory protein VP16. *Genes & Development* 13:1692-1703.
- Loret S, Guay G, Lippé R (2008) Comprehensive Characterization of Extracellular Herpes Simplex Virus Type 1 Virions. *Journal of virology* 82(17):8605-8618.
- Lukashchuk V, Everett RD (2010) Regulation of ICP0-Null Mutant Herpes Simplex Virus Type 1 Infection by ND10 Components ATRX and hDaxx. *Journal of virology* 84(8):4026-4040.
- Lum KK, Howard TR, Pan C, Cristea IM (2019) Charge-Mediated Pyrin Oligomerization Nucleates Antiviral IFI16 Sensing of Herpesvirus DNA. *mBio* 10(4).
- Lymberopoulos MH, Pearson A (2007) Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363(2):397-409.
- Lymberopoulos MH, Pearson A (2010) Relocalization of Upstream Binding Factor to Viral Replication Compartments Is UL24 Independent and Follows the Onset of Herpes Simplex Virus 1 DNA Synthesis. *Journal of virology* 84(9):4810-4815.
- Ma Y, Li J, Dong H, Yang Z, Zhou L, Xu P (2022) PML Body Component Sp100A Restricts Wild-Type Herpes Simplex Virus 1 Infection. *Journal of virology* 10.1128/jvi.00279-22:e00279-00222.
- Maruzuru Y, Ichinohe T, Sato R, Miyake K, Okano T, Suzuki T, Koshihara T, Koyanagi N, Tsuda S, Watanabe M, Arii J, Kato A, Kawaguchi Y (2018) Herpes Simplex Virus 1 VP22 Inhibits AIM2-Dependent Inflammasome Activation to Enable Efficient Viral Replication. *Cell Host & Microbe* 23(2):254-265.e257.
- Melchjorsen J, Rintahaka J, Søbby S, Horan KA, Poltajainen A, Østergaard L, Paludan SR, Matikainen S (2010) Early Innate Recognition of Herpes Simplex Virus in Human Primary Macrophages Is Mediated via the MDA5/MAVS-Dependent and MDA5/MAVS/RNA Polymerase III-Independent Pathways. *Journal of virology* 84(21):11350-11358.
- Memedula S, Belmont AS (2003) Sequential Recruitment of HAT and SWI/SNF Components to Condensed Chromatin by VP16. *Current Biology* 13(3):241-246.
- Merkl PE, Knipe DM (2019) Role for a Filamentous Nuclear Assembly of IFI16, DNA, and Host Factors in Restriction of Herpesviral Infection. *mBio* 10(1).
- Ming S-L, Zhang S, Wang Q, Zeng L, Zhou L-Y, Wang M-D, Ma Y-X, Han L-Q, Zhong K, Zhu H-S, Bai Y-L, Yang G-Y, Wang J, Chu B-B (2021) Inhibition of USP14 influences alphaherpesvirus proliferation by degrading viral VP16 protein via ER stress-triggered selective autophagy. *Autophagy* 10.1080/15548627.2021.2002101:1-21.
- Mirzalieva O, Juncker M, Schwartzenburg J, Desai S (2022) ISG15 and ISGylation in Human Diseases. *Cells* 11(3):538.
- Mittler G, Stühler T, Santolin L, Uhlmann T, Kremmer E, Lottspeich F, Berti L, Meisterernst M (2003) A novel docking site on Mediator is critical for activation by VP16 in mammalian cells. *EMBO Journal* 22(24):6494-6504.
- Naldinho-Souto R, Browne H, Minson T (2006) Herpes Simplex Virus Tegument Protein VP16 Is a Component of Primary Enveloped Virions. *Journal of virology* 80(5):2582-2584.

Neely KE, Hassan AH, Wallberg AE, Steger DJ, Cairns BR, Wright AP, Workman JL (1999) Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Molecular Cell* 4(4):649-655.

O'Mahony DJ, Rothblum LI (1991) Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(8):3180-3184.

O'Mahony DJ, Smith SD, Xie W, Rothblum LI (1992) Analysis of the phosphorylation, DNA-binding and dimerization properties of the RNA polymerase I transcription factors UBF1 and UBF2. *Nucleic Acids Research* 20(6):1301-1308.

O'Sullivan AC, Sullivan GJ, McStay B (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Molecular and Cellular Biology* 22(2):657-668.

Orzalli MH, DeLuca NA, Knipe DM (2012) Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(44):E3008-E3017.

Ouellet Lavallée G, Pearson A (2015) Upstream binding factor inhibits herpes simplex virus replication. *Virology* 483:108-116.

Ouellet Lavallée G, Zhang YX, Pearson A (en révision) The herpes simplex virus protein VP16 blocks targeting of Upstream Binding Factor to incoming viral genomes.

Pan S, Liu X, Ma Y, Cao Y, He B (2018) Herpes Simplex Virus 1 γ 134.5 Protein Inhibits STING Activation That Restricts Viral Replication. *Journal of virology* 92(20):e01015-01018.

Parker ZM, Murphy AA, Leib DA (2015) Role of the DNA Sensor STING in Protection from Lethal Infection following Corneal and Intracerebral Challenge with Herpes Simplex Virus 1. *Journal of virology* 89(21):11080-11091.

Pearson A, Greenblatt J (1997) Modular organization of the E2F1 activation domain and its interaction with general transcription factors TBP and TFIID. *Oncogene* 15(22):2643-2658.

Pederson T (2011) The nucleolus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(3):a000638.

Pellett PE, Roizman B (2013) Herpesviridae. *Fields Virology*, Knipe DM, Howley PM (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 6e édition Ed. p 1802-1822.

Peri P, Mattila RK, Kantola H, Broberg E, Karttunen HS, Waris M, Vuorinen T, Hukkanen V (2008) Herpes Simplex Virus Type 1 Us3 Gene Deletion Influences Toll-like Receptor Responses in Cultured Monocytic Cells. *Virology journal* 5(1):140.

Peters GA, Khoo D, Mohr I, Sen GC (2002) Inhibition of PACT-Mediated Activation of PKR by the Herpes Simplex Virus Type 1 Us11 Protein. *Journal of virology* 76(21):11054-11064.

Pham TH, Kwon KM, Kim Y-E, Kim KK, Ahn J-H (2013) DNA Sensing-Independent Inhibition of Herpes Simplex Virus 1 Replication by DAI/ZBP1. *Journal of virology* 87(6):3076-3086.

Poddar A, Reed SC, McPhillips MG, Spindler JE, McBride AA (2009) The human papillomavirus type 8 E2 tethering protein targets the ribosomal DNA loci of host mitotic chromosomes. *Journal of virology* 83(2):640-650.

Potapova TA, Gerton JL (2019) Ribosomal DNA and the nucleolus in the context of genome organization. *Chromosome Research* 27(1-2):109-127.

Rajput P, Shukla SK, Kumar V (2015) The HBx oncoprotein of hepatitis B virus potentiates cell transformation by inducing c-Myc-dependent expression of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Virology journal* 12:62-62.

Randall RE, Dinwoodie N (1986) Intranuclear localization of herpes simplex virus immediate-early and delayed-early proteins: evidence that ICP 4 is associated with progeny virus DNA. *The Journal of general virology* 67(10):2163-2177.

Raychaudhuri S, Fontanes V, Barat B, Dasgupta A (2009) Activation of ribosomal RNA transcription by hepatitis C virus involves upstream binding factor phosphorylation via induction of cyclin D1. *Cancer research* 69(5):2057-2064.

Regier JL, Shen F, Triezenberg SJ (1993) Pattern of aromatic and hydrophobic amino acids critical for one of two subdomains of the VP16 transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(3):883-887.

Rehman S, Husain M, Yadav A, Kasinath BS, Malhotra A, Singhal PC (2012) HIV-1 promotes renal tubular epithelial cell protein synthesis: role of mTOR pathway. *PloS one* 7(1):e30071-e30071.

Roizman B, Knipe DM, Whitley RJ (2013) Herpes Simplex Viruses. *Fields Virology*, Knipe DM, Howley PM (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 6e édition p. 1823-1897.

Sánchez R, Mohr I (2007) Inhibition of Cellular 2'-5' Oligoadenylate Synthetase by the Herpes Simplex Virus Type 1 Us11 Protein. *Journal of virology* 81(7):3455-3464.

Sandbaumhüter M, Döhner K, Schipke J, Binz A, Pohlmann A, Sodeik B, Bauerfeind R (2013) Cytosolic herpes simplex virus capsids not only require binding inner tegument protein pUL36 but also pUL37 for active transport prior to secondary envelopment. *Cellular Microbiology* 15(2):248-269.

Sanij E, Diesch J, Lesmana A, Poortinga G, Hein N, Lidgerwood G, Cameron DP, Ellul J, Goodall GJ, Wong LH, Dhillon AS, Hamdane N, Rothblum LI, Pearson RB, Haviv I, Moss T, Hannan RD (2015) A novel role for the Pol I transcription factor UBTF in maintaining genome stability through the regulation of highly transcribed Pol II genes. *Genome research* 25(2):201-212.

Schilling M, Bulli L, Weigang S, Graf L, Naumann S, Patzina C, Wagner V, Bauersfeld L, Goujon C, Hengel H, Halenius A, Ruzsics Z, Schaller T, Kochs G (2018) Human MxB Protein Is a Pan-herpesvirus Restriction Factor. *Journal of virology* 92(17).

Sciortino MT, Parisi T, Siracusano G, Mastino A, Taddeo B, Roizman B (2013) The Virion Host Shutoff RNase Plays a Key Role in Blocking the Activation of Protein Kinase R in Cells Infected with Herpes Simplex Virus 1. *Journal of virology* 87(6):3271-3276.

Sen J, Liu X, Roller R, Knipe DM (2013) Herpes simplex virus US3 tegument protein inhibits Toll-like receptor 2 signaling at or before TRAF6 ubiquitination. *Virology* 439(2):65-73.

Shen G, Wang K, Wang S, Cai M, Li M-I, Zheng C, Sandri-Goldin RM (2014) Herpes Simplex Virus 1 Counteracts Viperin via Its Virion Host Shutoff Protein UL41. *Journal of virology* 88(20):12163-12166.

Sikorski TW, Joo YJ, Ficarro SB, Askenazi M, Buratowski S, Marto JA (2012) Proteomic analysis demonstrates activator- and chromatin-specific recruitment to promoters. *The Journal of biological chemistry* 287(42):35397-35408.

Sloan E, Orr A, Everett RD (2016) MORC3, a Component of PML Nuclear Bodies, Has a Role in Restricting Herpes Simplex Virus 1 and Human Cytomegalovirus. *Journal of virology* 90(19):8621-8633.

Sopta M, Carthew RW, Greenblatt J (1985) Isolation of three proteins that bind to mammalian RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* 260(18):10353-10360.

- Spector D, Purves F, Roizman B (1991) Role of alpha-transactivating factor (VP16) in the induction of alpha genes within the context of viral genomes. *Journal of virology* 65(7):3504-3513.
- Stefanovsky VY, Bazett-Jones DP, Pelletier G, Moss T (1996) The DNA supercoiling architecture induced by the transcription factor xUBF requires three of its five HMG-boxes. *Nucleic Acids Research* 24(16):3208-3215.
- Stern S, Herr W (1991) The herpes simplex virus trans-activator VP16 recognizes the Oct-1 homeo domain: evidence for a homeo domain recognition subdomain. *Genes & Development* 5(12B):2555-2566.
- Stow ND, Evans VC, Matthews DA (2009) Upstream-binding factor is sequestered into herpes simplex virus type 1 replication compartments. *The Journal of general virology* 90(Pt 1):69-73.
- Stringer KF, Ingles CJ, Greenblatt J (1990) Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature* 345(6278):783-786.
- Su C, Zhang J, Zheng C (2015) Herpes simplex virus 1 UL41 protein abrogates the antiviral activity of hZAP by degrading its mRNA. *Virology journal* 12(1):203.
- Su C, Zheng C (2017) Herpes Simplex Virus 1 Abrogates the cGAS/STING-Mediated Cytosolic DNA-Sensing Pathway via Its Virion Host Shutoff Protein, UL41. *Journal of virology* 91(6):e02414-02416.
- Sun C, Luecke S, Bodda C, Jønsson KL, Cai Y, Zhang B-C, Jensen SB, Nordentoft I, Jensen JM, Jakobsen MR, Paludan SR (2019) Cellular Requirements for Sensing and Elimination of Incoming HSV-1 DNA and Capsids. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 39(4):191-204.
- Sun H, Tu X, Prisco M, Wu A, Casiburi I, Baserga R (2003) Insulin-like growth factor I receptor signaling and nuclear translocation of insulin receptor substrates 1 and 2. *Molecular Endocrinology* 17(3):472-486.
- Taddeo B, Luo TR, Zhang W, Roizman B (2003) Activation of NF- κ B in cells productively infected with HSV-1 depends on activated protein kinase R and plays no apparent role in blocking apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(21):12408-12413.
- Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448(7152):501-505.
- Thompson RL, Preston CM, Sawtell NM (2009) De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from HSV latency in vivo. *PLoS Pathogens* 5(3):e1000352.
- Tiku V, Antebi A (2018) Nucleolar Function in Lifespan Regulation. *Trends in Cell Biology* 28(8):662-672.
- Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL (1988) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes & Development* 2(6):718-729.
- Tu X, Batta P, Innocent N, Prisco M, Casaburi I, Belletti B, Baserga R (2002) Nuclear translocation of insulin receptor substrate-1 by oncogenes and Igf-I. Effect on ribosomal RNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 277(46):44357-44365.
- Tuan JC, Zhai W, Comai L (1999) Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 19(4):2872-2879.

- Tumbar T, Sudlow G, Belmont AS (1999) Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain. *Journal of Cell Biology* 145(7):1341-1354.
- Tyack SG, Studdert MJ, Johnson MA (2006) Sequence and function of canine herpesvirus alpha-transinducing factor and its interaction with an immediate early promoter. *Virus Genes* 33(3):299-307.
- Uesugi M, Nyanguile O, Lu H, Levine Arnold J, Verdine Gregory L (1997) Induced α Helix in the VP16 Activation Domain upon Binding to a Human TAF. *Science* 277(5330):1310-1313.
- Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR, Bowie AG (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nature Immunology* 11(11):997-1004.
- Utlely RT, Ikeda K, Grant PA, Côté J, Steger DJ, Eberharter A, John S, Workman JL (1998) Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394(6692):498-502.
- van Lint AL, Murawski MR, Goodbody RE, Severa M, Fitzgerald KA, Finberg RW, Knipe DM, Kurt-Jones EA (2010) Herpes Simplex Virus Immediate-Early ICP0 Protein Inhibits Toll-Like Receptor 2-Dependent Inflammatory Responses and NF- κ B Signaling. *Journal of virology* 84(20):10802-10811.
- Van Sant C, Hagglund R, Lopez P, Roizman B (2001) The infected cell protein 0 of herpes simplex virus 1 dynamically interacts with proteasomes, binds and activates the cdc34 E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and possesses in vitro E3 ubiquitin ligase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(15):8815-8820.
- Verpooten D, Ma Y, Hou S, Yan Z, He B (2009) Control of TANK-binding Kinase 1-mediated Signaling by the γ 134.5 Protein of Herpes Simplex Virus 1*. *Journal of Biological Chemistry* 284(2):1097-1105.
- Vignali M, Steger DJ, Neely KE, Workman JL (2000) Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *EMBO Journal* 19(11):2629-2640.
- Villacís LN, Wong MS, Ferguson LL, Hein N, George AJ, Hannan KM (2018) New Roles for the Nucleolus in Health and Disease. *BioEssays* 40(5):1700233.
- Vojnic E, Mourão A, Seizl M, Simon B, Wenzek L, Larivière L, Baumli S, Baumgart K, Meisterernst M, Sattler M, Cramer P (2011) Structure and VP16 binding of the Mediator Med25 activator interaction domain. *Nature Structural & Molecular Biology* 18(4):404-409.
- Waisner H, Kalamvoki M (2019) The ICP0 Protein of Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) Downregulates Major Autophagy Adaptor Proteins Sequestosome 1 and Optineurin during the Early Stages of HSV-1 Infection. *Journal of virology* 93(21):e01258-01219.
- Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adriaenssens EM, Dempsey DM, Dutilh BE, Harrach B, Harrison RL, Hendrickson RC, Junglen S, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Nibert M, Orton RJ, Rubino L, Sabanadzovic S, Simmonds P, Smith DB, Varsani A, Zerbini FM, Davison AJ (2020) Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* 165(11):2737-2748.
- Walker S, Greaves R, O'Hare P (1993) Transcriptional activation by the acidic domain of Vmw65 requires the integrity of the domain and involves additional determinants distinct from those necessary for TFIIIB binding. *Molecular and Cellular Biology* 13(9):5233-5244.

- Wang K, Ni L, Wang S, Zheng C, Hutt-Fletcher L (2014) Herpes Simplex Virus 1 Protein Kinase US3 Hyperphosphorylates p65/RelA and Dampens NF- κ B Activation. *Journal of virology* 88(14):7941-7951.
- Wang L, Grossman SR, Kieff E (2000) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(1):430-435.
- Wang S, Wang K, Li J, Zheng C (2013) Herpes Simplex Virus 1 Ubiquitin-Specific Protease UL36 Inhibits Beta Interferon Production by Deubiquitinating TRAF3. *Journal of virology* 87(21):11851-11860.
- Wang Y, Huang L, Wang Y, Luo W, Li F, Xiao J, Qin S, Wang Z, Song X, Wang Y, Jin F, Wang Y (2020) Single-cell RNA-sequencing analysis identifies host long noncoding RNA MAMDC2-AS1 as a co-factor for HSV-1 nuclear transport. *International journal of biological sciences* 16(9):1586-1603.
- Wang Y, Wang R, Li F, Wang Y, Zhang Z, Wang Q, Ren Z, Jin F, Kitazato K, Wang Y (2018) Heat-shock protein 90 α is involved in maintaining the stability of VP16 and VP16-mediated transactivation of α genes from herpes simplex virus-1. *Molecular Medicine* 24(1):65.
- Watanabe D, Goshima F (2018) Oncolytic Virotherapy by HSV. *Human Herpesviruses*, Kawaguchi Y, Mori Y, Kimura H (Édit.) Springer Singapore, Singapore p. 63-84.
- Westdorp KN, Sand A, Moorman NJ, Terhune SS (2017) Cytomegalovirus Late Protein pUL31 Alters Pre-rRNA Expression and Nuclear Organization during Infection. *Journal of virology* 91(18).
- Whitley RJ, Roizman B (2016) Herpes Simplex Viruses. *Clinical Virology*, Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (Édit.) ASM Press, Washington, DC, 4e édition p. 415-445.
- Wu Q, Lian JB, Stein JL, Stein GS, Nickerson JA, Imbalzano AN (2017) The BRG1 ATPase of human SWI/SNF chromatin remodeling enzymes as a driver of cancer. *Epigenomics* 9(6):919-931.
- Wysocka J, Herr W (2003) The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends in Biochemical Sciences* 28(6):294-304.
- Xiao H, Pearson A, Coulombe B, Truant R, Zhang S, Regier JL, Triezenberg SJ, Reinberg D, Flores O, Ingles CJ, et al. (1994) Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Molecular and Cellular Biology* 14(10):7013-7024.
- Xing J, Ni L, Wang S, Wang K, Lin R, Zheng C (2013) Herpes Simplex Virus 1-Encoded Tegument Protein VP16 Abrogates the Production of Beta Interferon (IFN) by Inhibiting NF- κ B Activation and Blocking IFN Regulatory Factor 3 To Recruit Its Coactivator CBP. *Journal of virology* 87(17):9788-9801.
- Xing J, Wang S, Lin R, Mossman Karen L, Zheng C (2012) Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein US11 Downmodulates the RLR Signaling Pathway via Direct Interaction with RIG-I and MDA-5. *Journal of virology* 86(7):3528-3540.
- Xu H, Su C, Pearson A, Mody CH, Zheng C (2017) Herpes Simplex Virus 1 UL24 Abrogates the DNA Sensing Signal Pathway by Inhibiting NF- κ B Activation. *Journal of virology* 91(7).
- Xu Y, Yang W, Wu J, Shi Y (2002) Solution structure of the first HMG box domain in human upstream binding factor. *Biochemistry* 41(17):5415-5420.
- Yamauchi Y, Kiriya K, Kubota N, Kimura H, Usukura J, Nishiyama Y (2008) The UL14 Tegument Protein of Herpes Simplex Virus Type 1 Is Required for Efficient Nuclear Transport of the Alpha Transactivating Factor VP16 and Viral Capsids. *Journal of virology* 82(3):1094-1106.

- Yang F, DeBeaumont R, Zhou S, Näär AM (2004) The activator-recruited cofactor/Mediator coactivator subunit ARC92 is a functionally important target of the VP16 transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(8):2339-2344.
- Yang Q, Zhao J, Chen D, Wang Y (2021) E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Molecular Biomedicine* 2(1):23.
- Yang W, Xu Y, Wu J, Zeng W, Shi Y (2003) Solution Structure and DNA Binding Property of the Fifth HMG Box Domain in Comparison with the First HMG Box Domain in Human Upstream Binding Factor. *Biochemistry* 42(7):1930-1938.
- Yao X-D, Rosenthal KL (2011) Herpes simplex virus type 2 virion host shutoff protein suppresses innate dsRNA antiviral pathways in human vaginal epithelial cells. *The Journal of general virology* 92(Pt 9):1981-1993.
- You H, Zheng S, Huang Z, Lin Y, Shen Q, Zheng C, Sandri-Goldin Rozanne M (2019) Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein UL46 Inhibits TANK-Binding Kinase 1-Mediated Signaling. *mBio* 10(3):e00919-00919.
- Zamanian-Daryoush M, Mogensen TH, DiDonato JA, Williams BRG (2000) NF- κ B Activation by Double-Stranded-RNA-Activated Protein Kinase (PKR) Is Mediated through NF- κ B-Inducing Kinase and I κ B Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 20(4):1278-1290.
- Zenner HL, Mauricio R, Banting G, Crump CM (2013) Herpes Simplex Virus 1 Counteracts Tetherin Restriction via Its Virion Host Shutoff Activity. *Journal of virology* 87(24):13115-13123.
- Zhai W, Comai L (1999) A kinase activity associated with simian virus 40 large T antigen phosphorylates upstream binding factor (UBF) and promotes formation of a stable initiation complex between UBF and SL1. *Molecular and Cellular Biology* 19(4):2791-2802.
- Zhang J, Zhao J, Xu S, Li J, He S, Zeng Y, Xie L, Xie N, Liu T, Lee K, Seo GJ, Chen L, Stabell AC, Xia Z, Sawyer SL, Jung J, Huang C, Feng P (2018) Species-Specific Deamidation of cGAS by Herpes Simplex Virus UL37 Protein Facilitates Viral Replication. *Cell Host & Microbe* 24(2):234-248.e235.
- Zhu H, Joliot V, Prywes R (1994a) Role of transcription factor TFIIF in serum response factor-activated transcription. *Journal of Biological Chemistry* 269(5):3489-3497.
- Zhu Q, Courtney RJ (1994b) Chemical Cross-Linking of Virion Envelope and Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1. *Virology* 204(2):590-599.