

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**ETUDE STRUCTURE FONCTION DE LA PROTEINE CELLULAIRE
UPSTREAM BINDING FACTOR ET SON IMPACT SUR LA
REPLICATION DU HSV-1**

Par
Wiem Sleimi

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

Terence Ndonyi Bukong
Institut National de la Recherche Scientifique–Centre
Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Examineur externe

Tom Moss
Faculté de Médecine de l'Université Laval-
Département de Biologie Moléculaire, Biochimie
Médicale et Pathologie

Directrice de recherche

Angela Pearson
Institut National de la Recherche Scientifique–Centre
Armand-Frappier Santé Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Angela Pearson, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci pour votre soutien, vos conseils éclairés et votre encouragement constant tout au long de ma maîtrise.

Un chaleureux merci à mes amis de l'université, Mohamed, Gauthier, Samar, Maha, Fernando, Cherifa et Lituan, pour les moments de joie que nous avons partagés. Leur présence a été une source de réconfort, m'aidant à surmonter la solitude loin de ma famille. Je tiens également à exprimer ma gratitude envers mes amis Helmi et Mehdi pour leur encouragement continu à chaque étape de mon parcours académique.

Mes sincères remerciements vont à mes parents pour leur amour inconditionnel et leur soutien indéfectible. À mes sœurs et mon frère, mes meilleurs amis, qui, malgré la distance, ont toujours fait de leur mieux pour me soutenir émotionnellement. Mes mots ne suffisent pas à exprimer l'amour que j'ai pour vous. Merci pour votre soutien et vos encouragements, je vous dédie ce travail.

Enfin, je souhaite exprimer ma reconnaissance envers Ibrahim, qui m'a accompagné tout au long de ma maîtrise et qui a été un pilier de soutien dans les moments difficiles comme dans les moments joyeux. Merci infiniment !

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué à faire de cette aventure une expérience enrichissante.

RÉSUMÉ

Le virus herpès simplex 1 (HSV-1) est un virus enveloppé à ADN double brin. Ce virus cause typiquement des lésions orales qui se résorbent d'elles-mêmes, mais cet agent pathogène peut également induire des kératites oculaires et, dans de rares cas, des encéphalites sévères.

Dans la cellule infectée par le HSV-1, la protéine cellulaire Upstream Binding Factor (UBF) se relocalise du nucléole vers les compartiments de réplication virale. UBF est un facteur de transcription dont la principale fonction est d'activer la transcription des gènes ribosomiaux par l'ARN polymérase I. Notre laboratoire a découvert que UBF colocalise avec l'ADN viral de HSV-1 et affecte négativement sa réplication ainsi que sa transcription. Ainsi, UBF fait partie de la réponse antivirale intrinsèque de la cellule. L'hypothèse que nous avons émise est que les résidus nécessaires pour l'activité transcriptionnelle de UBF sont importants pour son activité antivirale.

L'objectif global de ce projet était d'effectuer une analyse structure-fonction de UBF afin d'identifier les acides aminés critiques pour sa fonction antivirale, en se focalisant sur des résidus qui ont été démontrés comme étant importants pour son activité transcriptionnelle.

Une stratégie de mutagenèse dirigée a été utilisée pour créer une banque de gènes *UBTF* mutés codant pour des substitutions d'acides aminés dans la protéine. Des sites de modification post-traductionnelle ont été ciblés (e.g. site de phosphorylation, site d'acétylation, site de méthylation). La mutation "E210K", associée à une maladie neurodégénérative rare, a également été testée. Nous avons généré les mutations suivantes : T201A ; S389A ; S412A ; S484A ; K232A ; K254A ; K352A et E210K, connues pour affecter l'activité transcriptionnelle d'UBF. L'expression des différentes formes d'UBF a été vérifiée par Western blot dans le cadre de transfection transitoire de la lignée épithéliale humaine HeLa.

Les formes mutées d'UBF ont été exprimées de manière ectopique dans un contexte d'infection de cellules épithéliales pour savoir si la mutation affecte la capacité inhibitrice d'UBF. La formation des compartiments de réplication virale de HSV-1 a été suivie par microscopie confocale en observant le marquage de l'ICP8, une protéine virale qui lie l'ADN simple brin.

Parmi les différentes mutations testées, seule la mutation du site d'acétylation K352 a induit une différence significative d'activité inhibitrice par rapport à l'UBF de type sauvage.

La substitution de la lysine 352 par l'alanine a maintenu la formation des compartiments de réplication virale, abolissant ainsi l'inhibition de la réplication du HSV-1 par l'UBF. Cette mutation est également associée à une réduction de la transcription des gènes ribosomiques.

Ces observations suggèrent que le site d'acétylation en position 352, essentiel pour l'activité transcriptionnelle de l'UBF, joue également un rôle crucial dans son activité antivirale.

Cette découverte contribue à une meilleure compréhension du mécanisme mis en œuvre par l'UBF pour inhiber la réplication du HSV-1. Une telle compréhension pourrait avoir des implications importantes dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre le HSV-1.

Mots clés : HSV-1 ; UBF ; réponse antivirale ; interaction hôte-virus ; High Mobility Group ; HMG

ABSTRACT

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) is an enveloped, double-stranded DNA virus. This virus typically causes self-resorbing oral lesions, but this pathogen also has the potential to induce ocular keratitis and, in rare cases, severe encephalitis.

In HSV1-1 infected cells, the cellular protein Upstream Binding Factor (UBF) relocates from the nucleolus to viral replication compartments. UBF is a transcription factor whose main function is to activate the transcription of ribosomal genes by RNA polymerase I. Our laboratory has discovered that UBF colocalizes with HSV-1 viral DNA and impairs both its transcription and replication. Thus, UBF is a component of the cell's intrinsic antiviral defense. According to our hypothesis, the residues essential for UBF's transcriptional activity are crucial for its antiviral activity.

The overall goal of this project was to conduct a structure-function analysis of UBF in order to pinpoint the amino acids necessary for its antiviral function, with a particular emphasis on residues that have been demonstrated to be important for its transcriptional activity.

A site-directed mutagenesis strategy was used to create a library of mutated *UBTF* genes encoding amino acid substitutions in the protein. Post-translation modification sites were targeted (e.g., phosphorylation site, acetylation site, methylation site). The "E210K" mutation, associated with a rare neurodegenerative disease, was also tested. We generated the following mutations: T201A; S389A; S412A; S484A; K232A; K254A; K352A and E210K, which are known to affect UBF's transcriptional activity. The expression of different UBF forms was verified by Western blot in the context of transient transfection of the human epithelial cell line HeLa.

To find out whether the mutation affects UBF's ability to suppress infection in epithelial cells, mutated forms of the protein were ectopically expressed in HeLa cells. Confocal microscopy was used to monitor the formation of HSV-1 viral replication compartments by observing ICP8 labeling, a viral protein binding single-stranded DNA.

Among the various mutations tested, only the acetylation site mutation K352 resulted in a significant difference in inhibitory activity compared to wild-type UBF. The substitution of lysine 352 with alanine preserved the formation of viral replication compartments, thus abolishing the inhibition of HSV-1 replication by UBF. This mutation is also associated with a reduction in ribosomal gene transcription.

These observations suggest that the acetylation site at position 352, crucial for UBF's transcriptional activity, also plays a crucial role in its antiviral activity.

This discovery contributes to a better understanding of the mechanism employed by UBF to inhibit HSV-1 replication. Such understanding could have significant implications in the development of new therapeutic approaches against HSV-1.

Keywords: HSV-1; herpesvirus; UBF; antiviral response; host-virus interaction; high mobility group; HMG

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
1 INTRODUCTION	1
1.1 VIRUS HERPES SIMPLEX 1	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Pathogénèse	2
1.1.3 Structure du virus HSV-1	2
1.1.4 Cycle de réplication lytique	4
1.2 LA PROTEINE CELLULAIRE UPSTREAM BINDING FACTOR	6
1.2.1 Structure et isoformes	7
1.2.1.1 Domaine de dimérisation	7
1.2.1.2 Domaine High Mobility Group	8
1.2.1.3 La région C-terminale acide	10
1.2.1.4 La variante UBF E210K	10
1.2.2 Fonctions de l'UBF	11
1.2.2.1 Facteur de transcription pour l'ARN polymérase I	11
1.2.2.2 Remodelage de la chromatine de l'ADN ribosomal	12
1.2.2.3 Régulations de la transcription par l'ARN polymérase II	12
1.2.2.4 Fonctions lors d'infections virales	13
1.2.3 Régulation de l'UBF	16
1.2.3.1 Phosphorylation	17
1.2.3.2 Méthylation	18
1.2.3.3 Acétylation	18
1.3 IMMUNITE INTRINSEQUE ANTIHERPETIQUE : DEFENSE NUCLEAIRE	20

1.3.1	Corps nucléaires ND10	20
1.3.2	Protéine 16 inductible par l'interféron Gamma IFI16	23
2	PROBLÉMATIQUE	25
3	MÉTHODOLOGIE	26
3.1	CULTURES CELLULAIRES	26
3.2	VIRUS ET INFECTIONS	26
3.3	MUTAGENESE DIRIGEE	27
3.4	TRANSFECTION DES CELLULES HELA	30
3.5	IMMUNBUVARDAGE DE TYPE WESTERN.....	30
3.6	IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE ET DETECTION PAR MICROSCOPIE CONFOCALE	31
3.7	ANALYSE STATISTIQUE	32
4	RESULTATS	33
4.1	BANQUE DE GENES <i>UBTF</i> MUTES.....	33
4.2	EXPRESSION DES FORMES MUTEES D'UBF1 DANS LES CELLULES HELA	34
4.3	IMPACT DES MUTATIONS DANS UBF1 SUR SA CAPACITE D'INHIBER LA REPLICATION DU HSV-1	36
4.4	QUANTIFICATION DE LA CAPACITE DES FORMES SUBSTITUEES D'UBF D'INHIBER LA REPLICATION DU HSV-1	41
4.5	EFFET DES MUTATIONS DU SITE D'ACETYLATION K352A D'UBF SUR SA CAPACITE D'INHIBER LA REPLICATION DU HSV-1	42
5	DISCUSSION	44
5.1	LE SITE D'ACETYLATION K352 D'UBF JOUE UN ROLE DANS SON EFFET ANTIVIRAL CONTRE LE HSV-1	44
5.2	LE ROLE POTENTIEL DE L'ACETYLATION DE L'UBF DANS LES DIFFERENTS MECANISMES ENVISAGEABLES DE L'ACTION ANTIVIRALE DE L'UBF CONTRE LE HSV-1	46
6	CONCLUSION.....	49
7	BIBLIOGRAPHIE	51

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : STRUCTURE DU HSV-1	3
FIGURE 1.2 : SCHEMA DU GENOME DU HSV-1	3
FIGURE 1.3 : SCHEMA DU CYCLE DE REPLICATION LYTIQUE DU HSV1	6
FIGURE 1.4 : REPRESENTATION DE LA STRUCTURE DES DEUX ISOFORMES D'UBF	7
FIGURE 1.5 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA PREMIERE BOITE HMG D'UBF	9
FIGURE 4.1 : PREDICTION DU MODELE 3D D'UBF1 AVEC LES SITES DES MUTATIONS	34
FIGURE 4.2 : EXPRESSION DES FORMES MUTEES DE L'UBF1 DANS DES CELLULES HELA	35
FIGURE 4.3 : IMPACT DES MUTATIONS DES SITES DE PHOSPHORYLATION DE L'UBF SUR SA CAPACITE A INHIBER LA REPLICATION DU HSV-1	37
FIGURE 4.4 : IMPACT DES MUTATIONS DES SITES DE METHYLATION DE L'UBF SUR SA CAPACITE A INHIBER LA REPLICATION DU HSV-1	38
FIGURE 4.5 : IMPACT DE LA MUTATION E210K DE L'UBF SUR SA CAPACITE A INHIBER LA REPLICATION DU HSV-1	39
FIGURE 4.6 : LA SUBSTITUTION DU SITE D'ACETYLATION K352 DE L'UBF PAR ALANINE ATTENUER SA CAPACITE A INHIBER LA REPLICATION DU HSV-1	40
FIGURE 4.7 : QUANTIFICATION DE L'EFFET DES MUTATIONS D'UBF SUR LA REPLICATION DE HSV1	42
FIGURE 4.8 : LA SUBSTITUTION DU SITE D'ACETYLATION K352 DE L'UBF PAR DE LA GLUTAMINE OU DE L'ARGININE CONSERVE SA CAPACITE A INHIBER LA REPLICATION DU HSV-1	43
FIGURE 6.1: MODELE DES MECANISMES D'ACTION ANTIVIRALE DIRECT ET INDIRECT D'UBF	50

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 3.1 : AMORCES DE MUTAGENESE	29
TABLEAU 3.2 : AMORCES UTILISEES POUR SEQUENCER LES VECTEURS D'EXPRESSION PCG ZEO MUT UBF MUTEES	29
TABLEAU 4.1 : DIFFERENTES MUTATIONS DE LA PROTEINE CELLULAIRE UBF	33

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNr	ADN ribosomal
ARNr	ARN ribosomique
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
BSA	Bovine serum albumin
CBP	CREB-binding protein
Cdk2	cyclin dependant kinase 2
CE	Core Element
CK2	Casein Kinase II
CONDBA	Childhood-Onset Neurodegeneration with Brain Atrophy
CRV	Compartiments de réplication virale
CTCF	CCTC binding factor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ETS	external transcribed spacer
EVs	extracellular vesicles
FBS	Fetal bovine serum
GAG	glycosaminoglycan
hALP	human acetyltransferase-like protein
HAT	histone acetyltransferase
HD	Huntington Disease
HDAC	Histone Désacétylase
Daxx	Death domain associated protein
HMG	High Mobility Group
HSV-1	Herpes simplex virus

IFI16	Interferon Gamma Inducible Protein 16
IRL	Internal repeat long
IRS	Internal repeat short
LEF	lymphoid enhancer factor
MOI	multiplicity of infection
NAT10	N-acétyltransférase 10
NCS	Newborn Calf Serum
ND10	Nuclear Domain 10
NLS	nuclear localisation signal
NS5A	Non structural Protein 5A
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	polyethylenimine
PFU	plaque forming unit
PIC	Transcription preinitiation complex
PKC	la protéine kinase C
PML	Promyelocytic leukemia protein
P/S	Pénicilline /streptomycine
Rb	Retinoblastoma
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIM	SUMO-interacting motif
SiRNA	Small interfering RNA
Sp100	speckled 100 kDa
TBP	TATA Binding Protein
TCF	T-cell factor
TRIM	Tripartite Ring Interaction Motif

TRL	Terminal repeat long
TRS	Terminal repeat short
UBF	Upstream Binding Factor
UBF1wt	UBF de type sauvage
UBTF	Upstream Binding Transcription Factor (gène)
UCE	Upstream Control Element
UL	Unique long
US	Unique short
Vhs	Virion host shutoff protein
VIH	virus de l'immunodéficience humain

1 INTRODUCTION

1.1 Virus herpès simplex 1

1.1.1 Taxonomie

Selon le rapport le plus récent de 2022 du Comité international de taxonomie des virus (International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV), la famille des *orthoHerpesviridae* appartient à l'ordre des *Herpesvirales* aux côtés des familles des *Alloherpesviridae* et des *Malacoherpesviridae*. Cette famille comprend entre autres neuf virus qui infectent les êtres humains et est subdivisée en trois sous-familles distinctes : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae*, et les *Gammaherpesvirinae*.

La sous-famille *Alphaherpesvirinae* comprend trois virus humains, soit les *Alphaherpesvirus humains* 1, 2 et 3. Les deux premiers sont plus couramment désignés sous les noms de Virus Herpès Simplex 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) et font partie du genre *simplexvirus*. Le troisième virus humain appartient au genre *Varicellovirus* et est communément appelé le virus Varicelle-Zona. Les virus de la sous-famille *Alphaherpesvirinae* ont généralement un cycle de réplication plus rapide que les autres virus herpès humains. La plupart d'entre eux sont des virus neurotropes qui établissent la latence dans les neurones.

Les virus humains de la sous-famille *Betaherpesvirinae* sont regroupés en deux genres. L'espèce *Betaherpesvirus* humain 5, également connue sous le nom de cytomégalovirus humain, est classée dans le genre *Cytomegalovirus*. Quant aux espèces *Betaherpesvirus* humains 6A, 6B et 7, elles appartiennent au genre des *Roseolovirus*. Les *Betaherpesvirus* sont caractérisés par un tropisme généralement restreint, à la fois en ce qui concerne l'espèce hôte et le type cellulaire. Leur cycle de réplication est lent et le virus a tendance à rester associé aux cellules.

La sous-famille *Gammaherpesvirinae* comprend le *Gammaherpesvirus* humain 4, membre du genre *Lymphocryptovirus* et mieux connu sous le nom de virus d'Epstein-Barr. Cette sous-famille comprend également le virus herpès humain de type 8, connu pour causer le sarcome de Kaposi (KSHV), et qui appartient au genre *Rhadinovirus*. Les virus de la sous-famille *Gammaherpesvirinae* présentent un tropisme lymphocytaire et sont connus pour leur potentiel oncogénique.

1.1.2 Pathogénèse

Le virus herpès simplex de type 1 est un pathogène humain très répandu. En 2016, on estimait qu'environ 3,7 milliards de personnes âgées de moins de 50 ans, soit 67% de la population mondiale, étaient séropositives pour le HSV-1 (James *et al.*, 2020).

Le HSV-1 se transmet principalement par un contact direct avec les muqueuses buccales, entraînant une infection à vie. Ce virus provoque généralement des lésions cutanées, communément appelées boutons de fièvre ou feux sauvages, qui se résorbent d'elles-mêmes. De plus, le HSV peut affecter diverses structures oculaires, entraînant un éventail de manifestations cliniques de gravité variable. La complication oculaire principale associée au HSV est la kératite, une infection de la cornée qui peut conduire à la cécité (Bagga *et al.*, 2020). Lorsque le HSV-1 envahit le système nerveux central, il peut déclencher une encéphalite rapidement progressive, nécrosante et potentiellement mortelle chez les humains. L'encéphalite herpétique présente un taux de mortalité significatif, avec entre 20% et 30% des patients décédant malgré un traitement approprié, et ce taux de mortalité augmente à 70% en l'absence de traitement (Whitley & Johnston, 2021; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

Le HSV-1 établit une latence dans le ganglion trigéminal et peut être réactivé en réponse à une variété de stimuli chimiques, physiques et biologiques, notamment le stress physique ou émotionnel, la fièvre, l'exposition aux rayons ultraviolets, les lésions tissulaires, la transplantation d'organes ou l'immunosuppression (Pires de Mello *et al.*, 2016).

1.1.3 Structure du virus HSV-1

Le HSV-1 est un virus enveloppé à ADN double brin linéaire d'environ 152 kb, comprenant plus de 80 gènes et contenu à l'intérieur d'une capsidie icosaédrique. La capsidie est composée de 162 capsomères organisés en 150 hexones, 11 pentons et 1 portail. Les hexones et les pentons sont formés par VP5, la protéine majeure de la capsidie, et sont reliés entre eux par les protéines VP23 et VP19C. Entre la capsidie et l'enveloppe, il existe une couche non structurée appelée tégument, composée de protéines cellulaires et virales essentielles pour une infection efficace. Le tégument est subdivisé en tégument interne, directement associé à la capsidie virale, et en tégument externe, associé à l'enveloppe. À la surface du virus, on trouve 12 glycoprotéines virales : gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM et gN ainsi que 3 protéines non glycosylées (UL20, UL56, US9) (figure 1.1) (Knipe *et al.*, 2021; Loret *et al.*, 2008).

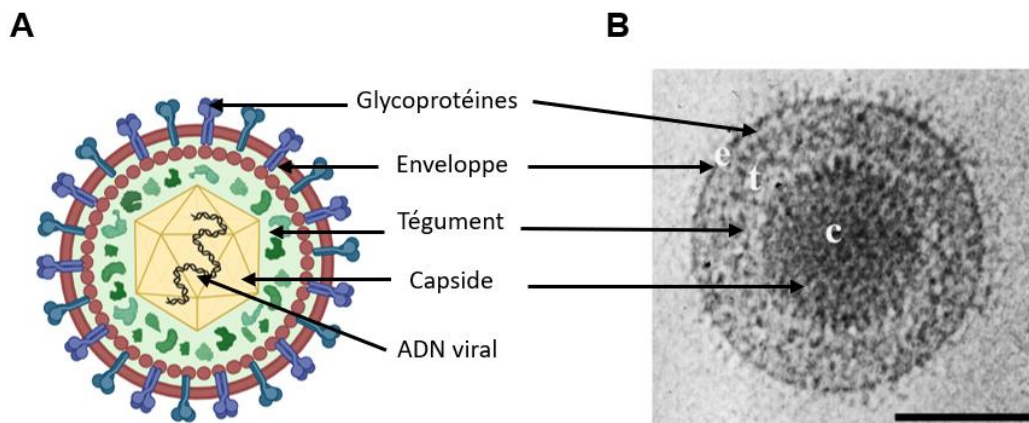


Figure 1.1 : Structure du HSV-1

(A) Le virus HSV-1 est un virus enveloppé (en rouge) à ADN double brin (en noir) avec une capside icosaédrique (en jaune) et une couche tégumentaire (en vert), formée de protéines virales et cellulaires. Le virion possède des glycoprotéines à sa surface (en bleu). Dessin réalisé à l'aide du logiciel Biorender. (B) Micrographie électronique cryogénique du virion HSV-1. Adapté de Duncan J. McGeoch et al., (2006).

Le génome du HSV-1 est constitué de deux régions distinctes, appelées région unique longue (UL) et région unique courte (US). Ces deux régions sont flanquées de séquences répétées inversées, notées RL et RS, avec les préfixes I ou T indiquant une position interne ou terminale. Ces séquences répétées inversées sont à leur tour bordées par de plus courtes séquences répétées appelées « a » et « a' ». À l'intérieur du génome du HSV-1, on trouve trois origines de réplication : oriL située dans la région UL et deux copies d'oriS présentes aux extrémités de la région US (figure 1.2) (Everett, 2014; Packard & Dembowski, 2021).



Figure 1.2 : Schéma du génome du HSV-1

La région UL est flanquée de répétitions inversées TRL et IRL (en vert) et la région US est flanquée de IRS et TRS (en violet). La région répétée a et a' est présente aux extrémités du génome ainsi qu'à la jonction entre IRL et IRS (en orange). Les trois origines de réplication (une oriL et deux oriS) sont désignées par des ovales noirs. Dessin réalisé à l'aide du logiciel Biorender.

1.1.4 Cycle de réplication lytique

L'entrée des particules de HSV-1 dans les cellules nécessite à la fois des récepteurs cellulaires à la surface de la cellule et des glycoprotéines virales dans l'enveloppe du virus. La fixation initiale à la membrane plasmique se produit par la liaison des glycoprotéines gB et de gC aux glycosaminoglycanes cellulaires (GAG). La liaison aux GAG est suivie de l'interaction de glycoprotéine gD avec plusieurs récepteurs cellulaires d'entrée dont le médiateur de l'entrée des HSV-1 (HVEM), la nectine-1 et la nectine-2, ainsi que les héparines 3-O-sulfatées (Spear, 1993). Ces interactions conduisent à la fusion des membranes virale et cellulaire, permettant ainsi l'entrée du virus. En outre, des études ont montré que l'entrée peut également se produire par endocytose, avec la fusion se produisant à l'intérieur de vésicules après l'internalisation du virus (Everett, 2014; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021).

Après la fusion, la capsid et les protéines de tégument sont libérées dans le cytoplasme. Certaines protéines tégumentaires accomplissent leurs fonctions dans le cytoplasme, comme la protéine vhs, qui induit la dégradation des ARNm, limitant ainsi les réponses antivirales nécessitant une expression génique de novo. D'autres protéines tégumentaires agissent dans le noyau, comme la protéine VP16, qui stimule la transcription des gènes viraux par l'ARN polymérase II via la transactivation. La capsid virale est transportée le long des microtubules vers l'enveloppe nucléaire. Ensuite, la capsid est désenveloppée, permettant ainsi au génome viral d'être injecté dans le nucléoplasme à travers les pores nucléaires (Everett, 2014).

Dès son entrée dans le noyau, le génome viral de forme linéaire subit une circularisation. La réplication du génome et son encapsidation se produisent dans des compartiments de réplication virale (CRVs) formés à l'intérieur du noyau. L'expression des gènes du HSV-1 suit une cascade temporelle coordonnée, se divisant en trois groupes : immédiats-précoces, précoces et tardifs. Les gènes immédiats-précoces sont les premiers à être transcrits par un processus qui utilise l'appareil transcriptionnel de l'hôte. Leur transcription est stimulée par la protéine tégumentaire virale VP16. Les produits de ces gènes favorisent la transcription des gènes précoces (E), dont plusieurs de leurs produits sont des protéines impliquées dans la réplication du génome viral. Les gènes tardifs ne sont transcrits qu'après le début de la réplication de l'ADN viral, beaucoup de leurs produits sont des protéines structurales impliquées dans l'assemblage du virus (Everett, 2014).

Le HSV-1 code pour sept protéines nécessaires à la réplication de son génome, y compris une protéine de reconnaissance de l'origine de réplication (UL9), une protéine de liaison à l'ADN simple brin (ICP8, codée par UL29), un complexe hélicase/primase tripartite (composé de

protéines codées par UL5, UL8 et UL52), ainsi qu'une ADN polymérase virale et une protéine accessoire (UL30 et UL42). La réplication du génome viral peut être initiée à trois sites différents. Tout d'abord, UL9 se lie à l'une des origines de réplication, amorçant ainsi l'ouverture de la double hélice, suivie de son association avec ICP8. Ensuite, le complexe composé d'UL9 et d'ICP8 recrute un autre complexe, l'hélicase-primase. L'hélicase (UL52) permet le déroulement de l'ADN double brin tandis que la primase (UL5) ajoute de courtes amorces d'ARN qui servent de substrat pour la synthèse d'ADN. Enfin, la polymérase UL30, assistée de son facteur de processivité UL42, entreprend la synthèse du brin complémentaire (Everett, 2014; Packard & Dembowski, 2021) Knipe et al. 2021).

L'assemblage de la capside et l'encapsidation du génome nouvellement synthétisé se produisent dans le noyau. Ensuite, la capside acquiert une enveloppe primaire en bourgeonnant à travers la membrane nucléaire interne dans l'espace péri-nucléaire. Cependant, cette enveloppe est perdue lors de la fusion avec la membrane nucléaire externe, libérant ainsi la capside dans le cytoplasme (Mettenleiter *et al.*, 2006). Après avoir quitté le noyau, la capside mature, contenant l'ADN viral, s'associe aux membranes des vésicules du Golgi. Lorsque la capside bourgeonne dans ces vésicules, le tégument et l'enveloppe, avec les glycoprotéines matures, s'assemblent autour d'elle. Enfin, ces vésicules transportent les particules du HSV-1 vers la membrane plasmique, où le virion mature est libéré de la cellule hôte par exocytose (Everett, 2014; Zhu & Viejo-Borbolla, 2021). Un résumé du cycle de réplication lytique du HSV-1 est présenté à la Figure 1.3.

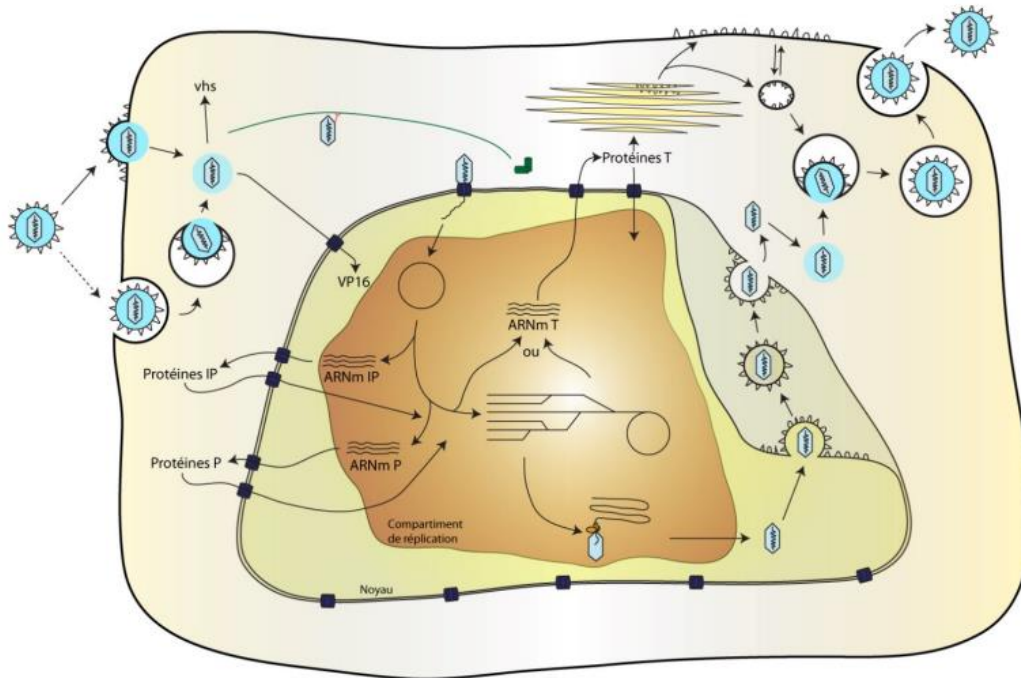


Figure 1.3 : Schéma du cycle de réplication lytique du HSV1

Le virus pénètre dans la cellule hôte, que ce soit par fusion avec la membrane plasmique ou par endocytose. Dans les deux cas, la capside et le téguent se retrouvent dans le cytoplasme. Certaines protéines du téguent ont des fonctions dans le cytoplasme, telles que la vhs, tandis que d'autres agissent dans le noyau, comme le facteur de transactivation VP16. La capside est acheminée vers le noyau via les microtubules. Le génome viral entre dans le noyau par les pores nucléaires, où il adopte une conformation circulaire. La transcription des gènes immédiats précoces (IP), précoces (P), et tardifs (T), ainsi que la réplication du génome et son encapsidation, ont lieu dans des compartiments de réplication virale formés autour du génome. La capside mature contenant de l'ADN quitte le noyau grâce à un processus d'enveloppement-désenveloppement. Dans le cytoplasme, la capside acquiert un téguent et une enveloppe avant d'être libérée de la cellule par exocytose. Figure tirée de (Bertrand,2011).

1.2 La protéine cellulaire Upstream Binding Factor

La protéine cellulaire UBF est un facteur de transcription dont la principale fonction est d'activer la transcription des gènes ribosomaux par l'ARN polymérase I. UBF se trouve dans le nucléole, une structure nucléaire non délimitée par une membrane, qui abrite la transcription de l'ADN ribosomal (ADNr) et la biogenèse des ribosomes.

Le nucléole est organisé en trois composantes distinctes, identifiables par microscopie électronique : le centre fibrillaire, entouré par le composant fibrillaire dense, qui lui-même est encadré dans le composant granulaire. UBF se localise dans la composante fibrillaire dense et à la périphérie des centres fibrillaires (Hernandez-Verdun, 2006; Hozák *et al.*, 1994; Roussel *et al.*, 1993).

1.2.1 Structure et isoformes

La structure d'UBF peut être subdivisée en trois domaines distincts : un domaine de dimérisation situé à l'extrémité N-terminale, un domaine transactivateur acide à l'extrémité C-terminale, et six boîtes HMG (High Mobility Group) intermédiaires, comme illustré dans la figure 1.4 (Justilien *et al.*, 2020).

Il existe deux isoformes d'UBF, UBF1 et UBF2, avec des poids moléculaires respectifs de 97 kDa et 94 kDa. Ces isoformes sont codés par le gène *UBTF*, localisé sur le chromosome 17q21.3 (Jones *et al.*, 1995). Leur ARNm résulte de l'épissage alternatif de l'exon 8. Notamment, UBF2 manque de 37 acides aminés dans sa deuxième boîte HMG (figure 1.4) (Hisatake *et al.*, 1991; O'Mahony & Rothblum, 1991).

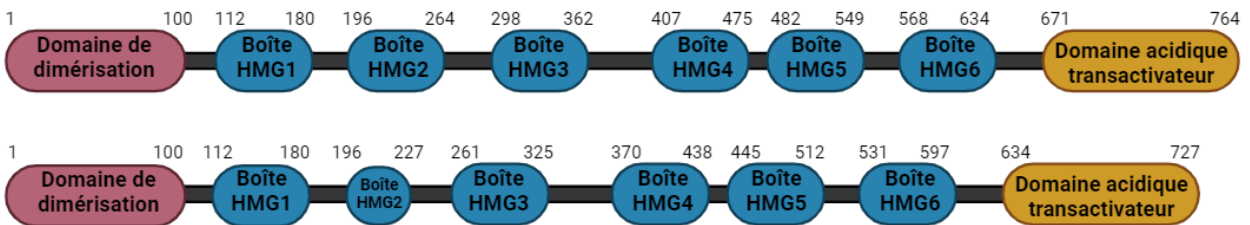


Figure 1.4 : Représentation de la structure des deux isoformes d'UBF

Le domaine de dimérisation en N-terminal est représenté par la bulle rouge. Les six domaines HMG sont représentés par les formes bleues. La queue acide en C-terminal est représentée en jaune. La position en acides aminés des différentes régions est indiquée en haut de la figure. Dessin réalisé à l'aide du logiciel Biorender.

1.2.1.1 Domaine de dimérisation

Le domaine de dimérisation d'UBF, situé à l'extrémité N-terminale, est composé d'environ une centaine d'acides aminés (McStay *et al.*, 1991). Ce domaine confère à UBF la capacité de former à la fois des homodimères et des hétérodimères (O'Mahony & Rothblum, 1991).

Ce domaine de dimérisation présente quatre régions propices à la formation d'hélices, couvrant respectivement les résidus 23S à 37L (hélice 1), 53L à 61Y (hélice 2), 65G à 81K (hélice 3) et 82F à 98H (hélice 4). De plus, une structure en boucle a été prédite pour s'étendre entre les hélices 2 et 3 (Lai *et al.*, 1996).

Des observations de leur étude montrent que la plupart des acides aminés hydrophobes et hydrophiles dans le domaine de dimérisation d'UBF sont localisés dans des régions opposées

de ces multiples hélices, soulignant le rôle crucial des interactions hydrophobes dans l'association de deux protéines UBF.

Le domaine de dimérisation est également impliqué dans l'interaction d'UBF avec la protéine CTCF. Le CTCF (CCTC binding factor) un facteur de liaison au motif CCTC, se lie en amont des promoteurs des gènes ADN_r et interagit avec le domaine de dimérisation d'UBF par le biais de ses doigts de zinc. Cette interaction favorise la liaison d'UBF aux promoteurs des gènes ribosomiaux, stimulant ainsi leur transcription (van de Nobelen *et al.*, 2010).

Outre son implication dans les interactions protéine-protéine, le domaine de dimérisation participe également aux interactions protéine-ADN. Une étude a démontré que ce domaine est indispensable pour une forte liaison d'UBF à l'ADN et pour un repliement efficace de l'ADN. En revanche, la suppression de la partie N-terminale réduit la capacité d'UBF à se lier à l'ADN (Putnam *et al.*, 1994).

1.2.1.2 Domaine High Mobility Group

L'analyse de la séquence de l'UBF humain a révélé la présence de six domaines présentant une homologie avec les protéines de la famille HMG, qui sont des protéines architecturales non histones (Bachvarov & Moss, 1991; Jantzen *et al.*, 1990). Les protéines de la famille HMG sont regroupées en trois sous-familles en fonction de leurs domaines de liaison à l'ADN : la famille HMGA contenant le domaine "AT hook" ; la famille HMGB contenant le domaine de boîte HMG ; et la famille HMGN contenant le domaine de liaison nucléosomique (Stros, 2010). Les six domaines d'UBF présentent une similitude plus marquée avec la sous-famille HMGB qu'avec les deux autres sous-familles.

Les protéines HMGB abondent dans le noyau où elles se lient à l'ADN de manière non spécifique en ce qui concerne les séquences, mais dépendent de la structure de l'ADN. Elles jouent un rôle essentiel dans la régulation de nombreuses activités cellulaires, notamment la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN (Kozlova *et al.*, 2018; Reeves, 2015). Certains membres de cette sous-famille se lient également aux acides nucléiques immunogènes et sont impliqués dans l'activation des réponses immunitaires innées médiées par les récepteurs d'acide nucléique (Yanai *et al.*, 2012).

Comme les structures connues des autres domaines HMG, les domaines HMG d'UBF adoptent une forme aplatie en L, résultant de l'intersection de trois hélices alpha. La structure tridimensionnelle des domaines un et cinq d'UBF a été établie par la RMN multidimensionnelle

(Xu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). La figure 4 présente une représentation en ruban du premier domaine HMG d'UBF.



Figure 1.5 : structure tridimensionnelle de la première boîte HMG d'UBF

La structure en solution du premier domaine HMG d'UBF humain a été étudiée par résonance magnétique nucléaire par l'équipe de Xu *et al.*, 2002.

Les domaines HMG de l'UBF jouent un rôle essentiel dans son interaction avec l'ADN. Comme plusieurs autres protéines contenant des boîtes HMG, la liaison de l'UBF à l'ADN ne semble pas dépendre d'une séquence spécifique des acides nucléiques, mais plutôt de la structure de l'ADN. En effet, la boîte HMG1 reconnaît la structure de l'ADN qui se forme lorsque deux double-hélices se croisent (Bazett-Jones *et al.*, 1994; Copenhaver *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1994). L'UBF nécessite à la fois son domaine de dimérisation et son premier domaine HMG pour se lier spécifiquement aux promoteurs des gènes ribosomiques UCE et CE, ainsi que pour induire le repliement de l'ADNr (Bazett-Jones *et al.*, 1994; Jantzen *et al.*, 1992; Putnam *et al.*, 1994; Stefanovsky *et al.*, 1996).

Il a été démontré, en utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine, que la liaison de l'UBF à l'ADN ne se limite pas aux séquences régulatrices connues, mais s'étend à travers l'ensemble de la répétition de l'ADN ribosomal humain (O'Sullivan *et al.*, 2002). Plus récemment, il a été découvert qu'UBF se lie également à une région dépourvue de nucléosomes (Nucleosome-Free Region), à travers le gène 47S ainsi que les éléments "enhancer" proches de la région 5' (Herdman *et al.*, 2017; Moss *et al.*, 2019; Tremblay *et al.*, 2022).

1.2.1.3 La région C-terminale acide

L'UBF, tout comme les autres membres du groupe des protéines à haute mobilité (HMG), possède une extrémité C-terminale acide, mais elle est deux fois plus longue que celle des autres protéines HMG. Cette queue acide de l'UBF (acides aminés 671 à 764) est constituée de deux séquences polyacides de 18 et 21 résidus composées exclusivement d'aspartate et de glutamate (acides aminés 671 à 706 et 707 à 746), ainsi que d'une région riche en sérine (acides aminés 747 à 764) (Jantzen *et al.*, 1990).

La région C-terminale acide de l'UBF joue un rôle dans le recrutement du complexe SL1 aux promoteurs de l'ADN ribosomal, ce qui est essentiel pour la transcription médiée par l'ARN polymérase I (Jantzen *et al.*, 1992; Tuan *et al.*, 1999).

Une étude a révélé que la région d'UBF qui relie la sixième boîte HMG et la queue acide agit comme un signal de localisation nucléaire (NLS). Les résultats de cette étude suggèrent qu'après la synthèse de l'UBF1 dans le cytoplasme, la région acide C-terminale s'associe fortement aux boîtes HMG 1 et 3 à 6, exposant ainsi la séquence NLS à la machinerie d'importation nucléaire. Cela favorise la localisation nucléolaire de l'UBF. De plus, l'association intramoléculaire de la région acide avec les boîtes HMG atténue leur liaison non spécifique aux gènes ribosomiques (Ueshima *et al.*, 2017).

1.2.1.4 La variante UBF E210K

Une variante hétérozygote de type faux-sens, c.628G>A, a été récemment identifiée dans le gène *UBTF* à l'aide de séquençage complet de l'exome. Cette variante entraîne la substitution de l'acide glutamique par la lysine à la position 210 (p. Glu210Lys) dans la protéine UBF. Elle a été signalée de novo chez 13 patients atteints de la CONDBA (Childhood-Onset Neurodegeneration with Brain Atrophy) une maladie caractérisée par une régression du développement touchant plusieurs domaines (moteur, social, cognitif) et une atrophie cérébrale qui survient généralement entre l'âge de 2,5 et 7 ans (Bastos *et al.*, 2020; Edvardson *et al.*, 2017; Ikeda *et al.*, 2021; Sedláčková *et al.*, 2019; Toro *et al.*, 2018).

E210 fait partie du deuxième domaine HMG et est hautement conservée au cours de l'évolution dans toutes les espèces qui possèdent *UBTF*. La mutation E210K modifie la propriété du résidu d'acide aminé d'une ionisation chargée négativement à une ionisation chargée positivement, ce qui pourrait entraîner une interaction plus forte avec l'ADNr chargé négativement.

Des expériences de CHIP-qPCR ont montré que la liaison d'UBF aux régions du promoteur de l'ADNr de l'ETS (external transcribed spacer) est significativement augmentée (3X) dans les fibroblastes de l'individu atteint par rapport aux cellules de contrôle. Cela était associé à une augmentation de l'accumulation de l'ARN ribosomique (ARNr) 18S. Cela était associé à une expression d'environ 4 fois plus élevée de l'ARNr 18S (Edvardson *et al.*, 2017).

Dans une autre étude utilisant également des fibroblastes de patients, la variante E210K d'UBTF a été associée à une augmentation de l'accumulation de pré-ARNr (>3X) et de l'ARNr 18S (>2X), ce qui est compatible avec un mécanisme de gain de fonction moléculaire (Toro *et al.*, 2018).

Les résultats de ces deux études suggèrent que la variante d'UBF portant la mutation p. Glu210Lys fonctionne comme un "facteur de transcription hyperactif", ce qui entraîne une augmentation de l'expression de l'ADN ribosomal. Contrairement à ces résultats, des expériences de ChIP-Seq menées avec des fibroblastes issus d'un modèle de souris homozygote portant la mutation E210K ont révélé une réduction significative du chargement de l'ARN polymérase I et du recrutement de SL1 et UBF1 au niveau du promoteur de l'ADNr. Cette réduction était associée à une diminution de plus de 40% du taux de synthèse du pré-ARNr 47S dans les cellules mutantes par rapport aux cellules de type sauvage, telle qu'évaluée par marquage métabolique dans ces cellules (Tremblay *et al.*, 2022).

1.2.2 Fonctions de l'UBF

1.2.2.1 Facteur de transcription pour l'ARN polymérase I

Le recrutement de l'ARN polymérase I au promoteur de l'ADN ribosomal nécessite la formation d'un complexe de pré-initiation de la transcription (PIC). Ce complexe est constitué du facteur de transcription UBF et du facteur de sélectivité (SL1) comprenant la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP) ainsi que quatre facteurs associés à TBP (TAFIA à D) (Moss *et al.*, 2007).

UBF se lie aux séquences Upstream Control Element (UCE) et Core Element (CE) de la région promotrice des gènes ribosomaux sous forme de dimère. Cette liaison d'UBF induit une nouvelle topologie transitoire du promoteur reconnue par SL1. Des expériences d'inactivation génétique de SL1 ou d'UBF ont démontré que le recrutement de ces facteurs au promoteur était interdépendant et coopératif (Moss *et al.*, 2023; Tremblay *et al.*, 2022).

Outre son interaction avec le promoteur, SL1 se lie à la queue acide C-terminale d'UBF via ses sous-unités TAFIA et TBP, ce qui stabilise l'association d'UBF avec le complexe de pré-initiation

de la transcription (Beckmann *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 2005; Jantzen *et al.*, 1992; Tuan *et al.*, 1999). Le complexe UBF/SL1 résultant permet ensuite le recrutement d'une sous-population de l'ARN polymérase I connue sous le nom de Pol I β . Le facteur RRN3 (TIF1A) associé à Pol I β lui permet d'être incorporé dans des PIC et d'initier une transcription spécifique du promoteur (Hamdane *et al.*, 2014; Herdman *et al.*, 2017; Tremblay *et al.*, 2022).

1.2.2.2 Remodelage de la chromatine de l'ADN ribosomal

L'UBF est capable de former une structure nucléoprotéique, appelée « enhancéosome », qui ressemble au nucléosome en termes de taille et de contenu en ADN. L'enhancéosome se compose d'un dimère d'UBF lié à environ 140 paires de bases d'ADN qui sont bouclées en un seul tour de 360° grâce aux trois boîtes N-terminales HMG d'UBF (Bazett-Jones *et al.*, 1994; Stefanovsky *et al.*, 1996; Stefanovsky *et al.*, 2001a).

L'UBF se lie non seulement au promoteur, mais s'étend sur la totalité de la région transcrite de la répétition de l'ADNr et, dans une moindre mesure, sur les séquences non transcrites de l'espaceur (O'Sullivan *et al.*, 2002). De ce fait, l'enhancéosome peut se former le long des gènes d'ARNr, ce qui permet à UBF de réguler l'élongation de la polymérase I en fonction de la phosphorylation de ses domaines HMG 1 et 2 (Stefanovsky *et al.*, 2006).

L'influence d'UBF sur l'ADN ne se limite pas à la formation de l'enhancéosome. En effet, UBF joue un rôle essentiel dans le maintien de l'état actif de la chromatine des gènes ribosomiaux.

Des études ont révélé que l'association directe d'UBF avec les gènes d'ARNr non méthylés favorise la formation de la chromatine r active (euchromatine) en empêchant l'assemblage de structures de chromatine d'ordre supérieur inactives sur le plan transcriptionnel, processus catalysé par l'histone de liaison H1. Les gènes d'ARNr sont soit associés à l'UBF, soit à l'histone H1 ; ces associations sont mutuellement exclusives. UBF2, qui présente une délétion dans la boîte HMG 2 réduisant sa capacité à courber et à boucler l'ADN, est incapable de remodeler la chromatine en une configuration active (Hamdane *et al.*, 2014; Sanij *et al.*, 2008).

1.2.2.3 Régulations de la transcription par l'ARN polymérase II

En plus de son rôle crucial dans la transcription des gènes ribosomiaux par l'ARN polymérase I, deux études ont révélé que UBF peut également stimuler la transcription de certains gènes par l'ARN polymérase II.

UBF2 a été identifié dans un criblage fonctionnel dans des cellules humaines comme activateur de la voie de la β -caténine. Cette voie déclenche la transcription d'une variété de gènes possédant des sites de liaison pour les facteurs LEF « lymphoid enhancer factor 1 » / TCF « T-cell factor », notamment ceux codant pour la cycline D1, c-Myc et la métalloprotéinase matricielle 7. La suppression de l'expression endogène d'UBF à l'aide d'une approche d'interférence par ARN réduit l'activation transcriptionnelle médiée par la β -caténine du promoteur du gène de la cycline D1. Cette étude a démontré que les deux isoformes d'UBF sont capables d'activer la transcription médiée par la polymérase II et d'agir en tant qu'effecteurs positifs dans la voie de la β -caténine en interagissant avec LEF-1, un facteur de transcription appartenant également à la famille HMG (Grueneberg *et al.*, 2003).

Une autre étude ultérieure a rapporté que les deux isoformes de UBF (UBF1/2) se lient à des gènes hautement exprimés transcrits par l'ARN polymérase II à travers le génome, y compris les gènes d'histones. La liaison d'UBF à ces gènes ne provoque pas le recrutement de l'ARN polymérase I. L'inhibition de l'expression d'UBF entraîne une augmentation de l'accessibilité des promoteurs d'histones à la nucléase micrococcale et une réduction de l'expression des gènes d'histones, ce qui est associé à des dommages à l'ADN et à une instabilité génomique. UBF joue donc un rôle dans le recrutement de l'ARN polymérase II vers les gènes d'histones et dans leur expression optimale, indépendamment des modifications de la chromatine ou de la présence des nucléosomes (Sanij *et al.*, 2015).

De plus, cette étude a démontré que l'isoforme UBF2, bien qu'inactif dans la régulation de la transcription de l'ADNr par rapport à UBF1 (Grummt, 1999; Hannan *et al.*, 1999; Stefanovsky & Moss, 2008) et sans fonction dans le remodelage de la chromatine au niveau de l'ADNr en l'absence d'UBF1 (Sanij *et al.*, 2008), est suffisante pour réguler l'expression des gènes de l'ARN polymérase II.

1.2.2.4 Fonctions lors d'infections virales

Certains virus oncogènes peuvent réguler positivement la biogenèse des ribosomes en modulant l'activité d'UBF lors de la transcription par l'ARN polymérase I. D'autres virus non oncogènes exploitent également les fonctionnalités d'UBF, avec, pour certains d'entre eux, une observation de changement de localisation de ce facteur de transcription.

Le papillomavirus humain

Dans le cas du papillomavirus humain 16, son oncoprotéine virale E7 interagit avec UBF, stimulant ainsi la phosphorylation de cette dernière au niveau de la sérine 388. Cette phosphorylation renforce l'interaction entre l'UBF et l'ARN polymérase I, ce qui amplifie l'activation de la transcription de l'ADNr. De plus, cette stimulation de la phosphorylation contrecarre également la fonction inhibitrice de p14ARF sur ce facteur essentiel de la transcription par l'ARN polymérase I. En effet, la protéine p14ARF peut réprimer la transcription de l'ADNr en perturbant la phosphorylation d'UBF1 (Dichamp *et al.*, 2014) et en empêchant la localisation nucléolaire du facteur de terminaison de la transcription de l'ARN polymérase I, TTF-1 (Lessard *et al.*, 2010).

Le virus de l'hépatite C

Lorsque les cellules hépatiques sont infectées par le virus de l'hépatite C, cela entraîne une augmentation significative de la synthèse de l'ARNr. L'expression de la protéine non structurale 5A (NS5A) du virus provoque l'activation simultanée de la cycline D1 et de la cdk4, ce qui conduit à la phosphorylation accrue de l'UBF au niveau du résidu de sérine 484. Cette hyperphosphorylation entraîne une activation marquée de l'UBF, déclenchant ainsi l'activation de l'ARN polymérase I (Raychaudhuri *et al.*, 2009). Cette étude repose sur l'utilisation de plasmides rapporteurs qui sont peu susceptibles de refléter l'activité de l'ADNr endogène. De plus, une étude distincte a révélé que NS5A réprime la prolifération plutôt que de l'augmenter (Arima *et al.*, 2001). En plus de la protéine NS5A, la protéine core du virus de l'hépatite C stimule également la phosphorylation des résidus de sérine de l'UBF, renforçant ainsi le recrutement de l'UBF et de l'ARN polymérase I aux promoteurs des gènes ribosomiaux (Kao *et al.*, 2004).

Le virus de l'hépatite B

L'oncoprotéine HBx du virus de l'hépatite B stimule l'expression du gène *UBTF* en favorisant le recrutement de c-Myc, un facteur de transcription crucial, au promoteur de ce gène. L'expression accrue de l'UBF entraîne une augmentation significative de la biogenèse des ribosomes, contribuant ainsi à la prolifération et à la transformation cellulaire (Rajput *et al.*, 2015).

Le virus simien 40

Le grand antigène T du virus simien 40, grâce à son activité kinase associée, accroît considérablement la phosphorylation du domaine C-terminal acide de l'UBF. Cette

phosphorylation de l'UBF favorise la formation d'un complexe protéique stable entre UBF et SL1, entraînant ainsi une augmentation de l'activité transcriptionnelle (Zhai & Comai, 1999).

Le cytomégalovirus humain

L'infection par le cytomégalovirus humain, appartenant à la sous-famille des *Betaherpesvirinae*, provoque la relocalisation de l'UBF du nucléole à une distribution diffuse dans le noyau, entraînant une réduction des niveaux de pré-ARNr. La protéine virale pUL31, exprimée lors des phases tardives de l'infection, est essentielle pour la redistribution de l'UBF sans toutefois co-localiser avec celle-ci (Westdorp *et al.*, 2017).

Le virus de l'immunodéficience humaine

Les cellules épithéliales tubulaires proximales de souris transduites par un vecteur qui code pour les gènes du VIH présentent une augmentation de l'expression de l'UBF phosphorylée par rapport aux cellules transduites avec un vecteur vide. Cette observation suggère que le VIH pourrait favoriser la transcription de l'ADNr et la biogenèse des ribosomes dans ces cellules par le biais de l'activation et de la phosphorylation de l'UBF (Rehman *et al.*, 2012).

Le poliovirus

L'infection des cellules HeLa par le virus de la poliomyélite entraîne une réduction drastique des niveaux de SL-1 et d'UBF seulement quatre heures après l'infection, ce qui conduit à une inhibition de la transcription par l'ARN polymérase I. L'étude suggère que cette baisse pourrait être due aux protéases virales du poliovirus, qui dégradent ces facteurs (Banerjee *et al.*, 2005).

L'adénovirus

Peu après l'infection par l'adénovirus, l'UBF est relocalisé du nucléole aux centres de réplication virale, en s'associant préférentiellement aux extrémités du génome viral linéaire, là où la réplication commence. Cette séquestration de l'UBF n'interfère pas avec la localisation de l'ARN polymérase I ni avec la synthèse de l'ARNr. La neutralisation de l'UBF à l'aide d'un antisérum réduit considérablement la réplication de l'ADN viral dans des conditions *in vitro*. Cela suggère que le virus pourrait exploiter l'UBF pour stimuler la réplication de son propre génome, bien que le rôle précis de l'UBF demeure à élucider (Lawrence *et al.*, 2006). Une autre étude a démontré qu'en plus de l'UBF, les protéines nucléolaires NPM1 et NCL sont également mobilisées vers les compartiments de réplication de l'ADN viral, suggérant un rôle collaboratif de ces protéines dans la régulation de la structure de la chromatine virale (Genoveso *et al.*, 2020).

Le virus herpès simplex de type 1

L'infection par HSV-1 entraîne la redistribution de protéines nucléolaires, notamment la nucléoline, la fibrillarine, la B23 et l'UBF. La nucléoline et la B23 sont dispersées de manière dépendante de la protéine virale UL24, tandis que la redistribution de la fibrillarine et de l'UBF est indépendante de l'UL24. Similairement à l'adénovirus, peu de temps après l'infection par le HSV-1 (6 hpi), la plupart de l'UBF est séquestrée dans des compartiments de réplication virale dans le noyau, tandis qu'une partie de l'UBF demeure dans le nucléole et continue de fonctionner dans la synthèse de l'ARNr (Lymeropoulos *et al.*, 2011; Lymeropoulos & Pearson, 2010; Stow *et al.*, 2009).

Une étude ultérieure a révélé que les titres de HSV-1 étaient plus élevés dans les cellules où l'expression de l'UBF avait été réduite par l'interférence ARN (siRNA). Cette diminution de l'expression de l'UBF a entraîné une augmentation progressive de la réplication de l'ADN viral, ainsi que des niveaux accrus d'ARNm et de protéines associées aux gènes immédiats précoces (ICP27) et précoces (TK) du HSV-1. Cette augmentation de l'expression des gènes s'est produite même en inhibant la réplication de l'ADN viral. Les résultats de cette étude suggèrent donc que l'UBF pourrait inhiber l'expression génique à partir de l'ADN viral avant sa réplication (Ouellet Lavallée & Pearson, 2015).

Malgré les fonctions distinctes des deux isoformes UBF1 et UBF2 dans la transcription, la surexpression ectopique de l'une ou l'autre a bloqué la formation des compartiments de réplication virale de HSV-1 dans les cellules appauvries en UBF endogène. Cette étude a également montré que l'UBF colocalise avec l'ADN du HSV-1 dans le noyau (Ouellet Lavallée *et al.*, soumis).

Contrairement à son rôle proviral lors de l'infection par l'adénovirus, UBF joue un rôle antiviral lors de l'infection par le HSV-1.

1.2.3 Régulation de l'UBF

Dans la cellule, l'UBF subit plusieurs modifications post-traductionnelles qui régulent son activité transcriptionnelle, comprenant la phosphorylation, la méthylation et l'acétylation, qui sont décrites dans cette section.

1.2.3.1 Phosphorylation

L'activation de la transcription des gènes ribosomiques chez les mammifères nécessite la phosphorylation de l'UBF. Le domaine acide C-terminal de l'UBF est phosphorylé par la caséine kinase 2 (CK2) au niveau de plusieurs résidus de sérine. Bien que ces phosphorylations dans le domaine C-terminal contribuent à l'activation transcriptionnelle, elles ne suffisent pas à elles seules (O'Mahony *et al.*, 1992; Voit *et al.*, 1995; Voit *et al.*, 1992). Cette modification post-traductionnelle joue un rôle important dans la régulation des interactions protéine-protéine entre l'UBF et le complexe SL1 (Lin *et al.*, 2006; Tuan *et al.*, 1999). L'état de phosphorylation du domaine acide de l'UBF n'affecte ni sa localisation nucléolaire ni son affinité de liaison au promoteur de l'ADN ribosomal (Tuan *et al.*, 1999; Ueshima *et al.*, 2017).

L'UBF est phosphorylée au niveau de la sérine 389 par les complexes kinase cycline-dépendante 2 (cdk2) -cycline E et cdk2-cycline A. Cette phosphorylation stimule l'activation de la transcription de l'ADNr. Des études d'interaction protéine-protéine ont révélé que la présence d'une charge négative au niveau de la sérine 389 d'UBF est nécessaire pour ses interactions avec l'ARN polymérase I et le complexe SL1. Il a été démontré également que cette phosphorylation n'affecte pas les propriétés de liaison à l'ADN de l'UBF (Lin *et al.*, 2007; Voit & Grummt, 2001).

Le résidu sérine 484 a été identifié comme une cible directe de la phosphorylation par les complexes cdk4-cycline D1 et cdk2-cycline E. La substitution de la sérine 484 par de l'alanine a un effet inhibiteur sur la transcription de l'ADNr (Voit *et al.*, 1999).

Récemment, une étude a rapporté que dans les cellules cancéreuses pulmonaires, la protéine kinase C (PKC) phosphoryle directement UBF1 au niveau de la sérine 412. Cette phosphorylation permet à l'UBF de s'associer à ECT2, un facteur d'échange de nucléotides de guanine surexprimé dans de nombreux cancers, et de le recruter vers les régions promotrices de l'ADNr. Le recrutement d'ECT2 à l'ADNr favorise une synthèse accrue d'ARNr et stimule les caractéristiques du phénotype transformé observées dans les cellules cancéreuses du poumon. De plus, l'étude a démontré que cette phosphorylation n'affecte pas la capacité d'UBF1 à se lier à l'ADNr (Justilien *et al.*, 2020).

Autres que les résidus sérine d'UBF qui sont phosphorylés, il a été montré qu'une MAP kinase ERK1/2 phosphoryle les thréonines T117 et T201 des boîtes HMG1 et 2 d'UBF. La mutation des sites ERK diminue significativement la transcription ribosomique dans les cellules (Stefanovsky *et al.*, 2001b). La phosphorylation de T117 et T201 par ERK réduit l'affinité des

boîtes HMG 1 et 2 pour l'ADNr et diminue leur capacité à le plier, conduisant ainsi à un déploiement coopératif de l'enhancéosome. Cette phosphorylation régule donc l'élongation en facilitant le passage de la polymérase à travers l'ADN de l'enhancéosome (Stefanovsky *et al.*, 2006; Stefanovsky & Moss, 2006).

En plus de jouer un rôle essentiel dans l'élongation de la transcription, le résidu T117 de l'UBF semble être crucial pour la capacité de l'UBF1 à remodeler la chromatine en une configuration active. Une étude a révélé qu'un remplacement de la thréonine 117 par de l'acide glutamique réduit considérablement la capacité de l'UBF à remodeler la chromatine (Sanij *et al.*, 2008).

1.2.3.2 Méthylation

ESET, une protéine associée à ERG avec un domaine SET, est une méthyltransférase spécifique de l'histone H3K9. Elle agit également comme un motif de signature pour les protéines impliquées dans la régulation du silençage de l'ADN méthylé (Yang *et al.*, 2002).

Il a été démontré que ESET interagit avec la deuxième boîte HMG de l'UBF, via son domaine de liaison méthyl-CpG, et triméthyle ses deux résidus lysine (K) : K232 et 254. Cette triméthylation de l'UBF augmente sa liaison à la région promotrice de l'ADNr, ce qui entraîne la condensation de la chromatine nucléolaire et, par conséquent, la répression de la transcription de l'ADNr. Les mutations des résidus lysine 232 et 254 en alanine (A), glutamine (Q) ou arginine (R) ont bloqué la triméthylation de l'UBF, rétablissant ainsi l'activité transcriptionnelle de gènes ribosomiaux (Hwang *et al.*, 2014).

Il a été constaté que les niveaux de la protéine ESET et d'UBF méthylé étaient considérablement accrus chez les patients atteints de la maladie de Huntington (HD). Les conclusions de cette étude suggèrent que l'augmentation de la méthylation de l'UBF est associée à une régulation à la baisse de la transcription ribosomique, contribuant ainsi à la dysfonction striatale et à la neurodégénérescence observées dans la maladie de Huntington (Hwang *et al.*, 2014).

1.2.3.3 Acétylation

Outre la phosphorylation et la méthylation, l'acétylation joue un rôle essentiel dans la fonction d'UBF lors de la transcription de l'ADNr.

Une étude a révélé que la protéine CBP (CREB-binding protein) possède une activité histone acétyltransférase (HAT) intrinsèque qui lui permet d'acétyler UBF. Cette acétylation d'UBF est

nécessaire pour activer la transcription ribosomique, sans toutefois affecter sa capacité de liaison au promoteur de l'ADNr. De plus, la protéine du rétinoblastome (Rb) inhibe l'activation de la transcription ribosomique en interagissant avec l'UBF et en recrutant l'histone désacétylase 1 (HDAC1), entraînant ainsi la désacétylation de l'UBF (Pelletier *et al.*, 2000).

Une autre étude a démontré que l'acétylation de l'UBF stimule son interaction avec PAF53, une sous-unité de l'ARN polymérase I, facilitant ainsi le recrutement de Pol I au promoteur de l'ADNr et la formation du complexe d'initiation de la transcription. En surexprimant HDAC1 dans les cellules, le niveau de Pol I associé à l'ADNr et la synthèse de pré-ARNr étaient réduits (Meraner *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que la transcription de l'ADNr est régulée par deux processus opposés : l'acétylation et la désacétylation de l'UBF.

La maladie de Huntington (HD) est un trouble génétique mortel caractérisé par un trio de symptômes cliniques comprenant la chorée, la détresse émotionnelle et le déclin cognitif. La mutation génétique associée à la maladie de Huntington implique une expansion de répétitions de CAG codant pour la glutamine (Q) dans le gène de la huntingtine (*htt*). Il a été démontré que les répétitions polyQ dans mHtt interagissent physiquement avec CBP, inhibant ainsi son activité intrinsèque HAT et sa fonction de coactivateur transcriptionnel (Steffan *et al.*, 2001). Cela perturbe l'acétylation d'UBF1 par CBP, ce qui entraîne une répression significative de la transcription de l'ADNr dans les modèles cellulaires et animaux de la maladie de Huntington (Lee *et al.*, 2011). Cette étude met en évidence que le CBP acétyle l'UBF1 au niveau de la lysine K352, située dans le domaine HMG3, afin d'améliorer l'activité transcriptionnelle de l'ADNr. Les mutations de k352 en alanine (A), glutamine (Q) et arginine (R) ont inhibé l'acétylation de l'UBF1 ainsi que l'activation transcriptionnelle de l'ADNr (Lee *et al.*, 2011).

Il été découvert que la protéine Tip60 est recrutée au promoteur de l'ADNr, où elle colocalise avec UBF et l'acétyle grâce à son activité HAT. Cette acétylation augmente la transcription des gènes ribosomiaux (Halkidou *et al.*, 2004).

Une autre protéine acétyltransférase, hALP (human acetyltransferase-like protein), également connue sous le nom de NAT10 (N-acétyltransférase 10), interagit avec UBF et l'acétyle grâce à son activité HAT. L'acétylation de l'UBF par hALP favorise le recrutement de PAF 53 vers le promoteur d'ADNr pour activer la transcription de Pol I (Kong *et al.*, 2011).

Les conclusions tirées de diverses études indiquent que l'UBF est acétylé par différentes acétyltransférases, et que son acétylation n'influence pas son interaction avec le promoteur de l'ADNr, mais favorise plutôt son association avec la protéine PAF53.

1.3 Immunité intrinsèque antiherpétique : défense nucléaire

Dès son entrée dans la cellule, le virus HSV-1 fait face à divers mécanismes intrinsèques de l'hôte qui représentent la première ligne de défense intracellulaire contre l'infection. L'emphase de cette section est mise sur les facteurs nucléaires servant de restriction pour la réplication et la propagation de HSV-1.

1.3.1 Corps nucléaires ND10

Les corps nucléaires ND10 (Nuclear Domain 10), également appelés corps nucléaires PML (leucémie promyélocytaire) ou domaines oncogènes PML, sont des structures dynamiques présentes dans les noyaux, avec environ 1 à 30 ND10 par noyau (Gu & Zheng, 2016). Les ND10 sont composés de plus de 150 protéines associées de manière permanente ou transitoire (Alandijany, 2019; Van Damme *et al.*, 2010).

Parmi les composants constants des ND10, on trouve TRIM19 (Tripartite Ring Interaction Motif) ou la protéine de leucémie promyélocytaire (PML), Sp100 (speckled 100 kDa), Daxx (death domain associated protein), MORC3, et ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked) (Alandijany, 2019; Xu *et al.*, 2016).

Les protéines constitutives des ND10 sont impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires, tels que le cycle cellulaire, la réponse aux dommages de l'ADN, la réparation de l'ADN, et l'apoptose (Hsu & Kao, 2018).

Lors de l'infection par le HSV-1, les composants des ND10 se dirigent vers les complexes viraux dans le noyau, où ils s'associent au génome viral et forment de nouveaux corps ND10 autour de celui-ci (Everett & Murray, 2005; Everett & Zafirooulos, 2004).

ICP0, une protéine immédiate précoce du HSV-1, est une ligase ubiquitine E3 qui induit la dégradation de plusieurs protéines cellulaires. ICP0 interagit de manière dynamique avec les corps nucléaires ND10 et provoque la dégradation de leurs deux principaux organisateurs, PML et Sp100, entraînant ainsi la dispersion subséquente des corps ND10 (Chelbi-Alix & de Thé, 1999; Everett *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 2013; Maul *et al.*, 1993).

Les mutants du HSV-1, qui n'expriment pas la protéine virale ICP0, présentent un défaut prononcé dans l'expression génique virale et la formation des plages de lyse. Le knock-down individuel ou combiné des protéines des corps nucléaires ND10 (PML, SP100, Daxx, ATRX, ou MORC3) par des ARN interférents améliore significativement l'efficacité de formation de

plaques et l'expression des protéines virales de ces mutants (Everett *et al.*, 2008; Everett *et al.*, 2006; Lukashchuk & Everett, 2010; Sloan *et al.*, 2016).

La protéine Sp100

Le gène *Sp100* produit quatre isoformes par le biais de l'épissage alternatif : Sp100A, Sp100B, Sp100C et Sp100HMG. Des études ont montré que tôt après l'infection par le HSV-1, les isoformes B, C et HMG de Sp100, mais pas Sp100A, inhibent efficacement la transcription à partir du promoteur ICP0. Il a également été démontré que toutes les isoformes de Sp100 protègent PML de la dégradation par ICP0 (Negorev *et al.*, 2006; Negorev *et al.*, 2009).

La formation des compartiments de réplication virale de HSV-1 est améliorée en l'absence de SP100 (Xu & Roizman, 2017). Une étude récente a mis en évidence que la Sp100A entrave la réplication du HSV-1 de type sauvage de manière indépendante de PML. Au cours de cette recherche, l'isoforme Sp100A a été repérée dans le cytosol. À la suite de l'infection par le HSV-1, le Sp100 nucléaire subit une dégradation peu de temps après l'entrée nucléaire de l'ICP0, tandis que le Sp100A cytosolique demeure stable et est libéré dans l'espace extracellulaire via des vésicules extracellulaires (EVs). La protéine Sp100A associée aux EVs restreint la réplication du HSV-1 dans les cellules réceptrices (Ma *et al.*, 2022).

ATRX et Daxx

Les protéines ATRX et Daxx forment un complexe chaperon d'histones qui recrute la variante non canonique d'histone H3.3 aux télomères (Lewis *et al.*, 2010). Daxx interagit physiquement avec des protéines associées à la chromatine, telles que l'histone déacétylase II (HDAC II), et a été impliqué dans la régulation épigénétique de l'expression génique (Hollenbach *et al.*, 2002).

15 minutes après l'infection, les protéines ATRX et Daxx colocalisent avec l'ADN viral. La déplétion d'ATRX entraîne une augmentation de la réplication et la transcription de l'ADN du HSV dépourvu d'ICP0 et favorise la suppression de l'hétérochromatine. ATRX et Daxx en tant que complexe, contribuent à la résistance antivirale intrinsèque à l'infection par le HSV-1, ce qui est contrecarré par ICP0 (Cabral *et al.*, 2018; Lukashchuk & Everett, 2010).

Malgré l'association précoce d'ATRX avec l'ADN viral et sa capacité à restreindre l'expression génique et la réplication du HSV, le complexe ATRX/Daxx n'est pas strictement nécessaire pour le dépôt initial de l'H3 sur l'ADN viral entrant. En revanche, il a été démontré que ATRX est important pour la rétention de l'H3 sur le génome viral, limitant ainsi l'accessibilité de l'ADN viral pendant l'infection. En limitant l'accessibilité du génome du HSV, ATRX pourrait efficacement retarder la progression de l'infection virale et réduire les niveaux d'expression génique virale. Le

complexe ATRX/Daxx est nécessaire pour le maintien de l'hétérochromatine sur l'ADN viral (Cabral *et al.*, 2021; Cabral *et al.*, 2018; Knipe *et al.*, 2021).

PML

PML est un membre de la famille de protéines TRIM. Le gène *PML* code pour sept isoformes majeures qui se ressemblent à l'extrémité N-terminale, mais qui diffèrent considérablement dans leur extrémité C-terminale (Jensen *et al.*, 2001). La protéine PML est essentielle pour le recrutement de composants et l'assemblage des corps ND10 (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2016).

Peu après l'infection par HSV-1, la protéine PML est recrutée vers le génome viral. Dans les cellules infectées par le mutant HSV-1 qui n'exprime pas ICP0, la protéine PML est capable d'inhiber la réplication et l'expression génique du HSV-1 d'une façon indépendante de Sp100 et Daxx (Boutell & Everett, 2013; Glass & Everett, 2013).

PML subit plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la SUMOylation, acétylation, ubiquitination, et phosphorylation, qui sont essentielles pour l'activité de PML et sa capacité à former des ND10 (Cheng & Kao, 2012; Sternsdorf *et al.*, 1997). Ces modifications post-traductionnelles influencent également la capacité de PML à répondre à l'infection par le HSV-1. Le recrutement de PML aux génomes viraux se fait de manière dépendante de sa SUMOylation, et les formes qui ne peuvent pas être SUMOylées ne parviennent pas à s'associer à l'ADN viral (Cuchet *et al.*, 2011; Everett *et al.*, 2013).

Une autre étude a montré que la SUMOylation de PML-II, -III, -IV, -V, et -VI est nécessaire pour leur interaction avec ICP0, tandis que PML-I a la capacité d'interagir avec ICP0 de manière indépendante de la SUMOylation grâce à une région unique dans la partie C-terminale (Cuchet-Lourenço *et al.*, 2012).

Autre que la SUMOylation, la phosphorylation de PML-I est dispensable pour la formation des ND10 et la colocalisation entre PML-I et la protéine régulatrice du HSV-1, ICP0. La mutation des sites de phosphorylation de PML-1 près de son domaine SIM (SUMO-interacting motif) empêche son recrutement sur les génomes viraux entrants (Smith *et al.*, 2014).

Le mécanisme détaillé de la restriction par PML n'a pas été défini, mais il a été démontré que PML augmente le chargement de l'hétérochromatine de l'histone H3.3 et favorise le maintien de la stabilité de l'hétérochromatine, notamment H3K9me3 et H3K27me3, sur le génome du virus HSV-1 qui n'exprime pas ICP0 (Cabral *et al.*, 2018; Knipe *et al.*, 2021).

De manière intéressante, des recherches suggèrent que PML possède à la fois des propriétés antivirales et provirales dans l'infection par le HSV. Il a été démontré que, à faible multiplicité d'infection, PML peut favoriser la réplication du HSV. Une étude a suggéré qu'une fonction liée à la protéine PML est nécessaire pour la formation des compartiments de réplication de HSV-1 et la réplication de son ADN viral (Merkl *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2016).

1.3.2 Protéine 16 inductible par l'interféron Gamma IFI16

La protéine inductible par l'interféron gamma 16 (IFI16) appartient à la famille des protéines PYHIN et contient d'un domaine pyrin N-terminal, qui médie les interactions protéine-protéine, et de deux domaines HIN C-terminaux, qui confèrent une capacité de liaison à l'ADN double brin (dsDNA) non spécifique de séquence (Jin *et al.*, 2012; Knipe *et al.*, 2021; Unterholzner *et al.*, 2010).

IFI16 a été initialement identifiée comme une protéine de liaison à l'ADN cytosolique (Unterholzner *et al.*, 2010), mais une autre étude a montré que sa localisation peut être nucléaire ou cytoplasmique en fonction du type cellulaire (Choubey *et al.*, 2008).

IFI16 s'associe rapidement à l'ADN herpétique suivant son entrée dans le noyau (Cabral *et al.*, 2018; Everett, 2016). Des études utilisant la microscopie confocale montrent que cette association est médiée par l'oligomérisation d'IFI16 à proximité des génomes viraux (Alandijany *et al.*, 2018; Lum *et al.*, 2019).

La déplétion d'IFI16 entraîne une augmentation de la réplication et de l'expression génique du HSV-1 dépourvu d'ICP0 (Orzalli *et al.*, 2013), tandis que la surexpression ou l'induction d'IFI16 par l'interféron gamma conduit à une restriction de la réplication et de l'expression génique du HSV-1 de type sauvage (Johnson *et al.*, 2014; Sodroski & Knipe, 2023). Comme pour les protéines PML et Sp100, il a été montré que, suite à l'infection par le HSV-1, IFI16 est dégradé par la protéine virale ICP0 (Orzalli *et al.*, 2012).

Bien qu'IFI16 ait été observé en colocalisation avec PML et ATRX sur les génomes viraux entrants (Everett, 2016; Orzalli *et al.*, 2013), IFI16 restreint l'expression génique à la fois des génomes viraux entrants et répliqués par des mécanismes indépendants des protéines ND10 (Merkl *et al.*, 2018).

Des études ont révélé que IFI16 favorise l'établissement et le maintien de l'hétérochromatine répressive sur le génome viral, ce qui le rend ainsi épigénétiquement silencieux (Johnson *et al.*, 2014; Merkl & Knipe, 2019; Sodroski & Knipe, 2023).

Une autre recherche démontre que, dans les cellules infectées par une souche mutante du HSV-1 déficiente en ICP0, IFI16 génère des structures filamenteuses au sein d'un sous-ensemble des compartiments de réplication virale. De petites structures filamenteuses d'IFI16 commencent à apparaître dès 4 heures post-infection, formant un réseau filamenteux large et dense d'IFI16 à 6 heures post-infection. Des expériences en présence d'acide phosphonoacétique (PAA) montrent que la formation de ces filaments nécessite la réplication de l'ADN viral. Les protéines PML, Sp100 et ATRX colocalisent au sein des filaments dans les CRVs. Il a été démontré que les filaments d'IFI16 atténuent l'association de l'ARN polymérase II avec les génomes viraux, limitant ainsi l'expression génique virale (Merkl & Knipe, 2019).

2 PROBLÉMATIQUE

Suite à l'infection par le HSV-1, la protéine cellulaire UBF subit une relocalisation depuis les nucléoles vers les compartiments de réplication virale, comme démontré dans des études antérieures (Lymberopoulos & Pearson, 2010).

Des résultats de notre laboratoire ont montré que l'inhibition de l'expression d'UBF1 par interférence à ARN entraîne une augmentation significative de la production de virions ainsi qu'une augmentation de la transcription des gènes viraux immédiats-précoces et précoces (Ouellet Lavallée & Pearson, 2015). Par ailleurs, nous avons constaté que la surexpression de UBF par transfection transitoire entraîne une inhibition de la formation des compartiments de réplication virale (Ouellet Lavallée *et al.*, soumis). Cette inhibition est spécifique à UBF, car la transfection d'un vecteur témoin exprimant la protéine mCherry n'a pas eu cet effet inhibiteur. Ces résultats indiquent que l'effet inhibiteur observé après la transfection d'un vecteur exprimant UBF n'est pas le résultat d'une réponse de l'immunité innée à l'ADN transféré (Ouellet Lavallée *et al.*, soumis). Notre laboratoire a également observé que UBF colocalise avec le génome viral entrant (Ouellet Lavallée *et al.*, soumis).

Étant donné qu'UBF semble avoir un effet antiviral contre le HSV-1 en colocalisant avec le génome viral et en influençant sa transcription, nous avons formulé l'hypothèse que les résidus d'UBF essentiels à sa fonction transcriptionnelle pourraient également être cruciaux pour son rôle antiviral.

Afin de mettre à l'épreuve cette hypothèse, nous avons suivi une approche en deux étapes. Tout d'abord, nous avons constitué une bibliothèque de gènes UBTF mutés en nous concentrant spécifiquement sur les sites critiques d'UBF impliqués dans la transcription par ARN polymérase I, tels qu'identifiés dans la littérature scientifique. Ensuite, nous avons évalué l'impact de la surexpression des différentes formes d'UBF sur la réplication du HSV-1 en culture cellulaire.

3 MÉTHODOLOGIE

3.1 Cultures cellulaires

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour ce projet :

Les cellules d'Henrietta Lacks (HeLa) sont des cellules épithéliales humaines provenant d'un cancer du col de l'utérus. Le milieu de culture utilisé est le DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenant 8 % de sérum de veau fœtal, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de pénicilline / streptomycine (P/S).

Les cellules Vero sont des cellules épithéliales reinales extraites d'un singe vert africain. Elles ont été cultivées dans du DMEM contenant 5 % de sérum NCS (Newborn Calf Serum), 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine (P/S).

À chaque fois que les cellules atteignent 90 % de confluence, un passage cellulaire est effectué de la manière suivante : le milieu de culture est aspiré et les cellules sont lavées avec du PBS (phosphate buffered saline). Ensuite, l'enzyme trypsine est utilisée pour dissocier les cellules de la surface du récipient de culture et des autres cellules. La trypsine est neutralisée par l'ajout d'un volume égal de milieu de culture. Les cellules sont concentrées par centrifugation, puis re-suspendues dans le milieu de culture. Enfin, un huitième du volume est utilisé pour le passage des cellules HeLa, et un dixième du volume est utilisé pour les cellules Vero. Les cellules de passage sont replacées dans le milieu de culture puis cultivées dans un incubateur à 37 °C avec 5 % de CO₂.

3.2 Virus et infections

La souche virale KOS de HSV-1 a été initialement fournie par Donald M. Coen de la faculté de médecine de l'université Harvard. Des stocks ont été produits et titrés sur des cellules Vero.

Les infections ont été réalisées en diluant dans du DMEM contenant 2 % de FBS (fetal bovine serum) et P/S la quantité requise de particules infectieuses, ou PFU (*plaque forming unit*), selon la MOI (multiplicity of infection) requise. Un volume de 150 µl de ce milieu a été ajouté à chaque puits pour les plaques de 24 puits, et elles ont été agitées toutes les 15 minutes pendant une heure. Ensuite le milieu d'infection a été remplacé par 1 ml de milieu de culture DMEM 8% FBS.

Détermination des titres viraux

Pour déterminer le titre viral d'un stock de virus déjà préparé, un essai de plaques de lyse a été réalisé. Pour cela, 3×10^5 cellules HeLa ont étéensemencées dans chaque puits d'une plaque à 12 puits avec du DMEM contenant 5 % de NCS et P/S. 24 heures après l'ensemencement, la monocouche cellulaire confluente a été infectée avec une dilution en série de 10^{-1} à 10^{-8} de la souche virale KOS en duplicata. La dilution a été faite avec du DMEM contenant 2 % de NCS et P/S.

Une heure après l'infection, les cellules ont été recouvertes de DMEM contenant 2 % de NCS et 0,33 % de méthylcellulose, puis incubées à 37°C avec 5 % de CO₂.

Trois jours post-infection, les cellules ont été fixées avec 1 ml de solution de fixation (ratio de méthanol : acide acétique de 3 :1) pendant une heure, puis colorées avec 1 ml de solution du cristal violet. Les plaques ont été rincées, et les plages de lyse ont été visualisées et comptées à l'aide d'un stéréoscope Nikon SMZ800. Les titres viraux sont exprimés en unité formatrice de plaque par ml (PFU/ml).

La détermination des titres viraux a été effectuée sur des cellules Vero. Ces cellules ne peuvent pas exprimer l'interféron protéique antiviral en raison de leurs défauts génétiques inhérents et sont donc plus susceptibles aux infections.

3.3 Mutagenèse dirigée

La banque de gènes *UBTF* mutés a été générée par mutagenèse dirigée. Pour créer une version mutée d'UBF1, deux segments de l'ORF d'UBF ont été amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant le plasmide pCG zeo mut-UBF1-res (Ouellet Lavallée *et al.*, soumis) comme matrice, des amorces contenant la mutation souhaitée (tableau1.3), et l'enzyme Q5 polymérase (New England Biolabs M0491S) ou bien l'enzyme PFU polymérase (Bio BASIC B0093).

La taille des fragments amplifiés par PCR a été vérifiée en migrant un dixième du volume total de produit PCR par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 % à 95 V pendant 50 min. Le reste du volume du produit PCR a été purifié avec un kit PCR *clean-up* (Macherey-Nagel 740609.50) puis dosé avec le NanoDrop (Thermo Scientific ND-ONE-W).

Le vecteur pCG zeo mut, un vecteur d'expression transitoire, a été linéarisé par double digestion avec les enzymes de restriction BamHI (NEB R0136S) et XbaI (NEB R0145S) dans le

tampon CutSmart (NEB B7204S) pendant 1h30 à 37 °C. Puis, la digestion a été vérifiée en migrant le produit de digestion sur un gel d'agarose 1 % à 80 V pendant 40 min, et le reste du produit de digestion a été purifié avec un kit (Macherey-Nagel 740609.50).

Les segments d'UBF ont été conçus pour contenir des extrémités qui se chevauchent, lesquelles ont ensuite été réassemblées dans le vecteur d'expression de mammifère au ratio 2 :1 à 50°C pendant 30 min à l'aide du kit d'assemblage d'ADN NEBuilder HiFi (cat # E2621S).

Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries compétentes E.coli DH5α et les bactéries transformées ont été sélectionnées sur des géloses LB-ampicilline.

Cinq à dix colonies positives ont été inoculées dans du milieu LB avec 50 µg/ml d'ampicilline, puis les plasmides ont été purifiés par miniprep (Omega D6942-02).

Les plasmides purifiés ont été doublement digérés toute une nuit à 37 °C avec les enzymes de restriction HindIII (NEB R0104L) et AflII (NEB R0520S) en présence du tampon R2.1 (NEB B7202S) pour vérifier la présence de l'insert.

Le produit de la digestion a été migré sur un gel d'agarose 1 % à 80 V pendant 40 min. Les clones positifs (pCGzeo mut-UBF mutée), qui ont montré deux bandes de 1200 paires de bases et de 6400 paires de bases, ont été envoyés au Centre d'expertise et de service Génome Québec pour confirmer la présence de la mutation désirée et l'absence d'autres mutations par séquençage de Sanger (Tableau 3.2).

Tableau 3.1 : Amorces de mutagenèse

Site		Amorces
T201A	1	F :5'-CTATAGGGCGAATTCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGC-3' R :5'-CTGCTGGGGGGCTTTGGGCTTCTCTGGGATGTCCG-3'
	2	F :5'-GCCCAAAGCCCCCAGCAGCTGTGGTACACC-3' R :5'-GCAGGTTTAAACAGTCGACTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTC-3'
S389A	1	F :5'-CTATAGGGCGAATTCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGC-3' R :5'-TGGAGGCGGGGGCGGTGGCCTGCTTCTTGTGATGTTTCAGC-3'
	2	F :5'-GGCCACC GCCCCCGCTCCAAGAAGCAGCCC-3' R :5'-GCAGGTTTAAACAGTCGACTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTC-3'
S412A	1	F :5'-CTATAGGGCGAATTCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGC-3' R :5'-CATGGCCGCCACGGGCCGCTTGGGCTTCTC-3'
	2	F :5'-CGGCCCGTGGCGGCCATGTTTCATCTTCTC-3' R :5'-GCAGGTTTAAACAGTCGACTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTC-3'
S484A	1	F :5'-CTATAGGGCGAATTCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGC-3' R :5'-CAGCTCTTTTGGGGCCTCGGGCAGCTTGCCC-3'
	2	F :5'-CCGAGGCCCCAAAAGAGCTGAGGAGATCTGGC-3' R :5'-GCAGGTTTAAACAGTCGACTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTC-3'
E210K	1	F :5'-CTATAGGGCGAATTCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGC-3' R :5'-AGATACACCTTCTTCTGTGGGTGTACCACAGCTGCTGG-3'
	2	F :5'-CACCCACAAGAAGAAGGTGTATCTCAAAGTGC GGCCAG-3' R :5'-GCAGGTTTAAACAGTCGACTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTC-3'
K352A	1	F :5'-CTATAGGGCGAATTCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGC-3' R :5'-CCACCTCGTAATCTGCCTTTTTCTGATCACACTTCTTGTGATAGGCG-3'
	2	F :5'-CAGAAAAAGGCAGATTACGAGGTGGAGCTGCTCCGTTTCCTCG-3' R :5'-GCAGGTTTAAACAGTCGACTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTC-3'
K352R	1	F :5'-CTATAGGGCGAATTCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGC-3' R :5'-CCACCTCGTAATCTCTCTTTTTCTGATCACACTTCTTGTGATAGGCG
	2	F :5'-CAGAAAAAGAGAGATTACGAGGTGGAGCTGCTCCGTTTCCTCG-3' R :5'-GCAGGTTTAAACAGTCGACTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTC-3'
K352Q	1	F :5'-CTATAGGGCGAATTCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGC-3' R :5'-CCACCTCGTAATCTTGTCTTTTTCTGATCACACTTCTTGTGATAGGCG-3'
	2	F :5'-CAGAAAAAGCAAGATTACGAGGTGGAGCTGCTCCGTTTCCTCG-3' R :5'-GCAGGTTTAAACAGTCGACTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTC-3'

Tableau 3.2 : Amorces utilisées pour séquencer les vecteurs d'expression pCG zeo mut UBF mutées

	Séquence 5'-3'	Position
Seq UBF F1	CCCCTTATTTCCGCTTCTTC	350
Seq UBF F2	AGCGGAAGGAGTACGAGGAG	756
Seq UBF F3	CAAGAAGCAGGCCACCAG	1150
Seq UBF F4	TGACCTGGAATAACATGGAAAA	1551
Seq UBF F5	CCAATAAACGTAAGAGCATGACC	1950
Seq pCG F6	TTCCTACAGCTCCTGGGCAA	-----
Seq UBF R1	TCTGGACAGAATCTTGGTTA	455
Seq UBF R2	GTGAGGGTGGACTTGGTGAT	849
Seq UBF R3	AGATGAACATGGCCGACAC	1250
Seq UBF R4	CCGCATCTCACTCAGCTCTC	1648
Seq UBF R5	TCATCATCCTCCTCGGACTC	2046
Seq pCG R6	GAAGCTTCCAGAGGAAGTGC	-----

3.4 Transfection des cellules HeLa

Pour valider l'expression des formes mutées d'UBF, des cellules HeLa ont été transfectées avec les vecteurs pCG zeo mut-UBF mutée. Pour ce faire, des plaques à 6 puits ont étéensemencées avec 1.4×10^5 de cellules HeLa dans du DMEM avec 8 % FBS et P/S par puits.

Vingt-quatre heures post-ensemencement (60-70 % de confluence), les cellules ont été lavées avec du tampon PBS, puis transfectées de manière transitoire avec 1 μ g par puits de vecteur d'expression en utilisant l'agent de transfection PEI (polyéthylèneimine) (Sigma 408727) d'une concentration 1 μ g/1 μ l à un ratio 3 :1 PEI : ADN. Six heures post transfection, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM avec 8 % FBS et P/S.

La concentration des cellules par puits, la quantité d'ADN, ainsi que le ratio PEI : ADN ont été déterminés par des expériences d'optimisation de transfection des cellules HeLa avec le plasmide pEGFP-N1. Ce plasmide code pour une protéine fluorescente verte, ce qui a permis d'estimer l'efficacité de la transfection à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Pour la préparation de lamelles de culture de cellules exprimant la protéine UBF mutée, une lamelle a été déposée dans chaque puits de plaque à 24 puits, et chaque puits a étéensemencé avec 5×10^4 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 PEI au ratio 1 :3. 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.

3.5 Immunobuvardage de type western

Extraction des protéines :

24 ou 48 heures post transfection, les plaques de culture cellulaire ont été placées sur de la glace et les cellules ont été lavées avec du PBS froid. Les cellules ont été lysées avec un tampon de radio-immunoprécipitation RIPA (50 mM tris pH 7.5 ; 1 % triton X-100 ; 0.5 % désoxycholate de sodium, 0.1 % SDS (sodium dodecyl sulfate), 500 mM NaCl ; inhibiteur de protéase complete mini de Roche 11836153001).

Après une incubation de 15 minutes, les cellules ont été grattées et récoltées dans des tubes Eppendorf préalablement refroidis. Les lysats cellulaires ont été centrifugés à 4°C à 13 000 rpm pendant 15 minutes. Les surnageants ont été transférés dans des Eppendorfs refroidis, puis les protéines ont été concentrées pendant 1 heure au speedvac sans chauffage. La quantification relative des protéines a été effectuée par dosage de Bradford.

Western blot :

Pour vérifier l'expression de la protéine UBF mutée suite à la transfection, 15 µg de protéines ont été mélangés avec un tampon de charge (60 mM Tris-HCl pH 6.8 ; 2 % SDS (sodium dodecyl sulfate) ; 0,01 % bromophenol bleu ; 238 mM β-mercaptoéthanol et 8 % glycerol), chauffées 5 minutes à 95 °C, puis migrés pendant 1 heure sur un gel de 8 % polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) à 120 V. Les protéines ont été transférées du gel vers une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) pendant 30 minutes à 16 V à l'aide du Trans-Blot Semi-Dry de Bio-Rad.

La membrane a été bloquée avec la solution saline tamponnée Tris et 0,25 % Tween-20 (TBS-T) + 1 % BSA (Bovine serum albumin) toute la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, la membrane a été lavée avec TBS-T puis coupée en deux, sous la bande de 50 kDa du marqueur de taille. Les deux morceaux ont été incubés 1 h à température ambiante sous agitation avec des anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage.

Pour le haut de la membrane : un anticorps de lapin anti-UBF (Santa cruz Biotech) dilué 1 :500.

Pour le bas de la membrane : un anticorps de lapin anti-α tubuline (New England Biolabs 44059S) dilué 1 :1000.

Après trois lavages dans la solution TBS-T, les deux morceaux de la membrane ont été incubés 45 minutes sous agitation avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch 111035003) dilué 1 :5000 dans du TBS-T + 1 % BSA, puis ils ont été lavés deux fois dans TBS-T et une dernière fois dans le TBS. Par la suite, la révélation a été réalisée en couvrant la membrane par la solution de révélation : le substrat de peroxyde et de luminol au ratio 1 :1 (Promega W1015). Enfin, les protéines des deux morceaux de membrane ont été observées avec l'instrument « Sapphire Biomolecular Imager » d'Azure.

3.6 Immunofluorescence indirecte et détection par microscopie confocale

Le marquage d'immunofluorescence indirecte et imagerie ont été réalisés essentiellement comme décrit précédemment (Ouellet Lavallée & Pearson, 2015). Les cellules transfectées et infectées ont été fixées avec 2 % de paraformaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante.

Les cellules fixées ont été perméabilisées avec 0,1 % Triton X-100 pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation, lavées, puis bloquées pendant 30 minutes à température ambiante avec solution de blocage (PBS 20 % NCS ; 0,5 % Tween-20).

Ensuite chaque lamelle a été déposée face vers le bas sur une goutte d'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage, puis incubée pendant une heure dans une chambre humidifiée à 37°C. UBF a été ciblé avec un anticorps de lapin anti-UBF (Sigma HPA006385) dilué 1 :900 et ICP8 avec un anticorps de souris anti-ICP8 (Santa Cruz SC-53329) dilué 1 :50.

Après l'incubation avec l'anticorps primaire, les lamelles ont été lavées avec PBS, puis déposées sur une goutte d'anticorps secondaire et incubées pendant 1 heure dans une chambre humidifiée à 37°C. L'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin conjugué au fluorophore Alexa 488 (Invitrogen A11008) et l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris conjugué au fluorophore Alexa 568 (Invitrogen A11031) ont été dilués 1 :1000 dans le tampon de blocage.

Par la suite, les lamelles ont été lavées avec PBS, et les noyaux des cellules ont été marqués avec 300 nM de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) pendant 10 minutes à température ambiante. Les lamelles ont été lavées une dernière fois avec PBS puis montées sur des lames en verre avec 8 µl de la solution de montage *ProLong Gold Antifade reagent (Invitrogen P36934)*.

Le lendemain, les lames ont 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 de microscope confocal ont été exportées avec le logiciel Zen 3.3 *blue edition*.

3.7 Analyse statistique

Les résultats présentés dans les figures 4.5, 4.6 et 4.7 sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

La figure 4.7 quantifiant l'effet des mutations a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.5.1. Sur cette figure, les différences statistiques entre les effets des UBF mutées et d'UBF wt ont été déterminées par une analyse de la variance à un facteur (one-way ANOVA).

4 RESULTATS

Les expériences de ce projet avaient pour objectif d'identifier les acides aminés critiques pour la fonction antivirale de l'UBF contre le HSV-1. Notre approche expérimentale consistait à introduire des mutations dans la séquence d'UBF et à tester les formes mutées exprimées de manière ectopique dans un contexte d'infection in vitro des cellules épithéliales pour déterminer si la mutation affectait l'activité d'inhibition de la réplication virale. Étant donné que les deux isoformes d'UBF sont capables d'inhiber la réplication du HSV-1 (Ouellet Lavallée *et al.*, soumis), nous avons décidé de mener ces expériences en utilisant uniquement l'isoforme UBF1.

4.1 Banque de gènes *UBTF* mutés

Étant donné que UBF1 subit plusieurs modifications post-traductionnelles qui régulent son activité transcriptionnelle, nous avons décidé de substituer les différents sites de ces modifications par des résidus d'alanine afin d'observer leurs effets sur l'activité inhibitrice de l'UBF contre le HSV-1. En plus de ces substitutions, nous avons choisi de tester la mutation d'UBF E210K associée à une maladie neurodégénérative rare. Cette mutation modifie la propriété du résidu d'acide aminé en passant d'une ionisation chargée négativement à positivement. Le tableau 4.1 ci-dessous présente les différentes mutations générées par mutagenèse dirigée, ainsi que leur position dans l'UBF1 et leurs effets sur l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I, tels qu'indiqués dans la littérature. Toutes ces mutations ont été vérifiées par séquençage.

Tableau 4.1 : Différentes mutations de la protéine cellulaire UBF

	Mutation	Position	Effet sur la transcription par ARN polymérase I
Site de phosphorylation	T201A	2 ^e boîte HMG	Diminue la transcription
	S389A	Entre 3 ^e et 4 ^e boîte HMG	Inactive la transcription
	S412A	4 ^e boîte HMG	Diminue la transcription
	S484A	5 ^e boîte HMG	Diminue la transcription
Site de méthylation	K232A	2 ^e boîte HMG	Augmente la transcription
	K254A	2 ^e boîte HMG	Augmente la transcription
Site d'acétylation	K352A	3 ^e boîte HMG	Diminue la transcription
Associée à une maladie rare	E210K	2 ^e boîte HMG	Augmente la transcription

La figure 4.1 présente un modèle tridimensionnel de l'UBF1, indiquant la position des différents acides aminés qui ont été substitués dans le cadre de mes expériences.

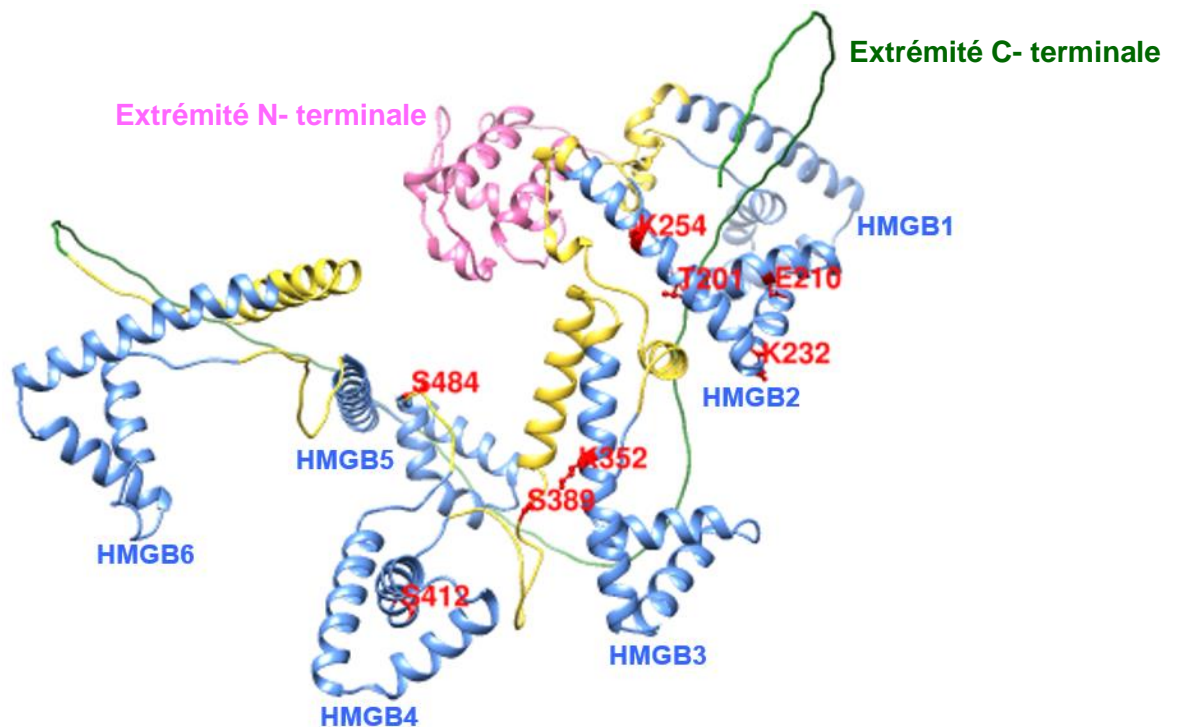


Figure 4.1 : Prédiction du modèle 3D d'UBF1 avec les sites des mutations

Le domaine de dimérisation est représenté en rose, la queue acide en vert, et les boîtes HMG sont en bleu. Les résidus sujets à des substitutions sont marqués en rouge. Cette image a été adaptée d'une prédiction de la structure 3D d'UBF réalisée à l'aide du logiciel AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021).

4.2 Expression des formes mutées d'UBF1 dans les cellules HeLa

Les formes mutées d'*UBTF* ont été générées par mutagenèse dirigée, puis clonées dans le vecteur d'expression pCG zeo mut. Afin de valider l'expression de ces différentes formes mutées, des cellules épithéliales HeLa ont été soit non transfectées (Mock), soit transfectées avec le plasmide vide comme contrôle négatif, ou avec l'un des plasmides exprimant UBF1 mutée comme indiqué dans la figure 4.1. Après 24 heures, les protéines des cellules ont été extraites puis quantifiées par la méthode de Bradford. Par la suite, 15 µg de protéines ont été analysées par immunobuvardage de type western.

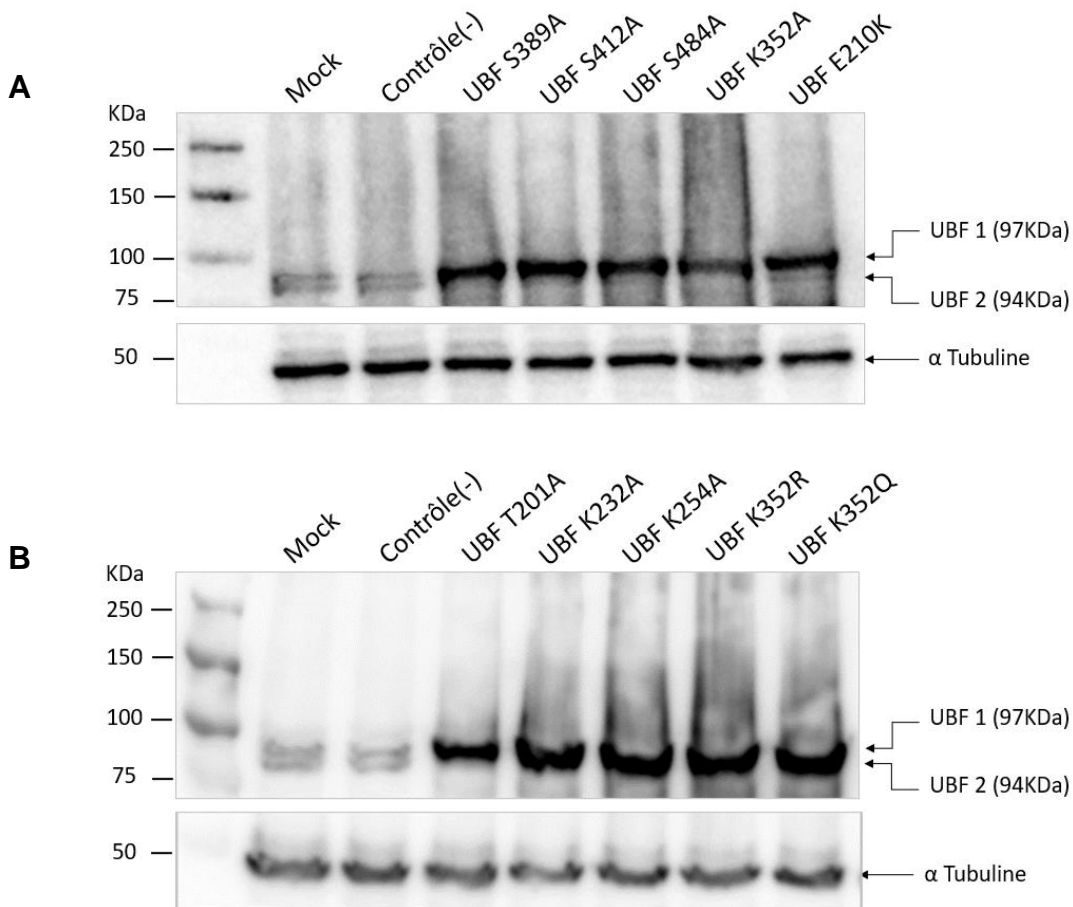


Figure 4.2 : Expression des formes mutées de l'UBF1 dans des cellules HeLa

Immunoblot des protéines UBF endogènes et exogènes. A et B : le panneau en haut montre les niveaux d'UBF et le panneau du bas montre l'alpha-tubuline, le témoin de charge. Le doublet représente les deux isoformes d'UBF (UBF1 et UBF2). La position du marqueur de poids moléculaire est indiquée à gauche des panneaux.

Dans la figure 4.2, on observe que notre témoin de charge α -Tubuline de 50 kDa présente des bandes d'intensité égale dans tous les puits, démontrant ainsi qu'une quantité équivalente de protéines a été introduite dans chaque puits.

Pour les conditions Mock et contrôle négatif, on observe deux bandes situées à environ 100 kDa, en accord avec la masse moléculaire prédite des deux isoformes de l'UBF (Jones *et al.*, 1995).

Pour les différentes formes mutées, on observe une bande plus intense correspondant à l'isoforme UBF1, confirmant ainsi que les cellules HeLa, transfectées de manière transitoire avec ces vecteurs, surexpriment UBF1 mutée à la taille attendue.

4.3 Impact des mutations dans UBF1 sur sa capacité d'inhiber la réplication du HSV-1

Une fois l'expression des formes modifiées d'UBF1 confirmée, nous avons testé leur capacité à inhiber la formation de compartiments de réplication virale du HSV-1. À cette fin, des cellules HeLa ont été soit non transfectées (Mock), soit transfectées avec UBF1 de type sauvage ou l'un des plasmides exprimant UBF1 mutée. Après 24 heures, les cellules non transfectées ont été infectées par simulation (Mock), tandis que les cellules transfectées ont été infectées par la souche KOS du HSV-1 à un MOI de 5. Cinq heures après l'infection, les cellules ont été traitées pour l'immunofluorescence indirecte et co-marquées avec les anticorps dirigés contre la protéine cellulaire UBF et la protéine virale ICP8. Ensuite, les cellules ont été observées au microscope confocal.

La formation des compartiments de réplication virale a été suivie en observant le marquage pour ICP8, une protéine virale du HSV-1 qui lie l'ADN simple brin, considérée comme marqueur pour les compartiments de réplication virale (Figures 4.3 - 4.6).

La figure 4.3 présente les résultats des mutations des sites de phosphorylation. Le taux de transfection n'est pas de 100 % ; par conséquent, nous avons pu observer sur la même lamelle des cellules exprimant uniquement l'UBF endogène et d'autres cellules surexprimant l'UBF exogène. Pour les cellules transfectées, un marquage de l'UBF a été détecté dans tout le nucléoplasme.

Contrairement aux cellules non transfectées qui présentent des compartiments de réplication virale (marqués en rouge) partout dans leurs noyaux, les cellules surexprimant UBF1 de type sauvage (wt) dans la figure 4.3 ne montrent aucune formation de compartiments de réplication virale. Ces résultats sont en accord avec les conclusions antérieures issues des travaux menés par un étudiant de notre laboratoire (Ouellet Lavallée *et al.*, soumis).

Dans la même figure, les cellules surexprimant UBF1 avec des mutations au niveau des sites de phosphorylation : S389A, S412A, S484A et T201A, ont également présenté une inhibition de la formation de compartiments de réplication virale.

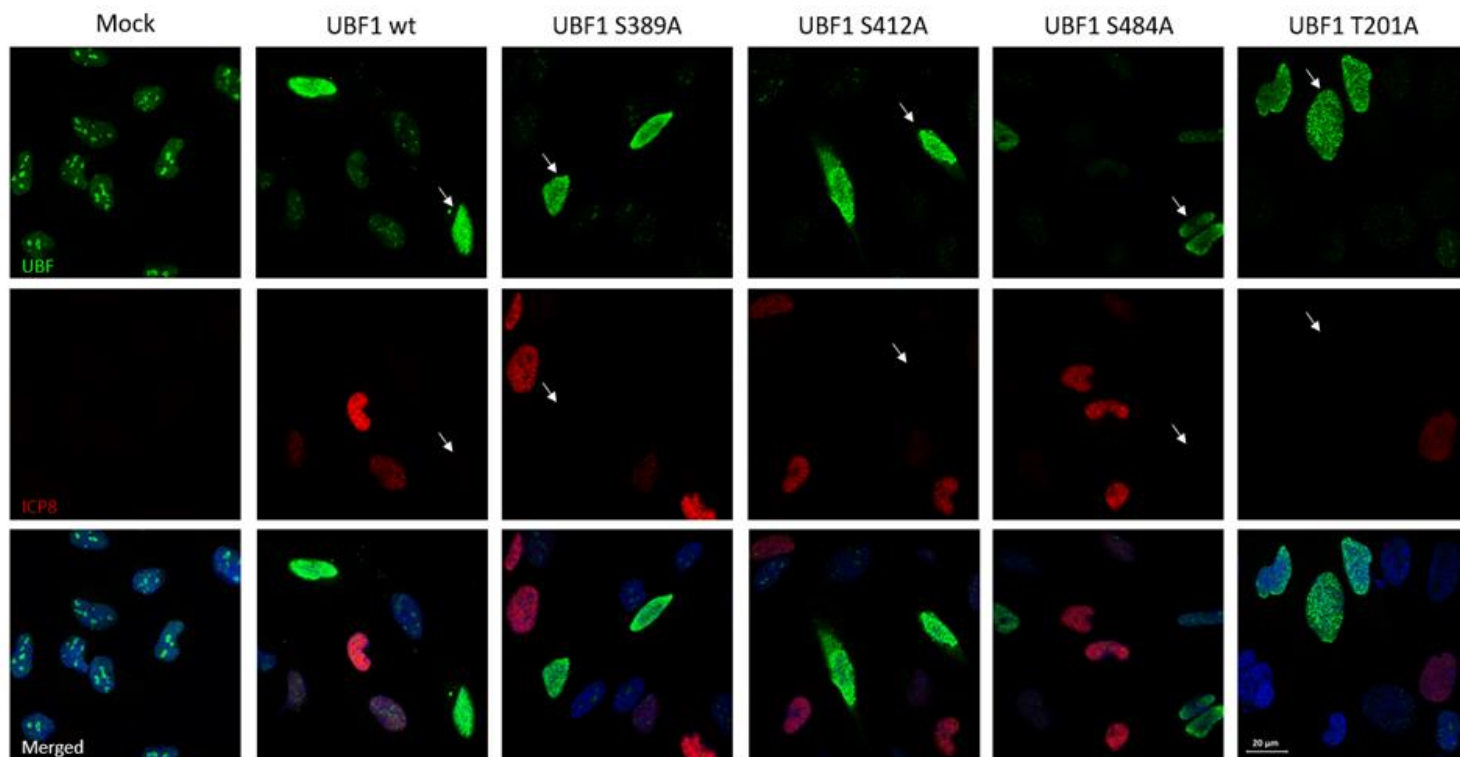


Figure 4.3 : Impact des mutations des sites de phosphorylation de l'UBF sur sa capacité à inhiber la réplication du HSV-1

Images de microscopie confocale de cellules HeLa, soit non transfectées (Mock), soit transfectées de façon transitoire avec UBF de type sauvage (wt) ou UBF muté au niveau d'un site de phosphorylation, puis infectées avec KOS à une MOI de 5. Les cellules ont été fixées 5 hpi et co-marquées par immunofluorescence pour UBF (vert, rangée du haut) et ICP8 (rouge, rangée du milieu) ; les noyaux ont été colorés avec DAPI (bleu). La rangée du bas représente les canaux fusionnés. Les flèches pointent vers une cellule typique dans laquelle UBF1 wt ou mutée est surexprimée.

Pour confirmer que l'inhibition de l'expression d'ICP8, et donc la réduction de la réplication virale, est spécifiquement due à l'absence d'UBF et non simplement à un échec de l'infection par le HSV, nous avons infecté des cellules par le HSV-1 en l'absence d'UBF. Les résultats démontrent que sous nos conditions expérimentales, 98 % des cellules ont été infectées.

Après avoir observé les effets des mutations des sites de phosphorylation, nous avons ensuite examiné les effets des mutations des sites de méthylation.

Les résultats illustrés dans la figure 4.4 démontrent que l'UBF1, dont les sites de méthylation ont été substitués par des alanines, conserve son activité inhibitrice contre le HSV-1. En effet, les cellules surexprimant les formes mutées UBF1 K232A et UBF1 K254A ne montrent pas de réplication du HSV-1.

Il semble également que la mutation du glutamate 210 en résidu de lysine, associée à une maladie neurodégénérative rare chez les enfants, n'ait aucun effet sur l'activité inhibitrice de l'UBF lors de l'infection par le HSV-1. Comme le montre la figure 4.5, les cellules surexprimant UBF E210K inhibent la formation des compartiments de réplication virale.

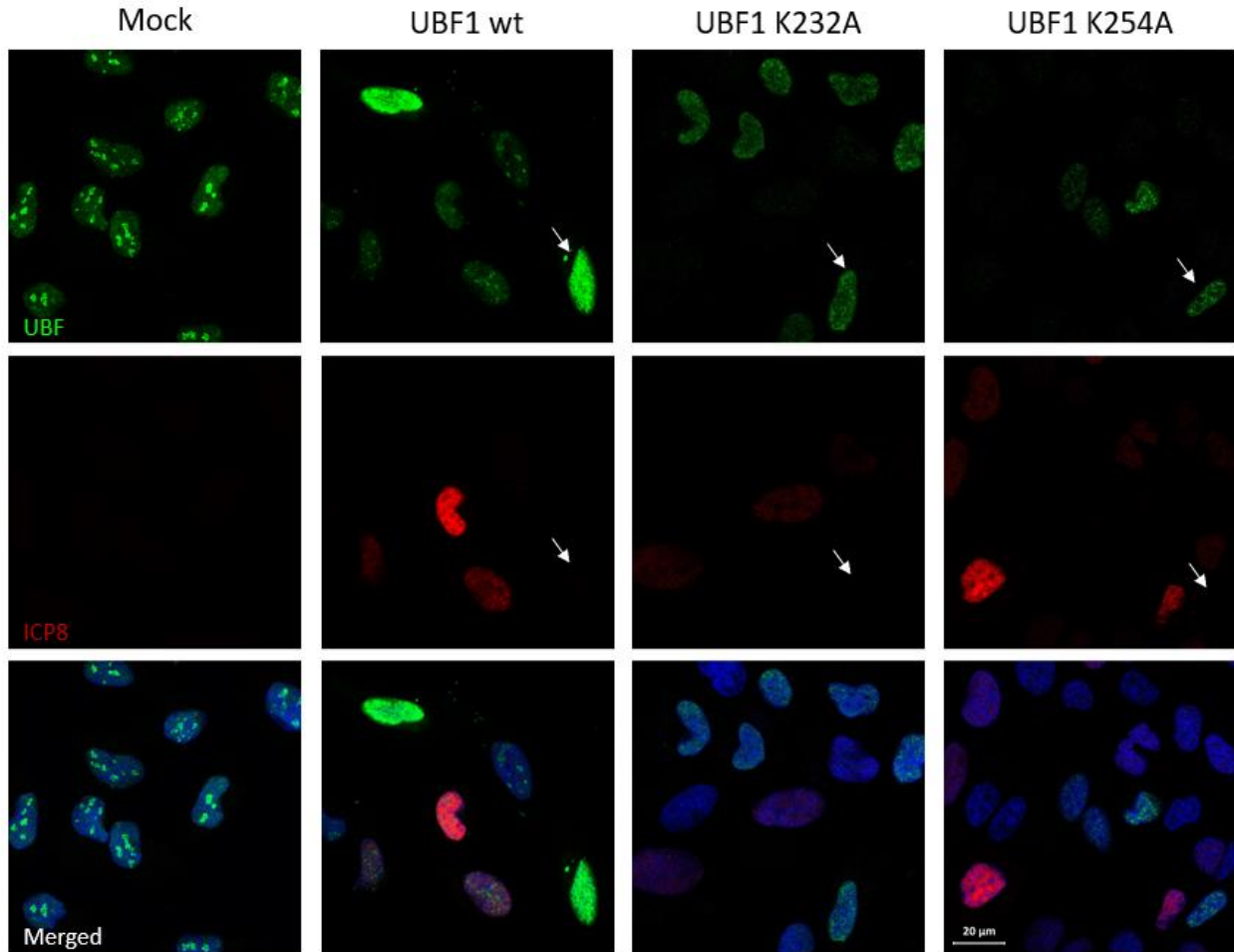


Figure 4.4 : Impact des mutations des sites de méthylation de l'UBF sur sa capacité à inhiber la réplication du HSV-1

Images de microscopie confocale de cellules HeLa, soit non transfectées (Mock), soit transfectées de façon transitoire avec UBF de type sauvage (wt) ou UBF mutée au niveau d'un site de méthylation, puis infectées avec KOS à une MOI de 5. Les cellules ont été fixées 5hpi et co-marquées par immunofluorescence pour UBF (vert, rangée du haut) et ICP8 (rouge, rangée du milieu) ; les noyaux ont été colorés avec DAPI (bleu). La rangée du bas représente les canaux fusionnés. Les flèches indiquent une cellule typique dans laquelle UBF1 wt ou mutée est surexprimée.

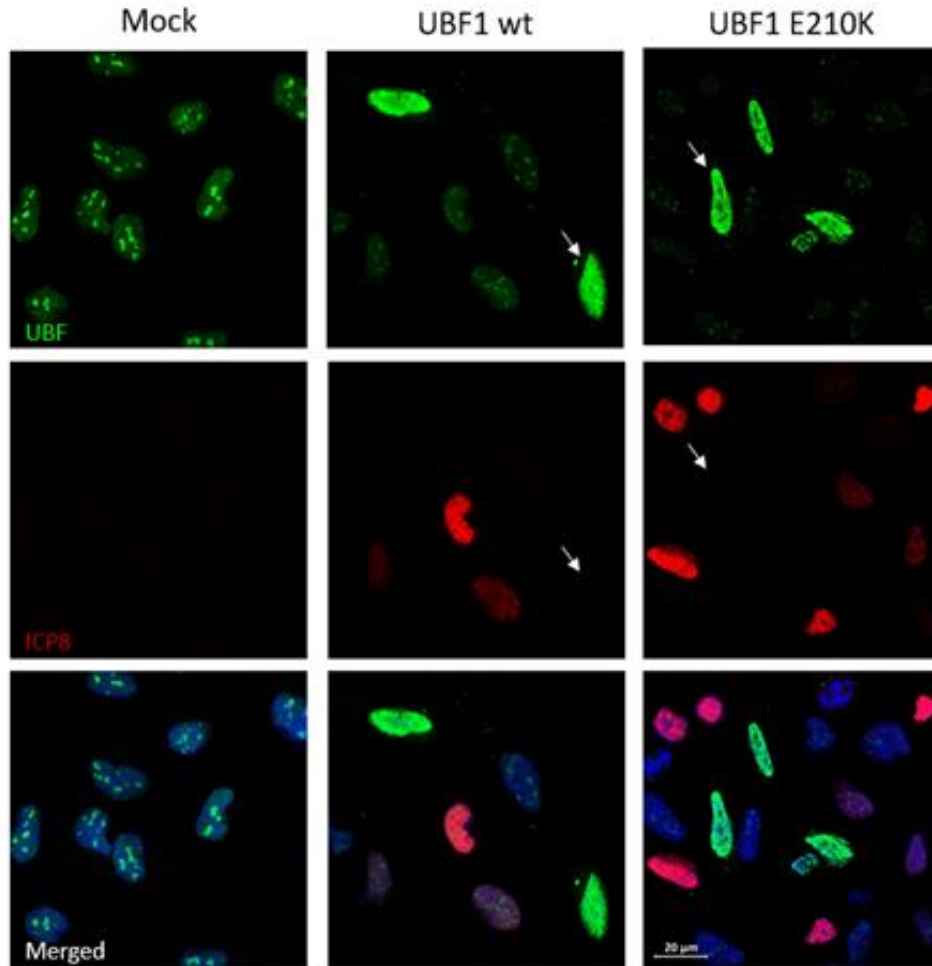


Figure 4.5 : Impact de la mutation E210K de l'UBF sur sa capacité à inhiber la réplication du HSV-1

Images de microscopie confocale de cellules HeLa, soit non transfectées (Mock), soit transfectées de façon transitoire avec UBF de type sauvage (wt) ou UBF1 E210K, puis infectées avec KOS à une MOI de 5. Les cellules ont été fixées 5hpi et co-marquées par immunofluorescence pour UBF (vert, rangée du haut) et ICP8 (rouge, rangée du milieu) ; les noyaux ont été colorés avec DAPI (bleu). La rangée du bas représente les canaux fusionnés. Les flèches pointent vers une cellule typique dans laquelle UBF1 Wt ou bien UBF1 E210K est surexprimée. Les images présentées sont représentatives de la population cellulaire observée dans trois expériences indépendantes.

Pour toutes les mutations précédentes, aucune différence d'activité inhibitrice par rapport à l'UBF de type sauvage n'a été observée. Cependant, un résultat différent a été obtenu lorsque le site d'acétylation a été modifié (figure 4.6). La substitution de la lysine 352 en alanine a permis de maintenir la formation de compartiments de réplication virale et a ainsi aboli l'inhibition de la réplication du HSV-1 par l'UBF. Cela suggère que le site d'acétylation en position 352 est crucial pour l'activité antivirale de l'UBF contre le HSV-1.

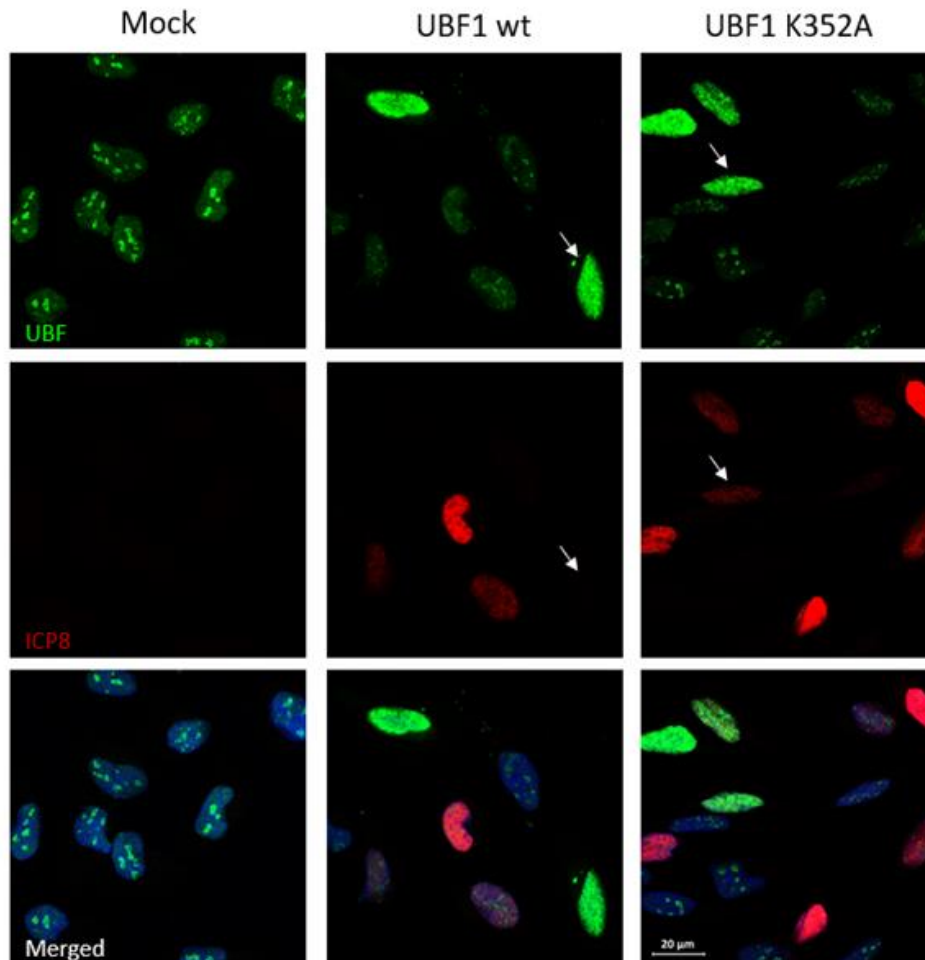


Figure 4.6 : La substitution du site d'acétylation K352 de l'UBF par alanine atténue sa capacité à inhiber la réplication du HSV-1

Images de microscopie confocale de cellules HeLa, soit non transfectées (Mock), soit transfectées de façon transitoire avec UBF de type sauvage (wt) ou UBF mutée au niveau du site d'acétylation (UBF1 K352A), puis infectées avec KOS à une MOI de 5. Les cellules ont été fixées 5hpi et co-marquées par immunofluorescence pour UBF (vert, rangée du haut) et ICP8 (rouge, rangée du milieu) ; les noyaux ont été colorés avec DAPI (bleu). La rangée du bas représente les canaux fusionnés. Les flèches pointent vers une cellule typique dans laquelle UBF1 wt ou UBF1 K352A est surexprimée. Les images présentées sont représentatives de la population cellulaire observée dans trois expériences indépendantes.

4.4 Quantification de la capacité des formes substituées d'UBF d'inhiber la réplication du HSV-1

Pour évaluer la signification de l'effet observé, nous avons procédé à la quantification de nos résultats de microscopie confocale (figure 4.7). Chaque mutation a impliqué l'analyse d'au moins 26 cellules observées dans trois expériences indépendantes.

Les cellules surexprimant UBF de manière ectopique (100%) sont subdivisées en deux sous-groupes : d'une part, celles dans lesquelles la surexpression d'UBF inhibe la réplication virale de HSV-1 (représentées en gris clair), ce qui signifie que la formation des compartiments de réplication virale (marqué en rouge) n'est pas détectée dans ces cellules, et d'autre part, celles où la surexpression d'UBF n'affecte pas la réplication virale de HSV-1 (représentées en gris foncé).

Les résultats de la quantification n'ont pas révélé de différence statistiquement significative entre le pourcentage des cellules dont la réplication virale a été inhibée par la surexpression de l'UBF1 de type sauvage (98,5 %) et celui des cellules dont la réplication virale a été inhibée par la surexpression des variantes mutées d'UBF1 suivantes : S389A (96,3 %), S412A (100 %), S484A (95,6 %) et E210K (98 %).

Cependant, une différence significative a été observée pour la mutation du site d'acétylation K352A. Environ 30 % des cellules surexprimant la forme mutée UBF1 K352A ont maintenu la formation des compartiments de réplication virale du HSV-1, tandis que seulement 1.5 % des cellules surexprimant l'UBF de type sauvage ont maintenu cet état.

Pris ensemble, ces résultats démontrent que le site d'acétylation de l'UBF lysine 352 contribue à son activité antivirale contre HSV-1.

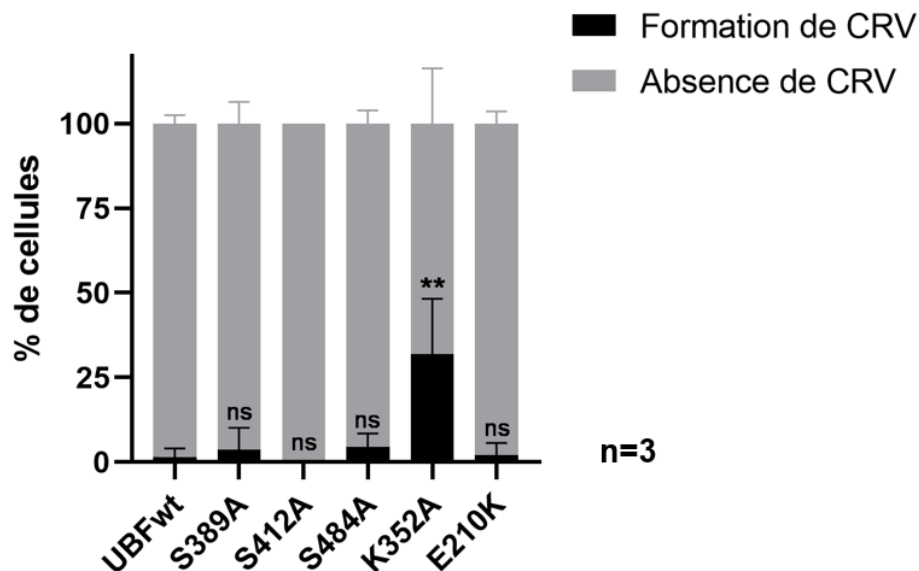


Figure 4.7 : Quantification de l'effet des mutations d'UBF sur la répliation de HSV1

Ce graphique montre le pourcentage des cellules surexprimant UBF1 de type sauvage ou UBF1 mutée et qui maintiennent la formation des compartiments de répliation virale (en noir) et celles où la formation des compartiments de répliation virale n'est pas détectée dans ces cellules (en gris). Les barres d'erreur indiquent l'erreur type. Test statistique one-way ANOVA : ** $p \leq 0.01$, ns, non significative. La figure représente la moyenne de trois expériences indépendantes ($n = 3$).

4.5 Effet des mutations du site d'acétylation K352A d'UBF sur sa capacité d'inhiber la répliation du HSV-1

Pour confirmer davantage l'importance du site d'acétylation K352 de l'UBF dans son activité inhibitrice de la répliation du HSV-1, nous avons créé deux autres mutants du site d'acétylation K352 de l'UBF1. L'une des mutations implique la substitution de la lysine K352 par une glutamine, permettant ainsi de neutraliser la charge positive du résidu et de mimer l'acétyl-lysine. L'autre mutation consiste à substituer la lysine par de l'arginine, imitant ainsi l'état non acétylé de la lysine. L'expression des deux formes mutées, UBF1 K352Q et UBF1 K352R, a été confirmée par western blot (voir figure 4.2).

Comme pour les mutations précédentes, nous avons évalué la capacité de ces deux nouvelles formes mutées d'UBF1 à inhiber la formation de compartiments de répliation virale du HSV-1 en effectuant des essais de transfection transitoire sur des cellules HeLa avec ces formes substituées, suivie d'une infection à une MOI de 5 avec la souche KOS du HSV-1. Les cellules ont été marquées par immunofluorescence indirecte pour détecter la protéine cellulaire UBF (en vert) et la protéine virale ICP8 (en rouge) au microscope confocal (figure 4.8).

Dans la figure 4.8, les cellules surexprimant UBF1 K352Q et UBF1 K352R ne présentent aucun signe de formation de compartiments de réplication virale (marqué en rouge). Ces résultats préliminaires suggèrent que, contrairement à la substitution du site d'acétylation de l'UBF K352A qui inhibe son activité antivirale contre le HSV-1, le remplacement de ce site par du glutamate ou de l'arginine rétablit son activité antivirale.

Une analyse des résultats issus de 26 cellules transfectées par K352Q et de 45 cellules transfectées par K352R révèle l'absence de formation de compartiments de réplication virale du HSV-1 dans toutes ces cellules.

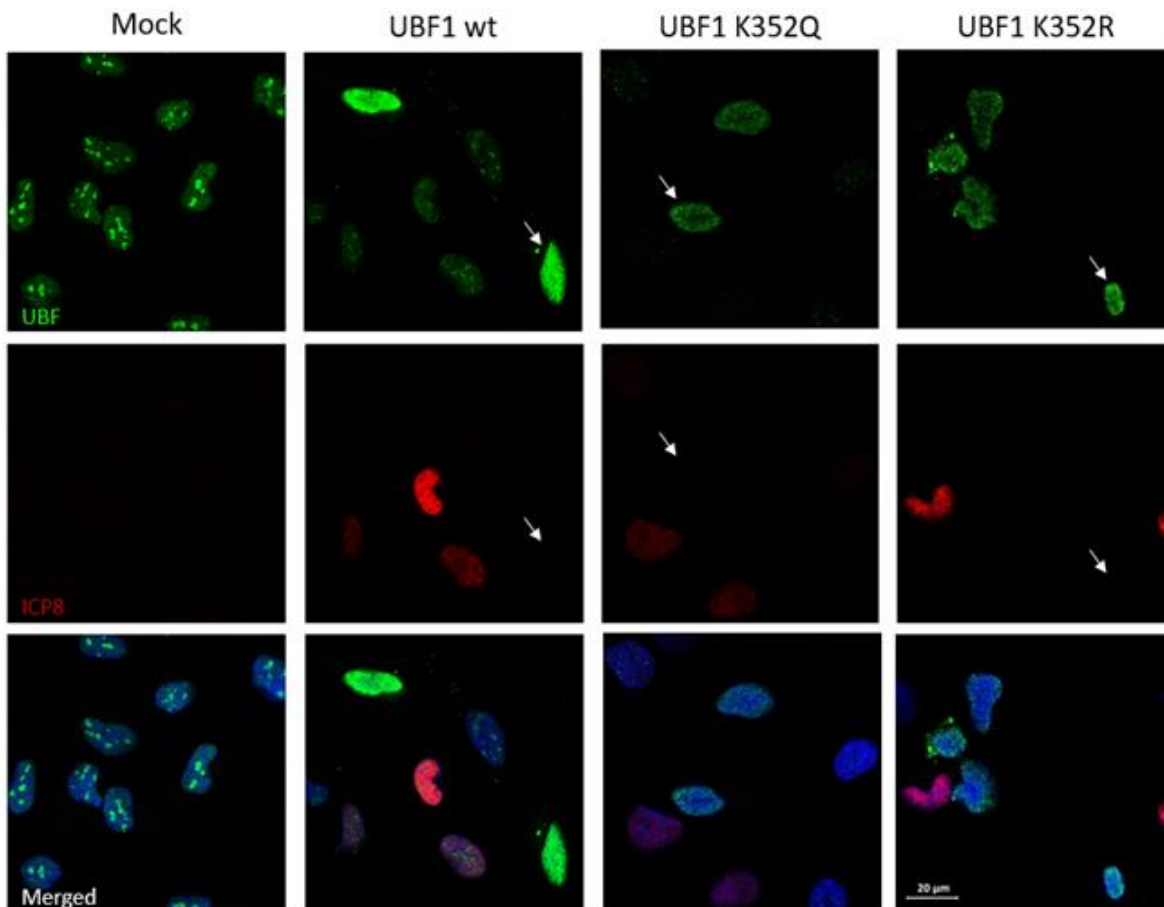


Figure 4.8 : La substitution du site d'acétylation K352 de l'UBF par de la glutamine ou de l'arginine conserve sa capacité à inhiber la réplication du HSV-1

Images de microscopie confocale montrant des cellules HeLa, soit non transfectées (Mock), soit transfectées de façon transitoire avec UBF de type sauvage (wt), UBF1 K352R, ou UBF1 K352Q, puis infectées avec KOS à une MOI de 5. Les cellules ont été fixées 5hpi et co-marquées par immunofluorescence pour UBF (vert, rangée du haut) et ICP8 (rouge, rangée du milieu) ; les noyaux ont été colorés avec DAPI (bleu). La rangée du bas représente les canaux fusionnés. Les flèches pointent vers une cellule typique dans laquelle UBF1 wt, UBF1 K352Q ou UBF1 K352R est surexprimée.

5 DISCUSSION

Notre laboratoire a démontré que la protéine cellulaire UBF inhibe la réplication du virus HSV-1 (Ouellet Lavallée *et al.*, soumis). Le mécanisme de la restriction par UBF n'a pas été défini. Le but de cette étude était de déterminer les résidus d'UBF nécessaires pour son activité antivirale, comme une première étape vers la compréhension du mécanisme d'UBF.

5.1 Le site d'acétylation K352 d'UBF joue un rôle dans son effet antiviral contre le HSV-1

Bien que le rôle transcriptionnel de l'UBF dans la cellule soit régulé par des modifications post-traductionnelles, les effets de ces modifications sur son activité antivirale envers le HSV-1 sont inexplorés. Pour cela, nous avons choisi d'examiner différents sites de modifications post-traductionnelles d'UBF rapportés dans la littérature.

Nous avons substitué les sites de phosphorylation : S389, S412, S484 et T201 ; les sites de méthylation : K232 et K254 ; ainsi que le site d'acétylation K352 par l'alanine afin d'évaluer l'impact fonctionnel. Puis, nous avons testé la capacité des différentes formes mutées à inhiber la formation de compartiments de réplication virale du HSV-1.

Parmi les différents sites mutés, seul le site d'acétylation en position 352 d'UBF semble être crucial pour son activité antivirale contre le HSV-1. La substitution par l'alanine, un acide aminé neutre et non chargé, élimine la charge positive de la lysine et empêche l'acétylation, perturbant ainsi les interactions électrostatiques associées à cette modification post traductionnelle.

Comme illustré dans la figure 4.6, la mutation du site d'acétylation K352A abolit l'inhibition de la réplication du HSV-1 par l'UBF. La quantification des résultats a révélé que 30 % des cellules surexprimant la forme mutée UBF1 K352A ont maintenu la formation des compartiments de réplication virale du HSV-1.

En essayant de mieux comprendre l'importance du site K352, nous l'avons substitué par deux autres résidus : la glutamine (Q) et l'arginine (R). Ces mutations aident à déterminer si les propriétés chimiques particulières de la lysine à ce site d'acétylation sont critiques pour la fonction antivirale de l'UBF.

La substitution par glutamine maintient une charge neutre et certaines propriétés structurales tout en empêchant l'acétylation, car la chaîne latérale de la glutamine est similaire à celle de la lysine. Tandis que la substitution par arginine conserve la charge positive, mais elle peut

perturber la régulation normale de la lysine par acétylation en raison de la différence de taille et de structure chimique entre la lysine et l'arginine. Curieusement, la mutation K352R, qui bloquerait l'acétylation et aurait la même charge positive que la lysine, ou K352Q, qui devrait imiter l'acétylation de la lysine, conserve toutes deux la capacité antivirale de l'UBF, comme démontré dans la figure 4.8. Les expériences avec ces deux mutants doivent être répétées pour confirmer les résultats et garantir la reproductibilité des observations. Si les répétitions expérimentales prouvent que les mutations en arginine et en glutamine ont effectivement conduit à la conservation de la fonction inhibitrice de l'UBF, l'interprétation possible de cette observation pourrait être la suivante :

- La charge électrique à ce site d'acétylation semble jouer un rôle crucial dans le maintien de l'activité antivirale de la protéine. La substitution par un acide aminé neutre comme l'alanine perturbe cette charge, entraînant une altération de la fonction antivirale de l'UBF.
- Cependant, la taille de la chaîne latérale (arginine ou glutamine) ne semble pas avoir le même impact, indiquant que la perturbation de la charge plutôt que des propriétés stériques spécifiques est probablement responsable des changements fonctionnels observés.

Il sera important de valider ces observations avec des analyses complémentaires. Pour déterminer si l'acétylation d'UBF change lors de l'infection par HSV-1, nous pourrions évaluer le niveau d'acétylation d'UBF dans les cellules infectées en isolant UBF à partir de lysat cellulaire par immunoprécipitation, puis l'analyser par western blot en utilisant des anticorps anti-acétyl-lysine. Si l'acétylation d'UBF est nécessaire pour son activité antivirale, nous nous attendons à observer une augmentation du niveau d'UBF acétylée dans l'extrait des cellules infectées par rapport aux cellules non infectées.

Nous pourrions également caractériser l'association entre UBF1 et CBP, l'acétyltransférase qui acétyle UBF au niveau de la lysine 352, en effectuant une immunoprécipitation à partir des extraits de cellules infectées. Ceci sera réalisé en utilisant soit des anticorps anti-UBF. L'immunoprécipitation sera suivie d'un immunobuvardage en utilisant des anticorps anti-CBP pour détecter la présence de CBP et confirmer l'association physique entre l'UBF et le CBP.

La présence de la forme endogène de l'UBF pourrait avoir un impact sur les résultats obtenus dans ces expériences. Il est possible que les formes mutées de l'UBF aient formé des dimères avec l'UBF endogène, ce qui pourrait masquer tout effet inhibiteur. Il serait intéressant de

reproduire les expériences avec les différentes formes mutées en inhibant l'expression de l'UBF endogène à l'aide de siARN.

5.2 Le rôle potentiel de l'acétylation de l'UBF dans les différents mécanismes envisageables de l'action antivirale de l'UBF contre le HSV-1

On peut classer les mécanismes possibles de l'action antivirale de l'UBF contre le HSV-1 en deux catégories :

Action directe

UBF peut directement entraver la réplication virale de manière autonome. Un exemple possible de mécanisme direct est qu'UBF se lie directement au promoteur des gènes viraux, ce qui diminue l'accessibilité au promoteur et interfère avec le recrutement des facteurs de transcription bloquant ainsi la transcription virale. Un autre exemple possible est qu'UBF se lie à travers le génome viral, entravant ainsi la progression de la machinerie de transcription, similaire à sa régulation de l'élongation de la polymérase I.

Ces exemples impliquent la liaison d'UBF au génome viral. Notre laboratoire a découvert que UBF colocalise avec le génome viral du HSV-1 de manière indépendante des protéines virales (Ouellet Lavallée *et al.*, soumis). Une étude a analysé les interactions entre l'ADN du HSV-1 et les protéines virales et cellulaires tout au long de l'infection en utilisant des approches de purification par affinité du génome viral et d'imagerie. Cette étude a révélé que UBF est associé au génome viral à 2hpi, 3hpi et 6hpi (Dembowski & DeLuca, 2018). Afin de confirmer l'interaction entre l'UBF et le génome viral et de déterminer si UBF reconnaît des séquences spécifiques de l'ADN viral, nous pourrions effectuer une immunoprécipitation de la chromatine ciblant UBF suivie d'un séquençage à haut débit.

Selon des études antérieures, l'acétylation d'UBF par l'acétyltransférase CBP, n'affecte pas sa capacité de liaison au promoteur de l'ADNr. Nous pourrions également étudier si l'acétylation de l'UBF affecte son association avec l'ADN viral. Pour cela, nous pourrions réaliser des tests d'immunoprécipitation de la chromatine pour détecter si l'occupation de l'ADN viral par UBF1 sera perturbée suite aux substitutions de site d'acétylation K352 par alanine, arginine ou glutamine.

Ces exemples de mécanismes directs impliquent également la possibilité qu'UBF modifie la conformation de l'ADN viral. Une étude structurale du complexe UBF-ADN viral peut être réalisée *in vitro* à l'aide de l'imagerie spectroscopique électronique pour déterminer si UBF

forme des enhancéosome en se liant sur l'ADN viral comme pour l'ADNr. La phosphorylation de T117 et T201 par ERK réduit l'affinité des boîtes HMG 1 et 2 pour l'ADNr et diminue leur capacité à le plier, empêchant ainsi la formation de l'enhancéosome (Stefanovsky *et al.*, 2006). Nous pourrions simuler la phosphorylation de ces deux sites en substituant la thréonine par l'acide glutamique puis déterminer l'effet de cette mutation sur la liaison d'UBF à l'ADN viral et l'effet sur l'activité inhibitrice d'UBF.

Action indirecte

Le fait que UBF se lie à l'ADN ribosomal et recrute des protéines pour former le complexe d'initiation de la transcription suggère la possibilité que UBF entrave la transcription virale indirectement en se liant à l'ADN viral et en recrutant une ou plusieurs protéines de répression.

Afin d'identifier et de quantifier les protéines associées à l'UBF dans les cellules infectées par le HSV-1, nous pourrions réaliser une immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse. Ensuite, nous pourrions confirmer les interactions en utilisant des méthodes complémentaires comme l'immunoprécipitation suivie d'un immunobuvardage.

Des recherches antérieures ont établi que l'acétylation de l'UBF favorise son interaction avec PAF53, une sous-unité de l'ARN polymérase I, ce qui facilite le recrutement de Pol I au promoteur de l'ADNr (Kong *et al.*, 2011; Meraner *et al.*, 2006). Par conséquent, il est plausible que l'acétylation de la lysine K352 de l'UBF soit essentielle pour ses interactions protéine-protéine au cours de l'infection par le HSV-1. Nous pourrions refaire la même expérience d'immunoprécipitation suivie par spectrométrie de masse pour identifier et quantifier les protéines qui interagissent spécifiquement avec les différentes formes mutées d'UBF.

Parmi les candidats possibles est l'IFI16, un capteur d'ADN viral qui est capable d'inhiber la réplication ainsi que l'expression génique de HSV-1 de type sauvage (Sodroski & Knipe, 2023). En utilisant la purification par immunoaffinité et la spectrométrie de masse ciblée, il a été découvert que UBF colocalise avec IFI16 oligomérique au niveau des génomes du HSV-1 dans les fibroblastes lors d'une infection simulée et pendant les premières phases de l'infection (Lum *et al.*, 2019).

Un autre candidat plausible est la CTCF, une protéine nucléaire à onze doigts de zinc, qui régule l'expression génique en modulant le recrutement des protéines coactivateurs et corépresseurs, ainsi que par son activité de barrière au niveau des promoteurs (Ghirlando & Felsenfeld, 2016).

Par exemple, une étude a démontré qu'une fraction de CTCF interagit avec l'ARN polymérase II pour stimuler la transcription d'un gène rapporteur (Chernukhin *et al.*, 2007). De plus, il a été également démontré que CTCF se lie en amont du promoteur du gène ADNr et augmente sa transcription en interagissant directement avec UBF par ses doigts de zinc, favorisant ainsi la liaison d'UBF à l'ADNr (van de Nobelen *et al.*, 2010).

D'autres études ont révélé que CTCF induit la répression de la transcription du promoteur c-myc en recrutant les protéines répresseurs Sin3 et YB1 (Lutz *et al.*, 2000). En outre, CTCF interagit directement avec Suz12, une composante du complexe répressif polycomb 2 (PRC2) (Li *et al.*, 2008). Le PRC2, un complexe régulateur épigénétique constitué de cinq protéines (EZH2, SUZ12, EED et RdAp46/48), est responsable de la triméthylation de l'histone 3 à la lysine 27 (H3K27me3), aboutissant à la répression de la transcription génique (Simon & Kingston, 2009).

Par ailleurs, une analyse de la séquence du génome du HSV-1 a repéré sept motifs de liaison à CTCF conservés (Amelio *et al.*, 2006). CTCF est associée à ces motifs sur le génome latent, agissant comme un isolant de la chromatine qui empêche l'activation de promoteurs lytiques tels que celui d'ICP0 par l'activateur LAT (Washington *et al.*, 2018).

6 CONCLUSION

Le mécanisme de la restriction du virus HSV-1 par la protéine cellulaire UBF est inconnu. Comme un première pas vers la compréhension de ce mécanisme, on a essayé d'identifier des acides aminés critiques pour cette fonction antivirale.

Cette étude est la première à examiner les effets des mutations sur différents sites de modification post-traductionnelle dans le cadre d'une infection par le HSV-1, ainsi qu'à étudier l'impact d'une variante d'UBF associée à une maladie neurodégénérative rare (E210K) dans le contexte de l'infection.

Nos résultats suggèrent que la mutation E210K n'affecte pas l'activité inhibitrice d'UBF contre la réplication de HSV-1. Cependant, nous avons identifié le site d'acétylation K352 d'UBF comme étant crucial pour son effet antiviral. Pour approfondir la compréhension du mécanisme d'action d'UBF, notre laboratoire envisage deux catégories de mécanismes : action directe et action indirecte. Tenant compte des résultats de cette étude, dans notre modèle UBF est acétylé pour pouvoir inhiber l'expression virale (figure 7.1).

L'association de l'UBF avec le génome du HSV-1 suggère que UBF pourrait agir directement en se liant à l'ADN viral, interférant avec la transcription virale. L'analyse structurale de complexes UBF-ADN viral pourrait fournir des informations cruciales sur ce mécanisme. L'étude de l'acétylation d'UBF et son association avec CBP pendant l'infection par HSV-1 peut également apporter des éclaircissements sur les mécanismes d'action.

En ce qui concerne l'action indirecte, l'interaction potentielle d'UBF avec des protéines telles que IFI16 et CTCF offre des pistes intéressantes. Des expériences supplémentaires, telles que l'immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse, pourraient confirmer ces interactions et fournir des détails sur les partenaires protéiques impliqués.

En résumé, nos résultats suggèrent un rôle crucial du site d'acétylation K352 d'UBF dans son activité antivirale, tout en ouvrant des perspectives prometteuses pour la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents. Une telle compréhension pourrait avoir des implications importantes dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre le HSV-1.

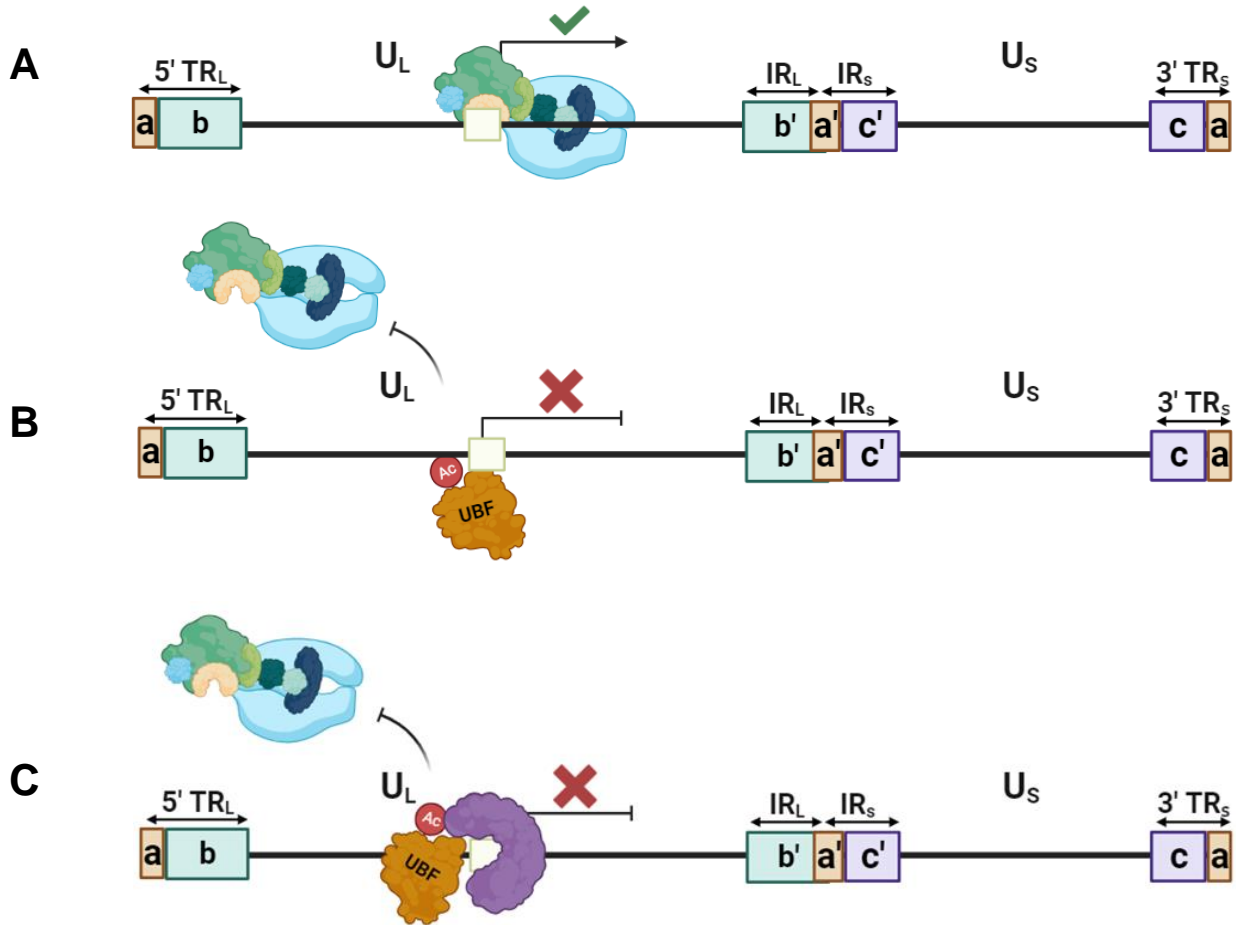


Figure 6.1: Modèle des mécanismes d'action antivirale direct et indirect d'UBF

- (A) En l'absence d'UBF, les facteurs de transcription se fixent sur le promoteur viral (rectangle jaune) et activent la transcription.
- (B) Mécanisme direct : UBF acétylé se lie à la région promotrice du génome viral et interfère avec le recrutement des facteurs de transcription, inhibant ainsi la transcription virale.
- (C) Mécanisme indirect : UBF acétylé se lie au génome viral et y recrute une protéine de répression qui interfère avec le recrutement des facteurs de transcription et bloque la transcription des gènes viraux. Les dessins sont réalisés sur le logiciel Biorender.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Alandijany T (2019) Host Intrinsic and Innate Intracellular Immunity During Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Infection. *Front Microbiol* 10:2611.
- 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 Pathog* 14(1):e1006769.
- Amelio AL, McAnany PK & Bloom DC (2006) A chromatin insulator-like element in the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript region binds CCCTC-binding factor and displays enhancer-blocking and silencing activities. *J Virol* 80(5):2358-2368.
- Arima N, Kao CY, Licht T, Padmanabhan R, Sasaguri Y & Padmanabhan R (2001) Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J Biol Chem* 276(16):12675-12684.
- Bachvarov D & Moss T (1991) The RNA polymerase I transcription factor xUBF contains 5 tandemly repeated HMG homology boxes. *Nucleic Acids Res* 19(9):2331-2335.
- Bagga B, Kate A, Joseph J & Dave VP (2020) Herpes simplex infection of the eye: an introduction. *Community Eye Health* 33(108):68-70.
- 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. *J Gen Virol* 86(Pt 8):2315-2322.
- Bastos F, Quinodoz M, Addor MC, Royer-Bertrand B, Fodstad H, Rivolta C, Poloni C, Superti-Furga A, Roulet-Perez E & Lebon S (2020) Childhood neurodegeneration associated with a specific UBTF variant: a new case report and review of the literature. *BMC Neurol* 20(1):17.
- Bazett-Jones DP, Leblanc B, Herfort M & Moss T (1994) Short-range DNA looping by the Xenopus HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* 264(5162):1134-1137.
- Beckmann H, Chen JL, O'Brien T & Tjian R (1995) Coactivator and promoter-selective properties of RNA polymerase I TAFs. *Science* 270(5241):1506-1509.
- Boutell C & Everett RD (2013) Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins. *J Gen Virol* 94(Pt 3):465-481.
- Cabral JM, Cushman CH, Sodroski CN & Knipe DM (2021) ATRX limits the accessibility of histone H3-occupied HSV genomes during lytic infection. *PLoS Pathog* 17(4):e1009567.
- Cabral JM, Oh HS & Knipe DM (2018) ATRX promotes maintenance of herpes simplex virus heterochromatin during chromatin stress. *Elife* 7.
- 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.
- Cheng X & Kao HY (2012) Post-translational modifications of PML: consequences and implications. *Front Oncol* 2:210.
- Chernukhin I, Shamsuddin S, Kang SY, Bergström R, Kwon YW, Yu W, Whitehead J, Mukhopadhyay R, Docquier F, Farrar D, Morrison I, Vigneron M, Wu SY, Chiang CM, Loukinov D, Lobanenkova V, Ohlsson R & Klenova E (2007) CTCF interacts with and

- recruits the largest subunit of RNA polymerase II to CTCF target sites genome-wide. *Mol Cell Biol* 27(5):1631-1648.
- Choubey D, Deka R & Ho SM (2008) Interferon-inducible IFI16 protein in human cancers and autoimmune diseases. *Front Biosci* 13:598-608.
- Copenhaver GP, Putnam CD, Denton ML & Pikaard CS (1994) The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 22(13):2651-2657.
- Cuchet-Lourenço D, Vanni E, Glass M, Orr A & Everett RD (2012) Herpes simplex virus 1 ubiquitin ligase ICP0 interacts with PML isoform I and induces its SUMO-independent degradation. *J Virol* 86(20):11209-11222.
- Cuchet D, Sykes A, Nicolas A, Orr A, Murray J, Sirma H, Heeren J, Bartelt A & Everett RD (2011) PML isoforms I and II participate in PML-dependent restriction of HSV-1 replication. *J Cell Sci* 124(Pt 2):280-291.
- Dembowski JA & DeLuca NA (2018) Temporal Viral Genome-Protein Interactions Define Distinct Stages of Productive Herpesviral Infection. *mBio* 9(4).
- 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.
- Edvardson S, Nicolae CM, Agrawal PB, Mignot C, Payne K, Prasad AN, Prasad C, Sadler L, Nava C, Mullen TE, Begtrup A, Baskin B, Powis Z, Shaag A, Keren B, Moldovan GL & Elpeleg O (2017) Heterozygous De Novo UBTF Gain-of-Function Variant Is Associated with Neurodegeneration in Childhood. *Am J Hum Genet* 101(2):267-273.
- Everett RD (2014) HSV-1 biology and life cycle. *Methods Mol Biol* 1144:1-17.
- Everett RD (2016) Dynamic Response of IFI16 and Promyelocytic Leukemia Nuclear Body Components to Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J Virol* 90(1):167-179.
- Everett RD, Boutell C & Hale BG (2013) Interplay between viruses and host sumoylation pathways. *Nat Rev Microbiol* 11(6):400-411.
- Everett RD, Freemont P, Saitoh H, Dasso M, Orr A, Kathoria M & Parkinson J (1998) The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol* 72(8):6581-6591.
- Everett RD & Murray J (2005) ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection. *J Virol* 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. *J Virol* 82(6):2661-2672.
- Everett RD, Rechter S, Papior P, Tavalai N, Stamminger T & Orr A (2006) PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol* 80(16):7995-8005.
- Everett RD & Zafiroopoulos A (2004) Visualization by live-cell microscopy of disruption of ND10 during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 78(20):11411-11415.
- Friedrich JK, Panov KI, Cabart P, Russell J & Zomerdijk JC (2005) TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *J Biol Chem* 280(33):29551-29558.

- 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. *FEBS J* 287(1):205-217.
- Ghirlando R & Felsenfeld G (2016) CTCF: making the right connections. *Genes Dev* 30(8):881-891.
- Glass M & Everett RD (2013) Components of promyelocytic leukemia nuclear bodies (ND10) act cooperatively to repress herpesvirus infection. *J Virol* 87(4):2174-2185.
- Grueneberg DA, Pablo L, Hu KQ, 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 beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 23(11):3936-3950.
- Grummt I (1999) Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62:109-154.
- Gu H & Zheng Y (2016) Role of ND10 nuclear bodies in the chromatin repression of HSV-1. *Virology* 533:62.
- Gu H, Zheng Y & Roizman B (2013) Interaction of herpes simplex virus ICP0 with ND10 bodies: a sequential process of adhesion, fusion, and retention. *J Virol* 87(18):10244-10254.
- Halkidou K, Logan IR, Cook S, Neal DE & Robson CN (2004) Putative involvement of the histone acetyltransferase Tip60 in ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Res* 32(5):1654-1665.
- Hamdane N, Stefanovsky VY, Tremblay MG, Németh A, Paquet E, Lessard F, Sanij E, Hannan R & Moss T (2014) Conditional inactivation of Upstream Binding Factor reveals its epigenetic functions and the existence of a somatic nucleolar precursor body. *PLoS Genet* 10(8):e1004505.
- Hannan R, Stefanovsky V, Arino T, Rothblum L & Moss T (1999) Cellular regulation of ribosomal DNA transcription: both rat and *Xenopus* UBF1 stimulate rDNA transcription in 3T3 fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 27(4):1205-1213.
- Herdman C, Mars JC, Stefanovsky VY, Tremblay MG, Sabourin-Felix M, Lindsay H, Robinson MD & Moss T (2017) A unique enhancer boundary complex on the mouse ribosomal RNA genes persists after loss of Rrn3 or UBF and the inactivation of RNA polymerase I transcription. *PLoS Genet* 13(7):e1006899.
- Hernandez-Verdun D (2006) The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* 126(2):135-148.
- 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 Res* 19(17):4631-4637.
- Hollenbach AD, McPherson CJ, Mientjes EJ, Iyengar R & Grosveld G (2002) Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* 115(Pt 16):3319-3330.
- Hozák P, Cook PR, Schöfer C, Mosgöller W & Wachtler F (1994) Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 2):639-648.
- Hsu KS & Kao HY (2018) PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. *Cell Biosci* 8:5.

- Hu CH, McStay B, Jeong SW & Reeder RH (1994) xUBF, an RNA polymerase I transcription factor, binds crossover DNA with low sequence specificity. *Mol Cell Biol* 14(5):2871-2882.
- Hwang YJ, Han D, Kim KY, Min SJ, Kowall NW, Yang L, Lee J, Kim Y & Ryu H (2014) ESET methylates UBF at K232/254 and regulates nucleolar heterochromatin plasticity and rDNA transcription. *Nucleic Acids Res* 42(3):1628-1643.
- Ikedo C, Kawarai T, Setoyama C, Orlicchio A & Imamura H (2021) Recurrent de novo missense variant E210K in UBTF causes juvenile dystonia-parkinsonism. *Neurol Sci* 42(3):1217-1219.
- James C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KM, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL & Looker KJ (2020) Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ* 98(5):315-329.
- 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.
- Jantzen HM, Chow AM, King DS & Tjian R (1992) Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes Dev* 6(10):1950-1963.
- Jensen K, Shiels C & Freemont PS (2001) PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20(49):7223-7233.
- Jin T, Perry A, Jiang J, Smith P, Curry JA, Unterholzner L, Jiang Z, Horvath G, Rathinam VA, Johnstone RW, Hornung V, Latz E, Bowie AG, Fitzgerald KA & Xiao TS (2012) Structures of the HIN domain:DNA complexes reveal ligand binding and activation mechanisms of the AIM2 inflammasome and IFI16 receptor. *Immunity* 36(4):561-571.
- Johnson KE, Bottero V, Flaherty S, Dutta S, Singh VV & Chandran B (2014) IFI16 restricts HSV-1 replication by accumulating on the hsv-1 genome, repressing HSV-1 gene expression, and directly or indirectly modulating histone modifications. *PLoS Pathog* 10(11):e1004503.
- 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.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P & Hassabis D (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596(7873):583-589.
- Justilien V, Lewis KC, Meneses KM, Jamieson L, Murray NR & Fields AP (2020) Protein kinase C₁ promotes UBF1-ECT2 binding on ribosomal DNA to drive rRNA synthesis and transformed growth of non-small-cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 295(24):8214-8226.
- Kao CF, Chen SY & Lee YH (2004) Activation of RNA polymerase I transcription by hepatitis C virus core protein. *J Biomed Sci* 11(1):72-94.
- 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.) Wolters Kluwer, Philadelphia, PA, 7 Ed Vol 2. p 235-296.

- Kong R, Zhang L, Hu L, Peng Q, Han W, Du X & Ke Y (2011) hALP, a novel transcriptional U three protein (t-UTP), activates RNA polymerase I transcription by binding and acetylating the upstream binding factor (UBF). *J Biol Chem* 286(9):7139-7148.
- Kozlova AL, Valieva ME, Maluchenko NV & Studitsky VM (2018) [HMGB Proteins as DNA Chaperones That Modulate Chromatin Activity]. *Mol Biol (Mosk)* 52(5):737-749.
- Lai YS, Tseng HB & Hu CH (1996) The dimerization domain upstream binding factor contains multiple helical structures. *Biochem Biophys Res Commun* 220(3):816-823.
- Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honoré N, Doubeikovsky A, Duprez E, Pandolfi PP, Puvion E, Freemont P & de Thé H (2001) Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193(12):1361-1371.
- 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. *J Cell Sci* 119(Pt 12):2621-2631.
- Lee J, Hwang YJ, Boo JH, Han D, Kwon OK, Todorova K, Kowall NW, Kim Y & Ryu H (2011) Dysregulation of upstream binding factor-1 acetylation at K352 is linked to impaired ribosomal DNA transcription in Huntington's disease. *Cell Death Differ* 18(11):1726-1735.
- Lessard F, Morin F, Ivanchuk S, Langlois F, Stefanovsky V, Rutka J & Moss T (2010) The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I. *Mol Cell* 38(4):539-550.
- Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC & Allis CD (2010) Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32):14075-14080.
- Li T, Hu JF, Qiu X, Ling J, Chen H, Wang S, Hou A, Vu TH & Hoffman AR (2008) CTCF regulates allelic expression of *Igf2* by orchestrating a promoter-polycomb repressive complex 2 intrachromosomal loop. *Mol Cell Biol* 28(20):6473-6482.
- Lin CH, Platt MD, Ficarro SB, Hoofnagle MH, Shabanowitz J, Comai L, Hunt DF & Owens GK (2007) Mass spectrometric identification of phosphorylation sites of rRNA transcription factor upstream binding factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(5):C1617-1624.
- Lin CY, Navarro S, Reddy S & Comai L (2006) CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction. *Nucleic Acids Res* 34(17):4752-4766.
- Loret S, Guay G & Lippé R (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol* 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. *J Virol* 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).
- Lutz M, Burke LJ, Barreto G, Goeman F, Greb H, Arnold R, Schultheiss H, Brehm A, Kouzarides T, Lobanenko V & Renkawitz R (2000) Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 28(8):1707-1713.

- Lymberopoulos MH, Bourget A, Ben Abdeljelil N & Pearson A (2011) Involvement of the UL24 protein in herpes simplex virus 1-induced dispersal of B23 and in nuclear egress. *Virology* 412(2):341-348.
- 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. *J Virol* 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. *J Virol* 96(8):e0027922.
- Maul GG, Guldner HH & Spivack JG (1993) Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol* 74 (Pt 12):2679-2690.
- McStay B, Frazier MW & Reeder RH (1991) xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 5(11):1957-1968.
- Meraner J, Lechner M, Loidl A, Goralik-Schramel M, Voit R, Grummt I & Loidl P (2006) Acetylation of UBF changes during the cell cycle and regulates the interaction of UBF with RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* 34(6):1798-1806.
- Merkel PE & Knipe DM (2019) Role for a Filamentous Nuclear Assembly of IFI16, DNA, and Host Factors in Restriction of Herpesviral Infection. *mBio* 10(1).
- Merkel PE, Orzalli MH & Knipe DM (2018) Mechanisms of Host IFI16, PML, and Daxx Protein Restriction of Herpes Simplex Virus 1 Replication. *J Virol* 92(10).
- Mettenleiter TC, Klupp BG & Granzow H (2006) Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* 9(4):423-429.
- Moss T, LeDoux MS & Crane-Robinson C (2023) HMG-boxes, ribosomopathies and neurodegenerative disease. *Front Genet* 14:1225832.
- Moss T, Mars JC, Tremblay MG & Sabourin-Felix M (2019) The chromatin landscape of the ribosomal RNA genes in mouse and human. *Chromosome Res* 27(1-2):31-40.
- Negorev DG, Vladimirova OV, Ivanov A, Rauscher F, 3rd & Maul GG (2006) Differential role of Sp100 isoforms in interferon-mediated repression of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein expression. *J Virol* 80(16):8019-8029.
- Negorev DG, Vladimirova OV & Maul GG (2009) Differential functions of interferon-upregulated Sp100 isoforms: herpes simplex virus type 1 promoter-based immediate-early gene suppression and PML protection from ICP0-mediated degradation. *J Virol* 83(10):5168-5180.
- O'Mahony DJ & Rothblum LI (1991) Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(8):3180-3184.
- O'Mahony DJ, Xie WQ, Smith SD, Singer HA & Rothblum LI (1992) Differential phosphorylation and localization of the transcription factor UBF in vivo in response to serum deprivation. In vitro dephosphorylation of UBF reduces its transactivation properties. *J Biol Chem* 267(1):35-38.
- O'Sullivan AC, Sullivan GJ & McStay B (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* 22(2):657-668.

- Orzalli MH, Conwell SE, Berrios C, DeCaprio JA & Knipe DM (2013) Nuclear interferon-inducible protein 16 promotes silencing of herpesviral and transfected DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(47):E4492-4501.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(44):E3008-3017.
- Ouellet Lavallée G & Pearson A (2015) Upstream binding factor inhibits herpes simplex virus replication. *Virology* 483:108-116.
- Packard JE & Dembowski JA (2021) HSV-1 DNA Replication-Coordinated Regulation by Viral and Cellular Factors. *Viruses* 13(10).
- Pelletier G, Stefanovsky VY, Faubladiere M, Hirschler-Laszkiwicz I, Savard J, Rothblum LI, Côté J & Moss T (2000) Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Mol Cell* 6(5):1059-1066.
- Pires de Mello CP, Bloom DC & Paixão IC (2016) Herpes simplex virus type-1: replication, latency, reactivation and its antiviral targets. *Antivir Ther* 21(4):277-286.
- Putnam CD, Copenhaver GP, Denton ML & Pikaard CS (1994) The RNA polymerase I transactivator upstream binding factor requires its dimerization domain and high-mobility-group (HMG) box 1 to bend, wrap, and positively supercoil enhancer DNA. *Mol Cell Biol* 14(10):6476-6488.
- 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. *Virol J* 12:62.
- 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 Res* 69(5):2057-2064.
- Reeves R (2015) High mobility group (HMG) proteins: Modulators of chromatin structure and DNA repair in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 36:122-136.
- 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.
- Roussel P, André C, Masson C, Géraud G & Hernandez-Verdun D (1993) Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci* 104 (Pt 2):327-337.
- 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 Res* 25(2):201-212.
- Sanij E, Poortinga G, Sharkey K, Hung S, Holloway TP, Quin J, Robb E, Wong LH, Thomas WG, Stefanovsky V, Moss T, Rothblum L, Hannan KM, McArthur GA, Pearson RB & Hannan RD (2008) UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J Cell Biol* 183(7):1259-1274.

- Sedláčková L, Laššuthová P, Štěrbová K, Haberlová J, Vyhnálková E, Neupauerová J, Staněk D, Šedivá M, Kršek P & Seeman P (2019) UBTF Mutation Causes Complex Phenotype of Neurodegeneration and Severe Epilepsy in Childhood. *Neuropediatrics* 50(1):57-60.
- Simon JA & Kingston RE (2009) Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(10):697-708.
- 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. *J Virol* 90(19):8621-8633.
- Smith MC, Box AC, Haug JS, Lane WS & Davido DJ (2014) A Phospho-SIM in the Antiviral Protein PML is Required for Its Recruitment to HSV-1 Genomes. *Cells* 3(4):1131-1158.
- Sodroski CN & Knipe DM (2023) Nuclear interferon-stimulated gene product maintains heterochromatin on the herpes simplex viral genome to limit lytic infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120(45):e2310996120.
- Spear PG (1993) Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminars in Virology* 4(3):167-180.
- Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI & Moss T (2006) Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell* 21(5):629-639.
- Stefanovsky V & Moss T (2006) Regulation of rRNA synthesis in human and mouse cells is not determined by changes in active gene count. *Cell Cycle* 5(7):735-739.
- 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 Res* 24(16):3208-3215.
- Stefanovsky VY & Moss T (2008) The splice variants of UBF differentially regulate RNA polymerase I transcription elongation in response to ERK phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 36(15):5093-5101.
- Stefanovsky VY, Pelletier G, Bazett-Jones DP, Crane-Robinson C & Moss T (2001a) DNA looping in the RNA polymerase I enhancerosome is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res* 29(15):3241-3247.
- Stefanovsky VY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI & Moss T (2001b) An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* 8(5):1063-1073.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL & Thompson LM (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413(6857):739-743.
- Sternsdorf T, Jensen K & Will H (1997) Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* 139(7):1621-1634.
- Stow ND, Evans VC & Matthews DA (2009) Upstream-binding factor is sequestered into herpes simplex virus type 1 replication compartments. *J Gen Virol* 90(Pt 1):69-73.
- Stros M (2010) HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta* 1799(1-2):101-113.
- Toro C, Hori RT, Malicdan MCV, Tiffit CJ, Goldstein A, Gahl WA, Adams DR, Fauni HB, Wolfe LA, Xiao J, Khan MM, Tian J, Hope KA, Reiter LT, Tremblay MG, Moss T, Franks AL,

- Balak C & LeDoux MS (2018) A recurrent de novo missense mutation in UBTF causes developmental neuroregression. *Hum Mol Genet* 27(4):691-705.
- Tremblay MG, Sibai DS, Valère M, Mars JC, Lessard F, Hori RT, Khan MM, Stefanovsky VY, LeDoux MS & Moss T (2022) Ribosomal DNA promoter recognition is determined in vivo by cooperation between UBTF1 and SL1 and is compromised in the UBTF-E210K neuroregression syndrome. *PLoS Genet* 18(2):e1009644.
- 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. *Mol Cell Biol* 19(4):2872-2879.
- Ueshima S, Nagata K & Okuwaki M (2017) Internal Associations of the Acidic Region of Upstream Binding Factor Control Its Nucleolar Localization. *Mol Cell Biol* 37(22).
- 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. *Nat Immunol* 11(11):997-1004.
- Van Damme E, Laukens K, Dang TH & Van Ostade X (2010) A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci* 6(1):51-67.
- van de Nobelen S, Rosa-Garrido M, Leers J, Heath H, Soochit W, Joosen L, Jonkers I, Demmers J, van der Reijden M, Torrano V, Grosveld F, Delgado MD, Renkawitz R, Galjart N & Sleutels F (2010) CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats. *Epigenetics Chromatin* 3(1):19.
- Voit R & Grummt I (2001) Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24):13631-13636.
- Voit R, Hoffmann M & Grummt I (1999) Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J* 18(7):1891-1899.
- Voit R, Kuhn A, Sander EE & Grummt I (1995) Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res* 23(14):2593-2599.
- Voit R, Schnapp A, Kuhn A, Rosenbauer H, Hirschmann P, Stunnenberg HG & Grummt I (1992) The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J* 11(6):2211-2218.
- Washington SD, Musarrat F, Ertel MK, Backes GL & Neumann DM (2018) CTCF Binding Sites in the Herpes Simplex Virus 1 Genome Display Site-Specific CTCF Occupation, Protein Recruitment, and Insulator Function. *J Virol* 92(8).
- Westdorp KN, Sand A, Moorman NJ & Terhune SS (2017) Cytomegalovirus Late Protein pUL31 Alters Pre-rRNA Expression and Nuclear Organization during Infection. *J Virol* 91(18).
- Whitley RJ & Johnston C (2021) Herpes Simplex Viruses: Pathogenesis and Clinical Insights. *Fields Virology*, Howley Pm & Knipe Dm (Édit.) Wolters Kluwer, Philadelphia, PA, 7 Ed Vol 2. p 297-323.
- Xu P, Mallon S & Roizman B (2016) PML plays both inimical and beneficial roles in HSV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(21):E3022-3028.

- Xu P & Roizman B (2017) The SP100 component of ND10 enhances accumulation of PML and suppresses replication and the assembly of HSV replication compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(19):E3823-E3829.
- 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.
- Yanai H, Ban T & Taniguchi T (2012) High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity. *Trends Immunol* 33(12):633-640.
- Yang L, Xia L, Wu DY, Wang H, Chansky HA, Schubach WH, Hickstein DD & Zhang Y (2002) Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene* 21(1):148-152.
- 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.
- 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. *Mol Cell Biol* 19(4):2791-2802.
- Zhu S & Viejo-Borbolla A (2021) Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence* 12(1):2670-2702.