

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
INRS-Institut Armand-Frappier

**RÔLE DE PROTÉINES NUCLÉOLAIRES
DANS L'INFECTION PAR LE
VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX 1**

Par
Gabriel Ouellet Lavallée

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Magister Scientiæ, M.Sc.
en immunologie et virologie

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
examinatrice interne

Maritza Jaramillo
Centre-INRS Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Jacques Archambault
Institut de Recherches Cliniques de Montréal

Directrice de recherche

Angela Pearson
Centre-INRS Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche pour son encadrement et son soutien pendant ma maîtrise. J'ai beaucoup appris durant ces années grâce à son enseignement et ses critiques constructives. Merci pour la confiance qui m'a été accordée. Je veux aussi remercier les membres du laboratoire que j'ai côtoyés et avec qui j'ai partagé de bons moments. Merci à Alexandre Rochette, Amélie Bourget, Annie Rochette, Carolina Sanabria, Ginette Denis, Luc Bertrand et Nawel Ben Abdeljelil pour l'aide qu'ils ont apporté à mon projet et pour les discussions intéressantes.

Merci à toute ma famille qui a manifesté son encouragement et son intérêt pour ma maîtrise. Je veux remercier particulièrement mes parents, qui m'ont toujours supporté et encouragé à poursuivre mes études. Je suis reconnaissant pour tous les efforts que vous avez faits durant mon parcours académique.

En terminant, je tiens à remercier chaleureusement Rima Habib, avec qui j'ai partagé tous ces moments. Merci d'avoir partagé les bons moments et rendu meilleurs les plus ardues. Merci de m'avoir accompagné durant les années passées à la maîtrise et pour toute la compréhension dont tu as fait preuve.

RÉSUMÉ

Le virus de l'herpès simplex 1 (VHS-1) est un agent pathogène très répandu dans la population humaine. Il infecte les cellules épithéliales des muqueuses et est connu pour causer les feux sauvages. La réplication du virus dans le noyau de la cellule hôte y cause plusieurs changements, notamment la formation des compartiments de réplication virale et la relocalisation de certaines protéines du nucléole.

Une protéine nucléolaire impliquée dans la synthèse des ribosomes, UBF pour « *Upstream Binding Factor* », fait partie des protéines relocalisées lors de l'infection. Ses fonctions sont d'initier la production des transcrits ribosomiaux et de faciliter leur élongation. B23 est également une protéine nucléolaire relocalisée lors de l'infection et est impliquée principalement dans la maturation des sous-unités ribosomiales et la régulation du cycle cellulaire.

La localisation d'UBF est normalement dans le centre fibrillaire, au centre du nucléole. Cependant, l'infection par le VHS-1 entraîne le recrutement d'UBF aux compartiments de réplication virale. La localisation de B23 passe de nucléolaire à dispersée au noyau lors de l'infection. Notre hypothèse était que les protéines nucléolaires relocalisées lors de l'infection par le VHS-1 servent à la réplication virale.

Afin de vérifier cette hypothèse, la stratégie principale mise au point a été de diminuer l'expression de ces protéines par une technique d'interférence à ARN. Nous avons transfecté les cellules humaines d'origine épithéliale HeLa avec des ARN interférents (ARNi) ciblant les ARNm des gènes d'intérêt. Les cellules transfectées ont ensuite été infectées par le virus de type sauvage KOS.

Après avoir infecté les cellules dont l'expression de B23 était réduite, aucun changement significatif sur la production de particules virales infectieuses n'a été observé. Contrairement à l'hypothèse de départ, la réplication virale était plus importante dans les cellules où l'expression d'UBF était diminuée. Chez les cellules déplétées en UBF, un titre viral plus élevé de dix fois par rapport au témoin transfecté avec des ARNi ne ciblant aucun gène a été observé. Une quantification relative par qPCR a permis de déterminer que la réplication du génome viral était plus importante dans les cellules transfectées avec des ARNi contre UBF que dans les cellules témoins. Une analyse par immunobuvardage de type western a aussi montré que la synthèse de protéines virales était augmentée dans ces cellules. De plus, la synthèse de protéines immédiates-précoces et précoces est demeurée plus élevée dans les cellules déplétées en

UBF malgré l'ajout d'une drogue qui inhibe la réplication de l'ADN. Ces résultats suggèrent qu'UBF fait partie d'un mécanisme antiviral qui interfère avec la réplication virale tôt dans le cycle de réplication. Ce mécanisme n'est pas restreint au VHS-1, puisqu'une augmentation du nombre de particules virales infectieuses a aussi été observée avec le VHS-2. Nous suggérons qu'UBF agit au niveau de la transcription des gènes à partir du génome entrant.



Gabriel Ouellet Lavallée



Angela Pearson

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IX
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
Virus de l'herpès simplex	2
Taxonomie des virus herpès	2
Morphologie du VHS-1	2
Cycle de réplication lytique	4
<i>Attachement et entrée</i>	<i>5</i>
<i>Transport au noyau</i>	<i>6</i>
<i>Expression des gènes viraux.....</i>	<i>7</i>
<i>Réplication du génome.....</i>	<i>8</i>
<i>Encapsidation et sortie</i>	<i>9</i>
Pathogenèse	11
Latence et réactivation	12
Le nucléole.....	13
Organisation et morphologie	13
Fonctions du nucléole	15
<i>Biogenèse des ribosomes</i>	<i>15</i>
<i>Régulation du cycle cellulaire</i>	<i>16</i>
<i>Réponses aux stress.....</i>	<i>16</i>
Protéines nucléolaires étudiées	17
<i>Upstream Binding Factor.....</i>	<i>17</i>
<i>B23 / NPM1 / Nucleophosmin / NO38 / Numatrin</i>	<i>20</i>
Interactions entre certains virus et des protéines nucléolaires	22

Adénovirus	22
Virus de l'hépatite C	23
Virus de l'immunodéficience humaine	23
Virus de la poliomyélite	24
Virus de l'herpès simplex 1	24
Réponse antivirale intrinsèque contre le VHS-1	25
Nuclear Domain 10	25
Réparation de l'ADN	27
Problématique.....	28
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	29
Culture cellulaire.....	30
Immunobuvardage de type western.....	30
Extraction des protéines.....	30
SDS-PAGE	31
Anticorps	31
Interférence à ARN	32
ARNi Dharmacon	32
ARNi Invitrogen	33
Virus et infections.....	33
Détermination des titres viraux	34
PCR en temps réel	35
Extraction d'ADN.....	35
PCR en temps réel.....	35
Statistiques et alignements	36
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	37
B23	38
Diminution de l'expression de B23 par interférence à ARN	38
Importance de B23 pour la production de particules virales infectieuses.....	40
UBF	41
Diminution de l'expression d'UBF par interférence à ARN	41

Importance d'UBF pour la production de particules virales infectieuses	42
<i>Spécificité de l'effet des ARNi UBF</i>	44
Impact d'UBF sur le cycle de réplication virale	45
<i>Impact sur le niveau de protéines structurales</i>	46
<i>Impact sur la réplication du génome viral</i>	46
<i>Impact sur le niveau de protéines IP et P</i>	48
Effet d'UBF sur la réplication du VSH-2	50
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	52
B23	53
UBF	54
Hypothèse actuelle.....	56
Travaux futurs	57
CHAPITRE 5 : CONCLUSION.....	59
RÉFÉRENCES.....	61

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Orientations des segments UL et US du génome viral	3
Figure 2 : Structure du virion	4
Figure 3 : Cycle de réplication lytique.....	5
Figure 4 : Schématisation de l'organisation du nucléole	14
Figure 5 : Représentation des deux isoformes d'UBF	18
Figure 6 : Modèle de l'augmentation du taux d'élongation de la transcription en réponse à la phosphorylation d'UBF par ERK.....	20
Figure 7 : Représentation des domaines et sites de régulation de B23.1	22
Figure 8 : Schématisation des événements liés aux ND10 suivant l'entrée du génome viral	26
Figure 9 : Alignement des séquences de B23 et des ARNi B23	38
Figure 10 : Niveau de B23 après transfection avec les ARNi	39
Figure 11 : Réplication virale lors d'une diminution de l'expression de B23.....	40
Figure 12 : Alignement des séquences d'UBF et des ARNi UBF.....	41
Figure 13 : Niveau d'UBF après transfection avec les ARNi Dharmacon.....	42
Figure 14 : Réplication virale lors d'une diminution de l'expression d'UBF	43
Figure 15 : Niveau d'UBF après transfection avec les ARNi d'Invitrogen.....	44
Figure 16 : Réplication virale lors d'une diminution de l'expression d'UBF par les ARNi d'Invitrogen	45
Figure 17 : Impact d'UBF sur l'expression de protéines virales structurales	46
Figure 18 : Effet d'UBF sur la réplication de l'ADN viral.....	47
Figure 19 : Impact d'UBF sur l'expression des protéines IP et P	48
Figure 20 : Impact d'UBF sur l'expression des protéines IP et P en absence de réplication d'ADN viral.....	49
Figure 21 : Réplication du VHS-2 lors d'une diminution de l'expression d'UBF	50

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomal
ATM : « ataxia telangiectasia mutated »
ATR : « ataxia telangiectasia and Rad3-related »
CCSC : « C-capsid-specific components »
CDK : « cyclin-dependent-kinase »
ARNi : ARN interférent
DFC : « dense fibrillar component »
FC : « fibrillar center »
GC : « granular component »
HMG : « high mobility group »
hpi : heure post-infection
HVEM : « herpesvirus entry mediator »
ICP : « infected cell polypeptide »
ICTV : « International Committee on Taxonomy of Viruses »
IP : immédiat-précoce
IRES : « internal ribosome entry site »
LAT : « latency associated transcript »
m.o.i. : « multiplicity of infection »
ND10 : « nuclear domain 10 »
NES : « nuclear export signal »
NLS : « nuclear localisation signal »
NoLS : « nucleolar localisation signal »
NOR : « nucleolus organizer region »
OF-1 : « origin factor 1 »
P : précoce
PAA : « phosphonoacetic acid »
pfu : « plaque forming unit »
Pol I : ARN polymérase I
P/S : pénicilline et streptomycine
RNP : complexe ribonucléoprotéique

SDS : « sodium dodecylsulfate »
snoRNA : « small nucleolar RNA »
snoRNP : « small nucleolar ribonucleoprotein »
T : tardif
UCE : « upstream control element »
UL : « unique long »
US : « unique short »
VHC : virus de l'hépatite C
VHS : virus de l'herpès simplex
vhs : « virion host shutoff »
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VP : « viral protein »

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX

Taxonomie des virus herpès

Les virus herpès sont très répandus dans le règne animal, avec des représentants dans plusieurs espèces. Le « *International Committee on Taxonomy of Viruses* » (ICTV), classifie les virus herpès de la façon suivante. L'ordre des *Herpesvirales* regroupe trois familles : *Alloherpesviridae*, *Malacoherpesviridae* et *Herpesviridae*. La famille des *Alloherpesviridae* se subdivise en quatre genres qui infectent des amphibiens de la famille des *Ranidae* et des poissons de la famille des *Cyprinidae*, *Anguillidae*, *Acipenseridae* et *Ictaluridae*. La famille des *Malacoherpesviridae*, quant à elle ne compte qu'un genre, soit *Ostreavirus*, dont la seule espèce est le *Osterid herpesvirus 1*. Les virus de la famille *Herpesviridae* sont répartis en trois sous-familles qui contiennent chacune entre quatre et cinq genres et plusieurs dizaines d'espèces infectant également une grande variété d'hôtes vertébrés. Il y a cependant huit virus humains qui seront décrits plus en détail.

La sous-famille *Alphaherpesvirinae* comprend le genre *Simplexvirus* qui inclut les espèces de l'herpès simplex 1 et 2 (VHS-1 et VHS-2), et le genre *Varicellovirus* qui comprend l'espèce varicella-zoster. Les *Alphaherpesvirinae* ont un cycle de réplication plus court que les autres virus herpès humains et ont un tropisme neuronal.

La sous-famille *Betaherpesvirinae* comprend le genre *Cytomegalovirus*, dont le représentant humain est le cytomégalovirus humain. Les herpèsvirus humains 6 et 7, du genre *Roseolovirus*, font également partie de cette sous-famille. Les *Betaherpesvirus* ont un cycle de réplication lent, tant chez l'hôte qu'en culture cellulaire.

La sous-famille *Gammaherpesvirinae* comprend les genres *Lymphocryptovirus* et *Rhadinovirus*, dont les représentants humains sont respectivement le virus Epstein-Barr et le virus associé au sarcome de Kaposi. Ces virus ont un tropisme lymphocytaire et sont oncogéniques.

Morphologie du VHS-1

Le génome du VHS-1 est un brin linéaire d'ADN bicaténaire de 152 kb. Son contenu en GC avoisine 68% et il code pour au moins 84 protéines (Roizman *et al.*, 2007). Le génome est dépourvu d'histone sous la forme encapsidée. Cependant, des polyamines servent à neutraliser les charges négatives de l'ADN, permettant une haute densité d'encapsidation (Gibson *et al.*,

1971, Leinbach *et al.*, 1980). Le génome est composé de deux parties majeures qui sont flanquées de régions répétées : UL « *unique long* » et US « *unique short* » (Figure 1). Il est possible de retrouver le génome dans quatre conformations différentes à des concentrations équimolaires, qui varient selon l'orientation des composantes UL et US (Hayward *et al.*, 1975).

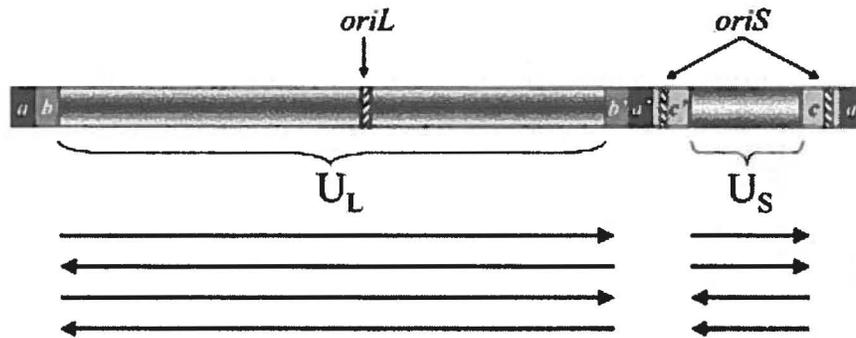


Figure 1 : Orientations des segments UL et US du génome viral
 Représentation des quatre isoformes pouvant être retrouvés selon l'orientation des segments UL et US. Les boîtes *a*, *b* et *c* représentent les régions répétées qui flanquent les régions UL et US. Les régions hachurées sont les origines de réplication *oriL* et *oriS*. Les flèches horizontales montrent les orientations possibles des segments UL et US. Modifiée de : Boehmer *et al.*, 2003

Trois formes de capsides se retrouvent dans les cellules infectées, nommées A, B et C. Les formes A et B sont considérées comme des formes abortives de l'encapsidation étant donné l'absence de génomes (Conway, 2011). La capside mature contenant le génome (capside C) est de forme icosaédrique de symétrie T=16 pour la couche externe et possède une couche interne de symétrie T=4 (Schrag *et al.*, 1989). La structure de la capside est composée principalement à partir de quatre protéines virales : VP5 (UL19), protéine majeure qui s'arrange en hexons et pentons pour former les capsomères, VP19c (UL38) et VP23 (UL18) qui lient les capsomères ensemble et VP26 (UL35) qui s'assemble en hexamères sur les hexons de VP5 (Zhou *et al.*, 1995). Un portail permettant l'entrée du génome est formé de la protéine UL6 (Newcomb *et al.*, 2001).

Un tégument protéique entoure la capside (Figure 2). Ce tégument contiendrait entre 20 et 23 protéines virales qui servent lors de l'entrée du virion dans la cellule avant la synthèse des nouvelles protéines virales (Loret *et al.*, 2008 et revue dans Kelly *et al.*, 2009). Ces protéines serviront principalement à diriger les capsides au noyau (ex : UL14), à réguler l'expression génique cellulaire et virale (ex : VP16, ICP0), à contrer la réponse à l'interféron (ex : UL13) et à

l'assemblage des virions à la fin du cycle viral (ex : VP1/2) (Coller *et al.*, 2007, Hwang *et al.*, 2009, Yamauchi *et al.*, 2008 et revue dans Kelly *et al.*, 2009).

L'extérieur du virion est une enveloppe bi-lipidique dans laquelle sont insérées des glycoprotéines virales : gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, gM, ainsi que certaines protéines non-glycosylées, encodées par *ul20* et *us9* (Loret *et al.*, 2008, Roizman *et al.*, 2007). La présence d'autres protéines est également soupçonnée.

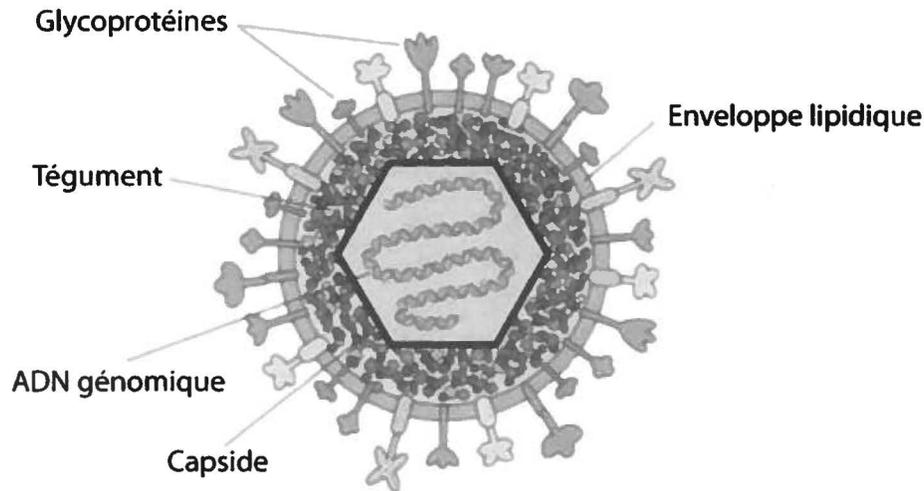


Figure 2 : Structure du virion

L'ADN génomique double brin linéaire, au centre, est dans une capsid protéique icosaédrique. Un tégument contenant des protéines virales et cellulaires est situé entre la capsid et l'enveloppe lipidique. Les glycoprotéines virales régulant l'attachement et l'entrée y sont insérées. Image tirée de <http://www.bact.wisc.edu/>.

Cycle de réplication lytique

L'infection des cellules épithéliales des muqueuses par le VHS-1 résulte en une réplication virale accrue qui mène ultimement à la lyse des cellules infectées et à sa dissémination. Le cycle de réplication virale qui se déroule dans le cytoplasme et dans le noyau s'effectue en plusieurs étapes ordonnées (Figure 3).

fusion lors de sa liaison avec les « *herpesvirus entry mediator* » (HVEM), les nectines 1 et 2, ou les héparines 3-O-sulfatées. Cette interaction permet d'initier la fusion en induisant un changement conformationnel de gD, ce qui expose un domaine pro-fusion (Cocchi *et al.*, 2004, Fusco *et al.*, 2005). En effet, le complexe de fusion composé de gB et gH-gL est assemblé par le domaine pro-fusion de gD (Atanasiu *et al.*, 2007). La glycoprotéine gB catalyse ensuite la fusion des membranes via son interaction avec ses récepteurs, soit les héparines sulfates, DC-SIGN, MAG et NM2a (revue dans Connolly *et al.*, 2011). Les glycoprotéines gH et gL forment un hétérodimère et peuvent lier des intégrines elles-mêmes, mais leur rôle dans la fusion est dû à l'interaction avec gB, ce qui mène à la formation du complexe de fusion (Atanasiu *et al.*, 2007, Parry *et al.*, 2005). Selon les types cellulaires, l'entrée peut aussi se faire via l'endocytose de la particule virale, soit de façon pH-dépendante ou pH-indépendante (Milne *et al.*, 2005, Nicola *et al.*, 2005, Nicola *et al.*, 2003). Les glycoprotéines gB, gD, gH et gL sont également requises lors de l'endocytose (Nicola *et al.*, 2004).

Transport au noyau

Une fois les membranes virale et cellulaire fusionnées, le tégument protéique et la capside se retrouvent à l'intérieur de la cellule. Le principal rôle du tégument est de créer un environnement permmissible et favorable à la réplication du virus. Dans un premier temps, la protéine « *virion host shutoff* » (vhs), entraîne la dégradation des ARNm grâce à son activité RNase intrinsèque, ce qui met fin à pratiquement toute traduction dans la cellule infectée (Zelus *et al.*, 1996). Cette fonction exclut toutefois les ARNm viraux lorsque la protéine virale VP16 est synthétisée (Knez *et al.*, 2003, Lam *et al.*, 1996). La protéine vhs est également capable de réguler la traduction de façon indépendante de son activité RNase (Saffran *et al.*, 2010).

VP22, une protéine multifonctionnelle et abondante du tégument, possède des motifs de liaison aux microtubules et à la chromatine (Martin *et al.*, 2002). VP22 regroupe les microtubules tôt dans l'infection ce qui les stabilisent, mais induira leur désorganisation plus tard dans le cycle viral, ce qui causera la relocalisation de VP22 au noyau (Elliott *et al.*, 1998, Kotsakis *et al.*, 2001). Il a été montré également que VP22 peut promouvoir la synthèse de protéines virales tard dans l'infection et l'accumulation de quelques transcrits viraux à des temps précoces. Elle peut aussi réguler la transcription de la *thymidine kinase virale* et de *gC* via une interaction avec ICP0 (Duffy *et al.*, 2009, Yu *et al.*, 2010).

ICP0 est une protéine immédiate-précoce, mais qui a tout de même été détectée dans une préparation purifiée de virions (Loret *et al.*, 2008, Yao *et al.*, 1992). Cette protéine occupe plusieurs fonctions importantes dans la réplication du VHS, surtout en lien avec l'évasion des mécanismes de défense intracellulaire qui sera discutée plus loin. La raison de la présence d'ICP0 dans le tégument reste à être confirmée, mais une étude récente montre qu'ICP0 est importante pour le transport des capsides au noyau, possiblement à cause de son activité E3-ubiquitine ligase et son interaction avec le protéasome (Delboy *et al.*, 2011). Il a déjà été démontré que le protéasome est important pour le transport des capsides au noyau (Delboy *et al.*, 2008). Des mutants en ICP0 montrent un transport au noyau altéré. En présence d'ICP0 dans le tégument, une inhibition du protéasome interfère avec le transport des capsides au noyau (Delboy *et al.*, 2011). Les auteurs de cette étude suggèrent qu'ICP0 du tégument permettrait une dégradation de certaines protéines du virion ou du cytosquelette par le protéasome et faciliterait ainsi le transport au noyau.

Une partie du tégument reste lié à la capsidie pendant son transport jusqu'aux pores nucléaires via les microtubules (Dohner *et al.*, 2002, Morrison *et al.*, 1998, Sodeik *et al.*, 1997). Au moins deux protéines virales sont impliquées dans l'attachement de la capsidie aux pores nucléaires, UL25 et UL36 (VP1/2) (Copeland *et al.*, 2009, Padeloup *et al.*, 2009). L'interaction de ces protéines avec le complexe des pores nucléaires permet l'orientation de la capsidie et son attachement. Toutefois, le mécanisme précis d'injection du génome viral à l'intérieur du noyau est inconnu. L'hypothèse principale est que le génome est sous pression à l'intérieur de la capsidie (revue dans Liashkovich *et al.*, 2011). La base de cette hypothèse est la similitude entre la capsidie virale du VHS-1 et celle de certains bactériophages (Baker *et al.*, 2005). Dans ces bactériophages, le génome peut être encapsidé sous pression, ce qui permet l'éjection au moment de la liaison de la capsidie à son récepteur (Evilevitch *et al.*, 2003, Smith *et al.*, 2001).

Expression des gènes viraux

L'expression des gènes viraux se produit en une cascade ordonnée (Honest *et al.*, 1974). Les trois classes principales de gènes sont les immédiats-précoces (IP ou α), précoces (P ou β) et tardifs (T ou γ) et leur transcription est faite dans le noyau par l'ARN polymérase II cellulaire (Costanzo *et al.*, 1977). Les protéines IP sont ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, et US1.5 et sont les premières à être produites. La transcription des gènes IP ne dépend pas d'autres protéines virales, mais elle est favorisée par la présence de VP16 (Ace *et al.*, 1989, Campbell *et al.*, 1984, Poon *et al.*, 1995). VP16 agit avec HCF et Oct-1, deux protéines cellulaires, et le

complexe qu'elles forment permet de recruter les facteurs de transcription aux promoteurs des gènes IP (revue dans Weir, 2001). Les principales fonctions des protéines IP sont de contrer les défenses de l'hôte (ICP0, ICP47), de réguler la transcription des classes de gènes viraux (ICP4, ICP27) et de réguler l'activité de l'ARN polymérase II (ICP22, ICP27). L'expression de la deuxième classe de gènes requiert la présence d'ICP4 comme facteur de transcription. Les protéines précoces sont impliquées principalement dans la réplication de l'ADN. Par exemple, ICP8 est une protéine liant l'ADN simple brin, UL30 est l'ADN polymérase et UL23 est la thymidine kinase virale. La dernière classe de gènes est divisée en deux sous-classes selon leur dépendance à la réplication de l'ADN viral. Les γ_1 , ou « *leaky late* », peuvent être exprimés sans la réplication de l'ADN, malgré que cette dernière augmente leur transcription (Godowski *et al.*, 1986). Les γ_2 , ou « *true late* », requièrent la réplication de l'ADN viral (revue dans Roizman *et al.*, 2007). Les protéines T sont principalement impliquées dans l'assemblage des nouveaux virions. Par exemple, cette classe de gènes comprend les protéines de la capsid, le complexe terminase qui encapside les génomes et les glycoprotéines virales (revue dans Roizman *et al.*, 2007). Cette classe contient aussi certaines protéines du tégument qui seront utilisées lors de l'entrée de la nouvelle particule virale, par exemple vhs et VP16 (revue dans Kelly *et al.*, 2009).

Réplication du génome

Suivant l'entrée du génome dans le noyau, le brin d'ADN linéaire se circularise (Garber *et al.*, 1993). Le génome possède trois origines de réplication, la première se situe dans la partie UL (oriL) et les deux autres se trouvent dans chacune des parties c qui encadrent la région US (oriS) (Figure 1). Même si les origines ne sont pas identiques, il semble y avoir une certaine redondance, puisque la mutation d'une ou de deux origines permet toujours la réplication (Igarashi *et al.*, 1993, Longnecker *et al.*, 1986, Polvino-Bodnar *et al.*, 1987). À ces origines de réplication se lient des facteurs viraux et cellulaires pour initier la réplication. Dans un premier temps, la protéine virale UL9 est essentielle pour l'initiation de la réplication en se liant aux origines de réplication, ce qui induit un changement de conformation de celles-ci (Koff *et al.*, 1991). L'interaction d'UL9 avec ICP8, une protéine liant l'ADN simple brin, permet d'ouvrir la double hélice, de stabiliser cet état et de stimuler l'activité hélicase d'UL9 (Arana *et al.*, 2001, He *et al.*, 2001). Une étude a également identifié plus de 50 protéines cellulaires ayant co-précipitées avec ICP8 et qui seraient impliquées dans la réplication de l'ADN (Taylor *et al.*, 2004). Deux protéines cellulaires ont été identifiées comme pouvant se lier au site oriS et

participer à l'initiation de la réplication, soit OF-1 pour « *origin factor 1* » et le facteur de transcription Sp1 (Baker *et al.*, 2000, Dabrowski *et al.*, 1994, Nguyen-Huynh *et al.*, 1998). La suite de la séparation des brins est faite par le complexe de l'hélicase composé d'UL5, UL8 et UL52 (Crute *et al.*, 1988, Crute *et al.*, 1989). La réplication du génome est ensuite effectuée par le complexe de la polymérase composé de UL30, la sous-unité catalytique, et de UL42, une sous-unité accessoire responsable d'augmenter la force de liaison au brin matrice (Chow *et al.*, 1995, Gottlieb *et al.*, 1994, Gottlieb *et al.*, 1990).

La réplication du génome du VHS-1 est complexe et les détails de tous les phénomènes observés ne sont pas connus, tels l'inversion des génomes sous forme de concatémères. En effet, la réplication commence de façon thêta et se poursuit en cercle roulant, ce qui produit de long concatémères de génomes « tête-à-queue » (revue dans Boehmer *et al.*, 1997). L'origine des inversions des segments UL et US est due à la recombinaison homologue, qui pourrait jouer un rôle important dans la réplication du génome, autre que de provoquer l'inversion seulement (revue dans Wilkinson *et al.*, 2003). D'autres observations démontrent l'importance de la recombinaison, comme les structures complexes et branchées des intermédiaires de réplication (Severini *et al.*, 1996). Un modèle récent proposé par Okamoto et son équipe suggère une réplication par « double cercle roulant » qui est hautement propice à la recombinaison et pourrait rallier les deux éléments clés de la réplication du génome viral, soit les concatémères et l'inversion des génomes (Okamoto *et al.*, 2011). Enfin, plusieurs protéines cellulaires impliquées dans la recombinaison, la réparation et le remodelage de la chromatine sont recrutées aux compartiments de réplication virale (Taylor *et al.*, 2004). Certaines des protéines cellulaires recrutées participent à la réparation de l'ADN et sont importantes pour une réplication efficace du virus, comme Mre11 et ATM, pour « *ataxia telangiectasia mutated* ». Une diminution de la réplication virale est observée en absence de ces protéines (Lilley *et al.*, 2005). MHS2 et MLH1 sont deux protéines qui font partie d'un mécanisme de réparation des mauvais appariements ou MMR, pour « *mismatch repair* ». Lors d'une diminution de l'expression de ces protéines, un retard dans l'expression de gènes IP et P et dans la réplication est observé (Mohani *et al.*, 2011). Par contre, d'autres protéines cellulaires relocalisées font partie d'une défense antivirale intracellulaire qui sera abordée plus loin.

Encapsidation et sortie

L'assemblage des capsides est observé à l'intérieur du noyau et cette activité forme des régions nommées corps d'inclusions. La chaîne d'assemblage des capsides commence avec la

formation de complexes entre VP5, la protéine majeure de la capsid, et VP22a (UL26.5), la protéine d'échafaudage, qui s'assemblent en capsides sphériques (Newcomb *et al.*, 1996). L'ajout du portail composé de douze copies d'UL6 se fait via une interaction avec les protéines d'échafaudage à ce moment (Newcomb *et al.*, 2005). Cet intermédiaire instable est nommé pro-capsid et peut subir un changement de conformation qui mène à la forme « B ». Cette forme contient toujours les protéines d'échafaudage, mais elle n'est pas une forme productive (revue dans Brown *et al.*, 2011). La protéase UL26 procède normalement à la digestion des ces protéines d'échafaudage (Liu *et al.*, 1993). Une fois la pro-capsid assemblée, mais avant sa maturation, le complexe terminase composé d'UL15, UL28 et UL33 est assemblé et se lie au portail (Sheaffer *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2007). Ce complexe est responsable du clivage des concatémères en génomes uniques et de leur entrée dans la capsid. UL17 et UL25 s'arrangent en dimère et forment les CCSC, pour « *C-capsid-specific components* » (Trus *et al.*, 2007). Ces protéines stabilisent alors la nouvelle conformation de la capsid contenant le génome nommée capsid « C » (Toropova *et al.*, 2011). Une forme abortive de l'encapsidation, nommée A, est caractérisé par l'absence de protéines d'échafaudage et d'ADN (Newcomb *et al.*, 1991). Cette forme ne serait pas causée par un défaut d'initiation de l'empaquetage, mais plutôt par un problème de rétention du génome, étant donné l'absence d'échafaudage et la présence de protéines d'empaquetage de l'ADN (Beard *et al.*, 2004).

Une fois le génome empaqueté, la capsid sort du noyau. Il existe une hypothèse selon laquelle les capsides emprunteraient les pores nucléaires pour sortir du noyau (Wild *et al.*, 2005). Une étude plus récente montrant que les pores nucléaires demeurent majoritairement non-affectés lors de l'infection confirme qu'il est improbable qu'ils soient impliqués dans la sortie des virions (Nagel *et al.*, 2008). Une autre hypothèse veut que la capsid acquière son enveloppe finale au niveau de la membrane nucléaire (Epstein, 1962). Cependant, la composition de l'enveloppe des virions matures n'est pas similaire à celle du noyau (van Genderen *et al.*, 1994). De plus, les capsides semblent se désenvelopper à la membrane externe du noyau (Stackpole, 1969). Une étude plus récente montre qu'une rétention de gD au réticulum endoplasmique diminue grandement sa présence dans l'enveloppe des virions extracellulaires, suggérant que l'enveloppe finale ne provient pas du noyau (Skepper *et al.*, 2001).

Selon le modèle généralement accepté, la capsid sort du noyau en traversant la membrane nucléaire. Les protéines virales UL31 et UL34 sont importantes pour le bourgeonnement initial à la membrane nucléaire interne en entraînant la dispersion de la lamine nucléaire et en donnant

à la capsidie l'accès à la membrane (revue dans Mettenleiter *et al.*, 2006). Ces protéines ne sont toutefois pas retrouvées dans les virions extracellulaires (Loret *et al.*, 2008, Reynolds *et al.*, 2002). La capsidie enveloppée entre la membrane interne et externe du noyau fusionne pour se retrouver désenveloppée dans le cytoplasme (Skepper *et al.*, 2001).

Le recrutement du tégument final se fait une fois que la capsidie est dans le cytoplasme. La protéine de capsidie UL25, en plus d'être impliquée dans le bourgeonnement de la membrane nucléaire, est utilisée pour l'assemblage ordonné du tégument proximal via son interaction avec VP1/2 (Coller *et al.*, 2007, Trus *et al.*, 2007). UL36 et UL37 sont également essentielles à l'ajout du tégument. Sans elles, il a été observé une accumulation de capsidies « nues » dans le cytoplasme (Desai *et al.*, 2001). L'assemblage du tégument est un processus structuré faisant intervenir plusieurs interactions protéiques. Par exemple, VP1/2 permet l'incorporation de VP16, une protéine majeure du tégument, qui recrute ensuite VP22. (Hafezi *et al.*, 2005, Svobodova *et al.*, 2012). L'enveloppement final se fait au niveau du réseau du golgi et possiblement des endosomes. C'est également à cet endroit que le virion acquiert la partie distale du tégument (Sugimoto *et al.*, 2008, Turcotte *et al.*, 2005 et revue dans Kelly *et al.*, 2009). La vésicule contenant la particule virale enveloppée fusionne ensuite avec la membrane cellulaire, ce qui relâche le virion à l'extérieur de la cellule (revue dans Mettenleiter *et al.*, 2006).

Pathogenèse

Le VHS-1 est très répandu dans la population générale, mais la prévalence augmente et l'âge de la primo-infection diminue dans les milieux socio-économiques défavorisés. La transmission se fait par contact entre humains, étant donnée l'absence de vecteur ou de réservoir animal. Ses manifestations sont variables en intensité et en durée, passant d'asymptomatiques à mortelles dans des cas rares. Des particules virales infectieuses ont même été isolées de la salive de personnes asymptomatiques (Buddingh *et al.*, 1953, Tateishi *et al.*, 1994). On estime qu'au moins la moitié ($\geq 45\%$) de la population mondiale serait séropositive, et qu'environ 40 à 60 % des adultes aux États-Unis le serait (revue dans Fatahzadeh *et al.*, 2007).

La primo-infection se fait au niveau des muqueuses ou de la peau abrasée. Elle peut être asymptomatique ou entraîner une lésion locale causée par la mort cellulaire et l'inflammation, communément appelée feu sauvage (Roizman *et al.*, 2007). Il est estimé que dans environ 1 cas sur 300 000 l'infection ou la réactivation après la latence résulte en une encéphalite qui peut être mortelle ou entraîner des séquelles neurologiques en absence de traitement (Whitley,

2006 et revue dans Brady *et al.*, 2004). D'autres complications sont possibles, telles des kératites herpétiques, qui sont une cause importante de cécité due à une maladie infectieuse dans les pays développés (Toma *et al.*, 2008).

Latence et réactivation

Suite à la primo-infection des muqueuses orales, le virus infecte les neurones sensitifs adjacents et est transporté jusqu'au ganglion trijumeau où il entre en latence (Baringer *et al.*, 1973, Bastian *et al.*, 1972). La latence aurait été détectée de façon expérimentale pour la première fois en 1971 dans un modèle murin (Stevens *et al.*, 1971). En latence, le génome viral est associé à des nucléosomes et est maintenu sous forme épisomale dans le noyau de la cellule hôte (Deshmane *et al.*, 1989). L'association du génome aux histones joue un rôle essentiel dans la latence. Les gènes viraux IP sont associés avec des formes d'histones non-acétylées ce qui réprime la transcription. À l'opposé, la région dont sont issus les transcrits associés à la latence, ou LAT, pour « *latency associated transcripts* » est associée à des histones acétylées, ce qui favorise la transcription (Kubat *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2005a). Les transcrits LAT proviennent de l'épissage du transcrit LAT primaire. Ce sont les seuls transcrits longs détectés en grande quantité lors de la latence (Stevens *et al.*, 1987). Le mécanisme du maintien de la latence par les LAT reste à être élucidé. Cependant, plusieurs hypothèses sont étudiées. Brièvement, une partie des LAT est antisense à plusieurs gènes cruciaux pour la réplication lytique, comme ICP0 et ICP4, ce qui pourrait empêcher leur traduction. Deuxièmement, il existe une autre hypothèse selon laquelle les micro-ARN encodés par LAT pourraient réguler la traduction d'ICP0, ICP4, ICP34.5, ou de certains gènes cellulaires (revue dans Bloom *et al.*, 2011).

La réactivation du virus a lieu suite à un stress quelconque, comme un stress émotionnel ou physique, des rayons UV, ou encore à une autre infection. L'acétylation des histones liées au génome permettrait aussi aux gènes lytiques d'initier la réactivation (Arthur *et al.*, 2001). Une fois que la production de nouvelles particules virales infectieuses est recommencée, le virus retourne au site initial de l'infection via l'axone et il y a ré-infection de la muqueuse.

Le nucléole

Le nucléole est un sous-compartiment dynamique du noyau des cellules eucaryotes qui aurait été observé au début du 19^e siècle pour la première fois. Son lien avec la production des ARN ribosomiaux (ARNr) a été établi dans la deuxième moitié du 20^e siècle (Perry *et al.*, 1961, Ritossa *et al.*, 1965). Comme les autres corps sous-nucléaires, aucune membrane ne délimite les nucléoles.

Organisation et morphologie

Le nucléole est subdivisé en trois zones généralement concentriques, mais aucune membrane ne sépare les sous-divisions entre elles. En microscopie, le nucléole est faiblement coloré par un marquage de l'ADN, tandis que la chromatine dense entourant le nucléole est visible. Les différentes structures se distinguent par leur composition en protéines et acides nucléiques, ainsi que par leurs fonctions. Leur nom est tiré de leur morphologie en microscopie électronique. Du centre vers l'extérieur, il y a : un ou plusieurs centres fibrillaires, ou FC pour « *fibrillar center* », la composante fibrillaire dense, ou DFC pour « *dense fibrillar component* » et la composante granulaire, ou GC pour « *granular component* » (Figure 4). L'organisation du nucléole se fait autour de régions spécifiques de l'ADN génomique, appelées régions organisatrices du nucléole, ou NOR, pour « *nucleolus organizer region* ». Ces régions contiennent les gènes codant pour les ARNr et se trouvent sur les chromosomes 13, 14, 15, 21 et 22 (Henderson *et al.*, 1972, Ritossa *et al.*, 1965).

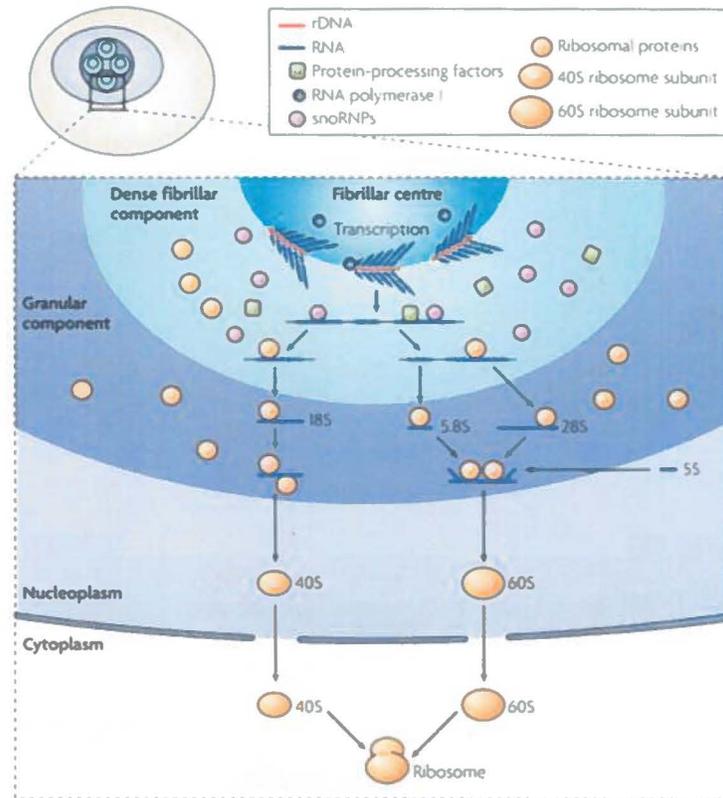


Figure 4 : Schématisation de l'organisation du nucléole

Les FC sont au centre du nucléole, entourés de la DFC et ensuite de la GC. Les gènes ribosomiaux (lignes rouges) sont transcrits en ARN ribosomiaux (lignes bleues) en bordure du FC par l'ARN polymérase I. Leur maturation est liée à leur transport au travers de la DFC et de la GC, puis du noyau. Le transcrit primaire est clivé dans la DFC et est modifié par plusieurs « *small nucleolar ribonucleoprotein* », ou snoRNP. L'assemblage avec des protéines ribosomales commence dans cette zone également. L'association avec d'autres protéines et d'autres étapes de clivage se font dans la GC. Les sous-unités 40S et 60S des ribosomes sont retrouvées dans le noyau, puis s'assemblent en ribosomes dans le cytoplasme. Tirée de Boisvert *et al.*, 2007.

L'assemblage et la dispersion du nucléole durant le cycle cellulaire est un excellent exemple de son dynamisme. À la fin de la prophase, il y a arrêt de la transcription des gènes ribosomiaux, ce qui entraîne la dispersion du nucléole (revue dans Boisvert *et al.*, 2007). Brièvement, la phosphorylation de certaines sous-unités de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase I (Pol I) par CDK1, pour « *cyclin-dependent kinase-1* » arrête son activité de transcription, et cela serait en partie responsable de la dispersion du nucléole (Leung *et al.*, 2004). La protéine B23, une protéine constitutive d'un complexe ribonucléoprotéique (RNP) pré-ribosomal, est impliquée dans la maturation des ARNr. Sa phosphorylation, qui dépend également de CDK1, est maintenue durant la mitose et serait impliquée dans la dispersion de cette protéine de la GC (Negi *et al.*, 2006). Cela fait des kinases dépendantes de cyclines, ou CDK, un mécanisme omniprésent pour la régulation du nucléole pendant le cycle cellulaire. Malgré que la majorité du nucléole soit dispersée, une partie des protéines reste liée aux NOR

durant tout le cycle cellulaire. Des sous-unités de la PolI et les facteurs de transcription UBF, SL1 et TTF-1 restent associés aux NOR durant la mitose (Dundr *et al.*, 2000, Leung *et al.*, 2004, Roussel *et al.*, 1996, Sirri *et al.*, 1999).

Durant la télophase, le nucléole s'assemble de nouveau autour des NOR (Roussel *et al.*, 1996). Il semble que le redémarrage de la transcription des ADNr seulement n'est pas suffisant à l'assemblage du nucléole (Sirri *et al.*, 2000). En effet, il peut se faire indépendamment de la transcription des ADNr (Dousset *et al.*, 2000). De plus, des inhibiteurs de CDK préviennent l'assemblage des nucléoles à la sortie de la mitose, ce qui montre que cet assemblage est régulé par certaines CDK et non seulement par la transcription des ADNr (Sirri *et al.*, 2002).

Fonctions du nucléole

Biogenèse des ribosomes

La fonction première du nucléole est la production des ribosomes, une activité hautement organisée et régulée que certains estiment être responsable de la moitié de la transcription d'une cellule en croissance (Moss *et al.*, 2002). Elle se fait de façon ordonnée : les transcrits d'ARNr débutent en bordure du FC et poursuivent leur maturation lors de leur transport vers le cytoplasme (Figure 4) (Lazdins *et al.*, 1997). Dans des cellules ayant une production élevée en ribosomes, on observe plusieurs FC de petites tailles, alors qu'un seul FC plus large est observé autrement (Hozak *et al.*, 1989, Lafarga *et al.*, 1989). Les ARNr 28S, 18S et 5.8S proviennent initialement du transcrit unique 47S produit par la Pol I, tandis que l'ARNr 5S est produit par l'ARN polymérase III (revue dans Sirri *et al.*, 2008, Tschochner *et al.*, 2003). Le transcrit 47S est détecté à la frontière des régions FC et DFC (Cmarko *et al.*, 2000). Il est ensuite clivé et subit plusieurs modifications dans la DFC. Plus de 150 petits ARN nucléolaires, ou snoRNA pour « *small nucleolar RNA* » et deux RNP sont impliqués dans la maturation des différents précurseurs ribosomiaux (revue dans Sirri *et al.*, 2008). La liaison de ces précurseurs à environ 80 protéines ribosomiales s'effectue ensuite principalement dans la GC, où l'on retrouve les précurseurs des sous-unités 40S et 60S. Ces précurseurs subissent leurs dernières modifications lors de leur sortie du nucléole et leur trajet dans le noyau.

Régulation du cycle cellulaire

La relation entre le nucléole et le cycle cellulaire est complexe. En plus d'être régulé par le cycle cellulaire, le nucléole est lui-même impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. Les modifications post-traductionnelles sont responsables de déclencher plusieurs étapes du cycle cellulaire et certaines protéines modificatrices sont localisées ou interagissent avec le nucléole. Des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et la sumoylation sont dynamiques et régulent certaines fonctions. Par exemple, une protéase spécifique aux protéines sumoylées nommée SENP5a a été identifiée au nucléole et son absence entraîne un défaut de division cellulaire (Di Bacco *et al.*, 2006). Le nucléole affecte le cycle cellulaire aussi par le contrôle de la localisation de protéines comme la protéine phosphatase 1 γ (PP1 γ). Sa localisation est nucléolaire lors de l'interphase, mais devient cytoplasmique et concentrée au kinétochores lors de la mitose. PP1 γ s'associe ensuite aux chromosomes, puis au nucléole suite à la division. Ces interactions déclenchées par le nucléole participeraient à la régulation de la ségrégation des chromosomes (Trinkle-Mulcahy *et al.*, 2007, Vagnarelli *et al.*, 2006). Un autre exemple est la séquestration durant le cycle cellulaire et le relâchement durant la phase S de la télomérase. La nucléoline, une protéine majeure du nucléole, est responsable de cette séquestration (Khurts *et al.*, 2004).

Réponses aux stress

Le nucléole reçoit et répond à plusieurs signaux, ce qui en fait un acteur important dans la réponse à certains stress. Ces stress peuvent être un dommage à l'ADN, un défaut dans la production de ribosomes, un manque de nutriments ou encore un choc thermique. Ils entraînent alors l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire via la stabilisation de p53. HDM2, une E3 ubiquitine ligase présente dans le noyau, maintient le niveau de p53 bas dans une cellule normale dû à une dégradation continue des nouvelles protéines synthétisées (Prives, 1998). B23, une protéine nucléolaire, retient normalement p14ARF au nucléole, un acteur de la voie d'induction de l'apoptose (Korgaonkar *et al.*, 2005). Lors de certains stress, l'interaction B23-p14ARF est brisée et p14ARF est libre d'interagir avec HDM2. La liaison de p14ARF avec HDM2 prévient ainsi son interaction avec p53 dans le noyau (Lee *et al.*, 2005). La protéine p53 est alors en mesure d'induire l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, la stabilisation de p53 peut être induite par une désorganisation du nucléole, sans nécessairement qu'il y ait dommage à l'ADN (Rubbi *et al.*, 2003). Cela fait du nucléole un système qui intègre plusieurs signaux pour réagir aux différents stress.

Protéines nucléolaires étudiées

L'étude du nucléole est un domaine très actif. En 2006, environ 700 protéines nucléolaires étaient identifiées dans une étude protéomique (Leung *et al.*, 2006). En revanche, selon les dernières études environ 4500 protéines sont présentes dans le nucléole (Ahmad *et al.*, 2009). Les deux protéines étudiées dans ce mémoire sont décrites dans cette section.

Upstream Binding Factor

La protéine UBF est composée de six domaines homologues aux protéines de la famille HMG pour « *high mobility group* » (Bachvarov *et al.*, 1991, Jantzen *et al.*, 1990). Ce nom vient de leur migration rapide dans un gel dénaturant SDS-PAGE. Ces domaines ont été identifiés dans plusieurs autres protéines liant l'ADN (revue dans Stros *et al.*, 2007). Les protéines HMG sont reconnues pour leur grande mobilité et de leur dynamisme à l'intérieur du noyau. La famille HMG est aussi connue pour son implication dans la modulation de la structure de la chromatine, la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN et la recombinaison (revue dans Reeves, 2010). Les protéines HMG sont regroupées en trois sous-familles : HMGA, B et C. Les domaines d'UBF s'apparentent à la sous-famille HMGB, qui lie préférentiellement l'ADN endommagé, replié ou déformé (Stros, 2010). Certains membres de cette sous-famille sont aussi impliqués dans les mécanismes de détection d'acides nucléiques exogènes et d'induction d'inflammation lors de la réponse immunitaire innée (revue dans Yanai *et al.*, 2012).

Il existe deux isoformes de la protéine UBF (O'Mahony *et al.*, 1991) (Figure 5). Le gène *ubf* encode trois transcrits différents, dont deux qui sont traduits en une protéine identique : UBF2 (Figure 12). Ces deux isoformes semblent être produits en quantité similaire et auraient chacun leur utilité, malgré que les fonctions spécifiques à UBF2 sont peu connues. Il a été rapporté que les deux isoformes n'ont pas la même capacité d'initier la transcription (Kuhn *et al.*, 1994). Les auteurs de la principale étude sur les isoformes d'UBF suggèrent que le ratio entre UBF1 et UBF2 pourrait être un moyen de réguler plus précisément la transcription des gènes ribosomiaux (Stefanovsky *et al.*, 2008).

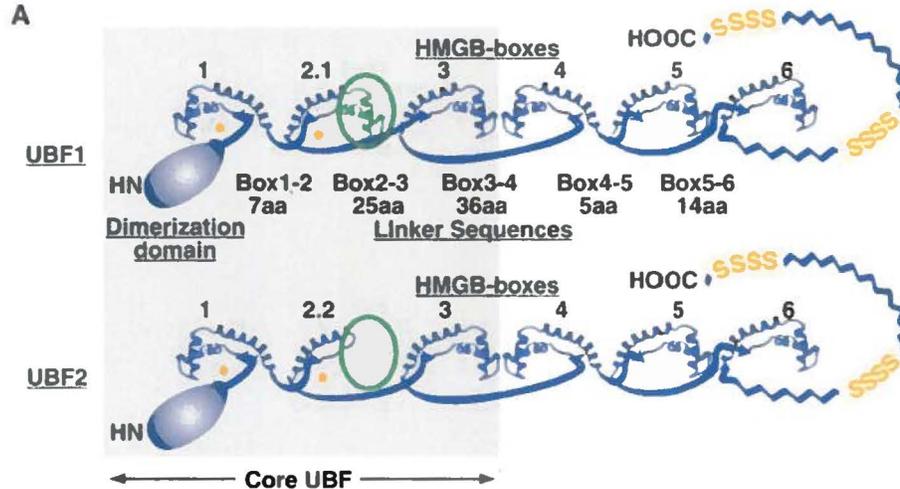


Figure 5 : Représentation des deux isoformes d'UBF

Structure prédite des domaines HMG d'UBF. Un domaine de dimérisation se trouve en N-terminale et est représenté par l'ovale. UBF est composé de six domaines homologues aux HMG, et d'une partie C-terminale acide contenant des régions riches en sérines (SSSS). Le deuxième domaine HMG d'UBF2 (2.2) possède une délétion de 37 acides aminés représentée par le cercle vert comparativement au deuxième domaine HMG d'UBF1 (2.1). Les astérisques montrent des sites de phosphorylation par la kinase ERK. Tirée de Stefanovsky *et al.*, 2008.

Les gènes codants pour les ARNr se trouvent répétés en tandem et espacés par des régions non-transcrites. Le promoteur de ces gènes contient deux parties importantes, le CE, pour « *core element* » et le UCE, pour « *Upstream CE* ». Ces deux régions permettent de recruter le complexe complet de la Pol I. UBF tire son nom de sa fonction de liaison à l'ADN sur la région UCE du promoteur des gènes ribosomiaux (Learned *et al.*, 1986). Le rôle d'UBF dans l'initiation de la transcription est de stabiliser l'interaction entre le complexe protéique SL1, des sous-unités de la Pol I et le promoteur. UBF et SL1 interagissent de façon coopérative lors de cette liaison au promoteur. SL1 ne semble pas pouvoir lier l'ADN au promoteur sans UBF selon certaines études (Bell *et al.*, 1990, Bell *et al.*, 1988, Jantzen *et al.*, 1992, Learned *et al.*, 1986). UBF peut également recruter PAF53, une sous-unité de la Pol I, directement au promoteur (Hanada *et al.*, 1996). Par contre, certaines études contredisent ce modèle. L'origine de la spécificité du recrutement au promoteur est méconnue et pourrait venir du complexe SL1 plutôt que d'UBF. En effet, SL1 est capable de recruter certaines sous-unités de la Pol I au promoteur en absence d'UBF (Friedrich *et al.*, 2005, Moss *et al.*, 2002, Panov *et al.*, 2006). Une étude montre qu'UBF aurait plutôt un rôle au niveau de la transition entre la formation du complexe d'initiation et l'élongation de la transcription (Panov *et al.*, 2006).

Indépendamment du modèle de recrutement du complexe d'initiation de la transcription, des études démontrent que la liaison d'UBF à l'ADN n'est pas restreinte aux promoteurs des gènes ribosomiaux. En effet UBF peut lier l'ADN de façon non-spécifique et reconnaît des structures plutôt qu'une séquence précise (Copenhaver *et al.*, 1994, Kuhn *et al.*, 1994, O'Sullivan *et al.*, 2002). Cette liaison à l'ADN se fait avec une plus haute affinité au promoteur, mais se retrouve dans tout le locus des gènes ribosomiaux (O'Sullivan *et al.*, 2002). Elle serait également responsable de la formation et du maintien des NOR durant les étapes du cycle cellulaire, ainsi que du recrutement au nucléole des différents facteurs de transcription de la Pol I (Mais *et al.*, 2005).

De plus, la liaison d'UBF à l'ADN a un grand impact au niveau de sa structure. Premièrement, la liaison d'un dimère d'UBF au promoteur des gènes ribosomiaux peut induire une structure similaire à la chromatine appelée « *enhancesome* » qui consiste en une boucle complète de 140 paires de bases (Figure 6) (Putnam *et al.*, 1994, Stefanovsky *et al.*, 2001a). Deux de ces boucles peuvent survenir au promoteur, rapprochant ainsi la région UCE du CE et deux complexes SL1, favorisant la formation un complexe fonctionnel de la Pol I (Sanij *et al.*, 2009). Deuxièmement, UBF peut induire une décondensation de la chromatine (Chen *et al.*, 2004, Sanij *et al.*, 2008). La liaison d'UBF à l'ADN et celle de l'histone H1, qui condense normalement les nucléosomes, sont mutuellement exclusives et UBF peut déloger H1 (Kermekchiev *et al.*, 1997). Aussi, UBF se retrouve associé aux promoteurs actifs des gènes ribosomiaux, alors que les promoteurs de gènes inactifs sont liés aux histones H1 (Sanij *et al.*, 2008). Cette étude montre également qu'une diminution de la quantité d'UBF par interférence à ARN n'affecte pas la production nette d'ARNr. En effet, lorsque le nombre de sites actifs de transcription diminue suite à la transfection d'ARNi contre UBF, l'activité de transcription des sites actifs restant augmente (Sanij *et al.*, 2008).

Les mécanismes de régulation des fonctions d'UBF identifiés sont principalement la phosphorylation et l'acétylation. L'acétylation d'UBF par CBP, une histone acétyl-transférase, active la transcription en favorisant le recrutement de PAF53, une sous-unité de la Pol I (Meraner *et al.*, 2006, Pelletier *et al.*, 2000). Aussi, la phosphorylation de la cinquième boîte HMG par CDK-2 et CDK-4 est requise pour l'activation de la transcription (Voit *et al.*, 1999). La phosphorylation de la partie C-terminale d'UBF régule son interaction avec SL1 (Hempel *et al.*, 1996, Tuan *et al.*, 1999). De plus, la phosphorylation d'UBF aux boîtes HMG 1 et 2 par ERK, une kinase régulée par des signaux extracellulaires, permet d'augmenter le taux d'élongation de la transcription en réponse à des facteurs de croissance, et ce en modifiant la conformation de

la chromatine (Figure 6) (Stefanovsky *et al.*, 2006a, Stefanovsky *et al.*, 2001b). UBF2, l'isoforme le plus court, ne possède pas le site de phosphorylation par ERK sur la deuxième boîte HMG et ne peut replier l'ADN. Cette délétion simule un état constitutivement phosphorylé de cette région. UBF2 répondrait donc plus rapidement à la phosphorylation par ERK, car seul le site sur la boîte HMG 1 doit être phosphorylé pour augmenter l'activité d'UBF. À l'opposé, cet état d'UBF2 la rendrait moins apte à ralentir la transcription (Stefanovsky *et al.*, 2008).

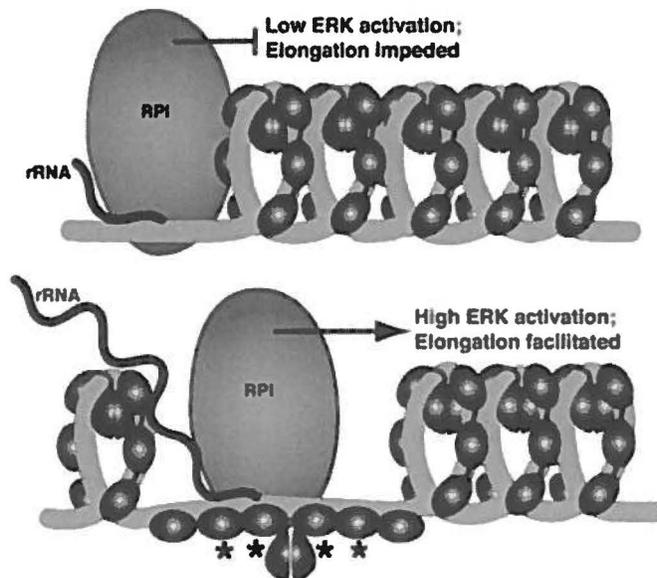


Figure 6 : Modèle de l'augmentation du taux d'élongation de la transcription en réponse à la phosphorylation d'UBF par ERK
 La spirale grise représente l'ADN lié à UBF et les ovales noirs représentent les domaines HMG d'UBF. Les astérisques signifient une phosphorylation par la kinase ERK. L'ARN polymérase I est représenté par l'ovale gris et sa progression par la flèche. Dans le panneau du bas, une phosphorylation des boîtes HMG 1 et 2 d'UBF déroule l'« *enhancesome* », ce qui permet une progression plus rapide de la Pol I. Tirée de Stefanovsky *et al.*, 2006a.

B23 / NPM1 / Nucleophosmin / NO38 / Numatrin

Cette protéine, ci-après appelée B23, est multifonctionnelle et est présente en grande quantité dans le nucléole, principalement à la GC (Spector *et al.*, 1984). Deux isoformes de B23 sont produits par épissage alternatif, B23.1 et B23.2 (Chang *et al.*, 1989). Ces deux isoformes ont une partie C-terminale différente ; B23.2 est tronquée de 35 acides aminés. Les deux isoformes ont aussi une localisation cellulaire différente, soit principalement nucléolaire pour B23.1 et cytoplasmique pour B23.2 (Wang *et al.*, 1993). La partie C-terminale unique de B23.1 permet une liaison à l'ARN qui est requise pour sa localisation nucléolaire (Nishimura *et al.*, 2002,

Wang *et al.*, 1994). B23 possède un domaine d'oligomérisation dans sa partie N-terminale et plusieurs de ses fonctions semblent dépendre de cette oligomérisation, comme son association à l'ARN et ses fonctions de chaperonne (Akey *et al.*, 2003, Hingorani *et al.*, 2000, Okuwaki *et al.*, 2002). Récemment, un troisième isoforme manquant un exon comparativement à B23.1 a été identifié et nommé B23.3. L'exon manquant se situe dans la partie C-terminale. En ce moment, aucune fonction n'est connue pour cet isoforme (Lindstrom, 2011).

Les signaux de localisation nucléaire (NLS) sont connus et bien caractérisés, ce qui n'est pas le cas pour les signaux de localisation nucléolaire (NoLS) où le seul consensus est la présence d'acides aminés basiques (Sirri *et al.*, 2008). Par contre, beaucoup de protéines se localisent au nucléole en interagissant avec B23 ce qui en fait un transporteur possible pour les NoLS, d'autant plus que B23 circule constamment entre le noyau et le cytoplasme (Borer *et al.*, 1989). Un NoLS serait probablement une séquence permettant d'interagir avec une protéine nucléolaire comme B23 (Lechertier *et al.*, 2007).

B23 est impliquée dans la biogenèse des ribosomes à plusieurs niveaux. Premièrement, elle est impliquée au niveau du transport nucléaire, par exemple en transportant la protéine ribosomale L5, une chaperonne pour l'ARNr 5S (Maggi *et al.*, 2008, Yu *et al.*, 2006). Deuxièmement, B23 possède une activité ribonucléase qui est impliquée dans le clivage et la maturation de certains ARN pré-ribosomiaux (Herrera *et al.*, 1995). Par exemple, la production de l'ARNr 28S est déficiente en absence de B23 (Savkur *et al.*, 1998). B23 est également une chaperonne d'histones, pouvant moduler la formation de nucléosomes (Okuwaki *et al.*, 2001b). Elle agit aussi comme chaperonne en prévenant les agrégations ou la dénaturation de protéines suite à un traitement thermique. Elle permet par exemple la restauration de l'activité de l'enzyme LADH « *liver alcohol deshydrogenase* », suite à un traitement chimique qui la dénature (Szebeni *et al.*, 1999).

B23 participe à plusieurs autres fonctions cellulaires, comme la régulation du cycle cellulaire en contrôlant la duplication des centrosomes lors de la mitose (Okuda *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2005b). Elle est impliquée aussi dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (revue dans Lindstrom, 2011).

La régulation de B23 par des modifications post-traductionnelles a été étudiée en détail par de nombreuses équipes de recherche (Figure 7). En plus de ces mécanismes, la formation d'hétéro-oligomères entre B23.1 et B23.2 est une façon de réguler la liaison à l'ARN de B23.1, car le ratio des isoformes dans un pentamère module la liaison à l'ARN (Okuwaki *et al.*, 2002).



Figure 7 : Représentation des domaines et sites de régulation de B23.1

Le domaine d'oligomérisation est montré en vert, les régions acides en rouge et le domaine de liaison à l'ARN en bleu. Les motifs noirs représentent les signaux d'export nucléaire, le motif bleu représente le signal d'import nucléaire et le rouge un site de liaison à l'ATP. Les sites connus de modifications post-traductionnelles sont indiqués par l'acide aminé ciblé, par exemple S4 pour la sérine 4. Modifiée d'Okuwaki, 2008.

Interactions entre certains virus et des protéines nucléolaires

Plusieurs virus, qu'ils se répliquent dans le noyau ou non, interagissent avec le nucléole et d'autres compartiments sous-nucléaires. De nombreuses interactions avec UBF et B23 ont été rapportées. Les exemples les plus pertinents sont décrits dans les sections suivantes.

Adénovirus

Les adénovirus ont un génome d'ADN linéaire double brin et se répliquent dans le noyau. La réplication induit des changements dans la cellule hôte et implique l'utilisation de certaines protéines nucléolaires. Par exemple, B23 et une autre protéine majeure du nucléole, la nucléoline, sont dispersées du nucléole par la protéine virale V (Matthews, 2001, Walton *et al.*, 1989). Il a ensuite été montré que B23 interagit avec plusieurs protéines virales et participe à la réplication de l'ADN viral en servant de chaperonne pour l'assemblage de la chromatine (Okuwaki *et al.*, 2001a, Samad *et al.*, 2007). Une autre équipe a par la suite démontré que B23.1 et B23.2 ont des partenaires d'interaction viraux différents, soit pTP pour « *preterminal protein* » et DBP pour « *DNA-binding protein* » respectivement, deux protéines impliquées dans la réplication du génome des adénovirus. Malgré cela, les deux isoformes de B23 servent à la réplication virale à titre de chaperonnes dans l'assemblage de la chromatine (Hindley *et al.*, 2007, Samad *et al.*, 2007). L'étude de Hindley *et al.* souligne ainsi l'importance d'étudier les différents isoformes d'une même protéine dans ce contexte. Récemment, il a été suggéré que la protéine V et B23 participeraient au processus d'assemblage des virions (Ugai *et al.*, 2012). De plus, une relocalisation d'UBF aux génomes viraux a été observée. UBF est retrouvée aux

extrémités des génomes et favorise la réplication virale (Lawrence *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que dans cette étude la relocalisation d'UBF aux génomes viraux ne semble pas affecter la synthèse d'ARNr. En 2008, Sanji et ses collaborateurs ont montré qu'après diminution du niveau d'UBF, le nombre de NOR actifs diminuent, mais ceux qui restent augmentent en activité, ce qui maintient le niveau total de transcription des ARNr (Sanji *et al.*, 2008). Ces observations offrent une explication au phénomène observé en 2006 par l'équipe de Lawrence *et al.*

Virus de l'hépatite C

Même chez un virus à ARN qui ne se réplique pas dans le noyau, des interactions avec plusieurs protéines nucléolaires ont été rapportées. La polymérase du virus de l'hépatite C (VHC) possède deux sites pouvant lier la nucléoline et il semble que cette interaction puisse influencer l'oligomérisation nécessaire à l'activité de la polymérase NS5B (Hirano *et al.*, 2003). Des expériences subséquentes ont montré que la nucléoline serait importante pour la réplication du VHC (Kusakawa *et al.*, 2007, Shimakami *et al.*, 2006). La nucléoline présente dans le cytoplasme est également impliquée dans la traduction de protéines virales par les IRES, pour « *Internal Ribosome Entry Site* » (Izumi *et al.*, 2001, Lu *et al.*, 2004). Un effet majeur chez la cellule hôte de l'infection par le virus de l'hépatite C est l'augmentation de la croissance cellulaire. La protéine virale Core participerait à ce phénomène en augmentant le recrutement du complexe de transcription de la Pol I aux promoteurs des ADNr en induisant la phosphorylation d'UBF sur des sérines en C-terminale (Kao *et al.*, 2004). NS5A est également capable d'induire l'activation et la phosphorylation d'UBF, ce qui résulte en une augmentation de la transcription par la Pol I (Raychaudhuri *et al.*, 2009). De plus, un signal d'export nucléaire (NES) a été identifié récemment chez la protéine Core qui lui permet de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, un mécanisme important pour la réplication virale (Cerutti *et al.*, 2011).

Virus de l'immunodéficience humaine

Le VIH utilise plusieurs protéines nucléolaires lors de son cycle de réplication. Selon certaines études, la nucléoline membranaire serait même impliquée dans son entrée de la cellule hôte (Nisole *et al.*, 2002, Said *et al.*, 2005). Il a aussi été rapporté que des modifications de la nucléoline par le VIH seraient responsables de la dérégulation du cycle cellulaire chez les lymphocytes infectés. La nucléoline est altérée de plusieurs façons lors de l'infection. Dans les

lymphocytes de patients infectés, elle est plus fortement phosphorylée, clivée et se trouve de façon prédominante à l'extérieur du noyau et à la membrane plasmique (Galati *et al.*, 2003). Suite à l'entrée du virion, deux protéines régulatrices majeures du VIH se localisent au nucléole grâce à leur interaction avec B23 : Tat, un transactivateur de la transcription de l'ADN viral, ainsi que Rev, un facteur d'export nucléaire et d'épissage des ARN viraux (Li, 1997, Szebeni *et al.*, 1997). La localisation nucléolaire de ces protéines est essentielle à leurs fonctions (Michienzi *et al.*, 2002). De plus, l'export des ARNm du VIH se ferait via le nucléole avec le transport de Rev (Canto-Nogues *et al.*, 2001, Michienzi *et al.*, 2000). En effet, une séquestration de Rev au nucléole inhibe la réplication virale, de même lors de l'expression et de la localisation nucléolaire d'un ribozyme ciblant l'ARNm viral (Michienzi *et al.*, 2000, Michienzi *et al.*, 2006).

Virus de la poliomyélite

L'infection par le virus de la poliomyélite entraîne une relocalisation de la nucléoline dans le cytoplasme (Waggoner *et al.*, 1998). Il utilise lui aussi des sites IRES pour la traduction de ses ARN et, comme chez le virus de l'hépatite C, la nucléoline est impliquée (Izumi *et al.*, 2001). La protéase virale 3C est responsable de l'arrêt de la transcription des gènes cellulaires observé dans les cellules infectées par le virus de la poliomyélite (Kundu *et al.*, 2005). De plus, l'interaction du virus de la poliomyélite avec la machinerie de transcription de la Pol I a pour but d'inhiber la transcription des gènes ribosomiaux. En effet, la protéase virale 3C clive la protéine TAF110, une partie du complexe du facteur de transcription SL1, ce qui empêche la transcription par la Pol I. UBF est également dégradée lors de l'infection, mais par un mécanisme autre que la protéase 3C (Banerjee *et al.*, 2005).

Virus de l'herpès simplex 1

La réplication du VHS-1 se fait principalement dans le noyau. De ce fait, de nombreuses interactions avec des protéines et sous-compartiments nucléaires ont été rapportées. Avant tout, un effet général de réduction de la production et de la maturation des ARNr est observé suite à l'infection (Wagner *et al.*, 1969). Dans un premier temps, plusieurs protéines nucléolaires sont relocalisées lors de l'infection. La protéine B23 passe d'une localisation nucléolaire pour devenir nucléaire suite à l'infection par un virus de type sauvage, ou suite à la transfection du gène viral *ul24* (Calle *et al.*, 2008, Lymberopoulos *et al.*, 2011). La nucléoline subit un changement similaire et se disperse suite à l'infection, de façon dépendante de la

région putative d'endonucléase de la protéine UL24 (Bertrand *et al.*, 2010, Bertrand *et al.*, 2008, Lymberopoulos *et al.*, 2007). La nucléoline est importante pour la réplication virale et est impliquée dans la sortie des particules virales du noyau. Lors d'une expression réduite de la nucléoline, on observe une plus faible réplication virale et une réduction du nombre de capsides détectées dans le cytoplasme (Calle *et al.*, 2008, Sagou *et al.*, 2010). Aussi, la protéine virale US11 interagit avec la nucléoline, mais s'accumule au noyau en son absence. La nucléoline serait donc impliquée dans l'export de US11 du noyau (Greco *et al.*, 2011). UBF subit aussi un changement de localisation. Elle se colocalise avec les compartiments de réplication virale suite à l'initiation de la synthèse d'ADN viral (Lymberopoulos *et al.*, 2010, Stow *et al.*, 2009). Il a été suggéré qu'UBF serait impliquée dans la synthèse d'ADN viral, au même titre que chez les adénovirus.

Réponse antivirale intrinsèque contre le VHS-1

Les interactions entre les virus et les cellules hôte se manifestent de plusieurs façons. D'une part, le virus exerce un contrôle des éléments cellulaires à des fins répliquatives. D'autre part, la cellule possède une défense antivirale intrinsèque visant à restreindre la réplication virale.

Nuclear Domain 10

Lors de l'entrée du génome viral dans le noyau, un mécanisme de défense cellulaire se met en place. Les ND10, pour « *Nuclear Domain 10* » sont aussi appelés corps PML, à cause de la protéine constituante majeure, PML, pour « *Promyelocytic Leukemia* ». Hors d'un contexte d'infection, ils participent à la régulation de l'apoptose, de la transcription et de la réparation des dommages à l'ADN (Borden, 2002, Kriehoff-Henning *et al.*, 2008, Zhong *et al.*, 2000). Le nombre et la taille des ND10 sont augmentés en réponse à l'interféron, mais il n'est pas nécessaire à leur présence (revue dans Borden, 2002). Les principales composantes des ND10, soit PML, Sp100 et hDaxx, s'assemblent *de novo* rapidement auprès des génomes du VHS-1 après leur entrée (Figure 8) (Everett *et al.*, 2005). La séquence oriS et les protéines virales ICP4 et ICP27 semblent être suffisantes pour induire la colocalisation des génomes et des ND10 (Tang *et al.*, 2003). Par contre, les ND10 sont rapidement dispersés par la protéine virale ICP0 lors d'une infection avec un virus de type sauvage (Everett *et al.*, 2004, Maul *et al.*, 1993). PML est requise pour la formation des ND10. L'activité E3 ubiquitine ligase de ICP0

entraîne la dégradation de PML et Sp100 par le protéasome, ce qui cause donc la dispersion des ND10 (Boutell *et al.*, 2002, Chelbi-Alix *et al.*, 1999, Everett *et al.*, 1998, Ishov *et al.*, 1999).

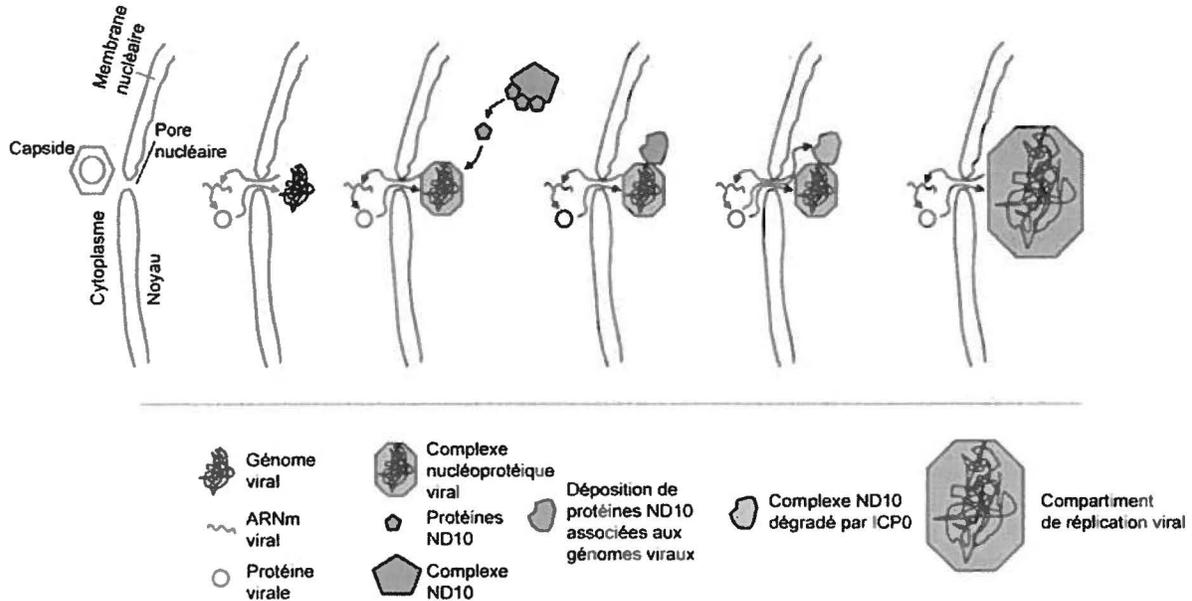


Figure 8 : Schématisation des événements liés aux ND10 suivant l'entrée du génome viral
 Suite à l'entrée du génome viral dans le noyau par le pore nucléaire, la transcription commence et les constituants des ND10 forment de nouveaux complexes adjacents au génome. Après l'expression d'ICP0, ces complexes sont dégradés et le compartiment de réplication viral se développe. Tirée d'Everett *et al.*, 2005.

La restriction de la réplication du VHS-1 par PML a été montrée directement à l'aide d'un virus déficient en ICP0. Ce virus ne peut pas se répliquer de façon efficace qu'à forte multiplicité d'infection (m.o.i.) ou si la production de PML est inhibée par interférence à ARN, mais la réplication n'atteint toutefois pas les niveaux du virus sauvage (Everett *et al.*, 2006). Au moins deux des six isoformes de PML seraient impliqués dans cette restriction (Cuchet *et al.*, 2011). D'autres protéines des ND10 qui participent à la restriction de la réplication ont aussi été identifiées, soit Sp100, hDaxx et ATRX. Le gène de Sp100 encode plusieurs isoformes (Sp100A, Sp100B, Sp100C et Sp100HMG), dont un contient un domaine HMG (Sp100HMG). Les isoformes B, C et HMG sont impliqués dans la restriction de la réplication (Negorev *et al.*, 2006). La déplétion de Sp100 permet également à un virus déficient en ICP0 de se répliquer et la déplétion simultanée de PML et Sp100 permet une réplication plus élevée que la déplétion de PML ou Sp100 seule (Everett *et al.*, 2008). ATRX et hDaxx ont des fonctions connues de remodelage de la chromatine (Xue *et al.*, 2003). La diminution de l'expression par interférence à ARN de ces protéines permet aussi à un virus déficient en ICP0 de se répliquer, et ces deux protéines agissent en tant que complexe (Lukashchuk *et al.*, 2010). Le complexe hDaxx et

ATRAX n'est pas affecté par ICP0 et il ne semble pas y avoir d'interaction directe entre celui-ci et ICP0. L'inhibition des fonctions de hDaxx semble plutôt être due à son hyperphosphorylation lors de l'infection de façon dépendante d'ICP0 (Lukashchuk *et al.*, 2010). ICP0 possède donc plusieurs moyens de contrer les défenses cellulaires. De plus, une étude récente suggère qu'un microARN pourrait empêcher la traduction de ATRX (Jurak *et al.*, 2012). Hors d'un contexte d'infection, PML, Sp100, hDaxx et ATRX interagissent tous avec des protéines régulatrices pouvant modifier les histones (revue dans Nevels *et al.*, 2011). Le mécanisme d'action antiviral précis des effecteurs des ND10 est donc probablement lié aux histones et à la conformation de la chromatine, comme il est montré chez le cytomégalo virus humain (Woodhall *et al.*, 2006).

Réparation de l'ADN

La cellule possède des mécanismes assurant une intégrité génomique. Ces mécanismes ont aussi été liés à une défense antivirale intrinsèque lors de l'infection par le VHS-1. Comme mentionné plus tôt, certaines protéines servant à la réparation de l'ADN sont utilisées par le virus pour sa réplication (Mohani *et al.*, 2010, Mohani *et al.*, 2011, Taylor *et al.*, 2004). Le VHS-1 module la réponse cellulaire des dommages à l'ADN à son avantage en exploitant certaines parties de cette réponse et en inhibant celles qui font partie d'une défense antivirale. ATR et ATRIP, deux des protéines cellulaires recrutées aux compartiments de réplication virale, font partie de la voie de réponse aux dommages à l'ADN ATR, pour « *ataxia telangiectasia and Rad3-related* ». Cependant, la suite de la voie de signalisation ATR est inhibée lors de l'infection par le VHS-1. En effet le recrutement de ATR et ATRIP cause normalement une signalisation de dommages à l'ADN, ce qui n'est pas le cas lors de l'infection par le VHS-1 (Mohani *et al.*, 2010). De plus, leur recrutement est bénéfique pour la réplication virale. Un autre exemple est la dégradation par le protéasome induite par ICP0 de la sous-unité catalytique protéine DNA-PK, une protéine impliquée dans la réparation des bris double-brins (Parkinson *et al.*, 1999). ATM, une autre voie de réponse des dommages à l'ADN est activée par l'infection, ICP0 la module en dégradant RNF8 et RNF168, deux ubiquitines ligases qui servent à recruter d'autres protéines effectrices (Lilley *et al.*, 2011, Shirata *et al.*, 2005). L'inhibition de parties précises de ces voies permet au virus d'éviter ces mécanismes ayant des propriétés antivirales.

Problématique

Le VHS-1 induit différents changements dans la cellule hôte. La relocalisation de certaines protéines nucléolaires par l'infection a été montrée auparavant dans plusieurs types cellulaires. B23 et UBF sont deux protéines normalement localisées dans le nucléole. Suite à l'infection, B23 se disperse dans le noyau, alors qu'UBF se relocalise aux compartiments de réplication virale. Il a déjà été démontré qu'une protéine virale tardive, UL24, est nécessaire et suffisante pour disperser B23 dans les fibroblastes (Lymberopoulos *et al.*, 2011). La cause exacte de la relocalisation d'UBF dans les cellules infectées n'est pas connue. Cependant, un virus UV-inactivé n'ayant aucune expression génique n'induit pas de relocalisation d'UBF (Bourget, 2011). Un traitement à l'acide phosphonoacétique, ou PAA pour « *phosphonoacetic acid* », empêchant la réplication de l'ADN viral permet une relocalisation partielle d'UBF (Lymberopoulos *et al.*, 2010). Il a été suggéré qu'UBF est recrutée aux compartiments de réplication virale pour participer à la réplication du génome viral (Stow *et al.*, 2009). Par contre, la relocalisation d'UBF est détectée après le début de la synthèse d'ADN viral (Lymberopoulos *et al.*, 2010).

Chez les adénovirus, UBF est aussi recrutée aux génomes viraux. Elle joue un rôle dans leur réplication en favorisant la synthèse de l'ADN viral. Chez ce virus, B23 est aussi dispersée du nucléole et est impliquée dans la réplication de l'ADN viral et dans l'assemblage des virions.

Chez le VHS-1, le rôle de la dispersion de B23 est inconnu et aucun rôle n'a été attribué hors de tous doutes au recrutement d'UBF aux compartiments de réplication virale. L'hypothèse de départ était que ces altérations au nucléole sont provoquées par le virus afin de favoriser sa réplication.

Afin de tester cette hypothèse, la réplication virale a été étudiée dans des cellules dont l'expression des protéines cibles était diminuée par interférence à ARN.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture cellulaire

Les cellules Vero sont une lignée de fibroblastes de reins qui proviennent du singe vert d'Afrique. Elles ont été propagées dans du milieu de culture DMEM « *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* » contenant 5 % de sérum de veau nouveau-né ou NCS « *newborn calf serum* » et 0,5 U/mL de pénicilline et 0,5 µg/mL de streptomycine (P/S). À l'atteinte d'environ 90 % de confluence, le milieu de culture était vidé et les cellules étaient lavées avec du PBS « *phosphate buffered saline* ». De la trypsine, à raison de 2,5 g/L de trypsine et 0,38 g/L d'EDTA était ajouté aux cellules. Elles étaient ensuite incubées à 37 °C avec 5 % de CO₂ jusqu'à ce qu'elles se détachent. Un volume de milieu de culture égal à celui de la trypsine était ajouté aux cellules. À cette étape, un dixième du volume était conservé pour le passage et la concentration en cellule du reste était comptée pour utilisation. Les cellules du passage étaient remises dans du milieu de culture, à 37 °C avec 5 % de CO₂.

Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales humaines qui proviennent d'un cancer du col de l'utérus. Elles ont été propagées dans du DMEM contenant 8 % de sérum de bœuf fœtal, ou FBS « *fetal bovine serum* » et 0,5 U/mL de pénicilline et 0,5 µg/mL de streptomycine. Lorsque la culture atteignait environ 75 % de confluence, un passage était fait de la même façon que pour les cellules Vero, à l'exception du volume conservé qui était de un huitième.

Immunobuvardage de type western

Extraction des protéines

Les plaques de culture cellulaire étaient mises sur glace et le milieu de culture était enlevé, puis les cellules étaient lavées au PBS froid. La lyse des cellules était faite avec le tampon de lyse RIPA : 50 mM de Tris, 1 % (v/v) de Triton X-100, 0,5 % de DOC, 0,1 % (p/v) de SDS et 500 mM de NaCl dans de l'eau Milli-Q. Avant utilisation, un mélange d'inhibiteur de protéases (cOmplete Mini, Roche) était ajouté au tampon RIPA. Un volume de 150 µL de tampon RIPA était ajouté à chacun des puits pour les plaques de six puits, et 75 µL à chacun des puits pour les plaques de douze puits. Après incubation de cinq minutes, les cellules étaient grattées et récoltées dans un tube, puis les lysats incubés sur glace pendant cinq minutes. Les lysats étaient ensuite centrifugés à 4 °C à 13 000 rpm pendant 30 minutes dans une microcentrifugeuse. Les surnageants ont été conservés à -20°C.

SDS-PAGE

La solution de chargement 6X contenant du bleu de bromophénol et 1:5 de β -mercaptoéthanol était ajoutée aux lysats de protéines pour une concentration finale de 1X. Les lysats étaient chauffés à 95 °C pendant une minute, puis remis sur glace. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 10 % dans un tampon de migration composé de 3 g/L de Tris, 14,4 g/L de glycine et 0,1 % (v/v) SDS dans de l'eau Milli-Q. Au moment de la sortie du front de migration, les protéines étaient transférées sur une membrane de PVDF (*polyvinylidene difluoride*). Cette étape était faite par transfert liquide dans un tampon de transfert composé de 3 g/L de Tris, 14,4 g/L de glycine et 20 % (v/v) de méthanol dans de l'eau Milli-Q pendant 90 minutes. Les sites libres de la membrane étaient ensuite bloqués par incubation d'au moins une heure dans une solution de 5 % (p/v) de lait écrémé déshydraté (Bio-Rad) dilué dans du TTBS : 2,42 g/L de Tris, 29,2 g/L de NaCl et 0,05 % (v/v) de Tween 20 dilués dans de l'eau Milli-Q.

Anticorps

Le marquage avec tous les anticorps était fait de la même façon, mais en variant les temps d'incubations et la concentration des anticorps. Après le blocage, la membrane était lavée avec du TTBS durant cinq minutes à deux reprises. Les anticorps primaires étaient dilués dans 10 mL d'une solution de gélatine à 0,05 % dans du TTBS. La membrane était incubée avec l'anticorps primaire avec agitation, puis lavée durant cinq minutes à trois reprises avec du TTBS. L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) était dilué dans la solution de blocage et la membrane était incubé avec agitation, puis lavée durant cinq minutes à cinq reprises avec du TTBS. La solution de chimiluminescence Immuni-Star (Bio-Rad) était ajoutée sur la membrane pendant cinq minutes, puis les films Biomax XAR (Kodak) étaient exposés à la membrane, puis développés.

Les anticorps primaires étaient soit des monoclonaux de souris (mAb) ou des polyclonaux de lapins (pAb). Les anticorps secondaires dirigés contre les anticorps monoclonaux de souris provenaient de Jackson ImmunoResearch et ceux contre les anticorps polyclonaux de lapins provenaient de Bethyl Laboratories. Les conditions qui étaient utilisées sont données sous la forme : dilution utilisée puis temps d'incubation pour l'anticorps primaire, suivi des conditions de l'anticorps secondaire.

UBF (Santa Cruz Biotechnology, mAb, reconnaît UBF1 et UBF2) : 1:500 pour 90 minutes, 1:750 pour 90 minutes

γ-Tubuline (Sigma-Aldrich, pAb) : 1:2000 pour 60 minutes, 1:7500 pour 60 minutes

B23 (Santa Cruz Biotechnology, mAb) : 1:5000 pour 90 minutes, 1:7500 pour 90 minutes

ICP27 (Fitzgerald, mAb) : 1:1000 pour 75 minutes, 1:5000 pour 90 minutes.

TK (Dr W. Summers, Yale, pAb) : 1:1000 pour 90 minutes, 1:7500 pour 90 minutes.

gC (Fitzgerald, mAb) : 1:1500 pour 90 minutes, 1:5000 pour 90 minutes.

VHS-1 total (Abcam, pAb) : 1:2000 pour 90 minutes, 1:5000 pour 90 minutes.

Interférence à ARN

ARNi Dharmacon

Les ARN interférents (ARNi) utilisés proviennent de Dharmacon (Thermo Fisher) et sont conçus pour s'apparier spécifiquement aux ARNm des gènes cibles (UBF ou B23) ou pour s'apparier à aucun ARNm de mammifère (NT, pour « *non-targeting* »). Pour chaque transfection, quatre séquences différentes d'ARNi NT ou ciblant UBF ou B23 ont été utilisées. Selon les expériences, les cellules HeLa ont été mises en culture sur plaque de six ou de douze puits. Les conditions suivantes correspondent à une transfection d'un puits de plaque de douze puits. Pour les puits de plaques de six puits, toutes les quantités étaient doublées.

Les cellules HeLa étaient mises en culture la veille de la transfection dans un puits à une quantité de 1×10^5 . Le milieu de transfection était préparé en ajoutant 5 μL d'ARNi à 5 μM dans 95 μL de DMEM et en incubant à température pièce pendant cinq minutes. Pour les transfusions d'une seule séquence, 5 μL de cet ARNi étaient ajoutés. Pour les transfusions de quatre séquences, 1,25 μL de chaque ARNi étaient ajoutés (total de 5 μL). Parallèlement, 2 μL de réactif de transfection Dharmafect 1 étaient ajoutés à 98 μL de DMEM et incubé à température pièce pendant cinq minutes. Les deux solutions étaient mélangées et incubées à température pièce pendant 20 minutes. Le milieu de culture du puits était enlevé pour être remplacé par 800 μL de DMEM avec 8 % de FBS, sans P/S, auquel était ajouté par la suite le milieu de transfection. La concentration finale d'ARNi pour toutes les transfusions était de 25 nM. Les cellules étaient remises en incubation à 37 °C avec 5 % de CO₂ pour 48 heures pour une transfection d'ARNi contre UBF et 72 heures pour une transfection d'ARNi contre B23.

Dans les deux cas, le milieu était changé pour du milieu de culture complet cinq heures après la transfection.

La culture a été testée pour le taux de mortalité à l'aide d'une coloration des acides nucléiques des cellules mortes avec le colorant SYTOX Green (Invitrogen). Un volume de 1 μ L du colorant à 5 mM a été dilué dans 10 mL de milieu de culture, pour une concentration finale de 0,5 μ M. Un volume de 500 μ L de ce milieu a été ajouté dans chaque puits. Après cinq minutes, les puits ont été lavés au PBS. Un volume de 1 mL de milieu de culture a été rajouté par puits et les cellules ont été observées à l'aide d'un stéréoscope à fluorescence (excitation à 488nm).

ARNi Invitrogen

Le milieu de transfection était préparé en ajoutant 0,66 μ L de chacune des trois séquences d'ARNi à 20 μ M (total de 2 μ L) dans 98 μ L de DMEM et en incubant à température pièce pendant cinq minutes. Parallèlement, 2 μ L de réactif de transfection Lipofectamine 2000 étaient ajoutés à 98 μ L de DMEM et incubés à température pièce pendant cinq minutes. Les deux solutions étaient mélangées et incubées à température pièce pendant 20 minutes. Le reste de la transfection est inchangé.

Virus et infections

Le VHS-1 de type sauvage (KOS) et le VHS-2 de type sauvage (HG52) proviennent originalement de Donald M. Coen (Harvard Medical School, Boston). Les stocks viraux ont été produits en infectant 3×10^7 cellules Vero dans un flacon T175 avec une multiplicité d'infection (m.o.i.) de 0,01 dans 5 mL de DMEM contenant 2 % de NCS et P/S. Le flacon a été agité aux 15 minutes pendant une heure. Ensuite, le milieu d'infection a été remplacé par 25 mL de DMEM contenant 2 % de NCS et P/S et le flacon a été remis à 37 °C et à 5 % de CO₂. Lorsqu'un effet cytopathique était observé chez toutes les cellules, le flacon était frappé de façon à les décoller du flacon. Elles ont été centrifugées à 4 °C à 1500 rpm (484 x g) pendant cinq minutes et le culot a été resuspendu dans 1,5 mL de DMEM contenant 2 % de NCS et P/S. Les cellules ont ensuite été lysées par trois cycles de congélation sur glace sèche et décongélation à 37 °C, puis soniquées pendant 30 secondes avec le *Digital Sonifier* de Branson (amplitude 50 % et pulsations de 0,5 secondes). Le lysat a été centrifugé à 4 °C pendant cinq minutes à 5000 rpm dans une microcentrifugeuse et le surnageant a été aliquoté et congelé à -80 °C.

Les infections ont été faites en diluant dans du DMEM contenant 2 % de NCS et P/S la quantité requise de particules infectieuses, ou pfu « *plaque forming unit* », selon la m.o.i. requise. Un volume de 300 µL de ce milieu était mis dans chaque puits à infecter pour les plaques de douze puits (500 µL pour les plaques de six puits) et elles ont été agitées aux 15 minutes pendant une heure. Le milieu d'infection était ensuite remplacé par 1 mL de milieu de culture. Le cas échéant, le milieu d'infection a été remplacé par du milieu de culture contenant 0,3 mg/mL d'acide phosphonoacétique, ou PAA « *phosphonoacetic acid* », un inhibiteur de l'ADN polymérase virale.

Détermination des titres viraux

Les titres viraux étaient déterminés par un essai de plages de lyse. L'échantillon à quantifier était dilué en série de 10^{-1} à 10^{-6} dans du DMEM contenant 2 % de NCS et P/S pour les expériences de réplication virale et de 10^{-3} à 10^{-8} pour les stocks viraux. La veille, 3×10^5 cellules Vero avaient été mises en culture dans chaque puits de plaque douze puits avec du DMEM contenant 5 % de NCS et P/S. Lors du titrage, le milieu de culture était changé pour 200 µL de DMEM contenant 2 % de NCS et P/S. Un volume de 100 µL des dilutions en série était mis sur le tapis de cellules Vero. Les plaques de culture étaient mises en incubation à 37 °C avec 5 % de CO₂ et agitées aux 15 minutes pendant une heure. Ensuite, 1 mL de DMEM contenant 2 % de NCS et P/S et 0,6 % de méthylcellulose était ajouté aux puits, de façon à prévenir la diffusion des virions dans le milieu de culture. De 48 à 72 heures post-infection, 1 mL de solution fix (ratio de méthanol :acide acétique de 3 :1) était ajouté aux puits pour fixer les cellules. Après une heure ou plus, le fix était enlevé et remplacé par 1 mL de solution de crystal violet (25 % (v/v) de méthanol et 0,5 % (p/v) de crystal violet dans de l'eau Milli-Q) pendant une heure supplémentaire pour colorer les cellules. Les plaques étaient ensuite rincées à l'eau. Les plages de lyse correspondant à une particule virale infectieuse étaient comptées à l'aide d'un stéréoscope. Les titres viraux sont exprimés en unité formatrice de plage par mL (pfu/mL).

La détermination des titres viraux a été effectuée sur des cellules Vero. Cependant, les cellules HeLa sont plus difficilement infectées. La différence de susceptibilité à l'infection est d'environ dix fois.

PCR en temps réel

Extraction d'ADN

L'ADN total des cellules infectées a été obtenu à l'aide de l'ensemble d'extraction sur colonne DNeasy de Qiagen. Les cellules HeLa en culture dans des plaques de six puits étaient lavées avec du PBS, puis les plaques étaient vidées. Un volume de 200 µL de PBS et 20 µL de protéinase K étaient ajoutés à chaque puits. Le reste de l'extraction a été faite en suivant le protocole du fabricant. L'éluat final contenant l'ADN était remis sur la colonne pour répéter la dernière étape d'éluat afin d'en augmenter la concentration finale. L'ADN extrait a été conservé à -20°C.

PCR en temps réel

La quantification relative par qPCR nécessite un gène contrôle pour la normalisation. Le gène cellulaire qui a été choisi était *rnaseP*. L'amplification de ce gène s'est faite avec les amorces suivantes : sens 5'-cct gaa ggc tct gcg cgg ac et antisens 5'-cag acc aac acc tcg gcg gg. Le gène viral qui a servi à quantifier les génomes viraux était *icp4*. Son amplification s'est faite avec les amorces suivantes : sens 5'-cga cac gga tcc acg acc c et antisens 5'-gat ccc cct ccc gcg ctt cgt ccg (Kramer *et al.*, 1995). La spécificité des produits amplifiés a été confirmée par PCR et migration sur gel d'agarose. Pour la réaction d'amplification, l'ensemble SYBR Advantage (Clontech) a été utilisé.

Pour chaque échantillon d'ADN extrait, l'amplification a été faite avec les deux ensembles d'amorces séparément, soit une amplification avec les amorces *rnaseP* et une avec les amorces *icp4*. Les réactions étaient faites en triplicata dans un volume total de 20 µL avec les quantités suivantes par tube : 10 µL de SYBR Advantage reaction mixture 2X, 0,8 µL de chaque amorces à 50 µg/mL, 6,4 µL d'eau et 2 µL d'ADN dilué 1/10 dans de l'eau. L'amplification était faite avec une étape de 10 minutes à 95 °C, puis de 35 cycles composés d'une étape à 95°C de 20 secondes suivie d'une étape à 64 °C de 20 secondes et d'une à 72 °C de 25 secondes. L'acquisition de données était faite après l'étape de 72 °C à 585 nm.

La réaction de PCR et l'acquisition des données ont été faites avec l'appareil Rotor-Gene 3000 (Corbett Life Science). L'analyse des courbes d'amplification, la détermination du seuil de fluorescence et des valeurs Ct ont été faites avec le logiciel Rotor Gene 6 (Corbett Life

Science). Les valeurs Ct représentent le moment (cycle) où l'amplification atteint un seuil déterminé. Le logiciel Microsoft Excel ensuite a été utilisé pour calculer le rapport d'augmentation du nombre de génomes viraux dans une condition par rapport à une autre en utilisant les valeurs Ct. Le calcul effectué est décrit dans (Livak *et al.*, 2001). Brièvement, la méthode $2^{-\Delta\Delta C_T}$ utilise les valeurs Ct pour calculer la différence dans la quantité de la cible entre deux conditions. Ce calcul relatif nécessite l'amplification d'un gène qui sert de normalisation pour la quantité d'ADN utilisée. Les valeurs Ct pour *icp4* sont donc normalisées par rapport aux valeurs Ct de *rnaseP* du même échantillon avant la comparaison entre différentes conditions.

Statistiques et alignements

Les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel Prism 5 (GraphPad software). Les alignements des séquences des ARNm et des ARNi ont été faits avec le logiciel Geneious 5.5.2 (Biomatters Ltd). Les séquences des ARNm proviennent de la base de données du NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Les expériences de ce projet avaient pour but de déterminer le rôle de B23 et d'UBF dans la réplication du VHS-1. La méthodologie employée était de diminuer l'expression de ces protéines par interférence à ARN, puis d'observer la réplication virale dans ces conditions.

B23

Diminution de l'expression de B23 par interférence à ARN

Une analyse informatique utilisant l'outil *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) a été faite pour s'assurer de l'absence d'appariement entre les ARNi et les ARNm viraux. Les ARNi de Dharmacon conçus contre les ARNm de B23 (ARNi B23) n'ont aucune cible sur les ARNm viraux (données non-publiées). L'analyse a révélée que les ARNi n'avaient aucun site d'homologie (complète ou importante) sur les ARNm viraux. Ensuite, pour s'assurer que les quatre séquences d'ARNi B23 pouvaient se lier aux trois transcrits d'ARNm identifiés pour B23, un alignement de toutes ces séquences a été fait avec le logiciel Geneious (Biomatters Ltd) (Figure 9). Les ARNi B23 peuvent s'apparier aux trois transcrits d'ARNm, codant pour les isoformes B23.1, B23.2 et B23.3.



Figure 9 : Alignement des séquences de B23 et des ARNi B23

Les barres noires représentent les trois transcrits de B23 et les zones rouges représentent les régions d'appariement des quatre séquences d'ARNi B23. Les appariements se font dans le cadre de lecture ouvert des trois transcrits d'ARNm de B23.

Ces analyses bioinformatiques ont aussi été faites avec les quatre séquences d'ARNi témoins conçues pour ne cibler aucun transcrit cellulaire. L'analyse avec le génome viral KOS a révélée que les quatre ARNi témoins négatifs « *non-targeting* » (ARNi NT) n'avaient aucune cible sur les ARNm viraux. Les ARNi NT ne ciblent donc aucun transcrits d'ARNm cellulaires ni viraux.

Afin de vérifier la diminution de l'expression de B23 par les ARNi, une analyse par immunobuvardage de type Western a été faite. Les cellules HeLa ont été mises en culture dans une plaque de douze puits et ont été soit non-transfectées, transfectées avec les ARNi NT ou avec un mélange des quatre ARNi B23. Les cellules ont été transfectées pendant 72 heures.

Afin de vérifier que la transfection n'affectait pas la viabilité cellulaire, le test SYTOX Green qui colore les acides nucléiques des cellules mortes a été utilisé. Les résultats de ce test montrent qu'après 72 heures de transfection au moins 85% des cellules transfectées étaient viables, qu'elles aient été transfectées avec les ARNi NT ou les ARNi B23 (données non publiées). Les cellules ont été lysées et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de PVDF. Elle a ensuite été marquée avec un anticorps monoclonal de souris contre B23 (Figure 10).

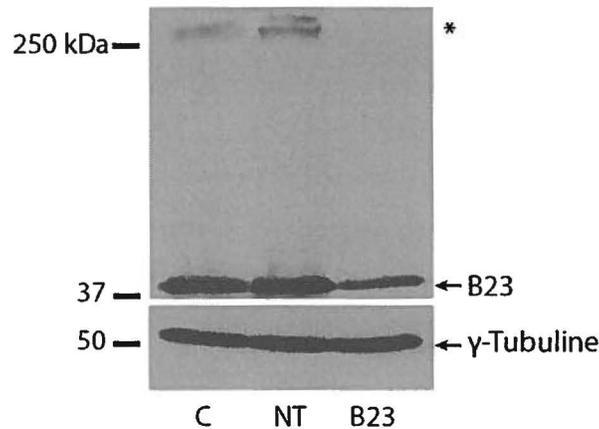


Figure 10 : Niveau de B23 après transfection avec les ARNi

Niveau d'expression de B23 dans les cellules HeLa après 72 heures de transfection avec les ARNi NT ou B23. Le puits de gauche contenait le lysat des cellules contrôles non-transfectées (C), le puits du centre contenait le lysat des cellules transfectées avec les ARNi NT (NT), et le puits de droite contenait le lysat des cellules transfectées avec les ARNi B23 (B23). L'astérisque montre la position de la forme oligomérisée de B23. La γ -tubuline sert de contrôle de chargement. La position du marqueur de poids moléculaire est indiquée à la gauche des panneaux.

Par rapport aux témoins, la transfection avec les ARNi B23 a causé une diminution de l'expression de B23. La bande marquée à 37 kDa est la forme monomérique qui diminue en intensité dans le puits correspondant à la transfection avec les ARNi B23. Le marquage situé près de 250 kDa représente une forme oligomérisée de B23 qui résiste à la dénaturation par SDS. Cette forme est retrouvée dans certaines cellules cancéreuses, dont les cellules HeLa (Ulanet *et al.*, 2003, Vladimirova *et al.*, 2010). Suite à la transfection des ARNi B23, la quantité de B23 sous forme oligomérisée diminue aussi.

Importance de B23 pour la production de particules virales infectieuses

Cette expérience visait à déterminer l'effet de la diminution de l'expression de B23 sur la réplication virale. Les cellules HeLa ont été transfectées en suivant les conditions décrites précédemment. Après la transfection de 72 heures, les cellules ont été infectées avec le virus de type sauvage KOS pour 18 heures à une m.o.i. de 5. Après le temps d'infection, le surnageant et les cellules ont été récoltés. Les particules virales intracellulaires et extracellulaires produites ont ensuite été quantifiées par titration (Figure 11).

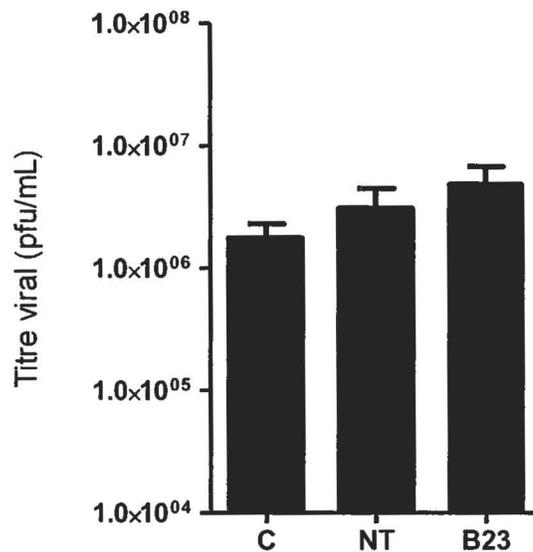


Figure 11 : Réplication virale lors d'une diminution de l'expression de B23

Représentation de la quantité de particules virales infectieuses produite pendant 18 heures dans les cellules non-transfectées (C), transfectées avec les ARNi NT (NT) et transfectées avec les ARNi B23 (B23). Cette figure regroupe les résultats de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type. Le test *t* de Student pour données non-appariées a été effectué.

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les différentes conditions. Ces résultats montrent que la diminution de B23 n'affecte pas le nombre de particules infectieuses produites à 18 heures post-infection (hpi) dans ces conditions.

UBF

Diminution de l'expression d'UBF par interférence à ARN

L'expérience qui suit avait pour but de vérifier la diminution spécifique de l'expression d'UBF dans les cellules transfectées. Les mêmes analyses bioinformatiques que celles effectuées avec les ARNi contre B23 ont été faites avec les ARNi dirigés contre les transcrits d'UBF (ARNi UBF). Ces ARNi de Dharmacon n'ont aucune cible sur les transcrits viraux et s'apparient aux trois transcrits identifiés pour UBF (Figure 12, zones rouges). Ces trois transcrits encodent deux isoformes d'UBF. Le transcrit (a) encode l'isoforme UBF1, alors que les transcrits (b) et (c) encodent l'isoforme UBF2.

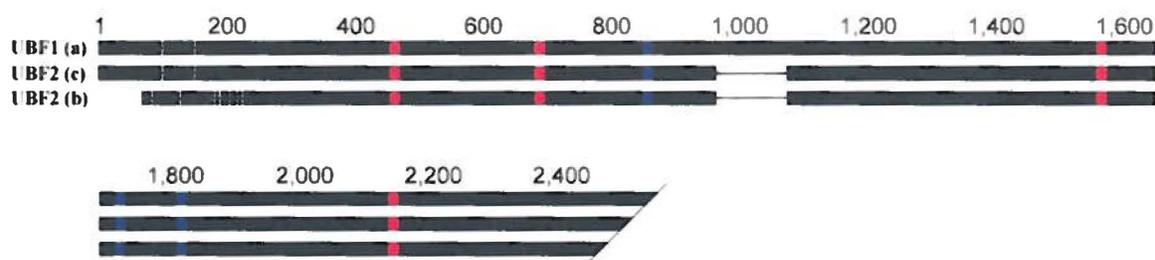


Figure 12 : Aligement des séquences d'UBF et des ARNi UBF

Les barres noires représentent les trois transcrits d'ARNm d'UBF et les zones rouges représentent les régions d'appariement des quatre séquences d'ARNi UBF provenant de Dharmacon. Les zones bleues représentent les régions ciblées par les trois séquences d'ARNi provenant d'Invitrogen. Tous les appariements sont dans le cadre de lecture ouvert.

Les lysats des cellules HeLa transfectées avec les ARNi NT ou transfectées avec les ARNi UBF ont été analysés par immunobuvardage de type western pour vérifier la diminution de l'expression d'UBF (Figure 13). Les cellules ont été transfectées avec un des quatre ARNi UBF ou les quatre en même temps, ou avec les ARNi NT.

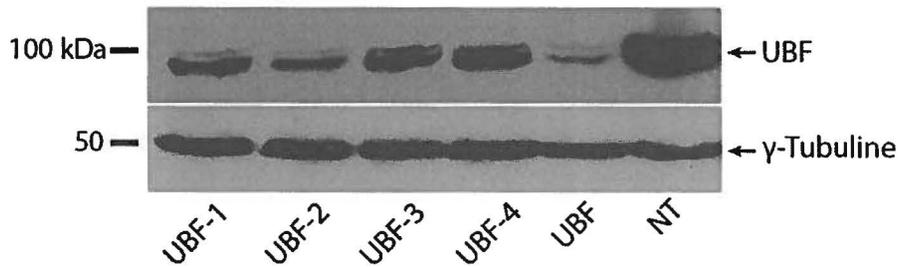


Figure 13 : Niveau d'UBF après transfection avec les ARNi Dharmacon
 Niveau d'expression d'UBF après 48 heures de transfection avec les ARNi provenant de Dharmacon. Les quatre premiers puits identifiés UBF-1, UBF-2, UBF-3 et UBF-4 correspondent aux lysats des cellules transfectées avec les ARNi UBF 1 à 4 respectivement. Le puits identifié UBF correspond au lysat des cellules transfectées avec les quatre séquences ensemble. Le dernier puits identifié NT correspond au lysat des cellules transfectées avec les quatre séquences d'ARNi témoins. Toutes les transfactions ont été faites avec la même concentration finale d'ARNi. La γ -tubuline sert de contrôle de chargement. La position du marqueur de poids moléculaire est indiquée à la gauche des panneaux.

La transfection avec une seule séquence a permis une diminution visible de la quantité d'UBF dans les cellules par rapport au témoin ARNi NT. La transfection avec quatre séquences différentes a permis une diminution plus importante de la quantité d'UBF par rapport aux transfactions avec séquences uniques et au contrôle. Afin de vérifier que la viabilité des cellules n'était pas affectée par la transfection, le test de viabilité SYTOX Green a été fait. Les résultats de ce test ont montré qu'après 48 heures de transfection, au moins 85% des cellules transfectées étaient viables, qu'elles aient été transfectées avec les ARNi NT ou les ARNi UBF (données non publiées). Les résultats qui suivent ont été obtenus en transfectant les cellules avec les quatre séquences d'ARNi UBF de Dharmacon pendant 48 heures, soit les conditions entraînant la plus grande diminution de l'expression d'UBF.

Importance d'UBF pour la production de particules virales infectieuses

Afin de déterminer l'effet de l'absence d'UBF sur la réplication virale, des cellules HeLa ont été non-transfectées (C), transfectées avec les ARNi NT (NT) ou transfectées avec les quatre séquences d'ARNi UBF (UBF). Après 48 heures, ces cellules ont été infectées par le virus de type sauvage KOS pendant 18 heures à une m.o.i. de 5. Après l'infection, les particules virales intracellulaires et extracellulaires produites ont ensuite été quantifiées par titration (Figure 14).

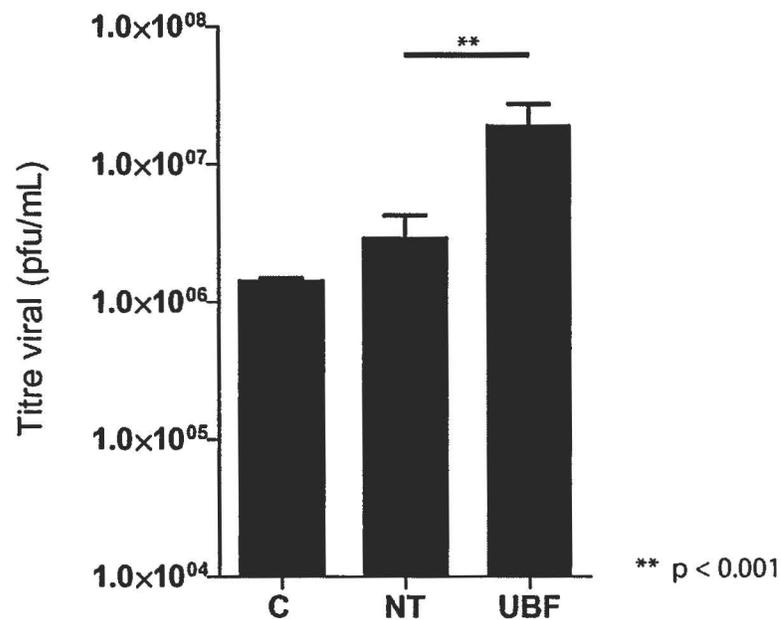


Figure 14 : Réplication virale lors d'une diminution de l'expression d'UBF
 Représentation de la quantité de particules virales infectieuses produite pendant 18 heures dans les cellules non-transfectées (C), transfectées avec les ARNi NT (NT) et transfectées avec les ARNi UBF (UBF) de Dharmacon. Le test *t* de Student pour données non-appariées a été effectué. Il y a une différence significative entre (NT) et (UBF), mais il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le titre viral de (C) et de (NT) ($p=0,12$). Cette figure regroupe les résultats de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type.

Cet essai de réplication virale sur les cellules transfectées contre UBF montre que le nombre de particules virales infectieuses produites est affecté par la diminution de l'expression d'UBF. Une augmentation de la quantité de virions produite d'environ dix fois par rapport au contrôle NT a été observée. Cela suggère que, contrairement à notre hypothèse de départ, UBF restreint la production de particules virales infectieuses. En effet, dans les cellules ayant un faible niveau d'UBF, le virus se réplique en plus grande quantité.

Spécificité de l'effet des ARNi UBF

Afin d'éliminer la possibilité que le résultat observé est dû à un effet hors-cible imprévu, les expériences représentées aux figures 13 et 14 ont été répétées, cette fois-ci avec trois séquences d'ARNi provenant d'Invitrogen. Ces trois séquences sont différentes et ciblent d'autres exons des ARNm d'UBF que ceux ciblés par les ARNi de Dharmacon (Figure 12, zones bleues). Les cellules HeLa ont été soit non-transfectées (C), transfectées avec un ARNi témoin négatif provenant d'Invitrogen ne ciblant aucun ARNm (Neg), ou transfectées avec les trois séquences d'ARNi d'Invitrogen ciblant UBF (A, B et C). Les cellules ont été lysées 48 heures après transfection et les protéines ont été analysées par immunobuvardage de type western (Figure 15).

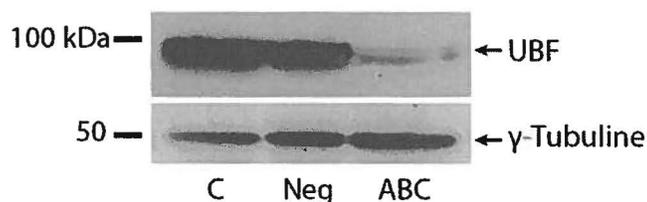


Figure 15 : Niveau d'UBF après transfection avec les ARNi d'Invitrogen

Niveau d'expression d'UBF après 48 heures de transfection avec les ARNi d'Invitrogen. Le premier puits identifié C correspond au lysat des cellules non-transfectées. Le deuxième puits identifié Neg correspond au lysat des cellules transfectées avec l'ARNi témoin négatif. Le dernier puits identifié ABC correspond au lysat des cellules transfectées avec les trois séquences d'ARNi contre UBF provenant d'Invitrogen (A, B et C). La γ -tubuline sert de contrôle de chargement. La position du marqueur de poids moléculaire est indiquée à la gauche des panneaux.

Ces différentes séquences entraînent également une diminution importante du niveau d'UBF après 48 heures par rapport aux témoins. Par la suite, d'autres cellules ont été transfectées suivant les mêmes conditions et ont été infectées avec KOS pour 18 heures à une m.o.i. de 5. Les particules virales intracellulaires et extracellulaires produites ont ensuite été quantifiées par titration (Figure 16).

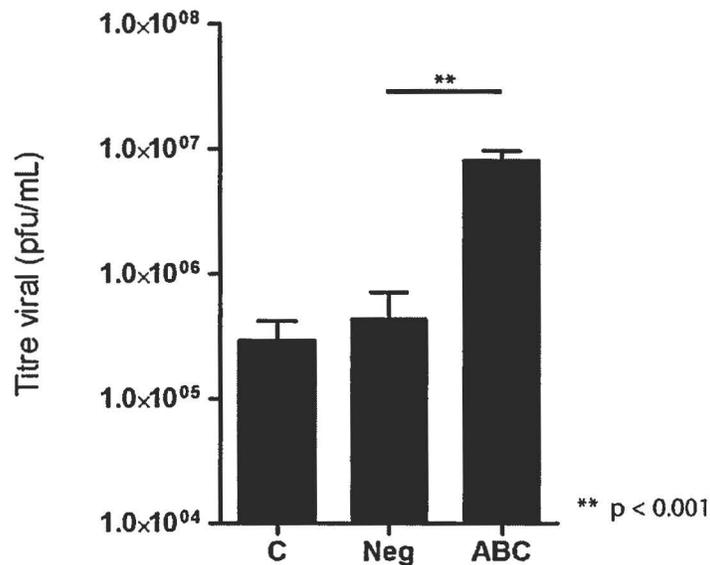


Figure 16 : Réplication virale lors d'une diminution de l'expression d'UBF par les ARNi d'Invitrogen
 Représentation de la quantité de particules virales infectieuses produite pendant 18 heures dans les cellules non-transfectées (C), transfectées avec l'ARNi témoin négatif (Neg) et transfectées avec les ARNi d'Invitrogen contre UBF (ABC). Le test *t* de Student pour données non-appariées a été effectué. Il y a une différence significative entre (Neg) et (ABC), mais il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le titre viral de (C) et de (Neg) ($p=0,39$). Cette figure regroupe les résultats de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type.

La production de particules virales infectieuses est toujours augmentée d'environ dix fois dans les cellules déplétées en UBF par rapport aux contrôles. Cela montre que l'augmentation observée du nombre de particules infectieuses produit n'est pas dû à un effet hors-cible des ARNi. Effectivement, le même effet est obtenu avec différentes séquences ciblant les ARNm d'UBF. Toutes les expériences qui suivent ont été faites en utilisant les ARNi provenant de Dharmacon (Figure 12, zones rouges).

Impact d'UBF sur le cycle de réplication virale

Les prochaines expériences avaient pour but d'identifier avec quelle étape de la réplication virale UBF interfère.

Impact sur le niveau de protéines structurales

Afin de déterminer si la diminution de l'expression d'UBF menait à un changement du niveau de synthèse des protéines virales, les cellules HeLa ont été soit non-transfectées (C), transfectées avec les ARNi NT (NT) ou avec les ARNi UBF (UBF) pendant 48 heures. Elles ont ensuite été infectées par KOS à une m.o.i. de 5 et les protéines ont été extraites aux temps indiqués. Un immunobuvardage de type western et un marquage contre les protéines structurales du VHS-1 a été fait ensuite (Figure 17). Ce marquage contre les protéines structurales montre qu'elles sont exprimées en plus grande quantité dans les cellules transfectées avec les ARNi UBF par rapport aux témoins, ce qui est évident à 10 et à 15 hpi. L'échantillon M montre que la majorité des protéines marquées sont d'origine virale.

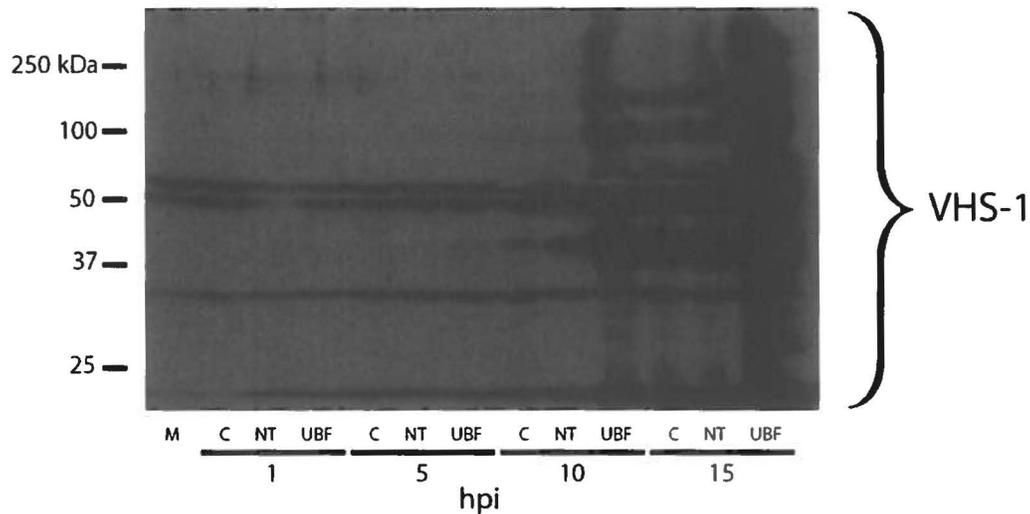


Figure 17 : Impact d'UBF sur l'expression de protéines virales structurales

Les protéines provenaient de cellules non-transfectées (C), transfectées avec les ARNi NT (NT) ou les ARNi UBF (UBF). L'échantillon identifié M venait de cellules non-transfectées et non-infectées. Les protéines ont été extraites à 1, 5, 10 et 15 hpi et ont été marquées en utilisant un anticorps dirigé contre les protéines totales du VHS-1. La position du marqueur de poids moléculaire est indiquée à la gauche du panneau.

Impact sur la réplication du génome viral

Puisque ces protéines sont principalement exprimées à partir des gènes tardifs, et que ces derniers dépendent de la réplication de l'ADN viral, l'impact d'UBF sur la synthèse des génomes viraux a été testé.

Les cellules ont été soit non-transfectées, transfectées avec les ARNi NT ou avec les ARNi UBF. Après 48 heures, elles ont été infectées avec le virus de type sauvage KOS à une m.o.i. de 5. L'ADN total a été extrait à 1, 5, 10 et 15 hpi, puis les génomes viraux ont été quantifiés de façon relative par qPCR en utilisant des amorces spécifiques au gène *icp4* (Figure 18). La quantité de génomes viraux a été normalisée par rapport à la quantité de génomes cellulaires qui ont été amplifiés avec des amorces spécifiques au gène *maseP*. Le ratio entre le nombre de génomes viraux produit dans les cellules transfectées avec les ARNi UBF et le nombre produit dans les cellules transfectées avec les ARNi NT a été déterminé.

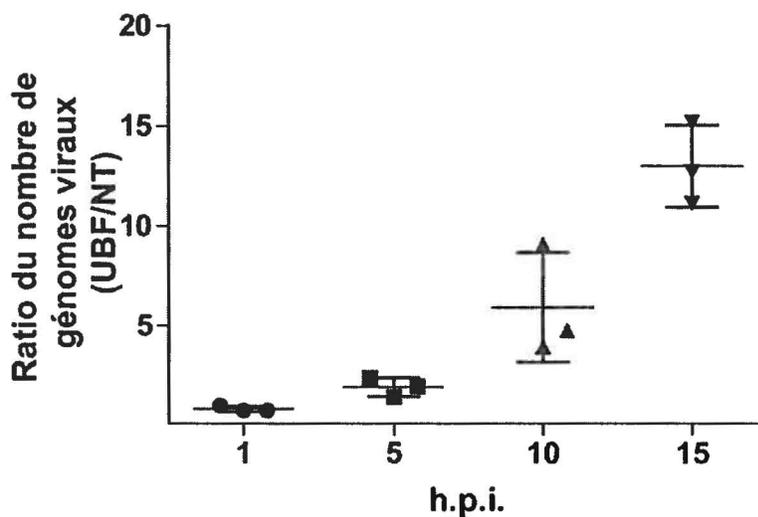


Figure 18 : Effet d'UBF sur la réplication de l'ADN viral

Ce diagramme représente l'impact de la réduction du niveau d'UBF sur la synthèse des génomes viraux. L'axe des ordonnées représente le ratio entre la quantité de génomes viraux produits dans les cellules déplétées en UBF par rapport à la quantité produite dans les cellules transfectées avec les ARNi NT. L'axe des abscisses donne le temps post-infection de l'extraction d'ADN total. Les données proviennent de trois expériences indépendantes et les barres d'erreurs représentent l'écart type.

La quantification relative par qPCR a révélé que le nombre de génomes viraux a augmenté plus rapidement dans les cellules qui ont été transfectées avec les ARNi UBF que dans les cellules témoins. À 1 hpi le ratio était près de 1, ce qui est attendu étant donné que la réplication de l'ADN viral n'était pas encore débutée. À 5 hpi la réplication du génome viral était initiée et le ratio moyen était de 1,93. Il y avait donc environ deux fois plus de génomes viraux dans les cellules où le niveau d'UBF avait été diminué que dans les cellules contrôles. À 10 hpi le ratio moyen était de 5,9 et il était de 13 à 15 hpi. En plus d'une quantité de génomes viraux augmentée dans les cellules déplétées en UBF, cette différence s'est accrue avec le temps, ce

qui démontre que la réplication des génomes viraux s'est fait avec moins de restrictions. À des fins de contrôle, le ratio a également été calculé entre les deux témoins (non-transfecté et NT). Le calcul a été fait avec les valeurs obtenues pour les cellules transfectées avec les ARNi NT par rapport à celles obtenues pour les cellules non transfectées. Les ratios calculés étaient tous près de 1 pour chaque temps post-infection (données non publiées). Donc, aucun changement dans la synthèse d'ADN viral n'a été observé entre les deux témoins.

Impact sur le niveau de protéines IP et P

Étant donné l'effet d'UBF sur la réplication de l'ADN viral, la possibilité que cet effet soit dû à une augmentation de la synthèse de protéines immédiate-précoces et précoces a été étudiée. Dans cette expérience, les cellules ont été soit non-transfectées, transfectées avec les ARNi NT ou avec les ARNi UBF. Elles ont ensuite été infectées avec KOS à une m.o.i. de 5. Les protéines ont été extraites à 5, 10 et 15 hpi. Un échantillon de cellules (M) a été non transfecté et non-infecté. Les protéines de cet échantillon ont été extraites au même moment que 15 hpi. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de PVDF (Figure 19). Le marquage d'ICP27 par immunobuvardage de type western a été utilisé pour représenter la production de protéines immédiate-précoces et le marquage de la thymidine kinase virale (TK) pour les protéines précoces.

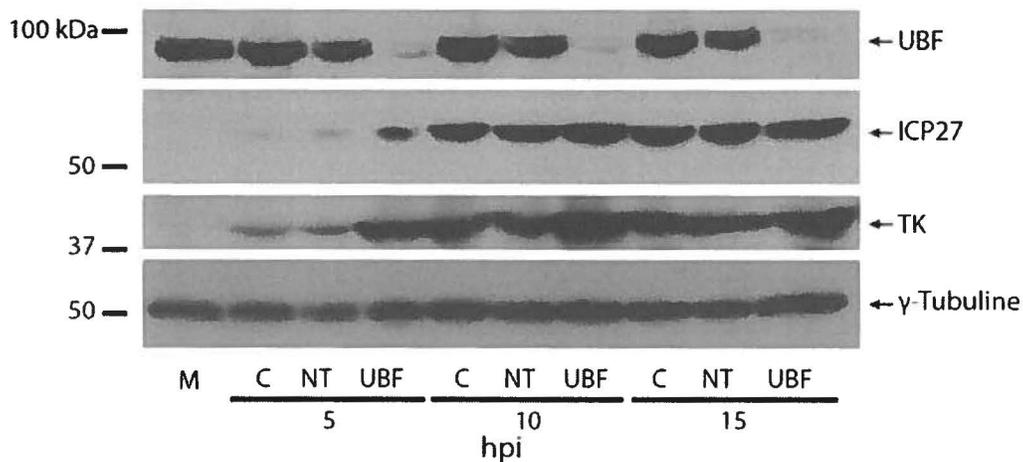


Figure 19 : Impact d'UBF sur l'expression des protéines IP et P
 Les protéines provenaient de cellules non-transfectées (C), transfectées avec les ARNi NT (NT) ou les ARNi UBF (UBF). L'échantillon (M) a été extrait à 15 hpi et venait de cellules non-transfectées et non-infectées. Les protéines ont été extraites à 5,10 et 15 hpi. Les membranes ont été marquées pour UBF, ICP27, TK et la γ -tubuline. Cette dernière sert de contrôle de chargement. La position du marqueur de poids moléculaire est indiquée à la gauche des panneaux.

Le marquage d'UBF a montré que son niveau était diminué dans les cellules transfectées avec les ARNi UBF par rapport aux témoins (C) et (NT). Dans les puits (UBF), le marquage d'ICP27 a montré une quantité plus élevée de la protéine que dans les puits (C) et (NT) à 5 hpi. Le niveau d'expression de TK était aussi plus élevé par rapport aux témoins à 5, 10 et 15 hpi. La différence dans la quantité de protéines virales était visible à des temps post-infection où la réplication de l'ADN viral était déjà commencée (Figure 18 à 5 hpi et Figure 19 à 5 hpi). La prochaine expérience a servi à déterminer si l'augmentation du nombre de génomes viraux pouvait être responsable de l'augmentation de l'expression de ces protéines virales.

Pour ce faire, l'expérience précédente (Figure 19) a été répétée, mais en présence de l'inhibiteur de l'ADN polymérase virale PAA dans le milieu de culture suite à l'infection (Figure 20). Il n'y a donc pas eu de réplication d'ADN viral dans ces cellules. La suite de l'expérience était inchangée.

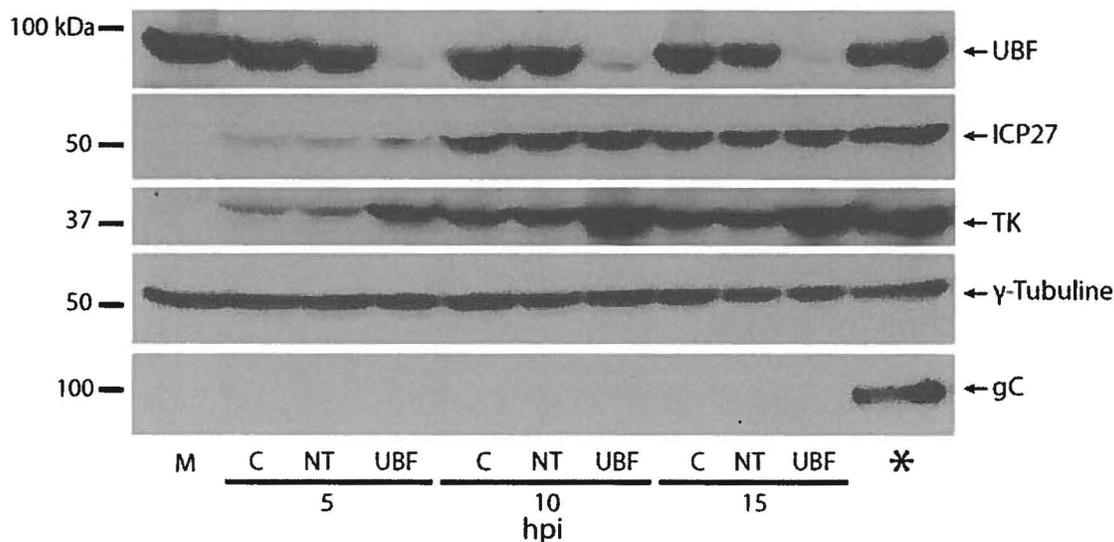


Figure 20 : Impact d'UBF sur l'expression des protéines IP et P en absence de réplication d'ADN viral
 Les protéines provenaient de cellules non-transfectées (C), transfectées avec les ARNi NT (NT) ou les ARNi UBF (UBF). L'échantillon (M) venait des cellules non-transfectées et non-infectées. Les protéines ont été extraites à 5, 10 et 15 hpi. Les membranes ont été marquées pour UBF, ICP27, TK, γ -tubuline et gC. La γ -tubuline sert de contrôle de chargement et la protéine virale γ 2 gC sert de contrôle pour l'inhibition de la réplication de l'ADN viral. Le puits identifié par un astérisque (*) sert de contrôle positif pour le marquage de gC et cet échantillon provenait de l'expérience précédente (Figure 19, puits C à 15 hpi). La position du marqueur de poids moléculaire est indiquée à la gauche des panneaux.

Le marquage d'UBF a montré que la transfection avec les ARNi UBF a permis une diminution de l'expression de cette protéine par rapport aux contrôles. L'absence de marquage pour gC,

une protéine $\gamma 2$, a confirmé l'inhibition de la synthèse d'ADN viral par le PAA. Dans les cellules déplétées en UBF, une légère augmentation de la quantité d'ICP27 par rapport aux contrôles était visible à 5 hpi. Il y a également eu une augmentation de la quantité de TK visible à 5, 10 et 15 hpi. Ces protéines étaient exprimées en plus grande quantité que dans les contrôles (C) et (NT), malgré l'absence de réplication de l'ADN viral.

Effet d'UBF sur la réplication du VSH-2

La prochaine expérience avait pour but de tester si l'effet d'UBF sur la réplication du VHS-1 était spécifique à ce virus, ou s'il s'agissait d'un mécanisme général aux *Simplexvirus*. L'expérience de réplication virale dans les cellules contrôles non-transfectées, transfectées avec les ARNi NT ou transfectées avec les ARNi UBF (Figure 14) a donc été faite avec la souche HG52 du virus de l'herpès simplex 2 (Figure 21).

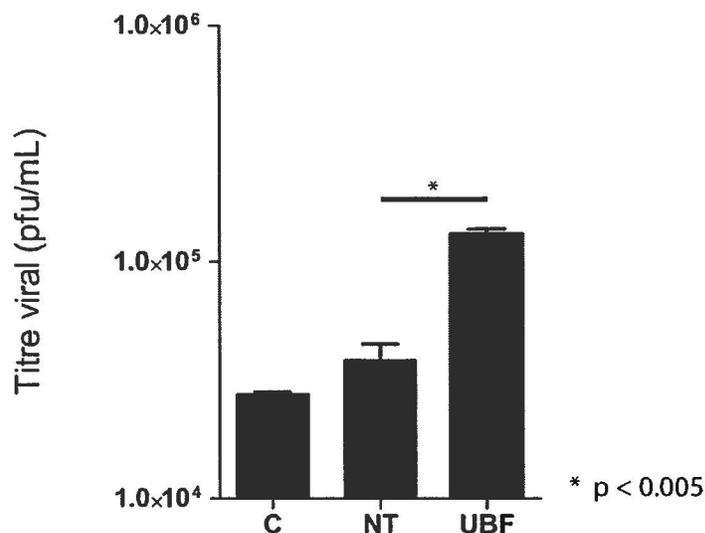


Figure 21 : Réplication du VHS-2 lors d'une diminution de l'expression d'UBF

Représentation de la quantité de particules virales infectieuses produite pendant 18 heures dans les cellules non-transfectées (C), transfectées avec les ARNi NT (NT) et transfectées avec les ARNi UBF (UBF). Le test *t* de Student pour données non-appariées a été effectué. Il y a une différence significative entre (NT) et (UBF). Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le titre viral de (C) et de (NT) ($p=0,15$). Cette figure regroupe les résultats de deux expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent l'écart type.

Les résultats ont été similaires à ceux obtenus pour la souche KOS du VHS-1. C'est-à-dire qu'il y a eu une augmentation significative de la quantité de particules virales infectieuses produite à

18 hpi dans les cellules transfectées contre UBF par rapport aux témoins. Il n'y a pas non-plus eu de différence significative entre les deux conditions témoins (C et NT). La réplication du VHS-2 était donc réduite en présence d'UBF. La fonction antivirale apparente d'UBF est donc un mécanisme cellulaire qui semble intervenir dans plusieurs herpèsvirus.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Le but de cette étude était de déterminer quels rôles jouent B23 et UBF, deux protéines nucléolaires, dans la réplication du VHS-1. La méthode choisie a permis d'obtenir plusieurs résultats quant à l'impact de ces protéines lors de l'infection de cellules humaines. Dans le cas d'UBF, ces résultats ont infirmé notre hypothèse de départ et orientent les travaux futurs dans une direction qui n'est pas explorée à ce jour, soit UBF en tant que mécanisme antiviral intrinsèque.

B23

La transfection avec les ARNi B23 a permis de diminuer son expression dans les cellules humaines HeLa par rapport aux témoins C et NT (Figure 10). Cependant, la diminution de l'expression de B23 n'a pas changé la quantité de particules virales infectieuses du VHS-1 présente à 18 hpi (Figure 11). Il est possible que la dispersion de B23 soit la conséquence d'une désorganisation nucléolaire. Étant donné (i) l'implication de B23 dans des processus cellulaires cruciaux, (ii) sa relocalisation spécifiquement causée par une protéine virale (UL24), et (iii) son implication dans la réplication de plusieurs virus, il semble peu probable que la relocalisation de B23 soit un « dommage collatéral » et qu'elle ne soit pas impliquée dans la réplication du VHS-1. L'explication probable et la plus simple est que la quantité résiduelle de B23 après 72 heures de transfection est toujours appréciable. Ce niveau de B23 pourrait être suffisant pour participer à la réplication virale sans causer un impact visible sur le nombre de particules infectieuses produites. Par contre, il est possible que les fonctions de B23 dans la biologie du virus soient dépendantes du type cellulaire. Le VHS-1 a la capacité d'infecter plusieurs types cellulaires. De la même façon que toutes les protéines virales ne sont pas requises dans tous les types cellulaires, il est possible que B23 ne soit pas importante dans les conditions testées.

De plus, la forme de B23 dans les cellules tumorales est particulière. Dans plusieurs types de cancers, des modifications du gène et de la protéine ont été répertoriées (revue dans Grisendi *et al.*, 2006). Une forme tronquée en N-terminale a été identifiée dans les cellules HeLa (9 acides aminés) et dans des cellules de cancer du foie (7 acides aminés) (Ulanet *et al.*, 2003, Vladimirova *et al.*, 2010). Cette forme tronquée a la capacité de former des oligomères stables dans des conditions dénaturantes (Figure 10), mais l'impact physiologique de cette délétion reste à être élucidé complètement. Il est possible que cette modification altère les fonctions de B23 et masque son rôle dans le cadre de l'infection. Les essais effectués pourraient être reproduits dans un autre type cellulaire afin d'éliminer cette possibilité. Dans l'éventualité où un

effet de l'absence de B23 est observé, il sera surtout intéressant de déterminer l'implication de ses isoformes (B23.1 B23.2 et B23.3), étant donné leurs différentes caractéristiques.

UBF

La transfection avec les ARNi qui ciblent UBF a permis de diminuer de façon importante l'expression de cette protéine par rapport aux différents témoins (Figure 13). Contrairement à notre hypothèse, le nombre de particules infectieuses produit est augmenté dans les cellules où le niveau d'UBF est faible (Figure 14). Afin d'éliminer tous les doutes que cette augmentation soit le résultat d'un effet hors-cible des ARNi UBF, l'essai a été reproduit avec trois séquences différentes d'ARNi ciblant chacune des exons différents du cadre de lecture ouvert d'UBF (Figure 12). Cette vérification a permis de confirmer que l'effet observé est spécifique à la diminution de la quantité d'UBF et non à une cible secondaire que les ARNi auraient pu avoir (Figure 16). De plus, deux études montrent que le taux de synthèse des ARNr peut être maintenu lors d'une redistribution ou lors d'une diminution de la quantité d'UBF (Lawrence *et al.*, 2006, Sanij *et al.*, 2008). Il est donc peu probable qu'une altération du cycle cellulaire soit responsable du phénomène observé. La diminution du niveau d'UBF semble donc lever une restriction sur la réplication virale. Tous virus confondus, aucune étude publiée ne suggère un rôle antiviral pour UBF.

L'évaluation du niveau des protéines structurales (principalement T) a ensuite permis d'orienter le reste des expériences (Figure 17). UBF aurait pu, par exemple, interférer avec une étape du cycle de réplication qui ne fait pas intervenir une synthèse protéique, comme le clivage des concatémères en génomes uniques, ou l'encapsidation des génomes pour la formation des capsides C. UBF aurait alors restreint la production de particules virales infectieuses, sans affecter la synthèse de composantes virales. Cependant, l'expérience représentée à la figure 17 a permis de savoir que la synthèse de protéines était affectée par UBF. Les expériences suivantes ont donc été orientées vers cet aspect du cycle de réplication virale.

UBF est une protéine qui lie l'ADN et qui peut en altérer la conformation. Étant donné qu'UBF est recrutée aux compartiments de réplication virale, il avait été suggéré qu'elle pouvait participer à la réplication du génome, comme il semble être le cas chez les adénovirus (Lawrence *et al.*, 2006, Stow *et al.*, 2009). Notre laboratoire a montré par la suite que l'initiation de la réplication de l'ADN viral précède le recrutement d'UBF (Lymberopoulos *et al.*, 2010). La quantification relative par qPCR des génomes viraux a permis d'éclaircir la relation entre UBF et

la réplication de l'ADN viral. Selon les résultats obtenus lors de cette expérience, la réplication du génome viral est aussi favorisée en absence d'UBF (Figure 18). Effectivement, le ratio entre le nombre de génomes viraux dans les cellules déplétées en UBF par rapport aux cellules témoins est supérieur à un. Ce ratio démontre une plus grande quantité de génomes viraux dans les cellules où l'expression d'UBF est diminuée par rapport aux témoins. De plus, ce ratio augmente avec le temps (Figure 18, 10 et 15 hpi) ce qui suppose que la restriction par UBF se poursuit durant tout le cycle de réplication. La première hypothèse est qu'UBF affecte une étape plus précoce et ainsi cause un retard qui s'amplifie durant le cycle de réplication. Une hypothèse alternative, soutenue par la capacité d'UBF d'interagir directement avec l'ADN et d'altérer la chromatine, est que la réplication du génome pourrait être directement affectée par UBF. Ces deux hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives, mais seule la première a été testée dans cette étude.

Dans le but de vérifier si UBF intervient plus tôt dans le cycle de réplication que la synthèse d'ADN, l'expression de protéines IP et P a été vérifiée (Figure 19). ICP27 et TK ont été choisies pour représenter les deux classes cinétiques IP et P respectivement. Les résultats de cette expérience montrent que le niveau de ces protéines IP et P augmente dans les cellules transfectées avec des ARNi contre UBF. Cette expression plus élevée pourrait être à l'origine de la réplication augmentée de l'ADN viral. De plus, cela suggère qu'UBF pourrait interférer avec la transcription. Par contre, la possibilité demeure que ce soit la plus grande quantité de génomes viraux qui permettent plus de transcription en servant de matrice. Pour répondre à cette question, cette expérience a été répétée en inhibant la réplication de l'ADN viral par l'ajout de PAA au milieu de culture. Dans ce contexte, il n'y a pas de réplication de l'ADN viral ni d'expression des protéines qui en dépendent. Le fait que le même phénomène d'augmentation de l'expression des protéines IP et P est observé montre que cette synthèse est affectée directement par UBF (Figure 20). Cela n'exclut toutefois pas la possibilité qu'une plus grande quantité de génomes viraux soit un facteur supplémentaire pour augmenter la transcription.

Les résultats obtenus montrent qu'UBF réduit le niveau de synthèse des protéines IP, P et T, le rythme auquel les génomes viraux sont répliqués et le nombre de particules infectieuses produit. La figure 21 montre que cette inhibition de la réplication n'est pas limitée au VHS-1, mais s'applique aussi au VHS-2. Cela suggère qu'UBF est un facteur intrinsèque de défense antivirale qui restreint la réplication du VHS-1 et du VHS-2. Il s'agit possiblement d'un phénomène présent chez d'autres virus de la famille *Herpesviridae*, au même titre que les ND10.

Hypothèse actuelle

L'hypothèse actuelle est qu'UBF est recrutée aux génomes viraux entrants où la transcription est active pour restreindre la réplication du VHS-1 et VHS-2, possiblement en reconnaissant des structures de l'ADN spécifiques à cet état. Plusieurs éléments abondent dans ce sens.

Premièrement, les résultats de cette étude montrent qu'UBF restreint la réplication virale. Aussi, une étude montre que des constructions d'UBF tronquées, mais qui sont recrutées aux compartiments de réplication virale sont capables de diminuer la réplication virale et la réplication d'ADN dans un essai de transfection. Les formes tronquées plus courtes qui ne sont pas relocalisées n'induisent pas ces diminutions de réplication ou de synthèse d'ADN. La relocalisation semble donc être liée aux effets d'UBF. Les auteurs de cette étude proposent qu'UBF est recrutée à des structures spécifiques de l'ADN pour participer à sa réplication (Stow *et al.*, 2009). Ces résultats peuvent être interprétés différemment et ils concordent avec les observations d'effet antiviral d'UBF. De plus, son recrutement n'est pas nécessaire pour initier la réplication de l'ADN viral. En effet, notre laboratoire a montré que la synthèse d'ADN viral commence avant que la relocalisation d'UBF soit détectée (Lymberopoulos *et al.*, 2010).

Deuxièmement, la liaison d'UBF à la chromatine induit des changements de conformation qui peuvent en moduler l'accès, ce qui est connu pour les protéines du type HMG. UBF a la capacité de réguler l'élongation de la transcription par la Pol I en faisant adopter à la chromatine une conformation restrictive (Stefanovsky *et al.*, 2006a, Stefanovsky *et al.*, 2006b). Il est donc possible qu'UBF altère la conformation du génome viral, ce qui en limiterait la transcription et possiblement la réplication. Cela expliquerait les observations de cette étude. De plus, HMG 1 et Y, de la famille HMG (sous-famille HMGA), ont été identifiées comme pouvant se lier à plusieurs endroits dans le site promoteur IE-3 des gènes IP. Cette liaison favorise la transcription à partir de ce site en l'absence de facteurs viraux (Panagiotidis *et al.*, 1999). Ce résultat soutient notre hypothèse selon laquelle UBF pourrait interagir avec le génome viral, et cela grâce à ses domaines HMG. L'expérience représentée à la figure 20 qui montre qu'UBF est capable de restreindre la production de protéines IP et P à partir des génomes parentaux appuie aussi l'hypothèse actuelle. En plus d'agir directement sur le génome, UBF pourrait produire son action antivirale via d'autres protéines ou en complexe. Par exemple, notre laboratoire a montré qu'UBF restait associée à une sous-unité de la Pol I, RPA194, lors de sa relocalisation (Lymberopoulos *et al.*, 2010). UBF interagit aussi avec plusieurs protéines et est

capable d'en recruter à l'ADN, telles que PAF53, SL1 et plusieurs autres lors de la formation des NOR.

Troisièmement, la transcription semble recruter UBF au génome entrant. Une étude de notre laboratoire montre que la relocalisation d'UBF est partielle en présence de PAA (Lymberopoulos *et al.*, 2010). La réplication de l'ADN viral n'est donc pas essentielle à cette relocalisation, mais la transcription dans ces conditions est capable de l'induire. De plus, un virus UV-inactivé qui n'a aucune activité de transcription n'induit aucune relocalisation d'UBF (Bourget, 2011). Ces éléments montrent que la transcription virale peut causer le recrutement d'UBF, mais que cette dernière n'est pas recrutée en absence de transcription.

L'ensemble de ces éléments soutient donc l'hypothèse actuelle qui sera la base des travaux futurs.

Travaux futurs

Il existe deux isoformes d'UBF, qui varient dans leur capacité à lier l'ADN, à moduler sa conformation et à réguler la transcription. La question se pose alors si UBF1 et UBF2 sont impliquées dans les effets antiviraux observés, et si oui, s'ils le sont de la même façon. L'exon supplémentaire dans l'ARNm d'UBF1 pourrait permettre de le cibler spécifiquement à l'aide d'ARNi et donc de diminuer seulement cet isoforme afin d'étudier son rôle. Alternativement, une transfection d'ARNi comme dans cette étude (Figure 12) jumelée à la transfection de plasmide exprimant un des deux isoformes pourra permettre d'évaluer leur contribution individuelle à l'effet antiviral. La séquence de nucléotides du plasmide d'UBF pourrait être mutée pour éliminer le site de liaison des ARNi, mais en conservant la séquence d'acides aminés.

UBF peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et l'actétylation qui modulent son activité, sa spécificité et sa capacité d'interaction avec d'autres protéines. Le suivi de ces modifications au fil du cycle de réplication virale pourra révéler leurs rôles potentiels dans la modulation de l'activité antivirale d'UBF.

Une donnée manquante pour appuyer l'hypothèse actuelle est le lien direct entre UBF et la transcription. La méthodologie utilisée sera similaire à celle de cette étude, mais les transcrits d'ARNm viraux seront observés par l'utilisation d'une sonde radiomarquée au ³²P. Les résultats obtenus à l'aide de cette technique de « *Northern blot* » pourront confirmer que la transcription restreinte est la cause du niveau plus faible de protéines.

Ensuite, les mécanismes de la relocalisation d'UBF devront être éclaircis. Jusqu'à maintenant, la relocalisation d'UBF a été montrée aux compartiments de réplication virale. Dans un premier temps, un essai d'immunoprécipitation de la chromatine avec UBF permettra de vérifier si UBF interagit avec le génome viral. Jumelé à cela, nous pourrons identifier les sites de liaison d'UBF sur le génome avec un essai de protection de la DNase. Dans un deuxième temps, une co-immunoprécipitation avec UBF pourra éclaircir les mécanismes de sa relocalisation en identifiant ses partenaires d'interaction protéiques.

Les résultats à ce jour montrent que la transcription est nécessaire à la relocalisation, mais ils ne montrent pas si elle est suffisante. Une expérience de transfection de l'ADN viral infectieux et de marquage d'UBF en immunofluorescence permettra de déterminer si des facteurs de transcription viraux du tégment, tels que VP16, sont impliqués dans le recrutement d'UBF, car ils seront absents au début de l'infection. En plus de cette expérience, la transfection d'ADN viral infectieux en présence d'un inhibiteur de la transcription nous permettra de savoir si le génome viral est suffisant pour induire la relocalisation, ou si la transcription est requise. Dans l'éventualité où le génome seul pourrait induire la relocalisation d'UBF, le lien entre les domaines HMGB d'UBF et les mécanismes senseurs d'acides nucléiques pourra être étudié. Effectivement, ces domaines sont impliqués dans ces mécanismes (Yanai *et al.*, 2012). Des co-marquages avec UBF et des facteurs de l'immunité innée pourront montrer ces interactions possibles.

Les résultats de ces expériences pourront nous permettre d'identifier le mécanisme de relocalisation d'UBF ainsi que sa cible dans les compartiments de réplication virale.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Dans un premier temps, les résultats de B23 montrent qu'elle ne serait pas impliquée dans la réplication du VHS-1, car le nombre de particules infectieuses produit était inchangé. Il faut toutefois souligner l'importance du type cellulaire et l'impact que peuvent avoir certaines particularités des lignées tumorales. Ces différences limitent la valeur de l'extrapolation qui peut être faite à d'autres types cellulaires.

Ensuite, les résultats des expériences effectuées dans cette étude montrent qu'UBF est un facteur de défense antivirale intrinsèque contre le VHS-1 et VHS-2. Effectivement, une restriction de la production de particules virales infectieuses, de la synthèse protéique et de la réplication du génome a été observée. Plusieurs études font état d'UBF comme facteur cellulaire détourné par les virus pour leur propre réplication. Cette étude montre pour la première fois qu'UBF peut participer à une défense antivirale.

Le VHS-1 ne possède pas de moyen connu pour échapper à cette restriction. D'autres mécanismes antiviraux intrinsèques sont efficacement contrecarrés par des facteurs viraux. Les corps ND10 sont un bon exemple de cette situation. Ils ont la capacité d'inhiber presque complètement la réplication virale, mais ils sont dégradés aussitôt qu'ICP0 est produite. À l'opposé, la relocalisation d'UBF semble se faire sans contrainte et persiste dans le temps. Les répercussions sur le cycle de réplication virale sont observées jusqu'à au moins 18 hpi.

Les travaux futurs devront donc viser à identifier le mécanisme de relocalisation d'UBF et son inhibition de l'expression génique, ainsi que sa cible. Ces informations pourront possiblement servir à imiter ce fonctionnement de façon artificielle. Cela pourra s'avérer être le début d'un nouveau moyen thérapeutique contre le VHS-1 et VHS-2.

RÉFÉRENCES

- Ace CI, McKee TA, Ryan JM, Cameron JM & Preston CM (1989) Construction and characterization of a herpes simplex virus type 1 mutant unable to transinduce immediate-early gene expression. *J. Virol.* 63(5):2260-2269.
- Ahmad Y, Boisvert FM, Gregor P, Cobley A & Lamond AI (2009) NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue):D181-184.
- Akey CW & Luger K (2003) Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13(1):6-14.
- Akhtar J & Shukla D (2009) Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 276(24):7228-7236.
- Arana ME, Haq B, Tanguy Le Gac N & Boehmer PE (2001) Modulation of the herpes simplex virus type-1 UL9 DNA helicase by its cognate single-strand DNA-binding protein, ICP8. *J. Biol. Chem.* 276(9):6840-6845.
- Arthur JL, Scarpini CG, Connor V, Lachmann RH, Tolkovsky AM & Efstathiou S (2001) Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. *J. Virol.* 75(8):3885-3895.
- Atanasiu D, Whitbeck JC, Cairns TM, Reilly B, Cohen GH & Eisenberg RJ (2007) Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(47):18718-18723.
- 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.
- Baker ML, Jiang W, Rixon FJ & Chiu W (2005) Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages. *J. Virol.* 79(23):14967-14970.
- Baker RO, Murata LB, Dodson MS & Hall JD (2000) Purification and characterization of OF-1, a host factor implicated in herpes simplex replication. *J. Biol. Chem.* 275(39):30050-30057.
- 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.
- Baringer JR & Swoveland P (1973) Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. *N. Engl. J. Med.* 288(13):648-650.
- Bastian FO, Rabson AS, Yee CL & Tralka TS (1972) Herpesvirus hominis: isolation from human trigeminal ganglion. *Science* 178(4058):306-307.
- Beard PM, Duffy C & Baines JD (2004) Quantification of the DNA cleavage and packaging proteins U(L)15 and U(L)28 in A and B capsids of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 78(3):1367-1374.

- Bell SP, Jantzen HM & Tjian R (1990) Assembly of alternative multiprotein complexes directs rRNA promoter selectivity. *Genes Dev.* 4(6):943-954.
- Bell SP, Learned RM, Jantzen HM & Tjian R (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* 241(4870):1192-1197.
- Bertrand L, Leiva-Torres GA, Hyjazie H & Pearson A (2010) Conserved residues in the UL24 protein of herpes simplex virus 1 are important for dispersal of the nucleolar protein nucleolin. *J. Virol.* 84(1):109-118.
- Bertrand L & Pearson A (2008) The conserved N-terminal domain of herpes simplex virus 1 UL24 protein is sufficient to induce the spatial redistribution of nucleolin. *J. Gen. Virol.* 89(Pt 5):1142-1151.
- Bloom DC & Kwiatkowski DL (2011) HSV-1 Latency and the Roles of the LATs. *Alphaherpesviruses*, Weller SK (Édit.). p 295-315.
- Boehmer PE & Lehman IR (1997) Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 66:347-384.
- Boehmer PE & Villani G (2003) Herpes simplex virus type-1: a model for genome transactions. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 75:139-171.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascues J & Lamond AI (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(7):574-585.
- Borden KL (2002) Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol. Cell. Biol.* 22(15):5259-5269.
- Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM & Nigg EA (1989) Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56(3):379-390.
- Bourget A (2011) *Réorganisation nucléolaire des neurones suite à une infection par le virus de l'herpès simplex 1*. Master (Université du Québec).
- Boutell C, Sadis S & Everett RD (2002) Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *J. Virol.* 76(2):841-850.
- Brady RC & Bernstein DI (2004) Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* 61(2):73-81.
- Brown JC & Newcomb WW (2011) Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Current opinion in virology* 1(2):142-149.
- Buddingh GJ, Schrum DI, Lanier JC & Guidry DJ (1953) Studies of the natural history of herpes simplex infections. *Pediatrics* 11(6):595-610.
- Calle A, Ugrinova I, Epstein AL, Bouvet P, Diaz JJ & Greco A (2008) Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. *J. Virol.* 82(10):4762-4773.
- Campbell ME, Palfreyman JW & Preston CM (1984) Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription. *J. Mol. Biol.* 180(1):1-19.

- Canto-Nogues C, Hockley D, Grief C, Ranjbar S, Bootman J, Almond N & Herrera I (2001) Ultrastructural localization of the RNA of immunodeficiency viruses using electron microscopy in situ hybridization and in vitroinfected lymphocytes. *Micron* 32(6):579-589.
- Cerutti A, Maillard P, Minisini R, Vidalain PO, Roohvand F, Pecheur EI, Pirisi M & Budkowska A (2011) Identification of a functional, CRM-1-dependent nuclear export signal in hepatitis C virus core protein. *PLoS ONE* 6(10):e25854.
- Chang JH & Olson MO (1989) A single gene codes for two forms of rat nucleolar protein B23 mRNA. *J. Biol. Chem.* 264(20):11732-11737.
- Chelbi-Alix MK & de The H (1999) Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18(4):935-941.
- Chen D, Belmont AS & Huang S (2004) Upstream binding factor association induces large-scale chromatin decondensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(42):15106-15111.
- Chow CS & Coen DM (1995) Mutations that specifically impair the DNA binding activity of the herpes simplex virus protein UL42. *J. Virol.* 69(11):6965-6971.
- Cmarko D, Verschure PJ, Rothblum LI, Hernandez-Verdun D, Amalric F, van Driel R & Fakan S (2000) Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem. Cell Biol.* 113(3):181-187.
- Cocchi F, Fusco D, Menotti L, Gianni T, Eisenberg RJ, Cohen GH & Campadelli-Fiume G (2004) The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(19):7445-7450.
- Coller KE, Lee JI, Ueda A & Smith GA (2007) The capsid and tegument of the alphaherpesviruses are linked by an interaction between the UL25 and VP1/2 proteins. *J. Virol.* 81(21):11790-11797.
- Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS & Longnecker R (2011) Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* 9(5):369-381.
- Conway JF, Homa F. L. (2011) Nucleocapsid structure, assembly and DNA packaging of herpes simplex virus. *Alphaherpesviruses*, Weller SK (Édit.). p 175-193.
- Copeland AM, Newcomb WW & Brown JC (2009) Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment. *J. Virol.* 83(4):1660-1668.
- 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.
- Costanzo F, Campadelli-Fiume G, Foa-Tomasi L & Cassai E (1977) Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B. *J. Virol.* 21(3):996-1001.
- Crute JJ, Mocarski ES & Lehman IR (1988) A DNA helicase induced by herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res.* 16(14A):6585-6596.

- Crute JJ, Tsurumi T, Zhu LA, Weller SK, Olivo PD, Challberg MD, Mocarski ES & Lehman IR (1989) Herpes simplex virus 1 helicase-primase: a complex of three herpes-encoded gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86(7):2186-2189.
- 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.
- Dabrowski CE, Carmillo PJ & Schaffer PA (1994) Cellular protein interactions with herpes simplex virus type 1 oriS. *Mol. Cell. Biol.* 14(4):2545-2555.
- Delboy MG & Nicola AV (2011) A Pre-Immediate-Early Role for Tegument ICP0 in the Proteasome-Dependent Entry of Herpes Simplex Virus. *J. Virol.* 85(12):5910-5918.
- Delboy MG, Roller DG & Nicola AV (2008) Cellular proteasome activity facilitates herpes simplex virus entry at a postpenetration step. *J. Virol.* 82(7):3381-3390.
- Desai P, Sexton GL, McCaffery JM & Person S (2001) A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation. *J. Virol.* 75(21):10259-10271.
- Deshmane SL & Fraser NW (1989) During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* 63(2):943-947.
- Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, Catic A, Ploegh H & Gill G (2006) The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol. Cell. Biol.* 26(12):4489-4498.
- Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R & Sodeik B (2002) Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol. Biol. Cell* 13(8):2795-2809.
- Dousset T, Wang C, Verheggen C, Chen D, Hernandez-Verdun D & Huang S (2000) Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol. Biol. Cell* 11(8):2705-2717.
- Duffy C, Mbong EF & Baines JD (2009) VP22 of herpes simplex virus 1 promotes protein synthesis at late times in infection and accumulation of a subset of viral mRNAs at early times in infection. *J. Virol.* 83(2):1009-1017.
- Dundr M, Misteli T & Olson MO (2000) The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J. Cell Biol.* 150(3):433-446.
- Elliott G & O'Hare P (1998) Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 induces the stabilization and hyperacetylation of microtubules. *J. Virol.* 72(8):6448-6455.
- Epstein MA (1962) Observations on the mode of release of herpes virus from infected HeLa cells. *J. Cell Biol.* 12:589-597.
- 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.
- Evilevitch A, Lavelle L, Knobler CM, Raspaud E & Gelbart WM (2003) Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(16):9292-9295.
- Fatahzadeh M & Schwartz RA (2007) Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.* 57(5):737-763; quiz 764-736.
- 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.
- Fusco D, Forghieri C & Campadelli-Fiume G (2005) The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(26):9323-9328.
- Galati D, Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Bocchino M, Costantini A, Montroni M, Magnani M, Piedimonte G & Silvestri G (2003) Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 188(10):1483-1491.
- Garber DA, Beverley SM & Coen DM (1993) Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197(1):459-462.
- Gibson W & Roizman B (1971) Compartmentalization of spermine and spermidine in the herpes simplex virion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68(11):2818-2821.
- Godowski PJ & Knipe DM (1986) Transcriptional control of herpesvirus gene expression: gene functions required for positive and negative regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83(2):256-260.
- Gottlieb J & Challberg MD (1994) Interaction of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase and the UL42 accessory protein with a model primer template. *J. Virol.* 68(8):4937-4945.
- Gottlieb J, Marcy AI, Coen DM & Challberg MD (1990) The herpes simplex virus type 1 UL42 gene product: a subunit of DNA polymerase that functions to increase processivity. *J. Virol.* 64(12):5976-5987.
- Greco A, Arata L, Soler E, Gaume X, Coute Y, Hacot S, Calle A, Monier K, Epstein AL, Sanchez JC, Bouvet P & Diaz JJ (2011) Nucleolin interacts with Us11 protein of herpes simplex virus type 1 and is involved in its trafficking. *J. Virol.*

- Grisendi S, Mecucci C, Falini B & Pandolfi PP (2006) Nucleophosmin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6(7):493-505.
- Hafezi W, Bernard E, Cook R & Elliott G (2005) Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains an internal VP16 interaction domain and a C-terminal domain that are both required for VP22 assembly into the virus particle. *J. Virol.* 79(20):13082-13093.
- Hanada K, Song CZ, Yamamoto K, Yano K, Maeda Y, Yamaguchi K & Muramatsu M (1996) RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *EMBO J.* 15(9):2217-2226.
- Hayward GS, Jacob RJ, Wadsworth SC & Roizman B (1975) Anatomy of herpes simplex virus DNA: evidence for four populations of molecules that differ in the relative orientations of their long and short components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72(11):4243-4247.
- He X & Lehman IR (2001) An initial ATP-independent step in the unwinding of a herpes simplex virus type I origin of replication by a complex of the viral origin-binding protein and single-strand DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(6):3024-3028.
- Hempel WM, Cavanaugh AH, Hannan RD, Taylor L & Rothblum LI (1996) The species-specific RNA polymerase I transcription factor SL-1 binds to upstream binding factor. *Mol. Cell. Biol.* 16(2):557-563.
- Henderson AS, Warburton D & Atwood KC (1972) Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69(11):3394-3398.
- Herrera JE, Savkur R & Olson MO (1995) The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res.* 23(19):3974-3979.
- Hindley CE, Davidson AD & Matthews DA (2007) Relationship between adenovirus DNA replication proteins and nucleolar proteins B23.1 and B23.2. *J. Gen. Virol.* 88(Pt 12):3244-3248.
- Hingorani K, Szebeni A & Olson MO (2000) Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J. Biol. Chem.* 275(32):24451-24457.
- Hirano M, Kaneko S, Yamashita T, Luo H, Qin W, Shirota Y, Nomura T, Kobayashi K & Murakami S (2003) Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J. Biol. Chem.* 278(7):5109-5115.
- Honess RW & Roizman B (1974) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14(1):8-19.
- Hozak P, Novak JT & Smetana K (1989) Three-dimensional reconstructions of nucleolus-organizing regions in PHA-stimulated human lymphocytes. *Biol. Cell.* 66(3):225-233.
- Hwang S, Kim KS, Flano E, Wu TT, Tong LM, Park AN, Song MJ, Sanchez DJ, O'Connell RM, Cheng G & Sun R (2009) Conserved herpesviral kinase promotes viral persistence by inhibiting the IRF-3-mediated type I interferon response. *Cell Host Microbe* 5(2):166-178.
- Igarashi K, Fawl R, Roller RJ & Roizman B (1993) Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus I lacking both S-component origins of DNA synthesis. *J. Virol.* 67(4):2123-2132.

- Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, Yeh ET, Strauss JF, 3rd & Maul GG (1999) PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J. Cell Biol.* 147(2):221-234.
- Izumi RE, Valdez B, Banerjee R, Srivastava M & Dasgupta A (2001) Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res.* 76(1):17-29.
- 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.
- Jurak I, Silverstein LB, Sharma M & Coen DM (2012) Herpes Simplex Virus is Equipped With RNA- and Protein-Based Mechanisms to Repress the Expression of ATRX, An Effector of Intrinsic Immunity. *J. Virol.* 86(18):10093-10102.
- 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.
- Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL & Diefenbach RJ (2009) Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res.* 145(2):173-186.
- Kermekchiev M, Workman JL & Pikaard CS (1997) Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. *Mol. Cell. Biol.* 17(10):5833-5842.
- Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, Arai K, Oishi N, Mizuno H, Hayashi N, Hahn WC & Murakami S (2004) Nucleolin interacts with telomerase. *J. Biol. Chem.* 279(49):51508-51515.
- Knez J, Bilan PT & Capone JP (2003) A single amino acid substitution in herpes simplex virus type 1 VP16 inhibits binding to the virion host shutoff protein and is incompatible with virus growth. *J. Virol.* 77(5):2892-2902.
- Koff A, Schwedes JF & Tegtmeyer P (1991) Herpes simplex virus origin-binding protein (UL9) loops and distorts the viral replication origin. *J. Virol.* 65(6):3284-3292.
- Korgaonkar C, Hagen J, Tompkins V, Frazier AA, Allamargot C, Quelle FW & Quelle DE (2005) Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol. Cell. Biol.* 25(4):1258-1271.
- Kotsakis A, Pomeranz LE, Blouin A & Blaho JA (2001) Microtubule reorganization during herpes simplex virus type 1 infection facilitates the nuclear localization of VP22, a major virion tegument protein. *J. Virol.* 75(18):8697-8711.
- Kramer MF & Coen DM (1995) Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* 69(3):1389-1399.
- Krieghoff-Henning E & Hofmann TG (2008) Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1783(11):2185-2194.

- Kubat NJ, Amelio AL, Giordani NV & Bloom DC (2004) The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription. *J. Virol.* 78(22):12508-12518.
- Kuhn A, Voit R, Stefanovsky V, Evers R, Bianchi M & Grummt I (1994) Functional differences between the two splice variants of the nucleolar transcription factor UBF: the second HMG box determines specificity of DNA binding and transcriptional activity. *EMBO J.* 13(2):416-424.
- Kundu P, Raychaudhuri S, Tsai W & Dasgupta A (2005) Shutoff of RNA polymerase II transcription by poliovirus involves 3C protease-mediated cleavage of the TATA-binding protein at an alternative site: incomplete shutoff of transcription interferes with efficient viral replication. *J. Virol.* 79(15):9702-9713.
- Kusakawa T, Shimakami T, Kaneko S, Yoshioka K & Murakami S (2007) Functional interaction of hepatitis C Virus NS5B with Nucleolin GAR domain. *J Biochem* 141(6):917-927.
- Lafarga M, Berciano MT, Hervas JP & Villegas J (1989) Nucleolar organization in granule cell neurons of the rat cerebellum. *J. Neurocytol.* 18(1):19-26.
- Lam Q, Smibert CA, Koop KE, Lavery C, Capone JP, Weinheimer SP & Smiley JR (1996) Herpes simplex virus VP16 rescues viral mRNA from destruction by the virion host shutoff function. *EMBO J.* 15(10):2575-2581.
- 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.
- Lazdins IB, Delannoy M & Sollner-Webb B (1997) Analysis of nucleolar transcription and processing domains and pre-rRNA movements by in situ hybridization. *Chromosoma* 105(7-8):481-495.
- Learned RM, Learned TK, Haltiner MM & Tjian RT (1986) Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element. *Cell* 45(6):847-857.
- Lechertier T, Sirri V, Hernandez-Verdun D & Roussel P (2007) A B23-interacting sequence as a tool to visualize protein interactions in a cellular context. *J. Cell Sci.* 120(Pt 2):265-275.
- Lee C, Smith BA, Bandyopadhyay K & Gjerset RA (2005) DNA damage disrupts the p14ARF-B23(nucleophosmin) interaction and triggers a transient subnuclear redistribution of p14ARF. *Cancer Res.* 65(21):9834-9842.
- Leinbach SS & Summers WC (1980) The structure of herpes simplex virus type 1 DNA as probed by micrococcal nuclease digestion. *J. Gen. Virol.* 51(Pt 1):45-59.
- Leung AK, Gerlich D, Miller G, Lyon C, Lam YW, Lleres D, Daigle N, Zomerdijk J, Ellenberg J & Lamond AI (2004) Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J. Cell Biol.* 166(6):787-800.
- Leung AK, Trinkle-Mulcahy L, Lam YW, Andersen JS, Mann M & Lamond AI (2006) NOPdb: Nucleolar Proteome Database. *Nucleic Acids Res.* 34(Database issue):D218-220.

- Li YP (1997) Protein B23 is an important human factor for the nucleolar localization of the human immunodeficiency virus protein Tat. *J. Virol.* 71(5):4098-4102.
- Liashkovich I, Hafezi W, Kuhn JM, Oberleithner H & Shahin V (2011) Nuclear delivery mechanism of herpes simplex virus type 1 genome. *J. Mol. Recognit.* 24(3):414-421.
- Lilley CE, Carson CT, Muotri AR, Gage FH & Weitzman MD (2005) DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(16):5844-5849.
- Lilley CE, Chaurushiya MS, Boutell C, Everett RD & Weitzman MD (2011) The intrinsic antiviral defense to incoming HSV-1 genomes includes specific DNA repair proteins and is counteracted by the viral protein ICP0. *PLoS Pathog.* 7(6):e1002084.
- Lindstrom MS (2011) NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. *Biochemistry research international* 2011:195209.
- Liu F & Roizman B (1993) Characterization of the protease and other products of amino-terminus-proximal cleavage of the herpes simplex virus 1 UL26 protein. *J. Virol.* 67(3):1300-1309.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402-408.
- Longnecker R & Roizman B (1986) Generation of an inverting herpes simplex virus 1 mutant lacking the L-S junction a sequences, an origin of DNA synthesis, and several genes including those specifying glycoprotein E and the alpha 47 gene. *J. Virol.* 58(2):583-591.
- Loret S, Guay G & Lippe R (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 82(17):8605-8618.
- Lu H, Li W, Noble WS, Payan D & Anderson DC (2004) Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *J. Proteome Res.* 3(5):949-957.
- 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.
- Lymberopoulos MH, Bourget A, Abdeljelil NB & 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 (2007) Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363(2):397-409.
- Lymberopoulos MH & Pearson A (2010) Relocalization of upstream binding factor to viral replication compartments is UL24 independent and follows the onset of herpes simplex virus 1 DNA synthesis. *J. Virol.* 84(9):4810-4815.
- Maggi LB, Jr., Kuchenruether M, Dadey DY, Schwoppe RM, Grisendi S, Townsend RR, Pandolfi PP & Weber JD (2008) Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol. Cell. Biol.* 28(23):7050-7065.
- Mais C, Wright JE, Prieto JL, Raggett SL & McStay B (2005) UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev.* 19(1):50-64.

- Martin A, O'Hare P, McLauchlan J & Elliott G (2002) Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains overlapping domains for cytoplasmic localization, microtubule interaction, and chromatin binding. *J. Virol.* 76(10):4961-4970.
- Matthews DA (2001) Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm. *J. Virol.* 75(2):1031-1038.
- 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.
- 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.
- Mettenleiter TC, Klupp BG & Granzow H (2006) Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(4):423-429.
- Michienzi A, Cagnon L, Bahner I & Rossi JJ (2000) Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(16):8955-8960.
- Michienzi A, De Angelis FG, Bozzoni I & Rossi JJ (2006) A nucleolar localizing Rev binding element inhibits HIV replication. *AIDS Res. Ther.* 3:13.
- Michienzi A, Li S, Zaia JA & Rossi JJ (2002) A nucleolar TAR decoy inhibitor of HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(22):14047-14052.
- Milne RS, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ & Cohen GH (2005) Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 79(11):6655-6663.
- Mohni KN, Livingston CM, Cortez D & Weller SK (2010) ATR and ATRIP are recruited to herpes simplex virus type 1 replication compartments even though ATR signaling is disabled. *J. Virol.* 84(23):12152-12164.
- Mohni KN, Mastrocola AS, Bai P, Weller SK & Heinen CD (2011) DNA mismatch repair proteins are required for efficient herpes simplex virus 1 replication. *J. Virol.* 85(23):12241-12253.
- Morrison EE, Stevenson AJ, Wang YF & Meredith DM (1998) Differences in the intracellular localization and fate of herpes simplex virus tegument proteins early in the infection of Vero cells. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 10):2517-2528.
- Moss T & Stefanovsky VY (2002) At the center of eukaryotic life. *Cell* 109(5):545-548.
- Nagel CH, Dohner K, Fathollahy M, Strive T, Borst EM, Messerle M & Sodeik B (2008) Nuclear egress and envelopment of herpes simplex virus capsids analyzed with dual-color fluorescence HSV1(17+). *J. Virol.* 82(6):3109-3124.
- Negi SS & Olson MO (2006) Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J. Cell Sci.* 119(Pt 17):3676-3685.

- 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.
- Nevels M, Nitzsche A & Paulus C (2011) How to control an infectious bead string: nucleosome-based regulation and targeting of herpesvirus chromatin. *Rev. Med. Virol.* 21(3):154-180.
- Newcomb WW & Brown JC (1991) Structure of the herpes simplex virus capsid: effects of extraction with guanidine hydrochloride and partial reconstitution of extracted capsids. *J. Virol.* 65(2):613-620.
- Newcomb WW, Homa FL & Brown JC (2005) Involvement of the portal at an early step in herpes simplex virus capsid assembly. *J. Virol.* 79(16):10540-10546.
- Newcomb WW, Homa FL, Thomsen DR, Booy FP, Trus BL, Steven AC, Spencer JV & Brown JC (1996) Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. *J. Mol. Biol.* 263(3):432-446.
- Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK & Brown JC (2001) The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *J. Virol.* 75(22):10923-10932.
- Nguyen-Huynh AT & Schaffer PA (1998) Cellular transcription factors enhance herpes simplex virus type 1 oriS-dependent DNA replication. *J. Virol.* 72(5):3635-3645.
- Nicola AV, Hou J, Major EO & Straus SE (2005) Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J. Virol.* 79(12):7609-7616.
- Nicola AV, McEvoy AM & Straus SE (2003) Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 77(9):5324-5332.
- Nicola AV & Straus SE (2004) Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. *J. Virol.* 78(14):7508-7517.
- Nishimura Y, Ohkubo T, Furuichi Y & Umekawa H (2002) Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(10):2239-2242.
- Nisole S, Krust B & Hovanessian AG (2002) Anchorage of HIV on permissive cells leads to coaggregation of viral particles with surface nucleolin at membrane raft microdomains. *Exp. Cell Res.* 276(2):155-173.
- 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'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.
- Okamoto H, Watanabe TA & Horiuchi T (2011) Double rolling circle replication (DRCR) is recombinogenic. *Genes Cells* 16(5):503-513.

- Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE & Fukasawa K (2000) Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103(1):127-140.
- Okuwaki M (2008) The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem* 143(4):441-448.
- Okuwaki M, Iwamatsu A, Tsujimoto M & Nagata K (2001a) Identification of nucleophosmin/B23, an acidic nucleolar protein, as a stimulatory factor for in vitro replication of adenovirus DNA complexed with viral basic core proteins. *J. Mol. Biol.* 311(1):41-55.
- Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M & Nagata K (2001b) Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett.* 506(3):272-276.
- Okuwaki M, Tsujimoto M & Nagata K (2002) The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol. Biol. Cell* 13(6):2016-2030.
- Panagiotidis CA & Silverstein SJ (1999) The host-cell architectural protein HMG I(Y) modulates binding of herpes simplex virus type 1 ICP4 to its cognate promoter. *Virology* 256(1):64-74.
- Panov KI, Friedrich JK, Russell J & Zomerdijk JC (2006) UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J.* 25(14):3310-3322.
- Parkinson J, Lees-Miller SP & Everett RD (1999) Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *J. Virol.* 73(1):650-657.
- Parry C, Bell S, Minson T & Browne H (2005) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein H binds to alphavbeta3 integrins. *J. Gen. Virol.* 86(Pt 1):7-10.
- Pasdeloup D, Blondel D, Isidro AL & Rixon FJ (2009) Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25. *J. Virol.* 83(13):6610-6623.
- Pelletier G, Stefanovsky VY, Faubladiere M, Hirschler-Laszkiwicz I, Savard J, Rothblum LI, Cote J & Moss T (2000) Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription. *Mol. Cell* 6(5):1059-1066.
- Perry RP & Errera M (1961) The role of the nucleolus in ribonucleic acid- and protein synthesis. I. Incorporation of cytidine into normal and nucleolar inactivated HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta* 49:47-57.
- Polvino-Bodnar M, Orberg PK & Schaffer PA (1987) Herpes simplex virus type 1 oriL is not required for virus replication or for the establishment and reactivation of latent infection in mice. *J. Virol.* 61(11):3528-3535.
- Poon AP & Roizman B (1995) The phenotype in vitro and in infected cells of herpes simplex virus 1 alpha trans-inducing factor (VP16) carrying temperature-sensitive mutations introduced by substitution of cysteines. *J. Virol.* 69(12):7658-7667.

- Prives C (1998) Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 95(1):5-8.
- 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.
- 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 (2010) Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1799(1-2):3-14.
- Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ & Baines JD (2002) Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J. Virol.* 76(17):8939-8952.
- Ritossa FM & Spiegelman S (1965) Localization of DNA Complementary to Ribosomal Rna in the Nucleolus Organizer Region of Drosophila Melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 53:737-745.
- Roizman B, Knipe DM & Whitley RJ (2007) Herpes Simplex Viruses. *Fields Virology*, Knipe DM & Howley PM (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins.
- Roussel P, Andre C, Comai L & Hernandez-Verdun D (1996) The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J. Cell Biol.* 133(2):235-246.
- Rubbi CP & Milner J (2003) Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* 22(22):6068-6077.
- Saffran HA, Read GS & Smiley JR (2010) Evidence for translational regulation by the herpes simplex virus virion host shutoff protein. *J. Virol.* 84(12):6041-6049.
- Sagou K, Uema M & Kawaguchi Y (2010) Nucleolin is required for efficient nuclear egress of herpes simplex virus type 1 nucleocapsids. *J. Virol.* 84(4):2110-2121.
- Said EA, Courty J, Svab J, Delbe J, Krust B & Hovanessian AG (2005) Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface-expressed nucleolin. *FEBS J.* 272(18):4646-4659.
- Samad MA, Okuwaki M, Haruki H & Nagata K (2007) Physical and functional interaction between a nucleolar protein nucleophosmin/B23 and adenovirus basic core proteins. *FEBS Lett.* 581(17):3283-3288.
- Sanij E & Hannan RD (2009) The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics* 4(6):374-382.
- 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.

- Savkur RS & Olson MO (1998) Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 26(19):4508-4515.
- Schrag JD, Prasad BV, Rixon FJ & Chiu W (1989) Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid. *Cell* 56(4):651-660.
- Severini A, Scraba DG & Tyrrell DL (1996) Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 70(5):3169-3175.
- Sheaffer AK, Newcomb WW, Gao M, Yu D, Weller SK, Brown JC & Tenney DJ (2001) Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation. *J. Virol.* 75(2):687-698.
- Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohno K, Kaneko S & Murakami S (2006) Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J. Virol.* 80(7):3332-3340.
- Shirata N, Kudoh A, Daikoku T, Tatsumi Y, Fujita M, Kiyono T, Sugaya Y, Isomura H, Ishizaki K & Tsurumi T (2005) Activation of ataxia telangiectasia-mutated DNA damage checkpoint signal transduction elicited by herpes simplex virus infection. *J. Biol. Chem.* 280(34):30336-30341.
- Sirri V, Hernandez-Verdun D & Roussel P (2002) Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J. Cell Biol.* 156(6):969-981.
- Sirri V, Roussel P & Hernandez-Verdun D (1999) The mitotically phosphorylated form of the transcription termination factor TTF-1 is associated with the repressed rDNA transcription machinery. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 19):3259-3268.
- Sirri V, Roussel P & Hernandez-Verdun D (2000) In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J. Cell Biol.* 148(2):259-270.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P & Hernandez-Verdun D (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* 129(1):13-31.
- Skepper JN, Whiteley A, Browne H & Minson A (2001) Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J. Virol.* 75(12):5697-5702.
- Smith DE, Tans SJ, Smith SB, Grimes S, Anderson DL & Bustamante C (2001) The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413(6857):748-752.
- Sodeik B, Ebersold MW & Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 136(5):1007-1021.
- Spector DL, Ochs RL & Busch H (1984) Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma* 90(2):139-148.
- Stackpole CW (1969) Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J. Virol.* 4(1):75-93.

- Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI & Moss T (2006a) 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 VY, Langlois F, Bazett-Jones D, Pelletier G & Moss T (2006b) ERK modulates DNA bending and enhancesome structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry (Mosc.)* 45(11):3626-3634.
- 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 enhancesome 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.
- Stevens JG & Cook ML (1971) Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* 173(3999):843-845.
- Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML & Feldman LT (1987) RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 235(4792):1056-1059.
- 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.
- Stros M, Launholt D & Grasser KD (2007) The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 64(19-20):2590-2606.
- Sugimoto K, Uema M, Sagara H, Tanaka M, Sata T, Hashimoto Y & Kawaguchi Y (2008) Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 82(11):5198-5211.
- Svobodova S, Bell S & Crump CM (2012) Analysis of the interaction between the essential herpes simplex virus 1 tegument proteins VP16 and VP1/2. *J. Virol.* 86(1):473-483.
- Szebeni A, Mehrotra B, Baumann A, Adam SA, Wingfield PT & Olson MO (1997) Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry (Mosc.)* 36(13):3941-3949.
- Szebeni A & Olson MO (1999) Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci.* 8(4):905-912.
- Tang Q, Li L, Ishov AM, Revol V, Epstein AL & Maul GG (2003) Determination of minimum herpes simplex virus type 1 components necessary to localize transcriptionally active DNA to ND10. *J. Virol.* 77(10):5821-5828.

- Tateishi K, Toh Y, Minagawa H & Tashiro H (1994) Detection of herpes simplex virus (HSV) in the saliva from 1,000 oral surgery outpatients by the polymerase chain reaction (PCR) and virus isolation. *J. Oral Pathol. Med.* 23(2):80-84.
- Taylor TJ & Knipe DM (2004) Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J. Virol.* 78(11):5856-5866.
- Toma HS, Murina AT, Areaux RG, Jr., Neumann DM, Bhattacharjee PS, Foster TP, Kaufman HE & Hill JM (2008) Ocular HSV-1 latency, reactivation and recurrent disease. *Semin. Ophthalmol.* 23(4):249-273.
- Toropova K, Huffman JB, Homa FL & Conway JF (2011) The HSV-1 UL17 protein is the second constituent of the capsid vertex specific component (CVSC) required for DNA packaging and retention (revised). *J. Virol.*
- Trinkle-Mulcahy L, Chusainow J, Lam YW, Swift S & Lamond A (2007) Visualization of intracellular PP1 targeting through transiently and stably expressed fluorescent protein fusions. *Methods Mol. Biol.* 365:133-154.
- Trus BL, Newcomb WW, Cheng N, Cardone G, Marekov L, Homa FL, Brown JC & Steven AC (2007) Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids. *Mol. Cell* 26(4):479-489.
- Tschochner H & Hurt E (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 13(5):255-263.
- 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.
- Turcotte S, Letellier J & Lippe R (2005) Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J. Virol.* 79(14):8847-8860.
- Turner A, Bruun B, Minson T & Browne H (1998) Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J. Virol.* 72(1):873-875.
- Ugai H, Dobbins GC, Wang M, Le LP, Matthews DA & Curiel DT (2012) Adenoviral protein V promotes a process of viral assembly through nucleophosmin 1. *Virology* 432(2):283-295.
- Ulanet DB, Torbenson M, Dang CV, Casciola-Rosen L & Rosen A (2003) Unique conformation of cancer autoantigen B23 in hepatoma: a mechanism for specificity in the autoimmune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(21):12361-12366.
- Vagnarelli P, Hudson DF, Ribeiro SA, Trinkle-Mulcahy L, Spence JM, Lai F, Farr CJ, Lamond AI & Earnshaw WC (2006) Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat. Cell Biol.* 8(10):1133-1142.

- van Genderen IL, Brandimarti R, Torrisi MR, Campadelli G & van Meer G (1994) The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* 200(2):831-836.
- Vladimirova NM, Lobanova NV & Potapenko NA (2010) State of oncomarker protein B23/nucleophosmin in HeLa cells. *Biochemistry (Mosc.)* 75(7):851-860.
- 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.
- Waggoner S & Sarnow P (1998) Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocation of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J. Virol.* 72(8):6699-6709.
- Wagner EK & Roizman B (1969) Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. I. Patterns of ribonucleic acid synthesis in productively infected cells. *J. Virol.* 4(1):36-46.
- Walton TH, Moen PT, Jr., Fox E & Bodnar JW (1989) Interactions of minute virus of mice and adenovirus with host nucleoli. *J. Virol.* 63(9):3651-3660.
- Wang D, Baumann A, Szebeni A & Olson MO (1994) The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end. *J. Biol. Chem.* 269(49):30994-30998.
- Wang D, Umekawa H & Olson MO (1993) Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell. Mol. Biol. Res.* 39(1):33-42.
- Wang QY, Zhou C, Johnson KE, Colgrove RC, Coen DM & Knipe DM (2005a) Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(44):16055-16059.
- Wang W, Budhu A, Forgues M & Wang XW (2005b) Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat. Cell Biol.* 7(8):823-830.
- Weir JP (2001) Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* 271(2):117-130.
- Whitley RJ (2006) Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res.* 71(2-3):141-148.
- Wild P, Engels M, Senn C, Tobler K, Ziegler U, Schraner EM, Loepfe E, Ackermann M, Mueller M & Walther P (2005) Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J. Virol.* 79(2):1071-1083.
- Wilkinson DE & Weller SK (2003) The role of DNA recombination in herpes simplex virus DNA replication. *IUBMB Life* 55(8):451-458.
- Woodhall DL, Groves IJ, Reeves MB, Wilkinson G & Sinclair JH (2006) Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J. Biol. Chem.* 281(49):37652-37660.
- WuDunn D & Spear PG (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 63(1):52-58.

- Xue Y, Gibbons R, Yan Z, Yang D, McDowell TL, Sechi S, Qin J, Zhou S, Higgs D & Wang W (2003) The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(19):10635-10640.
- Yamauchi Y, Kiriya K, Kubota N, Kimura H, Usukura J & Nishiyama Y (2008) The UL14 tegument protein of herpes simplex virus type 1 is required for efficient nuclear transport of the alpha transducing factor VP16 and viral capsids. *J. Virol.* 82(3):1094-1106.
- 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 K & Baines JD (2006) The putative terminase subunit of herpes simplex virus 1 encoded by UL28 is necessary and sufficient to mediate interaction between pUL15 and pUL33. *J. Virol.* 80(12):5733-5739.
- Yang K, Homa F & Baines JD (2007) Putative terminase subunits of herpes simplex virus 1 form a complex in the cytoplasm and interact with portal protein in the nucleus. *J. Virol.* 81(12):6419-6433.
- Yao F & Courtney RJ (1992) Association of ICP0 but not ICP27 with purified virions of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 66(5):2709-2716.
- Yu X, Liu L, Wu L, Wang L, Dong C, Li W & Li Q (2010) Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is capable of modulating the transcription of viral TK and gC genes via interaction with viral ICP0. *Biochimie* 92(8):1024-1030.
- Yu Y, Maggi LB, Jr., Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H & Weber JD (2006) Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* 26(10):3798-3809.
- Zelus BD, Stewart RS & Ross J (1996) The virion host shutoff protein of herpes simplex virus type 1: messenger ribonucleolytic activity in vitro. *J. Virol.* 70(4):2411-2419.
- Zhong S, Salomoni P & Pandolfi PP (2000) The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat. Cell Biol.* 2(5):E85-90.
- Zhou ZH, He J, Jakana J, Tatman JD, Rixon FJ & Chiu W (1995) Assembly of VP26 in herpes simplex virus-1 inferred from structures of wild-type and recombinant capsids. *Nat. Struct. Biol.* 2(11):1026-1030.