

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

**INHIBITION DU VIRUS DE L'HERPÈS SIMPLEX
PAR LA PROTÉINE CELLULAIRE
UPSTREAM BINDING FACTOR**

Par
Gabriel Ouellet Lavallée

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.)
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Jean-François Laliberté INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Lionel Berthoux Département de Biologie Médicale Université du Québec à Trois-Rivières
Examineur externe	Jacques Archambault Département de Microbiologie et Immunologie Université McGill
Directrice de recherche	Angela Pearson INRS-Institut Armand-Frappier

*adde parvum parvo
magnus acervus erit*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Angela Pearson pour son encadrement, son soutien et surtout pour la liberté intellectuelle qui m'a été accordée. J'ai également beaucoup appris grâce à ses critiques constructives. Merci pour la confiance qui m'a été accordée. Je tiens aussi remercier les membres du laboratoire et autres collègues 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, Nawel Ben Abdeljelil, Nicolas Richerieux, Slimane Dridi, Soumia Lahmidi et Tania Charpentier pour tous les moments passés au laboratoire et ailleurs, leur aide et les échanges qui ont eu lieu. Je remercie aussi Anne Philippon pour son aide et ses conseils, tant à tous les étudiants qu'à moi-même durant ces années à l'Institut Armand-Frappier.

Je tiens aussi à souligner le soutien dont ont fait preuve mes collègues de travail chez PAIRimmune et leur compréhension face aux défis de l'agencement travail-étude.

Merci à toute ma famille et belle-famille qui ont manifesté de l'intérêt pour ce projet de vie et surtout pour leur encouragement durant tout mon parcours. Je tiens à remercier sincèrement mes parents, René Ouellet et Danielle Lavallée, qui m'ont soutenu et encouragé à persévérer. Je suis éternellement reconnaissant pour tous les efforts que vous avez faits durant mon parcours académique.

En terminant, je tiens à remercier chaleureusement Rima Habib, que j'ai rencontrée durant mes études et avec qui je partage maintenant ma vie. Merci d'avoir partagé les bons moments et rendu meilleurs les plus ardues. Merci de m'avoir accompagné et écouté durant les années passées aux études et pour toute la compréhension dont tu fais preuve encore aujourd'hui.

RÉSUMÉ

La protéine cellulaire Upstream Binding Factor (UBF) est un facteur de transcription critique pour la production de transcrits ribosomiaux par l'ARN polymérase I. UBF est normalement localisée au nucléole où elle accomplit ses fonctions cellulaires. Suite à l'infection de la cellule hôte par le virus de l'Herpès Simplex 1 (VHS-1), la localisation d'UBF change et devient distribuée sous forme de multiples points dans le noyau.

Des résultats publiés du laboratoire ont montré que la relocalisation d'UBF est détectée initialement ailleurs qu'aux compartiments de réplication virale (CRV). Cependant, le rôle d'UBF dans l'infection par le VHS-1 demeurerait inconnu.

La méthode choisie pour déterminer la fonction d'UBF durant l'infection a été de diminuer son expression par interférence à ARN. Cela a permis de découvrir qu'UBF restreint la réplication virale. En effet, la diminution de son expression a résulté en une plus grande production de particules virales infectieuses ainsi qu'une accumulation plus importante d'ADN, de transcrits, et de protéines virales. De plus, une inhibition de la réplication de l'ADN viral a permis de démontrer qu'UBF interfère avec la réplication virale à partir du génome entrant.

Des analyses de colocalisation entre les points d'UBF et divers facteurs viraux par microscopie confocale ont ensuite été faites. Les résultats de ces expériences ont pu démontrer que les points d'UBF ne colocalisent pas initialement avec les CRV, ni leurs précurseurs, les pré-CRV. Par contre, les points d'UBF sont colocalisés avec les génomes entrants dans une certaine proportion.

La proportion avec laquelle les points d'UBF et les génomes viraux colocalisent varie selon la multiplicité d'infection (MOI) utilisée. À plus forte MOI, une plus grande proportion des génomes viraux est dépourvue d'UBF, alors que l'inverse est observé à plus faible MOI. Parallèlement à ce phénomène, une infection virale à plus forte MOI est moins affectée par la présence d'UBF qu'une infection à plus faible MOI. Une MOI plus élevée semble donc réduire la susceptibilité à UBF en réduisant sa colocalisation avec les génomes viraux.

Des expériences avec un virus mutant ont pu ensuite identifier une protéine virale responsable de cet effet dépendant de la MOI. Un virus dont le domaine d'activation du facteur de transcription viral VP16 est absent ne produit pas ce phénomène dépendant de la MOI. La proportion de génomes viraux et d'UBF colocalisés reste élevée peu importe la MOI. Le domaine d'activation

de VP16 semble donc requis pour prévenir la colocalisation entre le génome viral et UBF et possiblement pour contrecarrer son effet antiviral.

Deux isoformes d'UBF existent, soit UBF1 et UBF2, et des fonctions uniques à celles-ci ont été répertoriées. Il était donc pertinent de déterminer si une isoforme en particulier était responsable de l'effet antiviral. Une expression ectopique d'UBF1 ou d'UBF2 dans des cellules où l'expression d'UBF endogène est diminuée a permis de déterminer que les deux isoformes peuvent restreindre la réplication virale.

L'ensemble des résultats obtenus décrit pour la première fois une fonction antivirale menée par UBF. Le modèle proposé est qu'UBF est relocalisée aux génomes viraux après leur entrée dans le noyau de la cellule hôte. À ce moment, UBF interfère avec la production de transcrits et limite ainsi la réplication virale. Une fonction qui dépend de la protéine virale VP16 peut cependant contrecarrer cette inhibition en prévenant la colocalisation entre UBF et les génomes viraux.

ABSTRACT

The cellular protein Upstream Binding Factor (UBF) is an essential factor in rRNA transcription and is localised in the nucleolus. After infection by Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1), UBF is relocalised in the nucleus in distinct foci.

Published results from our laboratory showed that UBF relocalisation is initially detected outside of viral replication compartments (VRC). However, the precise role of UBF in HSV-1 infection remains undetermined.

A siRNA knock-down approach was chosen to identify UBF's role in HSV-1 infection. This allowed the discovery that UBF has an antiviral effect. Indeed, UBF knock-down results in an increase in infectious viral particles as well as in viral products such as viral transcripts, proteins, and DNA. Moreover, inhibition of viral DNA replication showed that the inhibitory effect of UBF on viral transcription is mediated on the input genomes.

Colocalisation analysis between UBF foci and viral components was subsequently performed by confocal microscopy. Results showed that UBF does not initially colocalise with VRC, or with pre-VRC. They do however colocalise with input viral genomes at a certain ratio.

The ratio of colocalisation between UBF foci and input viral genomes varies depending on the multiplicity of infection (MOI) used. At a higher MOI, the ratio of colocalisation decreases whereas this ratio is higher at a lower MOI. The use of a higher MOI also diminishes the UBF-mediated inhibition of replication. A higher MOI therefore seems to render infection less susceptible to UBF by preventing colocalisation between UBF foci and viral genomes.

Subsequent experiments with a viral mutant allowed the identification of a viral protein responsible for the MOI-dependant effect. A mutant in which the activation domain of the transcription factor VP16 is absent does not produce this MOI-dependent effect. The ratio of colocalisation remains high at all MOI tested. The VP16 activation domain therefore seems required to block colocalisation between UBF foci and viral genomes, and possibly counter the UBF-mediated inhibition of replication.

Two isoforms of the UBF protein exist, UBF1 and UBF2, and functions unique to each have been published. It was therefore important to determine if an isoform in particular is responsible

for the inhibition of HSV replication. Ectopic overexpression of UBF1 or UBF2 in cells knocked-down for endogenous UBF was performed. Results showed that either UBF isoform can inhibit viral replication.

Taken together, these results describe for the first time an antiviral function carried out by UBF. The proposed model is that relocalisation of UBF to input viral genome happens after entry in the host nucleus. UBF then interferes with the production of viral transcripts which results in a limited viral replication. A function dependent on the viral protein VP16 can counteract this inhibition by preventing the colocalisation of UBF foci with viral genomes.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ	IV
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
CHAPITRE UN : INTRODUCTION	1
1 UPSTREAM BINDING FACTOR	2
1.1 TRANSCRIPTION DES GÈNES RIBOSOMAux.....	2
1.1.1 <i>Initiation</i>	2
1.1.2 <i>Élongation</i>	5
1.1.3 <i>Régulation d'Upstream Binding Factor</i>	5
1.2 IMPACT ARCHITECTURAL	8
1.3 NUCLÉOLE ET CYCLE CELLULAIRE	10
1.4 UPSTREAM BINDING FACTOR 1 ET 2.....	12
1.5 STRUCTURE	14
1.5.1 <i>Domaine de dimérisation</i>	15
1.5.2 <i>Domaines High Mobility Group</i>	16
1.5.3 <i>Queue C-terminale acide</i>	17
1.6 FONCTIONS LORS D'INFECTIONS VIRALES.....	18
1.6.1 <i>Virus variés</i>	18
1.6.2 <i>Virus Herpès Simplex 1</i>	19
2 VIRUS HERPÈS SIMPLEX	22
2.1 TAXONOMIE	22
2.2 VUE D'ENSEMBLE DU VHS-1	23
2.2.1 <i>Morphologie</i>	23
2.2.2 <i>Pathogénèse</i>	24
2.2.3 <i>Réponse immunitaire</i>	26

2.2.4	<i>Latence</i>	27
2.3	CYCLE DE RÉPLICATION LYTIQUE	29
2.3.1	<i>Entrée</i>	30
2.3.2	<i>Génome viral</i>	35
2.3.3	<i>Expression génique</i>	36
2.3.4	<i>Réplication du génome</i>	41
2.3.5	<i>Encapsidation</i>	46
2.3.6	<i>Sortie</i>	48
3	RÉPONSE INTRINSÈQUE ANTI-HERPÉTIQUE ET SON ÉVASION	50
3.1	ND10.....	50
3.2	IFI16	52
4	HYPOTHÈSE DE TRAVAIL	55
CHAPITRE DEUX : UPSTREAM BINDING FACTOR INHIBITS HERPES SIMPLEX VIRUS		
	REPLICATION.....	57
1	ABSTRACT	60
2	INTRODUCTION.....	61
3	MATERIALS AND METHODS	62
3.1	CELLS AND VIRUSES	62
3.2	WESTERN BLOTTING.....	63
3.3	SIRNA TRANSFECTIONS.....	63
3.4	DNA EXTRACTION, QPCR AND RT-QPCR	64
3.5	CONFOCAL MICROSCOPY	64
4	RESULTS	65
4.1	KNOCK-DOWN OF UBF CAUSES INCREASED HSV-1 TITERS.....	65
4.2	INCREASE IN VIRAL DNA SYNTHESIS IN CELLS KNOCKED-DOWN FOR UBF	68
4.3	LEVELS OF IE AND E VIRAL GENE PRODUCTS ARE AFFECTED BY UBF.....	69
4.4	UBF LIMITS THE ACCUMULATION OF VIRAL PRODUCTS FROM INPUT GENOMES.....	71
4.5	UBF IS REDISTRIBUTED TO SITES OTHER THAN PRE-VRCs BEFORE RELOCALIZATION TO VRCs	72
4.6	UBF RESTRICTS HSV-2 REPLICATION.....	75
4.7	UBF AFFECTS VIRAL REPLICATION IN NON-TRANSFORMED CELLS.....	75
5	DISCUSSION	77

5.1	UBF RESTRICTS HSV REPLICATION IN CELL CULTURE	77
5.2	UBF AFFECTS HSV REPLICATION AT THE LEVEL OF VIRAL MRNA ACCUMULATION	78
5.3	POSSIBLE MECHANISMS OF UBF RESTRICTION OF HSV REPLICATION	78
6	REFERENCES	80
CHAPITRE TROIS : THE HERPES SIMPLEX VIRUS 1 PROTEIN VP16 BLOCKS TARGETING OF UPSTREAM BINDING FACTOR TO INCOMING VIRAL GENOMES.....		85
1	ABSTRACT	88
2	INTRODUCTION.....	89
3	MATERIALS AND METHODS	92
3.1	PLASMID CONSTRUCTION AND TRANSFECTION	92
3.2	CELLS AND VIRUSES	93
3.3	SIRNA TRANSFECTION	94
3.4	WESTERN BLOTTING.....	94
3.5	IMMUNOFLUORESCENCE	94
3.6	FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH).....	95
3.7	CONFOCAL MICROSCOPY AND IMAGE ANALYSIS	96
4	RESULTS	97
4.1	EITHER UBF1 OR UBF2 IS SUFFICIENT TO INHIBIT HSV REPLICATION	97
4.2	UBF FOCI ARE ASSOCIATED WITH HSV-1 DNA IN THE ABSENCE OF VIRAL DNA REPLICATION	100
4.3	INCREASING THE MOI REDUCES CO-LOCALIZATION OF UBF WITH VIRAL DNA	103
4.4	ABSENCE OF ICPO DOES NOT AFFECT THE INHIBITION OF VIRAL REPLICATION BY UBF	104
4.5	INCREASING THE MOI RENDERS VIRAL REPLICATION LESS SUSCEPTIBLE TO RESTRICTION BY UBF	106
4.6	IMPACT OF MOI ON THE ASSOCIATION OF VIRAL GENOMES WITH UBF FOCI IS DEPENDANT ON THE VP16 ACTIVATION DOMAIN	108
5	DISCUSSION	110
5.1	CO-LOCALIZATION OF UBF WITH VIRAL GENOMES.....	110
5.2	VP16.....	111
5.3	UBF	112
6	REFERENCES	114
CHAPITRE QUATRE : DISCUSSION		120
1	RESTRICTION DE LA RÉPLICATION VIRALE PAR UBF.....	121

1.1	RELOCALISATION ET DÉTECTION	122
1.2	MÉCANISME D’ACTION	123
1.3	UBF1 ET UBF2	126
1.4	RÉPONSE VIRALE.....	127
2	MODÈLE	129
3	CONCLUSION	133
	RÉFÉRENCES	134

LISTE DES FIGURES

Chapitre un : Introduction

FIGURE 1: SCHÉMATISATION DE LA RÉGION PROMOTRICE DES GÈNES RIBOSOMAux.	3
FIGURE 2 : REPRÉSENTATION DE L'ENHANCESOME.	4
FIGURE 3 : REPRÉSENTATION DE LA STRUCTURE D'UBF.	15
FIGURE 4 : STRUCTURE DU PREMIER DOMAINE HMG D'UBF.	16
FIGURE 5 : PRINCIPALES PATHOLOGIES ENGENDRÉES PAR LE VHS-1	25
FIGURE 6 : RÉSUMÉ DU CYCLE DE RÉPLICATION LYTIQUE.	30
FIGURE 7 : SCHÉMA DU GÉNOME VIRAL LINÉAIRE.	35
FIGURE 8 : ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION VIRALE IMMÉDIATE-PRÉCOCE.	38
FIGURE 9 : SCHÉMATISATION DE L'INITIATION DE LA RÉPLICATION DU GÉNOME VIRAL	44
FIGURE 10 : ENCAPSIDATION DU GÉNOME VIRAL	48
FIGURE 11 : RELOCALISATION D'UBF AU NOYAU SOUS FORME DE POINTS SUITE À L'INFECTION.	55

Chapitre deux : Upstream Binding Factor Inhibits Herpes Simplex Virus

Replication

FIGURE 1. DESCRIPTION OF THE siRNA APPROACH.	65
FIGURE 2. INCREASED PRODUCTION OF INFECTIOUS VIRAL PARTICLES IN CELLS KNOCKED-DOWN FOR UBF.	67
FIGURE 3. INCREASED AMOUNT OF STRUCTURAL PROTEINS IN CELLS KNOCKED-DOWN FOR UBF COMPARED TO NEGATIVE CONTROLS	68
FIGURE 4. IMPACT OF UBF ON VIRAL DNA SYNTHESIS DURING INFECTION.	69
FIGURE 5. INCREASED PRODUCTION OF IMMEDIATE-EARLY AND EARLY HSV-1 GENE PRODUCTS IN UBF-DEPLETED CELLS	70
FIGURE 6. WESTERN BLOT ANALYSIS OF VIRAL PROTEIN LEVELS IN UBF-DEPLETED AND PAA-TREATED CELLS	71
FIGURE 7. UBF IS REDISTRIBUTED TO SITES OTHER THAN PRE-VRCs BEFORE RELOCALIZATION TO VRCs IN VERO CELLS.	74
FIGURE 8. INCREASED PRODUCTION OF HSV-2 INFECTIOUS VIRAL PARTICLES IN UBF-DEPLETED CELLS	75
FIGURE S1. RELOCALIZATION OF UBF TO VRCs IN HeLa CELLS.	76

Chapitre trois : The herpes simplex virus 1 protein VP16 blocks targeting of Upstream Binding Factor to Incoming viral genomes

TABLE 1: PRIMERS USED IN PLASMID CONSTRUCTION	92
FIGURE 1. CONSTRUCTION OF EXPRESSION VECTORS CONTAINING siRNA-RESISTANT VERSIONS OF UBF1 AND UBF2	97
FIGURE 2. SELECTIVE OVEREXPRESSION OF EITHER siRNA-RESISTANT UBF1 OR UBF2 IN HeLa CELLS.	98
FIGURE 3. ECTOPIC OVEREXPRESSION OF EITHER UBF1 OR UBF2 BLOCKS HSV-1 REPLICATION.	100
FIGURE 4. ENDOGENOUS UBF CO-LOCALIZES WITH HSV-1 DNA BOTH UPON INFECTION AND UPON TRANSFECTION OF A BAC-CLONED HSV-1 GENOME.	103
FIGURE 5. INCREASING THE MOI REDUCES CO-LOCALIZATION OF UBF WITH VIRAL DNA	104
FIGURE 6. ICP0 DOES NOT AFFECT INHIBITION OF HSV-1 REPLICATION BY UBF	105
FIGURE 7. EFFECT OF UBF KNOCK-DOWN ON VIRAL TITERS OF A VP16-TRANSACTIVATION DOMAIN MUTANT.	107
FIGURE 8. INCREASING THE MOI FOR A VP16AD MUTANT DOES NOT INCREASE THE NUMBER OF UBF-FREE VIRAL GENOMES.....	109

Chapitre quatre : Discussion

FIGURE 12 : COMPARAISON DES SÉQUENCES RECONNUES PAR UBF AVEC DES SÉQUENCES VIRALES.	123
FIGURE 13 : REPRÉSENTATION DE L'ACTION D'UBF DIRECTE ET INDIRECTE.....	125
FIGURE 14 : VP16 CONTRECARRE L'INHIBITION DE LA TRANSCRIPTION VIRALE PAR UBF.	128
FIGURE 15 : MODÈLE DE LA DYNAMIQUE D'UBF ET DE VP16 LORS D'UNE INFECTION À FAIBLE ET À FORTE MOI....	130

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARNr	ARN ribosomal
ATRX	<i>Alpha-thalassemia x-linked</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CE	<i>Core Element</i>
CKII	Caséine Kinase II
CMV	Cytomégalovirus
CRV	Compartiment de réplication viral
CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
CVSC	<i>Capsid Vertex Specific Component</i>
EBV	Virus Epstein-Barr
ERK	<i>Extracellular signal–Regulated Kinases</i>
g*	glycoprotéine, où * est remplacé par la glycoprotéine, i.e. gB
H*	Histone où * est remplacé par l’histone, i.e. H3
H*K#	Lysine de l’histone, où # est remplacé par la lysine, i.e. H3K4
HAT	Histone Acétyle Transférase
HCF-1	<i>Host Cell Factor 1</i>
HDAC	Histone Désacétylase
hDaxx	<i>human Death-associated protein 6</i>
HMG	<i>High Mobility Group</i>
ICP	<i>Infected Cell Polypeptide</i>
IFI16	<i>Interferon gamma inducible protein 16</i>
IFN	Interféron
IP	Immédiat-Précoce
IRF-3	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i>
KOS	Kendall Owen Smith, Virologue ayant isolé de lui-même la souche qui porte le même nom (Grose, 2014)
LAT	<i>Latency Associated Transcript</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer Factor</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>

ND10	<i>Nuclear Domain 10</i>
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i>
NOR	<i>Nucleolar Organizer Region</i>
Oct-1	<i>Octamer-binding protein 1</i>
P	<i>Précoce</i>
PAA	<i>Acide Phosphonoacétique</i>
PAF	<i>Polymerase-Associated Factor</i>
PML	<i>Promyelocytic Leukemia</i>
PRR	<i>Patern Recognition Receptor</i>
pVHS	<i>protéine Virion Host Shutoff</i>
Rb	<i>Retinoblastome</i>
RPA	<i>RNA Polymerase I subunit</i>
SL1	<i>Selectivity Factor 1</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
T	<i>Tardif</i>
TAF	<i>TBP Associated Factors</i>
TBP	<i>TATA-Binding Protein</i>
UBF	<i>Upstream Binding Factor</i>
UBTF	<i>Upstream Binding Transcription Factor</i>
UCE	<i>Upstream Control Element</i>
UL	<i>Unique Long</i>
US	<i>Unique Short</i>
VHC	<i>Virus de l'Hépatite C</i>
VHS	<i>Virus de l'Herpès Simplex</i>
VP	<i>Virion Protein</i>
XEn	<i>Xenopus laevis Enhancer</i>

CHAPITRE UN : INTRODUCTION

1 UPSTREAM BINDING FACTOR

La protéine cellulaire Upstream Binding Factor est principalement connue sous ce nom, avec UBF comme acronyme, malgré que son nom officiel selon le HUGO Gene Nomenclature Committee soit Upstream Binding Transcription Factor (UBTF) (Gray *et al.*, 2015). Au moment de sa découverte, cette protéine a aussi porté le nom de *Nucleolus-Organizing Region 90* (NOR-90), dû à sa localisation lors d'un marquage intracellulaire et de la taille observée lors de sa migration par électrophorèse (Rodriguez-Sanchez *et al.*, 1987). L'acronyme UBF qui est prédominant et majoritairement utilisé dans la littérature scientifique sera employé ici.

UBF a un rôle essentiel pour le métabolisme cellulaire. Premièrement, elle a une fonction critique pour la biogénèse des ribosomes en tant que facteur de transcription pour l'ARN polymérase I. Deuxièmement, UBF est aussi impliquée dans le maintien de l'organisation nucléolaire lors de la division cellulaire. Troisièmement, UBF2, un isoforme qui sera discuté plus en détail ultérieurement, semble avoir la capacité de réguler la transcription par l'ARN polymérase II. Ces fonctions ainsi que d'autres caractéristiques sont détaillées dans ce chapitre.

1.1 Transcription des gènes ribosomaux

La fonction la plus connue d'UBF est sans doute d'activer la transcription des gènes ribosomaux. Environ 400 copies de ces gènes sont répétées en tandems et présentes sur cinq chromosomes, soit les 13, 14, 15, 21 et 22 (Henderson *et al.*, 1972). Autour du locus de ces gènes va s'assembler le, ou les, nucléole. Le nucléole est un sous-compartiment du noyau non délimité par une membrane. Son organisation est constituée de trois régions concentriques. Du centre vers l'extérieur on retrouve : le centre fibrillaire, la composante fibrillaire dense et ensuite la composante granulaire. UBF se localise dans la composante fibrillaire dense, mais principalement dans le centre fibrillaire et à sa périphérie, là où se produit la transcription des gènes ribosomaux (Hozak *et al.*, 1994, Roussel *et al.*, 1993).

1.1.1 Initiation

La région promotrice des gènes ribosomaux comprend deux séquences principales appelées Upstream Control Element (UCE) et Core Element (CE), identifiées à cause de leur présence

obligatoire pour initier la transcription (Haltiner *et al.*, 1986, Learned *et al.*, 1986). Ces deux régions représentées à la Figure 1 permettent de recruter le complexe de transcription de l'ARN polymérase I via UBF et un complexe protéique appelé SL1, ce qui mène à la transcription. Ce complexe SL1 est composé de plusieurs sous-unités. On y retrouve minimalement la *TATA-Binding Protein* (TBP), ainsi que les *TBP Associated Factors* (TAF_I) 110, 63 et 48 (Comai *et al.*, 1992, Zomerdijk *et al.*, 1994). Il semble aussi que d'autres composantes non essentielles comme TAF_I41 et TAF_I12 pourraient s'y retrouver (Denissov *et al.*, 2007, Gorski *et al.*, 2007)

Des expériences de protection à la DNase ont montré qu'UBF seul peut lier les éléments UCE et CE, mais que SL1 ne peut les lier sans la présence d'UBF chez l'humain. Cependant, la présence combinée d'UBF et SL1 agrandit les régions protégées de la DNase et en crée aussi de nouvelles, démontrant une liaison coopérative aux régions promotrices (Bell *et al.*, 1988, Learned *et al.*, 1986).

Chevauchant une partie des régions UCE et CE, deux séquences ont été identifiées comme strictement requises pour la liaison d'UBF à celles-ci (Figure 1) (Bell *et al.*, 1988). Malgré que ces séquences soient requises pour la liaison d'UBF, rien ne démontre qu'elles sont suffisantes à elles seules.

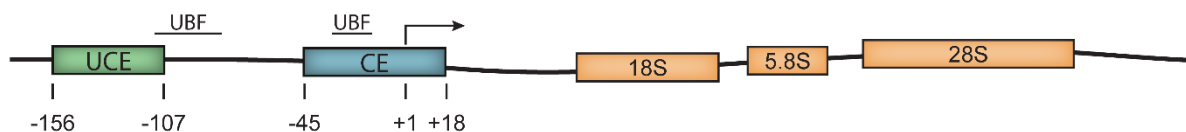


Figure 1: Schématisation de la région promotrice des gènes ribosomaux.

Les régions d'intérêt sont représentées par les boîtes colorées superposées au trait horizontal qui symbolise le gène ribosomal. La partie de gauche contenant la séquence UCE et CE est à l'échelle, tandis que la partie de droite contenant les transcrits 18S, 5.8S et 28S ne l'est pas. La position des nucléotides d'intérêt est indiquée au bas de la figure. Le fin trait horizontal en haut de la figure représente les endroits où UBF se lie.

UBF et SL1 semblent donc interagir pour lier la région promotrice de façon coopérative. Deux interactions doivent donc se produire pour qu'il y ait activation de la transcription de l'ARN polymérase I par UBF : avec SL1 et avec les régions promotrices.

Cette interaction avec SL1 est essentielle à l'initiation de la transcription. Premièrement, Il a été démontré que cette interaction entre UBF et SL1 requiert la partie C-terminale d'UBF, car sans cette partie, les régions étendues protégées de la DNase ne sont pas maintenues (Hempel *et*

al., 1996, Jantzen *et al.*, 1992, Tuan *et al.*, 1999). UBF contacte en fait directement deux composantes du complexe SL1; TBP et TAF₄₈ (Beckmann *et al.*, 1995, Kwon *et al.*, 1994).

Deuxièmement, UBF se lie à l'ADN et le fait préférentiellement sous forme de dimère (O'Mahony *et al.*, 1992a). La liaison de ces dimères d'UBF à l'ADN entraîne la formation de boucles d'environ 140 paires de bases similaires aux nucléosomes nommées « *enhancesomes* », représentées à la Figure 2 (Bazett-Jones *et al.*, 1994, Putnam *et al.*, 1994, Stefanovsky *et al.*, 2001a). Il a été suggéré que ces formations induites par UBF rapprocheraient les régions UCE et CE afin de permettre à SL1 de les lier plus facilement (Bazett-Jones *et al.*, 1994, Stefanovsky *et al.*, 1996). Le fait que les régions d'UBF nécessaires à la formation de l'*enhancesome* sont aussi nécessaires à l'activation de transcription soutiennent ce modèle et prouve que la liaison d'UBF à l'ADN est essentielle pour activer la transcription (Jantzen *et al.*, 1992, McStay *et al.*, 1991a, Putnam *et al.*, 1994, Sullivan *et al.*, 1998).

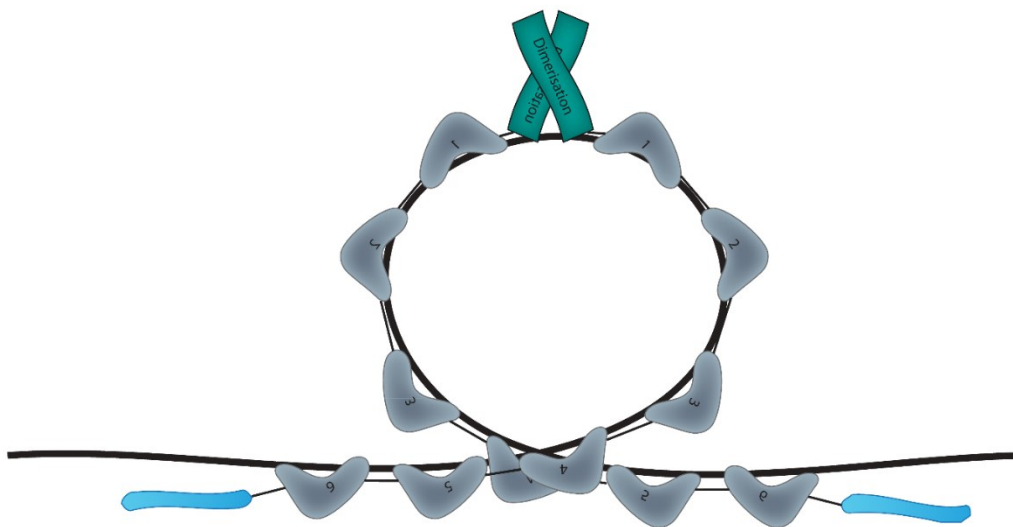


Figure 2 : Représentation de l'*enhancesome*.

Un dimère d'UBF est positionné sur le brin d'ADN et induit le repliement caractéristique de l'*enhancesome*. Le brin d'ADN est représenté par la boucle noire. Les deux protéines UBF sont en interaction entre elles via leur domaine de dimérisation et avec l'ADN via leurs domaines *High Mobility Group*.

Suite à la formation de cette structure UBF-SL1-*enhancesome*, il y a recrutement du complexe de l'ARN polymérase I lui-même, principalement par SL1 (revue dans (Goodfellow *et al.*, 2013)). Cependant, UBF a aussi un rôle important à cette étape. Il a été démontré que pour

permettre la formation d'un complexe d'initiation de la transcription fonctionnel, UBF doit interagir avec PAF53 et hPAF49, deux sous-unités de l'ARN polymérase I (Hanada *et al.*, 1996, Panov *et al.*, 2006b).

1.1.2 Élongation

La transcription par l'ARN polymérase I ne peut se faire sans le complexe SL1, mais semble cependant pouvoir se produire *in vitro* à un niveau basal faible sans UBF (Friedrich *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 1993). UBF ne semble donc pas strictement nécessaire pour initier la transcription et former le complexe de transcription dans cette situation. Ces résultats ont soulevé un doute à l'effet qu'UBF pourrait avoir un rôle dans la transcription autre que celui de l'initiation. Selon une étude, elle accélérerait plutôt la transition entre l'initiation et l'élongation, soit l'étape du « *promoter escape* » (Panov *et al.*, 2006a). UBF semblerait plutôt jouer un rôle de stimulation de la transcription déjà activée plutôt que d'initiation dans ces conditions.

Initialement, UBF était décrite comme une protéine liant la région promotrice des gènes ribosomaux. Il a ensuite été montré que sa liaison était détectée sur tout le locus des gènes ribosomaux, alors que SL1 était toujours confiné aux régions promotrices (O'Sullivan *et al.*, 2002). Cette observation est cohérente avec les propriétés observées préalablement à l'effet qu'UBF n'interagit pas avec l'ADN via une séquence spécifique (Copenhaver *et al.*, 1994). La présence d'UBF sur toute la région des gènes ribosomaux explique son rôle dans la régulation de l'élongation.

Il a en effet été démontré plus tard que la présence d'UBF sur la région codante et sa capacité à former une boucle (*enhancesome*) lui permet de moduler l'élongation de la transcription. La formation d'*enhancesomes* dans la région codante réprime l'élongation, alors que le déroulement de cette structure permet une élongation plus rapide (Stefanovsky *et al.*, 2006a, Stefanovsky *et al.*, 2006b).

1.1.3 Régulation d'Upstream Binding Factor

UBF peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles. Ces modifications vont permettre à UBF d'initier, ou de réguler, la transcription des gènes ribosomaux. Il a été démontré très tôt que l'état de phosphorylation de la partie C-terminale d'UBF corrèle positivement avec

l'activation de la transcription et la croissance cellulaire (O'Mahony *et al.*, 1992b, Voit *et al.*, 1992). En fait, la phosphorylation d'UBF est essentielle pour activer la transcription. Des expériences ont démontré qu'UBF déphosphorylée ne peut activer la transcription de l'ARN polymérase I, alors qu'elle en a la capacité une fois phosphorylée (O'Mahony *et al.*, 1992b, Voit *et al.*, 1995). Une partie de la phosphorylation de la partie C-terminale est médiée par la Caséine Kinase II (CKII) *in vitro*, malgré qu'elle ne soit pas suffisante, ni essentielle, pour l'activité d'UBF (Voit *et al.*, 1995). Des recherches subséquentes ont permis de démontrer que CKII est effectivement capable de phosphoryler UBF, et TAF_I110, ce qui régule la formation et la stabilité du complexe d'initiation de transcription (Lin *et al.*, 2006, Panova *et al.*, 2006).

Comme mentionné précédemment, l'interaction avec SL1 se fait par la partie C-terminale d'UBF. La formation de ce complexe nécessite également que cette partie soit phosphorylée (Tuan *et al.*, 1999). Cette étude montre aussi que l'état de phosphorylation de la partie C-terminale n'affecte pas la capacité d'UBF à se lier aux parties UCE et CE de la région promotrice des gènes ribosomiaux. Elle est plutôt déterminante pour la capacité de SL1 de lier ces régions.

À l'aide de mutagenèse dirigée, il a ensuite été montré que le résidu sérine 484 est la cible de phosphorylation par le complexe kinase cycline-dépendante 4 (cdk4)-cycline D1 et par cdk2-cycline E, et que la mutation de ce résidu diminue la transcription des ARNr (Voit *et al.*, 1999). Le résidu sérine 388 doit également être phosphorylé par cdk2-cycline E et cdk2-cycline A, sans quoi il n'y a pas d'interaction avec l'ARN Polymérase I (Voit *et al.*, 2001). Ces résultats créent dès lors un lien entre la phosphorylation d'UBF et la variation de la production d'ARNr en fonction du cycle cellulaire. De plus, il a été montré que le suppresseur de tumeur P14^{ARF} peut interagir avec UBF et que sa surexpression entraîne une baisse de production du transcrit précurseur 45S, ainsi qu'une baisse de phosphorylation des résidus sérine 388 et 484 (Ayrault *et al.*, 2006). Les liens multiples entre la synthèse des ARNr et le cycle cellulaire sont décrits plus en détails dans ces revues (Hernandez-Verdun, 2011, Tsai *et al.*, 2014). Effectivement, la phosphorylation d'UBF par les cdk n'est qu'une partie de la régulation de la production des ARNr au cours du cycle cellulaire. Par exemple, d'autres facteurs comme B23 impliqués dans la maturation des transcrits sont aussi modifiés.

La protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) est un régulateur majeur de la croissance cellulaire qui agit principalement via le contrôle de la traduction. Il a aussi été démontré que ce système peut réguler la transcription des gènes ribosomiaux. Un partenaire de mTOR, la kinase S6K1, peut phosphoryler la partie C-terminale d'UBF et ainsi promouvoir l'interaction avec SL1. Cette phosphorylation est dépendante de l'activation de mTOR, ce qui fait en sorte de créer un lien entre le contrôle de la traduction et la production de ribosomes (Hannan *et al.*, 2003).

Le rôle d'UBF dans l'élongation de la transcription décrit précédemment est régulé par la phosphorylation. Ces événements sont régis par la kinase ERK en réponse à un signal de croissance tel qu'une stimulation par EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Stefanovsky *et al.*, 2001b). Deux résidus thréonine sont phosphorylés : les résidus 117 et 201, situés dans le premier et le deuxième domaine HMG (*High Mobility Group*) respectivement (Stefanovsky *et al.*, 2006a). Cette phosphorylation entraîne une modification de la conformation d'UBF et de l'ADN auquel elle est liée par le fait même. Ce changement conformationnel résulte en un déroulement de l'enhancesome, et une augmentation du taux de transcription. En contrepartie, une absence de phosphorylation de ces deux sites résulte en une répression de l'élongation (Stefanovsky *et al.*, 2006b). Le résidu 117 a aussi été impliqué dans la capacité d'UBF1 de maintenir la chromatine dans une conformation active. Une mutation de ce résidu thréonine en acide glutamique ne permet pas de restaurer la conformation active des gènes ribosomiaux comme le fait la protéine de type sauvage (Sanij *et al.*, 2008). Ces résultats soulignent le rôle d'UBF dans la régulation de l'élongation en fonction du métabolisme. L'ensemble de la production des ribosomes et des ARN ribosomiaux est sujet à la régulation selon l'état du métabolisme et de la croissance cellulaire. Plus de détails au sujet des autres facteurs impliqués dans la modulation complète de la production d'ARN ribosomiaux et ribosomes en fonction des nutriments et du métabolisme sont présentés dans ces revues (de la Cruz *et al.*, 2018, Grummt *et al.*, 2010).

Outre la phosphorylation, l'acétylation régule aussi l'activité d'UBF. La protéine Rb, un suppresseur de tumeur, a la capacité de contrôler la prolifération cellulaire en menant à l'arrêt de la transcription dépendante de l'ARN polymérase I, II et III. Il a été démontré que l'arrêt de la transcription par l'ARN polymérase I par Rb implique UBF et ses deux premiers domaines HMG (Cavanaugh *et al.*, 1995, Voit *et al.*, 1997). Cette interaction n'empêche pas UBF de lier l'ADN, mais bloque plutôt son interaction avec SL1 (Hannan *et al.*, 2000). Une étude subséquente a

permis de démontrer que la présence de Rb conjointement avec l'histone désacétylase 1 (HDAC1) provoque la désacétylation d'UBF et l'inhibition de la transcription par l'ARN polymérase I. Cette étude montre également que l'histone acétyl transférase (HAT) CBP (*CREB-Binding Protein*) catalyse l'acétylation d'UBF, ce qui permet la transcription. Cette étude montre aussi que l'interaction d'UBF avec Rb et CBP est mutuellement exclusive, ce qui permet de réguler l'acétylation d'UBF selon les stimuli (Pelletier *et al.*, 2000). L'acétylation d'UBF entraîne le recrutement de PAF53 et par conséquent contribue à la formation du complexe d'initiation de la transcription décrit précédemment. De plus, l'acétylation d'UBF change selon l'étape du cycle cellulaire. Cette modification post-traductionnelle a été observée en phase S et G₂ (Meraner *et al.*, 2006). Ces résultats montrent que Rb peut bloquer l'activation par UBF de deux façons. Ils sont aussi un autre exemple du lien entre la transcription des gènes ribosomaux et la progression du cycle cellulaire.

1.2 Impact architectural

UBF est plus qu'un facteur de transcription traditionnel. Sa liaison à l'ADN peut provoquer plusieurs changements structuraux, d'où son appellation occasionnelle de facteur de transcription architectural.

La formation de l'*enhancesome* discuté plus tôt est un phénomène très précis. Le domaine de dimérisation et le premier domaine HMG sont reliés par un segment de six acides aminés. L'ajout ou le retrait de trois acides aminés résulte en l'abolition de l'*enhancesome* et en une capacité réduite de former un dimère d'UBF sur l'ADN. Ces expériences montrent cependant qu'un monomère est capable d'induire un pli dans le brin d'ADN. La structure provoquée par ces mutants a été qualifiée de « *hemi-enhancesome* » (Stefanovsky *et al.*, 2001a). Certains rapports vont même plus loin en soutenant qu'une partie d'UBF aussi courte qu'un à trois domaines HMG est suffisante pour induire une altération de la structure de la chromatine (Putnam *et al.*, 1994, Stefanovsky *et al.*, 1996).

L'effet d'UBF sur l'ADN n'est pas limité à l'*enhancesome* seulement. L'organisation de la chromatine des gènes ribosomaux a été le sujet de nombreuses études et plusieurs d'entre elles illustrent l'importance d'UBF.

La capacité d'UBF de lier l'ADN sans spécificité de séquence particulière est sans doute une caractéristique qui rend possible cet impact architectural à plus grande échelle. Une équipe a obtenu des résultats intéressants en employant une protéine de fusion UBF-répresseur *lac*. En exploitant la capacité naturelle du répresseur *lac* de lier les séquences d'opérons *lac*, elle a pu provoquer l'interaction entre ces séquences et UBF. Ces auteurs ont observé une décondensation importante de la chromatine à ces endroits, dû à l'interaction avec UBF. Ils y ont aussi observé la présence du complexe SL1 et de la sous-unité de l'ARN polymérase I RPA40 (Chen *et al.*, 2004).

UBF peut aussi induire de façon moins directe des changements à la structure de la chromatine. Il a été démontré par exemple qu'UBF a la capacité d'entrer en compétition et de déplacer l'histone H1 des nucléosomes (Kermekchiev *et al.*, 1997). Cette compétition a comme résultat de prévenir l'assemblage des nucléosomes en chromatine inactive et de rendre la chromatine plus disponible pour la transcription. En fait, la liaison d'UBF et de l'histone H1 est mutuellement exclusive (Sanij *et al.*, 2008).

UBF est également capable d'entrer en interaction avec un régulateur important de l'organisation de la chromatine appelé *CCCTC-binding factor* (CTCF) (van de Nobelen *et al.*, 2010). Dans une lignée cellulaire déficiente en CTCF, une baisse d'association d'UBF et de l'ARN polymérase I avec une région en amont du promoteur du transcrit ribosomal, le *spacer promoter*, est observée. Cette région semble donc accessible à UBF grâce à la présence de CTCF. Cette absence de CTCF provoque aussi une diminution de la présence de marqueurs de chromatine active, ainsi que de la transcription d'ARN non-condants à partir du *spacer promoter*. Ces phénomènes ne sont toutefois pas observés en aval, c'est-à-dire au niveau du transcrit 45S. CTCF est aussi importante pour permettre la division cellulaire et sa présence corrèle avec un plus grand nombre de nucléoles. Ces deux phénomènes, la croissance cellulaire et un nombre plus élevé de nucléoles sont généralement observés ensembles. Une étude récente confirme la présence d'UBF sur toute la région des gènes ribosomiaux et l'exclusion des nucléosomes qui en résulte. De plus, cette étude souligne la présence intéressante de CTCF dans un complexe « frontière » sur les régions intergéniques de l'ARN ribosomal. Ce complexe est même préservé en l'absence d'UBF. Il contribuerait à la maintenir la stabilité et la disponibilité de cette région pour la liaison d'UBF et son remplacement des histones (Herdman *et al.*, 2017). Ces résultats montrent l'implication de

plusieurs facteurs et leur interconnexion dans la structure de l'ADN, particulièrement autour de la région des gènes ribosomaux.

1.3 Nucléole et cycle cellulaire

L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase I est sans aucun doute une fonction essentielle d'UBF, car elle est à la base de la production des ribosomes. Cette transcription se fait au nucléole, un sous-compartiment dynamique du noyau qui n'est pas délimité par une membrane, mais plutôt défini par la présence des composantes responsables de la production des ribosomes. Le cycle cellulaire et les fonctions remplies par le nucléole sont étudiés de façon considérable, et l'étendue des connaissances sur ces sujets est vaste. La dernière étude protéomique focalisée sur le nucléole a révélé que plus de 4500 protéines y sont présentes (Ahmad *et al.*, 2009). Le nucléole est maintenant vu comme un régulateur majeur de l'homéostasie de la cellule et non seulement le site de production des ARN ribosomaux. Cette section se focalise cependant sur la place d'UBF dans l'organisation du nucléole et lors du cycle cellulaire.

Comme mentionné précédemment, le nucléole se forme autour des gènes ribosomaux répétés en tandem. Ces régions chromosomales sont nommées « *Nucleolar Organiser Regions* » (NORs). C'est la capacité d'UBF de lier ces régions qui lui permet de se localiser au nucléole (Maeda *et al.*, 1992). La présence d'UBF à ces régions est essentielle pour que le nucléole soit fonctionnel et soit formé aux NORs. Il a en effet été observé qu'en l'absence d'UBF il y a agrégation de composantes de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase I en corps nucléolaires, sans que ceux-ci contiennent les gènes ribosomaux (Hamdane *et al.*, 2014). Ces auteurs notent la ressemblance de ces agrégats aux corps nucléolaires précurseurs présents dans les oocytes, qui sont eux aussi indépendants des gènes ribosomaux.

Selon l'état du métabolisme cellulaire, certains NORs peuvent être actifs et produire des transcrits ou être inactifs. Au cours de la mitose, la transcription des gènes ribosomaux cesse et le nucléole se désassemble afin d'être divisé en deux. Il est par la suite réassemblé dans les cellules filles. Ce processus est revu dans les publications suivantes (Grob *et al.*, 2014b, Hernandez-Verdun, 2011). Il a été observé que les NORs actifs avant le début de la mitose seront ceux qui seront actifs après la fin de la mitose (Roussel *et al.*, 1996, Sirri *et al.*, 1999). De plus, alors que la

plupart des protéines présentes aux NORs durant l'interphase les quittent durant la mitose (incluant plusieurs sous-unités de l'ARN polymérase I), UBF est une des rares protéines à rester liée aux NORs durant le désassemblage des nucléoles (Leung *et al.*, 2004, Roussel *et al.*, 1993, Zatsepina *et al.*, 1993). UBF serait même liée plus fortement à l'ADN durant la mitose que durant l'interphase, en plus d'y maintenir la chromatine des gènes ribosomiaux sous forme décondensée; un phénomène appelé constriction secondaire (Gebrane-Younes *et al.*, 1997, Sirri *et al.*, 1999). L'importance d'UBF dans la formation de NORs suite à la mitose a bien été démontrée dans des expériences utilisant des pseudo-NORs (Grob *et al.*, 2014a). Cette présence continue d'UBF aux NORs durant le cycle cellulaire est un bon indice de son importance dans l'organisation du nucléole.

UBF ne dépend pas de séquences nucléotidiques spécifiques pour lier l'ADN, mais elle a une affinité reconnue pour les éléments intergéniques des gènes ribosomiaux de *Xenopus laevis*, appelées *XEn* (*Xenopus Enhancer*). Effectivement, UBF se lie aux *XEn* malgré que ces dernières n'aient pas d'homologies de séquences avec les régions promotrices humaines (Bell *et al.*, 1989, McStay *et al.*, 1997). Ce phénomène particulier de reconnaissance, malgré qu'il n'active pas la transcription, est probablement possible grâce à la similarité de la séquence d'acides aminés d'UBF entre *Xenopus laevis* et l'humain (Bachvarov *et al.*, 1991, Bell *et al.*, 1989, McStay *et al.*, 1991b). Il est important de noter que cette reconnaissance croisée ne s'applique pas à SL1 ni à la transcription par l'ARN polymérase I. Il est bien établi que la transcription par l'ARN polymérase I est spécifique à chaque espèce et que cette spécificité est due aux facteurs composant SL1 (Grummt *et al.*, 1982, Heix *et al.*, 1995, Learned *et al.*, 1985, Learned *et al.*, 1982).

La liaison d'UBF, et seulement d'UBF, aux *XEn* est importante pour l'étude de Mais *et al.* Cette équipe a inséré des séquences *XEn* dans différentes régions de chromosomes humains (Mais *et al.*, 2005). Ce groupe a pu ainsi déterminer que la localisation d'UBF était une conséquence de sa liaison à l'ADN, puisque de nouvelles concentrations d'UBF étaient observées dans ces chromosomes modifiés, hors des nucléoles. Ensuite, cette stratégie a aussi révélé que la présence d'UBF à ces nouvelles régions entraîne la formation de pseudo-NORs, des régions aux caractéristiques similaires au NORs. En plus d'être positives pour la présence d'UBF, ces pseudo-NORs provoquent une constriction secondaire lors de la mitose, et sont positives lors d'un marquage à l'argent, trois caractéristiques des NORs. En plus de ressembler aux NORs, ces

pseudo-NORs contiennent plusieurs composantes de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase I, dont des sous-unités de l'ARN polymérase I et des composantes de SL1 (Mais *et al.*, 2005). Deux résultats additionnels importants sont aussi apportés par cette équipe : ces pseudo-NORs ne produisent pas de transcrits, et la transcription normale des gènes ribosomaux par l'ARN polymérase I ne diminue pas. Ce dernier montre que la quantité d'UBF et des autres composantes est en excès par rapport à la quantité requise.

En somme des résultats présentés précédemment concernant le cycle cellulaire; la liaison d'UBF à l'ADN est maintenue durant la mitose, elle est suffisante pour engendrer la formation de NORs et elle entraîne le recrutement de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase I. UBF agit donc en quelque sorte comme un marque-pages pour la reconstruction des nucléoles.

De manière plus générale, ces résultats, et ceux de Chen *et al.* présentés dans la section précédente, démontrent deux capacités importantes d'UBF : elle peut lier des séquences exogènes et elle peut y amener d'autres protéines.

1.4 Upstream Binding Factor 1 et 2

Très tôt dans l'étude d'UBF, deux polypeptides ont été observés, sans savoir s'ils étaient produits par modification post-traductionnelle, par épissage alternatif, ou encore par deux gènes différents (Bell *et al.*, 1988). Il existe effectivement deux isoformes protéiques d'UBF; UBF1 et UBF2, provenant de deux ARNm différents. Il manque à UBF2 un exon dans la deuxième boîte HMG, correspondant aux acides aminés 221 à 257, ce qui fait en sorte que cet isoforme est plus court de 37 acides aminés (O'Mahony *et al.*, 1991). Il a été démontré par la suite que ces deux ARNm sont produits par épissage alternatif du gène *ubtf* (*upstream binding transcription factor*) (Hisatake *et al.*, 1991). Dès l'identification des deux isoformes et de leur différence, il a été spéculé qu'elles pourraient avoir des fonctions distinctes (O'Mahony *et al.*, 1991, O'Mahony *et al.*, 1992a).

L'étude de la transcription par l'ARN polymérase I a souvent été faite sans discernement entre les isoformes. Par contre, certaines études qui s'y sont penchées ont démontré que les principales fonctions attribuées à UBF sont en fait remplies par UBF1 (Hannan *et al.*, 1999, Hannan *et al.*, 1996, Jantzen *et al.*, 1992, Kuhn *et al.*, 1994, Smith *et al.*, 1993). UBF1 serait aussi le seul

isoforme pouvant maintenir la chromatine de la région des gènes ribosomaux dans un état décondensé et donc plus accessible à la machinerie de transcription. Il a en effet été observé qu'une diminution de la quantité d'UBF1 entraînait une diminution du nombre de gènes ribosomaux actifs, ce qui n'est pas le cas pour UBF2 (Sanij *et al.*, 2008).

Malgré cela, et l'absence de fonction connues d'UBF2, il n'était pas considéré que cette isoforme soit simplement inutile, puisque plusieurs espèces expriment UBF1 et UBF2 à des niveaux similaires (Bolivar *et al.*, 1996, Hisatake *et al.*, 1991, Larson *et al.*, 1993, O'Mahony *et al.*, 1991). De plus, chaque isoforme peut lier l'ADN sans la présence de l'autre (O'Mahony *et al.*, 1992a).

Selon le groupe de Stefanovsky *et al.*, UBF2 pourrait servir à réguler le taux de transcription par l'ARN polymérase I. Les résultats des expériences *in vitro* de ce groupe montrent qu'UBF2 est moins apte qu'UBF1 à arrêter l'élongation de la transcription (Stefanovsky *et al.*, 2008). Cela s'expliquerait par la partie manquante d'UBF2. En effet, cette différence fait en sorte qu'UBF2 a perdu la capacité à lier l'ADN replié. UBF2 déphosphorylé peut donc difficilement former les boucles dans la région codante des gènes ribosomaux pour arrêter l'élongation. De plus, un des deux sites cibles de la phosphorylation par ERK mentionnée précédemment est absent d'UBF2. Par conséquent, un seul événement de phosphorylation est nécessaire pour « dérouler » UBF2 et permettre l'élongation, alors qu'il en faut deux pour obtenir la même conformation avec UBF1; UBF2 agirait en fait comme UBF1 hémi-phosphorylé. Bref, UBF2 est moins susceptible d'arrêter l'élongation, mais répond plus facilement à la phosphorylation par ERK. C'est pour ces raisons que les auteurs soutiennent qu'UBF2 serait un moyen pour réguler plus finement la transcription par l'ARN polymérase I en réponse aux facteurs de croissance (Stefanovsky *et al.*, 2008).

Contrairement au dogme établi qu'UBF participe seulement à la transcription par l'ARN polymérase I, certaines études ont découvert un lien entre UBF2 et la transcription par l'ARN polymérase II. À l'aide d'une technique de criblage fonctionnel en cellules transfectées, UBF2 a été identifiée comme pouvant augmenter l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle d'éléments de réponse à « *lymphoid enhancer factor* » (LEF)/« *T-cell factor* » (TCF), deux facteurs de transcription de la voie de signalisation Wnt. Cette étude montre qu'UBF2 coopère avec LEF-1, un facteur de transcription de la voie Wnt, pour augmenter la transcription de gènes

sous son contrôle. L'interaction entre ces deux facteurs a aussi été observée en co-précipitation (Grueneberg *et al.*, 2003).

UBF avait déjà été observée liée à l'ADN ailleurs que sur les régions promotrices de gènes ribosomaux, cependant elle se trouvait tout de même dans le locus de ces gènes (O'Sullivan *et al.*, 2002). Par contre, des données subséquentes d'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-seq) ont montré qu'UBF est également retrouvée aux régions promotrices de gènes activés par la voie de signalisation Wnt/Wingless, soutenant ainsi son rôle dans la transcription par l'ARN polymérase II décrit ci-haut.

Une autre équipe a montré l'implication d'UBF2 dans la transcription par l'ARN polymérase II. Cette fois, UBF2 contribuerait à la transcription des gènes d'histones. UBF1 et UBF2 ont été retrouvés sur les régions promotrices des gènes d'histones ainsi que d'autres gènes hautement transcrits par l'ARN polymérase II (Sanij *et al.*, 2015). La présence d'UBF au locus des gènes d'histones n'est cependant pas accompagnée par celle de l'ARN polymérase I. Une expérience de transfection d'ARNi contre UBF1 et UBF2 résulte en une diminution de la quantité d'ARNm des histones H1, H2a et H4 par rapport au niveau normal. Une transfection contre UBF1 seulement n'a pas cet effet, indiquant qu'UBF2 serait suffisant pour maintenir ce niveau. De plus, il est intéressant de noter que la présence d'UBF, qui résulte en une plus forte transcription des gènes d'histones, n'est pas corrélée avec des modifications de la chromatine ni avec la présence de nucléosomes.

La conclusion principale à tirer de l'ensemble de ces études est sans aucun doute l'importance de considérer les deux isoformes lors de l'étude d'UBF.

1.5 Structure

UBF1 est une protéine de 97 kDa (94 kDa pour UBF2) composée de multiples domaines aux propriétés différentes. La structure d'UBF peut être divisée en trois régions principales : le domaine de dimérisation, les domaines HMG et la queue acide. Ces régions sont représentées à la Figure 3. Les informations reliées à la structure des différentes régions seront couvertes dans les sections suivantes.

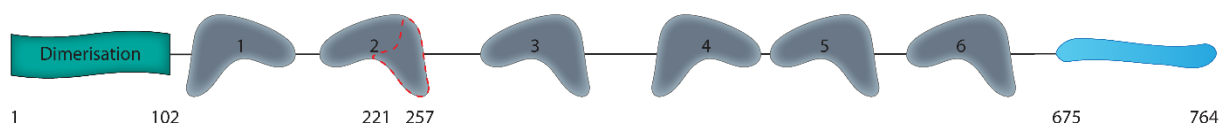


Figure 3 : Représentation de la structure d'UBF.

Le domaine de dimérisation en N-terminal est représenté par le rectangle vert. Les six domaines HMG sont représentés par les formes grises qui imitent la forme tridimensionnelle. La partie C-terminale non structurée est représentée en bleu. Le pointillé rouge délimite la partie du deuxième domaine HMG absente d'UBF2. La position en acides aminés des différentes régions est indiquée au bas de la figure.

1.5.1 Domaine de dimérisation

UBF possède un domaine de dimérisation en N-terminal qui permet de former autant des homodimères que des hétérodimères composés d'UBF1 et d'UBF2 (Jantzen *et al.*, 1992, O'Mahony *et al.*, 1992a). Ce domaine de dimérisation a été identifié en premier avec la protéine UBF de *Xenopus laevis* (xUBF), un homologue d'UBF humain très similaire, à l'exception d'une délétion d'un des domaines HMG (Bachvarov *et al.*, 1991, McStay *et al.*, 1991a, McStay *et al.*, 1991b).

Le domaine de dimérisation comme tel est compris dans les cent premiers acides aminés. Il est composé de quatre d'hélices alpha au caractère amphipathique, contrairement aux domaines de dimérisation typiques comme bZip et bHLH qui n'en contiennent qu'une ou deux. Les résidus hydrophobes et hydrophiles se retrouvent sur les côtés opposés des hélices prédites, et il est spéculé que la dimérisation résulte de l'interaction entre les régions hydrophobes (Lai *et al.*, 1996). Cette hypothèse reste toutefois à être confirmée à ce jour.

Ce domaine est important pour les fonctions d'UBF. En effet, la présence du domaine de dimérisation influence positivement la liaison avec l'ADN. Il a été démontré à l'aide de mutants tronqués en N-terminal que l'absence de ce domaine réduit la capacité d'UBF à lier l'ADN (Jantzen *et al.*, 1992, McStay *et al.*, 1991a, O'Mahony *et al.*, 1992a). De plus, chaque mutation empêchant la dimérisation empêche aussi la transcription (McStay *et al.*, 1991a). Il est intéressant de noter que le domaine de dimérisation semble crucial pour la localisation nucléolaire d'UBF, ainsi que les deux premiers domaines HMG (Ueshima *et al.*, 2017).

1.5.2 Domaines High Mobility Group

Le premier séquençage d'UBF humain a permis d'identifier des régions homologues aux protéines HMG (Jantzen *et al.*, 1990). Cette famille de protéines est connue pour son implication dans plusieurs aspect relié à l'ADN; la régulation génique, la modification de la structure de la chromatine, la réparation et la recombinaison (revue dans (Reeves, 2015)).

La sous-famille HMGB est aussi étudiée de façon approfondie pour son implication dans des fonctions immunologiques, comme l'inflammation le cancer et le signalement de danger (revue dans (Bianchi *et al.*, 2017, Yanai *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2015)). Cette particularité est intéressante parce que les domaines HMG d'UBF sont plus apparentés à la sous-famille HMGB qu'aux deux autres sous-familles, soit HMGA ou HMGN (Read *et al.*, 1993, Weir *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2003). Les domaines HMG d'UBF ne sont pas parfaitement identiques entre eux, mais sont composés de trois hélices alpha qui forment un « L » élargi à la base, à l'exception du domaine six. La structure des domaines un et cinq d'UBF a été résolue par RMN (Xu *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2003), ainsi que les domaines trois et six d'UBF murin (MMDB ID : 28060 et 28059) (Madej *et al.*, 2014). Le premier domaine HMG d'UBF est présenté à la Figure 4.

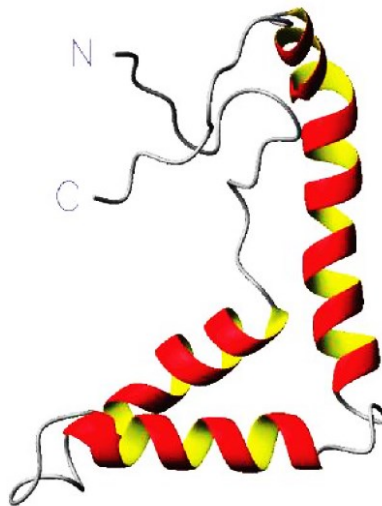


Figure 4 : Structure du premier domaine HMG d'UBF.

La structure tridimensionnelle du premier domaine HMG d'UBF humain obtenu par résonance magnétique nucléaire par l'équipe de Xu *et al.*, 2002.

La composition d'UBF à base de domaines homologues aux HMGB explique plusieurs de ses propriétés décrites précédemment. Typique aux domaines HMGB, les domaines homologues d'UBF lui confère sa capacité à replier l'ADN (Bazett-Jones *et al.*, 1994, Putnam *et al.*, 1994, Stefanovsky *et al.*, 1996). La formation de l'*enhancesome* décrit plus haut nécessite en plus que leur position relative soit exacte dans un dimère, sans quoi le repliement est partiel (Stefanovsky *et al.*, 2001a). Ses domaines HMGB sont aussi responsable de son interaction avec l'ADN qui se fait sans requérir une séquence précise d'acides nucléiques, mais qui peut se faire plutôt via un aspect structural, comme l'ADN replié, cruciforme, ou encore les jonctions à quatre voies (Copenhaver *et al.*, 1994, Hu *et al.*, 1994, Hu *et al.*, 1998, O'Sullivan *et al.*, 2002). Cependant, la liaison d'UBF précisément aux régions promotrices UCE et CE nécessite absolument la partie N-terminale contenant le premier domaine HMG, alors que les autres contribuent moins à cette liaison (Jantzen *et al.*, 1992).

1.5.3 Queue C-terminale acide

La partie C-terminale d'UBF est peu structurée. Il s'agit une longue série d'acides aminés majoritairement acides, où on y retrouve deux séquences de 21 et 18 résidus composés exclusivement d'acide glutamique et d'acide aspartique. Le reste de la région C-terminale est composé aussi de résidus sérines, asparagines et glycines. Cette composition C-terminale acide est commune aux protéines HMGB, à l'exception que la queue C-terminale d'UBF est environ deux fois plus longue (Jantzen *et al.*, 1990).

Les acides aminés 640 à 670, décrits comme « lien » entre le sixième domaine HMG et la queue C-terminale, contiennent un NLS (*Nuclear Localisation Signal*). Sa délétion entraîne la localisation d'UBF au cytoplasme, sans empêcher sa localisation nucléaire et nucléolaire. La partie acide comme telle semble favoriser la localisation nucléolaire (Ueshima *et al.*, 2017).

D'autres résultats intéressants de la même étude suggèrent fortement que la queue C-terminale acide est capable d'interagir avec les domaines HMG d'UBF, et ce de façon intramoléculaire. Cette interaction semble augmenter la préférence du premier domaine HMG pour l'ADN structuré, représenté par un plasmide surenroulé. Elle a également comme conséquence de diminuer l'affinité non spécifique de ce domaine pour de l'ADN linéaire.

1.6 Fonctions lors d'infections virales

Les virus, dépendant entièrement d'une cellule hôte pour se répliquer, ont développé au fil de l'évolution une multitude de mécanismes afin d'en prendre le contrôle. Les virus exploitent évidemment le mécanisme cellulaire de traduction, mais peuvent aussi utiliser l'ADN polymérase cellulaire afin de répliquer leur matériel génétique, ou encore l'ARN polymérase II afin de produire des ARN messagers. Il est intéressant de noter que certains virus ont évolué des capacités de moduler le métabolisme cellulaire à leur avantage de façon plus profonde.

1.6.1 Virus variés

Étant donné le rôle central qu'occupe la transcription des ARNr par l'ARN polymérase I dans la biologie cellulaire, il n'est pas surprenant que plusieurs virus la manipulent. L'interaction avec cette voie via UBF est décrite dans cette section. Dans certains cas il s'agit d'une inhibition comme lors d'une infection par le virus de la poliomyélite. Dans d'autres cas il s'agit d'une stimulation comme lors d'une infection par le Virus de l'Hépatite C (VHC) et le Virus Simien 40 (SV40). Ces deux derniers visent à augmenter la transcription par l'ARN polymérase I afin de stimuler la croissance cellulaire et ultimement leur réplication.

Virus Simien 40

L'infection par le SV40 résulte en une stimulation de la transcription des gènes ribosomaux. Le mécanisme responsable de cette augmentation exploite les fonctions normales d'UBF. L'antigène large T de ce Polyomavirus induit la phosphorylation de la partie C-terminale d'UBF, ce qui permet de former un complexe UBF-SL1 stable; ce qui à son tour stimule la transcription des gènes ribosomaux (Zhai *et al.*, 1999, Zhai *et al.*, 1997).

Hépatite C

Le VHC exploite aussi les fonctionnalités d'UBF. La protéine virale Core, connue pour réguler la transcription de gènes par l'ARN polymérase II, a aussi été observée pouvant réguler la transcription par l'ARN polymérase I. La présence de la protéine Core provoque une phosphorylation accrue sur les résidus sérines d'UBF, ce qui entraîne une augmentation du recrutement d'UBF et de l'ARN polymérase I aux régions promotrices des gènes ribosomaux (Kao *et al.*, 2004). Cette étude a démontré que la protéine Core interagit avec TBP, une

composante du complexe de transcription de l'ARN polymérase I, II et III. Cette interaction entre Core et TBP permet alors au VHC d'être directement impliqué dans les trois transcriptions.

Poliomyélite

À l'opposé du SV40 et du VHC, le virus de la Poliomyélite a plutôt un effet inhibiteur sur la transcription des gènes ribosomaux. Une infection par ce virus résulte en fait en la dégradation d'UBF et de SL1 dès trois heures post-infection (Banerjee *et al.*, 2005). Cette inhibition rapide s'intègre dans la stratégie du virus de la Poliomyélite d'arrêter toute transcription cellulaire.

Adénovirus

L'Adénovirus exploite également UBF pour favoriser sa réplication, mais contrairement au VHC et au SV40, le mécanisme n'est pas en lien avec la transcription par l'ARN polymérase I. Effectivement, UBF est relocalisé lors de l'infection mais ne colocalise plus avec l'ARN polymérase I, ce qui n'altère pas pour autant la production d'ARNr. UBF semble plutôt impliqué dans la réplication du génome viral (Lawrence *et al.*, 2006). Des expériences de neutralisation d'UBF avec un anti-sérum résultent en une plus faible réplication de l'ADN viral. Cela suggère donc qu'UBF est utilisée par le virus pour la réplication de son ADN.

1.6.2 Virus Herpès Simplex 1

Le VHS-1 induit plusieurs changements au noyau et au nucléole de la cellule infectée. Une partie importante de ces modifications est observable par le changement de localisation de diverses protéines.

UBF

Deux études ont montré qu'UBF est redistribuée lors de l'infection (Lymberopoulos *et al.*, 2010, Stow *et al.*, 2009). Une partie d'UBF perd effectivement sa localisation nucléolaire et est redistribuée sous forme de points dans le noyau. L'étude du groupe de Stow *et al.* a aussi tenté de montrer qu'UBF était relocalisée indépendamment de l'ARN polymérase I, un partenaire d'interaction important d'UBF, comme lors de l'étude du même groupe chez l'Adénovirus (Lawrence *et al.*, 2006). Cependant, la description de la méthodologie employée et référée ne fournit pas de précision pour pouvoir identifier quelle sous-unité de l'ARN polymérase I est observée (Lawrence *et al.*, 2006, Mais *et al.*, 2005, Stow *et al.*, 2009). Deux possibilités peuvent

toutefois en être déduites, il s'agit soit de la sous-unité RPA43 ou de la sous-unité PAF53. Dans le cas de RPA43, UBF serait relocalisée sans une protéine avec laquelle elle n'interagit pas directement. Par contre, UBF interagit normalement avec PAF53 (Hanada *et al.*, 1996), ce qui signifie que cette association serait perdue lors de l'infection. Ce résultat aurait pu fournir de l'information supplémentaire quant à comment le VHS-1 influence les interactions protéiques d'UBF. Des expériences de notre laboratoire montrent qu'UBF est relocalisée lors de l'infection conjointement avec la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase I, RPA194 (Lymberopoulos *et al.*, 2010). Cette sous-unité n'a pas été montrée comme étant un partenaire direct d'UBF. Il est donc possible qu'un groupe de sous-unités reste associé à UBF via PAF53, par exemple. UBF est donc relocalisée lors de l'infection avec au moins une sous-unité de l'ARN polymérase I. Il demeure encore incertain si l'infection par le VHS-1 peut moduler les interactions protéines-protéines d'UBF. Les résultats de Lymberopoulos *et al.* montrent également qu'UBF est relocalisée ailleurs qu'aux compartiments de réplication virale (CRV) ou qu'aux sites initiaux de réplication de l'ADN viral.

Dans une autre partie de l'étude de Stow *et al.*, une expérience de co-transfection montre qu'UBF a un effet inhibiteur sur la réplication d'un plasmide. Cette expérience utilise un plasmide nommé pS1 possédant la séquence d'une origine de réplication du VHS-1, *OriS*, ainsi que sept autres plasmides codant pour les sept protéines virales nécessaires à la réplication de l'ADN viral, soit UL5, UL8, UL9, UL29, UL30, UL42 et UL52. La co-transfection de ces plasmides avec un plasmide codant pour une protéine de fusion EGFP-UBF montre en effet une diminution de la réplication du plasmide pS1 comparativement au contrôle sans UBF. Il en va de même avec des versions d'EGFP-UBF tronquées en C-terminal jusqu'à la troisième boîte HMG. Une deuxième expérience a été effectuée, mais en utilisant cette fois de l'ADN viral co-transfecté avec les troncations d'EGFP-UBF. Le nombre de plaques de lyse formées sur tapis de cellules diminue en présence d'EGFP-UBF ou une construction tronquée à partir du dernier domaine HMG. Les auteurs de cette étude y voient la preuve de l'implication d'UBF dans la réplication du VHS-1, mais favorisent cependant l'hypothèse d'un effet dominant-négatif pour expliquer l'impact négatif sur la réplication, comme observé lors de l'expression de cette protéine de fusion lors de la réplication de l'Adénovirus (Lawrence *et al.*, 2006, Stow *et al.*, 2009).

Nucléole

Mise à part l'impact sur UBF, l'infection par HSV-1 peut aussi entraîner d'autres altérations du nucléole. Par exemple, l'infection entraîne la dispersion de B23 et de la nucléoline, deux protéines nucléolaires impliquées entre autres dans la production et la maturation des ARNr.

La nucléoline perd sa localisation nucléolaire au profit d'une localisation dispersée dans le noyau, et ce d'une façon dépendante de la région putative d'endonucléase de la protéine virale UL24. En contraste, la relocalisation d'UBF ne dépend pas d'UL24 (Bertrand *et al.*, 2010, Bertrand *et al.*, 2008, Lymberopoulos *et al.*, 2007, Lymberopoulos *et al.*, 2010). À l'opposé d'UBF, il a été démontré que la nucléoline est importante pour la réplication virale. Lorsque l'expression de la nucléoline est réduite, la réplication virale est aussi diminuée, ainsi que l'export nucléaire des capsides virales (Calle *et al.*, 2008, Sagou *et al.*, 2010).

La protéine B23 est une protéine multifonctionnelle impliquée entre autres dans la biogénèse des ribosomes. Elle est responsable de la localisation nucléolaire de plusieurs autres facteurs, du clivage et de la maturation de précurseurs d'ARNr. Ces diverses fonctions cellulaires sont revues dans les publications suivantes (Box *et al.*, 2016, Lindstrom, 2011). Dans le cadre de l'infection, B23 est aussi dispersée de façon similaire à la nucléoline (Calle *et al.*, 2008, Lymberopoulos *et al.*, 2011).

ARNr

L'effet général de l'infection par le VHS-1 est une diminution de la quantité de certains ARNr (Wagner *et al.*, 1969). D'un côté, la production du précurseur 45S semble ne pas être visiblement altérée par l'infection, par contre l'ARNr 18S est toujours produit, mais paraît s'accumuler dans la composante granulaire (Besse *et al.*, 1996). Malgré ces observations et l'arrêt de la production de la majorité des protéines cellulaires lors de l'infection, la production de ribosomes se poursuit dans les cellules infectées, bien qu'à un niveau réduit (Simonin *et al.*, 1997). Les résultats d'une étude plus poussée ont permis de démontrer qu'effectivement le niveau du précurseur 45S était peu affecté par l'infection. L'inhibition de l'ARN polymérase I résulte normalement en une chute du niveau du précurseur 45S. Ces résultats suggèrent donc que le fonctionnement de l'ARN polymérase I n'est pas inhibé de façon majeure par l'infection (Belin *et al.*, 2010). Cette étude montre également que c'est une modification de la maturation des précurseurs qui cause cette diminution de la quantité de ribosomes. Les auteurs décrivent le modèle suivant : d'une

part, permettre la synthèse des ARNr, même à un niveau réduit, permettrait à la cellule infectée d'éviter le stress ribosomal qui stimulerait l'apoptose. D'autre part, la modification de la maturation permet au virus de produire des intermédiaires d'ARNr modifiés, et possiblement des ribosomes spécialisés (Belin *et al.*, 2010).

Somme toute, le VHS-1 provoque des modifications élaborées de plusieurs aspects du noyau et du nucléole qui ont toutes pour but de favoriser sa réplication.

2 VIRUS HERPÈS SIMPLEX

2.1 Taxonomie

La classification provient du dernier rapport (2016) du « International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ». L'ordre des *Herpesvirales* a des représentants dans une grande variété d'hôtes couvrant une partie impressionnante du règne animal. La famille des *Herpesviridae* est celle qui comprend les neuf de ces virus qui ont un hôte humain. Elle est divisée en trois sous-familles; les *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, et *Gammapherpesvirinae*.

Dans la sous-famille *Alphaherpesvirinae*, deux virus humains se trouvent dans le genre *Simplexvirus*, soit les *Alphaherpesvirus humain 1* et *2*, mieux connus sous le nom de Virus Herpès Simplex 1 et 2 (VHS-1 et VHS-2). Le troisième virus humain des *Alphaherpesvirinae* fait partie du genre *Varicellovirus* et se nomme *Alphaherpesvirus humain 3*, connu comme le virus Varicelle-Zona (VZV). Les virus appartenant à la sous-famille *Alphaherpesvirinae* ont typiquement un cycle de réplication plus court que les autres virus herpès humains. Ils ont un tropisme principalement épithélial et entrent en latence dans les cellules neuronales.

La sous-famille *Betaherpesvirinae* comprend le *Betaherpesvirus humain 5*, membre du genre *Cytomegalovirus*, connu comme le Cytomégalovirus (CMV). Elle comprend aussi le genre *Roseolovirus* regroupant trois espèces : les *Betaherpesvirus 6A*, *6B* et *7*. Les *Betaherpesvirus* se répliquent lentement chez leur hôte ainsi qu'en culture cellulaire. Ils démontrent généralement un tropisme restreint, tant au niveau de l'espèce de l'hôte que du type cellulaire. Le CMV est principalement connu pour son implication dans les infections congénitales et aussi dans les rejets de greffes.

Les virus humains de la sous-famille *Gammaherpesvirinae* sont divisés en deux genres. L'espèce *Gammaherpesvirus humain 4*, ou virus d'Epstein-Barr (EBV), appartient au genre *Lymphocryptovirus*, et le *Gammaherpesvirus humain 8*, connu pour causer le sarcome de Kaposi (KSHV) appartient au genre *Rhadinovirus*. Ces virus ont un potentiel oncogénique ainsi qu'un tropisme lymphocytaire, ils peuvent donc être la cause de plusieurs cancers, dont le lymphome de Burkitt, de Hodgkin et le sarcome de Kaposi par exemple.

2.2 Vue d'ensemble du VHS-1

2.2.1 Morphologie

Le VHS-1 est un virus enveloppé, c'est-à-dire que la structure externe du virion est une enveloppe bi-lipidique. Cette membrane est dérivée du Golgi de la cellule hôte de laquelle le virion est issu (van Genderen *et al.*, 1994). Plusieurs protéines virales glycosylées ou non y sont présentes. On y retrouve les glycoprotéines B (gB), gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, gM, ainsi que le produit des gènes *ul20* et *us9* (Loret *et al.*, 2008a, Roizman *et al.*, 2007).

À l'intérieur de cette enveloppe se trouve le tégment. Cette structure protéique est assemblée en majeure partie dans le cytoplasme avant la sortie des nouveaux virions. Elle est composée de plusieurs protéines virales et cellulaires (Loret *et al.*, 2008a). La présence de ces protéines dans le tégment leur permet d'exercer leurs fonctions dès l'entrée du virus dans la cellule hôte, sans nécessiter de synthèse *de novo*. Ces fonctions sont variées et vont de l'initiation de la transcription dans le cas de VP16 et d'ICP4 à l'évasion de défenses cellulaires dans le cas d'ICP0 et d'UL13 par exemple. On compte aussi comme fonctions le ciblage des capsides au noyau par UL14 et la dégradation d'ARNm cellulaires par la protéine VHS. Les fonctions remplies par les protéines du tégment sont revues dans les sections suivantes et dans ces revues (Kelly *et al.*, 2009, Roizman *et al.*, 2013). L'assemblage de cette partie du virion est contrôlé et résulte en un arrangement structuré qui sera décrit plus en détail.

Sous la couche du tégment se trouve la capside virale comme telle. Quatre protéines virales composent la majorité de la capside; soit VP5 (UL19), VP19c (UL38), VP23 (UL18) et VP26 (UL35). Les deux sous-unités principales de la capside sont formées par des arrangements de VP5, soit les hexons et les pentons, qui s'assemblent en capsomères. VP19c et VP23 attachent

les capsomères entre eux, et des hexamères de VP26 sont positionnés sur les hexons de VP5. Un seul vertex est différent, celui composé de douze unités de UL6. Cette structure est le portail par lequel le génome viral est encapsidé et ensuite expulsé de la capside. L'assemblage de la capside et l'encapsidation de l'ADN viral sont décrits dans les sections suivantes et dans ces revues (Brown *et al.*, 2011, Heming *et al.*, 2017). Le résultat de cet assemblage est une capside protéique composée de deux couches en forme icosaédrique, la symétrie de la couche externe est de T=16 et la couche interne de T=4 (Schrag *et al.*, 1989).

2.2.2 Pathogénèse

Le VHS-1 est connu dû à sa manifestation visible et reconnaissable. En effet, la principale pathologie associée au VHS-1 est la présence de lésions épithéliales sur la muqueuse buccale. Ces lésions herpétiques sont appelées communément « feu sauvage ». La prévalence du VHS-1 dans la population est très grande. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la prévalence dans la population mondiale est estimée à environ 70%. La prévalence corrèle inversement avec le niveau de développement socio-économique et pourrait même atteindre près de 100% dans certaines régions (Gupta *et al.*, 2007). La transmission se fait par contact direct et le VHS-1 ne possède pas de réservoir autre que l'humain. L'infection initiale se produit au niveau des muqueuses et est facilitée par la présence d'une brèche ou abrasion. Il est intéressant de noter que des particules infectieuses ont été isolées de la salive de personnes asymptomatiques et que ce phénomène contribuerait de façon importante à la transmission due à la diminution des précautions prises par les individus infectés (Mark *et al.*, 2008, Mertz, 2008, Tateishi *et al.*, 1994).

Les symptômes qui suivent une infection varient en durée et en intensité. Les particularités des différents symptômes sont couvertes dans ces revues (Fatahzadeh *et al.*, 2007, Roizman *et al.*, 2007). Comme mentionné précédemment, la manifestation principale est une lésion orolabiale. Par contre, l'infection peut entraîner des complications dans certains cas. On note parmi celles-ci : encéphalites, kératites et infections disséminées. Les kératites herpétiques sont une cause importante de cécité (Toma *et al.*, 2008). Par contre, les infections disséminées sont plus rares et surviennent chez les hôtes immunosupprimés tel que les sidéens ou les receveurs de greffes. Les nouveau-nés sont également plus susceptibles de développer une infection disséminée, ce qui

peut provoquer des complications graves. Chez les individus sains, l'infection par le VHS-1 ne cause généralement pas de morbidité élevée.

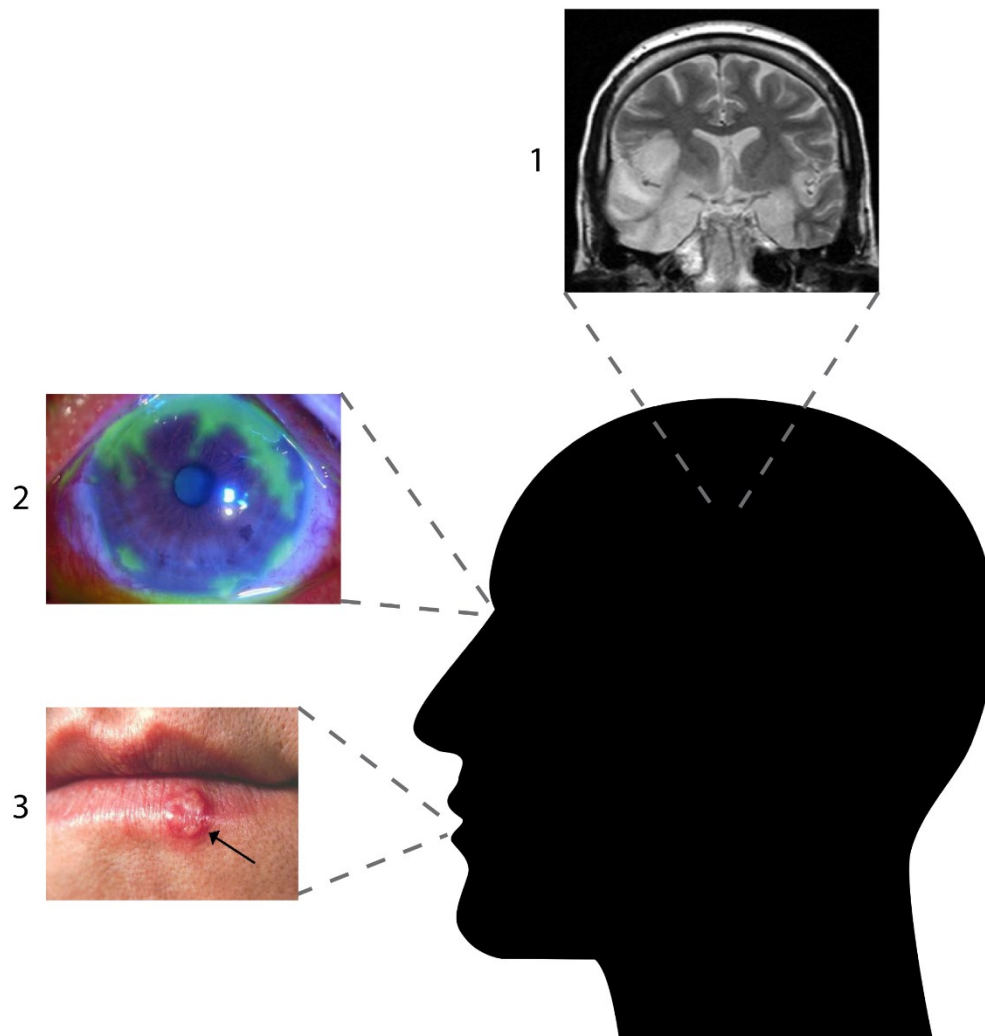


Figure 5 : Principales pathologies engendrées par le VHS-1

Illustration regroupant trois principales manifestations de l'infection par le VHS-1. **1.** Image de résonance magnétique (IRM) d'une encéphalite herpétique. Publiée par dr Laughlin Dawes sous licence CC BY 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) à l'adresse : <http://www.radpod.org/2007/03/24/herpes-simplex-encephalitis/>. L'inflammation est visible entre autres dans le lobe temporal (à gauche). **2.** Cornée marquée à l'aide de fluorescéine permettant de visualiser les dommages causés par une kératite herpétique. Image tronquée de l'originale publiée sous licence CC BY 2.5 (<https://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>) par (Yang et al., 2011). **3.** Herpès labial communément appelé « feu sauvage », identifié par la flèche noire. Image du domaine public.

2.2.3 Réponse immunitaire

Malgré que le VHS-1 peut causer des infections récurrentes chez les individus sains, le système immunitaire joue un rôle essentiel, tant dans le contrôle de l'infection que de la réactivation.

Le virus est reconnu initialement par les PRR; « *Pattern Recognition Receptor* ». Le TLR2 des cellules NK peut par exemple détecter la glycoprotéine gD présente sur le virion (Kim *et al.*, 2012b). L'ADN viral est détecté par le TLR9 et d'autres senseurs tels que AIM2 et IFI16 (discuté plus loin) (Hornung *et al.*, 2009, Lund *et al.*, 2003). L'ARN double brin est également détecté par les senseurs RIG-I et MDA5 (Thompson *et al.*, 2011).

La détection du VHS par les PRR permet à la réponse innée d'initier la production d'IFN de type I. La réponse innée implique principalement la production d'IFN de type I, les cellules NK, les macrophages et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ces dernières jouent un rôle initial important en sécrétant des IFN de type I, ce qui induit un état antiviral local (Barr *et al.*, 2007, Vogel *et al.*, 2014). Les IFN de type I induisent effectivement un état antiviral dans les cellules avoisinantes, en plus d'activer les cellules NK et les macrophages. Les cellules NK lysent les cellules infectées et sont un facteur de protection important contre l'infection (Grubor-Bauk *et al.*, 2008, Nandakumar *et al.*, 2008). Les macrophages recrutés au site de l'infection jouent également un rôle important en sécrétant des interleukines, du TNF et en participant à la présentation antigénique (Ellermann-Eriksen, 2005). La réponse innée ainsi que la détection par les PRR sont revues de façon complète dans les publications suivantes (Kurt-Jones *et al.*, 2017, Orzalli *et al.*, 2014).

La présentation antigénique permet ensuite le développement de la réponse adaptative essentielle à un contrôle efficace de l'infection et de la latence. Les cellules DC constituent le principal acteur de cette présentation antigénique en activant les cellules B, T et NK (Barr *et al.*, 2007, Collins *et al.*, 2017, Frank *et al.*, 2012). Les cellules T CD8⁺ sont l'élément primordial de cette réponse. Elles permettent non-seulement de résoudre l'infection initiale en provoquant la mort des cellules infectées, mais sont aussi responsables de la surveillance qui maintient le virus en latence (Mott *et al.*, 2009, Mott *et al.*, 2008, St Leger *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2017, Zhu *et al.*, 2007, Zhu *et al.*, 2013). La réponse immunitaire contre le VHS est étudiée en profondeur, surtout dans le but de développer un vaccin. Cette réponse et la vaccination sont revues en détail dans les

publications suivantes (Roizman *et al.*, 2013, Sandgren *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2017, Zhu *et al.*, 2014).

2.2.4 Latence

Le VHS-1 exploite le contact entre les muqueuses et les neurones sensitifs sous-jacents pour s'y propager. Les virions produits lors de la primo-infection peuvent ensuite infecter les neurones par leurs terminaisons axonales à proximité. L'infection des neurones mène à un phénomène pour lequel les virus herpétiques sont bien connus : la latence. Suite à l'infection de la muqueuse buccale, et subséquemment des neurones sensitifs, la latence s'établit dans les ganglions trijumeaux (Baringer *et al.*, 1973, Bastian *et al.*, 1972). Afin de s'y rendre, la capside virale est transportée de façon rétrograde jusqu'au corps neuronal (Smith *et al.*, 2001b, Snyder *et al.*, 2006). La latence permet au virus de se maintenir chez l'hôte pour la durée de sa vie.

La latence est caractérisée par la présence du génome viral au noyau sous forme épisomale, sans production de particule virale. Le génome viral est associé à des histones et maintenu sous forme de nucléosomes (Deshmane *et al.*, 1989, Efsthathiou *et al.*, 1986). Durant la latence, le génome viral est peu transcrit car il est majoritairement associé avec des histones portant des marques répressives de la transcription comme la tri-méthylation de la lysine 27 de la sous-unité H3 (H3K27me3) et la di- et tri-méthylation de la lysine 9 (H3K9me2/3) (Wang *et al.*, 2005). Ces marques s'accumulent au cours des jours suivant l'infection de neurones (Cliffe *et al.*, 2013). La région LAT, pour « *Latency-Associated Transcripts* » fait exception et est transcrite en abondance (Stevens *et al.*, 1987). Contrairement au reste du génome, les histones de cette région portent des marques associées à une transcription active, soit l'acétylation de la lysine 9 et 14 de la sous-unité H3 (H3K9ac et H3K14ac) (Kubat *et al.*, 2004a, Kubat *et al.*, 2004b).

Le facteur cellulaire CTCF contribue au contrôle de la transcription durant la latence. En plus d'interagir avec UBF dans le cadre de la transcription par l'ARN polymérase I, des sites consensus de liaison à CTCF ont été identifiés sur le génome viral. La liaison de CTCF à ces sites favorise la séparation de la région LAT où la transcription est active durant la latence du reste du génome où la transcription est inactive (Amelio *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2007). Ces sites contribuent à la fois à la latence, la réactivation et la réplication lytique (Lang *et al.*, 2017, Lee *et*

al., 2018). En effet, ces sites semblent être régulés indépendamment les uns des autres selon les circonstances. Il est intéressant de noter que certains de ces sites associés à la latence sont libérés de CTCF lors de la réactivation, ce qui suggère que leur occupation serait néfaste pour la transcription des gènes lytiques (Ertel *et al.*, 2012, Washington *et al.*, 2018).

La région LAT est étudiée depuis près de trente ans et l'étendue des connaissances sur sa complexité ne cesse d'augmenter. Pour une revue détaillée des acquis sur la région LAT et ses transcrits; voir (Phelan *et al.*, 2017). Brièvement, la transcription de la région LAT favorise le maintien de la latence en promouvant les formes H3K27me3 et H3K9me2/3 sur le reste du génome viral (Cliffe *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2005). Le transcrit LAT primaire est de 8.5 kb et est anti-sens à deux gènes importants pour la réplication lytique; ICP0 et ICP34.5 (Stevens *et al.*, 1987). Du transcrit primaire, un segment d'ARN de 2 kb et un de 1.5 sont aussi produits (Rock *et al.*, 1987). Ces deux ARNs produits par épissage alternatif seraient responsables de conférer une résistance à l'apoptose induite par les cellules immunitaires T cytotoxiques (Phelan *et al.*, 2017, St Leger *et al.*, 2011, Thompson *et al.*, 2001). La région LAT code aussi pour plusieurs autres ARN et micro-ARN. Les fonctions probables telles que le maintien de la latence par l'inhibition de la traduction de facteurs lytiques sont revues en détail dans (Phelan *et al.*, 2017). Par exemple, le micro-ARN H2 (miR-H2) est antisens au transcrit d'ICP0 et en réduit l'accumulation (Umbach *et al.*, 2008). Une mutation de ce micro-ARN est associée à une neurovirulence et une réactivation accrue (Jiang *et al.*, 2016, Jiang *et al.*, 2015).

Durant la latence, l'expression de gènes viraux associés à une réplication lytique a malgré tout été détectée à plusieurs reprises (Green *et al.*, 1981, Kramer *et al.*, 1995, Ma *et al.*, 2014, Maillet *et al.*, 2006, Russell *et al.*, 2016). Une hypothèse généralement acceptée est que ce phénomène représente des événements de réactivation contrôlés par une réponse immunitaire ou intracellulaire de l'hôte. De plus, un de ces gènes, ICP0, est spéculé pouvant servir à réguler l'état de la chromatine du génome latent (Raja *et al.*, 2016).

La réactivation se produit lorsque cet équilibre est brisé et que l'expression des gènes viraux n'est plus contrôlée. En effet, l'expression des gènes viraux au début de la réactivation n'est pas ordonnée comme il est observé lors de l'infection lytique initiale (Du *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2012a). Cette phase initiale de réactivation, quelques fois appelée animation, peut être déclenchée par une signalisation neuronale. Effectivement, plusieurs stimuli menant à une

réactivation déclenchent une signalisation par la voie JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*). Il a ensuite été démontré que cette voie de signalisation mène à une phosphorylation des histones qui répriment l'expression de gènes viraux. Ce mécanisme est particulièrement intéressant puisqu'il résulte en une expression de ces gènes viraux sans qu'il y ait retrait des marques répressives des histones (Cliffe *et al.*, 2015).

La transition entre cette phase d'animation et une réactivation réussie dépend de la protéine virale VP16. Ce facteur critique pour la réactivation complète jumelé à la localisation nucléaire du facteur cellulaire HCF-1 (*Host Cell Factor 1*) permet de coordonner l'expression génique de façon similaire à une infection initiale et la sortie de la latence (Sawtell *et al.*, 2011, Thompson *et al.*, 2009, Whitlow *et al.*, 2009).

Le déclenchement de la réactivation peut être causé par plusieurs types de facteurs externes, tel que la fatigue, le stress psychologique, une température élevée, des rayons UV, etc (Freeman *et al.*, 2007, Sawtell *et al.*, 1992, Worrall, 2009). Le stress psychologique par exemple, est réputé pouvoir altérer l'efficacité des cellules T CD8⁺ via la sécrétion de facteurs neuronaux. Il en résulte que les cellules T CD8⁺ spécifiques qui maintiennent normalement le virus en latence sont moins aptes à le faire efficacement (Freeman *et al.*, 2007).

2.3 Cycle de réplication lytique

L'entrée du virion dans la cellule est presque toujours décrite comme étant la première étape d'un cycle d'infection. Certains soulignent en revanche que cette façon de délimiter le cycle de réplication lytique néglige un élément important; soit l'origine de cette particule virale. Il en va de soi que nous devons placer arbitrairement une « fenêtre » au travers de laquelle se fait l'observation d'une partie d'un processus continu. Un résumé du cycle de réplication lytique du VHS-1 est présenté à la Figure 6.

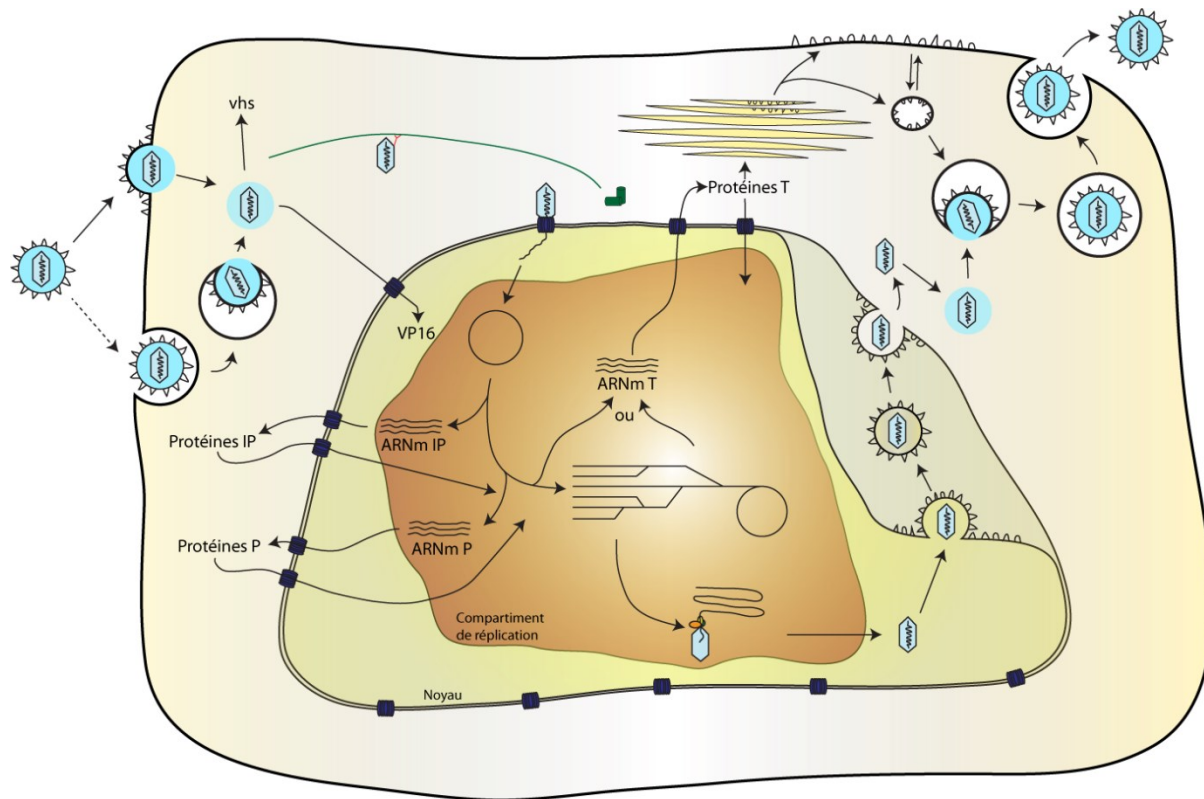


Figure 6 : Résumé du cycle de réplication lytique.

Suite à l'attachement, l'entrée se produit par fusion à la membrane plasmique ou par endocytose. Les protéines du téguement et la capsid virale se retrouvent alors au cytoplasme. La capsid virale est transportée activement jusqu'au pore nucléaire. Le génome viral est introduit à l'intérieur du noyau où il est circularisé et chromatinisé. La protéine du téguement VP16 active la transcription des gènes immédiat-précoces (IP). L'expression des gènes précoces (P) et tardifs (T) se produit en cascade. Le génome viral est répliqué et encapsidé à l'intérieur du compartiment de réplication dans le noyau. Après un enveloppement initial et une fusion à la membrane nucléaire externe, la capsid se trouve au cytoplasme où elle acquiert son téguement. Le virion obtient son enveloppe à partir de vésicules endosomales ou dérivées du Golgi. Le virion mature sort de la cellule hôte par exocytose. Figure tirée de (Bertrand, 2011).

2.3.1 Entrée

Attachement et fusion

Le processus d'entrée débute avec l'attachement de la particule virale à la membrane plasmique de la cellule. Cette interaction requiert des protéines d'attachement virales et des récepteurs cellulaires. L'attachement initial avec la cellule hôte se produit entre gB ou gC et les héparines sulfates (WuDunn *et al.*, 1989). Cet attachement réversible n'est pas essentiel à l'entrée, en revanche il permet un rapprochement entre les protéines de fusion et les récepteurs cellulaires, ce qui facilite l'entrée (Akhtar *et al.*, 2009). Il existe plusieurs glycoprotéines virales qui ont un rôle à jouer dans la fusion, cependant quatre ont été démontrées essentielles et suffisantes en culture

cellulaire; gB, gD, gH et gL (Turner *et al.*, 1998). L'interaction avec les récepteurs cellulaires (Nectine-1, les héparines 3-O-sulfatées et les *herpesvirus entry mediators*) et gD entraîne un changement conformationnel qui expose son domaine pro-fusion (Cocchi *et al.*, 2004, Fusco *et al.*, 2005). Ce dernier initie ensuite l'assemblage du complexe de fusion formé de gB et l'hétérodimère gH-gL (Atanasiu *et al.*, 2007). Le changement de conformation de gB est réputé être déclenché par son interaction avec le complexe gH-gL (Sathiyamoorthy *et al.*, 2017). La fusion des membranes est ensuite catalysée par gB, à la suite de son interaction avec ses récepteurs cellulaires : les héparines sulfates, DC-SIGN, MAG ou NM2a. Les facteurs gouvernant cette fusion sont revus en détail dans (Cooper *et al.*, 2015).

Les VHS-1 et -2 ont un tropisme relativement large; neurones, cellules épithéliales et fibroblastes. Selon le type cellulaire, le mécanisme d'entrée peut varier. En plus de la fusion, il a été démontré que l'entrée peut aussi se faire par endocytose pH-indépendante ou dépendante (Milne *et al.*, 2005, Nicola *et al.*, 2005, Nicola *et al.*, 2003). Cependant, peu importe le mécanisme, les mêmes quatre glycoprotéines ont été montrées comme nécessaires (Nicola *et al.*, 2004).

À la suite de la fusion des membranes virale et cellulaire, la capside doit aussi traverser le réseau d'actine. Cette barrière est franchie grâce à plusieurs mécanismes de signalisation et de réorganisation déclenchés lors de l'attachement qui sont revus dans (Denes *et al.*, 2018). On note en particulier l'importance de la signalisation des Ras/Rho GTPases Rac1 et Cdc42 et la nécessité d'induire la dépolymérisation de l'actine (Clement *et al.*, 2006, Hoppe *et al.*, 2006). La capside entourée du tégment se retrouve alors dans le cytoplasme. La présence d'un tégment protéique permet à une quantité et une diversité appréciable de protéines virales d'être présentes avant qu'il y ait synthèse *de novo*. Les fonctions remplies par ces protéines permettent d'établir un environnement plus permissif à la réplication virale. Elles vont par exemple contrer les défenses cellulaires et stimuler la transcription virale.

Protéine VHS

La protéine virale *virion host shutoff* (pVHS) présente dans le tégment est une de ces protéines faisant partie d'un mécanisme de contrôle de la cellule hôte. La protéine VHS a comme fonction de provoquer la dégradation des ARNm afin d'en limiter la traduction. Dès l'entrée dans la cellule hôte, cette endonucléase encodée par le gène *UL41* dégrade les ARNm (Kwong *et al.*,

1988, Strom *et al.*, 1987, Taddeo *et al.*, 2006a, Taddeo *et al.*, 2006b). À l'origine de cette découverte, le modèle était que pVHS dégrade les ARNm de façon non-spécifique. Des études ont ensuite montré que pVHS démontrait une certaine spécificité. Il est maintenant établi que pVHS peut stabiliser certains ARNm cellulaires et épargner certaines classes de transcrits viraux (Esclatine *et al.*, 2004a, Esclatine *et al.*, 2004b, c, Shu *et al.*, 2013, Taddeo *et al.*, 2013). Malgré que cette stabilisation de transcrits cellulaires puisse à prime abord sembler contre-intuitive, elle favorise ultimement la réplication virale. Un de ces transcrits cellulaires stabilisés code pour la tristetraproline, une protéine qui est utilisée par pVHS. Cette association permet à VHS de mieux cibler et dégrader les autres transcrits cellulaires associés à une réponse aux stress (Esclatine *et al.*, 2004b, Shu *et al.*, 2015).

Comme mentionné précédemment, pVHS dégrade principalement les ARNm cellulaires, mais aussi peut dégrader les ARNm viraux. Il a été montré que les transcrits IP sont principalement affectés, mais qu'il y a quand même accumulation d'ARNm viraux de toutes les classes, la dégradation étant plus lente que la synthèse *de novo*. De plus, dans un contexte d'infection, les transcrits viraux sont relativement stables (Taddeo *et al.*, 2013). Cette protection des transcrits viraux est faite par UL47, une autre protéine virale présente dans le tégment (Shu *et al.*, 2013) et ICP27 une protéine IP. L'activité de pVHS au début du cycle viral est donc régulée par des protéines virales et cellulaires.

Plus tard dans l'infection, l'activité de pVHS est également contrôlée par VP16. Elle est une protéine à cinétique tardive qui fait partie du tégment; donc présente dans la cellule dès l'entrée. Une des fonctions tardives de VP16 est d'interagir avec l'endonucléase pVHS afin de la contrôler et favoriser l'expression de gènes viraux (Lam *et al.*, 1996, Smibert *et al.*, 1994). La présence de VP22 est aussi importante pour contrôler pVHS à des temps tardifs (Sciortino *et al.*, 2007). La dégradation contrôlée des transcrits viraux serait un moyen d'assurer une transition entre les différentes phases de transcription (Shu *et al.*, 2013).

De plus, la dégradation de l'ARN par pVHS contribue à empêcher l'activation du senseur d'ARN double brin PKR, ce qui mènerait à la phosphorylation d'eIF2 α et l'arrêt de la traduction (Pasiaka *et al.*, 2009, Sciortino *et al.*, 2013).

Deux conséquences principales résultent donc de l'activité de pVHS; la traduction des transcrits viraux est favorisée, et les réponses antivirales nécessitant une expression génique *de novo* sont limitées.

Transport

Suite à la fusion des membranes du virion et de la cellule hôte, la capside se retrouve dans le cytoplasme. Chez le VHS-1, la réplication de l'ADN viral et sa transcription se font au noyau. Le génome viral reste à l'intérieur de la capside durant son transport jusqu'à ce dernier. Il a été estimé qu'une diffusion passive pourrait permettre un déplacement dans le cytoplasme de 10 µm en deux heures, ce qui est incompatible avec l'expression des gènes viraux qui est déjà observée à ce moment (Sodeik, 2000). De plus, à cette vitesse un centimètre serait parcouru en 231 ans, alors que la vitesse observée lors du transport rétrograde dans les neurones de plusieurs centimètres est de 3 à 5 mm par heure (Lycke *et al.*, 1984, Sodeik, 2000). Un transport actif est donc évidemment nécessaire pour que l'ADN viral puisse se retrouver au noyau et ainsi se répliquer et permettre la transcription des gènes viraux.

Malgré que le mécanisme exact reste à être élucidé, plusieurs éléments permettent d'obtenir un portrait global. Il est établi que la capside est transportée via les microtubules grâce au moteur moléculaire dynéine et le complexe protéique adaptateur nommé +TIP (Dohner *et al.*, 2002, Jovasevic *et al.*, 2015, Sodeik *et al.*, 1997). Les capsides provenant de virions extracellulaires peuvent interagir avec les microtubules, alors que les capsides provenant du noyau ne le peuvent pas. Étant donné qu'elles acquièrent leur tégment après la sortie du noyau, cela démontre clairement qu'une ou des protéines du tégment sont nécessaires pour le transport (Dodding *et al.*, 2011). Les microtubules ont un rôle crucial dans le transport au noyau qui est décrit en détail dans la revue suivante (Naghavi *et al.*, 2017). Basé sur les connaissances actuelles, il est supposé que VP22 est une de ces protéines du tégment probablement impliquées dans le transport via les microtubules. Il a effectivement été démontré que tôt dans l'infection VP22 stabilise les microtubules en induisant leur regroupement et leur hyper-acétylation (Elliott *et al.*, 1998).

Plusieurs autres protéines du tégment sont impliquées dans ce transport. Chez l'alphaherpesvirus PrV (*pseudorabies*) la protéine VP1/2, qui est aussi présente chez le VHS-1 et appelée UL36, sert à ancrer la capside au moteur moléculaire dynéine (Zaichick *et al.*, 2013). La protéine du tégment UL14 serait aussi impliquée dans ce transport puisqu'un mutant qui en est

dépourvu a été caractérisé comme ayant une quantité réduite de capsides en bordure du noyau (Yamauchi *et al.*, 2008).

Une autre protéine du tégument joue un rôle important suite à la fusion du virion, incluant le transport au noyau. ICP0 est une protéine multifonctionnelle qui agit tant au cytoplasme durant l'entrée qu'au noyau durant la réplication. Les fonctions nucléaires notamment reliées à contrer les défenses antivirales seront discutées plus loin. En ce qui a trait au transport de la capside, un mutant d'ICP0 montre un transport des capsides au noyau altéré (Delboy *et al.*, 2011). Ce même groupe a montré préalablement qu'un protéasome fonctionnel est important pour le transport des capsides au noyau (Delboy *et al.*, 2008). Comme la protéine ICP0 possède un domaine E3-ubiquitine ligase bien documenté, ces auteurs spéculent alors que ce domaine entrainerait la dégradation d'une ou plusieurs protéines par le protéasome, ce qui permettrait le transport de la capside au noyau.

Injection

Pour les virus qui répliquent leur génome au noyau, plusieurs façons de les faire entrer dans ce dernier ont été développées au fil de l'évolution. Par exemple, certains le font entrer encapsidé, comme les parvovirus, alors que d'autres le font décapsider dans le cytoplasme, puis entrer par les pores nucléaires, comme les lentivirus. Le VHS-1 garde son génome encapsidé jusqu'à son injection à l'intérieur du noyau par les pores nucléaires. Cela est démontré par la présence de capsides vides attachées aux pores nucléaires par le vertex qui contient le portail (Mettenleiter, 2016, Rode *et al.*, 2011). Pour ce faire, il doit y avoir interaction entre la capside et le pore nucléaire. Des expériences *in vitro* ont démontré la nécessité de l'importine-beta pour l'attachement de la capside (Ojala *et al.*, 2000). Deux protéines virales ont ensuite été démontrées importantes pour l'injection du génome au noyau; UL25 et UL36. UL25 et UL36 sont impliquées dans l'attachement de la capside au pore nucléaire et UL36 aussi dans sa localisation à celui-ci (Abaitua *et al.*, 2012, Copeland *et al.*, 2009, Pasdeloup *et al.*, 2009). Ces deux protéines virales doivent interagir avec Nup214 et Nup358, deux composantes de la partie cytoplasmique du pore nucléaire. Ensuite, le génome viral est relâché, ce qui dépend aussi de ces deux protéines virales, de la protéolyse de UL36 et de l'énergie fournie par un cycle RanGTP/GDP (Huffman *et al.*, 2017, Jovasevic *et al.*, 2008, Ojala *et al.*, 2000, Preston *et al.*, 2008). Le mécanisme déclencheur exact de cette relâche n'est pas encore élucidé. Ensuite, une

fois la capside « ouverte », le génome viral sortirait sous le simple effet de la pression présente au sein de la capside (Bauer *et al.*, 2013, Liashkovich *et al.*, 2011). Ce modèle tire son origine de la similarité entre la capside du VHS-1 et celle de certains bactériophages chez qui le génome est effectivement encapsidé sous pression dans une capside icosaédrique (Baker *et al.*, 2005, Evilevitch *et al.*, 2003, Smith *et al.*, 2001a). De plus, l'extrémité du génome qui sort de la capside en premier est la dernière à y être entrée, comme chez ces bactériophages (Newcomb *et al.*, 2009).

2.3.2 Génome viral

Le VHS-1 possède un génome d'ADN double brin linéaire long de 152 kb. Son contenu en GC est relativement élevé; soit d'environ 68%. Au moins 100 gènes, dont au moins 84 protéines, ont été identifiés (Roizman *et al.*, 2007, Umbach *et al.*, 2009).

Le génome est composé de deux segments uniques bordés de régions répétées et inversées. Le segment UL « *Unique Long* » est bordé par la région b (directe) et b' (inversée), et le segment US « *Unique Short* » est bordé par la région c et c'. La région répétée a et a' flanque le génome complet et se retrouve aussi entre UL et US (Figure 7). Les segments uniques peuvent aussi s'inverser lors de la réplication du génome; une conséquence du mode de réplication qui sera discuté plus loin. Il en résulte quatre possibilités d'isomères génomiques : P « *Prototype* », IL « *Inverted Long* », IS « *Inverted Short* », ILS « *Inverted Long and Short* » (Hayward *et al.*, 1975).

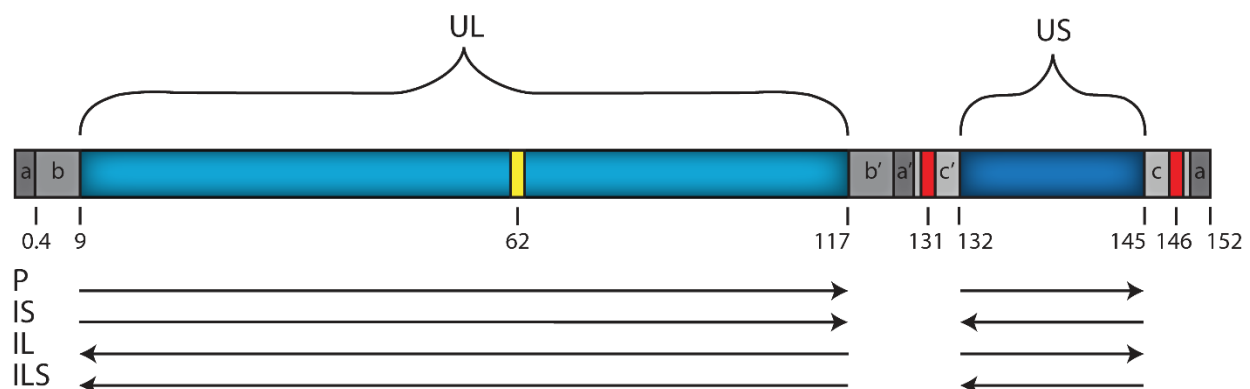


Figure 7 : Schéma du génome viral linéaire.

Le génome est représenté par le rectangle, où les régions uniques sont en bleu et les régions répétées en gris. La position de différents éléments est indiquée en kb sous le génome. L'origine de réplication OriL est colorée en jaune et OriS en rouge. L'orientation relative des segments uniques est indiquée par une flèche pour chacun des isomères possibles.

Le génome viral est sous forme linéaire dans la capside et à son arrivée dans le noyau, mais se circularise dès son entrée au noyau. Ce modèle a fait l'objet de critique, mais sa circularisation a été démontrée clairement ce qui en fait le modèle maintenant accepté (Garber *et al.*, 1993, Jackson *et al.*, 2003, Strang *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que cette circularisation avait tout de même été imaginée plusieurs années auparavant pour expliquer la présence de génomes « tête-à-queue » chez des virus mutants (Poffenberger *et al.*, 1985).

Bien que le génome viral soit dépourvu d'histones ou de protéines à sa sortie de la capside, il n'en demeure pas ainsi longtemps. Au départ, l'association du génome avec des histones avait été montrée dans un contexte de latence, alors que le génome viral semblait facilement accessible, donc dépourvu d'histones, durant une infection lytique (Deshmane *et al.*, 1989, Muggeridge *et al.*, 1986). Plus tard, des résultats montrant que des histones s'associent avec le génome viral, même durant une infection lytique ont surpris (Herrera *et al.*, 2004, Kent *et al.*, 2004). Ces études et d'autres subséquentes ont précisé que ces histones n'étaient pas disposées régulièrement comme celles empêchant la transcription sur le génome cellulaire compacté. De plus, elles ont montré la présence de la variante d'histone H3.3, et d'autres caractéristiques favorisant la transcription comme la présence de H3K4me3, H3K9ac et H3K14ac (Huang *et al.*, 2006, Lacasse *et al.*, 2010, Oh *et al.*, 2008, Placek *et al.*, 2009).

Des facteurs viraux importants sont responsables de maintenir la chromatine sous cette forme active, comme VP16 qui sera décrit dans la section suivante. Sans eux, la chromatinisation des génomes viraux mènerait à une infection quiescente. Par exemple, le génome d'un virus dont les fonctions de transactivation de VP16 et ICP0 sont mutées ne se réplique pas et persiste plusieurs jours dans la cellule hôte. L'introduction d'ICP0 est requise pour réactiver ce génome. (Minaker *et al.*, 2005, Mossman *et al.*, 1999).

2.3.3 Expression génique

L'expression des gènes chez le VHS-1 se fait séquentiellement selon trois classes principales (Honess *et al.*, 1974). Brièvement, la transcription des gènes immédiats-précoces (IP, ou α) est stimulée par des facteurs viraux provenant du tégument. Les produits de ces gènes vont ensuite réguler la transcription de toutes les classes. Les produits des gènes précoces (P, ou β) sont

responsables de mener la réplication du génome viral. Ensuite, l'expression de la dernière classe tardive (T, ou γ) produit entre autres les protéines structurales pour la formation de nouveaux virions.

VP16 et chromatine

Le contrôle de la chromatinisation est essentiel pour la réplication efficace du VHS-1. Plusieurs acteurs entrent en jeu pour permettre la transcription malgré la chromatinisation du génome viral décrite précédemment. L'emphasis de cette section est mise sur VP16; alors que d'autres facteurs sont décrits dans les publications suivantes (Conn *et al.*, 2013, Kristie, 2015, Nevels *et al.*, 2011).

La protéine VP16, autrefois appelée α -TIF pour « *α -Trans-Inducing Factor* » est un de ces facteurs importants (Triezenberg *et al.*, 1988b). Suite à l'entrée, elle est transportée au noyau par la protéine UL14 (Yamauchi *et al.*, 2008). Son rôle nucléaire de remodelage de la chromatine virale dépend de son domaine d'activation. Effectivement, ce domaine est important pour que VP16 interagisse avec les HAT CBP et p300, ainsi que les facteurs de remodelage BRG1 et hBRM (Herrera *et al.*, 2004). Le génome d'un mutant VP16 est chargé d'histones peu acétylées (Hancock *et al.*, 2010). L'importance de VP16 pour la transcription est certaine, en revanche, celle de l'impact de son recrutement des facteurs de remodelage de la chromatine l'est moins. Une étude a montré d'une part qu'une diminution de l'expression de CBP et p300 par ARNi n'affecte pas négativement l'expression des gènes IP in vitro. D'autre part, cette étude montre qu'une expression ectopique de p300 dans une lignée cellulaire qui en est déficiente provoque une augmentation de la transcription des gènes IP (Kutluay *et al.*, 2009). Set1, une histone méthyl-transférase interagissant avec VP16 via HCF-1 (Wysocka *et al.*, 2003), a été montrée importante pour l'expression optimale des gènes viraux. Sans Set1, une diminution de H3K4me3 sur le génome a été observée, associée à une diminution de l'expression de certains gènes viraux et de la réplication virale (Huang *et al.*, 2006). De plus, une histone déméthylase nommée LSD1 recrutée par un complexe contenant VP16 a été montrée aussi importante pour l'expression de gènes IP (Liang *et al.*, 2009). S'ils ne sont pas essentiels, ces facteurs semblent tout le moins jouer positivement sur l'expression virale. Outre les modifications post-traductionnelles des histones, la présence des histones elles-mêmes sur le génome viral est contrôlée. La protéine virale VP22 bloque la formation de nucléosomes en inhibant les fonctions de la protéine

cellulaire TAF-1, un facteur important pour le dépôt d'histones sur le génome viral (van Leeuwen *et al.*, 2003).

Activation et régulation de la transcription

Malgré que l'initiation de la transcription ne nécessite aucune protéine virale, comme le montre la production de virions suite à la transfection d'ADN viral, elle est grandement favorisée par VP16 (Ace *et al.*, 1989, Campbell *et al.*, 1984, Poon *et al.*, 1995). VP16 active la transcription des gènes IP en formant un complexe avec deux facteurs cellulaires : HCF-1 et Oct-1 (*Octamer-binding protein 1*). Ensemble, ces protéines reconnaissent la séquence consensus « TAATGArAT » présente dans la région promotrice des gènes IP (Gerster *et al.*, 1988, Kristie *et al.*, 1989, Stern *et al.*, 1989, Triezenberg *et al.*, 1988a, Triezenberg *et al.*, 1988b). La partie C-terminale de VP16 contient un domaine d'activation (VP16AD) qui est essentiel pour ses fonctions d'activation de la transcription, mais qui n'est pas impliqué dans sa localisation aux promoteurs (Herrera *et al.*, 2004, Smiley *et al.*, 1997). Il permet de recruter certaines composantes nécessaires à la transcription par l'ARN polymérase II, tels que TBP, TAF32, TFIIB et TFIID (Hall *et al.*, 2002, Klemm *et al.*, 1995, Xiao *et al.*, 1994). Ce domaine est aussi responsable de stimuler l'assemblage du complexe TFIID-TFIIA sur les régions promotrices (Berk *et al.*, 1998, Kobayashi *et al.*, 1995, Kobayashi *et al.*, 1998). L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II sur les gènes viraux IP s'en trouve donc stimulée.

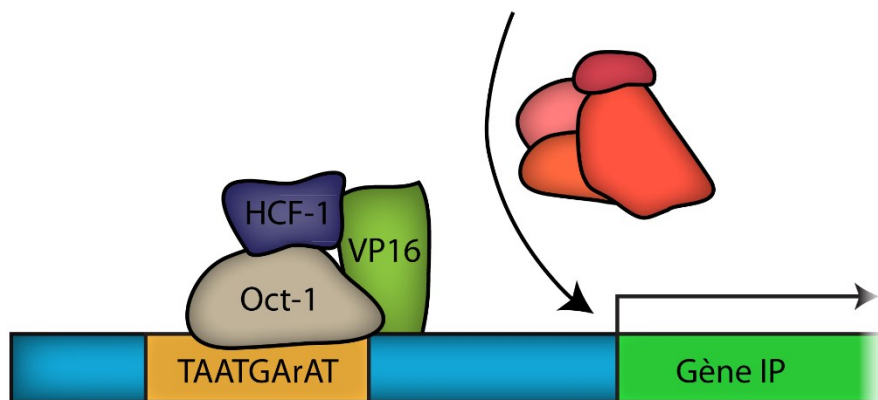


Figure 8 : Activation de la transcription virale immédiate-précoce.

Le complexe protéique formé de VP16, Oct-1 et HCF-1 reconnaît la séquence consensus « TAATGArAT » représentée par le rectangle orange sur la région promotrice des gènes viraux IP, schématisée par le rectangle bleu. Cette interaction provoque ensuite le recrutement des facteurs mentionnés ci-haut sur la région promotrice, ce qui active la transcription.

Il y a six protéines IP, soit : ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, et US1.5. Elles vont servir à réguler la transcription de toutes les classes de gènes viraux (ICP4, ICP27) et réguler la transcription par l'ARN Polymérase II (ICP22, ICP27). Certaines vont également contrecarrer les défenses de l'hôte (ICP0, ICP47).

ICP0 est considérée comme activateur général de la transcription, sans spécificité précise. Elle n'interagit pas directement avec l'ADN donc active la transcription indirectement. Il a été démontré qu'ICP0 stimule la transcription de toutes les classes de gènes et de la réplication virale dans son ensemble (Cai *et al.*, 1993, Cai *et al.*, 1992, Everett, 1984, O'Hare *et al.*, 1985). La facilitation de la transcription virale s'exerce par un démantèlement de réponses antivirales (discuté plus loin) et par la subversion de mécanismes cellulaires visant à induire une forme répressive de la chromatine virale. Le complexe CoREST/REST permet la stabilisation de LSD1, une de ses composante mentionnée précédemment, qui est utilisée pour faciliter la transcription des gènes IP par VP16/Oct-1/HCF-1 (revue dans (Roizman, 2011)). Le rôle d'ICP0 est dans l'inactivation de CoREST/REST, car malgré qu'il soit utilisé par le VHS-1 pour l'expression de gènes IP, il est délétère pour l'expression des gènes P et T (Zhou *et al.*, 2010). En effet, ICP0 est importante pour la transition de l'expression des gènes IP vers les gènes P. Elle promeut ce changement en empêchant la présence de l'histone désacétylase HDAC1 dans le complexe CoREST/REST qui sinon réduirait la transcription virale (Gu *et al.*, 2005, Gu *et al.*, 2007). Ces résultats concordent avec ceux montrant que la présence d'ICP0 augmente le niveau d'acétylation des histones et affecte aussi le dépôt de la composante H3 sur le génome viral (Cliffe *et al.*, 2008).

Le produit du gène ICP4 est à la fois un activateur et répresseur de la transcription. Cette protéine est effectivement requise pour activer la transcription de la deuxième et troisième classe de gènes, ce qu'elle le fait en favorisant l'association entre TFIID et la région promotrice (DeLuca *et al.*, 1985, Grondin *et al.*, 2000). À de faibles quantités, ICP4 stimule aussi la transcription des gènes IP, cependant, une fois accumulée elle a un effet inhibiteur sur cette classe et sa propre transcription, ce qui favorise une transition vers l'expression de la classe P (DeLuca *et al.*, 1985, Watson *et al.*, 1980). Contrairement à l'activité d'activation, l'activité de répression dépend d'une séquence spécifique (Faber *et al.*, 1986, Michael *et al.*, 1993, Roberts *et al.*, 1988). Dans le cas d'ICP4, ce site se trouve près du site d'initiation, ce qui interférerait avec l'activation de sa transcription (Leopardi *et al.*, 1995). Une étude récente montre qu'ICP4

participe aussi à maintenir le génome dans un état non-chromatinisé et permissif à la transcription (Gibeault *et al.*, 2016). Ces résultats concordent avec l'interaction démontrée d'ICP4 et de plusieurs facteurs de remodelage de la chromatine (Dembowski *et al.*, 2015).

ICP22 est responsable de phosphoryler la partie C-terminale de l'ARN polymérase II via une kinase cellulaire et virale (UL13), ce qui corrèle avec une accumulation normale de transcrits viraux à des temps tardifs (Durand *et al.*, 2005, Long *et al.*, 1999, Rice *et al.*, 1995). Ces auteurs avaient spéculé que cette phosphorylation, différente de celle permettant la transition de l'initiation vers l'élongation des transcrits, pourrait quand même avoir une fonction similaire. Une étude récente montre effectivement que la présence d'ICP22 est importante pour l'élongation des transcrits, et ce en recrutant des facteurs d'élongation au génome viral (Fox *et al.*, 2017). Un autre mécanisme facilite l'expression de gènes T en exploitant la topoisomérase II cellulaire; une enzyme critique pour la réplication du génome viral. ICP22 modifie un complexe cellulaire en y remplaçant deux protéines cellulaires par le facteur de processivité de l'ADN polymérase virale UL42, ce qui permet l'association avec la topoisomérase II. La topoisomérase II faciliterait ensuite l'accessibilité du génome réplcatif pour la machinerie de transcription (Advani *et al.*, 2003).

ICP27 est une protéine multifonctionnelle qui a des rôles reliés à la fois aux transcrits viraux et cellulaires. Dans un premier temps, ICP27 bloque l'épissage des ARNm cellulaires, ce qui contribue à inhiber leur expression (Bryant *et al.*, 2001, Hardy *et al.*, 1994). Non seulement l'épissage cellulaire est bloqué, mais de nouveaux événements d'épissage et de polyadénylation non standards sont médiés par ICP27, de façon dépendante de la séquence (Tang *et al.*, 2016). Ces mécanismes contribueraient à déjouer des réponses antivirales. Dans un deuxième temps, ICP27 recrute l'ARN polymérase II aux sites de réplication virale en interagissant avec sa partie C-terminale, ce qui est surtout important pour la transcription des gènes P et T (Dai-Ju *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2002). De plus, ICP27 favorise l'export des ARNm viraux en faisant la navette entre le noyau et le cytoplasme et en exploitant la machinerie cellulaire d'export d'ARNm (Johnson *et al.*, 2009, Koffa *et al.*, 2001, Mears *et al.*, 1998, Sandri-Goldin, 1998).

L'ensemble de ces facteurs permet de réguler l'initiation, et l'arrêt, de la transcription virale, afin de coordonner l'expression génique des différentes classes. Un élément supplémentaire, non

protéique, régule également la classe de gène T. La classe T peut en fait être divisée en deux sous-classes, soit la classe pseudo-tardive et la classe tardive. La différence se situe au niveau de la dépendance à la réplication du génome viral. L'expression de la classe pseudo-tardive ne dépend que partiellement de la réplication du génome viral et peut tout de même se faire sans elle, bien que plus faiblement. L'expression de la classe tardive ne le peut pas, car elle dépend entièrement de la réplication du génome viral. (Conley *et al.*, 1981, Jones *et al.*, 1979). La réplication du génome viral est donc en soi un moyen de réguler l'expression de certains gènes viraux.

Traduction

Comme tous les virus, le VHS-1 utilise la machinerie de traduction de l'hôte. Le VHS-1 a cependant certains mécanismes qui lui permettent de favoriser la traduction de ses transcrits. Les fonctions de pVHS et d'ICP27 mentionnées précédemment en font partie. De plus, le VHS peut agir directement sur la machinerie de traduction. Afin de stimuler la traduction, la protéine 4E-BP1 est phosphorylée par ICP0 et ensuite dégradée par le protéasome suite à l'infection, ce qui favorise la formation du complexe eIF4F et par conséquent la traduction. La phosphorylation de eIF4E est également induite par ICP0, ce qui favorise aussi la formation de ce complexe (Walsh *et al.*, 2004). Parallèlement, la protéine ICP6 se lie à eIF4G, ce qui favorise aussi la formation de eIF4F (Walsh *et al.*, 2005). De plus, la kinase virale Us3 phosphoryle la protéine TSC2, ce qui a comme effet d'activer constitutivement mTORC1. Il en résulte donc une phosphorylation de 4E-BP1, ce qui favorise une fois de plus la traduction (Chuluunbaatar *et al.*, 2010). Ces mécanismes sont un exemple supplémentaire du contrôle important qu'exerce le VHS-1 sur la cellule hôte.

2.3.4 Réplication du génome

La réplication du génome viral peut être initiée à différents endroits. Une de ces origines de réplication porte le nom de *OriL*, pour sa localisation dans la région génomique UL. L'autre origine est nommée *OriS* et se trouve dans la région *c* dupliquée bordant la partie US, portant le total à trois origines de réplication possibles. Ces origines sont palindromiques et ont une grande similarité de séquence malgré des structures différentes (Gray *et al.*, 1984, Lockshon *et al.*, 1986, Stow, 1982, Vlazny *et al.*, 1981). Aucune de ces origines n'est essentielle, ce qui est démontré par la réplication de mutants soit d'*OriL* ou d'*OriS* (Igarashi *et al.*, 1993, Longnecker *et al.*,

1986, Polvino-Bodnar *et al.*, 1987). De plus, certaines études montrent l'absence d'effet appréciable de l'inactivation d'une origine, suggérant une redondance et une apparente équivalence des origines de réplication (Igarashi *et al.*, 1993, Polvino-Bodnar *et al.*, 1987). En revanche, une hypothèse selon laquelle le contexte influence l'importance d'une origine par rapport à une autre a été avancée pour tenter d'expliquer l'existence de plus d'une origine de réplication. Cette hypothèse est basée sur des résultats montrant une importance variable d'*OriL* ou d'*OriS* selon différents contextes : *in vivo*, réactivation, type cellulaire, etc (Balliet *et al.*, 2006, Hardwicke *et al.*, 1997, Nguyen-Huynh *et al.*, 1998).

Réplication

Le VHS-1 encode sept protéines essentielles à la réplication de son génome : l'ADN polymérase (UL30) et le facteur de processivité qui lui est associé (UL42), la protéine de reconnaissance de l'origine de réplication (UL9), la protéine de liaison à l'ADN simple brin (ICP8) et le complexe hélicase-primase composé de trois sous-unités (UL5, UL8, UL52) (Crute *et al.*, 1989, Gottlieb *et al.*, 1990, Purifoy *et al.*, 1977, Wu *et al.*, 1988).

Pour initier la réplication, des facteurs viraux doivent en premier lieu se lier à une des origines de réplication. Le premier facteur viral à le faire est la protéine UL9, dont la liaison induira une boucle et une torsion de l'origine (Koff *et al.*, 1991). La protéine ICP8 est une métalloprotéine qui se lie à l'ADN simple brin de façon non-spécifique (Bryant *et al.*, 2012, Gupte *et al.*, 1991). Son interaction avec UL9 complètera ensuite ce complexe, ce qui aura comme effet de stimuler l'activité hélicase d'UL9 (Arana *et al.*, 2001, Bruckner *et al.*, 1991, He *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 1997). ICP8 et UL9, en présence d'ATP, entraînent ensuite un changement de structure de l'origine de réplication (Aslani *et al.*, 2002). Il est suspecté qu'un changement de conformation d'UL9 et ICP8 permet l'ouverture de l'origine de réplication et la transition d'ICP8 vers l'interaction avec l'ADN simple brin. Ce mécanisme est revu dans (Ward *et al.*, 2011). ICP8 interagit aussi avec elle-même et forme des filaments qui sont importants pour la réplication virale, probablement en servant d'échafaudage pour plusieurs autres protéines qui participent à la réplication du génome (Darwish *et al.*, 2015).

Le complexe formé d'UL9 et ICP8 recrute ensuite un autre complexe, celui de l'hélicase-primase composé d'UL5, UL8 et UL52. Ce complexe est responsable du déroulement du double brin et de la synthèse d'amorces pour le brin indirect grâce à ses activités hélicase et primase (Calder *et*

al., 1990, Dodson *et al.*, 1991, Sherman *et al.*, 1992). UL52 contient l'activité primase et contribue aussi à l'activité hélicase, alors qu'UL5 interagit avec l'ADN et est essentiel pour initier la synthèse d'amorces (Cavanaugh *et al.*, 2009). Il semble qu'UL8 n'ait pas d'activité enzymatique, mais est tout de même essentiel à la réplication du génome. Elle modulerait l'activité des deux autres protéines et pourrait également servir à recruter divers facteurs à la fourche de réplication, comme UL30 (Ward *et al.*, 2011). Une primase fonctionnelle entraîne ensuite le recrutement de la polymérase (Carrington-Lawrence *et al.*, 2003).

Le VHS-1 encode sa propre ADN polymérase qui est composée de deux sous-unités; la sous-unité catalytique (UL30), et la sous-unité de processivité (UL42) (Gottlieb *et al.*, 1990). UL30 est aussi capable d'une activité exonucléase 3'-5', ce qui résulte en une réplication plus fidèle du génome (Hwang *et al.*, 1997). Elle possède en plus une activité enzymatique qui lui permettrait aussi de procéder à une réparation par excision de bases (Bogani *et al.*, 2008). De son côté, UL42 ancre la polymérase avec l'ADN en interagissant avec chacun d'eux, ce qui rend possible la synthèse de longs fragments lors de la réplication du génome (Bridges *et al.*, 2001, Jiang *et al.*, 2007, Randell *et al.*, 2005, Zuccola *et al.*, 2000).

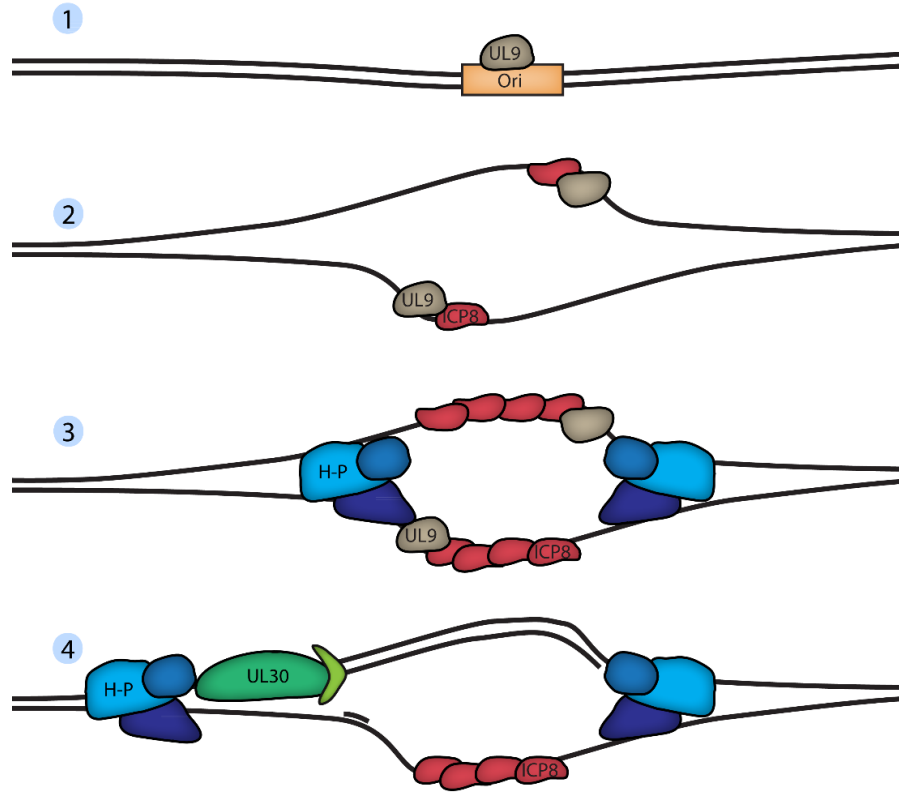


Figure 9 : Schématisation de l'initiation de la réplication du génome viral

Illustration des premières étapes de la réplication du génome viral. L'ADN double brin est représenté par les lignes noires et l'origine de réplication par le rectangle orange « Ori ». Dans un premier temps, UL9 (en brun) interagit avec l'origine de réplication. Dans un deuxième temps, elle initie l'ouverture de la double-hélice, ce qui est suivi de la liaison d'ICP8 (en rouge). Dans un troisième temps, le complexe hélicase-primase (identifié « H-P » en bleu) est recruté et procède au déroulement de l'ADN et à la synthèse d'amorces. Ensuite, la polymérase (identifiée « UL30 » en vert) et son facteur de processivité synthétise le brin complémentaire.

Des études ont identifié plusieurs protéines cellulaires qui participent aussi à la réplication du génome viral. Elles incluent par exemple : des facteurs de remodelage de la chromatine comme SWI/SNF et FACT, des topoisomérases, des éléments associés à la réponse aux dommages à l'ADN comme la voie ATR, et d'autres servant à la réparation de bris double brins tels que Ku70, Ku80 et le complexe MRN (Advani *et al.*, 2003, Dembowski *et al.*, 2015, Lilley *et al.*, 2005, Mohni *et al.*, 2013, Mohni *et al.*, 2011, Taylor *et al.*, 2004). Cette utilisation de mécanismes cellulaires est un exemple supplémentaire de la capacité du VHS-1 à exploiter de façon considérable la cellule hôte.

Le modèle actuel tente d'expliquer les phénomènes observés lors de la réplication du génome viral : l'inversion des régions uniques, la formation de molécules d'ADN multigénomiques (concatémères) et hautement ramifiées. Le génome se répliquerait d'abord de façon « thêta », auprès d'une origine de réplication. Puis, un changement s'opèrerait vers un mode « cercle roulant », ce qui permettrait d'expliquer la formation de longs concatémères de génomes « tête-à-queue » comme intermédiaires de réplication (revue dans (Ward *et al.*, 2011)). Ce changement du mode de réplication est supporté par des observations de modèles où UL9 est nécessaire pour initier la réplication origine-dépendente, mais facultative, voir même délétère, ensuite. Effectivement, une protéine liant l'origine de réplication nuit à la progression du cercle roulant (Blumel *et al.*, 1995, Skaliter *et al.*, 1994).

Comme mentionné précédemment, il est possible d'observer le génome viral selon quatre isomères, P, IS, IL et ILS (Figure 7). Ces isomères sont produits en quantité équimolaires (Bataille *et al.*, 1997, Hayward *et al.*, 1975). Certaines études ont montré que la recombinaison se produit sans nécessiter une séquence précise, mais plutôt un bris double brin (Martin *et al.*, 1996, Sarisky *et al.*, 1994, Weber *et al.*, 1988). D'autres montrent cependant que la région répétée inversée qui borde les parties uniques (*a*) est importante pour une efficacité élevée de recombinaison et de production des isomères (Chou *et al.*, 1985, Dutch *et al.*, 1994, Smiley *et al.*, 1990, Smiley *et al.*, 1981, Umene *et al.*, 2011). Ceux-ci peuvent être observés dès que de nouveaux génomes sont produits, démontrant que la recombinaison se produit tôt dans la réplication du génome (Zhang *et al.*, 1994). Une étude intéressante a toutefois démontré que dans certains types cellulaires, malgré une production équimolaire, un ratio différent dans la population de virions produits est observé, résultant probablement d'un biais d'encapsidation qui reste à être expliqué (Mahiet *et al.*, 2012).

Une autre caractéristique de la réplication du VHS-1 est la production de molécules d'ADN complexes et hautement ramifiées avec, entre autres, des embranchements « Y » et « X » typiques des fourches de réplication et d'intermédiaires de recombinaison (Severini *et al.*, 1994, Severini *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 1994). Ces structures ont été observées en l'absence d'inversion génomique, suggérant que ces deux phénomènes ne sont pas nécessairement interdépendants (Bataille *et al.*, 1997). La réplication par « cercle roulant » seulement ne peut

cependant pas expliquer ces inversions et embranchements. Ils peuvent cependant être expliqués par la recombinaison.

De plus, la recombinaison semble avoir un impact important dans la réplication virale qui dépasse l'inversion et les embranchements génomiques. En effet, une mutation des séquences importantes pour la recombinaison affecte la pathogénèse (Jenkins *et al.*, 1996, Jenkins *et al.*, 1990).

Un modèle proposé permet d'unifier toutes ces observations. Le « double cercle-roulant » décrit par l'équipe d'Okamoto et ses collègues reproduit en effet des phénomènes observés lors de la réplication du génome viral. La progression en cercle roulant produit de longs concatémères, et l'insertion de séquences inversées ou répétées dans ce système provoque des inversions fréquentes. Ce mode de réplication est réputé stimuler la recombinaison, ce qui rallierait le modèle « cercle roulant » et la recombinaison qui est nécessaire pour l'obtention d'isomères génomiques et de nombreux embranchements (Okamoto *et al.*, 2011).

La recombinaison et la réplication du génome sont étroitement liées. Ces observations, ainsi que la présence documentée de multiples protéines cellulaires reliées à la recombinaison, illustrent bien le rôle central qu'elle occupe dans la réplication du génome du HSV-1.

2.3.5 Encapsidation

L'étape suivante dans le cycle réplicatif est l'encapsidation du génome nouvellement synthétisé. Chez le VHS-1 le génome est introduit à l'intérieur d'une capsid préformée. Cet assemblage de la capsid se fait à l'intérieur du noyau et est responsable de la formation de corps d'inclusions.

Assemblage

La première étape de l'assemblage de la capsid est l'interaction entre la protéine majeure de la capsid VP5 et la protéine d'échafaudage VP22a. De multiples copies de ce complexe s'assemblent et débutent la construction d'une capsid sphérique. VP23 et VP19C, les composantes du triplex, s'ajoutent à cette structure au fur et à mesure de son assemblage (Newcomb *et al.*, 1996). L'ajout du portail par lequel le génome sera inséré se fait également à cette étape. Il est composé de douze copies de la protéine UL6 qui s'ajoutent à la capsid via une interaction avec l'échafaudage (Newcomb *et al.*, 2005, Newcomb *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2008). Il est possible qu'un changement de conformation survienne à ce moment et transforme la

pro-capside instable en capsid *B*, qui est une forme abortive contenant encore l'échafaudage (Newcomb *et al.*, 1991).

L'initiation de l'insertion du génome déclenche l'activité protéase d'UL26 qui dégrade l'échafaudage, un pré-requis pour l'insertion du génome viral (Church *et al.*, 1997, Heymann *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 1993). Suite à l'insertion du génome viral, le CVSC « *Capsid Vertex Specific Component* » composé d'UL17, UL25 et UL36 s'ajoute à chaque vertex afin de stabiliser la capsid (Fan *et al.*, 2015, Toropova *et al.*, 2011, Trus *et al.*, 2007). La capsid complète et mature est nommée *C*. Une forme abortive de la capsid peut être détectée et se nomme *A*. Elle est caractérisée par l'absence d'ADN et de protéines d'échafaudage (Newcomb *et al.*, 1991). L'absence d'échafaudage et d'ADN, jumelé à la présence de protéines du complexe terminase démontre que l'insertion du génome a débuté, mais pas terminé, ou que le génome n'a pas été retenu correctement à l'intérieur dû à l'absence d'UL25 (Beard *et al.*, 2004, Conway, 2011).

Insertion du génome

Une fois la pro-capsid assemblée, le complexe terminase se localise à la capsid via son interaction avec le portail. Ce complexe est composé d'UL15, UL28 et UL33 et est responsable du clivage des concatémères en unités génomiques et de leur insertion dans les capsides (Sheaffer *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2007). Dans un premier temps, UL28 balaye le concatémère jusqu'à la détection du site *pac2*, présent dans la région répétée *a* (Adelman *et al.*, 2001). La liaison d'UL28 avec *pac2* déclenche alors l'activité endonucléase d'UL15, qui coupe le concatémère une première fois. Le complexe terminase-concatémère se localise ensuite au portail et UL15 y insère l'ADN viral en hydrolysant de l'ATP. Pendant l'insertion du génome, UL28 balaye toujours le concatémère et déclenche une nouvelle fois son clivage suite à la détection de la séquence *pac1*, libérant ainsi une unité génomique. Ce mécanisme est revu en détail dans (Heming *et al.*, 2017). Certaines polyamines présentes dans la capsid neutralisent les charges négatives de l'ADN, ce qui permet la haute densité d'encapsidation sans protéine (Gibson *et al.*, 1971, Leinbach *et al.*, 1980).

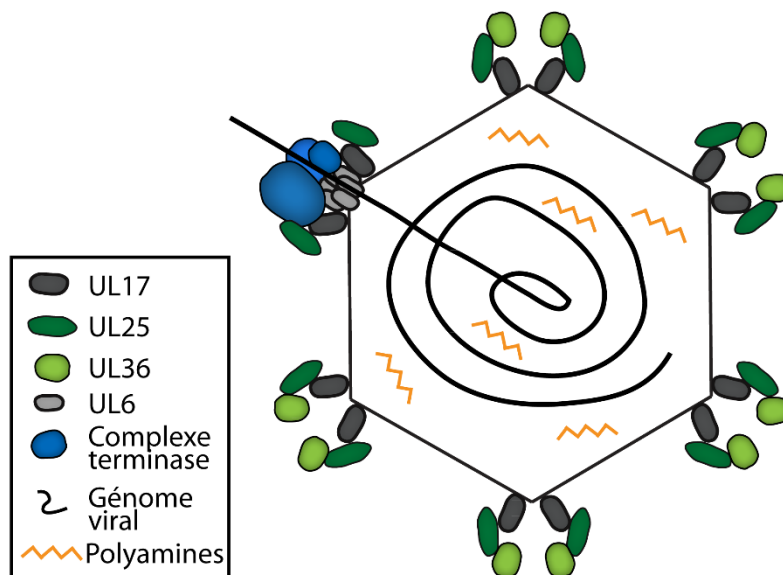


Figure 10 : Encapsulation du génome viral

Schéma illustrant l'étape d'insertion du génome viral dans la capside nouvellement formée. Les parois de la capside sont représentées par les lignes noires droites. Le complexe terminase est représenté en bleu et le portail par les protéines en gris pâle. L'identité des différentes protéines des CVSC (en vert et gris foncé) est indiqué sur la figure. Le génome viral, représenté par la ligne courbe noire, est stabilisé par les polyamines en orange.

2.3.6 Sortie

Le virion mature sort de la cellule par exocytose. Pour ce faire, la capside doit d'abord sortir du noyau. Le modèle accepté pour cette étape est un enveloppement à la membrane interne, puis un désenveloppement à la membrane externe du noyau. Plusieurs éléments abondent dans ce sens. Premièrement, une étude démontre que les pores nucléaires ne semblent pas modifiés lors de l'infection (Nagel *et al.*, 2008). Comme la capside est plus volumineuse que le maximum transmissible par les pores, il est peu probable qu'elle emprunte ce chemin. Deuxièmement, la composition de l'enveloppe des virions matures n'est pas similaire à la membrane nucléaire, ce qui concorde avec les observations de capsides qui se désenveloppent à la membrane externe du noyau (Stackpole, 1969, van Genderen *et al.*, 1994). La capside ne conserve donc pas la membrane acquise lors de l'enveloppement nucléaire.

Sortie du noyau

Pour initier le bourgeonnement initial, les protéines virales UL31, UL34 et US3 ainsi que des protéines cellulaires vont entraîner la dissolution de la lamine, ce qui permettra à la capside d'accéder à la membrane interne (revue dans (Mettenleiter *et al.*, 2006)). De ces protéines,

seulement US3 sera présente dans les virions matures (Loret *et al.*, 2008b, Reynolds *et al.*, 2002). L'enveloppement initial requiert la présence de CVSC et semble aussi être stimulé par une quantité croissante de ceux-ci (Klupp *et al.*, 2006, O'Hara *et al.*, 2010). En effet, les CVSC sont présents en plus grande quantité sur les capsides *C*, ce qui corrèle avec le fait que la majorité des capsides extranucléaires sont de la forme *C* avec seulement une minorité de *B*. La quantité de CVSC sur une capside serait donc un moyen d'envelopper préférentiellement les capsides contenant un génome viral (revue dans (Roller *et al.*, 2017)). Il s'en suit alors une fusion avec la membrane externe par un mécanisme mal connu et la capside désenveloppée se retrouve dans le cytoplasme (Skepper *et al.*, 2001).

Acquisition du tégument

Le tégument a déjà été vu comme un assemblage de protéines peu structuré. À l'opposé, plus les études s'y attardent, plus le tégument est décrit comme une structure organisée séquentiellement et avec précision. Effectivement, les interactions régissant l'assemblage du tégument sont complexes et souvent interdépendantes. Une description détaillée est présentée dans les revues suivantes : (Kelly *et al.*, 2009, Owen *et al.*, 2015, Smith, 2017).

Le tégument contient environ une vingtaine de protéines virales et plusieurs protéines cellulaires (Kelly *et al.*, 2009, Loret *et al.*, 2008b). Brièvement, le début de l'assemblage dépend de la composante des CVSC UL25. Elle interagit avec VP1/2 pour son incorporation dans le tégument (Coller *et al.*, 2007). VP1/2 est la seule protéine avec un lien direct établi avec la capside. La présence de VP1/2 permet ensuite l'ajout de VP16, et cette dernière recrute VP22 et UL37 (Hafezi *et al.*, 2005, Kelly *et al.*, 2014, Mijatov *et al.*, 2007, Svobodova *et al.*, 2012). UL37 est essentielle à l'enveloppement secondaire, probablement par son recrutement d'UL20 et de gK, deux protéines reconnues pour leur implication dans cet enveloppement (Chouljenko *et al.*, 2016, Jambunathan *et al.*, 2014). La partie distale du tégument est acquise au fil de la progression de la capside vers la périphérie de la cellule. C'est au niveau du réseau du golgi que se greffe le reste du tégument, et que se produit l'enveloppement secondaire (Sugimoto *et al.*, 2008, Turcotte *et al.*, 2005). La capside se retrouve enveloppée et incluse dans une vésicule qui est transportée jusqu'à la membrane cytoplasmique. Les détails de la succession d'événements menant à la relâche sont revus dans (Owen *et al.*, 2015). La résultante est la relâche par exocytose de la particule virale complète suite à la fusion de la vésicule.

La production de virions défectifs est connue depuis longtemps. Cependant, une étude intéressante a démontré que, même au sein des virions infectieux, il existe une variation dans leur contenu. Effectivement, malgré cet assemblage ordonné, tous les virions ne possèdent pas la même quantité de certaines protéines du tégument. Par exemple, la quantité de VP16 est variable et corrèle positivement avec l'infectiosité des virions (El Bilali *et al.*, 2017).

3 RÉPONSE INTRINSÈQUE ANTI-HERPÉTIQUE ET SON ÉVASION

Cette section décrit les mécanismes intrinsèques à la cellule hôte qui visent à inhiber la réplication virale. Les réponses intrinsèques sont caractérisées par leur présence constante, sans nécessiter d'expression préalable de gènes ni d'activation par un stimuli externe pour être activées. Le niveau d'expression de ces facteurs intrinsèques est aussi normalement constant. De plus, ils ne requièrent pas l'expression d'autres gènes pour restreindre la réplication virale. Cette réponse intrinsèque a donc la capacité d'agir immédiatement.

Bien entendu, les virus ont développé au fil de leur coévolution avec leur hôte une multitude de mécanismes afin de se soustraire à ces restrictions. Le VHS-1 est équipé de nombreux outils pour contrer les défenses de l'hôte, qu'elles soient systémiques ou cellulaires.

3.1 ND10

Les corps ND10, (*Nuclear Domain 10*), tirent leur nom du nombre de points observés en microscopie et sont un mécanisme majeur en ce qui a trait à la défense intrinsèque contre les *Herpesvirus*. À ce jour, plus d'une centaine de facteurs ont été associés à ces corps (Van Damme *et al.*, 2010). Une protéine en particulier, PML (*Promyelocytic Leukemia*), a été identifiée comme composante cruciale pour l'assemblage des corps ND10 (Ishov *et al.*, 1999). La relation entre ces corps et le VHS-1 a été identifiée pour la première fois il y a plus de vingt-cinq ans. Déjà, ce groupe a démontré que ces corps étaient dispersés de façon dépendante d'ICP0 (Maul *et al.*, 1993). À ce moment, l'hypothèse basée sur la juxtaposition du génome viral à ces corps en début d'infection était que les ND10 pourraient être utilisés pour initier la réplication du virus (Ishov *et al.*, 1996, Maul *et al.*, 1996). Cependant, il est devenu clair par la suite que les corps ND10 présentaient un obstacle pour la réplication virale. De plus, il a été démontré que le

génom viral ne se localisait pas aux corps ND10, mais que ce sont plutôt les corps ND10 qui s'assemblent au génom viral (Everett *et al.*, 2005, Everett *et al.*, 2004).

La protéine virale ICP0 est responsable de provoquer la dispersion de ces corps. Elle contient trois régions qui lui permettent d'interagir avec les corps ND10 (Zheng *et al.*, 2015). Son activité E3 ubiquitine ligase entraîne ensuite la dispersion des ND10, dû à la dégradation par le protéasome de PML et de Sp100, une autre protéine organisatrice des ND10 (Chelbi-Alix *et al.*, 1999, Everett *et al.*, 1998).

Sans ICP0, la fonction antivirale des ND10 est très apparente. La réplication des mutants d'ICP0 est grandement réprimée par les corps ND10. Cette répression est toutefois levée lorsque l'expression de PML ou de Sp100 est diminuée par ARNi (Everett *et al.*, 2008, Everett *et al.*, 2006). D'autres composantes des ND10 ont également un effet antiviral, soit hDaxx et ATRX. L'effet antiviral de ces protéines est présent si elles peuvent interagir ensemble (Lukashchuk *et al.*, 2010). Plusieurs composantes des ND10 possèdent à la fois des modifications post-traductionnelles SUMO (*Small Ubiquitine-like Modifier*) et des motifs d'interaction avec ces modifications (Ishov *et al.*, 1999, Shen *et al.*, 2006, Sternsdorf *et al.*, 1997). Les deux sont importants pour leur localisation aux ND10. Dans le cas de PML et hDaxx, l'élimination de ces motifs entraîne non seulement la perte de leur localisation aux ND10, mais aussi la perte de leur effet antiviral (Cuchet-Lourenco *et al.*, 2011).

Le mécanisme d'action de corps ND10 semble être lié à la modification de la chromatine virale. Le rôle d'ICP0 dans le désamorçage de cette défense soutient cette hypothèse. En effet, la région d'ICP0 importante pour interagir avec le complexe CoREST impliqué dans la transcription virale est aussi importante pour causer la dégradation de PML (Gu *et al.*, 2009). Aussi en soutien à cette hypothèse est le rôle de hDaxx et ATRX hors d'un contexte viral. Ces deux protéines sont connues être en complexe et pour leur rôle de remodelage de la chromatine (Tang *et al.*, 2004, Xue *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter qu'ICP0 ne semble pas interagir avec hDaxx, comme elle le fait avec d'autres composantes de remodelage de la chromatine. Il a été observé par contre que la phosphorylation de hDaxx est augmentée lors de l'infection, et ce d'une façon dépendante d'ICP0 (Lukashchuk *et al.*, 2010). Ces auteurs supposent que cette phosphorylation serait un deuxième moyen d'inactiver hDaxx, en plus de sa dispersion suite à la dégradation de PML et Sp100. Car chez la souris, c'est la forme non phosphorylée de Daxx qui peut interagir avec

l'histone désacétylase HDACII et les histones (Hollenbach *et al.*, 2002). La protéine ATRX quant à elle est dégradée par le protéasome de façon dépendante d'ICP0, et son ARNm est dégradé par pVHS (Jurak *et al.*, 2012). Cette étude a aussi identifié un micro-ARN viral capable de cibler l'ARNm de ATRX. Il semble cependant que ce micro-ARN ne soit pas impliqué *in vivo* dans la dégradation d'ATRX.

Le mécanisme intrinsèque exact d'inhibition du VHS-1 par les corps ND10 n'est pas complètement élucidé. Ces corps sont un assemblage complexe et dynamique qui change selon le contexte et même selon le type cellulaire, ce qui ajoute un niveau de complexité. À l'heure actuelle, il semble que les ND10 puissent avoir des fonctions opposées dans la réplication du VHS-1. Par exemple, l'histone acétyltransférase CLOCK se localise aux corps ND10 et sa présence est favorable à la réplication virale (Kalamvoki *et al.*, 2010). Aussi, PML pourrait également avoir des fonctions bénéfiques pour la réplication virale. Dans une étude récente, l'abolition de l'expression de PML a un effet positif sur la réplication virale, selon la multiplicité d'infection utilisée (Xu *et al.*, 2016). Une autre étude récente relève aussi un effet pro-viral de PML (Merkl *et al.*, 2018). Il semble que la méthode utilisée pour éliminer l'expression de PML et le type cellulaire employé peut affecter quel(s) isoforme(s) de PML sont effectivement ciblés. D'autres études focalisées sur des isoformes définis pourront permettre de confirmer, ou d'infirmer, le double rôle des corps ND10.

Les corps ND10 peuvent avoir un mode d'action supplémentaire relié à l'interféron. Par exemple, l'isoforme SP100-HMG (qui possède un domaine HMG) participe à l'inhibition de l'expression génique virale en réponse à l'IFN β . D'autres éléments similaires sont présentés dans la revue de Sherer *et al.* (Scherer *et al.*, 2016).

3.2 IFI16

La protéine IFI16 (*Interferon gamma inducible protein 16*) est localisée de façon prédominante au noyau et son expression peut être induite par l'interféron. Malgré ce que son nom indique, IFI16 est également exprimée de façon constitutive. Le facteur de transcription AP-1, connu pour son implication dans la croissance et la différenciation cellulaire est important aussi pour cette expression constitutive d'IFI16 (Clarke *et al.*, 2003). Il a été démontré que cette protéine fonctionne comme un senseur d'ADN viral intracellulaire. L'identification de cette fonction a été

possible grâce à son interaction avec une séquence d'ADN du virus de la vaccine connue pour induire une réponse IFN β . Cette étude a ensuite démontré que la diminution de l'expression d'IFI16 par interférence à ARN entraînait un défaut d'induction de la voie IFN β suite à une stimulation avec VHS-1 (Unterholzner *et al.*, 2010).

Une étude subséquente a aussi démontré le rôle anti viral d'IFI16 lors d'une infection par le CMV. Une diminution de l'expression d'IFI16 entraîne non seulement une augmentation de la réplication du CMV, mais aussi du VHS-1 et VHS-2. Plus précisément, la diminution de l'expression d'IFI16 entraîne une plus forte expression des transcrits P et T, sans toutefois affecter les transcrits IP. Cette différence s'explique par le fait qu'IFI16 interfère avec la transactivation des promoteurs P UL44 et UL54 de façon dépendante d'une interaction avec le facteur de transcription cellulaire Sp1 et son site de liaison à l'ADN en aval de ces régions promotrices (Gariano *et al.*, 2012). En contraste avec la fonction de senseur responsable de déclencher la réponse IFN β , cette inhibition du CMV par IFI16 est indépendante d'une réponse IFN β (Gariano *et al.*, 2012).

La diminution de l'expression d'IFI16 n'a cependant aucun effet sur la réplication du Virus de la Stomatite Vésiculaire ni de l'Adénovirus, ce qui a été à l'origine de l'hypothèse d'un effet antiviral plus restreint et possiblement seulement anti-herpétique (Gariano *et al.*, 2012). Cette hypothèse était soutenue par l'implication d'IFI16 dans une réponse contre le KHSV (Kerur *et al.*, 2011). Cependant, une étude subséquente a aussi démontré un effet négatif d'IFI16 sur l'expression à partir d'un plasmide et du génome du SV40, en plus de l'effet attendu sur le VHS-1 (Orzalli *et al.*, 2013). Les chercheurs de cette étude avancent l'hypothèse que l'ADN détecté doit être dépourvu de protéines, comme l'est l'ADN du VHS-1 lors de son entrée dans le noyau. Leurs résultats démontrent un effet restrictif sur le génome du SV40 lorsqu'il est transfecté sous forme de plasmide, mais pas lorsqu'il est introduit par le virion. Effectivement, le génome du SV40 est associé avec des nucléosomes et celui de l'Adénovirus avec la protéine virale VII qui lui offre une protection contre une réponse cellulaire (Germond *et al.*, 1975, Karen *et al.*, 2011, Vayda *et al.*, 1983). Cet état de l'ADN pourrait aussi être le moyen de distinction du « soi » et du « non-soi ».

IFI16 possède un NLS qui lui permet d'accéder au noyau, cependant une acétylation de ce NLS par l'HAT p300 permet sa localisation au cytoplasme. Cela explique que la détection

d'ADN au sein du cytoplasme a été décrite, malgré que la détection de l'ADN du VHS-1 par IFI16 a été démontrée au noyau (Li *et al.*, 2012, Unterholzner *et al.*, 2010). Effectivement, une version d'IFI16 comportant un NLS muté perd sa capacité à lier l'ADN génomique du VHS-1 lors d'une infection (Li *et al.*, 2012).

IFI16 altère l'état de la chromatine du VHS-1, ce qui entraîne une diminution de l'expression virale. Les résultats de cette étude montrent qu'après avoir diminué l'expression d'IFI16, la quantité de H3K4me3 sur les promoteurs viraux est augmentée alors que celle de H3K9me3 est réduite (Orzalli *et al.*, 2013). Ces résultats ont été obtenus lors de l'infection par un virus déficient en ICP0. Cela suggère donc qu'ICP0 contrecarre normalement ce mécanisme antiviral intrinsèque d'IFI16. Ce laboratoire a en effet montré auparavant qu'ICP0 est responsable de dégrader IFI16 de façon dépendante du protéasome, ce qui empêche l'activation d'une signalisation interféron. (Orzalli *et al.*, 2012). Un autre groupe a cependant obtenu des résultats montrant qu'ICP0 ne semble pas impliqué dans la dégradation d'IFI16 (Cuchet-Lourenco *et al.*, 2013). Cette différence pourrait être expliquée par les différents types cellulaires utilisés, pour qui l'importance d'ICP0 dans la réplication virale varie.

Une étude ultérieure a démontré que le mécanisme d'IFI16 responsable de cet effet n'est pas relié à l'interféron. Les résultats montrent qu'IFI16 entraîne une réduction du titre viral, même après avoir déplété ASC, une protéine adaptatrice de l'inflammasome, et IRF-3, un facteur de transcription de la voie interféron qui est activé par IFI16. Une immunoprécipitation de la chromatine a révélé qu'IFI16 était présente à certains promoteurs géniques du VHS-1. De plus, l'absence d'IFI16 entraîne une plus grande association de l'ARN polymérase II et d'Oct-1 à ces promoteurs ainsi qu'une plus grande présence de H3K4me3 corrélée avec une plus faible quantité de H3K9me3 (Johnson *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que la diminution de la production de transcrits viraux par IFI16 se produit dès le début de l'infection; à partir du génome viral entrant (Merkl *et al.*, 2018).

L'ensemble de ces résultats prouve qu'IFI16 démontre les caractéristiques d'un facteur antiviral intrinsèque, en plus de ses capacités de senseur d'ADN inducteur d'une réponse interféron. Les éléments d'IFI16 reliés à l'aspect interféron sont décrits plus en détails dans les revues de (Chan *et al.*, 2016, Christensen *et al.*, 2017).

4 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

L'origine de ce projet est l'observation de la relocalisation de plusieurs protéines nucléolaires suite à l'infection par le Virus Herpès Simplex 1. En particulier, des résultats de notre laboratoire avaient montré une relocalisation de la protéine nucléolaire Upstream Binding Factor sous forme de points, à des sites non-identifiés. Ces points d'UBF sont rapidement incorporés dans les CRV; ce qui a mené à une hypothèse d'utilisation d'UBF par le virus à des fins provirales. Par exemple, pour favoriser la réplication du génome comme c'est le cas chez l'Adénovirus, ou comme d'autres protéines nucléolaires relocalisées favorisent aussi la réplication virale.

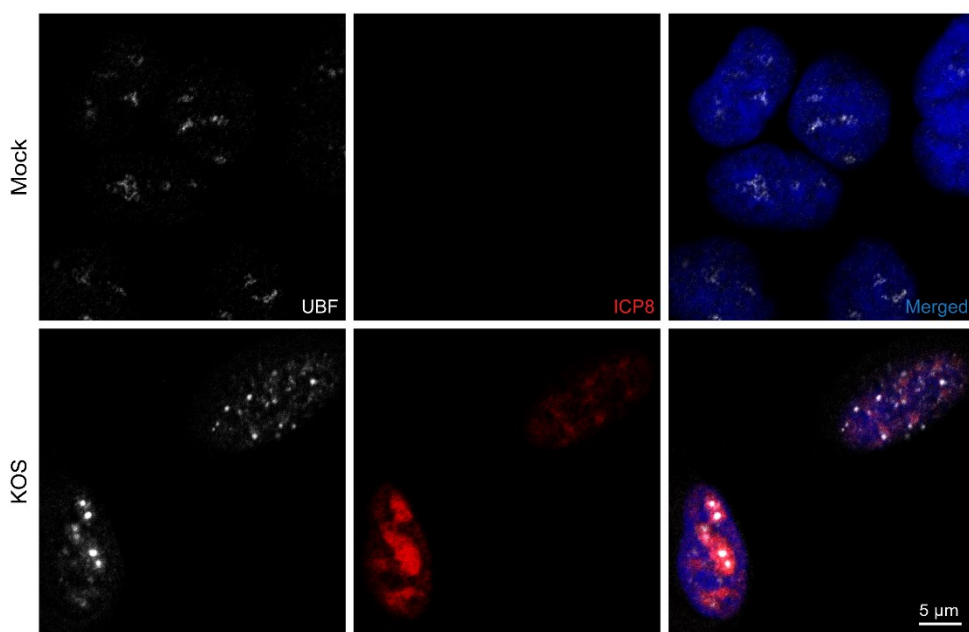


Figure 11 : Relocalisation d'UBF au noyau sous forme de points suite à l'infection.

Des cellules HeLa ont été infectées avec le virus de type sauvage ou non. Après cinq heures, les cellules ont été fixées et marquées par immunofluorescence. La rangée du haut montre les cellules non-infectées (Mock) et la rangée du bas les cellules infectées par le VHS-1 (KOS). La colonne de gauche montre le marquage de la protéine cellulaire UBF en blanc et la colonne du centre montre le marquage de la protéine virale ICP8 en rouge qui identifie les compartiments de réplication virale. La colonne de droite montre la superposition des marquages; qui inclue celui du noyau en bleu.

Trois observations clés ont été faites. Premièrement, la relocalisation initiale d'UBF se fait ailleurs qu'aux CRV. Deuxièmement, la réplication de l'ADN viral s'initie ailleurs qu'au points d'UBF. Troisièmement, les résultats d'un autre groupe de recherche montrent qu'une expression ectopique d'UBF réduit le nombre de plages virales à partir de cellules transfectées avec de l'ADN viral. Ces résultats émettent donc un doute quant à l'utilisation d'UBF à des fins

provirales. Toutefois, la possibilité demeure qu'UBF soit utilisée pour des étapes plus tardives de l'infection, car les points sont toujours présents dans les CRV à des temps tardifs d'infection. La présence tardive de ces points est à l'opposé de ce qui est observé avec les corps ND10, qui ont une fonction antivirale mais qui sont dispersés tôt dans l'infection. Des expériences ont été faites dans notre laboratoire pour déterminer l'identité de ces points, sans succès. Les co-marquages réalisés ont permis d'écarter les domaines VICE (*Virus-Induced Chaperone-Enriched*) et les *splicing speckles*, deux sous-compartiments des CRV (Lymberopoulos *et al.*, 2010).

Le but du projet est donc double; déterminer le rôle d'UBF dans l'infection par le VHS-1 et identifier la nature des points où UBF est relocalisée.

À cette fin, une technique de diminution de l'expression d'UBF par interférence à ARN est utilisée, ainsi que sa surexpression par transfection transitoire. L'information obtenue par la surexpression est double. D'une part, elle est complémentaire au résultat de diminution de l'expression. D'autre part, elle permet de tester l'effet individuel de chacun des isoformes d'UBF sur la réplication virale. Cette modification du niveau d'UBF est préalable à l'infection, qui est évaluée selon plusieurs paramètres.

Ensuite, la microscopie confocale est utilisée dans le but de caractériser la relocalisation d'UBF. Le co-marquage avec différents éléments viraux permet de mieux décrire la suite des événements précoces dans l'infection par rapport à la relocalisation d'UBF et d'identifier une cause de la formation de points.

En terminant, la relation entre UBF et la réplication virale est approfondie en y étudiant l'impact de certaines protéines virales. En particulier, l'impact d'une protéine virale sur la fonction antivirale d'UBF est étudié.

**CHAPITRE DEUX :
UPSTREAM BINDING FACTOR
INHIBITS HERPES SIMPLEX VIRUS REPLICATION**

Titre : Upstream Binding Factor inhibe la réplication du virus de l'Herpès Simplex

Manuscrit publié dans le journal *Virology*

Résumé :

L'infection par le virus de l'Herpès Simplex 1 induit des changements au niveau du noyau de la cellule hôte, incluant la relocalisation de la protéine cellulaire Upstream Binding Factor du nucléole vers les compartiments de réplication virale (CRV). Nous avons testé l'hypothèse qu'UBF est recrutée aux CRV pour promouvoir la réplication de l'ADN viral. Étonnamment, l'infection avec le VHS-1 ou VHS-2 de cellules où le niveau d'UBF est réduit résulte en un titre viral plus élevé comparativement aux contrôles. La réduction de la quantité d'UBF résulte également en une augmentation graduelle de la quantité relative d'ADN viral par rapport aux contrôles. Une augmentation de la quantité des ARNm et des protéines ICP27 et TK est aussi observée, que la réplication de l'ADN viral soit inhibée ou non. Nos résultats suggèrent qu'UBF peut inhiber l'expression des gènes à partir de l'ADN viral avant que ce dernier se réplique. Un effet similaire, mais de magnitude réduite, est aussi observé pour les titres viraux produits lors de l'infection de cellules fibroblastiques de prépuce humain. Ceci est la première démonstration d'UBF ayant un effet restrictif sur la réplication d'un virus.

Contribution des auteurs :

Gabriel Ouellet Lavallée : Conception et réalisation des expériences. Analyse des résultats et création des figures. Rédaction du manuscrit.

Angela Pearson : Conception des expériences. Analyse des résultats. Révision et correction du manuscrit.

UPSTREAM BINDING FACTOR INHIBITS HERPES SIMPLEX VIRUS REPLICATION

Gabriel Ouellet Lavallée¹ and Angela Pearson^{1*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

*Corresponding author:

Angela Pearson

531 boul. des prairies,

Laval, Québec, Canada H7V 1B7

450-687-5010

angela.pearson@iaf.inrs.ca

1 ABSTRACT

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) infection induces changes to the host cell nucleus including relocalization of the cellular protein Upstream Binding Factor (UBF) from the nucleolus to viral replication compartments (VRCs). Herein, we tested the hypothesis that UBF is recruited to VRCs to promote viral DNA replication. Surprisingly, infection of UBF-depleted HeLa cells with HSV-1 or HSV-2 produced higher viral titers compared to controls. Reduced expression of UBF also led to a progressive increase in the relative amount of HSV-1 DNA versus controls, and increased levels of HSV-1 *ICP27* and *TK* mRNA and protein, regardless of whether viral DNA replication was inhibited or not. Our results suggest that UBF can inhibit gene expression from viral DNA prior to its replication. A similar but smaller effect on viral titers was observed in human foreskin fibroblasts. This is the first report of UBF having a restrictive effect on replication of a virus.

Keywords: Herpes simplex virus; Upstream Binding Factor; Viral transcription; Viral DNA replication; Intrinsic antiviral response

2 INTRODUCTION

The nucleolus is involved in many cellular functions, such as ribosome biogenesis, cell cycle regulation, and stress responses [1-3]. The crucial function of transcribing ribosomal RNA genes to serve in ribosome biogenesis is ensured by the RNA polymerase I (PolI) complex. The nucleolar protein Upstream Binding Factor (UBF) is one of the required components to achieve rRNA production. At the extreme N-terminus is a dimerization domain through which UBF can form homo- or heterodimers, while the C-terminus part of the protein contains a stretch of acidic amino acids. The central portion of UBF is composed of six DNA-binding High Mobility Group (HMG) boxes through which it binds to rDNA. This DNA binding aids the recruitment of PolI and pre-rRNA processing components, and activates transcription [4-10]. UBF also promotes rRNA synthesis by stimulating promoter escape and transcript elongation [11,12]. Moreover, UBF regulates rDNA transcription in response to growth factors and cell cycle progression [12-17]. Interestingly, the binding of UBF to DNA does not seem to be restricted to specific nucleotide sequences; UBF may also recognize structural features of nucleic acids [18-20]. The binding of UBF to cellular DNA has the potential to alter chromatin by inducing chromatin remodelling and the formation of looped structures similar to nucleosomes termed “enhancesomes” [21-27]. Two isoforms of UBF, UBF1 and UBF2, are produced by differential splicing [28]. Compared to UBF1, UBF2 has a deletion of 37 amino acids near the end of the second HMG box. This deletion alters the DNA binding characteristics of UBF2, and is believed to affect its role in rDNA transcription regulation [13].

UBF has been shown to be involved in the replication of several viruses (reviewed in [29-31]). For example, hepatitis C virus (HCV) induces the phosphorylation of UBF, which stimulates the formation of the PolI transcription complex leading to increased rRNA production [32,33]. This increase in rRNA is in line with the ability of HCV to promote cell growth and proliferation. Another example is the use of UBF by adenovirus to stimulate viral replication. It has been suggested that the interaction of UBF with the ends of the viral genome promotes its replication [34].

HSV-1 carries out a major part of its replication cycle in the nucleus. The formation of Viral Replication Compartments (VRCs) and the action of several viral proteins induce many changes to the nucleus and nucleolus. Host cell chromatin is marginalized at the periphery of the nucleus [35], ND10 bodies are dispersed, which prevents their inhibition of viral replication [36-40], and rRNA synthesis and maturation is altered [41-43]. Several viral proteins have been shown to localize to, and interact with the nucleolus including US11, ICP0, ICP34.5, UL24 and UL27.5 [44-46]. We have previously reported that the viral protein UL24 induces the diffusion of nucleolin and B23 throughout the nucleus [47,48]. We and others also observed that the nucleolar protein UBF relocates to VRCs [49,50] shortly after the onset of viral DNA synthesis and in conjunction with the PolII subunit RPA194 [50]. The mechanisms involved in this relocation and the functions of UBF in HSV-1 replication are not yet known, although its relocation is independent of UL24. One model that has been proposed is that UBF has a direct role in viral DNA synthesis [49], such as seen in adenovirus replication where UBF is also recruited to VRCs [34]. Given that UBF relocates to VRCs, and its DNA-binding properties, we hypothesized that UBF is involved in the replication of HSV-1. To test this hypothesis, we used an siRNA approach to knock-down the expression of UBF. We subsequently infected knocked-down cells, and assessed the impact on viral replication.

3 MATERIALS AND METHODS

3.1 Cells and viruses

HeLa and HFF cells were plated at a density of 2×10^4 cells/cm² the day prior to experiments. HeLa cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) containing the antibiotics penicillin and streptomycin and 8% fetal bovine serum (FBS). HFF cells were cultured in DMEM containing the antibiotics penicillin and streptomycin and 10% FBS. Vero cells were cultured in DMEM containing 5% newborn calf serum (NCS) and the antibiotics penicillin and streptomycin. All cells were maintained at 37°C with 5% CO₂. The HSV-1 strain KOS and the HSV-2 strain HG-52 were originally provided by Donald M. Coen (Harvard Medical School). Multiplicities of infection (MOI) are presented based on titers obtained in Vero cells. An MOI of 0.5 was used in infection of HFF and Vero cells to reflect the lower effective MOI in HeLa cells. Where indicated, PAA treatment consisted of 300µg/mL in culture media.

3.2 Western blotting

Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and lysed in 150 μ L of RIPA lysis buffer (500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 50 mM Tris [pH 7.5]). Protein lysates were resolved by SDS-PAGE with an acrylamide concentration of 10%, and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for blotting (Immobilon-P; Millipore). Antibodies directed against the following proteins were used: UBF (mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology), γ -Tubulin (rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich), ICP8 (mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology), TK (mouse monoclonal, produced by William Summers, Yale), ICP27 (mouse monoclonal, Fitzgerald, #10-H44), HSV-1 (rabbit polyclonal, Abcam) and gC (mouse monoclonal, Fitzgerald). Anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories) or anti-rabbit (Bethyl) secondary goat antibodies conjugated to horseradish peroxidase were used.

3.3 siRNA transfections

siGenome non-targeting siRNA pool and siGenome UBF-targeting siRNAs were purchased from Dharmacon and resuspended according to the manufacturer's protocol. Transfections were carried out using 2 μ L of DharmaFECT 1 transfection reagent per well for 12-well plates, or 4 μ L per well for 6-well plates. HeLa and HFF cells were transfected with a final concentration of 25 nM of siRNA. Stealth siRNA targeting UBF and negative control were purchased from Invitrogen—Life Technologies. Transfections were carried out according to the manufacturer's protocol using 2 μ L of Lipofectamine 2000 transfection reagent per well for 12-well plates. HeLa cells were transfected with a final concentration of 40 nM of siRNA. For all siRNA transfections, transfection media was replaced with culture media 8 hours post transfection. Transfected cells were incubated for 48 hours before further use in experiments.

Transfected cells were tested for viability 48 hours post-transfection using the SYTOX Green nucleic acid stain (Invitrogen—Life Technologies). HeLa and HFF cells were stained according to the manufacturer's protocol using a dye concentration of 500 nM.

3.4 DNA extraction, qPCR and RT-qPCR

DNA was extracted from infected cells with the Qiagen Blood and Tissue Kit. qPCR was performed with Clontech SYBR Advantage qPCR Premix using the following primers: *RNaseP* forward 5'-CCT GAA GGC TCT GCG CGG AC, reverse 5'-CAG ACC AAC ACC TCG GCG GG; and *ICP4* forward 5'-CGA CAC GGA TCC ACG ACC C, reverse 5'-GAT CCC CCT CCC GCG CTT CGT CCG. *ICP4* primer sequences have been published previously [51].

RNA extraction was performed with the BioBasic EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-Preps kit. RT-qPCR reactions were done in two steps using the reverse transcription kit iScript cDNA Synthesis and the qPCR mastermix iTaq Universal SYBR Green Supermix from BioRad. The following qPCR primers were used: *GAPDH* forward: 5'-CTT CAC CAC CAT GGA GAA GGC, reverse: 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG; *ICP27* forward: 5'-TAA TTG ACC TCG GCC TGG AC, reverse: 5'-GGG TCT TCC ATG TCC TCG TC; *TK* forward: 5'-CCC AAC GGC GAC CTG TAT AAC, reverse: 5'-CCG GAG GTA AGT TGC AGC AG.

The qPCR reactions were performed on a Corbett Life Science Rotor-Gene 3000 with the Rotor-Gene 6 software. The specificity of the amplified products was confirmed by the analysis of melt curves. Relative quantification of viral genomes and transcripts was done using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [52].

3.5 Confocal microscopy

Cells were processed for indirect immunofluorescence experiments (IF) essentially as described previously [50] using a primary mouse monoclonal antibody to ICP8 (Santa Cruz Biotechnology) and a rabbit polyclonal antibody to UBF (Santa Cruz Biotechnology), as well as secondary antibodies conjugated to Alexa 488 or Alexa 568. Slides were visualized using a Zeiss LSM 780 confocal and an Axio Observer Z1 (63X, N.A. 1.4) microscope with an argon multi-line laser at 458/488/514 nm, a DPSS laser at 561 nm, and a HeNe laser at 633 nm. Confocal images and z-stacks were processed with the Zen Black 2011 software. Figures were assembled using Adobe Illustrator and Photoshop CS5.

4 RESULTS

4.1 Knock-down of UBF causes increased HSV-1 titers

To assess the functional role of UBF during infection in human cells, an siRNA approach to knock-down levels of UBF protein was chosen. HeLa cells were transfected with siRNA targeting the open reading frame of UBF. To eliminate the potential risk of observing off-target effects on either cellular or viral mRNAs, siRNAs from two manufacturers having different targets within UBF were used. The target sites for the four siRNAs from Dharmacon and the three from Invitrogen-Life Technologies are shown in Figure 1. Non-targeting siRNAs from each manufacturer were used as negative controls. The sequences of both the UBF-specific and the non-targeting controls were also checked against the HSV-1 KOS genome. As shown in Figure 1A, all siRNAs target the open reading frame of the three known mRNA transcripts for UBF.

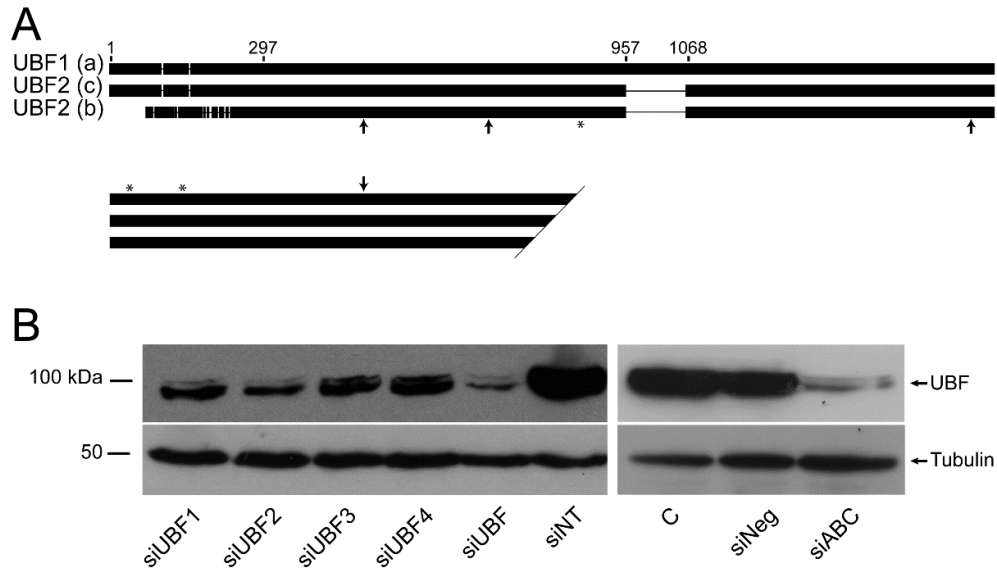


Figure 1. Description of the siRNA approach. (A) Graphic representation showing an alignment of the specific siRNAs with the three known UBF mRNAs. The thick black lines represent the 5' portions of the three different UBF mRNA species. Target sites are indicated with arrows for Dharmacon siRNAs and with asterisks for Invitrogen—Life Technologies siRNAs. All target sites are present on the three UBF mRNA species and fall within the open reading frame, which begins at nucleotide position 297. **(B)** Western blot analysis of UBF levels following siRNA treatment. Dharmacon siRNAs against UBF (siUBF) were tested individually and pooled. Non-targeting siRNAs (siNT) were used as a negative control. Invitrogen siRNAs A, B and C targeting UBF were tested pooled (siABC). Non-transfected cells (C) and cells transfected with non-targeting siRNAs (siNeg) served as negative controls. Cells were transfected with UBF-targeting siRNAs or non-targeting siRNAs for 48 hours prior to analysis. Top panel shows western blot for UBF, bottom panel shows blot for the loading control tubulin. The positions of molecular mass markers are indicated to the left of the panels.

HeLa cells were either non-transfected, transfected with the UBF-targeting siRNAs or else with the appropriate control siRNAs for 48 hours. Nucleic acid staining using SYTOX Green nucleic acid stain showed a viability of more than 85% 48 hours after transfection (data not shown). siRNAs from Dharmacon were tested individually and as a pool for their knock-down efficiency. To confirm the knock-down of UBF expression, protein levels were assessed by western blot (Figure 1B). A successful knock-down was established 48 hours post-transfection in cells transfected with UBF-targeting siRNAs compared to both controls, and the knock-down was more pronounced in cells transfected with pooled siRNAs. For all subsequent experiments, cells were transfected for 48 hours with pooled siRNAs prior to further experimentation. In order to test the importance of UBF for HSV-1 replication, control and transfected cells were infected with the HSV-1 strain KOS at an MOI of 5 for 18 hours, and infectious viral particles (cell-associated and cell-free) were quantified by titration assay on Vero cells. In this, and all subsequent experiments, small variations in titers between control cells and non-targeting controls were not statistically significant. Surprisingly, we found that viral titers were increased approximately ten-fold in UBF-knocked-down cells compared to controls. We obtained similar results using either set of UBF-targeting siRNAs (Figure 2A and B). This increase in infectious particles suggests that UBF might interfere with the viral replication cycle, as opposed to contributing to viral DNA synthesis.

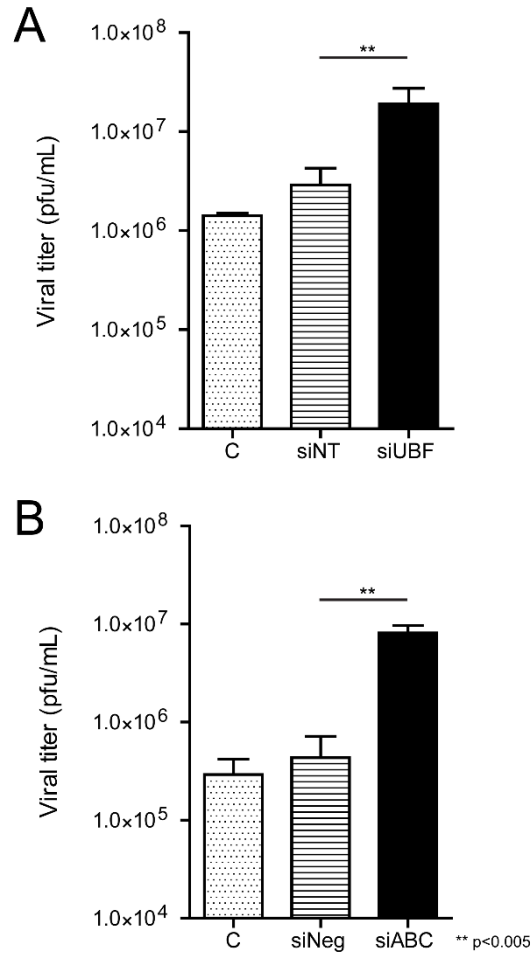


Figure 2. Increased production of infectious viral particles in cells knocked-down for UBF. HeLa cells were non-transfected (C) or transfected as previously described with a pool of non-targeting or UBF-targeting siRNAs from Dharmacon (A) and Invitrogen (B). After 48 hours, cells were infected with KOS at an MOI of 5. Total viral particles were harvested 18 hours post infection and quantified by plaque titration. Error bars represent the standard deviation from the mean of three independent experiments.

To confirm that reducing UBF levels leads to an increase in viral gene products and not only the production of more infectious particles, we tested whether there was an increase in viral structural proteins by western blot. We found that the level of structural HSV-1 proteins was increased in UBF-knocked-down cells compared to controls at 10 and 15 hpi (Figure 3). This result supports the notion that the increase in viral titers observed in cells knocked-down for UBF is the result of an increase in the synthesis of viral gene products.

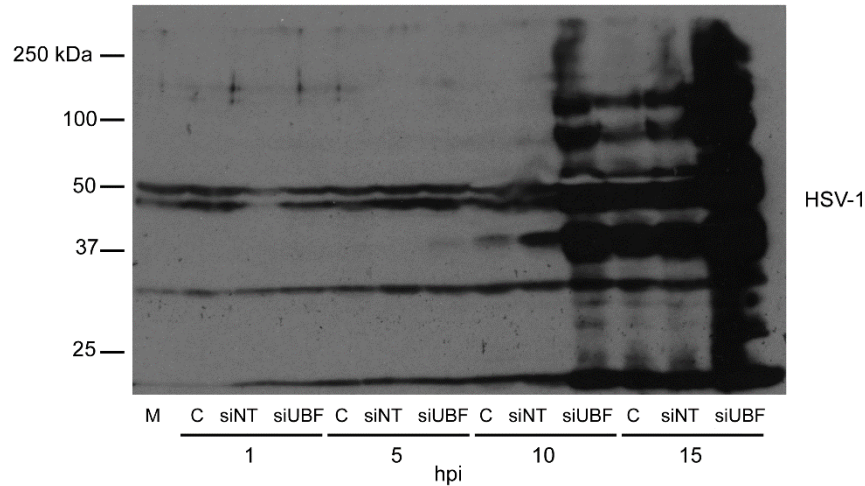


Figure 3. Increased amount of structural proteins in cells knocked-down for UBF compared to negative controls. Cells were non-transfected (C), transfected with non-targeting siRNAs (siNT) or transfected with UBF-targeting siRNAs (siUBF) for 48 hours. Cells were mock-infected (M) or infected with KOS at a MOI of 5. Cell lysates were prepared at the indicated time points. Proteins were analyzed by western blotting using a polyclonal antibody directed against HSV-1 structural proteins.

4.2 Increase in viral DNA synthesis in cells knocked-down for UBF

Based on our results, we next tested the hypothesis that UBF has a negative effect on HSV-1 DNA replication. We used qPCR to quantify viral DNA in cells treated with various siRNAs. Forty-eight hours post-transfection with UBF-targeting or non-targeting siRNAs, cells were infected at an MOI of 5 with KOS. At 1, 5, 10 and 15 hpi, total DNA was extracted and amplified by qPCR. Shown in Figure 4 is the fold increase of viral DNA in UBF-knocked-down cells compared to control cells transfected with non-targeting siRNAs. As expected, at 1 hpi, prior to viral DNA replication, the input genomes were present in similar amounts in UBF-knocked-down and in control cells. We detected a modest increase in the relative amount of viral DNA in UBF-knocked-down cells compared to the control as early as 5 hpi. The increase in the ratio of accumulated viral DNA in UBF-knocked-down cells compared to the control rose in magnitude at 10 and 15 hpi, reaching 6- and 13-fold respectively. To confirm that the observed result was caused by an increase in DNA synthesis and not a reduction in viral DNA degradation in UBF-knocked-down cells, the same experiment was carried out in the presence of the HSV DNA replication inhibitor phosphonoacetic acid (PAA). In the absence of viral DNA replication, the ratio of viral DNA in UBF-knocked-down cells compared to the controls remained stable.

Taken together, these results suggest that UBF hinders rather than promotes viral DNA production, and that this restriction is maintained during the infectious cycle, because the ratio of viral DNA between UBF-knocked-down cells and control cells increased over time.

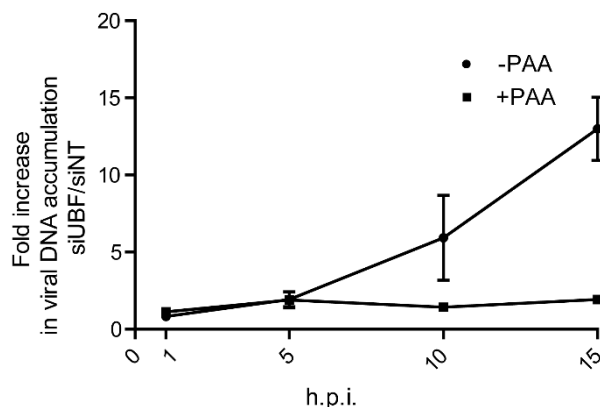


Figure 4. Impact of UBF on viral DNA synthesis during infection. Data points represent fold increase in viral DNA produced in UBF-depleted cells in comparison to the non-targeting control. HeLa cells previously transfected with UBF-targeting or non-targeting siRNAs were infected at an MOI of 5 with KOS, in the presence or absence of PAA. Total DNA was extracted at the indicated time points. Relative quantification was performed by qPCR using primers for the viral gene *ICP4* [51]. The cellular gene *RNAseP* served to normalise the results [67]. Error bars represent standard deviation from the mean of three independent experiments.

4.3 Levels of IE and E viral gene products are affected by UBF

The DNA-binding properties of UBF would be consistent with two hypotheses; the reduction in viral DNA production could be a result of UBF directly hindering viral DNA replication, or it could be an indirect effect due to an inhibitory effect on viral transcription, leading to lower amounts of proteins required for viral DNA replication. To test these hypotheses, we first analysed the effect of UBF on the production of representative immediate-early (IE) and early (E) viral gene products.

The IE protein ICP27 is a multifunctional regulator that plays an important role in regulating expression of proteins including, among others, those required for viral DNA synthesis. TK is encoded by an E gene; it is used in the production of nucleoside triphosphates required for viral DNA synthesis. The early protein ICP8 is the viral single strand DNA-binding protein and is critical for HSV-1 DNA replication. HeLa cells were non-transfected or transfected with non-targeting siRNAs as negative controls, or transfected with siRNAs targeting UBF as described

above. Forty-eight hours post-transfection, cells were infected with KOS at an MOI of 5. Cell lysates were prepared from cells at 5, 10 and 15 hpi and analysed by Western blot (Figures 5A and B). In cells knocked-down for UBF, higher amounts of ICP27, TK and ICP8 compared to controls were detected at 5 hpi by western blot. We concluded that viral IE and E protein accumulation is diminished in the presence of UBF.

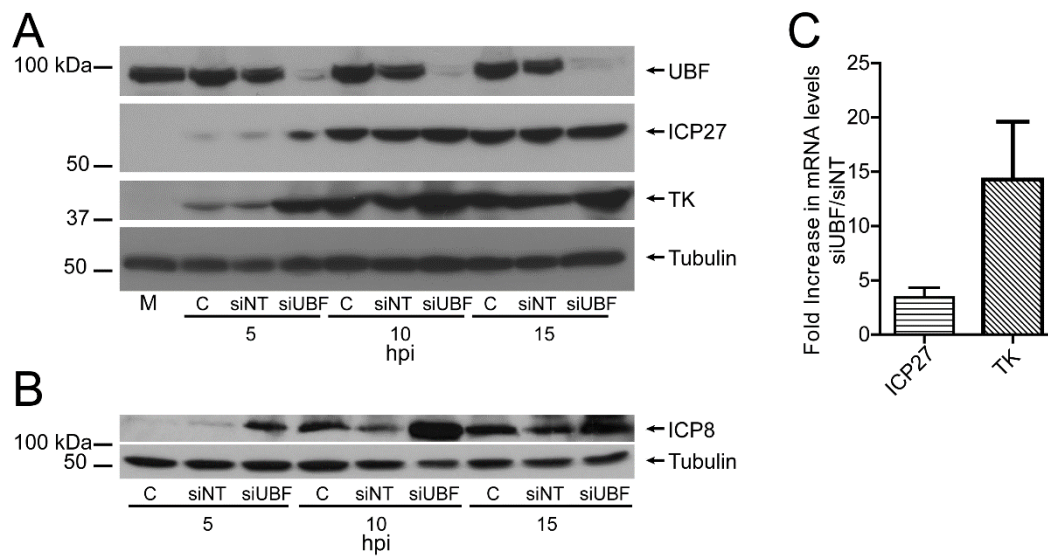


Figure 5. Increased production of immediate-early and early HSV-1 gene products in UBF-depleted cells. HeLa cells were non-transfected (C), or transfected with either the non-targeting (siNT) or the UBF-targeting siRNAs (siUBF). After 48 hours, cells were either mock-infected (M) or infected with KOS at an MOI of 5. **(A)** Western blot analysis of viral protein accumulation in UBF-depleted cells. Cell lysates were prepared at the indicated time points and resolved by SDS-PAGE. The top panel shows UBF levels, and the bottom panel shows tubulin, the loading control. The middle panels show Western blot results for the immediate-early viral protein ICP27 and the early protein TK. **(B)** Western blot showing steady-state levels of the early viral protein ICP8 in HSV-1-infected HeLa cells depleted for UBF. **(C)** Relative quantification of viral transcripts. Total mRNA was extracted at 5 hpi and analysed by RT-qPCR. Bars represent the fold increase in mRNA levels between UBF-knocked-down cells and cells transfected with the non-targeting control. Error bars represent standard deviation from three independent experiments.

To determine whether UBF affected viral protein expression at the transcript level, viral transcripts were quantified by qPCR. HeLa cells were transfected with UBF-specific siRNAs or controls and infected as described above. At 5 hpi, total RNA was extracted and reverse transcribed to cDNA. Relative quantification was done by qPCR and viral transcript levels were normalized with a cellular housekeeping gene (*GAPDH*). Shown in Figure 5C is the relative increase of transcript levels in UBF-knocked-down cells compared to the non-targeting control. In UBF-knocked-down cells, *ICP27* mRNA was increased more than two-fold and *TK* mRNA

was increased approximately fifteen-fold. We concluded that UBF restricts the accumulation of viral transcripts at early times in infection.

4.4 UBF limits the accumulation of viral products from input genomes

Our results showing the increase in IE and E viral gene products could be explained by an effect of UBF on DNA replication, which would affect the number of templates available for viral transcription, or it could be due in part to a direct effect on the input genomes.

To determine if the increase in viral proteins can be detected in the absence of an increase in viral genomes, we treated cells with PAA. Forty-eight hours post-transfection of siRNAs, cells were infected with KOS at an MOI of 5 in the presence of PAA. Consequently, any effect observed in UBF-knocked-down cells would not depend on differences in levels of viral DNA. The effect of PAA was confirmed by the absence of expression of the true-late protein gC (Figure 6A).

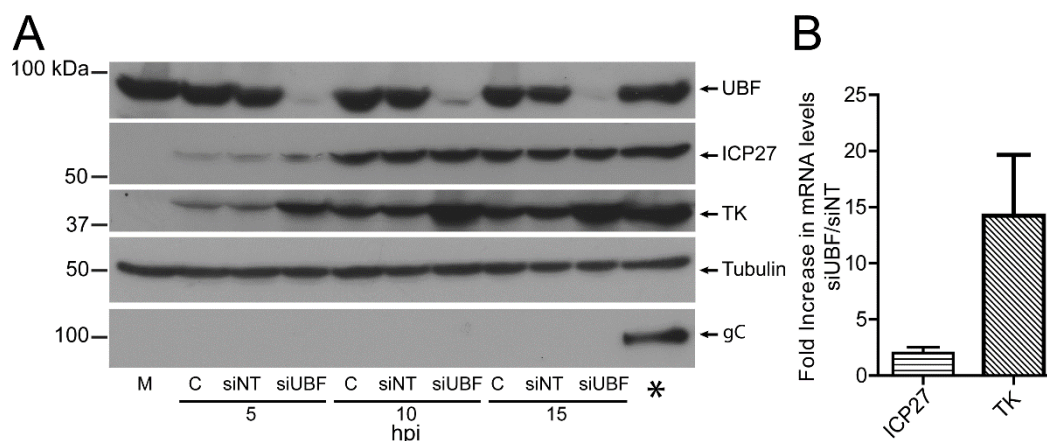


Figure 6. Western blot analysis of viral protein levels in UBF-depleted and PAA-treated cells. HeLa cells were non-transfected (C), or transfected with either the non-targeting (siNT) or the UBF-targeting siRNAs (siUBF). After 48 hours, cells were either mock-infected (M) or infected with KOS at an MOI of 5, then treated with PAA. **(A)** Western blot analysis of viral proteins in UBF-depleted cells treated with PAA. Cell lysates were prepared at the indicated time points and proteins resolved by SDS-PAGE. Staining was done as described in Figure 5A. Staining for the true late viral protein gC served as a control for the inhibition of viral DNA synthesis. The sample labeled with an asterisk originates from the experiment shown in Figure 5A, lane C at 15 hpi and serves as a positive staining control for gC. **(B)** Relative quantification of viral transcripts produced in UBF-depleted cells treated with PAA was done as described in Figure 5B. Error bars represent standard deviation from three independent experiments.

We found that even when blocking viral DNA synthesis, knock-down of UBF expression led to increased amount of ICP27 and TK proteins and transcripts at 5 hpi (Figure 6A and B). Similar results were obtained for the early HSV-1 protein ICP8 (data not shown). Transcript levels were increased approximately two-fold for *ICP27* and almost fifteen-fold for *TK*. From these results, we conclude that UBF negatively affects the levels of IE and E mRNA and proteins produced from the input genomes. We noted that the effect on ICP27 was less pronounced than what we observed when viral DNA synthesis was allowed to proceed. Thus, in our original knock-down experiments, the increase in the levels of viral transcripts and proteins appears to be a combination of a direct effect on the input genomes and an indirect effect due to changes in levels of viral genomes in infected cells. Regardless, even in the presence of PAA there were notably higher levels of TK protein at 5, 10 and 15 hpi, and of *TK* mRNA at 5 hpi (Figure 6). Therefore, we conclude that UBF is able to reduce the accumulation of viral transcripts expressed from the input genomes, independently of an effect on viral DNA replication.

4.5 UBF is redistributed to sites other than pre-VRCs before relocation to VRCs

Because the effect of UBF was detected in the absence of viral DNA replication, and based on our previous observation that viral DNA replication precedes the recruitment of UBF to VRCs, we tested directly whether UBF was recruited to pre-VRCs prior to relocating to VRCs. In addition to HeLa cells (Suppl. Fig. S1), we carried out the experiment in Vero cells (Fig. 7), which have been used extensively to study VRC formation, and in which we were able to better visualize the evolution of these structures early in infection than in HeLa cells. Mock-infected cells or cells at 1, 3, 5, and 7 hpi in the presence or absence of PAA were fixed and processed for IF co-staining of ICP8 and UBF. In both HeLa and Vero cells, UBF redistribution was detected by 3 hpi in the presence or absence of PAA. In HeLa cells, ICP8 staining remained mainly diffuse until 7 hpi when VRCs formed in which UBF staining was observed. In Vero cells, we observed formation of what appeared to be pre-VRCs at 3hpi, and then the growing VRCs. As expected, in the presence of PAA VRC formation was inhibited and ICP8 staining remained diffuse in the nucleoplasm with a few small intense spots detected. 3-D images compiled from Z-stacks revealed that UBF and ICP8 did not colocalize in the absence or presence of PAA in Vero cells at 3hpi (Suppl. Videos S1 and S2). This latter result demonstrates that UBF is

initially redistributed to nuclear subdomains other than pre-VRCs and that HSV DNA synthesis appears to trigger UBF relocalization to VRCs.

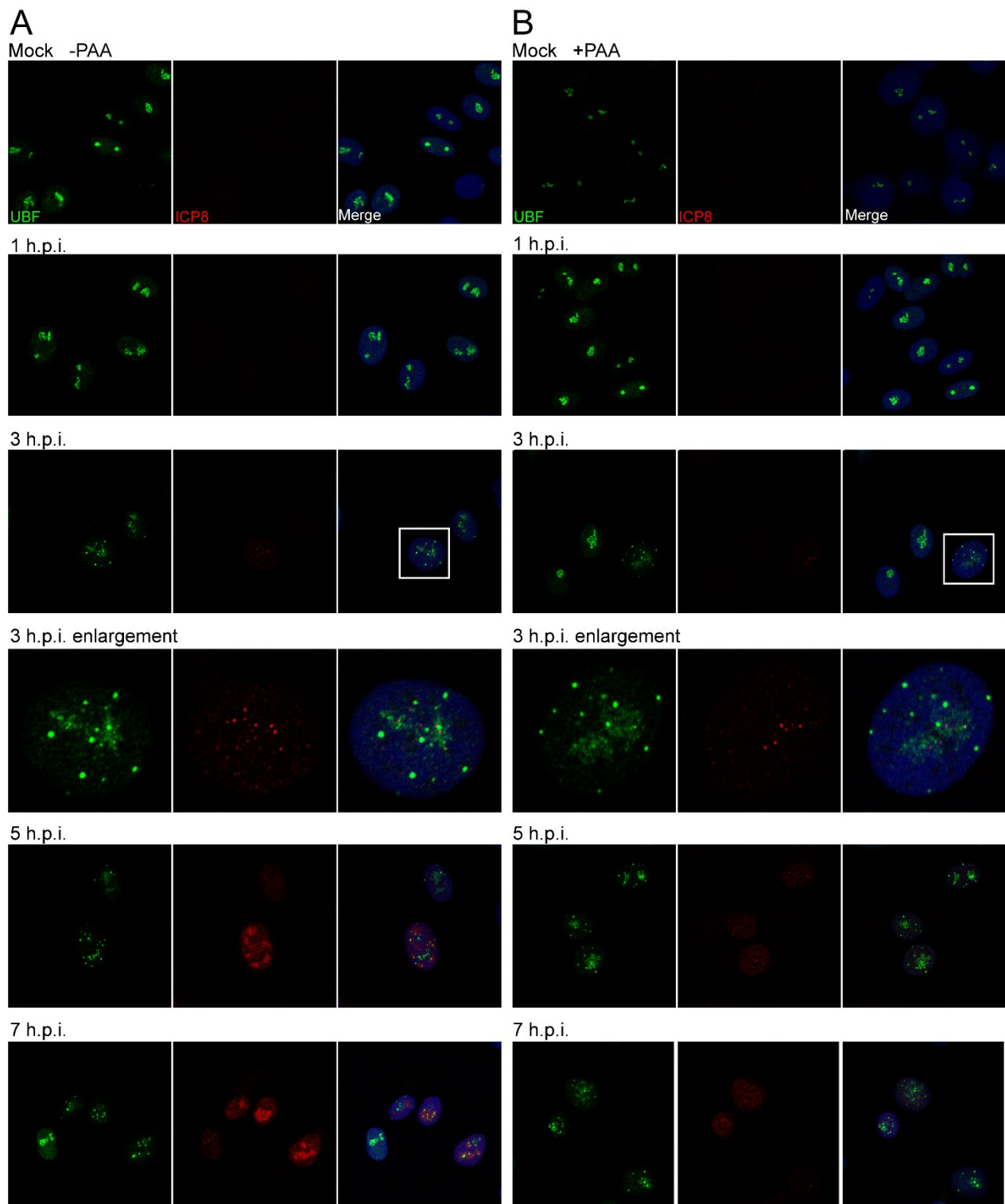


Figure 7. UBF is redistributed to sites other than pre-VRCs before relocation to VRCs in Vero cells. Vero cells were either mock-infected or infected with KOS at an MOI of 0.5 in the absence (A) or presence (B) of PAA. Cells were fixed at the indicated times post-infection, and analyzed by IF to co-stain for UBF (green) and ICP8 (red). Merge images are in the right-hand panel of each set. Nuclei were stained with Draq5 (blue). The fourth row of images represents a close up of the boxed region in the corresponding image from 3 hpi.

4.6 UBF restricts HSV-2 replication

To determine whether the effect of UBF on KOS replication was specific to HSV-1, HeLa cells were transfected as described in previous experiments, and subsequently infected with the HSV-2 strain HG52 at an MOI of 5. Cells were lysed at 18 hpi, and infectious viral particles were quantified by titration assay (Figure 8). In UBF-knocked-down cells, we observed a rise in viral titers for HSV-2 that was similar to that observed for HSV-1. Thus, our results suggest that restriction of viral replication by UBF is not specific to HSV-1, but is a phenomenon that can be generalized to a second human herpesvirus, HSV-2.

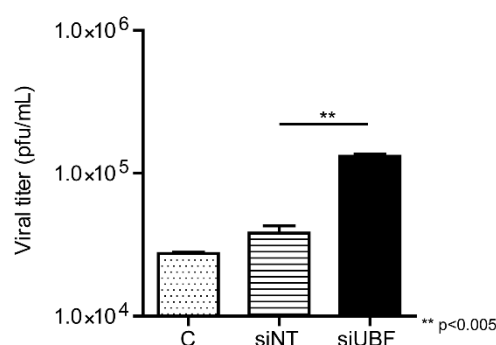


Figure 8. Increased production of HSV-2 infectious viral particles in UBF-depleted cells. HeLa cells were non-transfected (C) or transfected as previously described with a pool of non-targeting (siNT) or UBF-targeting siRNAs (siUBF). After 48 hours, cells were infected with the HSV-2 strain HG52 at a MOI of 5. Total viral particles were harvested 18 hours post infection and quantified by plaque titration. Error bars represents the standard error for two independent experiments.

4.7 UBF affects viral replication in non-transformed cells

We next assessed if the inhibition of viral replication by UBF was limited to HeLa cells by depleting UBF in a non-transformed cell line. The expression of UBF was knocked-down in human foreskin fibroblasts (HFF) as described for the previous experiments, and was confirmed by western blotting (data not shown). We observed a statistically significant increase of more than 45% in viral titers produced from UBF-knocked-down cells compared to non-targeting control cells. The magnitude of the effect on HSV-1 caused by depleting UBF in the non-transformed cells was lower than that seen in HeLa cells. Nevertheless, these results demonstrate that the negative effect of UBF on HSV-1 replication is not limited exclusively to HeLa cells.

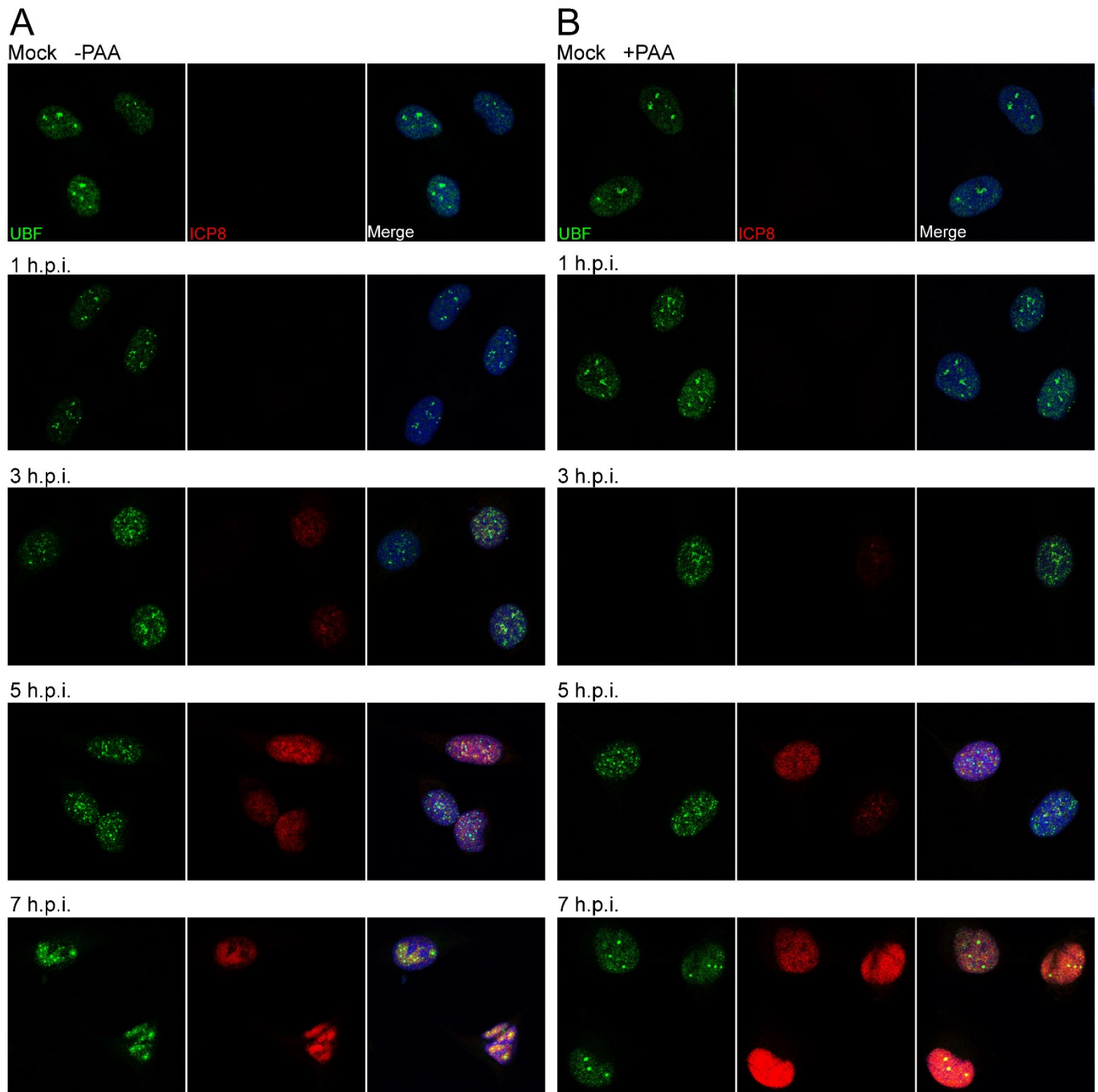


Figure S1. Relocalization of UBF to VRCs in HeLa cells. HeLa cells were either mock-infected or infected with KOS at an MOI of 5 in the absence (A) or presence (B) of PAA. Cells were fixed at the indicated times post-infection, and analyzed by IF to co-stain for UBF (green) and ICP8 (red). Merge images are in the right-hand panel of each set. Nuclei were stained with Draq5 (blue).

5 DISCUSSION

5.1 UBF restricts HSV replication in cell culture

Prior to undertaking this study, it had been proposed that UBF functions either directly or indirectly to promote HSV DNA replication similar to what has been reported for adenovirus DNA replication [34]. It was observed that overexpression of UBF negatively affected HSV-1 origin-dependent DNA synthesis in a co-transfection experiment [49], which was interpreted to reflect the importance of UBF for HSV-1 DNA replication. The relocalization of UBF to foci within viral replication compartments [49,50] was consistent with this model; however, the observation that compartments of DNA synthesis were readily observed prior to relocalization of UBF foci to VRCs suggested that at least early HSV DNA replication does not depend on UBF. Our recent results, including our observation that UBF does not relocalize to pre-VRCs, also do not support a model whereby UBF promotes HSV replication. Rather our data demonstrate that UBF has an inhibitory effect on HSV yield. Our discovery that HSV-1 titers are higher in cells where UBF expression has been reduced via siRNA knock-down was observed using two different sets of siRNAs that target different sites within the UBF ORF. This result strongly suggests that the increase in the production of infectious virus is attributable to the reduction in cellular UBF levels, and not an off-target effect. Furthermore, this impact of UBF on infection is not a peculiarity of the HSV-1 strain used, namely KOS, because we observed the same effect for a different virus, HSV-2. We have also shown that the effect mediated by UBF is present in HFFs, a non-transformed cell line. We noted that the increase in viral titers in UBF-depleted HFFs was not as high as that observed in HeLa cells. Similar disparities between cell lines with regards to host-antiviral responses have been reported in the past, including differences between non-transformed and cancerous cell lines [53]. Thus, we have identified a novel role for UBF in the host response against HSV.

5.2 UBF affects HSV replication at the level of viral mRNA accumulation

We found that reduced levels of UBF led to an increase in the levels of viral gene products. The increase in viral transcripts and proteins appears to be due to at least two factors. When levels of UBF were reduced, we observed a progressive increase in levels of viral DNA. This increase in template DNA would be expected to lead to more viral transcription, which in turn would lead to more mRNA available for translation into viral proteins. It was previously reported that over-expression of either wildtype UBF or fragments of UBF that retain DNA binding domains reduce infectivity of purified HSV DNA [49]. The original interpretation of this experiment was that it demonstrated a biological interaction between UBF and HSV, which supported the model that UBF plays a role in HSV DNA replication. But based on our results, we propose an alternate interpretation, namely that it reflects an intrinsic inhibitory effect of UBF on HSV replication. Although the increase in viral gene products is in part due to an increase in viral DNA synthesis, we also observed an increase in immediate-early and early viral gene expression even in the absence of viral DNA synthesis due to the replication inhibitor PAA. We conclude from these results that UBF negatively affects viral transcript levels originating from input genomes. Previous observations by our laboratory showed that inhibiting HSV-1 DNA replication with PAA does not completely block the relocalization of UBF to VRCs [50], which is also consistent with the model that the UBF can somehow interact with HSV-1 genomes prior to viral DNA synthesis. It should be noted however, that the magnitude of the effect of UBF on HSV protein expression was greater when viral DNA synthesis was allowed to proceed. Thus, we propose that the biological effect of UBF is the combined consequence of reducing viral transcript levels, and of reducing viral DNA synthesis, either directly or indirectly through a reduction in the quantity of viral replication proteins.

5.3 Possible mechanisms of UBF restriction of HSV replication

Given the intrinsic DNA-binding properties of UBF [10,18,54], one possible model for how UBF restricts HSV replication is that UBF binds incoming viral DNA and reduces accessibility both to cellular and viral transcription factors, and to the viral DNA replication machinery. Targeting of incoming viral genomes is the strategy at play in the ND10-based restriction of HSV-1

replication [55-59], and in a growing number of other cellular antiviral responses to HSV [53,60,61]. Because the HSV-1 genome is not in the form of chromatin when packaged into the capsid [62-64], it is easily accessible to DNA-binding proteins upon its release in the nucleus. The nuclear DNA sensor IFN-inducible protein 16 (IFI16) has been shown to relocalize to HSV-1 DNA and replication compartments [60,65,66]. IFI16 depletion promotes HSV-1 gene expression and reduces the accumulation of repressive histone marks [60]. It also limits the association of RNA PolII and of several transcription factors with transcription start sites [66]. Given the characteristics of UBF and the results of this study, it is possible that UBF functions in a similar manner, either independently or in relation with an already identified pathway. As we and others have proposed, UBF may recognize a specific structural feature of HSV DNA. Alternatively, UBF may interact with viral DNA in a non-specific manner.

Future work should address whether UBF interacts directly with HSV DNA, and if so, what parameters govern the interactions. Furthermore, based on studies with herpesviruses and other virus families, we expect that HSV replication occurs despite UBF due to the presence of viral effectors that counter its inhibitory activities, and which remain to be identified. We have demonstrated that the inhibitory effect of UBF extends at least from HSV-1 to HSV-2. It will be interesting to determine if it represents a general inhibitor of herpesvirus replication beyond the simplexviruses.

Acknowledgments

We thank W. Summers (Yale) for the TK antibody. GOL is the recipient of a scholarship from the Fondation Armand-Frappier (FAF). This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 82924) and the Canada Foundation for Innovation (9991) to A.P.

6 REFERENCES

1. Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129: 13-31.
2. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascues J, Lamond AI (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 574-585.
3. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI (2010) The nucleolus under stress. *Mol Cell* 40: 216-227.
4. 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: 847-857.
5. Bell SP, Learned RM, Jantzen HM, Tjian R (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* 241: 1192-1197.
6. Hanada K, Song CZ, Yamamoto K, Yano K, Maeda Y, et al. (1996) RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *EMBO J* 15: 2217-2226.
7. 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: 2872-2879.
8. Prieto JL, McStay B (2007) Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. *Genes Dev* 21: 2041-2054.
9. 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: 50-64.
10. 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: 830-836.
11. Panov KI, Friedrich JK, Russell J, Zomerdijk JC (2006) UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J* 25: 3310-3322.
12. Stefanovsky V, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, Moss T (2006) Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell* 21: 629-639.
13. 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: 5093-5101.
14. Sanij E, Poortinga G, Sharkey K, Hung S, Holloway TP, et al. (2008) UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J Cell Biol* 183: 1259-1274.

15. Voit R, Hoffmann M, Grummt I (1999) Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J* 18: 1891-1899.
16. Stefanovsky VY, Pelletier G, Hannan R, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI, et al. (2001) An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* 8: 1063-1073.
17. Meraner J, Lechner M, Loidl A, Goralik-Schramel M, Voit R, et al. (2006) Acetylation of UBF changes during the cell cycle and regulates the interaction of UBF with RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* 34: 1798-1806.
18. 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: 2651-2657.
19. Kuhn A, Voit R, Stefanovsky V, Evers R, Bianchi M, et al. (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: 416-424.
20. 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: 657-668.
21. Stefanovsky VY, Pelletier G, Bazett-Jones DP, Crane-Robinson C, Moss T (2001) DNA looping in the RNA polymerase I enhancosome is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res* 29: 3241-3247.
22. 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: 6476-6488.
23. Stefanovsky VY, Bazett-Jones DP, Pelletier G, Moss T (1996) The DNA supercoiling architecture induced by the transcription factor xUBF requires three of its five HMG-boxes. *Nucleic Acids Res* 24: 3208-3215.
24. Chen D, Belmont AS, Huang S (2004) Upstream binding factor association induces large-scale chromatin decondensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15106-15111.
25. Stefanovsky VY, Langlois F, Bazett-Jones D, Pelletier G, Moss T (2006) ERK modulates DNA bending and enhancosome structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry (Mosc)* 45: 3626-3634.
26. Sanij E, Hannan RD (2009) The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics* 4: 374-382.
27. Bazett-Jones DP, Leblanc B, Herfort M, Moss T (1994) Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* 264: 1134-1137.
28. 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: 3180-3184.

29. Hiscox JA, Whitehouse A, Matthews DA (2010) Nucleolar proteomics and viral infection. *Proteomics* 10: 4077-4086.
30. Greco A (2009) Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Rev Med Virol* 19: 201-214.
31. Hiscox JA (2002) The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol* 147: 1077-1089.
32. Kao CF, Chen SY, Lee YH (2004) Activation of RNA polymerase I transcription by hepatitis C virus core protein. *J Biomed Sci* 11: 72-94.
33. 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: 2057-2064.
34. 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: 2621-2631.
35. Monier K, Armas JC, Etteldorf S, Ghazal P, Sullivan KF (2000) Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nat Cell Biol* 2: 661-665.
36. 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.
37. Everett RD, Freemont P, Saitoh H, Dasso M, Orr A, et al. (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: 6581-6591.
38. Glass M, Everett RD (2013) Components of promyelocytic leukemia nuclear bodies (ND10) act cooperatively to repress herpesvirus infection. *J Virol* 87: 2174-2185.
39. Tavalai N, Stamminger T (2009) Interplay between Herpesvirus Infection and Host Defense by PML Nuclear Bodies. *Viruses* 1: 1240-1264.
40. Boutell C, Everett RD (2013) Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins. *J Gen Virol* 94: 465-481.
41. 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: 36-46.
42. Besse S, Puvion-Dutilleul F (1996) Distribution of ribosomal genes in nucleoli of herpes simplex virus type 1 infected cells. *Eur J Cell Biol* 71: 33-44.
43. Belin S, Kindbeiter K, Hacot S, Albaret MA, Roca-Martinez JX, et al. (2010) Uncoupling ribosome biogenesis regulation from RNA polymerase I activity during herpes simplex virus type 1 infection. *RNA* 16: 131-140.
44. MacLean CA, Rixon FJ, Marsden HS (1987) The products of gene US11 of herpes simplex virus type 1 are DNA-binding and localize to the nucleoli of infected cells. *J Gen Virol* 68 (Pt 7): 1921-1937.

45. Morency E, Coute Y, Thomas J, Texier P, Lomonte P (2005) The protein ICP0 of herpes simplex virus type 1 is targeted to nucleoli of infected cells. Brief report. *Arch Virol* 150: 2387-2395.
46. Salsman J, Zimmerman N, Chen T, Domagala M, Frappier L (2008) Genome-wide screen of three herpesviruses for protein subcellular localization and alteration of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog* 4: e1000100.
47. Lymberopoulos MH, Pearson A (2007) Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1-induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363: 397-409.
48. 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: 341-348.
49. Stow ND, Evans VC, Matthews DA (2009) Upstream-binding factor is sequestered into herpes simplex virus type 1 replication compartments. *J Gen Virol* 90: 69-73.
50. 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: 4810-4815.
51. 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: 1389-1399.
52. 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: 402-408.
53. Kalamvoki M, Roizman B (2014) HSV-1 degrades, stabilizes, requires, or is stung by STING depending on ICP0, the US3 protein kinase, and cell derivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E611-617.
54. Hu CH, Wang JM, Tseng HB (1998) The first high-mobility-group box of upstream binding factor assembles across-over DNA junction by basic residues. *Biochem J* 333 (Pt 1): 51-56.
55. Ishov AM, Maul GG (1996) The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol* 134: 815-826.
56. Maul GG, Ishov AM, Everett RD (1996) Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* 217: 67-75.
57. Everett RD, Murray J, Orr A, Preston CM (2007) Herpes simplex virus type 1 genomes are associated with ND10 nuclear substructures in quiescently infected human fibroblasts. *J Virol* 81: 10991-11004.
58. 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: 5078-5089.
59. Everett RD, Sourvinos G, Leiper C, Clements JB, Orr A (2004) Formation of nuclear foci of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP4 at early times of infection:

- localization, dynamics, recruitment of ICP27, and evidence for the de novo induction of ND10-like complexes. *J Virol* 78: 1903-1917.
60. Orzalli MH, Conwell SE, Berrios C, DeCaprio JA, Knipe DM (2013) Nuclear interferon-inducible protein 16 promotes silencing of herpesviral and transfected DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E4492-4501.
 61. Ducroux A, Benhenda S, Riviere L, Semmes OJ, Benkirane M, et al. (2014) The Tudor domain protein Spindlin1 is involved in intrinsic antiviral defense against incoming hepatitis B Virus and herpes simplex virus type 1. *PLoS Pathog* 10: e1004343.
 62. Oh J, Fraser NW (2008) Temporal association of the herpes simplex virus genome with histone proteins during a lytic infection. *J Virol* 82: 3530-3537.
 63. Gibson W, Roizman B (1971) Compartmentalization of spermine and spermidine in the herpes simplex virion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 2818-2821.
 64. Pignatti PF, Cassai E (1980) Analysis of herpes simplex virus nucleoprotein complexes extracted from infected cells. *J Virol* 36: 816-828.
 65. Li T, Diner BA, Chen J, Cristea IM (2012) Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10558-10563.
 66. Johnson KE, Bottero V, Flaherty S, Dutta S, Singh VV, et al. (2014) IFI16 Restricts HSV-1 Replication by Accumulating on the HSV-1 Genome, Repressing HSV-1 Gene Expression, and Directly or Indirectly Modulating Histone Modifications. *PLoS Pathog* 10: e1004503.
 67. McNees AL, White ZS, Zanwar P, Vilchez RA, Butel JS (2005) Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. *J Clin Virol* 34: 52-62.

CHAPITRE TROIS :
THE HERPES SIMPLEX VIRUS 1 PROTEIN VP16
BLOCKS TARGETING OF UPSTREAM BINDING FACTOR
TO INCOMING VIRAL GENOMES

Titre : La protéine virale VP16 du virus de l'Herpès Simplex 1 bloque le ciblage d'Upstream Binding Factor aux génomes viraux entrants.

Manuscrit sous révision pour *Journal of Virology*

Résumé :

La protéine Upstream Binding Factor (UBF) est relocalisée du nucléole vers les compartiments de réplication du virus de l'Herpès Simplex 1 (VHS-1) suite à l'infection, ce qui affecte négativement la transcription des gènes viraux (Ouellet Lavallee *et al.*, 2015). Malgré que l'isoforme UBF1 soit principalement impliqué dans la transcription par l'ARN polymérase I, l'isoforme UBF2 semble avoir certains rôles spécifiques au niveau de la transcription par l'ARN polymérase II. Nous avons démontré que malgré ces différences, la surexpression d'UBF1 ou d'UBF2 bloque la réplication du VHS-1 dans des cellules où l'expression d'UBF endogène est diminuée. En utilisant une technique qui combine l'immunofluorescence et l'hybridation *in situ* fluorescente, nous avons démontré qu'UBF colocalise avec l'ADN viral à la fois durant l'infection et en contexte de transfection. L'augmentation de la multiplicité d'infection (MOI) résulte en une réduction significative de la colocalisation entre UBF et le génome viral, ce qui suggère l'implication d'une protéine du tégument. La protéine tégumentaire VP16 est importante pour l'expression des gènes viraux immédiats-précoces. Nous avons découvert que, contrairement à KOS, l'augmentation de la MOI d'un virus dont le domaine de transactivation de VP16 est muté (v422) n'entraîne pas cette réduction de colocalisation entre UBF et le génome viral. Nos résultats soutiennent un modèle selon lequel la protéine du tégument VP16 favorise la réplication du VHS-1 en partie en bloquant le ciblage d'UBF aux génomes viraux entrants.

Contribution des auteurs :

Gabriel Ouellet Lavallée : Conception et réalisation des expériences. Analyse des résultats et création des figures. Rédaction du manuscrit.

Yu Xuan Zhang : Participation à la création des plasmides.

Angela Pearson : Conception des expériences. Révision et correction du manuscrit.

The herpes simplex virus 1 protein VP16 blocks targeting of Upstream Binding Factor to incoming viral genomes

Gabriel Ouellet Lavallée^a, Yu Xuan Zhang^a, Angela Pearson^{a*}

INRS, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec CANADA H7V 1B7^a

Running title: HSV-1 VP16 blocks targeting of UBF to viral DNA

Key words: UBF, VP16, HSV, cellular restriction factor

*Corresponding author:

Angela Pearson

angela.pearson@iaf.inrs.ca

Abstract: 186 words

Importance: 135 words

Text: xx words

1 ABSTRACT

Upstream Binding Factor (UBF) is redistributed from nucleoli to herpes simplex virus 1 (HSV-1) replication compartments upon infection, and negatively affects HSV-1 replication at the level of viral transcription (**Ouellet Lavallee *et al.*, 2015**). The UBF1 isoform is mainly involved in RNAPolII transcription; however, UBF2 appears to have certain roles specific to RNAPolII transcription. Herein, we show that despite these differences, ectopic overexpression of either UBF1 or UBF2 blocked HSV-1 replication in cells depleted for endogenous UBF. Using co-immunofluorescence and fluorescent in-situ hybridization staining, we found that UBF co-localized with HSV DNA both during infection, and upon transfection of viral DNA. Increasing the multiplicity of infection (MOI) significantly reduced co-localization of endogenous UBF with HSV-1 DNA, suggesting that a tegument protein may be involved. The tegument protein VP16 is important for immediate-early gene expression. We discovered that in contrast to KOS, increasing the MOI for a VP16 transactivation mutant, v422, did not result in a significant reduction in viral genomes co-localizing with UBF. Our results support a model whereby tegument VP16 promotes HSV-1 replication in part by blocking the targeting of UBF to incoming viral genomes.

Importance:

Mammalian cells possess antiviral strategies that target viruses early the infection process. In turn, viruses have evolved strategies to overcome these antiviral responses in order to successfully replicate and spread to other cells, and ultimately to other hosts. This study shows that artificially increasing levels of the cellular protein Upstream Binding Factor (UBF) shuts down herpes simplex virus 1 replication. In confocal microscopy experiments, we show that UBF targets the incoming viral genome. Furthermore, we identified a component of the viral particle, the VP16 transcriptional activator, as a viral protein that appears to inhibit the association of UBF with viral DNA. Our results support a model whereby VP16 counters the intrinsic antiviral activity of UBF by inhibiting the associated of UBF with the viral genome. This finding might be exploited to develop new antiviral strategies.

2 INTRODUCTION

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) infection induces profound changes to the subcellular distribution of host nucleolar proteins including the transcription factor Upstream Binding Factor (UBF, also known as Upstream Binding Transcription Factor or UBTF) (**Stow *et al.*, 2009, Lymberopoulos *et al.*, 2010**). We previously demonstrated that reducing levels of UBF has a positive effect on HSV-1 and -2 replication (**Ouellet Lavallee *et al.*, 2015**). Moreover, viral transcript accumulation increases independently of viral DNA replication in HeLa cells knocked-down for UBF. Reducing UBF levels ultimately results in a tenfold increase in infectious particle formation in infected HeLa cells.

UBF is a basal RNA polymerase I (RNAPI) transcription factor that is normally located in the nucleolus. It functions primarily by binding DNA and aiding the recruitment and stabilisation of the RNAPI pre-initiation complex (**Learned *et al.*, 1986, Bell *et al.*, 1988, Jantzen *et al.*, 1990, McStay *et al.*, 1991, Jantzen *et al.*, 1992, Hanada *et al.*, 1996, Hempel *et al.*, 1996, Tuan *et al.*, 1999, Mais *et al.*, 2005, Prieto *et al.*, 2007, Hamdane *et al.*, 2014**), and can also promote promoter escape to stimulate RNAPI transcription (**Panov *et al.*, 2006**). UBF has been shown to regulate rDNA transcription at the elongation phase (**Stefanovsky *et al.*, 2006b**), which is consistent with the observation that UBF can bind DNA not only at the rDNA promoter but throughout the rDNA locus (**O'Sullivan *et al.*, 2002**). Indeed, UBF binds DNA in a sequence-tolerant manner, and can also bind structured nucleic acids such as crossover and cruciform DNA (**Copenhaver *et al.*, 1994, Hu *et al.*, 1994**).

The binding of UBF to DNA results in conformational changes such as the formation of the “enhancesome” whereby the bound DNA is wound into circular loop (**Bazett-Jones *et al.*, 1994, Stefanovsky *et al.*, 1996**), leading to the bending of DNA and the reorganization of chromatin (**Putnam *et al.*, 1994, Hu *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2004, Stefanovsky *et al.*, 2006a, Stefanovsky *et al.*, 2006b, Sanij *et al.*, 2008, Hamdane *et al.*, 2014**).

The *ubtf* gene produces two UBF variants through alternative splicing, resulting in an exon missing from UBF2 compared to UBF1. UBF has often been studied as the combination of both variants, although functional differences between UBF1 and UBF2 have been hypothesized since their discovery (**Hisatake *et al.*, 1991, O'Mahony *et al.*, 1991**). More recently, different

functions and capabilities have been identified for each UBF variant. For instance, UBF1 has been found to be the major variant responsible for the RNA PolII transcription activity normally associated with UBF, and is the sole variant maintaining the open chromatin state of rDNA genes (Smith *et al.*, 1993, Kuhn *et al.*, 1994, Hannan *et al.*, 1996, Hannan *et al.*, 1999, Sanij *et al.*, 2008). In contrast to the dogma of UBF serving solely in RNA PolII transcription, some reports have found interesting evidence of UBF2 intervening in PolIII transcription. Indeed, UBF2, in association with LEF-1, has been reported to enhance PolIII transcription of genes belonging to the beta-catenin pathway (Grueneberg *et al.*, 2003). Independent of UBF1, UBF2 has also been identified as a factor important to maintain histone gene transcription (Sanij *et al.*, 2015). These reports highlight the importance of considering both variants when studying UBF.

After entry in the nucleus, the HSV-1 genome is targeted for chromatinization by cellular histones (Kent *et al.*, 2004, Oh *et al.*, 2008). However, those histones are not spaced regularly and present active transcription marks in a manner dependent of the viral tegument proteins VP16 and ICP0 (Herrera *et al.*, 2004, Gu *et al.*, 2007, Cliffe *et al.*, 2008, Hancock *et al.*, 2010). ICP0 is an E3 ubiquitin ligase that promotes viral transcription early in infection mainly by counteracting cellular intrinsic antiviral defense mechanisms. ICP0 is responsible for the inhibition of IRF3 activation and induction of interferon stimulated genes (ISG) (Eidson *et al.*, 2002, Lin *et al.*, 2004, Orzalli *et al.*, 2012, Taylor *et al.*, 2014). In addition, ICP0 has been shown to degrade ISGs products such as PML and Sp100 (Maul *et al.*, 1993, Everett *et al.*, 1994), both important components for the formation of ND10 bodies (Ishov *et al.*, 1999), and their degradation ultimately leads to the disruption of ND10 nuclear bodies that would otherwise restrict viral replication (Everett *et al.*, 1998, Chelbi-Alix *et al.*, 1999, Chee *et al.*, 2003, Everett *et al.*, 2005, Everett *et al.*, 2006, Everett *et al.*, 2008, Lukashchuk *et al.*, 2010, Glass *et al.*, 2013). Proteomic analyses of extracellular virions have revealed that ICP0 is a minor tegument protein (Loret *et al.*, 2008).

VP16 is a relatively abundant viral tegument protein (Batterson *et al.*, 1983). The most commonly known role ascribed to VP16 is its strong transactivator function that stimulates immediate early gene transcription. After entry in the nucleus, VP16 forms a complex with the cellular factors HCF and OCT-1, that are critical for translocation into the nucleus and binding to a consensus sequence on the viral DNA to induce immediate-early gene transcription (Gerster *et al.*, 1988, Triezenberg *et al.*, 1988a, Triezenberg *et al.*, 1988b, Kristie *et al.*, 1989, Stern *et*

et al., 1989). The C-terminal portion of VP16 contains an acidic activation domain, and is critical for its role of transcription activation (Smiley *et al.*, 1997). VP16 also has other functions not directly related to transcription, such as protecting viral mRNA from the virion host shut-off protein (VHS), and promoting egress and tegument assembly (Smibert *et al.*, 1994, Lam *et al.*, 1996, Mossman *et al.*, 2000, O'Regan *et al.*, 2007). In addition, the VP16 has been reported to counter cellular defenses by preventing IFN- β production (Xing *et al.*, 2013).

Previously, we determined that UBF affects viral transcript accumulation from the input genome independent of viral genome replication. This result suggests that UBF has the ability to interfere at an early time after viral genome entry into the nucleus. Cellular restriction factors are often countered, at least in part, by viral mechanisms. In this report, we tested the hypothesis that the reduction in viral transcript accumulation we previously identified for UBF is specific to one of the two UBF isoforms. Furthermore, we hypothesize that HSV-1 encodes a UBF-counteracting mechanism, likely a structural protein given the early time in infection at which UBF affects viral replication.

3 MATERIALS AND METHODS

Function	#	Direction	Sequence
ORF	1	Forward	5'-CCCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGCCC
cloning	2	Reverse	5'-CCCTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTCTGAGGAGTCC
resUBF	3	Forward	5'-CTATAGGGCGAATTCGGATCCATGAACGGAGAAGCCGACTGC
Segment 1	4	Reverse	5'-CTCGTTTGAGATCTCTACCCATTTGAGCTTGCACATGTCTCC
resUBF	5	Forward	5'-GGGTAGAGATCTCAAACGAGGTGAGGAAGTTCCGTACATTGAC
Segment 2	6	Reverse	5'-CTTTTCCGGGAGTTCTTTATATTTCTTGGACAGAATCTTG
resUBF	7	Forward	5'-ATATAAAGAACTCCCGGAAAAGAAGAAGATGAAATATATTGAG
Segment 3	8	Reverse	5'-CTTTTCGCTTAAGTCATTCCACATTCGGGCCAGCAGGCGG
resUBF	9	Forward	5'-GGAATGACTTAAGCGAAAAGAAGAAGGCCAAGTACAAGGCCCG
Segment 4	10	Reverse	5'-TCCTTGTAGGCGGCCCGGTCTTGGGGAGACAGGCTCTTAAC
resUBF	11	Forward	5'-CAAGACCGGGCCGCCTACAAGGAGTACATCTCCAATAAACGTAAGAG
Segment 5	12	Reverse	5'-TTTAAACAGTCGACTCTAGATCAGTTGGAGTCAGAGTCTGAG
Isoform	13	Forward	5'-ATGCCAAGAAATCGGACATC
screening	14	Reverse	5'-GCTCTGGGTGCTTCTGGATA

Table 1: Primers used in plasmid construction.

3.1 Plasmid construction and transfection

Plasmids coding for UBF1 or UBF2 were constructed by reverse transcription of HeLa mRNA with ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit from New England Biolabs (NEB) (cat# E6560S). Subsequent specific amplification of the UBF open reading frame (ORF) was carried out with Q5 DNA polymerase from NEB (cat# M0491S) using the primers number 1 and 2 of Table 1. The ORFs were then cloned into a mammalian expression vector.

To create a version of UBF1 and UBF2 resistant to siRNA knock-down, segments of the UBF ORF were amplified with primers containing the desired silent mutations at each of the four

specific siRNA binding sites. Between four and seven nucleotides per twenty-one nucleotide siRNA target were changed without altering the amino acid identity. The segments were created with the primers number 3 through 12 of Table 1, using a pool of UBF1 and UBF2 plasmid as template. Segments were designed to contain overlapping ends, which were then assembled back into the mammalian expression vector using the NEBuilder HiFi DNA Assembly kit (cat# E2621S). The resulting products were transformed into DH5 α E. coli. Screening of transformed bacteria was performed by PCR amplification of plasmids with primers number 13 and 14. The siRNA knock-down-resistant versions were named resUBF1 and resUBF2. In addition to identifying positive clones, the PCR amplification served to distinguish resUBF1 from resUBF2 based on the size of the fragment. Plasmids corresponding to resUBF1 or resUBF2 were isolated, and the mutations confirmed by sequencing. DNA sequencing was carried out by the McGill University Genome Québec Center for Innovation.

Plasmid (500 ng) and bacterial artificial chromosome (BAC) DNA (300 ng) transfections were done using Lipofectamine (Life technologies) according to manufacturer's instructions.

3.2 Cells and viruses

HeLa cells were plated at a density of 2×10^4 cells/cm² the day prior to experiments. HeLa cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) containing the antibiotics penicillin and streptomycin and 8% fetal bovine serum (FBS). Vero cells were cultured in DMEM containing the antibiotics penicillin and streptomycin and 5% newborn calf serum (NCS). U2OS cells (provided by James Smiley, University of Alberta) were cultured in DMEM containing the antibiotics penicillin and streptomycin and 10% FBS. All cells were maintained at 37°C with 5% CO₂. Where indicated, phosphonacetic acid (PAA) (Sigma-Aldrich) treatment corresponded to a final concentration of 300 μ g/mL in the culture media.

The HSV-1 strain KOS was originally provided by Donald M. Coen (Harvard Medical School). Stocks were produced and titrated on Vero cells. The v422 strain (**Lam *et al.*, 1996**) was provided by James Smiley (University of Alberta) and stocks were produced and titrated on U2OS cells. The 7134 and 7134R strains, originally created in Priscilla Schaffer's laboratory (**Cai *et al.*, 1989**), were provided by David Davido (University of Kansas). Stocks were produced and titrated on U2OS cells.

3.3 siRNA transfection

siGenome non-targeting siRNA pool (cat# D-001206-13-05) and siGenome UBF-targeting siRNAs (cat# M-020670-01-0010) were purchased from Dharmacon/Fisher scientific, and resuspended according to the manufacturer's protocol. Transfections were carried out using 2 μ L of DharmaFECT 1 transfection reagent (cat# T-2001-02) per well for 12-well plates. HeLa cells were transfected with a final concentration of 25 nM of siRNA. Transfection media was replaced with culture media 8 hours post transfection. Transfected cells were incubated for 48 hours before further use in experiments, or 24 hours before plasmid transfections where indicated.

3.4 Western blotting

Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and lysed in 150 μ L of RIPA lysis buffer (500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 50 mM Tris [pH 7.5]). Protein lysates were resolved by SDS-PAGE with an acrylamide concentration of 10%, and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for blotting (Immobilon-P; Millipore). Antibodies directed against the following proteins were used: UBF (mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology), γ -Tubulin (rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich), TK (mouse monoclonal, generously provided by William Summers, Yale). Anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories) or anti-rabbit (Bethyl) secondary goat antibodies conjugated to horseradish peroxidase were used. Signal was detected by chemiluminescence using Clarity Western ECL Substrate from Bio-Rad (cat#1705061).

3.5 Immunofluorescence

For indirect immunofluorescence experiments (IF), cells were processed essentially as described previously (**Lymberopoulos *et al.*, 2007**). Primary mouse monoclonal antibody against ICP8 (Santa Cruz Biotechnology) and a rabbit polyclonal antibody against UBF (Santa Cruz Biotechnology), as well as goat secondary antibodies conjugated to Alexa 488, Alexa 568 or Alexa 647 (Invitrogen) were used. Analyses of infected cells were carried out at 5 hpi.

3.6 Fluorescent in situ hybridization (FISH)

The probe for FISH was produced by using 1 µg of BAC_KOS DNA as template to avoid any mammalian cellular DNA labeling. dUTP-aminoallyl-ATTO565 from Jena Bioscience (cat# NU-803-565) was incorporated at a 1:3 ratio with dTTP in a random-primed amplification using the High Prime DNA labelling kit from Roche (cat# **11585584001**). The resulting product was ethanol precipitated then resuspended in water. HeLa cells grown on coverslips were fixed in 2% PFA for 10 minutes, then processed as per the IF protocol, with the omission of the Hoechst 33342 staining of chromatin. All wash and incubation steps were carried out at room temperature unless indicated otherwise. Cells were fixed again in 0.5% PFA for 10 minutes, then washed in PBS two times for 5 minutes. Coverslips were treated in a solution of 95% ethanol and 5% acetic acid for 5 minutes at -20°C, then washed three times in PBS for 5 minutes, followed by a 15 minutes incubation in 0.5% Roche blocking reagent diluted in PBS (from 10% stock prepared as per manufacturer's instructions, cat# 11096176001). Coverslips were washed again three times in PBS for 5 minutes.

Coverslips were placed cell-side down on a glass plate over a 20 µL drop of pre-hybridization solution (50% formamide, 4X SSC, 6% dextran sulfate, 0.1 µg/µL single stranded DNA from salmon testes from Sigma [cat# **D7656**]), and incubated in a humid chamber for 30 minutes at 37°C. Coverslips were transferred to a second glass plate and placed over a 20 µL drop of hybridization solution (pre-hybridization solution with 1.25 ng/µL labeled probe), heated for 2 minutes at 98°C, then the glass plate was placed in a humid chamber for incubation at 37°C overnight.

Coverslips were placed in a cell culture plate, cell side up, for the following 5-minute washes with agitation: 2X SSC at 60°C, 8X SSC at 60°C, 2X SSC at RT, 0.5X SSC at RT, PBS at RT. Chromatin was stained with Hoechst 33342 in PBS at a 1:10 000 dilution for 10 minutes, then coverslips were washed with PBS for 5 minutes. The coverslips were then mounted on glass slides with ProLong Gold antifade reagent from Thermo Fischer (cat# P36934).

3.7 Confocal microscopy and image analysis

Slides were visualized using a Zeiss LSM 780 confocal and an Axio Observer Z1 (63X, N.A. 1.4) microscope with an argon multi-line laser at 458/488/514 nm, a DPSS laser at 561 nm, and a HeNe laser at 633 nm. Confocal images and z-stacks were processed with the Zen Black 2.3 sp1 software. For FISH staining experiments, Z planes were individually analyzed for the nuclear presence of viral genomes and their association with UBF foci. The publication figures were created by combining nucleus-positive Z planes into a 2D image. For individual genome observation, signal intensity was adjusted with ZEN Black SP2.3 sp1 to help produce figures representative of the actual visible staining. Intensity was never altered to add or remove any signal. Final figure assembly was done using Adobe Illustrator. Confocal microscopy experiments were carried out at the INRS-Institut Armand-Frappier confocal microscopy facility.

4 RESULTS

4.1 Either UBF1 or UBF2 is sufficient to inhibit HSV replication.

Given the reported fundamental differences between the two different splice isoforms of UBF, we wished to test if the ability to down-regulate HSV replication was specific to one isoform in particular. Due to the entire UBF2 ORF being comprised within the UBF1 ORF, it is not possible to design siRNA targeting only the UBF2 ORF without targeting UBF1 at the same time. The overlap also limits the available target sites to knock-down UBF1 exclusively. We therefore opted for the strategy of knocking down all endogenous *ubtf* transcripts as we did previously (Ouellet Lavallee *et al.*, 2015), and then expressing an siRNA-resistant form of either UBF1 or UBF2 to study their individual effect. The strategy of introducing silent mutations in the siRNA target sites allowed the creation of siRNA-resistant versions of UBF that retain the wild-type amino-acid sequence. We named those UBF versions resUBF1 and resUBF2 for UBF1 and UBF2 respectively. The primers used are listed in Table 1, and their position relative to the UBF ORF is illustrated in Figure 1a. The nucleic acid mutations and their corresponding translation are listed in Figure 1b.

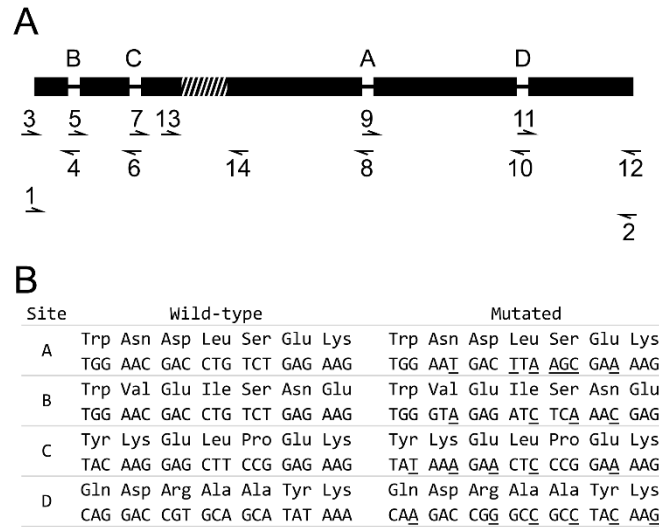


Figure 1. Construction of expression vectors containing siRNA-resistant versions of UBF1 and UBF2.

Positions and direction of the primers used for the construction of resUBF1 and UBF2 are shown in (A). Horizontal black bar represents the ORF of UBF. Thin horizontal lines within the ORF and identified by letters represent the four different siRNA target sites. Diagonally hatched area represents the exon missing from UBF2. (B) Left-hand half column lists the wild-type nucleic acid sequence of the siRNA target sites. Right-hand column shows the silent mutations that were introduced into the UBF ORF—modified nucleotide sequences are underlined. Translation products of both wild-type and mutated sequences are shown above each nucleic acid sequence.

We validated our strategy to selectively complement HeLa cells depleted for UBF by ectopically overexpressing either UBF1 or UBF2 via transient transfection of expression plasmids for each protein prior to infection with HSV-1 (Figure 2). Western blot analysis confirmed the efficient siRNA knock-down of UBF, and the successful expression of resUBF1 and resUBF2, both of which migrated corresponding to their predicted molecular mass. As expected, analysis of viral thymidine kinase (TK) levels showed an increase in the amount of TK protein in the UBF-knocked down cells compared to levels in control cells, as we have reported previously (**Ouellet Lavallee *et al.*, 2015**). We found that overexpression of either resUBF1 or resUBF2 caused a moderate decrease in TK accumulation in comparison with TK levels in UBF-knocked down cells. This result suggests that UBF1 or UBF2 can reduce viral protein accumulation in HSV-1-infected cells.

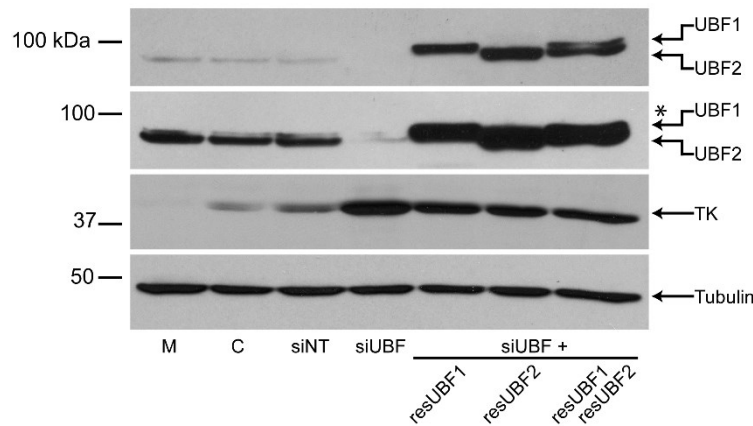


Figure 2. Selective overexpression of either siRNA-resistant UBF1 or UBF2 in HeLa cells.

HeLa cells were non-transfected (C), or transfected with either the non-targeting (siNT) or the UBF-targeting (siUBF) siRNAs. After 24 hours, siUBF-transfected cells were transfected with either the plasmid expressing resUBF1, resUBF2 or both. After another 24 hours, cells were either mock-infected (M) or infected with KOS at an MOI of 5. Cell lysates from 5 hpi were resolved by SDS-PAGE and subjected to Western blot analysis. The top two panels show UBF and resUBF levels, the second panel from the top labeled with an asterisk is a longer exposure of the top panel. The third panel from the top shows the levels of the early viral protein TK. The bottom panel shows tubulin, the loading control. The position of molecular mass markers is indicated to the left of the panels.

Although in our experiments, resUBF levels were higher than endogenous UBF levels (Figure 2), the amount of TK was not reduced to levels at or below those observed in control cells. Consistent with the highly efficient siRNA knockdown of UBF that we regularly observe, we previously confirmed—using fluorescently labelled siRNAs—that virtually 100% of cells receive siRNA under our transfection conditions (unpublished data). We suspected that while

most cells were infected and knocked-down for UBF, only a subset of those cells was transfected with the plasmid expressing resUBF1 or resUBF2. This difference could explain the modest impact on overall TK levels detected by Western blot. To overcome this problem, we processed cells for confocal microscopy at 5 hpi, which allowed us to analyse them individually (Figure 3). Cells were co-stained for the viral single-strand DNA-binding protein ICP8, which is a marker for viral replication compartments (VRCs), and for UBF. We found that the ICP8 staining in the majority of siUBF-treated cells appeared more intense than in the siNT-treated cells, which is consistent with the increase in TK expression observed by Western blot (Figure 2) and with our previous results showing increased viral replication in cells depleted for UBF. Despite the modest decrease in TK expression detected by Western blot, confocal analysis of individual cells detected hardly any ICP8 staining in cells over-expressing resUBF1, resUBF2 or both. Rather, staining for ICP8 and UBF appeared to be mutually exclusive under these conditions. Therefore, the modest decrease in TK levels in Figure 2 is likely due to not all of the cells being transfected with the resUBF plasmids. Thus, consistent with our previous findings that UBF knock-down leads to increased amounts of viral gene products, we found that overexpression of UBF leads to decreased amount of viral gene products and appears to block HSV-1 replication. These results support the conclusion that UBF inhibits viral gene expression, and demonstrate that UBF1 and UBF2 are each sufficient for this activity. As such, for the remaining experiments, UBF refers to the expression of both isoforms.

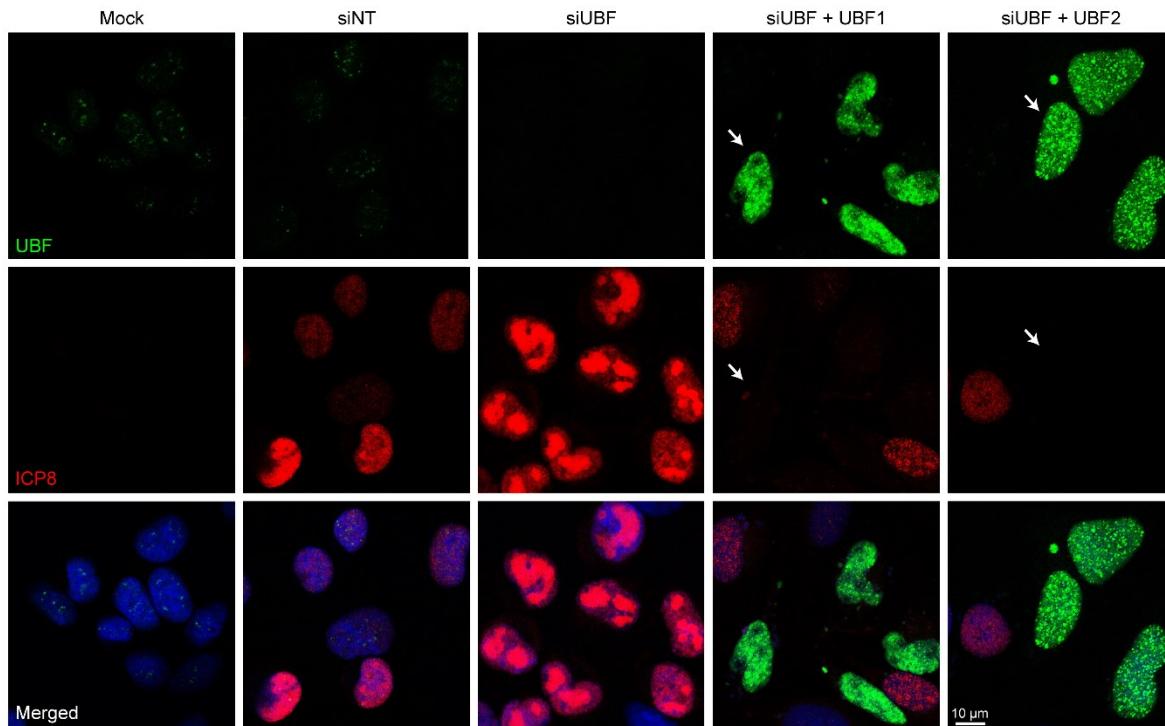


Figure 3. Ectopic overexpression of either UBF1 or UBF2 blocks HSV-1 replication.

HeLa cells were non-transfected (Mock), or transfected with either the non-targeting (siNT) or the UBF-targeting siRNAs (siUBF). After 24 hours, siUBF-transfected cells were transfected with either the plasmid expressing resUBF1 or resUBF2. After another 24 hours, cells were either mock-infected (Mock) or infected with KOS at an MOI of 5. Cells were processed for indirect immunofluorescence at 5 hpi and co-stained for UBF (green, top row) and ICP8 (red, middle row); the nucleus was stained with Hoechst 33342 (blue). The bottom row represents merged channels. Arrowheads show a typical cell in which resUBF1 or resUBF2 is overexpressed and ICP8 staining is weak or not detected. Images shown are representative of the observed cell population in three independent experiments.

4.2 UBF foci are associated with HSV-1 DNA in the absence of viral DNA replication

Upon infection of the host cell, UBF is redistributed from the nucleolus to small foci dispersed in the nucleus that ultimately accumulate mainly in viral replication compartments (**Stow *et al.*, 2009, Lymberopoulos *et al.*, 2010**). Firstly, in an attempt to determine if a specific viral component triggers this redistribution, we transfected the HSV-1 KOS genome cloned in the form of a Bacterial Artificial Chromosome (BAC) into HeLa cells (Figure 4). In this experiment, all cells were treated with phosphonoacetic acid (PAA) to prevent viral DNA replication, thus allowing the observation of input DNA only.

In confocal microscopy experiments, we observed that the redistribution of UBF occurred in cells transfected with HSV-1 BAC DNA (BAC_KOS) in the absence viral DNA synthesis similar to what we observed in PAA-treated infected cells (Figure 4, top row, middle and right-hand panels). Although we cannot exclude the possibility that gene expression from the BAC DNA had an impact on UBF redistribution, we did not detect representative immediate-early (IE) or early (E) proteins by immunofluorescence at 5 hours post-transfection (data not shown). Also of note is the absence of detectable FISH staining in mock-treated cells, which confirms that detected signal in the different panels originates from stained viral DNA. These results suggest that HSV-1 DNA itself is sufficient to trigger UBF redistribution, independent of viral structural proteins.

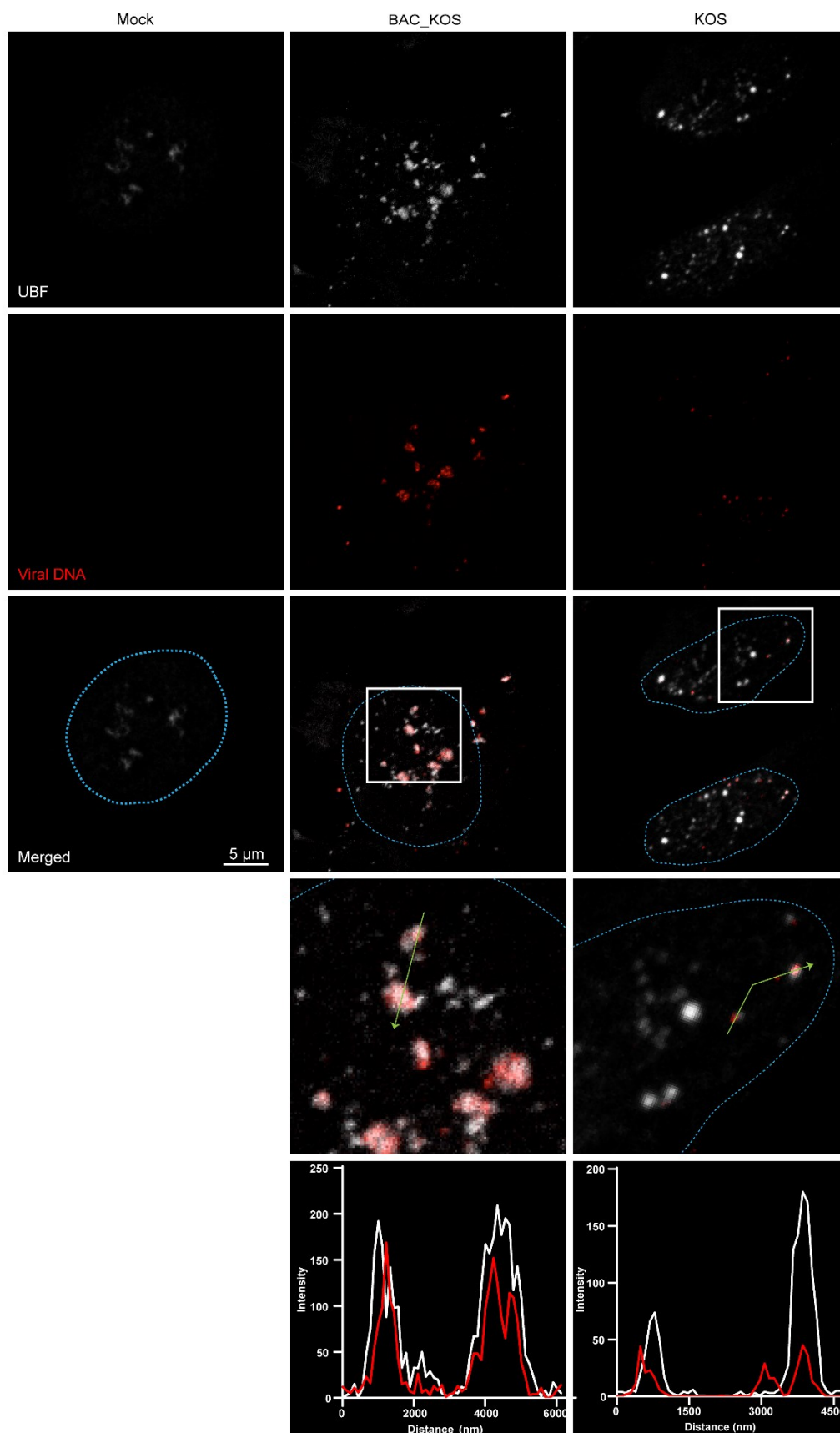


Figure 4. Endogenous UBF co-localizes with HSV-1 DNA both upon infection and upon transfection of a BAC-cloned HSV-1 genome.

HeLa cells were either untreated, infected with KOS at an MOI of 5, or transfected with BAC_KOS DNA. All cells were incubated in medium containing PAA at 300 $\mu\text{g/mL}$. After five hours, cells were processed for FISH staining followed by IF. The top row shows UBF staining, and the second row shows FISH staining of viral DNA either from viral particles (right-hand column) or transfected BAC_KOS DNA (middle column). Third row shows merged channels. Note that the display of chromatin staining was omitted to avoid affecting the visibility of the FISH staining but was used to draw the nucleus outline (blue dotted line). Fourth row is an enlargement of the region delimited by a white square in third row. The green line represents the path of the signal profiles shown in fifth row (UBF signal in white, viral DNA signal in red). The Y-axis represents signal intensity in relative units and the X-axis represents distance in nm.

Secondly, we investigated whether there was co-localization of FISH-stained viral DNA and UBF foci in transfected and infected cells. We observed that in both KOS-infected cells and in BAC_KOS-transfected cells UBF and viral DNA co-localized (Figure 4, bottom three rows). Interestingly, the staining pattern for relocalized UBF in BAC_KOS-transfected cells corresponded almost perfectly to the intra-nuclear FISH staining of the BAC_KOS DNA (Figure 4 middle column). In contrast, in KOS-infected cells, only a proportion of viral DNA co-localized with UBF foci (Figure 4 right-hand column). The illustrated profile path for KOS-infected cells (Figure 4, bottom row, right hand panel) shows a typical situation where two genomes are found to co-localize with a UBF foci, while one is UBF-free. This increase in co-localization of viral DNA with UBF in transfected versus infected cells led us to hypothesize that a structural protein from the virion could inhibit the co-localization of UBF and HSV-1 genomes.

4.3 Increasing the MOI reduces co-localization of UBF with viral DNA

To test the hypothesis that a virion protein affects the association between UBF and viral DNA, we tested the impact of increasing the MOI as a means of increasing the amount of structural proteins present initially in each cell. HeLa cells on coverslips were infected at an MOI of 5 or 20 for 5 hours in the presence of PAA, then co-stained for UBF and viral DNA (Figure 5). When comparing the merged channels for the two different MOI (Figure 5, right-hand column), we observed a greater proportion of UBF-free viral genomes (Figure 5, green arrowheads) in cells infected at an MOI of 20 than in those infected at an MOI of 5. At both MOIs, UBF foci we detected that were devoid of viral DNA staining (Figure 5, yellow triangles), moreover almost all BAC_KOS DNA co-localized with UBF (Figure 4). Thus, we can exclude the possibility that at the higher MOI cellular UBF was saturated with viral DNA, and that there was simply no UBF

available to associate with the increased number of viral genomes at the higher MOI. Rather, this result is consistent with the existence of a virion protein that functions to prevent the co-localization of UBF with viral genomes.

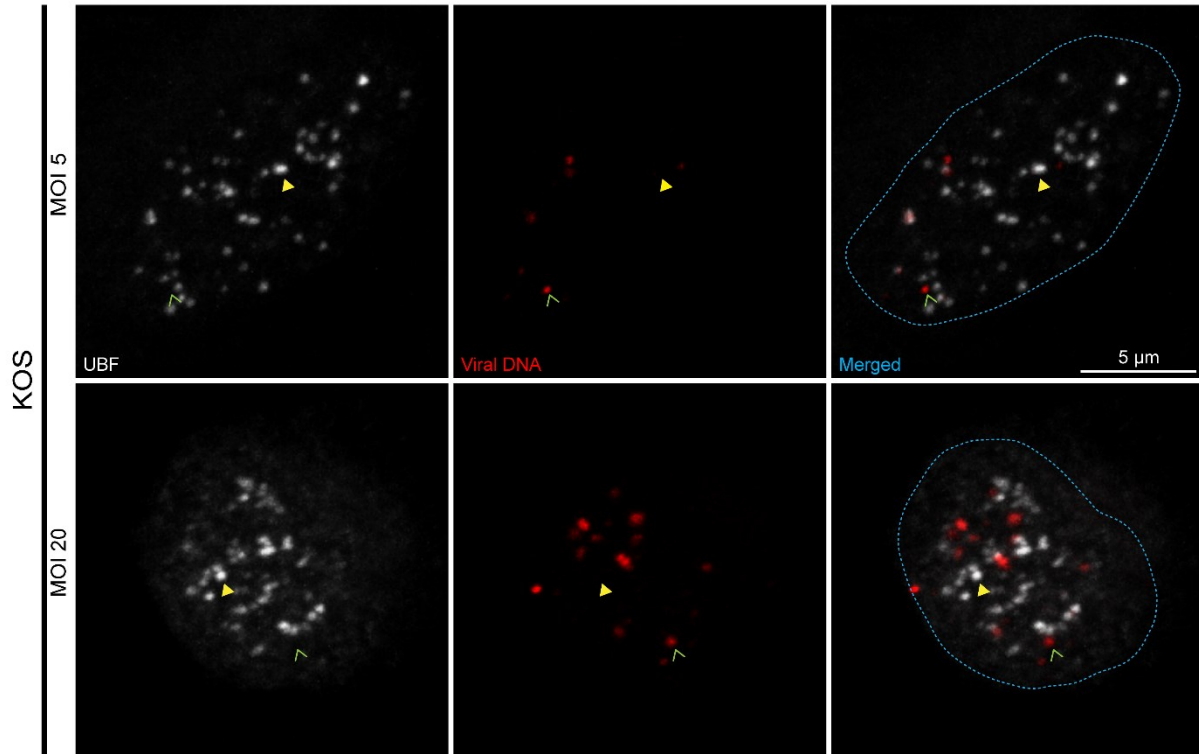


Figure 5. Increasing the MOI reduces co-localization of UBF with viral DNA.

HeLa cells were infected with KOS at the indicated MOI and treated with PAA at 300 µg/mL. At 5 hpi cells were processed for FISH staining followed by IF. Left-hand column shows UBF staining (white) and middle column shows viral genome staining (red). Right-hand column shows merged channels where chromatin staining was used to draw the nucleus outline (blue dotted line). Green arrowheads point at an example of a UBF-free viral genome and yellow triangles point at an example of UBF foci where viral DNA is absent.

4.4 Absence of ICP0 does not affect the inhibition of viral replication by UBF

ICP0 is a minor HSV-1 structural protein that counters multiple cellular host antiviral defenses (Loret *et al.*, 2008, Boutell *et al.*, 2013, Lanfranca *et al.*, 2014). In an attempt to determine if it also counters the inhibition by UBF, we infected control and UBF knocked-down HeLa cells

with an ICP0-null virus (7134) and its rescue virus (7134R). We hypothesized that if ICP0 counteracts the process by which UBF restricts viral replication, we would expect an ICP0-null virus to be severely affected by the presence of UBF, more so than its rescue virus which possesses ICP0. The expected result would be a greater difference in viral replication between the control cells and the UBF knocked-down cells for 7134 than for the rescue virus 7134R. Such a phenomenon has been described by Lukashchuk and colleagues when studying ICP0 and the cellular restriction factor ATRX (**Lukashchuk *et al.*, 2010**). We did not, however, observe this phenomenon with UBF. Although we observed reduced viral titers for the ICP0-null strain compared to the rescue under the different conditions tested, the increase in viral titers between control and UBF-knocked-down cells was not greater for 7134 than for the 7134R (Figure 6). Therefore, the absence of ICP0 did not render 7134 more susceptible to UBF than 7134R. From this evidence it seems unlikely that ICP0 counters the UBF-mediated inhibition of viral replication.

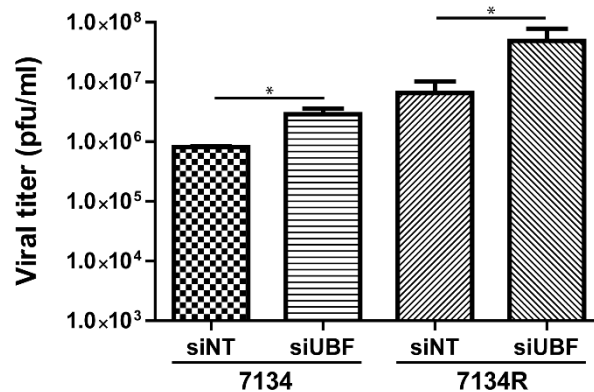


Figure 6. ICP0 does not affect inhibition of HSV-1 replication by UBF.

HeLa cells were transfected as previously described with a pool of non-targeting or UBF-targeting siRNAs. After 48 hours, cells were infected with the ICP0-null virus 7134 or the rescue virus 7134R at an MOI of 5. Total infectious viral particles were harvested 18 hpi and quantified by plaque titration on U2OS cells. Error bars represent the standard deviation from the mean of three independent experiments.

4.5 Increasing the MOI renders viral replication less susceptible to restriction by UBF

Another HSV-1 virion component is the transactivator VP16. We attempted to carry out a viral replication experiment similar to what we did with ICP0 comparing a VP16 activation domain (VP16AD) mutant (v422) to the wildtype strain KOS. V422 is a strain in which the acidic activation domain is rendered non-functional due to a C-terminal deletion beginning at amino acid 422 (**Lam *et al.*, 1996**). Figure 7a shows the viral titers obtained for KOS and v422 under our standard infection conditions. As expected, viral titers were approximately one log₁₀ higher in UBF-knocked-downed cells compared to control for the KOS virus. However, there was no significant difference between viral titers in UBF-knocked-downed cells and control cells infected with the v422 virus. We suspect that the severe replication defect associated with the VP16AD mutation hinders replication to a point where lifting other restrictions on viral replication has no observable impact on viral titers. A similar result was obtained comparing KOS and v422 when the MOI was increased to 20.

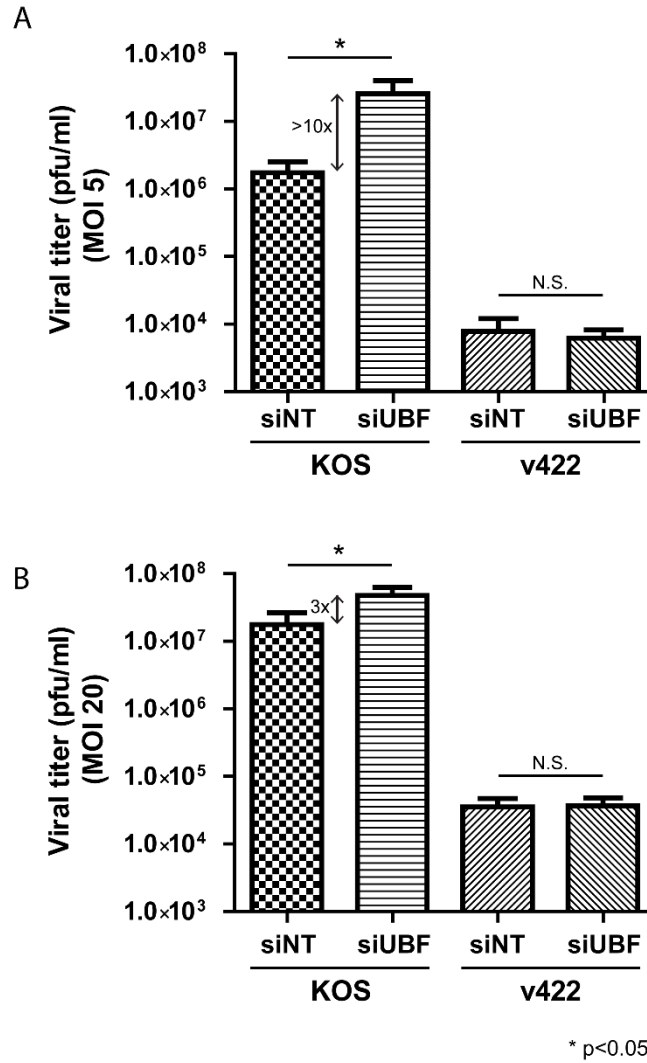


Figure 7. Effect of UBF knock-down on viral titers of a VP16-transactivation domain mutant.

HeLa cells were transfected as described above with a pool of non-targeting or UBF-targeting siRNAs. After 48 hours, cells were infected with **(A)** KOS or v422 at an MOI of 5 or **(B)** KOS or v422 at an MOI of 20. Total infectious viral particles were harvested 18 hours post infection and quantified by plaque titration on U2OS cells. Error bars represent the standard deviation from the mean of three independent experiments.

Interestingly, the increase in viral titers for KOS seen in UBF-knocked-down cells compared to control cells was reduced to approximately three-fold at an MOI of 20 from over ten-fold at an MOI of 5. Thus, in addition to reducing the association of UBF with viral DNA (Figure 5), an increase in MOI appeared to reduce the negative impact of UBF on KOS replication. This result supports the notion that a structural protein counters the effect of UBF on viral titers as well as on its co-localization with viral genomes.

4.6 Impact of MOI on the association of viral genomes with UBF foci is dependant on the VP16 activation domain

Because VP16 affects both early and late events in viral replication, we were not able to evaluate the importance of VP16 in the repression of HSV-1 replication by UBF using viral titers as a read-out (Fig. 7). Therefore, we chose an approach that was independent of the impact of VP16 on late events such as viral egress (**Mossman *et al.*, 2000**). The IF-FISH staining shown above revealed an increase in the detection of UBF-free viral genomes in cells infected with KOS at an MOI of 20 compared to those infected at an MOI of 5 (see Figure 5). We next tested whether the transactivation function of VP16 was important for this effect. We carried out IF-FISH staining for cells infected with the HSV-1 VP16 activation domain mutant v422. Using the same conditions as described for Figure 5, we detected UBF foci in association with v422 genomes (Figure 8a) just as we observed for KOS; however, unlike what we found for KOS, the proportion of UBF-free viral genomes (Figure 8a, green arrowheads) was similar in cells infected at an MOI of 5 or of 20. We quantified the co-localization of viral genomes with UBF foci, and present the results as the average number of UBF-free viral genomes detected in three independent experiments comparing KOS and v422 in parallel (Figure 8b). At an MOI of 5, only approximately 30% of KOS or v422 viral genomes were free of UBF foci (Figure 8a, green arrowheads). In contrast, the proportion of UBF-free KOS genomes increased to approximately 70% in when the infection was carried out at an MOI of 20; however, the proportion of UBF-free v422 genomes remained close to 30% even at the higher MOI. Just as we saw for KOS (Figure 5), even at the higher MOI, UBF foci were detected that were not associated with v422 DNA (Figure 8a, yellow triangles) demonstrating that the UBF pool was not saturated under these conditions. Because the experiments were carried out in the present of the HSV-1 replication inhibitor PAA, these contrasting results suggest that the increased amount of tegument VP16, but not the form with the V422 VP16AD mutation, prevented the co-localization of UBF foci with viral genomes. We propose a model whereby the VP16AD plays a role in preventing UBF from inhibiting of viral replication by somehow blocking the association of UBF with viral genomes.

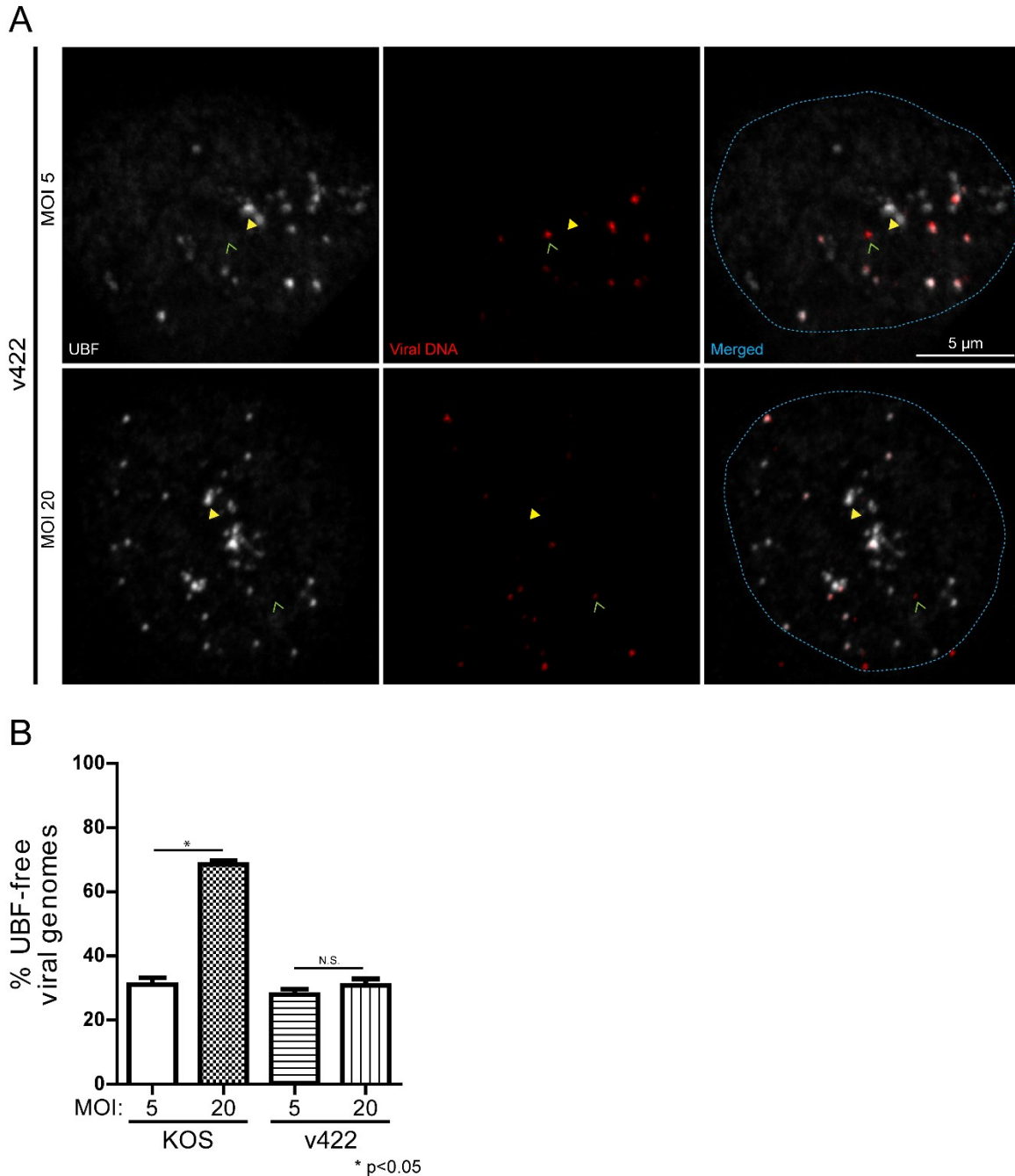


Figure 8. Increasing the MOI for a VP16AD mutant does not increase the number of UBF-free viral genomes. (A) HeLa cells were infected with the VP16 activation domain mutant v422 at the indicated MOI and treated with PAA at 300 $\mu\text{g/mL}$. At 5 hpi, cells were processed for FISH staining followed by IF. Left-hand column shows UBF staining (white) and middle column shows viral genome staining (red). Right-hand column shows merged channels where chromatin staining was used to draw the nucleus outline (blue dotted line). Green arrowheads point at an example of a UBF-free viral genome and yellow triangles point at an example of UBF foci where viral DNA is absent. (B) Percentages were calculated by analyzing genomes from three independent experiments such as the one described in the current figure and Figure 5. Individual Z-planes were used to determine whether or not a viral genome was in association with a UBF foci. Approximately one hundred intra-nuclear viral genomes were analyzed per condition for each independent experiment. Error bars represent standard deviation from the mean.

5 DISCUSSION

5.1 Co-localization of UBF with viral genomes

The use of FISH combined with IF allowed us to carry out single cell analyses to detect individual viral genomes and to ascertain if incoming viral DNA co-localized with UBF foci. BAC_KOS DNA transfection triggered relocalization of UBF, indicating that no viral proteins are necessary for this effect. Likewise, UBF co-localized with transfected BAC_KOS DNA. It is likely that the co-localization of UBF foci with viral genomes is important for UBF to inhibit viral replication.

In our previous study, perhaps counter-intuitively, we noted a general absence of co-localization between relocalized UBF foci and pre-VRCs as defined by staining for the viral single strand DNA-binding protein ICP8 (**Ouellet Lavallee *et al.*, 2015**). Consequently it is interesting to note that in the present study, we consistently detected a subset of viral genomes in cells that co-localized with UBF. Taken together these results lead us to propose a model whereby incoming viral genomes that are targeted by UBF are unlikely to develop into pre-VRC and in contrast, UBF-free genomes are more likely to develop into pre-VRCs and then onto VRCs. This model would explain why UBF does not co-localize with pre-VRCs, yet does co-localize with some incoming viral genomes. The model is also consistent with our previous report showing that at early times in infection sites of viral DNA synthesis are devoid of UBF foci (**Lymeropoulos *et al.*, 2010**).

At later times post-infection in the absence of PAA, VRCs develop and are positive for viral DNA, UBF, and viral DNA replication proteins (**Lymeropoulos *et al.*, 2010**). These results suggest that pre-VRCs that mature can merge with complexes of viral genomes and UBF foci, which might explain the existence of UBF foci within VRCs. A recent study by Sekine and colleagues demonstrated that some viral DNA remains in a compacted form in VRCs even when viral replication is underway (**Sekine *et al.*, 2017**). It is tempting to speculate that the compacted genomes observed by Sekine and colleagues represent those we observe co-localized with UBF.

5.2 VP16

Because UBF inhibits viral replication early from the input genomes, we hypothesized that any viral protein that could counteract the negative impact of UBF would need to be part of the virion, and thus be present at the very beginning of infection. Accordingly, we found that increasing the MOI—and thus the amount of viral structural proteins in the infected cell—lessened the impact of UBF on viral yields. Although increasing the MOI also increases the number of copies of viral genomes in the cell, it has been demonstrated that the number of incoming genomes that are ultimately expressed and replicated in a cell is limited to seven (Kobiler *et al.*, 2010). Thus, even though the ratio of tegument proteins to genomes would remain the same as the MOI is increased, the ratio of tegument proteins to potentially “active” genomes would be expected to increase. Although ICP0 is an important viral factor countering multiple host defenses, we found no difference in the degree to which knocking-down UBF levels affected replication of an ICP0-null mutant (7134) versus the rescue virus (7134R). The viral transactivator VP16 is another tegument protein, and is known to be involved in immediate-early transcription, making it an attractive candidate to counter UBF inhibition of viral gene expression. Testing the involvement of VP16 in the inhibition by UBF using the same strategy as for ICP0 proved unsuccessful, likely due to the multiple roles demonstrated for VP16 in HSV replication. To circumvent this problem, we opted for a replication-independent readout and directly observed viral input genomes relative to UBF using a combined IF-FISH technique.

We noted that at an MOI of 5, approximately a third of both v422 genomes and KOS genomes were free of UBF foci. Interestingly, we discovered that at an MOI of 20 the ability of UBF to inhibit KOS replication was diminished, and that in conjunction there was a reduction in the co-localization of UBF with viral genomes (Figure 4 and Figure 6). Strikingly, abolishing the transactivation function of VP16 eliminated the effect of increasing the MOI on the association of UBF with incoming viral genomes. Therefore, a functional VP16AD seems to be required to prevent UBF co-localization with viral genomes and to counteract the ability of UBF to inhibit viral replication. Whether these activities depend on functions that are directly mediated by the VP16AD or are the result of an indirect effect such as the stimulation of expression of another viral protein remains to be investigated. Our observation that an increased amount of VP16 during infection appears to counter a cellular antiviral defense mechanism is interesting because

it was also observed recently that the infectivity of virions positively correlates with an increased amount of tegument VP16 (**El Bilali *et al.*, 2017**). Thus, one of the mechanisms responsible for the increased infectivity when VP16 tegument levels are high could be a stronger antiviral defense countermeasure.

5.3 UBF

Based on several reports of UBF1 and UBF2 having distinct functions (**Grueneberg *et al.*, 2003**, **Panov *et al.*, 2006**, **Sanij *et al.*, 2015**), we hypothesized that the ability to inhibit HSV replication may be a function specific to one of the two isoforms. However, testing of both UBF1 and UBF2 independently for their ability to inhibit viral replication revealed that overexpression of either isoforms lead to a reduction in viral protein synthesis and the formation of VRCs. This result implies that features common to both isoforms must be responsible for the inhibitory function of UBF. The DNA-binding function of UBF is likely critical for the ability of UBF to inhibit HSV-1 gene expression and viral yield. A previous report describing co-transfection of deleted forms of UBF with infectious HSV-1 DNA showed that the core DNA-binding domain of UBF was required to observe a strong effect of UBF on the production of infectious virus (**Stow *et al.*, 2009**). UBF1 and UBF2 differ only at the second HMG box. Both isoforms can bind DNA, but because of the truncated second HMG box, UBF2 does not bind pre-bent DNA nor induce the bending required for enhancosome formation, which is marked by looping of the DNA (**Stefanovsky *et al.*, 2008**). Regardless of how UBF interacts with HSV-1 DNA, it seems unlikely that modification of the topology of the DNA by bending or looping is essential for the inhibition process because we found that UBF2 retains the ability to inhibit HSV-1 replication.

Intrinsic antiviral host responses are often stimulated by interferon, leading to antiviral states in neighboring cells (reviewed in (**Schoggins *et al.*, 2011**, **Schneider *et al.*, 2014**)). To the best of our knowledge, UBF expression is not stimulated by interferon. However, it has been demonstrated that the RNAPol I machinery is present in excess in the cell (**Mais *et al.*, 2005**). This excess capacity is why even when large portions of nucleolar proteins are redistributed away from nucleoli during HSV infection, transcription of ribosomal genes continues (**Besse *et al.*, 1996**, **Simonin *et al.*, 1997**, **Belin *et al.*, 2010**). Thus, the inhibition of HSV-1 replication by UBF does not require prior stimulation of UBF expression. Similar to bacterial restriction

systems—steady-state levels are sufficient and allow inhibition of replication in the first infected cells (**Vasu *et al.*, 2013**).

It remains to be determined if UBF is the effector itself, or rather is part of a complex that inhibits viral replication. In RNAPII transcription, UBF interacts with DNA and multiple proteins, which results in a modified state of chromatin (reviewed in (**Sanij *et al.*, 2009**, **Goodfellow *et al.*, 2013**)). Therefore, it could be contemplated that in the context of HSV-1 infection, one or several of these UBF-containing complexes are recruited to modify viral chromatin and silence HSV-1 gene expression. Future studies will be required to determine the mechanism underlying the ability of UBF to inhibit HSV gene expression and replication.

Acknowledgments

We thank J. Tremblay of the INRS-Institut Armand-Frappier imaging facility for assistance with the confocal microscopy experiments. GOL received a scholarship from the Fondation Armand-Frappier. This work was funded by a Canadian Institutes of Health Research operating grant to AP (MOP 82924).

6 REFERENCES

- Batterson W & Roizman B (1983) Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *J. Virol.* 46(2):371-7.
- Bazett-Jones DP, Leblanc B, Herfort M & Moss T (1994) Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* 264(5162):1134-7.
- Belin S, Kindbeiter K, Hacot S, Albaret MA, Roca-Martinez JX, Therizols G, Grosso O & Diaz JJ (2010) Uncoupling ribosome biogenesis regulation from RNA polymerase I activity during herpes simplex virus type 1 infection. *RNA* 16(1):131-40.
- 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):1192-7.
- Besse S & Puvion-Dutilleul F (1996) Intranuclear retention of ribosomal RNAs in response to herpes simplex virus type 1 infection. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 1):119-29.
- Boutell C & Everett RD (2013) Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins. *J. Gen. Virol.* 94(Pt 3):465-81.
- Cai WZ & Schaffer PA (1989) Herpes simplex virus type 1 ICP0 plays a critical role in the de novo synthesis of infectious virus following transfection of viral DNA. *J. Virol.* 63(11):4579-89.
- Chee AV, Lopez P, Pandolfi PP & Roizman B (2003) Promyelocytic leukemia protein mediates interferon-based anti-herpes simplex virus 1 effects. *J. Virol.* 77(12):7101-5.
- 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):935-41.
- 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):15106-11.
- Cliffe AR & Knipe DM (2008) Herpes simplex virus ICP0 promotes both histone removal and acetylation on viral DNA during lytic infection. *J. Virol.* 82(24):12030-8.
- 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):2651-7.
- Eidson KM, Hobbs WE, Manning BJ, Carlson P & DeLuca NA (2002) Expression of herpes simplex virus ICP0 inhibits the induction of interferon-stimulated genes by viral infection. *J. Virol.* 76(5):2180-91.
- El Bilali N, Duron J, Gingras D & Lippe R (2017) Quantitative Evaluation of Protein Heterogeneity within Herpes Simplex Virus 1 Particles. *J. Virol.* 91(10):e00320-17.
- 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):6581-91.

- Everett RD & Maul GG (1994) HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *EMBO J.* 13(21):5062-9.
- 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):5078-89.
- 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):2661-72.
- 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.
- Gerster T & Roeder RG (1988) A herpesvirus trans-activating protein interacts with transcription factor OTF-1 and other cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85(17):6347-51.
- Glass M & Everett RD (2013) Components of promyelocytic leukemia nuclear bodies (ND10) act cooperatively to repress herpesvirus infection. *J. Virol.* 87(4):2174-85.
- Goodfellow SJ & Zomerdijs JC (2013) Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcell. Biochem.* 61:211-36.
- Grueneberg DA, Pablo L, Hu KQ, August P, Weng Z & Papkoff J (2003) A functional screen in human cells identifies UBF2 as an RNA polymerase II transcription factor that enhances the beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23(11):3936-50.
- Gu H & Roizman B (2007) Herpes simplex virus-infected cell protein 0 blocks the silencing of viral DNA by dissociating histone deacetylases from the CoREST-REST complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(43):17134-9.
- Hamdane N, Stefanovsky VY, Tremblay MG, Nemeth A, Paquet E, Lessard F, Sanij E, Hannan R & Moss T (2014) Conditional inactivation of Upstream Binding Factor reveals its epigenetic functions and the existence of a somatic nucleolar precursor body. *PLoS Genet.* 10(8):e1004505.
- 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):2217-26.
- Hancock MH, Cliffe AR, Knipe DM & Smiley JR (2010) Herpes simplex virus VP16, but not ICP0, is required to reduce histone occupancy and enhance histone acetylation on viral genomes in U2OS osteosarcoma cells. *J. Virol.* 84(3):1366-75.
- Hannan R, Stefanovsky V, Arino T, Rothblum L & Moss T (1999) Cellular regulation of ribosomal DNA transcription: both rat and *Xenopus* UBF1 stimulate rDNA transcription in 3T3 fibroblasts. *Nucleic Acids Res.* 27(4):1205-13.
- Hannan RD, Stefanovsky V, Taylor L, Moss T & Rothblum LI (1996) Overexpression of the transcription factor UBF1 is sufficient to increase ribosomal DNA transcription in neonatal cardiomyocytes: implications for cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(16):8750-5.

- 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):557-63.
- Herrera FJ & Triezenberg SJ (2004) VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. *J. Virol.* 78(18):9689-96.
- Hisatake K, Nishimura T, Maeda Y, Hanada K, Song CZ & Muramatsu M (1991) Cloning and structural analysis of cDNA and the gene for mouse transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res.* 19(17):4631-7.
- Hu CH, McStay B, Jeong SW & Reeder RH (1994) xUBF, an RNA polymerase I transcription factor, binds crossover DNA with low sequence specificity. *Mol. Cell. Biol.* 14(5):2871-82.
- Hu CH, Wang JM & Tseng HB (1998) The first high-mobility-group box of upstream binding factor assembles across-over DNA junction by basic residues. *Biochem. J.* 333 (Pt 1):51-6.
- 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):221-34.
- 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):830-6.
- 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):1950-63.
- Kent JR, Zeng PY, Atanasiu D, Gardner J, Fraser NW & Berger SL (2004) During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. *J. Virol.* 78(18):10178-86.
- Kobiler O, Lipman Y, Therkelsen K, Daubechies I & Enquist LW (2010) Herpesviruses carrying a Brainbow cassette reveal replication and expression of limited numbers of incoming genomes. *Nat. Commun.* 1:146.
- Kristie TM, LeBowitz JH & Sharp PA (1989) The octamer-binding proteins form multi-protein--DNA complexes with the HSV alpha TIF regulatory protein. *EMBO J.* 8(13):4229-38.
- 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):416-24.
- 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):2575-81.
- Lanfranca MP, Mostafa HH & Davido DJ (2014) HSV-1 ICP0: An E3 Ubiquitin Ligase That Counteracts Host Intrinsic and Innate Immunity. *Cells* 3(2):438-54.

- 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):847-57.
- Lin R, Noyce RS, Collins SE, Everett RD & Mossman KL (2004) The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J. Virol.* 78(4):1675-84.
- Loret S, Guay G & Lippe R (2008) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 82(17):8605-18.
- 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):4026-40.
- 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):4810-5.
- 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.
- 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):2679-90.
- McStay B, Hu CH, Pikaard CS & Reeder RH (1991) xUBF and Rib 1 are both required for formation of a stable polymerase I promoter complex in *X. laevis*. *EMBO J.* 10(8):2297-303.
- Mossman KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J & Smiley JR (2000) Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J. Virol.* 74(14):6287-99.
- 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):3180-4.
- O'Regan KJ, Murphy MA, Bucks MA, Wills JW & Courtney RJ (2007) Incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 into the virus particle is independent of interaction with VP16. *Virology* 369(2):263-80.
- 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):657-68.
- Oh J & Fraser NW (2008) Temporal association of the herpes simplex virus genome with histone proteins during a lytic infection. *J. Virol.* 82(7):3530-7.
- Orzalli MH, DeLuca NA & Knipe DM (2012) Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(44):E3008-17.

- Ouellet Lavallee G & Pearson A (2015) Upstream binding factor inhibits herpes simplex virus replication. *Virology* 483:108-16.
- Panov KI, Friedrich JK, Russell J & Zomerdijs JC (2006) UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J.* 25(14):3310-22.
- Prieto JL & McStay B (2007) Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. *Genes Dev.* 21(16):2041-54.
- 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):6476-88.
- Sanij E, Diesch J, Lesmana A, Poortinga G, Hein N, Lidgerwood G, Cameron DP, Ellul J, Goodall GJ, Wong LH, Dhillon AS, Hamdane N, Rothblum LI, Pearson RB, Haviv I, Moss T & Hannan RD (2015) A novel role for the Pol I transcription factor UBTF in maintaining genome stability through the regulation of highly transcribed Pol II genes. *Genome Res.* 25(2):201-12.
- Sanij E & Hannan RD (2009) The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin. *Epigenetics* 4(6):374-82.
- 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):1259-74.
- Schneider WM, Chevillotte MD & Rice CM (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 32:513-45.
- Schoggins JW & Rice CM (2011) Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current opinion in virology* 1(6):519-25.
- Sekine E, Schmidt N, Gaboriau D & O'Hare P (2017) Spatiotemporal dynamics of HSV genome nuclear entry and compaction state transitions using bioorthogonal chemistry and super-resolution microscopy. *PLoS Pathog.* 13(11):e1006721.
- Simonin D, Diaz JJ, Masse T & Madjar JJ (1997) Persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 2):435-43.
- Smibert CA, Popova B, Xiao P, Capone JP & Smiley JR (1994) Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *J. Virol.* 68(4):2339-46.
- Smiley JR & Duncan J (1997) Truncation of the C-terminal acidic transcriptional activation domain of herpes simplex virus VP16 produces a phenotype similar to that of the in1814 linker insertion mutation. *J. Virol.* 71(8):6191-3.
- Smith SD, O'Mahony DJ, Kinsella BT & Rothblum LI (1993) Transcription from the rat 45S ribosomal DNA promoter does not require the factor UBF. *Gene Expr.* 3(3):229-36.

- Stefanovsky VY, Bazett-Jones DP, Pelletier G & Moss T (1996) The DNA supercoiling architecture induced by the transcription factor xUBF requires three of its five HMG-boxes. *Nucleic Acids Res.* 24(16):3208-15.
- Stefanovsky VY, Langlois F, Bazett-Jones D, Pelletier G & Moss T (2006a) ERK modulates DNA bending and enhances some structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry (Mosc.)* 45(11):3626-34.
- Stefanovsky VY, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI & Moss T (2006b) Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol. Cell* 21(5):629-39.
- 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):5093-101.
- Stern S, Tanaka M & Herr W (1989) The Oct-1 homeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16. *Nature* 341(6243):624-30.
- 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.
- Taylor KE, Chew MV, Ashkar AA & Mossman KL (2014) Novel roles of cytoplasmic ICP0: proteasome-independent functions of the RING finger are required to block interferon-stimulated gene production but not to promote viral replication. *J. Virol.* 88(14):8091-101.
- Triezenberg SJ, Kingsbury RC & McKnight SL (1988a) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* 2(6):718-29.
- Triezenberg SJ, LaMarco KL & McKnight SL (1988b) Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev.* 2(6):730-42.
- 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):2872-9.
- Vasu K & Nagaraja V (2013) Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77(1):53-72.
- Xing J, Ni L, Wang S, Wang K, Lin R & Zheng C (2013) Herpes simplex virus 1-encoded tegument protein VP16 abrogates the production of beta interferon (IFN) by inhibiting NF-kappaB activation and blocking IFN regulatory factor 3 to recruit its coactivator CBP. *J. Virol.* 87(17):9788-801.

CHAPITRE QUATRE : DISCUSSION

1 RESTRICTION DE LA RÉPLICATION VIRALE PAR UBF

La diminution de la quantité d'UBF favorise la réplication du VHS-1 et 2. Jumelé au fait que la surproduction d'UBF inhibe la réplication du VHS-1, il est clair qu'UBF fait partie d'un mécanisme antiherpétique, et peut-être même antiviral à plus large spectre. La levée de cette interférence par UBF résulte en une augmentation de tous les produits viraux observés en comparaison avec une infection témoin. Selon les résultats obtenus, UBF démontre la capacité d'interférer avec la production de transcrits viraux à partir du génome viral entrant. À cela s'ajoute le fait que, de façon indépendante de la réplication de l'ADN viral, UBF est relocalisée tôt dans l'infection et colocalise avec certains génomes viraux entrants. Observer l'effet d'UBF lors d'une infection de la cellule hôte est une méthodologie qui a permis de démontrer solidement son rôle antiviral. À l'opposé, les résultats utilisés pour soutenir l'hypothèse de son rôle proviral ont été obtenus par des méthodes plus distantes d'une infection « normale » qui isolaient seulement certains paramètres. Observer l'infection dans son ensemble préalablement à l'investigation d'un mécanisme précis a donc permis d'établir clairement le rôle antiviral d'UBF.

Comme il est tôt ou tard découvert pour tous les mécanismes de défense cellulaire, une réponse virale existe. Les résultats d'imagerie confocale ont permis de démontrer que la proportion de génomes viraux colocalisés avec UBF diminuait lorsque la multiplicité d'infection utilisée était augmentée. De plus, l'augmentation de la MOI atténue également la différence de titre viral entre les conditions témoins et sans UBF. L'augmentation de la quantité d'un facteur viral présent tôt dans l'infection semble donc à la fois diminuer la colocalisation entre UBF et le génome viral et réduire l'impact d'UBF sur le titre viral.

Ces observations ne sont faites que dans le cas d'une infection par le virus de type sauvage, et non lors de l'infection par un virus dont le domaine d'activation de la protéine VP16 est muté. Cela suggère que la protéine virale VP16 ou une activité qui dépend de son domaine d'activation permet au virus de limiter l'effet d'UBF et sa colocalisation avec le génome.

1.1 Relocalisation et détection

D'une façon ou d'une autre, l'ADN viral entrant doit être détecté pour qu'UBF s'y relocalise. Le mécanisme de reconnaissance du génome viral par UBF demeure inconnu. Outre les domaines HMG, UBF ne possède pas de domaine de reconnaissance typiquement retrouvé chez les senseurs d'ADN exogènes. Par exemple UBF est dépourvu de domaine PYHIN, utilisé par les senseurs d'ADN IFI16 et AIM2. Il est intéressant de noter que malgré cela, UBF et IFI16 semblent pouvoir reconnaître des structures similaires, comme l'ADN cruciforme ou surenroulé (Brazda *et al.*, 2012, Copenhaver *et al.*, 1994, Hu *et al.*, 1994). La reconnaissance de ces particularités est connue pour les domaines HMGB. Comme mentionné précédemment, les domaines HMG d'UBF sont apparentés à la famille HMGB, de laquelle ils héritent plusieurs propriétés. Ces domaines permettent entre autres à HMGB de détecter l'ADN exogène (Lee *et al.*, 2013, Yanai *et al.*, 2009).

La relocalisation d'UBF est détectable tôt lors de l'infection, soit dès 3 hpi. À ce moment, la transcription de gènes viraux est déjà enclenchée. Le traitement de cellules avec un virus VHS-1 inactivé aux UV incapable d'expression génique ne provoque pas la relocalisation d'UBF (Bourget, 2011). Un virus inactivé aux UV peut être quand même détecté par des senseurs d'ADN, comme c'est le cas du CMV par le senseur cGAS (Bianco *et al.*, 2017). Il est donc peu probable que le virus inactivé aux UV soit simplement indétectable. Cela suggère plutôt qu'une certaine activité virale, ou un état particulier du génome, est nécessaire à la relocalisation d'UBF. D'un autre côté, lors d'infection à MOI plus faible par un virus dont le domaine d'activation de VP16 est muté, il n'y a pas de détection de protéines IP ou P par microscopie confocale au moment où UBF est relocalisée. Il en va de même lors de la transfection du génome viral sous forme de BAC. Cela reste donc à être démontré directement si la transcription à partir du génome viral est nécessaire pour induire la relocalisation d'UBF.

Étant donné la capacité d'UBF à lier l'ADN directement, il est raisonnable de spéculer qu'UBF agit elle-même comme senseur d'ADN nucléaire. Les résultats de Mais *et al.* abondent dans le même sens; UBF peut se localiser dans le noyau ailleurs qu'au nucléole, et ce seulement dû à la présence d'une séquence d'ADN (Mais *et al.*, 2005).

Une brève analyse de séquence présentée à la Figure 12 a révélé que les séquences de haute affinité pour UBF conservées entre les régions UCE et CE établies par Bell *et al.* se retrouvent

partiellement dans le génome viral (Bell *et al.*, 1988). Malgré que ces séquences soient relativement courtes, elles seraient suffisantes pour être reconnues par un domaine HMG (Bazett-Jones *et al.*, 1994, Giese *et al.*, 1991, Leblanc *et al.*, 1993, Yang *et al.*, 2002). De plus, deux parties de la séquence *XEn* décrite par Pikaard *et al.* et utilisée par Mais *et al.* peuvent également être retrouvées dans le génome viral avec une homologie d'environ 75% (Mais *et al.*, 2005, Pikaard *et al.*, 1989). Il est possible de considérer que ces séquences jouent un rôle dans la reconnaissance du génome viral par UBF.

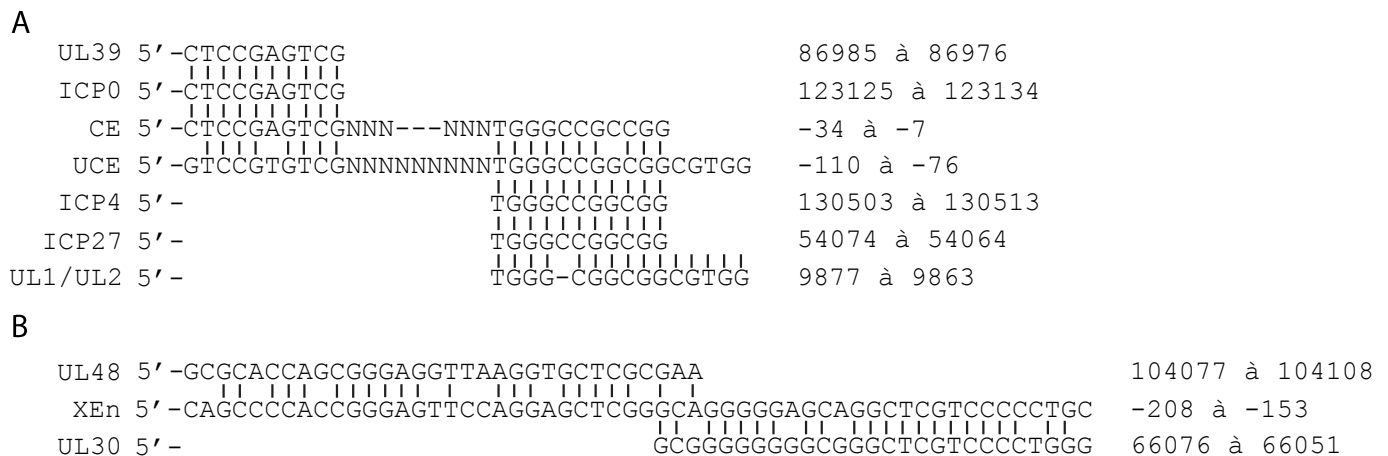


Figure 12 : Comparaison des séquences reconnues par UBF avec des séquences virales.

Alignement d'une partie des séquences UCE et CE (A) ou de *XEn* (B) avec des séquences virales. Le nom des séquences ou du gène auquel appartiennent les séquences est présenté à gauche de la figure. Les numéros d'accèsion pour les séquences utilisées sont les suivants : locus ribosomal humain : NT_167214, génome viral KOS : JQ673480, région intergénique de l'ADNr de *Xenopus laevis* : M23393.1. L'alignement des séquences est présenté au centre de la figure et la position relative de ces séquences à droite. La position des séquences virales est en relation avec le début du génome viral. La position des séquences UCE, CE et *XEn* est relative au nucléotide +1 de leur transcrit ribosomal respectif. Alignement effectué avec le logiciel Unipro UGENE, version 1.18.0.

1.2 Mécanisme d'action

Les mécanismes possibles pour l'action antivirale d'UBF peuvent être regroupés en deux catégories. UBF peut bloquer elle-même directement la réplication virale, par exemple en liant l'ADN viral et en interférant avec la transcription des gènes viraux. Elle peut également agir indirectement en tant qu'intermédiaire qui recrute d'autres protéines effectrices.

Mécanisme direct

Sa capacité à réguler l'élongation des transcrits par l'ARN polymérase I est un exemple de mécanisme d'action direct par UBF. Cette fonction dépend de la capacité d'UBF à modifier la conformation de l'ADN et est discutée dans la section suivante.

Alternativement, UBF pourrait affecter directement l'activité de promoteurs viraux, comme le font certaines protéines HMG. Par exemple, la protéine HMGB1 colocalise avec l'ADN viral et a été identifiée comme pouvant servir de coactivateur de la transcription virale par ICP4 *in vitro* (Carrozza *et al.*, 1998, Dembowski *et al.*, 2015). La protéine HMGA1 a elle été décrite comme pouvant augmenter la liaison d'ICP4 à sa séquence régulatrice, incluant celle sur son propre gène. Cela résulte en une augmentation de l'activité d'ICP4; d'une part la répression de sa propre transcription et d'autre part l'activation d'autres promoteurs IP. De plus la présence de HMGA1 réduit aussi l'activation dépendante d'ICP0 des promoteurs IP (Matta *et al.*, 2008, Panagiotidis *et al.*, 1999). Ces résultats montrent la capacité qu'ont certaines protéines HMG à moduler directement l'activité de promoteurs viraux.

Mécanisme indirect

En support à l'hypothèse d'un mécanisme indirect, on note la capacité d'UBF à recruter plusieurs protéines impliquées dans la transcription. En contexte d'infection, notre laboratoire a démontré que la sous-unité de l'ARN polymérase I RPA194 reste colocalisée avec UBF lors de sa redistribution (Lymberopoulos *et al.*, 2010). Ces résultats et ceux de Mais *et al.* démontrent la capacité d'UBF à recruter d'autres protéines lors de sa relocalisation aux génomes viraux ou à des séquences exogènes. On peut donc supposer qu'un partenaire d'UBF pourrait participer à la restriction de la réplication virale.

Cependant, la partie C-terminale d'UBF est requise pour recruter la plupart d'entre elles. Comme démontré par les résultats de Stow *et al.*, UBF semble conserver certaines capacités à restreindre la production virale à partir de transfection sans sa partie C-terminale et son dernier domaine HMG (Stow *et al.*, 2009). La capacité des troncations d'UBF à restreindre la réplication virale comme telle n'a cependant pas été vérifiée. Ces résultats suggèrent somme toute que la partie C-terminale et ce qui en découle normalement ne sont pas impliqués dans le mode d'action d'UBF contre le VHS-1.

Il demeure que des protéines interagissent avec UBF autrement que par la partie C-terminale. Premièrement, les protéines Rb et CBP interagissent avec UBF par le premier et le deuxième

domaine HMG. Comme mentionné précédemment, Rb peut être lié avec HDAC1 et CBP est une HAT; elles auraient donc le potentiel de modifier les histones sur le génome viral.

Deuxièmement, il a été démontré que l'interaction mentionnée au premier chapitre de CTCF avec UBF se fait via la partie N-terminale et le premier domaine HMG (van de Nobelen *et al.*, 2010). Jumelé au fait que plusieurs résultats placent CTCF comme un acteur important dans le contrôle de la transcription virale, il est probable que CTCF pourrait être impliquée dans la restriction menée par UBF.

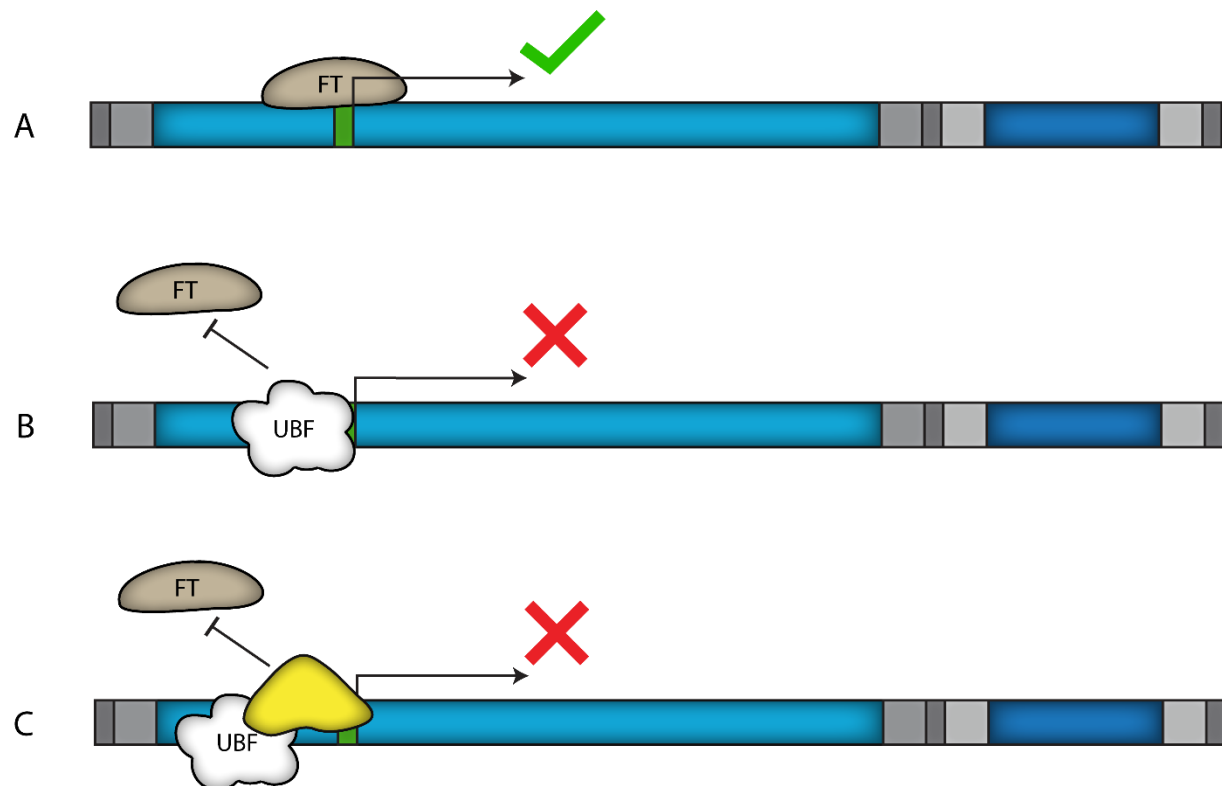


Figure 13 : Représentation de l'action d'UBF directe et indirecte.

Schématisation de la répression de la transcription virale par UBF via un mécanisme direct et indirect. Le génome viral est représenté par les rectangles bleu et gris, et le promoteur du gène viral par le rectangle vert. Un facteur de transcription est représenté en beige et identifié « FT », UBF est représenté en blanc et identifié « UBF » et un facteur hypothétique recruté par UBF est représenté en jaune. (A) En l'absence d'UBF, le facteur de transcription peut lier le promoteur et activer la transcription. (B) UBF lie directement la région promotrice et interfère avec la liaison du facteur de transcription, bloquant ainsi la transcription. (C) UBF interagit avec le génome viral et y recrute une autre protéine. Cette dernière interfère avec la liaison du facteur de transcription et bloque la transcription virale.

1.3 UBF1 et UBF2

UBF1 et UBF2 ont plusieurs différences, tant reliées à la liaison à l'ADN qu'à leurs rôles dans la transcription. Ces différences assez marquées renforçaient l'hypothèse selon laquelle un des deux isoformes serait responsable de l'inhibition de la réplication virale. Les résultats obtenus montrent cependant le contraire. Il semble qu'à la fois UBF1 et UBF2 soient suffisantes pour inhiber la réplication virale. Il est donc raisonnable de penser qu'une fonction commune aux deux isoformes est alors responsable de l'action antivirale.

Le domaine de dimérisation en N-terminal est commun aux deux isoformes et il a été démontré qu'il est important pour la capacité d'UBF à lier l'ADN et pour les fonctions d'UBF reliées à la transcription (Jantzen *et al.*, 1992, McStay *et al.*, 1991a, O'Mahony *et al.*, 1992a). Les informations disponibles à ce jour permettent toujours de supposer que la dimérisation d'UBF est impliquée dans l'inhibition de la réplication virale. Cependant, l'étendue de cette hypothèse peut maintenant être réduite à la présence d'homodimères.

La détermination de l'état de phosphorylation des résidus thréonine 117 et 201 d'UBF durant l'infection par le VHS-1 pourrait permettre de déterminer sous quelle forme est l'ADN viral lorsque lié par UBF, ou quelle forme UBF induit à l'ADN viral lorsqu'il s'y lie. Le fait que la phosphorylation de ces résidus entraîne une linéarisation du brin d'ADN par UBF1 et 2, et qu'UBF2 se comporte comme UBF1 héli-phosphorylé pourrait expliquer pourquoi les deux isoformes sont interchangeables en ce qui a trait à l'inhibition de la réplication virale. Si le mécanisme d'UBF est un changement de structure de l'ADN viral, il est possible que cette structure soit une linéarisation et non la formation d'une boucle. La région minimale d'UBF requise pour restreindre la réplication permet de former l'*enhancesome*, cependant seulement UBF1 peut le former alors qu'à la fois UBF1 et UBF2 peuvent lier et linéariser l'ADN. Si UBF interfère physiquement avec la transcription virale, il semble donc peu probable que ce soit en formant une structure comme l'*enhancesome*.

La partie C-terminale est aussi commune aux deux isoformes. Par contre, comme elle ne semble pas nécessaire à la restriction de la réplication, il est peu probable qu'elle y soit impliquée.

Dans tous les cas, à la fois UBF1 et UBF2 pourraient fonctionner selon un mécanisme direct ou indirect.

1.4 Réponse virale

VP16 est importante à plusieurs niveaux. Elle est impliquée entre autres dans l'initiation de l'infection, le maintien de la stabilité des transcrits viraux, la tégumentation de la capsid et l'export nucléaire de cette dernière. Ces multiples rôles critiques en font une protéine essentielle, et complexifie l'étude de fonctions particulières au sein du cycle de réplication. L'étude par microscopie confocale à des temps précoces de l'infection a permis de contourner certains de ces aspects plus tardifs.

La présence d'un facteur viral qui contrecarre UBF était attendue. La présence de ce facteur dans le virion était suspectée dû à la relation inverse entre la multiplicité d'infection et la quantité de génomes viraux colocalisés avec UBF. Les résultats de microscopie confocale montrent que la présence d'UBF est en excès par rapport au nombre de génomes détectés, peu importe la MOI. Il semble donc peu probable que la MOI plus élevée entraîne simplement une titration d'UBF par une plus grande quantité d'ADN viral. Les observations en microscopie confocale des cellules transfectées avec l'ADN BAC supportent cela. De plus, une certaine limite semble exister quant au nombre de génomes viraux pouvant s'exprimer au noyau (Kobiler *et al.*, 2010). Il ne semble cependant pas exister une telle limite au niveau de la quantité de protéines pouvant y entrer. Une MOI plus élevée entraînerait donc une surabondance de protéines tégumentaires par rapport au nombre de génomes viraux potentiellement réplicatifs.

L'augmentation de la proportion des génomes libres d'UBF se fait en augmentant la MOI du virus de type sauvage, mais cette proportion ne change pas lors de l'infection avec un virus dont le domaine d'activation de VP16 est muté. Cela implique donc ce domaine dans l'évasion de la réponse antivirale d'UBF. De plus, ces expériences démontrent que ce sont les protéines VP16 du tégument qui sont impliquées. En effet, afin d'observer uniquement les génomes entrants, le PAA a été utilisé pour bloquer la réplication de l'ADN viral. Du même coup, la production des protéines tardives comme VP16 est aussi bloquée. Les seules protéines VP16 présentes sont celles structurales.

L'incapacité à bloquer la localisation d'UBF aux génomes viraux n'est probablement pas due à une simple absence de réplication du mutant de VP16. Malgré l'absence de détection de certaines protéines IP ou P lors de la relocalisation d'UBF suite à une infection à MOI plus faible, il y a production de particules virales infectieuses. De plus, des résultats obtenus montrent

une production appréciable d'ICP8, une protéine P, lors d'une infection avec un mutant de VP16 à une MOI de 50 (Ouellet Lavallée *et al.*, non publiés). Dans ces conditions, la proportion de génomes viraux colocalisés avec UBF reste similaire à celle observée avec les autres MOI. Il semble donc que la transcription en tant que telle ne soit pas le mécanisme qui permette de contrecarrer UBF. Il est possible que ce qui permet la transcription, permette aussi de contrer UBF.

Comme mentionné au premier chapitre, l'espacement irrégulier et les marques d'euchromatine des histones sur le génome viral dépendent entre autres de VP16 (Hancock *et al.*, 2010, Herrera *et al.*, 2004). Il est possible que les fonctions de VP16 qui sont responsables de cet état soient aussi impliquées dans le blocage de la colocalisation entre le génome viral et UBF.

Il a été démontré que le mutant de VP16 v422 possède toujours la capacité de se lier au génome viral (Herrera *et al.*, 2004), ce qui n'est visiblement pas suffisant pour bloquer la colocalisation avec UBF. Cette information renforce donc l'hypothèse qu'un facteur recruté par le domaine d'activation de VP16 participe à contrer la localisation d'UBF aux génomes viraux, comme il se produit dans le cas des histones.

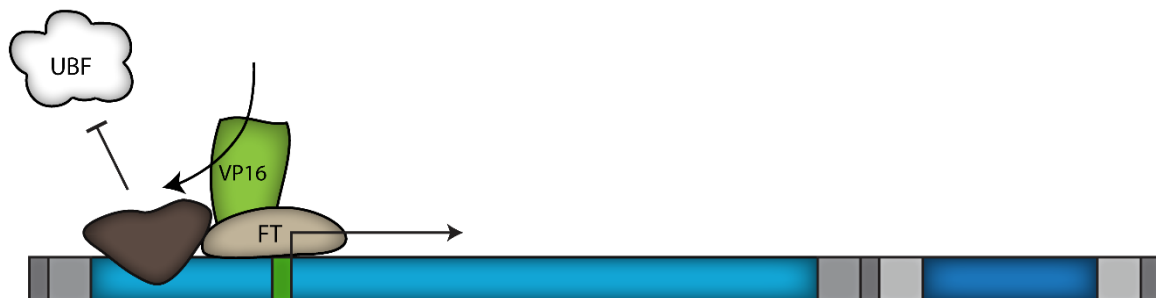


Figure 14 : VP16 contrecarre l'inhibition de la transcription virale par UBF.

Schématisme de l'activité du domaine d'activation de VP16 qui permet de contrecarrer l'inhibition de la réplication virale par UBF. Le génome viral est représenté par le rectangle bleu et gris, et le promoteur du gène viral par le rectangle vert. Un facteur de transcription est représenté en beige et identifié « FT », UBF est représenté en blanc et identifié « UBF » et VP16 est représenté en vert et identifié « VP16 ». Une activité qui nécessite le domaine d'activation de VP16, ici schématisée par le recrutement d'une protéine encore inconnue représentée en brun, bloque la localisation d'UBF avec le génome viral. L'absence d'UBF au génome viral permet la liaison du facteur de transcription au promoteur viral et ainsi l'expression génique.

Dans un même ordre d'idée, une équipe a démontré que VP16 pouvait bloquer l'induction de l'IFN- β . Le mécanisme identifié est que VP16 interagit avec CBP, ce qui empêche son recrutement normal par IRF-3. Il s'en suit donc un défaut d'expression des gènes dépendant

d'IRF-3 (Xing *et al.*, 2013). Une autre étude démontre l'implication de VP16 dans le blocage d'une réponse antivirale. Il est intéressant de noter que cette activité dépend de la MOI employée. Les résultats de cette étude montrent que l'expression génique en aval d'une signalisation par MAVS-Pex est diminuée lorsque la MOI est augmentée. Cette expression génique est partiellement restaurée en bloquant l'expression de VP16 par interférence à ARN. Les protéines VP16 présentes dans le virion ne sont pas affectées de cette façon, ce qui peut expliquer le phénotype intermédiaire observé (Zheng *et al.*, 2017). Il semble alors qu'à la fois VP16 du tégment et VP16 nouvellement synthétisé contribuent à bloquer cette signalisation, à l'aide d'un mécanisme qui reste à être élucidé. La liste des fonctions de VP16 continue de s'allonger et inclut de plus en plus des réponses aux défenses cellulaires.

2 MODÈLE

Le modèle proposé a pour but d'agencer les résultats obtenus avec les fonctions connues des protéines d'intérêt. Dans un premier temps, le génome viral entre au noyau et y est détecté peu de temps après par UBF. Cette détection se fait soit par une caractéristique structurale du génome, possiblement causée par sa transcription, ou par des séquences hautement similaires avec les séquences normalement reconnues par UBF. UBF s'accumule ensuite sur le génome viral, ce qui entraîne la formation des points visibles en microscopie confocale. Seul ou avec d'autres protéines, UBF interfère avec la production de transcrits viraux à partir de ce génome entrant.

En recrutant un, ou des, facteurs encore inconnus VP16 masque le génome viral ou bloque l'interaction d'UBF avec celui-ci, ce qui prévient leur colocalisation et permet une plus grande accumulation de transcrits viraux. Cet événement a plus de chance de se produire lorsque la quantité de VP16 ayant un domaine d'activation fonctionnel est grande. Cela entraîne les effets observés lors d'une infection à plus grande MOI avec un virus de type sauvage, comme la susceptibilité réduite à UBF.

Les génomes viraux qui restent libres d'UBF ont ensuite la possibilité de donner naissance aux compartiments de réplication virale et de mûrir normalement, alors que les autres non. Les génomes viraux « contrôlés » par UBF restent condensés, et ce même une fois englobés par la croissance des autres compartiments de réplication virale adjacents. Deux éléments supportent

cette hypothèse. Premièrement, des points d'UBF sont toujours présents à l'intérieur de compartiments de réplication virale (Ouellet Lavallée *et al.* non publiés) et (Lymberopoulos *et al.*, 2010). Deuxièmement, lors de l'infection, la synthèse d'ADN viral débute ailleurs qu'aux points d'UBF (Lymberopoulos *et al.*, 2010). Cela peut suggérer que les points d'UBF préviennent effectivement la formation de compartiments de réplication virale auprès de ces génomes. Cette hypothèse pourrait offrir une explication aux résultats du groupe de Sekine *et al.* qui ont effectivement observé des génomes viraux condensés et apparemment non réplcatifs au sein de compartiments de réplication virale (Sekine *et al.*, 2017).

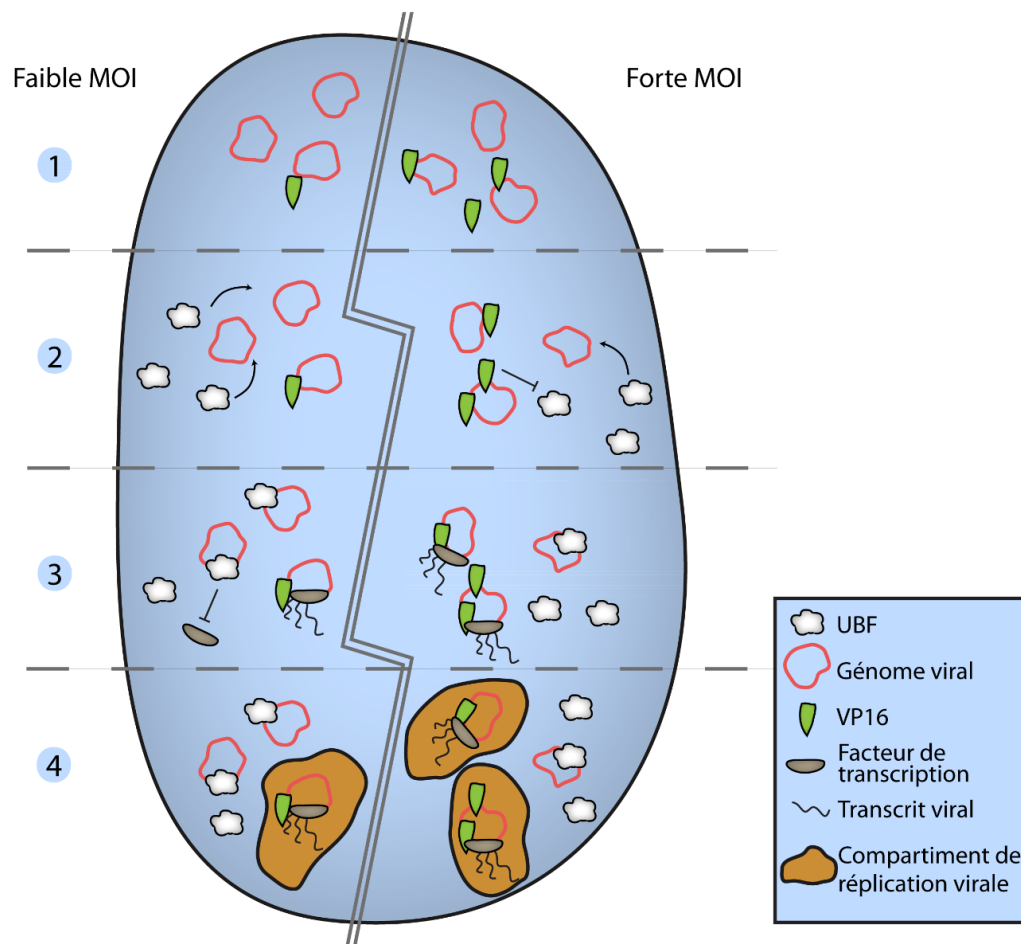


Figure 15 : Modèle de la dynamique d'UBF et de VP16 lors d'une infection à faible et à forte MOI

Représentation de l'inhibition de la transcription virale par UBF et de l'effet de VP16 en fonction de la MOI. Premièrement, le génome viral (représenté par le cercle rouge) entre au noyau (représenté par la forme bleue), avec proportionnellement plus de protéines VP16 (en vert) à forte MOI par rapport à une plus faible MOI. Deuxièmement, UBF (en blanc) est relocalisée sur la majorité des génomes viraux lors d'une infection à faible MOI, mais seulement sur une minorité de génomes à forte MOI. Ce phénomène dépend d'une activité du domaine d'activation de VP16. Troisièmement, la présence d'UBF sur le génome viral prévient la transcription virale, potentiellement en bloquant l'accès à des facteurs de transcription (en brun). Quatrièmement, les génomes viraux dépourvus d'UBF sont permissifs à la transcription et donnent naissance à des compartiments de réplication virale.

À la sortie de la latence, la transition de l'animation (phase initiale durant laquelle la transcription virale commence, mais de façon désordonnée) vers la réactivation a certains points communs avec la transcription initiale, comme le rôle important de VP16. Il est possible qu'UBF soit aussi impliquée dans le contrôle de la réactivation.

Informations supplémentaires

Pour soutenir le modèle proposé, certaines informations manquantes devraient être obtenues. Dans un premier temps, l'inhibition de la transcription par l'ARN polymérase II permettrait d'élucider si la relocalisation d'UBF aux génomes viraux entrant en dépend. La colocalisation d'UBF avec les génomes viraux dans un contexte où la transcription par l'ARN polymérase II est bloquée signifierait que le génome viral en tant que tel peut être détecté. Cette inhibition permettrait aussi de confirmer que la transcription n'est pas nécessaire pour que VP16 contrecarre la localisation d'UBF aux génomes viraux. L'inhibiteur α -amanitine a été prévu pour cette fonction pour deux raisons : premièrement dû à son absence d'effet sur l'ARN polymérase I, et deuxièmement à cause de la concentration efficace environ dix fois plus faible pour l'ARN polymérase II que III. Des essais préliminaires n'ont cependant pas permis d'obtenir de résultats concluants. Des optimisations sont encore requises pour déterminer la concentration qui est efficace et qui n'induit pas de toxicité outre mesure pendant une fenêtre d'observation raisonnable suite à l'infection.

Afin de déterminer si UBF lie l'ADN viral grâce à une séquence précise, une immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage devrait également être effectué. Les résultats actuels établissent une corrélation entre la proportion de génomes viraux colocalisés avec UBF et son effet antiviral. Dans l'hypothèse d'un résultat positif, l'introduction de mutations silencieuses à la place de ces séquences permettrait non seulement de confirmer cette reconnaissance, mais aussi de relier directement la colocalisation d'UBF avec le génome viral et son effet antiviral.

Ensuite, le blocage de la traduction permettrait de déterminer si l'effet antiviral d'UBF nécessite une synthèse protéique *de novo*, comme c'est le cas pour plusieurs mécanismes antiviraux. L'identification de partenaires d'UBF dans la réponse antivirale est aussi un élément important.

Les facteurs potentiels mentionnés tels que CBP, Rb et CTCF interagissent déjà avec UBF et/ou le génome viral. Il ne serait donc pas surprenant de les détecter dans les complexes UBF-génome viral. Les expériences devraient plutôt se focaliser sur la modulation de ces interactions à une forte MOI par rapport à une faible MOI et en présence ou en absence du domaine d'activation de VP16.

En terminant, le suivi en temps réel des génomes et de la maturation des compartiments de réplication virale pourrait permettre de confirmer si ce sont bel et bien les génomes « libres » qui donnent naissance aux compartiments de réplication matures. Alternativement, le marquage des transcrits nouvellement synthétisés déterminerait si les génomes occupés par UBF sont permissifs à la transcription.

3 CONCLUSION

Les résultats obtenus permettent de mieux comprendre l'interaction entre UBF et la réplication du VHS-1. En absence d'UBF, les résultats ont montré une hausse du niveau de tous les produits viraux mesurés, incluant le nombre de virions infectieux. La réciproque est aussi vraie, une augmentation de la quantité d'UBF entraîne une baisse de la quantité de produits viraux. Il est maintenant clair que les deux isoformes d'UBF jouent un rôle antiviral, contrairement à l'hypothèse qui prévalait à l'origine.

Son expression constitutive et sa présence en quantité appréciable dans la cellule placent UBF dans une bonne position pour intervenir tôt lors de l'infection. Comme de fait, UBF fait partie d'un mécanisme qui limite la réplication virale très tôt dans le cycle infectieux, soit à partir du génome entrant, où il se relocalise.

Une réponse antivirale est souvent déjouée par un mécanisme viral. Dans le cas présent, la protéine virale VP16 semble être responsable de contrecarrer l'effet d'UBF sur la réplication virale. Cette fonction s'exerce en bloquant sa relocalisation au génome viral entrant. La forte présence de VP16 a aussi comme effet de rendre la production de particules virales infectieuses moins susceptible à UBF.

Somme toute, ces travaux ont permis plusieurs avancées. Premièrement, le facteur de transcription nucléolaire UBF possède maintenant une nouvelle fonction à sa liste : le rôle de restreindre la réplication du VHS-1. Une fonction antivirale d'UBF n'avait jamais été démontrée auparavant. Deuxièmement, la protéine VP16 se voit aussi attribuer une nouvelle fonction, celle de réduire l'impact d'UBF, par un mécanisme encore inconnu.

Finalement, les résultats obtenus contribuent à mieux comprendre la complexité de la relation entre le VHS-1 et la cellule hôte en décrivant une nouvelle défense antivirale et son évasion. Ils soulignent également l'impact important d'une restriction précoce lors d'une l'infection. Le rôle antiviral d'UBF s'applique probablement à d'autres virus *Herpesviridae*, et possiblement à d'autres virus à ADN qui se répliquent au noyau.

RÉFÉRENCES

- Abaitua F, Hollinshead M, Bolstad M, Crump CM & O'Hare P (2012) A Nuclear localization signal in herpesvirus protein VP1-2 is essential for infection via capsid routing to the nuclear pore. *J. Virol.* 86(17):8998-9014.
- 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.
- Adelman K, Salmon B & Baines JD (2001) Herpes simplex virus DNA packaging sequences adopt novel structures that are specifically recognized by a component of the cleavage and packaging machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(6):3086-3091.
- Advani SJ, Weichselbaum RR & Roizman B (2003) Herpes simplex virus 1 activates cdc2 to recruit topoisomerase II alpha for post-DNA synthesis expression of late genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(8):4825-4830.
- 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.
- Akhtar J & Shukla D (2009) Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.* 276(24):7228-7236.
- Amelio AL, McAnany PK & Bloom DC (2006) A chromatin insulator-like element in the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript region binds CCCTC-binding factor and displays enhancer-blocking and silencing activities. *J. Virol.* 80(5):2358-2368.
- 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.
- Aslani A, Olsson M & Elias P (2002) ATP-dependent unwinding of a minimal origin of DNA replication by the origin-binding protein and the single-strand DNA-binding protein ICP8 from herpes simplex virus type I. *J. Biol. Chem.* 277(43):41204-41212.
- 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.
- Ayrault O, Andrique L, Fauvin D, Eymin B, Gazzeri S & Seite P (2006) Human tumor suppressor p14ARF negatively regulates rRNA transcription and inhibits UBF1 transcription factor phosphorylation. *Oncogene* 25(58):7577-7586.
- 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.

- Balliet JW & Schaffer PA (2006) Point mutations in herpes simplex virus type 1 oriL, but not in oriS, reduce pathogenesis during acute infection of mice and impair reactivation from latency. *J. Virol.* 80(1):440-450.
- 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.
- Barr DP, Belz GT, Reading PC, Wojtasiak M, Whitney PG, Heath WR, Carbone FR & Brooks AG (2007) A role for plasmacytoid dendritic cells in the rapid IL-18-dependent activation of NK cells following HSV-1 infection. *Eur. J. Immunol.* 37(5):1334-1342.
- Bastian FO, Rabson AS, Yee CL & Tralka TS (1972) Herpesvirus hominis: isolation from human trigeminal ganglion. *Science* 178(4058):306-307.
- Bataille D & Epstein AL (1997) Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. *J. Virol.* 71(10):7736-7743.
- Bauer DW, Huffman JB, Homa FL & Evilevitch A (2013) Herpes virus genome, the pressure is on. *J. Am. Chem. Soc.* 135(30):11216-11221.
- Bazett-Jones DP, Leblanc B, Herfort M & Moss T (1994) Short-range DNA looping by the Xenopus HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* 264(5162):1134-1137.
- 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.
- Beckmann H, Chen JL, O'Brien T & Tjian R (1995) Coactivator and promoter-selective properties of RNA polymerase I TAFs. *Science* 270(5241):1506-1509.
- Belin S, Kindbeiter K, Hacot S, Albaret MA, Roca-Martinez JX, Therizols G, Grosso O & Diaz JJ (2010) Uncoupling ribosome biogenesis regulation from RNA polymerase I activity during herpes simplex virus type 1 infection. *RNA* 16(1):131-140.
- 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.
- Bell SP, Pikaard CS, Reeder RH & Tjian R (1989) Molecular mechanisms governing species-specific transcription of ribosomal RNA. *Cell* 59(3):489-497.
- Berk AJ, Boyer TG, Kapanidis AN, Ebright RH, Kobayashi NN, Horn PJ, Sullivan SM, Koop R, Surby MA & Triezenberg SJ (1998) Mechanisms of viral activators. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63:243-252.
- Bertrand L (2011) *Identification et caractérisation des domaines fonctionnels de la protéine UL24 du virus de l'herpès simplex 1.* (Institut National de la Recherche Scientifique, Québec). 193 p

- 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.
- Besse S & Puvion-Dutilleul F (1996) Intranuclear retention of ribosomal RNAs in response to herpes simplex virus type 1 infection. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 1):119-129.
- Bianchi ME, Crippa MP, Manfredi AA, Mezzapelle R, Rovere Querini P & Venereau E (2017) High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunol. Rev.* 280(1):74-82.
- Bianco C & Mohr I (2017) Restriction of Human Cytomegalovirus Replication by ISG15, a Host Effector Regulated by cGAS-STING Double-Stranded-DNA Sensing. *J. Virol.* 91(9).
- Blumel J & Matz B (1995) Thermosensitive UL9 gene function is required for early stages of herpes simplex virus type 1 DNA synthesis. *J. Gen. Virol.* 76 (Pt 12):3119-3124.
- Bogani F & Boehmer PE (2008) The replicative DNA polymerase of herpes simplex virus 1 exhibits apurinic/apyrimidinic and 5'-deoxyribose phosphate lyase activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(33):11709-11714.
- Bolivar J, Goenechea LG, Grenett H, Pendon C & Valdivia MM (1996) Cloning and sequencing of the genes encoding the hamster ribosomal transcription factors UBF1 and UBF2. *Gene* 176(1-2):257-258.
- Bourget A (2011) *Réorganisation nucléolaire des neurones suite à une infection par le virus de l'herpès simplex 1*. Master (Université du Québec).
- Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ & Richard DJ (2016) Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol. Biol.* 17(1):19.
- Brazda V, Coufal J, Liao JC & Arrowsmith CH (2012) Preferential binding of IFI16 protein to cruciform structure and superhelical DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422(4):716-720.
- Bridges KG, Chow CS & Coen DM (2001) Identification of crucial hydrogen-bonding residues for the interaction of herpes simplex virus DNA polymerase subunits via peptide display, mutational, and calorimetric approaches. *J. Virol.* 75(11):4990-4998.
- Brown JC & Newcomb WW (2011) Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. *Current opinion in virology* 1(2):142-149.
- Bruckner RC, Crute JJ, Dodson MS & Lehman IR (1991) The herpes simplex virus 1 origin binding protein: a DNA helicase. *J. Biol. Chem.* 266(4):2669-2674.
- Bryant HE, Wadd SE, Lamond AI, Silverstein SJ & Clements JB (2001) Herpes simplex virus IE63 (ICP27) protein interacts with spliceosome-associated protein 145 and inhibits splicing prior to the first catalytic step. *J. Virol.* 75(9):4376-4385.

- Bryant KF, Yan Z, Dreyfus DH & Knipe DM (2012) Identification of a divalent metal cation binding site in herpes simplex virus 1 (HSV-1) ICP8 required for HSV replication. *J. Virol.* 86(12):6825-6834.
- Cai W, Astor TL, Liptak LM, Cho C, Coen DM & Schaffer PA (1993) The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 enhances virus replication during acute infection and reactivation from latency. *J. Virol.* 67(12):7501-7512.
- Cai W & Schaffer PA (1992) Herpes simplex virus type 1 ICP0 regulates expression of immediate-early, early, and late genes in productively infected cells. *J. Virol.* 66(5):2904-2915.
- Calder JM & Stow ND (1990) Herpes simplex virus helicase-primase: the UL8 protein is not required for DNA-dependent ATPase and DNA helicase activities. *Nucleic Acids Res.* 18(12):3573-3578.
- 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.
- Carrington-Lawrence SD & Weller SK (2003) Recruitment of polymerase to herpes simplex virus type 1 replication foci in cells expressing mutant primase (UL52) proteins. *J. Virol.* 77(7):4237-4247.
- Carrozza MJ & DeLuca N (1998) The high mobility group protein 1 is a coactivator of herpes simplex virus ICP4 in vitro. *J. Virol.* 72(8):6752-6757.
- Cavanaugh AH, Hempel WM, Taylor LJ, Rogalsky V, Todorov G & Rothblum LI (1995) Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by Rb gene product. *Nature* 374(6518):177-180.
- Cavanaugh NA, Ramirez-Aguilar KA, Urban M & Kuchta RD (2009) Herpes simplex virus-1 helicase-primase: roles of each subunit in DNA binding and phosphodiester bond formation. *Biochemistry (Mosc.)* 48(43):10199-10207.
- Chan YK & Gack MU (2016) Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(6):360-373.
- 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.
- Chen Q, Lin L, Smith S, Huang J, Berger SL & Zhou J (2007) CTCF-dependent chromatin boundary element between the latency-associated transcript and ICP0 promoters in the herpes simplex virus type 1 genome. *J. Virol.* 81(10):5192-5201.
- Chou J & Roizman B (1985) Isomerization of herpes simplex virus 1 genome: identification of the cis-acting and recombination sites within the domain of the a sequence. *Cell* 41(3):803-811.

- Chouljenko DV, Jambunathan N, Chouljenko VN, Naderi M, Brylinski M, Caskey JR & Kousoulas KG (2016) Herpes Simplex Virus 1 UL37 Protein Tyrosine Residues Conserved among All Alphaherpesviruses Are Required for Interactions with Glycoprotein K, Cytoplasmic Virion Envelopment, and Infectious Virus Production. *J. Virol.* 90(22):10351-10361.
- Christensen MH & Paludan SR (2017) Viral evasion of DNA-stimulated innate immune responses. *Cell. Mol. Immunol.* 14(1):4-13.
- Chuluunbaatar U, Roller R, Feldman ME, Brown S, Shokat KM & Mohr I (2010) Constitutive mTORC1 activation by a herpesvirus Akt surrogate stimulates mRNA translation and viral replication. *Genes Dev.* 24(23):2627-2639.
- Church GA & Wilson DW (1997) Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly. *J. Virol.* 71(5):3603-3612.
- Clarke CJ, Apostolidis V, Hii LL, Gough DJ, Trapani JA & Johnstone RW (2003) Critical role of the transcription factor AP-1 for the constitutive and interferon-induced expression of IFI 16. *J. Cell. Biochem.* 89(1):80-93.
- Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue BY & Shukla D (2006) A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J. Cell Biol.* 174(7):1009-1021.
- Cliffe AR, Arbuckle JH, Vogel JL, Geden MJ, Rothbart SB, Cusack CL, Strahl BD, Kristie TM & Deshmukh M (2015) Neuronal Stress Pathway Mediating a Histone Methyl/Phospho Switch Is Required for Herpes Simplex Virus Reactivation. *Cell Host Microbe* 18(6):649-658.
- Cliffe AR, Coen DM & Knipe DM (2013) Kinetics of facultative heterochromatin and polycomb group protein association with the herpes simplex viral genome during establishment of latent infection. *mBio* 4(1).
- Cliffe AR, Garber DA & Knipe DM (2009) Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *J. Virol.* 83(16):8182-8190.
- Cliffe AR & Knipe DM (2008) Herpes simplex virus ICP0 promotes both histone removal and acetylation on viral DNA during lytic infection. *J. Virol.* 82(24):12030-12038.
- 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.
- Collins N, Hochheiser K, Carbone FR & Gebhardt T (2017) Sustained accumulation of antigen-presenting cells after infection promotes local T-cell immunity. *Immunol. Cell Biol.* 95(10):878-883.

- Comai L, Tanese N & Tjian R (1992) The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell* 68(5):965-976.
- Conley AJ, Knipe DM, Jones PC & Roizman B (1981) Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides. *J. Virol.* 37(1):191-206.
- Conn KL & Schang LM (2013) Chromatin dynamics during lytic infection with herpes simplex virus 1. *Viruses* 5(7):1758-1786.
- Conway JF, Homa F. L. (2011) Nucleocapsid structure, assembly and DNA packaging of herpes simplex virus. *Alphaherpesviruses*, Weller SK (Édit.). p 175-193.
- Cooper RS & Heldwein EE (2015) Herpesvirus gB: A Finely Tuned Fusion Machine. *Viruses* 7(12):6552-6569.
- 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.
- 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-Lourenco D, Anderson G, Sloan E, Orr A & Everett RD (2013) The viral ubiquitin ligase ICP0 is neither sufficient nor necessary for degradation of the cellular DNA sensor IFI16 during herpes simplex virus 1 infection. *J. Virol.* 87(24):13422-13432.
- Cuchet-Lourenco D, Boutell C, Lukashchuk V, Grant K, Sykes A, Murray J, Orr A & Everett RD (2011) SUMO pathway dependent recruitment of cellular repressors to herpes simplex virus type 1 genomes. *PLoS Pathog.* 7(7):e1002123.
- Dai-Ju JQ, Li L, Johnson LA & Sandri-Goldin RM (2006) ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. *J. Virol.* 80(7):3567-3581.
- Darwish AS, Grady LM, Bai P & Weller SK (2015) ICP8 Filament Formation Is Essential for Replication Compartment Formation during Herpes Simplex Virus Infection. *J. Virol.* 90(5):2561-2570.
- de la Cruz J, Gomez-Herreros F, Rodriguez-Galan O, Begley V, de la Cruz Munoz-Centeno M & Chavez S (2018) Feedback regulation of ribosome assembly. *Curr. Genet.* 64(2):393-404.
- 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.

- DeLuca NA & Schaffer PA (1985) Activation of immediate-early, early, and late promoters by temperature-sensitive and wild-type forms of herpes simplex virus type 1 protein ICP4. *Mol. Cell. Biol.* 5(8):1997-2008.
- Dembowski JA & DeLuca NA (2015) Selective recruitment of nuclear factors to productively replicating herpes simplex virus genomes. *PLoS Pathog.* 11(5):e1004939.
- Denes CE, Miranda-Saksena M, Cunningham AL & Diefenbach RJ (2018) Cytoskeletons in the Closet-Subversion in Alphaherpesvirus Infections. *Viruses* 10(2).
- Denissov S, van Driel M, Voit R, Hekkelman M, Hulsen T, Hernandez N, Grummt I, Wehrens R & Stunnenberg H (2007) Identification of novel functional TBP-binding sites and general factor repertoires. *The EMBO Journal* 26(4):944-954.
- 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.
- Dodding MP & Way M (2011) Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *EMBO J.* 30(17):3527-3539.
- Dodson MS & Lehman IR (1991) Association of DNA helicase and primase activities with a subassembly of the herpes simplex virus 1 helicase-primase composed of the UL5 and UL52 gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(4):1105-1109.
- 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.
- Du T, Zhou G & Roizman B (2011) HSV-1 gene expression from reactivated ganglia is disordered and concurrent with suppression of latency-associated transcript and miRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(46):18820-18824.
- Durand LO, Advani SJ, Poon AP & Roizman B (2005) The carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II is phosphorylated by a complex containing cdk9 and infected-cell protein 22 of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 79(11):6757-6762.
- Dutch RE, Zemelman BV & Lehman IR (1994) Herpes simplex virus type 1 recombination: the Uc-DR1 region is required for high-level a-sequence-mediated recombination. *J. Virol.* 68(6):3733-3741.
- Efstathiou S, Minson AC, Field HJ, Anderson JR & Wildy P (1986) Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans. *J. Virol.* 57(2):446-455.
- El Bilali N, Duron J, Gingras D & Lippe R (2017) Quantitative Evaluation of Protein Heterogeneity within Herpes Simplex Virus 1 Particles. *J. Virol.* 91(10):e00320-00317.
- Ellermann-Eriksen S (2005) Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virol. J.* 2:59.
- 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.

- Ertel MK, Cammarata AL, Hron RJ & Neumann DM (2012) CTCF occupation of the herpes simplex virus 1 genome is disrupted at early times postreactivation in a transcription-dependent manner. *J. Virol.* 86(23):12741-12759.
- Esclatine A, Taddeo B, Evans L & Roizman B (2004a) The herpes simplex virus 1 UL41 gene-dependent destabilization of cellular RNAs is selective and may be sequence-specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(10):3603-3608.
- Esclatine A, Taddeo B & Roizman B (2004b) Herpes simplex virus 1 induces cytoplasmic accumulation of TIA-1/TIAR and both synthesis and cytoplasmic accumulation of tristetraprolin, two cellular proteins that bind and destabilize AU-rich RNAs. *J. Virol.* 78(16):8582-8592.
- Esclatine A, Taddeo B & Roizman B (2004c) The UL41 protein of herpes simplex virus mediates selective stabilization or degradation of cellular mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(52):18165-18170.
- Everett RD (1984) Trans activation of transcription by herpes virus products: requirement for two HSV-1 immediate-early polypeptides for maximum activity. *EMBO J.* 3(13):3135-3141.
- 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, Sourvinos G, Leiper C, Clements JB & Orr A (2004) Formation of nuclear foci of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP4 at early times of infection: localization, dynamics, recruitment of ICP27, and evidence for the de novo induction of ND10-like complexes. *J. Virol.* 78(4):1903-1917.
- 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.
- Faber SW & Wilcox KW (1986) Association of the herpes simplex virus regulatory protein ICP4 with specific nucleotide sequences in DNA. *Nucleic Acids Res.* 14(15):6067-6083.
- Fan WH, Roberts AP, McElwee M, Bhella D, Rixon FJ & Lauder R (2015) The large tegument protein pUL36 is essential for formation of the capsid vertex-specific component at the capsid-tegument interface of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 89(3):1502-1511.

- 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.
- Fox HL, Dembowski JA & DeLuca NA (2017) A Herpesviral Immediate Early Protein Promotes Transcription Elongation of Viral Transcripts. *mBio* 8(3).
- Frank GM, Buela KA, Maker DM, Harvey SA & Hendricks RL (2012) Early responding dendritic cells direct the local NK response to control herpes simplex virus 1 infection within the cornea. *J. Immunol.* 188(3):1350-1359.
- Freeman ML, Sheridan BS, Bonneau RH & Hendricks RL (2007) Psychological stress compromises CD8+ T cell control of latent herpes simplex virus type 1 infections. *J. Immunol.* 179(1):322-328.
- 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.
- 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.
- Gariano GR, Dell'Oste V, Bronzini M, Gatti D, Luganini A, De Andrea M, Gribaudo G, Gariglio M & Landolfo S (2012) The intracellular DNA sensor IFI16 gene acts as restriction factor for human cytomegalovirus replication. *PLoS Pathog.* 8(1):e1002498.
- Gebrane-Younes J, Fomproix N & Hernandez-Verdun D (1997) When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 19):2429-2440.
- Germond JE, Hirt B, Oudet P, Gross-Bellark M & Chambon P (1975) Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72(5):1843-1847.
- Gerster T & Roeder RG (1988) A herpesvirus trans-activating protein interacts with transcription factor OTF-1 and other cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85(17):6347-6351.
- Gibeault RL, Conn KL, Bildersheim MD & Schang LM (2016) An Essential Viral Transcription Activator Modulates Chromatin Dynamics. *PLoS Pathog.* 12(8):e1005842.
- 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.
- Giese K, Amsterdam A & Grosschedl R (1991) DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev.* 5(12B):2567-2578.
- Goodfellow SJ & Zomerdijk JC (2013) Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcell. Biochem.* 61:211-236.

- Gorski JJ, Pathak S, Panov K, Kaschiukovic T, Panova T, Russell J & Zomerdijs JC (2007) A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *The EMBO Journal* 26(6):1560-1568.
- 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.
- Gray CP & Kaerner HC (1984) Sequence of the putative origin of replication in the UL region of herpes simplex virus type 1 ANG DNA. *J. Gen. Virol.* 65 (Pt 12):2109-2119.
- Gray KA, Yates B, Seal RL, Wright MW & Bruford EA (2015) Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D1079-1085.
- Green MT, Courtney RJ & Dunkel EC (1981) Detection of an immediate early herpes simplex virus type 1 polypeptide in trigeminal ganglia from latently infected animals. *Infect. Immun.* 34(3):987-992.
- Grob A, Colleran C & McStay B (2014a) Construction of synthetic nucleoli in human cells reveals how a major functional nuclear domain is formed and propagated through cell division. *Genes Dev.* 28(3):220-230.
- Grob A & McStay B (2014b) Construction of synthetic nucleoli and what it tells us about propagation of sub-nuclear domains through cell division. *Cell Cycle* 13(16):2501-2508.
- Grondin B & DeLuca N (2000) Herpes simplex virus type 1 ICP4 promotes transcription preinitiation complex formation by enhancing the binding of TFIID to DNA. *J. Virol.* 74(24):11504-11510.
- Grose C (2014) Korean war and the origin of herpes simplex virus 1 strain KOS. *J. Virol.* 88(7):3911.
- Grubor-Bauk B, Arthur JL & Mayrhofer G (2008) Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *J. Virol.* 82(22):11073-11083.
- Grueneberg DA, Pablo L, Hu KQ, August P, Weng Z & Papkoff J (2003) A functional screen in human cells identifies UBF2 as an RNA polymerase II transcription factor that enhances the beta-catenin signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 23(11):3936-3950.
- Grummt I, Roth E & Paule MR (1982) Ribosomal RNA transcription in vitro is species specific. *Nature* 296(5853):173-174.
- Grummt I & Voit R (2010) Linking rDNA transcription to the cellular energy supply. *Cell Cycle* 9(2):225-226.
- Gu H, Liang Y, Mandel G & Roizman B (2005) Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(21):7571-7576.
- Gu H & Roizman B (2007) Herpes simplex virus-infected cell protein 0 blocks the silencing of viral DNA by dissociating histone deacetylases from the CoREST-REST complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104(43):17134-17139.

- Gu H & Roizman B (2009) The two functions of herpes simplex virus 1 ICP0, inhibition of silencing by the CoREST/REST/HDAC complex and degradation of PML, are executed in tandem. *J. Virol.* 83(1):181-187.
- Gupta R, Warren T & Wald A (2007) Genital herpes. *Lancet* 370(9605):2127-2137.
- Gupte SS, Olson JW & Ruyechan WT (1991) The major herpes simplex virus type-1 DNA-binding protein is a zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.* 266(18):11413-11416.
- 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.
- Hall DB & Struhl K (2002) The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking in vivo. *J. Biol. Chem.* 277(48):46043-46050.
- Haltiner MM, Smale ST & Tjian R (1986) Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 6(1):227-235.
- Hamdane N, Stefanovsky VY, Tremblay MG, Nemeth A, Paquet E, Lessard F, Sanij E, Hannan R & Moss T (2014) Conditional inactivation of Upstream Binding Factor reveals its epigenetic functions and the existence of a somatic nucleolar precursor body. *PLoS Genet.* 10(8):e1004505.
- 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.
- Hancock MH, Cliffe AR, Knipe DM & Smiley JR (2010) Herpes simplex virus VP16, but not ICP0, is required to reduce histone occupancy and enhance histone acetylation on viral genomes in U2OS osteosarcoma cells. *J. Virol.* 84(3):1366-1375.
- Hannan KM, Brandenburger Y, Jenkins A, Sharkey K, Cavanaugh A, Rothblum L, Moss T, Poortinga G, McArthur GA, Pearson RB & Hannan RD (2003) mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol. Cell. Biol.* 23(23):8862-8877.
- Hannan KM, Hannan RD, Smith SD, Jefferson LS, Lun M & Rothblum LI (2000) Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene* 19(43):4988-4999.
- Hannan R, Stefanovsky V, Arino T, Rothblum L & Moss T (1999) Cellular regulation of ribosomal DNA transcription: both rat and *Xenopus* UBF1 stimulate rDNA transcription in 3T3 fibroblasts. *Nucleic Acids Res.* 27(4):1205-1213.
- Hannan RD, Stefanovsky V, Taylor L, Moss T & Rothblum LI (1996) Overexpression of the transcription factor UBF1 is sufficient to increase ribosomal DNA transcription in neonatal cardiomyocytes: implications for cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(16):8750-8755.

- Hardwicke MA & Schaffer PA (1997) Differential effects of nerve growth factor and dexamethasone on herpes simplex virus type 1 oriL- and oriS-dependent DNA replication in PC12 cells. *J. Virol.* 71(5):3580-3587.
- Hardy WR & Sandri-Goldin RM (1994) Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J. Virol.* 68(12):7790-7799.
- 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.
- Heix J & Grummt I (1995) Species specificity of transcription by RNA polymerase I. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5(5):652-656.
- Heming JD, Conway JF & Homa FL (2017) Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 223:119-142.
- 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.
- Herdman C, Mars JC, Stefanovsky VY, Tremblay MG, Sabourin-Felix M, Lindsay H, Robinson MD & Moss T (2017) A unique enhancer boundary complex on the mouse ribosomal RNA genes persists after loss of Rrn3 or UBF and the inactivation of RNA polymerase I transcription. *PLoS Genet.* 13(7):e1006899.
- Hernandez-Verdun D (2011) Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus* 2(3):189-194.
- Herrera FJ & Triezenberg SJ (2004) VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. *J. Virol.* 78(18):9689-9696.
- Heymann JB, Cheng N, Newcomb WW, Trus BL, Brown JC & Steven AC (2003) Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nat. Struct. Biol.* 10(5):334-341.
- Hisatake K, Nishimura T, Maeda Y, Hanada K, Song CZ & Muramatsu M (1991) Cloning and structural analysis of cDNA and the gene for mouse transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res.* 19(17):4631-4637.
- Hollenbach AD, McPherson CJ, Mientjes EJ, Iyengar R & Grosveld G (2002) Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J. Cell Sci.* 115(Pt 16):3319-3330.
- 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.

- Hoppe S, Schelhaas M, Jaeger V, Liebig T, Petermann P & Knebel-Morsdorf D (2006) Early herpes simplex virus type 1 infection is dependent on regulated Rac1/Cdc42 signalling in epithelial MDCKII cells. *J. Gen. Virol.* 87(Pt 12):3483-3494.
- Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E & Fitzgerald KA (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458(7237):514-518.
- Hozak P, Cook PR, Schofer C, Mosgoller W & Wachtler F (1994) Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 2):639-648.
- Hu CH, McStay B, Jeong SW & Reeder RH (1994) xUBF, an RNA polymerase I transcription factor, binds crossover DNA with low sequence specificity. *Mol. Cell. Biol.* 14(5):2871-2882.
- Hu CH, Wang JM & Tseng HB (1998) The first high-mobility-group box of upstream binding factor assembles across-over DNA junction by basic residues. *Biochem. J.* 333 (Pt 1):51-56.
- Huang J, Kent JR, Placek B, Whelan KA, Hollow CM, Zeng PY, Fraser NW & Berger SL (2006) Trimethylation of histone H3 lysine 4 by Set1 in the lytic infection of human herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 80(12):5740-5746.
- Huffman JB, Daniel GR, Falck-Pedersen E, Huet A, Smith GA, Conway JF & Homa FL (2017) The C Terminus of the Herpes Simplex Virus UL25 Protein Is Required for Release of Viral Genomes from Capsids Bound to Nuclear Pores. *J. Virol.* 91(15).
- Hwang YT, Liu BY, Coen DM & Hwang CB (1997) Effects of mutations in the Exo III motif of the herpes simplex virus DNA polymerase gene on enzyme activities, viral replication, and replication fidelity. *J. Virol.* 71(10):7791-7798.
- Igarashi K, Fawl R, Roller RJ & Roizman B (1993) Construction and properties of a recombinant herpes simplex virus 1 lacking both S-component origins of DNA synthesis. *J. Virol.* 67(4):2123-2132.
- Ishov AM & Maul GG (1996) The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J. Cell Biol.* 134(4):815-826.
- 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.
- Jackson SA & DeLuca NA (2003) Relationship of herpes simplex virus genome configuration to productive and persistent infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(13):7871-7876.
- Jambunathan N, Chouljenko D, Desai P, Charles AS, Subramanian R, Chouljenko VN & Kousoulas KG (2014) Herpes simplex virus 1 protein UL37 interacts with viral glycoprotein gK and membrane protein UL20 and functions in cytoplasmic virion envelopment. *J. Virol.* 88(11):5927-5935.
- 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.
- Jenkins FJ, Donoghue AM & Martin JR (1996) Deletion of the Herpes simplex 1 internal repeat sequences affects pathogenicity in the mouse. *Front. Biosci.* 1:a59-68.
- Jenkins FJ & Martin JR (1990) Role of the herpes simplex virus 1 internal repeat sequences in pathogenicity. *Intervirology* 31(2-4):129-138.
- Jiang C, Hwang YT, Randell JC, Coen DM & Hwang CB (2007) Mutations that decrease DNA binding of the processivity factor of the herpes simplex virus DNA polymerase reduce viral yield, alter the kinetics of viral DNA replication, and decrease the fidelity of DNA replication. *J. Virol.* 81(7):3495-3502.
- Jiang X, Brown D, Osorio N, Hsiang C, BenMohamed L & Wechsler SL (2016) Increased neurovirulence and reactivation of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT)-negative mutant dLAT2903 with a disrupted LAT miR-H2. *J. Neurovirol.* 22(1):38-49.
- Jiang X, Brown D, Osorio N, Hsiang C, Li L, Chan L, BenMohamed L & Wechsler SL (2015) A herpes simplex virus type 1 mutant disrupted for microRNA H2 with increased neurovirulence and rate of reactivation. *J. Neurovirol.* 21(2):199-209.
- Johnson KE, Bottero V, Flaherty S, Dutta S, Singh VV & Chandran B (2014) IFI16 Restricts HSV-1 Replication by Accumulating on the HSV-1 Genome, Repressing HSV-1 Gene Expression, and Directly or Indirectly Modulating Histone Modifications. *PLoS Pathog.* 10(11):e1004503.
- Johnson LA & Sandri-Goldin RM (2009) Efficient nuclear export of herpes simplex virus 1 transcripts requires both RNA binding by ICP27 and ICP27 interaction with TAP/NXF1. *J. Virol.* 83(3):1184-1192.
- Jones PC & Roizman B (1979) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. VIII. The transcription program consists of three phases during which both extent of transcription and accumulation of RNA in the cytoplasm are regulated. *J. Virol.* 31(2):299-314.
- Jovasevic V, Liang L & Roizman B (2008) Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J. Virol.* 82(7):3311-3319.
- Jovasevic V, Naghavi MH & Walsh D (2015) Microtubule plus end-associated CLIP-170 initiates HSV-1 retrograde transport in primary human cells. *J. Cell Biol.* 211(2):323-337.
- 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.
- Kalamvoki M & Roizman B (2010) Circadian CLOCK histone acetyl transferase localizes at ND10 nuclear bodies and enables herpes simplex virus gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(41):17721-17726.
- 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.

- Karen KA & Hearing P (2011) Adenovirus core protein VII protects the viral genome from a DNA damage response at early times after infection. *J. Virol.* 85(9):4135-4142.
- Kelly BJ, Bauerfeind R, Binz A, Sodeik B, Laimbacher AS, Fraefel C & Diefenbach RJ (2014) The interaction of the HSV-1 tegument proteins pUL36 and pUL37 is essential for secondary envelopment during viral egress. *Virology* 454-455:67-77.
- 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.
- Kent JR, Zeng PY, Atanasiu D, Gardner J, Fraser NW & Berger SL (2004) During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. *J. Virol.* 78(18):10178-10186.
- 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.
- Kerur N, Veettil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P & Chandran B (2011) IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* 9(5):363-375.
- Kim JY, Mandarino A, Chao MV, Mohr I & Wilson AC (2012a) Transient reversal of episome silencing precedes VP16-dependent transcription during reactivation of latent HSV-1 in neurons. *PLoS Pathog.* 8(2):e1002540.
- Kim M, Osborne NR, Zeng W, Donaghy H, McKinnon K, Jackson DC & Cunningham AL (2012b) Herpes simplex virus antigens directly activate NK cells via TLR2, thus facilitating their presentation to CD4 T lymphocytes. *J. Immunol.* 188(9):4158-4170.
- Klemm RD, Goodrich JA, Zhou S & Tjian R (1995) Molecular cloning and expression of the 32-kDa subunit of human TFIID reveals interactions with VP16 and TFIIB that mediate transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(13):5788-5792.
- Klupp BG, Granzow H, Keil GM & Mettenleiter TC (2006) The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. *J. Virol.* 80(13):6235-6246.
- Kobayashi N, Boyer TG & Berk AJ (1995) A class of activation domains interacts directly with TFIIA and stimulates TFIIA-TFIID-promoter complex assembly. *Mol. Cell. Biol.* 15(11):6465-6473.
- Kobayashi N, Horn PJ, Sullivan SM, Triezenberg SJ, Boyer TG & Berk AJ (1998) DA-complex assembly activity required for VP16C transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 18(7):4023-4031.
- Kobiler O, Lipman Y, Therkelsen K, Daubechies I & Enquist LW (2010) Herpesviruses carrying a Brainbow cassette reveal replication and expression of limited numbers of incoming genomes. *Nat. Commun.* 1:146.
- 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.

- Koffa MD, Clements JB, Izaurralde E, Wadd S, Wilson SA, Mattaj IW & Kuersten S (2001) Herpes simplex virus ICP27 protein provides viral mRNAs with access to the cellular mRNA export pathway. *EMBO J.* 20(20):5769-5778.
- 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.
- Kristie TM (2015) Dynamic modulation of HSV chromatin drives initiation of infection and provides targets for epigenetic therapies. *Virology* 479-480:555-561.
- Kristie TM, LeBowitz JH & Sharp PA (1989) The octamer-binding proteins form multi-protein--DNA complexes with the HSV alpha TIF regulatory protein. *EMBO J.* 8(13):4229-4238.
- Kubat NJ, Amelio AL, Giordani NV & Bloom DC (2004a) 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.
- Kubat NJ, Tran RK, McAnany P & Bloom DC (2004b) Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. *J. Virol.* 78(3):1139-1149.
- 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.
- Kurt-Jones EA, Orzalli MH & Knipe DM (2017) Innate Immune Mechanisms and Herpes Simplex Virus Infection and Disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 223:49-75.
- Kutluay SB, DeVos SL, Klomp JE & Triezenberg SJ (2009) Transcriptional coactivators are not required for herpes simplex virus type 1 immediate-early gene expression in vitro. *J. Virol.* 83(8):3436-3449.
- Kwon H & Green MR (1994) The RNA polymerase I transcription factor, upstream binding factor, interacts directly with the TATA box-binding protein. *J. Biol. Chem.* 269(48):30140-30146.
- Kwong AD, Kruper JA & Frenkel N (1988) Herpes simplex virus virion host shutoff function. *J. Virol.* 62(3):912-921.
- Lacasse JJ & Schang LM (2010) During lytic infections, herpes simplex virus type 1 DNA is in complexes with the properties of unstable nucleosomes. *J. Virol.* 84(4):1920-1933.
- Lai YS, Tseng HB & Hu CH (1996) The dimerization domain upstream binding factor contains multiple helical structures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220(3):816-823.
- 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.
- Lang F, Li X, Vladimirova O, Hu B, Chen G, Xiao Y, Singh V, Lu D, Li L, Han H, Wickramasinghe JM, Smith ST, Zheng C, Li Q, Lieberman PM, Fraser NW & Zhou J

- (2017) CTCF interacts with the lytic HSV-1 genome to promote viral transcription. *Sci Rep* 7:39861.
- Larson DE, Xie W, Glibetic M, O'Mahony D, Sells BH & Rothblum LI (1993) Coordinated decreases in rRNA gene transcription factors and rRNA synthesis during muscle cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(17):7933-7936.
- 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.
- Learned RM, Cordes S & Tjian R (1985) Purification and characterization of a transcription factor that confers promoter specificity to human RNA polymerase I. *Mol. Cell. Biol.* 5(6):1358-1369.
- 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.
- Learned RM & Tjian R (1982) In vitro transcription of human ribosomal RNA genes by RNA polymerase I. *J. Mol. Appl. Genet.* 1(6):575-584.
- Leblanc B, Read C & Moss T (1993) Recognition of the *Xenopus* ribosomal core promoter by the transcription factor xUBF involves multiple HMG box domains and leads to an xUBF interdomain interaction. *EMBO J.* 12(2):513-525.
- Lee JS, Raja P, Pan D, Pesola JM, Coen DM & Knipe DM (2018) CCCTC-Binding Factor Acts as a Heterochromatin Barrier on Herpes Simplex Viral Latent Chromatin and Contributes to Poised Latent Infection. *mbio* 9(1).
- Lee MN, Roy M, Ong SE, Mertins P, Villani AC, Li W, Dotiwala F, Sen J, Doench JG, Orzalli MH, Kramnik I, Knipe DM, Lieberman J, Carr SA & Hacohen N (2013) Identification of regulators of the innate immune response to cytosolic DNA and retroviral infection by an integrative approach. *Nat. Immunol.* 14(2):179-185.
- Lee SS & Lehman IR (1997) Unwinding of the box I element of a herpes simplex virus type 1 origin by a complex of the viral origin binding protein, single-strand DNA binding protein, and single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(7):2838-2842.
- 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.
- Leopardi R, Michael N & Roizman B (1995) Repression of the herpes simplex virus 1 alpha 4 gene by its gene product (ICP4) within the context of the viral genome is conditioned by the distance and stereoaxial alignment of the ICP4 DNA binding site relative to the TATA box. *J. Virol.* 69(5):3042-3048.
- Leung AK, Gerlich D, Miller G, Lyon C, Lam YW, Lleres D, Daigle N, Zomerdijs 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.
- Li L, Johnson LA, Dai-Ju JQ & Sandri-Goldin RM (2008) Hsc70 focus formation at the periphery of HSV-1 transcription sites requires ICP27. *PLoS ONE* 3(1):e1491.

- Li T, Diner BA, Chen J & Cristea IM (2012) Acetylation modulates cellular distribution and DNA sensing ability of interferon-inducible protein IFI16. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(26):10558-10563.
- Liang Y, Vogel JL, Narayanan A, Peng H & Kristie TM (2009) Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks alpha-herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nat. Med.* 15(11):1312-1317.
- 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.
- Lin C-Y, Navarro S, Reddy S & Comai L (2006) *CK2-mediated stimulation of Pol I transcription by stabilization of UBF-SL1 interaction.* 4752-4766 p
- 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.
- Lockshon D & Galloway DA (1986) Cloning and characterization of oriL2, a large palindromic DNA replication origin of herpes simplex virus type 2. *J. Virol.* 58(2):513-521.
- Long MC, Leong V, Schaffer PA, Spencer CA & Rice SA (1999) ICP22 and the UL13 protein kinase are both required for herpes simplex virus-induced modification of the large subunit of RNA polymerase II. *J. Virol.* 73(7):5593-5604.
- 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 (2008a) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 82(17):8605-8618.
- Loret S, Guay G & Lippe R (2008b) Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 82(17):8605-8618.
- Lukashchuk V & Everett RD (2010) Regulation of ICP0-null mutant herpes simplex virus type 1 infection by ND10 components ATRX and hDaxx. *J. Virol.* 84(8):4026-4040.
- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R & Iwasaki A (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198(3):513-520.
- Lycke E, Kristensson K, Svennerholm B, Vahlne A & Ziegler R (1984) Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture. *J. Gen. Virol.* 65 (Pt 1):55-64.

- 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.
- Ma JZ, Russell TA, Spelman T, Carbone FR & Tschärke DC (2014) Lytic gene expression is frequent in HSV-1 latent infection and correlates with the engagement of a cell-intrinsic transcriptional response. *PLoS Pathog.* 10(7):e1004237.
- Madej T, Lanczycki CJ, Zhang D, Thiessen PA, Geer RC, Marchler-Bauer A & Bryant SH (2014) MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue):D297-303.
- Maeda Y, Hisatake K, Kondo T, Hanada K, Song CZ, Nishimura T & Muramatsu M (1992) Mouse rRNA gene transcription factor mUBF requires both HMG-box1 and an acidic tail for nucleolar accumulation: molecular analysis of the nucleolar targeting mechanism. *EMBO J.* 11(10):3695-3704.
- Mahiet C, Ergani A, Huot N, Alende N, Azough A, Salvaire F, Bensimon A, Conseiller E, Wain-Hobson S, Labetoulle M & Barradeau S (2012) Structural variability of the herpes simplex virus 1 genome in vitro and in vivo. *J. Virol.* 86(16):8592-8601.
- Maillet S, Naas T, Crepin S, Roque-Afonso AM, Lafay F, Efstathiou S & Labetoulle M (2006) Herpes simplex virus type 1 latently infected neurons differentially express latency-associated and ICP0 transcripts. *J. Virol.* 80(18):9310-9321.
- 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.
- Mark KE, Wald A, Magaret AS, Selke S, Olin L, Huang ML & Corey L (2008) Rapidly cleared episodes of herpes simplex virus reactivation in immunocompetent adults. *J. Infect. Dis.* 198(8):1141-1149.
- Martin DW & Weber PC (1996) The a sequence is dispensable for isomerization of the herpes simplex virus type 1 genome. *J. Virol.* 70(12):8801-8812.
- Matta MK & Panagiotidis CA (2008) High-mobility group protein A1 binds herpes simplex virus gene regulatory sequences and affects their expression. *Arch. Virol.* 153(7):1251-1262.
- 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.
- Maul GG, Ishov AM & Everett RD (1996) Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology* 217(1):67-75.

- McStay B, Frazier MW & Reeder RH (1991a) xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription. *Genes Dev.* 5(11):1957-1968.
- McStay B, Hu CH, Pikaard CS & Reeder RH (1991b) xUBF and Rib 1 are both required for formation of a stable polymerase I promoter complex in *X. laevis*. *EMBO J.* 10(8):2297-2303.
- McStay B, Sullivan GJ & Cairns C (1997) The *Xenopus* RNA polymerase I transcription factor, UBF, has a role in transcriptional enhancement distinct from that at the promoter. *EMBO J.* 16(2):396-405.
- Mears WE & Rice SA (1998) The herpes simplex virus immediate-early protein ICP27 shuttles between nucleus and cytoplasm. *Virology* 242(1):128-137.
- Meraner J, Lechner M, Loidl A, Goralik-Schramel M, Voit R, Grummt I & Loidl P (2006) Acetylation of UBF changes during the cell cycle and regulates the interaction of UBF with RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res.* 34(6):1798-1806.
- Merkel PE, Orzalli M & Knipe DM (2018) Mechanisms of Host IFI16, PML and Daxx Protein Restriction of Herpes Simplex Virus 1 Replication. *J. Virol.* 10.1128/JVI.00057-18.
- Mertz GJ (2008) Asymptomatic shedding of herpes simplex virus 1 and 2: implications for prevention of transmission. *J. Infect. Dis.* 198(8):1098-1100.
- Mettenleiter TC (2016) Breaching the Barrier-The Nuclear Envelope in Virus Infection. *J. Mol. Biol.* 428(10 Pt A):1949-1961.
- Mettenleiter TC, Klupp BG & Granzow H (2006) Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(4):423-429.
- Michael N & Roizman B (1993) Repression of the herpes simplex virus 1 alpha 4 gene by its gene product occurs within the context of the viral genome and is associated with all three identified cognate sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(6):2286-2290.
- Mijatov B, Cunningham AL & Diefenbach RJ (2007) Residues F593 and E596 of HSV-1 tegument protein pUL36 (VP1/2) mediate binding of tegument protein pUL37. *Virology* 368(1):26-31.
- 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.
- Minaker RL, Mossman KL & Smiley JR (2005) Functional inaccessibility of quiescent herpes simplex virus genomes. *Virol. J.* 2:85.
- Mohni KN, Dee AR, Smith S, Schumacher AJ & Weller SK (2013) Efficient herpes simplex virus 1 replication requires cellular ATR pathway proteins. *J. Virol.* 87(1):531-542.
- 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.
- Mossman KL & Smiley JR (1999) Truncation of the C-terminal acidic transcriptional activation domain of herpes simplex virus VP16 renders expression of the immediate-early genes almost entirely dependent on ICP0. *J. Virol.* 73(12):9726-9733.

- Mott KR, Bresee CJ, Allen SJ, BenMohamed L, Wechsler SL & Ghiasi H (2009) Level of herpes simplex virus type 1 latency correlates with severity of corneal scarring and exhaustion of CD8⁺ T cells in trigeminal ganglia of latently infected mice. *J. Virol.* 83(5):2246-2254.
- Mott KR, Underhill D, Wechsler SL & Ghiasi H (2008) Lymphoid-related CD11c⁺ CD8alpha⁺ dendritic cells are involved in enhancing herpes simplex virus type 1 latency. *J. Virol.* 82(20):9870-9879.
- Muggeridge MI & Fraser NW (1986) Chromosomal organization of the herpes simplex virus genome during acute infection of the mouse central nervous system. *J. Virol.* 59(3):764-767.
- 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.
- Naghavi MH & Walsh D (2017) Microtubule Regulation and Function during Virus Infection. *J. Virol.* 91(16).
- Nandakumar S, Woolard SN, Yuan D, Rouse BT & Kumaraguru U (2008) Natural killer cells as novel helpers in anti-herpes simplex virus immune response. *J. Virol.* 82(21):10820-10831.
- 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, Cockrell SK, Homa FL & Brown JC (2009) Polarized DNA ejection from the herpesvirus capsid. *J. Mol. Biol.* 392(4):885-894.
- 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.
- O'Hara M, Rixon FJ, Stow ND, Murray J, Murphy M & Preston VG (2010) Mutational analysis of the herpes simplex virus type 1 UL25 DNA packaging protein reveals regions that are important after the viral DNA has been packaged. *J. Virol.* 84(9):4252-4263.
- O'Hare P & Hayward GS (1985) Evidence for a direct role for both the 175,000- and 110,000-molecular-weight immediate-early proteins of herpes simplex virus in the transactivation of delayed-early promoters. *J. Virol.* 53(3):751-760.
- O'Mahony DJ & Rothblum LI (1991) Identification of two forms of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(8):3180-3184.
- O'Mahony DJ, Smith SD, Xie W & Rothblum LI (1992a) Analysis of the phosphorylation, DNA-binding and dimerization properties of the RNA polymerase I transcription factors UBF1 and UBF2. *Nucleic Acids Res.* 20(6):1301-1308.
- O'Mahony DJ, Xie WQ, Smith SD, Singer HA & Rothblum LI (1992b) Differential phosphorylation and localization of the transcription factor UBF in vivo in response to serum deprivation. In vitro dephosphorylation of UBF reduces its transactivation properties. *J. Biol. Chem.* 267(1):35-38.
- O'Sullivan AC, Sullivan GJ & McStay B (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol. Cell. Biol.* 22(2):657-668.
- Oh J & Fraser NW (2008) Temporal association of the herpes simplex virus genome with histone proteins during a lytic infection. *J. Virol.* 82(7):3530-3537.
- Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U & Helenius A (2000) Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 20(13):4922-4931.
- Okamoto H, Watanabe TA & Horiuchi T (2011) Double rolling circle replication (DRCR) is recombinogenic. *Genes Cells* 16(5):503-513.
- Orzalli MH, Conwell SE, Berrios C, DeCaprio JA & Knipe DM (2013) Nuclear interferon-inducible protein 16 promotes silencing of herpesviral and transfected DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(47):E4492-4501.
- Orzalli MH, DeLuca NA & Knipe DM (2012) Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(44):E3008-3017.
- Orzalli MH & Knipe DM (2014) Cellular sensing of viral DNA and viral evasion mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 68:477-492.
- Owen DJ, Crump CM & Graham SC (2015) Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. *Viruses* 7(9):5084-5114.
- 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 (2006a) UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J.* 25(14):3310-3322.
- Panov KI, Panova TB, Gadad O, Nishiyama K, Saito T, Russell J & Zomerdijk JCBM (2006b) RNA polymerase I-specific subunit CAST/hPAF49 has a role in the activation of transcription by upstream binding factor. *Mol. Cell. Biol.* 26(14):5436-5448.
- Panova TB, Panov KI, Russell J & Zomerdijk JCBM (2006) Casein Kinase 2 Associates with Initiation-Competent RNA Polymerase I and Has Multiple Roles in Ribosomal DNA Transcription. *Mol. Cell. Biol.* 26(16):5957-5968.
- 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.
- Pasieka TJ, Cilloniz C, Lu B, Teal TH, Proll SC, Katze MG & Leib DA (2009) Host responses to wild-type and attenuated herpes simplex virus infection in the absence of Stat1. *J. Virol.* 83(5):2075-2087.
- Pelletier G, Stefanovsky VY, Faubladier M, Hirschler-Laszkiewicz 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.
- Phelan D, Barrozo ER & Bloom DC (2017) HSV1 latent transcription and non-coding RNA: A critical retrospective. *J. Neuroimmunol.* 308:65-101.
- Pikaard CS, McStay B, Schultz MC, Bell SP & Reeder RH (1989) The Xenopus ribosomal gene enhancers bind an essential polymerase I transcription factor, xUBF. *Genes Dev.* 3(11):1779-1788.
- Placek BJ, Huang J, Kent JR, Dorsey J, Rice L, Fraser NW & Berger SL (2009) The histone variant H3.3 regulates gene expression during lytic infection with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 83(3):1416-1421.
- Poffenberger KL & Roizman B (1985) A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J. Virol.* 53(2):587-595.
- 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.
- Preston VG, Murray J, Preston CM, McDougall IM & Stow ND (2008) The UL25 gene product of herpes simplex virus type 1 is involved in uncoating of the viral genome. *J. Virol.* 82(13):6654-6666.
- Purifoy DJ, Lewis RB & Powell KL (1977) Identification of the herpes simplex virus DNA polymerase gene. *Nature* 269(5629):621-623.

- 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.
- Raja P, Lee JS, Pan D, Pesola JM, Coen DM & Knipe DM (2016) A Herpesviral Lytic Protein Regulates the Structure of Latent Viral Chromatin. *mBio* 7(3).
- Randell JC, Komazin G, Jiang C, Hwang CB & Coen DM (2005) Effects of substitutions of arginine residues on the basic surface of herpes simplex virus UL42 support a role for DNA binding in processive DNA synthesis. *J. Virol.* 79(18):12025-12034.
- Read CM, Cary PD, Crane-Robinson C, Driscoll PC & Norman DG (1993) Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res.* 21(15):3427-3436.
- Reeves R (2015) High mobility group (HMG) proteins: Modulators of chromatin structure and DNA repair in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)* 36:122-136.
- 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.
- Rice SA, Long MC, Lam V, Schaffer PA & Spencer CA (1995) Herpes simplex virus immediate-early protein ICP22 is required for viral modification of host RNA polymerase II and establishment of the normal viral transcription program. *J. Virol.* 69(9):5550-5559.
- Roberts MS, Boundy A, O'Hare P, Pizzorno MC, Ciufo DM & Hayward GS (1988) Direct correlation between a negative autoregulatory response element at the cap site of the herpes simplex virus type 1 IE175 (alpha 4) promoter and a specific binding site for the IE175 (ICP4) protein. *J. Virol.* 62(11):4307-4320.
- Rock DL, Nesburn AB, Ghiasi H, Ong J, Lewis TL, Lokensgard JR & Wechsler SL (1987) Detection of latency-related viral RNAs in trigeminal ganglia of rabbits latently infected with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 61(12):3820-3826.
- Rode K, Dohner K, Binz A, Glass M, Strive T, Bauerfeind R & Sodeik B (2011) Uncoupling uncoating of herpes simplex virus genomes from their nuclear import and gene expression. *J. Virol.* 85(9):4271-4283.
- Rodriguez-Sanchez JL, Gelpi C, Juarez C & Hardin JA (1987) Anti-NOR 90. A new autoantibody in scleroderma that recognizes a 90-kDa component of the nucleolus-organizing region of chromatin. *J. Immunol.* 139(8):2579-2584.
- Roizman B (2011) The checkpoints of viral gene expression in productive and latent infection: The role of the HDAC/CoREST/LSD1/REST repressor complex. *J. Virol.* JVI.00180-11 [pii]
10.1128/JVI.00180-11.
- Roizman B, Knipe DM & Whitley RJ (2007) Herpes Simplex Viruses. *Fields Virology*, Knipe DM (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins, Vol 2. p 3177

- Roizman B, Knipe DM & Whitley RJ (2013) Herpes Simplex Viruses. *Fields Virology*, Knipe DM & Howley PM (Édit.) Lippincott Williams & Wilkins 6th Ed Vol II. p 1823-1897.
- Roller JR & Baines DJ (2017) Herpesvirus Nuclear Egress. *Cell Biology of Herpes Viruses*, (Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Osterrieder K (Édit.) Springer International Publishing, Vol 223. p 224.
- 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.
- Roussel P, Andre C, Masson C, Geraud G & Hernandez-Verdun D (1993) Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 2):327-337.
- Russell TA & Tschärke DC (2016) Lytic Promoters Express Protein during Herpes Simplex Virus Latency. *PLoS Pathog.* 12(6):e1005729.
- 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.
- Sandgren KJ, Bertram K & Cunningham AL (2016) Understanding natural herpes simplex virus immunity to inform next-generation vaccine design. *Clin Transl Immunology* 5(7):e94.
- Sandri-Goldin RM (1998) ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. *Genes Dev.* 12(6):868-879.
- Sanij E, Diesch J, Lesmana A, Poortinga G, Hein N, Lidgerwood G, Cameron DP, Ellul J, Goodall GJ, Wong LH, Dhillon AS, Hamdane N, Rothblum LI, Pearson RB, Haviv I, Moss T & Hannan RD (2015) A novel role for the Pol I transcription factor UBTF in maintaining genome stability through the regulation of highly transcribed Pol II genes. *Genome Res.* 25(2):201-212.
- Sanij E, Poortinga G, Sharkey K, Hung S, Holloway TP, Quin J, Robb E, Wong LH, Thomas WG, Stefanovsky V, Moss T, Rothblum L, Hannan KM, McArthur GA, Pearson RB & Hannan RD (2008) UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals. *J. Cell Biol.* 183(7):1259-1274.
- Sarisky RT & Weber PC (1994) Requirement for double-strand breaks but not for specific DNA sequences in herpes simplex virus type 1 genome isomerization events. *J. Virol.* 68(1):34-47.
- Sathiyamoorthy K, Chen J, Longnecker R & Jardetzky TS (2017) The COMPLEXity in herpesvirus entry. *Current opinion in virology* 24:97-104.
- Sawtell NM & Thompson RL (1992) Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J. Virol.* 66(4):2150-2156.
- Sawtell NM, Triezenberg SJ & Thompson RL (2011) VP16 serine 375 is a critical determinant of herpes simplex virus exit from latency in vivo. *J. Neurovirol.* 17(6):546-551.

- Scherer M & Stamminger T (2016) Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *J. Virol.* 90(13):5850-5854.
- Schrag JD, Prasad BV, Rixon FJ & Chiu W (1989) Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid. *Cell* 56(4):651-660.
- Sciortino MT, Parisi T, Siracusano G, Mastino A, Taddeo B & Roizman B (2013) The virion host shutoff RNase plays a key role in blocking the activation of protein kinase R in cells infected with herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 87(6):3271-3276.
- Sciortino MT, Taddeo B, Giuffre-Cuculletto M, Medici MA, Mastino A & Roizman B (2007) Replication-competent herpes simplex virus 1 isolates selected from cells transfected with a bacterial artificial chromosome DNA lacking only the UL49 gene vary with respect to the defect in the UL41 gene encoding host shutoff RNase. *J. Virol.* 81(20):10924-10932.
- Sekine E, Schmidt N, Gaboriau D & O'Hare P (2017) Spatiotemporal dynamics of HSV genome nuclear entry and compaction state transitions using bioorthogonal chemistry and super-resolution microscopy. *PLoS Pathog.* 13(11):e1006721.
- Severini A, Morgan AR, Tovell DR & Tyrrell DL (1994) Study of the structure of replicative intermediates of HSV-1 DNA by pulsed-field gel electrophoresis. *Virology* 200(2):428-435.
- 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.
- Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM & Pandolfi PP (2006) The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol. Cell* 24(3):331-339.
- Sherman G, Gottlieb J & Challberg MD (1992) The UL8 subunit of the herpes simplex virus helicase-primase complex is required for efficient primer utilization. *J. Virol.* 66(8):4884-4892.
- Shu M, Taddeo B & Roizman B (2015) Tristetraprolin Recruits the Herpes Simplex Virion Host Shutoff RNase to AU-Rich Elements in Stress Response mRNAs To Enable Their Cleavage. *J. Virol.* 89(10):5643-5650.
- Shu M, Taddeo B, Zhang W & Roizman B (2013) Selective degradation of mRNAs by the HSV host shutoff RNase is regulated by the UL47 tegument protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110(18):E1669-1675.
- Simonin D, Diaz JJ, Masse T & Madjar JJ (1997) Persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 2):435-443.
- 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.

- Skaliter R & Lehman IR (1994) Rolling circle DNA replication in vitro by a complex of herpes simplex virus type 1-encoded enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(22):10665-10669.
- 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.
- Smibert CA, Popova B, Xiao P, Capone JP & Smiley JR (1994) Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *J. Virol.* 68(4):2339-2346.
- Smiley JR & Duncan J (1997) Truncation of the C-terminal acidic transcriptional activation domain of herpes simplex virus VP16 produces a phenotype similar to that of the in1814 linker insertion mutation. *J. Virol.* 71(8):6191-6193.
- Smiley JR, Duncan J & Howes M (1990) Sequence requirements for DNA rearrangements induced by the terminal repeat of herpes simplex virus type 1 KOS DNA. *J. Virol.* 64(10):5036-5050.
- Smiley JR, Fong BS & Leung WC (1981) Construction of a double-jointed herpes simplex viral DNA molecule: inverted repeats are required for segment inversion, and direct repeats promote deletions. *Virology* 113(1):345-362.
- Smith AG (2017) Assembly and Egress of an Alphaherpesvirus Clockwork. *Cell Biology of Herpes Viruses*, (Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Osterrieder K (Édit.) Springer International Publishing
- Vol 223. p 224.
- Smith DE, Tans SJ, Smith SB, Grimes S, Anderson DL & Bustamante C (2001a) The bacteriophage straight phi29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413(6857):748-752.
- Smith GA, Gross SP & Enquist LW (2001b) Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(6):3466-3470.
- Smith SD, O'Mahony DJ, Kinsella BT & Rothblum LI (1993) Transcription from the rat 45S ribosomal DNA promoter does not require the factor UBF. *Gene Expr.* 3(3):229-236.
- Snyder A, Wisner TW & Johnson DC (2006) Herpes simplex virus capsids are transported in neuronal axons without an envelope containing the viral glycoproteins. *J. Virol.* 80(22):11165-11177.
- Sodeik B (2000) Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol.* 8(10):465-472.
- 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.
- St Leger AJ & Hendricks RL (2011) CD8+ T cells patrol HSV-1-infected trigeminal ganglia and prevent viral reactivation. *J. Neurovirol.* 17(6):528-534.
- 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 VY, Bazett-Jones DP, Pelletier G & Moss T (1996) The DNA supercoiling architecture induced by the transcription factor xUBF requires three of its five HMG-boxes. *Nucleic Acids Res.* 24(16):3208-3215.
- Stefanovsky VY, Langlois F, Bazett-Jones D, Pelletier G & Moss T (2006a) 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, Langlois F, Gagnon-Kugler T, Rothblum LI & Moss T (2006b) 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 & 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.
- Stern S, Tanaka M & Herr W (1989) The Oct-1 homoeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16. *Nature* 341(6243):624-630.
- Sternsdorf T, Jensen K & Will H (1997) Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J. Cell Biol.* 139(7):1621-1634.
- 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 (1982) Localization of an origin of DNA replication within the TRS/IRS repeated region of the herpes simplex virus type 1 genome. *EMBO J.* 1(7):863-867.
- 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.
- Strang BL & Stow ND (2005) Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *J. Virol.* 79(19):12487-12494.
- Strom T & Frenkel N (1987) Effects of herpes simplex virus on mRNA stability. *J. Virol.* 61(7):2198-2207.
- 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.
- Sullivan GJ & McStay B (1998) Dimerization and HMG box domains 1-3 present in Xenopus UBF are sufficient for its role in transcriptional enhancement. *Nucleic Acids Res.* 26(15):3555-3561.

- 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.
- Taddeo B & Roizman B (2006a) The virion host shutoff protein (UL41) of herpes simplex virus 1 is an endoribonuclease with a substrate specificity similar to that of RNase A. *J. Virol.* 80(18):9341-9345.
- Taddeo B, Zhang W & Roizman B (2006b) The U(L)41 protein of herpes simplex virus 1 degrades RNA by endonucleolytic cleavage in absence of other cellular or viral proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(8):2827-2832.
- Taddeo B, Zhang W & Roizman B (2013) The herpes simplex virus host shutoff RNase degrades cellular and viral mRNAs made before infection but not viral mRNA made after infection. *J. Virol.* 87(8):4516-4522.
- Tang J, Wu S, Liu H, Stratt R, Barak OG, Shiekhhattar R, Picketts DJ & Yang X (2004) A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. *J. Biol. Chem.* 279(19):20369-20377.
- Tang S, Patel A & Krause PR (2016) Herpes simplex virus ICP27 regulates alternative pre-mRNA polyadenylation and splicing in a sequence-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113(43):12256-12261.
- 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.
- Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA & Fitzgerald KA (2011) Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3(6):920-940.
- Thompson RL, Preston CM & Sawtell NM (2009) De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from HSV latency in vivo. *PLoS Pathog.* 5(3):e1000352.
- Thompson RL & Sawtell NM (2001) Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival. *J. Virol.* 75(14):6660-6675.
- 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.* JVI.00837-11 [pii]
10.1128/JVI.00837-11.
- Triezenberg SJ, Kingsbury RC & McKnight SL (1988a) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* 2(6):718-729.

- Triezenberg SJ, LaMarco KL & McKnight SL (1988b) Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev.* 2(6):730-742.
- 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.
- Tsai RY & Pederson T (2014) Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease. *FASEB J.* 28(8):3290-3296.
- 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.
- Ueshima S, Nagata K & Okuwaki M (2017) Internal Associations of the Acidic Region of Upstream Binding Factor Control Its Nucleolar Localization. *Mol. Cell. Biol.* 37(22).
- Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM & Cullen BR (2008) MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 454(7205):780-783.
- Umbach JL, Nagel MA, Cohrs RJ, Gilden DH & Cullen BR (2009) Analysis of human alphaherpesvirus microRNA expression in latently infected human trigeminal ganglia. *J. Virol.* 83(20):10677-10683.
- Umene K & Fukumaki Y (2011) DNA genome of spontaneously occurring deletion mutants of herpes simplex virus type 1 lacking one copy of the inverted repeat sequences of the L component. *Arch. Virol.* 156(8):1305-1315.
- Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR & Bowie AG (2010) IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* 11(11):997-1004.
- Van Damme E, Laukens K, Dang TH & Van Ostade X (2010) A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci* 6(1):51-67.
- van de Nobelen S, Rosa-Garrido M, Leers J, Heath H, Souchit W, Joosen L, Jonkers I, Demmers J, van der Reijden M, Torrano V, Grosveld F, Delgado MD, Renkawitz R, Galjart N & Sleutels F (2010) CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats. *Epigenetics Chromatin* 3(1):19.
- 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.

- van Leeuwen H, Okuwaki M, Hong R, Chakravarti D, Nagata K & O'Hare P (2003) Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 interacts with TAF-I proteins and inhibits nucleosome assembly but not regulation of histone acetylation by INHAT. *J. Gen. Virol.* 84(Pt 9):2501-2510.
- Vayda ME, Rogers AE & Flint SJ (1983) The structure of nucleoprotein cores released from adenovirions. *Nucleic Acids Res.* 11(2):441-460.
- Vlazny DA & Frenkel N (1981) Replication of herpes simplex virus DNA: localization of replication recognition signals within defective virus genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78(2):742-746.
- Vogel K, Thomann S, Vogel B, Schuster P & Schmidt B (2014) Both plasmacytoid dendritic cells and monocytes stimulate natural killer cells early during human herpes simplex virus type 1 infections. *Immunology* 143(4):588-600.
- Voit R & Grummt I (2001) Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(24):13631-13636.
- Voit R, Hoffmann M & Grummt I (1999) Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J.* 18(7):1891-1899.
- Voit R, Kuhn A, Sander EE & Grummt I (1995) Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res.* 23(14):2593-2599.
- Voit R, Schafer K & Grummt I (1997) Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* 17(8):4230-4237.
- Voit R, Schnapp A, Kuhn A, Rosenbauer H, Hirschmann P, Stunnenberg HG & Grummt I (1992) The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J.* 11(6):2211-2218.
- 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.
- Walsh D & Mohr I (2004) Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells. *Genes Dev.* 18(6):660-672.
- Walsh D, Perez C, Notary J & Mohr I (2005) Regulation of the translation initiation factor eIF4F by multiple mechanisms in human cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol.* 79(13):8057-8064.
- Wang QY, Zhou C, Johnson KE, Colgrove RC, Coen DM & Knipe DM (2005) 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.
- Ward AS & Weller KS (2011) HSV-1 DNA replication. *Alphaherpesviruses*, Weller KS (Édit.) Caister Academic Press. p 89-112.

- Washington SD, Musarrat F, Ertel MK, Backes GL & Neumann DM (2018) CTCF Binding Sites in the Herpes Simplex Virus 1 Genome Display Site-Specific CTCF Occupation, Protein Recruitment, and Insulator Function. *J. Virol.* 92(8).
- Watson RJ & Clements JB (1980) A herpes simplex virus type 1 function continuously required for early and late virus RNA synthesis. *Nature* 285(5763):329-330.
- Weber PC, Challberg MD, Nelson NJ, Levine M & Glorioso JC (1988) Inversion events in the HSV-1 genome are directly mediated by the viral DNA replication machinery and lack sequence specificity. *Cell* 54(3):369-381.
- Weir HM, Kraulis PJ, Hill CS, Raine AR, Laue ED & Thomas JO (1993) Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J.* 12(4):1311-1319.
- Whitlow Z & Kristie TM (2009) Recruitment of the transcriptional coactivator HCF-1 to viral immediate-early promoters during initiation of reactivation from latency of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 83(18):9591-9595.
- Worrall G (2009) Herpes labialis. *BMJ Clin Evid* 2009.
- Wu CA, Nelson NJ, McGeoch DJ & Challberg MD (1988) Identification of herpes simplex virus type 1 genes required for origin-dependent DNA synthesis. *J. Virol.* 62(2):435-443.
- WuDunn D & Spear PG (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 63(1):52-58.
- Wysocka J, Myers MP, Laherty CD, Eisenman RN & Herr W (2003) Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev.* 17(7):896-911.
- Xiao H, Pearson A, Coulombe B, Truant R, Zhang S, Regier JL, Triezenberg SJ, Reinberg D, Flores O, Ingles CJ & et al. (1994) Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol. Cell. Biol.* 14(10):7013-7024.
- Xing J, Ni L, Wang S, Wang K, Lin R & Zheng C (2013) Herpes simplex virus 1-encoded tegument protein VP16 abrogates the production of beta interferon (IFN) by inhibiting NF-kappaB activation and blocking IFN regulatory factor 3 to recruit its coactivator CBP. *J. Virol.* 87(17):9788-9801.
- Xu P, Mallon S & Roizman B (2016) PML plays both inimical and beneficial roles in HSV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113(21):E3022-3028.
- Xu Y, Yang W, Wu J & Shi Y (2002) Solution structure of the first HMG box domain in human upstream binding factor. *Biochemistry (Mosc.)* 41(17):5415-5420.
- 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 transactivating factor VP16 and viral capsids. *J. Virol.* 82(3):1094-1106.

- Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, Nakasato M, Lu Y, Hangai S, Koshiba R, Savitsky D, Ronfani L, Akira S, Bianchi ME, Honda K, Tamura T, Kodama T & Taniguchi T (2009) HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 462(7269):99-103.
- Yang H, Wang H, Chavan SS & Andersson U (2015) High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule. *Mol. Med.* 21 Suppl 1:S6-S12.
- Yang HK, Han YK, Wee WR, Lee JH & Kwon JW (2011) Bilateral herpetic keratitis presenting with unilateral neurotrophic keratitis in pemphigus foliaceus: a case report. *J Med Case Rep* 5:328.
- 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 & Baines JD (2008) Domain within herpes simplex virus 1 scaffold proteins required for interaction with portal protein in infected cells and incorporation of the portal vertex into capsids. *J. Virol.* 82(10):5021-5030.
- 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.
- Yang W, Xu Y, Wu J, Zeng W & Shi Y (2003) Solution structure and DNA binding property of the fifth HMG box domain in comparison with the first HMG box domain in human upstream binding factor. *Biochemistry (Mosc.)* 42(7):1930-1938.
- Yang W, Zeng W, Zhou D & Shi Y (2002) Cloning, expression, secondary structure characterization of HMG box 1 of hUBF from E. coli and its binding to DNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1598(1-2):147-155.
- Zaichick SV, Bohannon KP, Hughes A, Sollars PJ, Pickard GE & Smith GA (2013) The herpesvirus VP1/2 protein is an effector of dynein-mediated capsid transport and neuroinvasion. *Cell Host Microbe* 13(2):193-203.
- Zatsepina OV, Voit R, Grummt I, Spring H, Semenov MV & Trendelenburg MF (1993) The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with transcriptionally active and inactive ribosomal genes. *Chromosoma* 102(9):599-611.
- Zhai W & Comai L (1999) A kinase activity associated with simian virus 40 large T antigen phosphorylates upstream binding factor (UBF) and promotes formation of a stable initiation complex between UBF and SL1. *Mol. Cell. Biol.* 19(4):2791-2802.
- Zhai W, Tuan JA & Comai L (1997) SV40 large T antigen binds to the TBP-TAF(I) complex SL1 and coactivates ribosomal RNA transcription. *Genes Dev.* 11(12):1605-1617.
- Zhang J, Liu H & Wei B (2017) Immune response of T cells during herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 18(4):277-288.
- Zhang X, Efsthathiou S & Simmons A (1994) Identification of novel herpes simplex virus replicative intermediates by field inversion gel electrophoresis: implications for viral DNA amplification strategies. *Virology* 202(2):530-539.

- Zheng C & Su C (2017) Herpes simplex virus 1 infection dampens the immediate early antiviral innate immunity signaling from peroxisomes by tegument protein VP16. *Virol. J.* 14(1):35.
- Zheng Y & Gu H (2015) Identification of three redundant segments responsible for herpes simplex virus 1 ICP0 to fuse with ND10 nuclear bodies. *J. Virol.* 89(8):4214-4226.
- Zhou C & Knipe DM (2002) Association of herpes simplex virus type 1 ICP8 and ICP27 proteins with cellular RNA polymerase II holoenzyme. *J. Virol.* 76(12):5893-5904.
- Zhou G, Te D & Roizman B (2010) The CoREST/REST repressor is both necessary and inimical for expression of herpes simplex virus genes. *mBio* 2(1):e00313-00310.
- Zhu J, Koelle DM, Cao J, Vazquez J, Huang ML, Hladik F, Wald A & Corey L (2007) Virus-specific CD8⁺ T cells accumulate near sensory nerve endings in genital skin during subclinical HSV-2 reactivation. *J. Exp. Med.* 204(3):595-603.
- Zhu J, Peng T, Johnston C, Phasouk K, Kask AS, Klock A, Jin L, Diem K, Koelle DM, Wald A, Robins H & Corey L (2013) Immune surveillance by CD8 α α ⁺ skin-resident T cells in human herpes virus infection. *Nature* 497(7450):494-497.
- Zhu XP, Muhammad ZS, Wang JG, Lin W, Guo SK & Zhang W (2014) HSV-2 vaccine: current status and insight into factors for developing an efficient vaccine. *Viruses* 6(2):371-390.
- Zomerdijk JC, Beckmann H, Comai L & Tjian R (1994) Assembly of transcriptionally active RNA polymerase I initiation factor SL1 from recombinant subunits. *Science* 266(5193):2015-2018.
- Zuccola HJ, Filman DJ, Coen DM & Hogle JM (2000) The crystal structure of an unusual processivity factor, herpes simplex virus UL42, bound to the C terminus of its cognate polymerase. *Mol. Cell* 5(2):267-278.