



Étude des mécanismes de l'intégration chromosomique des herpèsvirus humains 6A/B - Caractérisation de la protéine précoce immédiate 1

Thèse

Vanessa Collin

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

**Étude des mécanismes de l'intégration chromosomique
des herpèsvirus humains 6A/B
Caractérisation de la protéine précoce immédiate 1**

Thèse

Vanessa Collin

Sous la direction de :

Louis Flamand, directeur ou directrice de recherche

Résumé

Les herpèsvirus humains 6A/B (HHV-6A/B) sont deux virus ubiquitaires à l'échelle planétaire qui partagent 94% d'identité entre eux. Ces virus persistent tout au long de la vie de l'hôte en adoptant un état de latence. La latence d'HHV-6A/B est engendrée par l'intégration de leur génome entier aux télomères humains. Les télomères assurent la protection du génome cellulaire contre sa détérioration et dictent la durée de vie cellulaire. On estime que 1.1 % de la population mondiale possède la forme héritée du génome intégré d'HHV-6A/B (iciHHV-6A/B), ce qui signifie qu'environ 80 millions de personnes possèdent un génome d'HHV-6A/B dans un télomère de chaque cellule. Ceci signifie également que chez une personne iciHHV-6A/B, les virus peuvent se réactiver dans différents types de tissus cellulaires. Notamment, lors d'immunosuppression ou des traitements de chimiothérapie chez ces patients, la forme intégrée peut se réactiver et mène à de graves complications cliniques. Alors que les connaissances face à ces conséquences ont progressé, il demeure que les mécanismes fondamentaux utilisés par HHV-6A/B afin de s'intégrer aux télomères humains sont loin d'être élucidés.

Les protéines précoces immédiates (IE) des herpèsvirus exercent plusieurs fonctions à des fins de réplifications virales, dont celles d'être impliquées dans l'évasion du système immunitaire, dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans le remodelage des protéines qui gouvernent les télomères. L'expression soutenue des protéines IE des herpèsvirus tout au long de leur infection afin d'établir la phase lytique et latente, font de ces protéines des protagonistes intéressantes dans la quête de la compréhension du déroulement de l'intégration d'HHV-6A/B. Les protéines IE s'associent à des corps nucléaires formés par la protéine PML (PML-NBs) et compromettent l'intégrité de ceux-ci afin de favoriser l'infection virale. Cependant, il a été documenté que lors de l'infection par HHV-6A/B, leur protéine IE, IE1 (IE1A et IE1B, respectivement), s'associe aux PML-NBs sans occasionner la dégradation ou la destruction de ceux-ci. D'un point de vue télomérique, les PML-NBs s'associent aux télomères endommagés. Notamment, les PML-NBs sont impliqués dans la recombinaison homologue des télomères.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes associés à l'intégration d'HHV-6A/B en portant une attention particulière à la caractérisation de la protéine IE1 d'HHV-6A/B (IE1A/B). Dans un premier temps, nous avons identifié les corps nucléaires de la protéine PML (PML-NBs) comme promoteurs de la SUMOylation d'IE1B. Ce résultat nous a conduits à identifier un motif d'interaction SUMO putatif d'IE1B, essentiel à la fois pour sa SUMOylation et pour son oligomérisation avec les PML-NB. Nous avons ensuite étudié le rôle des PML-NBs dans l'intégration d'HHV-6B et identifié que les cellules déficientes pour la protéine PML étaient moins susceptibles à l'intégration d'HHV-6B. Ces résultats corrélerent avec le résultat des PML-NBs qui influencent la localisation d'IE1B aux télomères.

La deuxième étude est associée avec celle précédente dont l'objectif était de valider les résultats obtenus pour IE1B et HHV-6B avec IE1A et HHV-6A, dans un contexte de SUMOylation et d'absence de PML-NBs. Nous avons identifié des sites putatifs pour la SUMOylation d'IE1A, importants pour son oligomérisation. Par ailleurs, la localisation d'IE1A aux télomères et l'intégration d'HHV-6A furent influencées par la présence de PML-NBs. Ensemble, ces deux études ont mis en lumière l'importance de la SUMOylation pour l'oligomérisation d'IE1A/B, leur localisation aux PML-NBs et l'importance de ces derniers dans l'intégration d'HHV-6A/B.

Lors de la troisième étude, nous nous sommes intéressés à étudier HHV-6A/B dans un contexte télomérique et ce, en nous penchant sur une protéine télomérique majeure, la protéine TRF2. Nous rapportons que la réplication de l'ADN d'HHV-6A/B augmente considérablement le nombre de répétitions télomériques dans les cellules infectées. En outre, nous démontrons que TRF2 se lie aux répétitions télomériques virales pendant l'infection et elle est importante pour l'intégration d'HHV-6A/B.

La dernière étude de cette thèse avait l'objectif de caractériser la fonction d'IE1B dans un contexte de réparation de l'ADN. Nous avons mis en évidence qu'IE1B induit de l'instabilité génomique en inhibant la signalisation de la protéine détectrice de dommage de l'ADN, NBS1. Nous avons identifié deux régions protéiques d'IE1B responsables de l'interaction avec NBS1 et son inhibition. L'interaction/inhibition d'IE1B avec NBS1 mène à la diminution de la signalisation de dommage à l'ADN. Ces données corrélerent avec les événements de différentes voies associées à la recombinaison homologue qui sont réduits en présence d'IE1B. Toutefois, NBS1 est importante pour l'intégration d'HHV-6B dans les cellules qui utilisent un mécanisme d'élongation des télomères basé sur la recombinaison homologue. Cette étude soulève la possibilité que d'autres protéines virales contrôlent l'action d'IE1B lors l'intégration afin de ne pas saturer l'instabilité génomique qui serait toxique à la survie cellulaire et virale.

Dans l'ensemble, cette thèse identifie pour la première fois l'association de protéines cellulaires, PML, TRF2 et NBS1, dans l'intégration d'HHV-6A/B. Elle permet de mieux comprendre l'implication d'IE1B lors de l'infection d'HHV-6B et elle permet de percevoir une conséquence possible de l'iciHHV-6B. L'implication et l'importance d'IE1B dans l'instabilité génomique suggèrent qu'IE1B serait une cible thérapeutique pertinente dans le traitement des réactions d'HHV-6A/B.

Abstract

Human herpesviruses 6A/B (HHV-6A/B) are two ubiquitous viruses distributed worldwide that share 94% identity between them. These viruses persist throughout the host's life through a state of latency. The latency of HHV-6A/B is generated by integrating their entire genome into human telomeres. Telomeres protect the host's genome from its deterioration and dictate the cell lifespan. It is estimated that 1.1% of the world's population has the inherited form of the integrated HHV-6A/B genome (iciHHV-6A/B), meaning that about 80 million people have an HHV-6A/B genome in one telomere of each cell. In an iciHHV-6A/B+ individual, viruses can reactivate in different types of cell tissue. Particularly, during immunosuppression or chemotherapy treatments in these patients, the integrated form can reactivate and lead to serious clinical complications. While knowledge about these consequences has grown, the fact remains that the fundamental mechanisms used by HHV-6A/B to integrate at human telomeres are far from clear.

The immediate early proteins (IE) of herpesviruses perform several functions for viral replication purposes, including those involved in evading the immune system, responding to DNA damage, and remodeling the proteins that govern telomeres. The sustained expression of the IE proteins of herpesviruses throughout their infection in order to establish the lytic and latent phase make these proteins interesting protagonists in the quest to a better understanding of the process leading to the integration of HHV-6A/B. The IE proteins associate with nuclear bodies formed by the PML protein (PML-NBs) to compromise their integrity and promote viral infection. However, it has been documented that upon infection of HHV-6A/B, their IE protein, IE1 (IE1A/B), associates with PML-NBs without causing their degradation or destruction. From a telomeric perspective, PML-NBs associate at damaged telomeres. In particular, the PML-NBs are involved in the homologous recombination of telomeres.

As part of this thesis, we were interested in studying the mechanisms associated with the integration of HHV-6A/B with particular interest in the characterization of the IE1 protein of HHV-6A/B. We first identified the PML-NBs as promoters of IE1B SUMOylation. This result led us to identify a putative SUMO interaction motif of IE1B that is essential for both its SUMOylation and for the oligomerization of IE1B with PML-NBs. We then investigated the role of PML-NBs in the integration of HHV-6B and identified that cells deficient for PML were less susceptible to HHV-6B integration. These results correlate with the result that PML-NBs influence the localization of IE1B to telomeres.

The second study is associated with the previous one whose objective was to validate the results obtained for IE1B and HHV-6B with IE1A and HHV-6A, in a context of SUMOylation and absence of PML-NBs. We have identified putative sites for IE1A SUMOylation, important for its oligomerization. Furthermore, the localization of IE1A to telomeres and the integration of HHV-6A was influenced by the presence of PML-NBs. Together, these

two studies highlighted the importance of SUMOylation for the oligomerization of IE1A/B, their localization to PML-NBs and the importance of these in the integration of HHV-6A/B.

In the third study, we were interested in studying HHV-6A/B in a telomeric context by studying a major telomeric protein, the TRF2 protein. We report that the replication of HHV-6A/B DNA dramatically increases the number of telomeric repeats in infected cells. In addition, we demonstrate that TRF2 binds to viral telomeric repeats during infection and is important for the integration of HHV-6A/B.

The last study of this thesis aimed to characterize the function of IE1B in the context of DNA repair. We have shown that IE1B induces genomic instability by inhibiting the function of the DNA damage sensor protein, NBS1. We have identified two protein regions of IE1B responsible for the interaction with NBS1 and its inhibition. Interaction/inhibition of IE1B with NBS1 leads to decreased DNA damage signaling. These data correlate with the events of different pathways associated with homologous recombination which are reduced in the presence of IE1B. However, NBS1 is important for the integration of HHV-6B into cells that use a mechanism of telomere elongation based on homologous recombination. This study raises the possibility that other viral proteins control the action of IE1B during integration to not saturate genomic instability that would be toxic to cell and viral survival.

Taken together, this thesis identifies for the first time the association of cellular proteins, PML, TRF2 and NBS1, in the integration of HHV-6A/B. It provides a better understanding of the implication of IE1B in the infection of HHV-6B and in identifying a possible consequence of icHHV-6B. The implication and importance of IE1B in genomic instability suggests that IE1B may be an interesting therapeutic target in the treatment of HHV-6B reactivations.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iv
Table des matières	vi
Liste des figures, tableaux, illustrations	ix
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abréviations, sigles, acronymes	xii
Remerciements.....	xvii
Avant-propos	xix
Introduction	1
1. Les herpèsvirus	1
1.1 Classification des herpèsvirus humains.....	2
1.2 Compositions générales d'un virus herpétique.....	2
2. Les herpèsvirus 6A/B	4
2.1 Historique.....	4
2.2 Épidémiologie et transmission	5
2.3 Génomes des HHV-6A/B	6
2.4 Tropisme cellulaire.....	8
2.5 Cycles viraux.....	10
2.6 Infections primaires et pathologies associées	14
2.7 Réactivations et traitements.....	15
3. Intégration chromosomique des HHV-6A/B	16
3.1 Découverte et transmission	16
3.2 Structures des génomes des HHV-6A/B intégrés aux chromosomes humains.....	18
3.3 L'intégration des HHV-6A/B comme mode de latence.....	19
3.4 Méthodes de détections.....	21
3.5 Mécanismes d'intégration	22
4. Voies de réparation et reconnaissance des cassures de l'ADN.....	23
4.1 Choix des voies de réparation des cassures double brins à l'ADN	23
4.2 Les acteurs de premier plan lors d'une cassure de l'ADN.....	24
4.3 La voie de religature des extrémités non homologues	25
4.4 Réparation de l'ADN en présence de séquences homologues	26

5. Les télomères	31
5.1 Structure des télomères	31
5.2 Fonctions des télomères	33
5.3 Maintien des télomères	36
6. Les corps nucléaires de la protéine de la leucémie promyélocytaire	38
6.1 La SUMOylation, au cœur des PML-NBs	38
6.2 PML et la formation des PML-NBs	40
6.3 Les PML-NBs, des régulateurs des réponses aux dommages à l'ADN	42
6.4 Les PML-NBs et la réponse antivirale lors d'infections aux herpèsvirus	42
7. La protéine précoce immédiate 1 des HHV-6A/B	45
Problématique, contexte, hypothèse et objectifs de recherche	47
Chapitre 1. The Promyelocytic Leukemia Protein facilitates human herpesvirus 6B chromosomal integration, immediate early protein multiSUMOylation and its localization at telomeres	49
1.1 Résumé	50
1.2 Abstract	51
1.3 Introduction	52
1.4 Results	53
1.5 Discussion	68
1.6 Acknowledgements	71
1.7 Author Contributions	71
1.8 Material and methods	71
1.9 References	76
1.10 Supporting information	81
Chapitre 2. SUMOylation: A convergence between Human Herpesvirus 6A/B Immediate Early Protein 1	89
2.1 Résumé	90
2.2 Abstract	91
2.3 Introduction	92
2.4 Results	93
2.5 Discussion	103
2.6 Acknowledgement	104
2.7 Author Contributions	105
2.8 Materials and methods	105
2.9 References	108

2.10 Supporting Information	111
Chapitre 3. Role for the shelterin protein TRF2 in human herpesvirus 6A/B chromosomal integration	112
3.1 Résumé	113
3.2 Abstract	114
3.3 Introduction.....	115
3.4 Results	116
3.5 Discussion	131
3.6 Acknowledgement	134
3.7 Author Contributions.....	134
3.8 Materials and Methods	134
3.9 References	138
Chapitre 4. The immediate early protein 1 of the human herpesvirus 6B counteracts NBS1 and prevent homologous recombination repair pathways	143
4.1 Résumé	144
4.2 Abstract	145
4.3 Introduction.....	146
4.4 Results	148
4.5 Discussion	159
4.6 Acknowledgement	162
4.7 Author contributions	162
4.8 Material and methods.....	162
4.9 References	167
4.10 Supporting information	172
Discussion	181
Conclusion	198
Bibliographie	199
Annexe A - HHV-6A/B Integration and the Pathogenesis Associated with the Reactivation of Chromosomally Integrated HHV-6A/B	219

Liste des figures, tableaux, illustrations

Introduction

Figure 1. Hiérarchie des <i>Herpesvirales</i> et classification des <i>Herpesviridae</i>	1
Figure 2. Éléments qui composent une particule virale herpétique.....	3
Figure 3. Schéma général du génome des HHV-6A/B.....	6
Figure 4. Schéma des gènes et des cadres de lectures des HHV-6A/B.	8
Figure 5. Réplication de l'ADN viral par RCA.....	11
Figure 6. Schéma illustrant la production de virions.....	12
Figure 7. Modèles possibles de l'intégration des HHV-6A/B chez l'humain.....	18
Figure 8. Représentation schématique des formes de génomes des HHV-6A/B intégrés ayant été documentés.....	19
Figure 9. Mécanismes possibles de l'excision du génome des HHV-6A/B des télomères pour mener à la réactivation.....	20
Figure 10. Résumé des voies de réparations des cassures doubles brins.....	25
Figure 11. Voie de re-ligature des extrémités non homologues.....	26
Figure 12. Schéma de la signalisation lors d'une cassure double brin à l'ADN en phase S/G2 et des voies de réparation par homologies.....	30
Figure 13. Représentation de la structure des télomères.....	33
Figure 14. Schéma résumant les fonctions des télomères et des protéines shelterin.....	35
Figure 15. Élongation des télomères dans les cellules ALT.....	37
Figure 16. Étapes de la SUMOylation d'une protéine.....	40
Figure 17. Formation des PML-NBs.....	41
Figure 18. Résumé bref de la voie de signalisation de l'interféron de type I.....	43
Figure 19. Schéma du transcrit de la protéine IE1B.....	45

Chapitre 1

Figure 1.1 - IE1 associates with PML during infection and in the absence of other HHV-6B proteins.....	55
Figure 1.2 - Presence of PML-NBs leads to hyperSUMOylation of IE1.....	57
Figure 1.3 - Putative IE1 Sumo-Interacting Motif site is important for multiSUMOylation in presence of PML...60	60
Figure 1.4 - MultiSUMOylated IE1 contributes to nuclear bodies accumulation.....	62
Figure 1.5 - Absence of PML affects HHV-6B integration efficiency.....	64
Figure 1.6 - Localization of IE1 at telomeres is influenced by the presence of PML.....	67
Figure S1.1 - IE1 colocalizes with all PML nuclear isoforms.....	81
Figure S1.2 - Antibody test and IF-FISH example of colocalization of IE1 with PML at telomeres.....	82
Figure S1.3 - SUMOylation assay and search for potential SIM sites.....	83
Figure S1.4 - PML localizes at telomeres in ALT+ and HeLa LT cells.....	84
Figure S1.5 PML - KO cell line procedures.....	85
Figure S1.6 - Integration assay.....	87
Figure S1.7 - IE1 localizes at telomeres in HeLa LT cells.....	88

Chapitre 2

Figure 2.1. IE1A colocalization at telomeres is partly PML-NBs dependent.....	94
Figure 2.2. IE1A is multiSUMOylated in presence of PML-NBs.....	97
Figure 2.3. Characterization of putative SUMOylation sites for IE1A.....	99
Figure 2.4. Oligomerization of IE1A is dependent of SUMOylation and PML-NBs.....	102
Figure 2.5. Optimal IE1A SUMOylation is dependent of PML SIM site.....	102
Figure S2.1.....	111
Figure S2.2.....	111

Chapitre 3

Figure 3.1 - Accumulation of viral telomeric signals during HHV-6A infection.....	118
Figure 3.2 - Binding of TRF2 to HHV-6A viral DNA.....	120
Figure 3.3 - Binding of TRF2 to viral DNA during HHV-6A/B infection.....	121
Figure 3.4 - TRF2 expression in HHV-6A-infected U2OS cells.....	123
Figure 3.5 - Colocalization of shelterin complex proteins and HHV-6A IE2 protein at VRC and cellular telomeres.....	125
Figure 3.6.....	127
Figure 3.7 - TRF2 is required for IE2 localization with telomeres.....	129
Figure 3.8 -TRF2 knockdown affect HHV-6A/B chromosomal integration.....	130

Chapitre 4

Figure 4.1. HHV-6B infection and IE1 expression leads to micronuclei formation.....	149
Figure 4.2. Phosphorylation of H2AX (γ -H2AX) is inhibited in HHV-6B infected and IE1 expressing cells.....	151
Figure 4.3. HHV-6B IE1 interacts with NBS1 and prevents its recruitment to DSBs.....	153
Figure 4.4. Bipartite binding and inhibition of NBS1 by HHV-6B IE1.....	155
Figure 4.5. HHV-6B IE1 inhibits HR-mediated repair.....	157
Figure 4.6. Depletion of NBS1 impairs viral integration in cells maintaining telomere by homology-directed repair.....	158
Figure S4.1.....	172
Figure S4.2.....	173
Figure S4.3.....	174
Figure S4.4.....	175
Figure S4.5.....	176
Figure S4.6.....	177

Discussion

Figure 5.1. Schéma des virus recombinants HHV-6A générés.....	189
Figure 5.2. Organigramme des conséquences possibles de l'iciHHV-6A/B.....	195

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1. Classification des herpèsvirus humains.....	2
--	---

Chapitre 1

Table 1-1. Importance of PML for HHV-6B chromosomal integration in U2OS cells.....	65
--	----

Table 1-2. Importance of PML for HHV-6B chromosomal integration in HeLa cells.....	65
--	----

Chapitre 2

Table 2-1. Importance of PML for HHV-6A chromosomal integration in U2OS and HeLa cells.....	95
---	----

Chapitre 4

Table 4-1. Importance of NBS1 for HHV-6B chromosomal integration in ALT + and – cells.....	159
--	-----

Table S4-1. Primers, siRNA, shRNA and FISH probes sequences used in this study.....	178
---	-----

Table S4-2. Antibodies used in this study.....	179
--	-----

Table S4-3. Plasmids used in this study.....	180
--	-----

Discussion

Tableau 2. Résumé des chromosomes ciHHV-6A/B identifiés.....	198
--	-----

Liste des abréviations, sigles, acronymes

ABM	<i>ATM binding motif</i>	Motif liant ATM
ALT	<i>Alternative lengthening of telomeres</i>	Élongation alternative des télomères
Alt-EJ	<i>Alternative end-joining</i>	Ligature alternative des extrémités
APB	<i>ALT PML Nuclear Body</i>	Corps nucléaires PML des cellules ALT
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated protein</i>	
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>	
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>	Chromosome bactérien artificiel
BioID	<i>Proximity-dependent biotin identification</i>	
BIR	<i>Break-induced replication</i>	Réplication induite par la rupture
BRCT	<i>BRCA1 C terminus domain</i>	
BTR	<i>Bloom-TOP3A-RMI1/2</i>	
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>	Cycline dépendante de kinase
CH	<i>Hematopoietic cell</i>	Cellule hématopoïétique
ciHHV-6A/B	<i>chromosomally integrated HHV-6A/B</i>	HHV-6A/B intégré chromosomiquement
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>	Cytomégalovirus
CO	<i>Crossover</i>	Enjambement
CPE	<i>Cytopathic effect</i>	Effet cytopathique
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>	
CtIP	<i>C-terminal binding protein interacting protein</i>	
DAXX	<i>Death domain associated protein</i>	
DBD	<i>DNA binding domain</i>	Domaine liant l'ADN
ddPCR	<i>droplet digital PCR</i>	PCR digitale
DDR	<i>DNA damage response</i>	Réponse aux dommages à l'ADN
dHJ (dJH)	<i>double Holliday junction</i>	double jonction d'Holliday
DNA (ADN)	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Acide désoxyribonucléique
DR	<i>Direct repeat</i>	Répétition directe
DSB (CDB)	<i>DNA double-strand break</i>	Cassure double brin
dsDNA (ADNdb)	<i>Double stranded DNA</i>	ADN double brin
EBV	<i>Epstein's Barr Virus</i>	Virus d'Epstein-Barr
ECTR	<i>Extrachromosomal telomere repeat</i>	Répétition extrachromosomique des télomères
FHA	<i>Forkhead-associated</i>	
g	<i>Glycoprotein</i>	Glycoprotéine
G4	<i>Guanine quartet</i>	Quadruplet de guanines
GC (GC)	<i>Gene conversion</i>	Conversion de gène
GVHD	<i>Graft versus host disease</i>	Maladie du greffon contre l'hôte
Gy	<i>Gray</i>	
H2AX	<i>Histone family 2A variant X</i>	Variante X de la famille d'histone 2A
HDR	<i>Homology directed repair</i>	Réparation dirigée par homologie
HERV	<i>Human endogeneous retrovirus</i>	Rétrovirus endogène humain
HHV-6A	<i>Human herpesvirus 6A</i>	Herpèsvirus humain 6A
HHV-6A/B	<i>Human herpesvirus 6A/B</i>	Herpèsvirus humains 6A/B
HHV-6B	<i>Human herpesvirus 6B</i>	Herpèsvirus humain 6B
HJ (JH)	<i>Holliday junction</i>	Jonction d'Holliday

HR (RH)	<i>Homologous recombination</i>	Recombinaison homologue
HSC (CSH)	<i>Hematopoietic stem cell</i>	Cellule souche hématopoïétique
HSV-1	<i>Herpes Simplex Virus 1</i>	Virus de l'herpès simplex 1
HSV-2	<i>Herpes Simplex Virus 2</i>	Virus de l'herpès simplex 2
hTERT	<i>human Telomerase reverse transcriptase</i>	Transcriptase inverse de la télomérase humaine
iciHHV-6A/B	<i>inherited chromosomally integrated HHV-6A/B</i>	Forme héritée de l'intégration chromosomique d'HHV-6A/B
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>	Comité international de taxonomie des virus
IF-FISH	<i>Immunofluorescence conjugated to in situ hybridization</i>	Immunofluorescence conjuguée à l'hybridation <i>in situ</i>
IFN	<i>Interferon</i>	Interféron
impTMR	<i>imperfect Telomeric repeats</i>	Répétition télomérique imparfaite
InDel	<i>Insertion and Deletion</i>	Insertion et délétion
IR	<i>Internal repeats</i>	Répétitions internes
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>	Facteur régulateur de l'interféron 3
IRF7	<i>Interferon regulatory factor 7</i>	Facteur régulateur de l'interféron 7
ISG	<i>Interferon stimulated gene</i>	Gène stimulé par l'interféron
kbp (kpb)	<i>Kilobase pair</i>	Kilo paire de base
KO	<i>Knockout</i>	Délétion d'un gène
KSHV	<i>Kaposi's Sarcoma Herpesvirus</i>	Herpèsvirus du sarcome de Kaposi
LB		Lymphocyte B
LT		Lymphocyte T
MBM	<i>MRE11-binding motif</i>	Motif liant MRE11
MCC	<i>Mander's colocalization coefficient</i>	Coefficient de colocalisation de Mander
MDV	<i>Marek's disease virus</i>	Virus de la maladie de Marek
MiDAS	<i>Mitotic DNA synthesis</i>	Synthèse de l'ADN lors de la mitose
MN	<i>Micronuclei</i>	Micronoyaux
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>	Mutliplicité d'infection
MRN	<i>MRE11-RAD50-NBS1 complex</i>	Complexe MRE11-RAD50-NBS1
mRNA (ARNm)	<i>messenger RNA</i>	ARN messenger
MS	<i>Mass spectrometry</i>	Spectrométrie de masse
MS (SEP)	<i>Multiple sclerosis</i>	Sclérose en plaque
NB	<i>Nuclear body</i>	Corps nucléaire
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>	
NBS1i	<i>NBS1 inhibition</i>	Inhibition de NBS1
NCO	<i>Non crossover</i>	Pas de croisement
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>	Religature des jonctions non homologues
NI	<i>Not infected</i>	Non infecté
NID	<i>NBS1 interacting domain</i>	Domaine d'interaction avec NBS1
OBP	<i>Origin binding protein</i>	Protéine liant l'origine
ORF	<i>Open reading frame</i>	Cadre de lecture ouvert
PALE	<i>Post-transplant acute limbic encephalitis</i>	Encéphalite limbique aiguë post-greffe
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>	Patron moléculaire associé aux agents pathogènes
PBMC	<i>Peripheral blood mononucleated cells</i>	Cellules mononucléées du sang périphérique

PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>	Protéine de leucémie promyélocytaire
PML-NB	<i>Promyelocytic leukemia protein nuclear body</i>	Corps nucléaire de la protéine de leucémie promyélocytaire
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>	Récepteur de reconnaissance de patrons
PTM	<i>Post-translational modification</i>	Modification post-traductionnel
qPCR	<i>quantitative Polymerase chain reaction</i>	Réaction en chaîne de la polymérase quantitative
RAD51	<i>Recombinase in homologous recombination RAD51</i>	
RAD52	<i>Recombinase in homologous recombination RAD52</i>	
RCA	<i>Rolling circle amplification</i>	Amplification en cercle roulant
RNA (ARN)	<i>Ribonucleic acid</i>	Acide ribonucléique
RPA	<i>Replication protein A</i>	Protéine de réplication A
SD	<i>Standard deviation</i>	Écart-type
SDSA	<i>Synthesis-dependent strand annealing</i>	Synthèse dépendante de l'appariement des brins
SENP	<i>sentrin/SUMO-specific protease</i>	Protéase spécifique à la sentrine/SUMO
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>	Petit ARN en épingle à cheveux
SIM	<i>SUMO-interacting motif</i>	Motif d'interaction avec SUMO
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	Petit ARN interférent
SSA	<i>Single strand annealing</i>	Appariement des extrémités protubérantes simples brins
ssDNA (ADNsb)	<i>Single stranded DNA</i>	ADN simple brin
STAT1	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 1</i>	Transducteur de signal et activateur de transcription 1
STAT2	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 2</i>	Transducteur de signal et activateur de transcription 2
STUb1	<i>SUMO-targeted ubiquitin ligases</i>	SUMO ciblée par Ubiquitine ligases
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>	Petit modificateur de type ubiquitine
t-loop	<i>telomeric loop</i>	Boucle télomérique
TERRA	<i>Telomeric long non coding RNA</i>	ARN long non codant télomérique
TIF	<i>Telomere dysfunction induced foci</i>	Foyers induits par le dysfonctionnement des télomères
TMR	<i>Telomeric repeats</i>	Répétition télomérique
TR	<i>Terminal repeats</i>	Répétition terminales
TRF	<i>Telomere restriction fragment</i>	Fragment de restriction des télomères
TRF1	<i>Telomeric repeat-binding factor 1</i>	
TRF2	<i>Telomeric repeat-binding factor 2</i>	
U	<i>Unique region</i>	Région unique
VRC	<i>Virus replication compartment (CRV)</i>	Compartiment de réplication virale
VZV	<i>Varicella zoster virus</i>	Virus varicelle-zona

À ma famille

« *As long as you are learning, you are not
failing* »
Bob Ross

Remerciements

Mes études supérieures ont été l'expérience la plus enrichissante de ma vie, mais ce chemin a eu son lot de moments tumultueux. Ce parcours m'a permis de me découvrir comme individu et m'a fait croître dans de nombreux aspects. Tout au long de mon doctorat, j'ai bénéficié d'un réseau de mentors, collègues, d'amis et ma famille. Je voudrais donc profiter de cette occasion pour remercier les personnes importantes qui ont su m'épauler lors de ces 4 dernières années, avec le souhait que ces quelques lignes puissent rendre justice à la reconnaissance que j'éprouve envers chaque personne impliquée.

Ma plus grande reconnaissance va à mon directeur de recherche, Louis Flamand. Merci d'avoir vu en moi une petite graine de scientifique et de m'avoir fait confiance quand je doutais moi-même de mes capacités. Je serai toujours reconnaissante pour les opportunités que tu m'as offertes, tes conseils, ton soutien, ton optimisme, ta disponibilité, ta bienveillance et ton enthousiasme exagéré pour un beau marquage d'immunofluorescence, question d'encourager la troupe. Non seulement j'ai été formée comme scientifique, j'ai également un modèle remarquable de leader à suivre.

Je n'aurais pas accompli autant les dernières années sans la guidance précieuse d'Annie et Isabelle D, les piliers de l'équipe. Annie et Isa, merci de m'avoir tout appris, merci pour votre patience, votre aide et votre temps pour l'achèvement de mes articles. Vous êtes véritablement la définition d'une équipe de rêve. Émile, ce fut un plaisir de t'avoir à mes côtés la dernière année, merci pour toutes les bières. Gabrielle, merci pour ton aide au cours de mes derniers moments au laboratoire. Je suis fière d'avoir fait partie de ce laboratoire, j'ai l'équipe Flamand de tatouée sur le cœur. Aux collègues du bloc T1, Isabelle A, Cynthia, Myriam, Guillaume, Tanya, Geneviève, Julien et Stephan, merci d'avoir m'y du soleil dans mon quotidien, pour vos encouragements et d'avoir créé un sentiment d'appartenance au bloc T1, votre présence quotidienne va sincèrement me manquer.

Merci à la Dre Amélie Fradet-Turcotte pour l'encadrement, la disponibilité, le temps, les conseils et surtout d'avoir accepté de faire une collaboration qui a permis d'ajouter une valeur importante à ma thèse. J'aimerais particulièrement remercier ses membres d'équipe Vincent, Élise B et Élise G-L sans qui l'article à venir ne serait pas possible. Je souhaite remercier les membres de mon jury de thèse, Dr Guy Boivin, Dr Manuel Caruso et Dre Agnès Gautheret-Dejean d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer ma thèse.

À mes biotechnologistes préférées, Ariane et Denise, merci d'avoir été présentes en personne et à distance tout au long de cette période, d'avoir été mes supportrices #1, vous êtes des amies en or. À mes ami(e)s à distance, Kassandra, Éric, Camille, Monika, Vanessa, Émilie, Marie-Pier et Audrey (Audrè), merci d'accepter mon absence et surtout merci de faire sentir votre présence malgré les kilomètres ou l'océan qui nous séparent. C'est une réelle richesse d'être entourée de personnes comme vous.

À ma famille, je sais que je n'exprime pas assez souvent ma reconnaissance alors je vous dis sincèrement, merci. Votre support, la fierté que vous m'avez manifestée et votre capacité à me changer les idées ont permis de me garder saine d'esprit tout au long de ce récit. Merci à mes parents de m'avoir inculqué l'indépendance, la détermination et la patience, des valeurs indispensables pour survivre à un doctorat. Merci à mes grands-parents d'avoir toujours trouvé le moyen de me divertir, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous. Merci à Charles et Chantal, mes beaux-parents, pour votre accueil à bras ouverts chaque week-end dont j'avais besoin d'une pause, une chance qu'on vous a.

Enfin, mon cher Marc-Antoine, merci d'avoir été mon pilier depuis le début de cette aventure. On dit que derrière chaque homme se cache une grande femme or, derrière moi se cache un Marc-Antoine brillant, patient, à l'écoute, encourageant, aidant, attentionné qui a été la source de mon succès. On forme une belle équipe et je suis impatiente de voir ce que l'avenir nous réserve.

Bonne lecture!

Avant-propos

Le Dr Louis Flamand a conçu et dirigé les projets de recherche présentés au chapitre 1, 2 et 3 et a codirigé une le projet du chapitre 4. Il a participé à l'analyse des données et corrigé les articles des chapitres 1, 2, 3 et 4. La Dre Amélie Fradet-Turcotte a conçu et codirigé le projet du chapitre 4, participé à l'analyse et la rédaction de l'article du chapitre 4. La Dre Annie Gravel a codirigé les projets du chapitre 1 et 2 et a dirigé le projet du chapitre 3. Elle a participé aux corrections de tous les chapitres de cette thèse.

En collaboration avec Dr Flamand, j'ai conçu les projets présentés aux chapitres 1 et 2, réalisé toutes les expériences, les analyses, les interprétations des données, les analyses statistiques et écrit les manuscrits présentés aux chapitres 1, 2. L'article intégré du chapitre 1, **The Promyelocytic Leukemia Protein facilitates human herpesvirus 6B chromosomal integration, immediate-early 1 protein multiSUMOylation and its localization at telomeres**, a été publié dans le journal *Plos Pathogens* en 2020 : **Collin, V.**, Gravel, A., Kaufer, B. B. & Flamand, L. The promyelocytic leukemia protein facilitates human herpesvirus 6B chromosomal integration, immediate-early 1 protein multiSUMOylation and its localization at telomeres. *PLoS Pathogens* 16, (2020).

L'article intégré au chapitre 2, **SUMOylation: A convergence between Human Herpesvirus 6A/B Immediate Early Protein 1**, sera soumis en septembre 2021.

Dans le chapitre 3, j'ai participé à la conception du projet et spécifiquement aux montages des figures 3.1B-D, G, 3.4A, 3.5A-B et 3.6B,D, à l'analyse et l'interprétation des résultats des expériences des figures 3.4, 3.5, 3.6, 3.7D et 3.8 et à la rédaction/révision du manuscrit. L'article intégré au chapitre 3, **Role for the shelterin protein TRF2 in human herpesvirus 6A/B chromosomal integration**, a été publié dans le journal *Plos Pathogens* en 2020 : Gilbert-Girard S, Gravel A, **Collin V**, Wight DJ, Kaufer BB, Lazzerini-Denchi E & Flamand L. Role for the shelterin protein TRF2 in human herpesvirus 6A/B chromosomal integration. *PLoS Pathogens*, (2020).

En collaboration avec Dr Flamand, Dre Amélie-Fradet Turcotte et Dre Élise Biquand, j'ai conçu le projet et réalisé les expériences/schémas des figures 4.1A-C, 4.2D-E, 4.5A-D (schémas), 4.6, Table 4-1, S4.1A-B, GH, S4.5A, G, S4.6 présentés au chapitre 4. J'ai participé à l'analyse et l'interprétation des données de toutes les figures et participé à l'écriture du manuscrit et la préparation à la soumission, en collaboration avec Dre Amélie-Fradet et Dre Élise Biquand. L'article intégré au chapitre 4, **The immediate early protein 1 of the human herpesvirus 6B counteracts NBS1 and prevent homologous recombination repair pathways**, a été soumis au journal *PNAS* en juillet 2021.

Au début de mon doctorat, j'ai rédigé une revue de littérature, **HHV-6A/B integration and the pathogenesis associated with the reactivation of chromosomally integrated HHV-6A/B**, présentée en Annexe A: **Collin V**, Flamand L. HHV-6A/B integration and the pathogenesis associated with the reactivation of chromosomally integrated HHV-6A/B. *Viruses*. 2017;9(7):160.

J'ai rédigé à la fin de mon doctorat un article de revue qui a été accepté en septembre 2021 et qui sera publié dans le prochain numéro de médecine/sciences. **Collin V**, Flamand L. **L'importance des télomères dans les infections aux herpèsvirus humains 6A/B**. *Med Sci*. (2021)

Depuis mon arrivée au laboratoire du Dr Flamand, j'ai aussi participé à ces articles :

Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, Gilbert-Girard S, **Collin V**, Hall-Sedlak R, et al. Cell Culture Systems To Study Human Herpesvirus 6A/B Chromosomal Integration. *J Virol*. 2017;91(14):e00437-17.

Trempe F, Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, **Collin V**, Gilbert-Girard S, et al. Characterization of human herpesvirus 6A/B U94 as ATPase, helicase, exonuclease and DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(12):6084–98.

Introduction

1. Les herpèsvirus

Les herpèsvirus font partie de la grande famille des *Herpesviridae* qui, avec les *Alloherpesviridae* (infectent les poissons et les grenouilles) et les *Malacoherpesviridae* (infectent les mollusques et autres invertébrés), partagent l'ordre des *Herpesvirales* (Figure 1) [1–3]. Quant aux *Herpesviridae*, ils sont responsables des infections herpétiques chez les humains et les animaux tels que les reptiles, les oiseaux ainsi que les mammifères. À ce jour, le comité international sur la taxonomie des virus (ICTV pour « International Committee on Taxonomy of Viruses ») recense une centaine d'espèces qui appartiennent aux *Herpesvirales*. Sur la plateforme du NCBI, 75 séquences complètes de génomes d'herpèsvirus y sont déposées, dont les génomes de ceux-ci peuvent atteindre une longueur en acides nucléiques qui entre 109 à 241 kilopaires de bases (kpb). Relatifs à la taille de leurs génomes, les herpèsvirus peuvent posséder jusqu'à 223 cadres de lectures ouverts (ORF pour « Open ReadinG Frame ») [4]. Les virus de la famille des *Herpesviridae* partagent les mêmes éléments de structure, phases virales et mécanismes de réplication de l'ADN viral. Parmi les caractéristiques partagées, celle qui représente le mieux ces virus est leur capacité d'établir une infection persistante/chronique qui perdure tout au long de la vie de l'hôte. Neuf herpèsvirus qui appartiennent à trois sous-familles infectent l'homme [5].

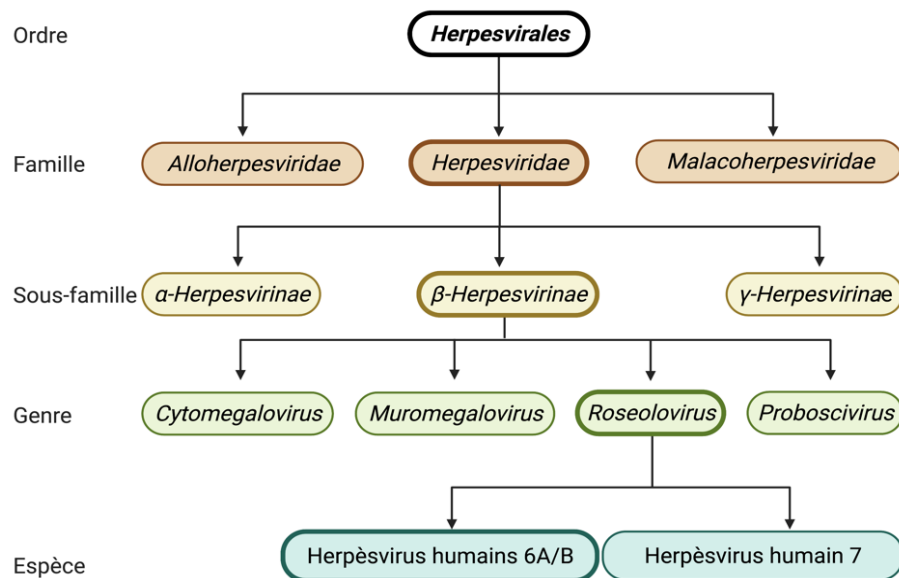


Figure 1. Hiérarchie des *Herpesvirales* et classification des *Herpesviridae*. Les herpèsvirus humains 6A/B appartiennent à la sous-famille des β -*Herpesvirinae* et au genre des *Roseolovirus*. ©Vanessa Collin

1.1 Classification des herpesvirus humains

Les neuf herpesvirus humains se classifient en trois sous-familles : *alpha* (α), *beta* (β) et *gamma* (γ) (Tableau 1), selon la composition de leur génome, leur tropisme cellulaire, la niche de latence, la pathogenèse et maladies associées [3]. Le tableau 1 permet d'apprécier l'ubiquité mondiale de certains herpesvirus humains ainsi que leurs pathologies [6].

Tableau 1. Classification des herpesvirus humains

Abréviation	Nom	Prévalence	Pathologie	Sous-famille
HHV-1/HSV-1	Virus de l'herpès simplex 1	47.8%	Lésions oculaires, buccales et génitales	α
HHV-2/HSV-2	Virus de l'herpès simplex 2	11.9%	Lésions génitales et anales	α
HHV-3/VZV	Virus de la varicelle/Zoster	>90%	Varicelle Zona	α
HHV-5/CMV	Cytomégalovirus	70%	Infections congénitales Complications post-greffes	β
HHV-6A	Herpesvirus humain 6A	>90%	Roséole ?	β
HHV-6B	Herpesvirus humain 6B	>90%	Roséole Complications post-greffes	β
HHV-7	Herpesvirus humain 7	>85%	Roséole ?	β
HHV-4/EBV	Virus Epstein-Barr	>95%	Mononucléose et lymphomes des cellules B	γ
HHV-8/KSHV	Herpesvirus associé au sarcome de Kaposi	<5%	Sarcome de Kaposi, maladie de Castleman multicentrique et lymphomes primitifs des séreuses	γ

1.2 Compositions générales d'un virus herpétique

La particule virale d'un herpesvirus est composée de quatre éléments (Figure 2A) :

1. Un génome linéaire composé d'**ADN** double **brin** (ADNdb);
2. Une nucléocapside virale d'environ 90 à 110 nanomètres (nm) de diamètre;
3. Une région tégment;
4. Une enveloppe virale qui confère au virus un diamètre total entre 160 et 200 nm.

Par analogie, la nucléocapside se compare à un noyau cellulaire puisqu'elle entoure et protège l'information génétique du virus. La structure de la nucléocapside est composée de vingt faces triangulaires, ce qui lui attribue une forme icosaédrique dont celle-ci se rapproche d'une sphère. La région située entre la nucléocapside et l'enveloppe nucléaire se nomme le tégument. Le tégument est composé de protéines de structures et de régulations ainsi que d'ARN [7]. Ces protéines sont substantielles au début du cycle infectieux du virus à la suite de son entrée dans la cellule, en régulant la transcription des gènes et en modulant l'environnement cellulaire [8]. L'enveloppe virale recouvre l'entièreté du virus et est composée d'une bicouche lipidique et de glycoprotéines. Ces glycoprotéines sont d'origines virales ainsi que cellulaires puisqu'elles sont acquises lors du bourgeonnement des particules virales hors des organelles cellulaires. Les glycoprotéines peuvent représenter plus de deux mille molécules à la surface de l'enveloppe virale. Notamment, les glycoprotéines sont responsables de l'adhésion d'un virus à une cellule cible en liant un récepteur cellulaire présent à la surface membranaire de la cellule. Parmi les glycoprotéines (g) virales, certaines sont conservées entre les herpesvirus dont : gM, gB, gH, gL et gN [9]. En ce qui concerne les herpesvirus humains 6A/B (HHV-6A/B), outre les glycoprotéines communes aux herpesvirus, celles identifiées jusqu'à présent sont les gL, gO, gQ1 et gQ2. À ce sujet, la gO est conservée dans la sous-famille des *β -Herpesvirinae* [10,11] et les gQ1 et gQ2 sont uniques à HHV-6A/B et HHV-7 [12,13]. Le quatrième élément d'une particule virale herpétique, le génome, est responsable de la variation entre les herpesvirus. Les formes les plus fréquentes des génomes herpétiques sont représentées à la Figure 2B. En général, un génome herpétique est composé d'une ou plusieurs régions uniques (U) qui peuvent être longues (U_L) ou courtes (U_S), flanquées par des séquences terminales répétées (TR) ou par des séquences internes répétées (IR). Les gènes de leur génome sont divisés en trois classes : les gènes précoces immédiats (IE pour « Immediate Early »), précoces (E pour « Early ») et tardifs (L pour « Late »). La composition du génome des HHV-6A/B sera détaillée dans la section 2.3 de l'introduction.

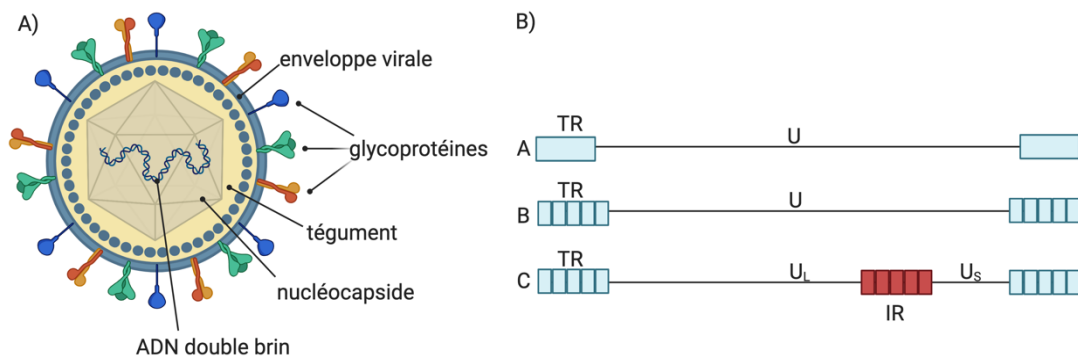


Figure 2. Éléments qui composent une particule virale herpétique. A) Schéma général de la structure virale d'un herpesvirus. L'ADNdb viral se trouve dans la nucléocapside icosaédrique qui est entourée de la région du tégument (couleur jaune). L'enveloppe nucléaire composée d'une bicouche lipidique est recouverte de glycoprotéines. Le schéma n'est pas dessiné à l'échelle. B) Schéma de la nomenclature générale des

génomés herpétiques les plus fréquents. Les génomes ne sont pas tracés à l'échelle. U (région unique), U_L (région unique longue), U_S (région unique courte), TR (régions terminales répétées), IR (séquences internes répétées). © Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

2. Les herpesvirus 6A/B

2.1 Historique

L'herpesvirus humain de type 6 (HHV-6) fut identifié en 1986 au « **National Cancer Institute** » (NCI) du Maryland aux États-Unis, à partir de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC pour « **p**eripheral **b**lood **m**ononuclear **c**ells ») provenant de patients atteints du **s**yndrome de l'**i**mmunod**d**éficience **a**cquise (SIDA) et de la leucémie/lymphome de cellules T [14]. Les analyses effectuées en laboratoire ont permis d'associer HHV-6 à la sous-famille des *β-Herpesvirinae* pour sa composition génomique colinéaire avec le génome du CMV humain (hCMV), un *β-Herpesvirinae* responsable de maladies congénitales [15]. Peu de temps après sa découverte, HHV-6 fut associé au genre des *Roseolovirus* de par son infection qui cause la roséole et dont une des manifestations se traduit par des éruptions cutanées [16,17]. À ce jour, les premières souches d'HHV-6 isolées sont encore celles utilisées comme outil de travail dans les différents laboratoires de recherches afin de caractériser l'infection par HHV-6. Parmi ces souches, la première fut isolée au NCI, nommée GS. D'autres souches furent isolées les deux années suivantes, soient U1102 (isolée au Ouganda) [18], Z29 (isolée au Zaïre) [19] et HST (isolée au Japon) [16]. C'est la souche HST qui a d'ailleurs permis d'associer son infection à la roséole. Toutefois, la réalisation d'études *in vitro* a permis d'observer des divergences qui désignaient la présence de deux types de virus dans les isolats d'HHV-6. Cette hypothèse fût validée par des analyses moléculaires en examinant les profils de digestions enzymatiques, des analyses de tropisme cellulaire des infections lytiques en observant l'effet cytopathique (CPE pour « **c**ytopathic **e**ffect ») des cellules (ballonnements des cellules), des analyses génomiques et, par des analyses sérologiques par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ensemble, ces résultats mirent en lumière l'existence de deux virus, HHV-6A et HHV-6B (HHV-6A/B). Ces deux virus appartiennent à l'espèce HHV-6 et partagent 94% d'identité en acides aminés. En revanche, ils démontrent des différences biologiques dont plusieurs sont décrites de façon non exhaustive tout au long de cette thèse, en mettant l'accent sur HHV-6B puisque c'est celui le mieux caractérisé et le plus étudié dans mes travaux. Ainsi, pour ces raisons, en 2014 le ICTV a approuvé la classification HHV-6A et HHV-6B (HHV-6A/B) afin de désigner le caractère distinctif de ces deux virus [20]. Il est important de souligner qu'avant cette distinction formelle, la plupart des études font principalement référence à HHV-6. *Au cours de cette thèse, la nomenclature HHV-6 est utilisée lorsque les études ne*

précisent pas l'espèce. D'autre part, la nomenclature HHV-6A et HHV-6B est utilisée pour référer au caractère distinctif de ces virus et la nomenclature HHV-6A/B est utilisée pour représenter un élément ou une étude qui s'applique aux deux virus.

2.2 Épidémiologie et transmission

La prévalence de l'HHV-6A est peu définie puisque les infections primaires sont possiblement asymptomatiques et se passent plus tard dans la vie [21]. Logiquement, on peut justifier le manque de données au niveau de la prévalence de l'infection de l'HHV-6A par la composition génomique très connexe avec l'HHV-6B. Par conséquent, il n'existe à ce jour aucun test sérologique clinique disponible pour les différencier [22]. Il est anticipé qu'à l'âge adulte, la population mondiale est séropositive à l'HHV-6A. En outre, une étude génotypique réalisée en Zambie et en Afrique du Sud démontre que 85% des individus infectés par l'HHV-6 sont séropositifs pour l'HHV-6A [23]. Au sujet de l'HHV-6B, c'est un virus ubiquitaire qui infecte près de 97-100% de la population mondiale [24,25]. L'infection par l'HHV-6B est acquise dès les deux premières années de la vie, soit entre six et vingt-quatre mois suivant la naissance, lorsque les anticorps maternels s'atténuent et disparaissent [24,26]. Au Canada, des anticorps contre l'HHV-6 ont pu être détectés dans 94% des individus d'une cohorte, suggérant que les sujets ont tous été infectés par l'HHV-6 et ont développé une réponse immunitaire mémoire contre ce dernier. Cependant, lors de cette étude, l'espèce n'a pas été déterminée, mais elle signale toutefois la forte prévalence de l'HHV-6 dans la population canadienne [27].

La route d'infection de l'HHV-6A n'est pas bien définie. Quant à l'HHV-6B, il est transmis par la salive et la voie olfactive par des contacts très étroits qu'ont les parents asymptomatiques avec leur enfant [24,28,29]. Bien que l'HHV-6B soit le virus le plus représenté dans la salive entre l'HHV-6A et B, deux études affirment la présence de l'HHV-6A, suggérant que celui-ci pourrait également être transmis par cette route [30,31]. Outre la salive, la possibilité de transmission de l'HHV-6 par la voie materno-fœtale, bien que très rare et moins fréquente que la transmission du hCMV, est observée chez 1% des naissances [25]. Dans un même contexte, jusqu'à présent aucun lien n'a été documenté concernant la transmission des HHV-6A/B avec l'allaitement. Chez un enfant dont l'âge est inférieur à trois ans, la transmission des HHV-6A/B est possible à la suite d'une greffe d'organe solide [32]. Un mode de transmission additionnel et unique aux HHV-6A/B parmi les herpesvirus humains est celui par la transmission verticale, c'est-à-dire de façon héréditaire [33]. *Les mécanismes derrière ce mode de transmission verticale qu'utilisent les HHV-6A/B pour persister chez son hôte sont le cœur de mon projet de doctorat et les informations utiles à la compréhension seront détaillées dans les prochaines sections.*

2.3 Génomes des HHV-6A/B

2.3.1 Structure du génome

Les génomes des HHV-6A/B sont très similaires en matière de composition génomique, car ils possèdent 90% d'identité en acides nucléiques. Leurs génomes appartiennent à la classe A (Figure 2A et 3), ce qui signifie qu'ils possèdent une seule région U flanquée par une région TR à chaque extrémité [34]. Les TRs sont composés de régions directes répétées (DR) à gauche (DR_L) et à droite (DR_R), dont la longueur est d'environ 8 à 9 kpb chacune (Figure 3). À l'extrémité 5' de chaque DR se situe une séquence pac1 (56 paires de bases) et à l'extrémité 3' une séquence pac2 (80 paires de bases). Ces séquences constituent des sites de reconnaissance et de clivage du génome viral lors de l'encapsidation qui mène à la production de nouveaux virions [35]. Avoisinant à pac2 se trouvent entre 15 à 180 répétitions de séquences télomériques (TMR pour « Telomeric Repeats ») (TTAGGG)_n d'une longueur de 0.3 à 1 kpb [36]. Il est intéressant d'indiquer que ces séquences sont identiques à celles des télomères humains situés à chaque extrémité des chromosomes. Enfin, adjacent à pac1 est localisé 0.3 à 3 kpb de séquences télomériques imparfaites (impTMR pour « imperfect Telomeric Repeats ») dont la composition en nucléotides est hétérogène, c'est-à-dire une série de séquences TA(A/G)(C/G)(C/T)C [37–39]. La région U quant à elle est composée de la majorité des gènes viraux et de l'origine de réplication (OriLyt) des HHV-6A/B, située près du centre du génome dans une région non codante [40]. En plus de ces éléments, la région U possède deux loci qui codent pour des gènes IE : les loci IE-A et IE-B. Le locus IE-A est composé de trois IR : R1 (répétitions de 12 paires de bases), R2 (répétitions de 18 paires de bases) et R3 (répétitions de 105 paires de bases) [39,41]. Par ailleurs, la région IE-A est la plus variable entre HHV-6A et HHV-6B [42]. En somme, les génomes d'HHV-6A/B font près de 160 kpb.

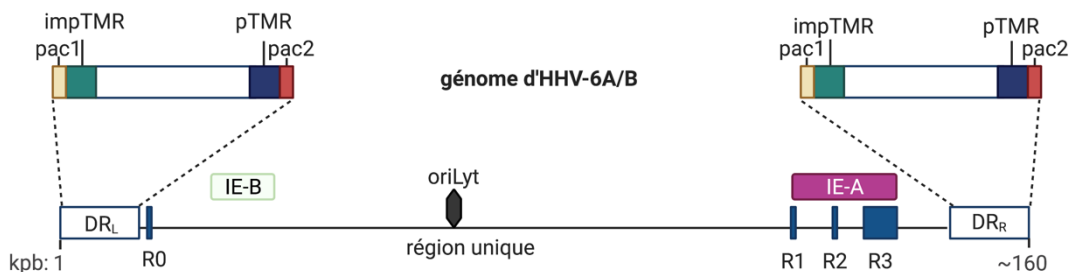


Figure 3. Schéma général du génome des HHV-6A/B. Dessin générique du génome des HHV-6A/B. La région unique (U) est flanquée par DR_L (gauche) et DR_R (droite). Un DR est composé, en direction 5' vers 3' d'une région pac1, de séquences répétées impTMR, de gènes (DR1 à DR6), de séquences répétées pTMR et d'une région pac2. À l'intérieur de la région U se situe l'origine de réplication (OriLyt) ainsi que des IR : R0, R1, R2 et R3. R0 est unique à HHV-6B. DR (région directe répétée), DR_L (DR de gauche), DR_R (DR de droite),

impTMR (télomères imparfaits), pTMR (télomères parfaits), IR (séquences internes répétées), IE (locus précoce immédiat), kpb (kilopaires de bases). Le génome et les éléments ne sont pas dessinés à l'échelle. La figure a été inspirée de [33]. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

2.3.2. Gènes et cadres de lectures

Les gènes des HHV-6A/B sont présents dans les DRs et dans la région U. Par conséquent, les gènes sont identifiés de *DR1* à *DR6* pour ceux situés dans les DRs et de *U1* à *U100* pour ceux de la région U. Le génome de l'HHV-6B possède 97 gènes (11 sont des gènes d'épissages alternatifs) et code pour 119 ORFs dont 110 ORFs sont partagés avec l'HHV-6A [38,39,41,43]. Les génomes des HHV-6A/B sont divisés en segments de gènes (Figure 4). Au début de la région U se situe un segment de gènes conservé chez les *β-Herpesvirinae* (*U2-U19*) dans lequel il y a le locus IE-B (*U16-U19*) [44]. Parmi ce locus, la protéine U19 d'HHV-6B est responsable de l'inhibition de p53, une protéine cellulaire dont l'activation mène à l'arrêt du cycle cellulaire [45]. Avoisinant le segment des *β-Herpesvirinae* est celui unique aux *Roseolovirus* (*U20-U21*, *U23-U24* et *U26*) dans lequel les gènes *U20*, *U21* et *U23* codent pour des glycoprotéines [46]. Outre les glycoprotéines, la protéine U24 joue un rôle dans l'expression du récepteur des lymphocytes T (TCR pour « T-cell receptor ») diminuant leur présentation à la surface cellulaire, ce qui réduit l'activation des lymphocytes T (LT) [47]. Sept segments de gènes sont présents dans tous les herpèsvirus et parmi ces gènes, *U27* (p41) est un facteur de processivité de l'ADN polymérase (gène *U38*). Les génomes des HHV-6A/B possèdent également des gènes uniques (*DR3*, *DR4*, *U1*, *U5-U6*, *U8-U9*, *U22*, *U61*, *U78*, *U84*, *U88*, *U91-U94*) et uniques à HHV-6B (*B1-B8*) (Figure 4). Parmi les gènes uniques aux HHV-6A/B, U22 est une glycoprotéine présente à la surface du virion et U83 est une chimiokine virale qui permet aux virus de recruter des monocytes pour y établir un état de latence [48]. U94, une des protéines les plus conservées entre les deux virus, possède des activités hélicase et exonucléase [49]. En plus de ces segments de gènes, le locus IE-A contient les ORFs des protéines IE, IE1 (*U90/U89*) et IE2 (*U90/U86/U87*) [42]. Une fois le locus IE-A traduit, R1 représente des répétitions de sérine et d'arginine (S/R) qui se situent dans la région C terminale de la protéine IE2. La répétition R2 est composée de séquences qui s'apparentent aux séquences TATA (CACATA), pouvant être liées par des facteurs de transcription. Pour sa part, R3 possède des répétitions de séquences pour l'enzyme de restriction KpnI ainsi que des sites de liaisons pour des facteurs de transcription, dont PEA3 et AP2 [34,39]. À cet égard, les répétitions R3 pourraient augmenter la transcription des gènes IE.

Comme mentionné précédemment, les génomes des HHV-6A/B possèdent des régions conservées et divergentes. Les gènes *U2-U85* partagent 95% d'homologie entre les HHV-6A/B, de même que les régions DRs (85% homologie) [39,41]. La région la plus variante entre l'HHV-6A et l'HHV-6B est dans le locus IE-A

dont l'homologie en acides nucléiques est de 72% [39]. Dans le locus IE-A, les IRs R1, R2 et R3 varient en matière de nombre de répétitions entre les deux virus. En somme, la région IE-A permet de distinguer l'HHV-6A de l'HHV-6B par leur composition génique ainsi que par les transcrits et les protéines appartenant au locus IE-A. Dans la section 7 de l'introduction, les ORFs U89/U90 et la protéine IE1 seront détaillés puisque la caractérisation d'IE1 dans le contexte de l'HHV-6B fait partie d'un élément central de mon projet de doctorat.

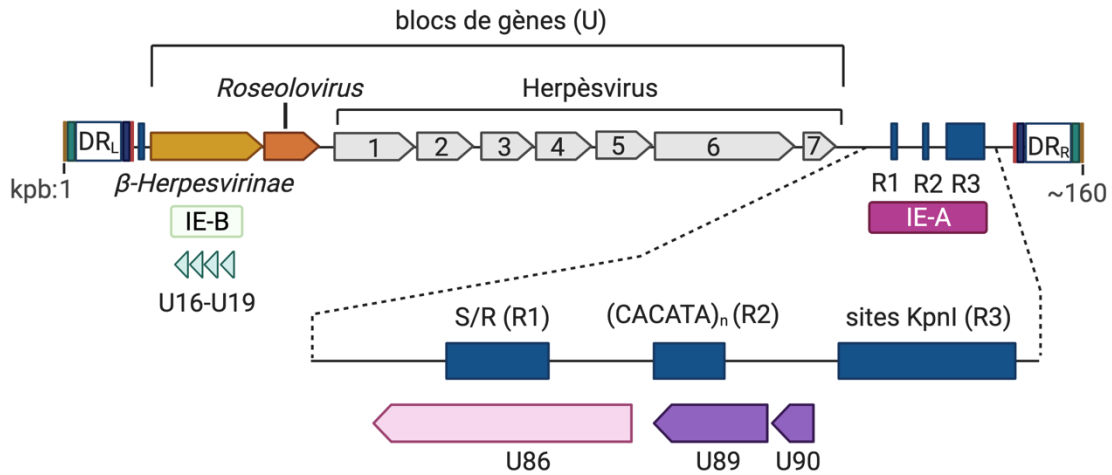


Figure 4. Schéma des gènes et des cadres de lectures des HHV-6A/B. Le génome des HHV-6A/B est composé d'un segment de gènes communs aux *β-Herpesvirinae* qui comprend le locus IE-B codant pour les gènes U16-19, un segment de gènes uniques aux *Roseolovirus* et 7 segments de gènes partagés entre tous les herpèsvirus (1 à 7). Les gènes IE se trouvent dans deux locus : IE-A qui possède les IRs, et le locus IE-B. L'IR R1 est riche en répétitions S/R, R2 est riche en répétitions CACATA et R3 possède des répétitions pour le site de clivage de KpnI. À l'intérieur du locus IE-A se situent les gènes U86, U88-91. IE (locus précoce immédiat), IR (séquences internes répétées), kpb (kilopaires de bases), S/R (sérine/arginine), DR (région directe répétée). Le génome et les éléments ne sont pas dessinés à l'échelle. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

2.4 Tropisme cellulaire

Afin d'adhérer à une cellule, l'HHV-6A se lie au récepteur cellulaire CD46 [50], un immunomodulateur exprimé à la surface de toutes les cellules nucléées. Pour sa part, l'HHV-6B peut aussi se lier à CD46, mais son récepteur principal est le CD134, un récepteur de la nécrose de tumeur (TNFR pour « **T**umor **N**ecrosis **F**actor **R**eceptor ») exprimé à la surface des LT activés [51]. Récemment, un nouveau récepteur lié par les HHV-6A/B a été identifié, le récepteur GP96 (ou GRP94) [52]. GP96 est une glycoprotéine qui appartient à la famille des protéines de chocs thermiques HSP90 [53,54] et est généralement présente dans le réticulum endoplasmique (RE), mais est également exprimée à la surface cellulaire. Par conséquent, l'expression de ces différents récepteurs suggère que les HHV-6A/B sont aptes d'infecter différents types de cellules.

Cependant, les HHV-6A/B peuvent seulement se propager dans des niches cellulaires spécifiques afin de générer de nouveaux virions.

Au moyen d'études *in vitro*, il a été mis en évidence que la niche principale pour la réplication et la production des HHV-6A/B sont les LT CD4+ [55]. L'infection par les HHV-6A/B peut être observée par un CPE. Ce phénotype est défini par la morphologie des cellules sous forme de ballonnements, ce qui conforme un volume beaucoup plus grand à la cellule infectée que les cellules voisines non infectées [56]. En laboratoire, il a été analysé que différentes souches de lignées cellulaires lymphoblastiques T CD4+ étaient susceptibles à la propagation de l'HHV-6A et/ou l'HHV-6B. Les souches de l'HHV-6A GS et U1102 peuvent être amplifiées dans des cellules LT immortalisées HSB-2 et J-Jhan, respectivement [56–58]. L'HHV-6A peut également se répliquer de façon lytique dans des SUP-T1 (lignée immortalisée LT CD4+) et des astrocytes primaires fœtaux [58]. Les souches HST et Z29 (HHV-6B) peuvent être produites dans les lignées LT immortalisées MOLT-3, MT-4 et SUP-T1 [57]. Contrairement à l'HHV-6A, le taux d'infection de l'HHV-6B dans les astrocytes est beaucoup plus faible [59]. D'autre part, il a été démontré que les deux virus peuvent se répliquer dans les cellules dendritiques et les cellules gliales [60]. *In vivo*, l'infection primaire menant à la production active de virions, en plus des LT, peut être réalisée dans les monocytes [61]. Par ailleurs, les virus peuvent se répliquer dans les glandes salivaires, ce qui expliquerait pourquoi la transmission peut se faire par la salive. Les HHV-6A/B peuvent également être retrouvés dans le liquide cébrospinal (CSF pour « cerebrospinal fluid ») [62,63].

Au-delà de la production virale, les HHV-6A/B peuvent infecter d'autres types cellulaires avec un niveau de réplication virale limitée. En laboratoire, les HHV-6A/B peuvent infecter différents types de lignées cellulaires immortalisées pour la culture cellulaire telle que des fibroblastes, des glioblastomes, des cellules épithéliales ainsi que neuronales dont des cellules gliales [15,21]. *In vivo* chez l'humain, les HHV-6A/B infectent des cellules germinales, endothéliales, épithéliales, neuronales, des cellules hématopoïétiques (CH) de la moelle osseuse ce qui leur permet d'infecter toutes les autres cellules mononuclées du sang comme des monocytes/macrophages [64,65]. Puisque les HHV-6A/B sont restreints aux humains, ils n'infectent pas les animaux et pour cette raison, les modèles *in vivo* sont peu/pas accessibles. Il existe des souris transgéniques pour le récepteur CD46, mais les données actuelles disponibles sont que pour l'HHV-6A. Notamment, les infections par HHV-6A chez ces souris mène à une production de protéines virales sans infections actives et de pathogénèses associées [60].

2.5 Cycles viraux

2.5.1 Phase lytique

2.5.1.a Attachement des HHV-6A/B et transport du génome au noyau

Pour qu'une cellule soit infectée, l'enveloppe virale doit d'abord fusionner avec la membrane cellulaire d'une cellule hôte [66]. Généralement, un herpèsvirus s'adsorbe sur une cellule lorsque les glycoprotéines de celui-ci s'attachent à des héparines sulfates (polysaccharides linéaires) présents à la surface extracellulaire [67–69]. Dans le cas des HHV-6A/B, la formation de tétramères gH/gL/gQ1/gQ2 est responsable et essentielle à l'adhésion des HHV-6A/B aux cellules, par leur liaison avec leurs récepteurs cellulaires respectifs [70]. À la suite de l'adhésion du virus à une cellule, l'enveloppe virale se fusionne avec la membrane cellulaire afin de permettre l'entrée de la nucléocapside virale entourée du tégument, dans le cytoplasme [71]. Une fois dans l'espace intracellulaire, les protéines du tégument se dispersent et libèrent la nucléocapside dont celle-ci rejoint le noyau à l'aide des microtubules [72]. Par la présence de pores nucléaires dans l'enveloppe du noyau, la nucléocapside relâche l'ADNdb viral dans ce dernier.

2.5.1.b Transcription, traduction et réplication virale

Les herpèsvirus ne possèdent pas d'ARN polymérase pour transcrire leurs gènes, ils utilisent donc celle de la cellule hôte. La transcription de ceux-ci est réalisée de façon séquentielle à la suite de l'entrée du génome viral dans le noyau de la cellule hôte, en débutant par la transcription des gènes *IE*, *E* pour terminer avec la transcription des gènes *L* [73,74]. En revanche, certaines protéines *IE* ne requièrent pas la synthèse protéique *de novo* pour être exprimées et leur transcription subséquente est généralement activée grâce à des protéines du tégument [75]. Dans le contexte des HHV-6A/B, lorsque les protéines *IE* rejoignent le noyau, elles activent la transcription des gènes *E* dont celui de l'ADN polymérase virale (*U38*). L'ARNm *E* passe ainsi du noyau au cytoplasme, où il est traduit. La protéine produite joint ensuite le noyau où elle contribue à la réplication du génome viral.

La réplication du génome herpétique a lieu dans des compartiments de réplication virale (CRV) de façon continue sous forme de « rolling circle » (RCA pour « **R**olling **C**ircle **A**mplification ») (Figure 5) [40,76,77]. La synthèse du génome des HHV-6A/B débute par la liaison d'U73, une protéine qui se lie à l'origine (OBP pour

« **O**riBnding **P**rotein »), aux sites OBP-1 et OBP-2 de l'oriLyt situé entre les gènes *U41* et *U42* [78,79]. En plus d'*U73*, les HHV-6A/B ont besoin d'un complexe hélicase/primase (pU43, pU74 et pU77) [80] et des sous-unités de l'ADN polymérase pU41, pU38 et pU27 [81,82]. Une fois l'ADN viral répliqué, les protéines structurales du virion sont produites. Ces protéines permettent l'assemblage de la nucléocapside. Lorsque la nucléocapside est formée, elle introduit une molécule d'ADNdb du génome complet généré par clivage du concatémère aux sites *pac1* et *pac2*, présents à chaque extrémité du génome [83,84].

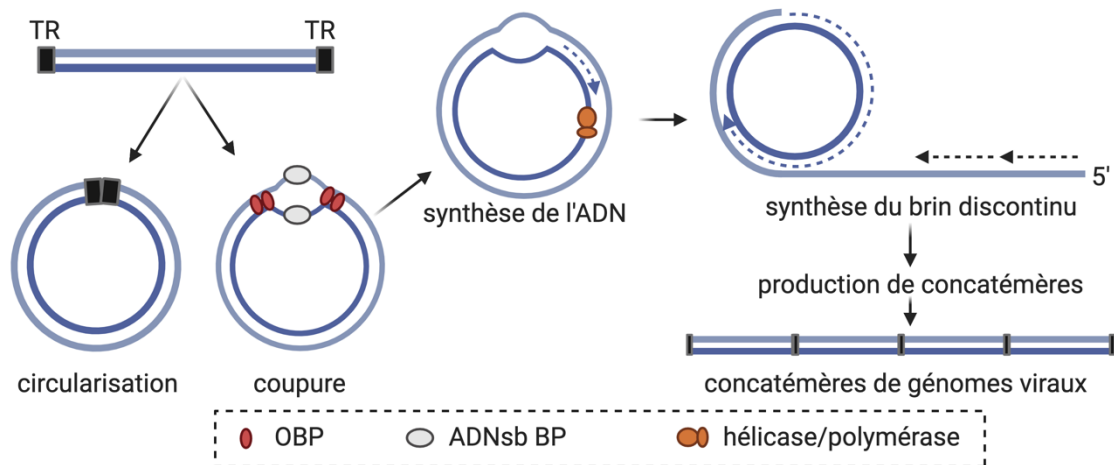


Figure 5. Réplication de l'ADN viral par RCA. Le principe de la RCA démarre par une protéine qui se lie à l'origine de réplication (OBP) et par le recrutement d'une hélicase afin de permettre la formation d'une bulle entre les deux brins pour y engager la machinerie de réplication de l'ADN. Des protéines virales pouvant lier l'ADNs (ADNs BP pour « Binding Protein ») s'associent aux brins séparés. Le complexe hélicase/ADN polymérase virale permet à la polymérase de synthétiser l'ADN du brin intérieur, de façon circulaire en direction 5' vers 3'. Le nouveau brin synthétisé sert à son tour de gabarit pour la synthèse du brin discontinu. La réplication circulaire de l'ADN peut être réalisée plusieurs fois, ce qui en résulte en plusieurs copies fusionnées du génome, formant un long concatémère. TR (répétitions terminales). Image inspirée de *Principles of Virology* [85]. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

2.5.1.c Production des particules virales

Une fois que la nucléocapside nouvellement synthétisée possède une molécule du génome viral d'ADNdb, elle sort du noyau par exocytose, ce qui lui confère une enveloppe temporaire qui est perdue une fois rendu dans le cytoplasme (Figure 6) [86–88]. Autour de la nucléocapside s'assemblent ensuite des protéines du tégment dont le site exact de l'assemblage demeure inconnu encore à ce jour, mais semble débiter dans le noyau et se continuer dans le cytoplasme [8]. La particule virale transgresse vers la plateforme *trans* Golgi (TGN pour « **t**rans **G**olgi **n**etwork ») et/ou à la vacuole venant du TGN dans laquelle elle acquiert des glycoprotéines virales qui s'assemblent autour du pseudovirion pour un réenveloppement [12]. L'enveloppe

virale acquiert également des protéines cellulaires lors du bourgeonnement du virus hors des organelles cellulaire [89,90]. Les virions sont subséquentement exportés par exocytose, par bourgeonnement ou par la lyse cellulaire comme c'est le cas avec les cellules grièvement infectées [91,92]. Ces virions peuvent ensuite atteindre d'autres cibles et conduire à des manifestations cliniques. *In vitro*, le temps requis pour produire de nouveaux virions des HHV-6A/B est de 72 heures à la suite de l'infection, où le CPE permet d'apprécier et de suivre le niveau de l'infection [92].

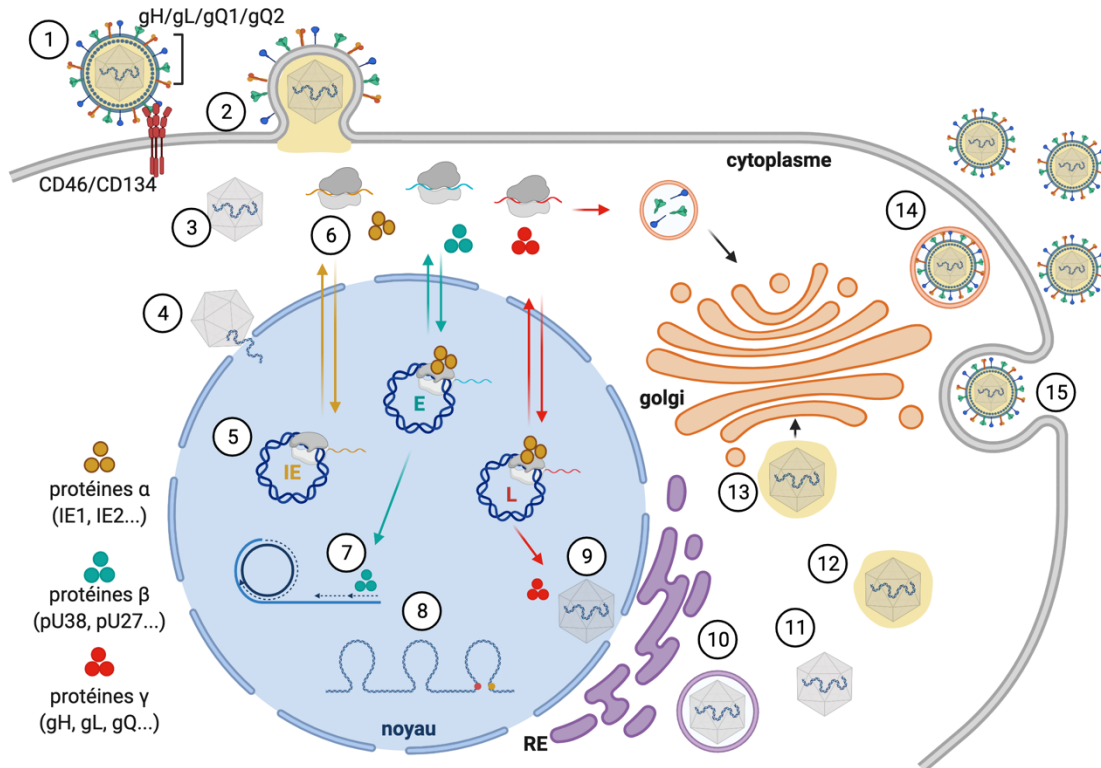


Figure 6. Schéma illustrant la production de virions. (1) Le virus adhère à une cellule cible par la liaison des tétramères gH/gL/gQ1/gQ2 aux récepteurs cellulaires CD46 ou CD134. (2) L'adhésion du virus émet la fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire, relâchant la nucléocapside entourée de tégument dans le cytoplasme de la cellule hôte. (3) La nucléocapside se rend à la surface du noyau où elle y relâche l'ADNdb (4). (5) La transcription virale débute par les gènes *IE* dont leur ARNm est traduit dans le cytoplasme en protéine *IE* telles que *IE1*, *IE2*, etc. (6) Les protéines traduites se déplacent au noyau pour permettre la transcription de gènes *E* et *L*. (7) La traduction des gènes *E* permet de débuter la réplication de l'ADN viral de façon RCA. (8) Le génome viral répliqué en concatémère est encapsidé grâce aux protéines *L* qui forment la capsid (9). (10) Une seule molécule d'un génome complet est incorporée dans la nucléocapside grâce aux séquences de clivage (rouge et jaune). La nucléocapside qui contient un génome viral subit un enveloppement en passant du noyau au réticulum endoplasmique (RE) et acquiert des protéines du tégument. (11) Une fois dans le cytoplasme, la nucléocapside virale perd l'enveloppement et acquiert des protéines du tégument (12). (13) Le pseudovirion passe par l'appareil de Golgi où la particule virale acquiert son enveloppe virale de glycoprotéines (14). (15) Le nouveau virus mature est relâché dans le milieu extracellulaire par exocytose. RCA (« Rolling Circle Amplification ») ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

2.5.2 Phase de latence

Les herpèsvirus parviennent à manipuler la cellule hôte en favorisant un état de latence lorsque l'environnement cellulaire n'est pas favorable à la production virale [93]. De façon générale, la latence est définie par la présence du génome viral à l'intérieur du noyau d'une cellule tout en maintenant une expression minimale de protéines virales. Chez certains herpèsvirus, il a été démontré que le génome en état de latence est de la forme épisomale (circulaire). À ce sujet, des *γ-herpesvirinae* maintiennent leurs épisomes dans les cellules en s'attachant aux chromosomes de lymphocytes **B** (LB). Cette liaison épisome/chromosome permet la réplication et la distribution fidèle de génomes viraux aux cellules filles lors de la division cellulaire [94]. Récemment, une étude a souligné pour la première fois ce même mode de latence chez un *β-herpesvirinae*, hCMV [95]. Dans certaines situations, l'état de latence d'un herpèsvirus peut transiter de la phase latente à la phase lytique, menant à la production de nouveaux virions et à des infections secondaires. Les causes des réactivations peuvent provenir de sources telles qu'une suppression du système immunitaire, une infection par d'autres virus, des changements hormonaux, des fièvres, pour n'en énumérer que quelques-unes [96].

La latence des HHV-6A/B est un sujet d'actualité dans la communauté scientifique. Alors que chez une personne saine les réactivations sont asymptomatiques, elles engendrent de graves conséquences cliniques chez les individus avec une santé précaire [97–99]. Les études cliniques suggèrent que les niches cellulaires de la latence des HHV-6A/B sont les monocytes/macrophages [64] ainsi que les cellules progénitrices de la moelle osseuse [100]. De plus, similaire aux herpèsvirus simplex, les HHV-6A/B semblent occuper un état de latence dans les cellules neuronales dont les oligodendrocytes et les astrocytes [101,102]. L'ADN de l'HHV-6 peut également être détecté dans la salive de personnes en santé (asymptomatiques) [26]. Cependant, les connaissances quant aux mécanismes de la latence des HHV-6A/B demeurent à ce jour incomplètes. En effet, malgré les efforts de plusieurs groupes, la forme épisomale des HHV-6A/B reste à être démontrée. Néanmoins, à partir de cellules en infection latente, il a été possible d'identifier deux sites de transcriptions de la latence qui produisent quatre transcrits appartenant au locus IE-A [103]. Kondo et collègues ont mis en évidence un premier site de transcription de la latence à 9.7 kpb de la position de départ des gènes des protéines IE1 et IE2, des produits d'épissage alternatif [104]. Le deuxième site se situe entre l'exon 2 et 3 des gènes des protéines IE1/IE2. Par ailleurs, des études récentes associent la protéine U94 comme un transcrit de latence supplémentaire [105,106]. Sous ces réserves, le rôle exact de ces protéines dans la latence reste encore à être défini.

2.6 Infections primaires et pathologies associées

L'infection par l'HHV-6A étant asymptomatique, peu d'informations reliées à son infection primaire et sa pathologie associée sont documentées à ce jour. Néanmoins, des études associent l'HHV-6A à la maladie d'Hashimoto, une inflammation chronique de la thyroïde [107], et à la sclérose en plaques (SEP), une maladie neuronale caractérisée par des dommages à la myéline des neurones. À ce sujet, l'HHV-6A a été retrouvé dans les cellules de patients affectées par la SEP ainsi que dans les plaques de la maladie, contrairement aux tissus sains [108]. Il demeure que beaucoup d'études restent à être effectuées pour y associer un rôle causal dans ces pathologies. Parallèlement, dans certains cas, l'infection primaire de l'HHV-6A peut mener à des encéphalites [109]. La pathologie la mieux définie des HHV-6A/B est celle de l'infection primaire par l'HHV-6B. Lors de son infection, l'HHV-6B est majoritairement associé à une fièvre importante. 20% des enfants manifestent une éruption cutanée, l'*exanthème subitum* ou mieux connu sous le nom de la roséole [16,17]. Les symptômes de la roséole se manifestent une à deux semaines après l'infection par une température corporelle de 40°C qui durent 4-5 jours (fièvre). Dans la majorité des cas, celle-ci se résorbe et l'enfant retrouve son état de santé. À l'opposé, de rares cas manifestent des détresses respiratoires et des encéphalites puisque le virus peut franchir la barrière hématoencéphalique. À cet égard, la roséole est responsable d'hospitalisations chez les jeunes enfants et dans de rares cas, elle peut causer la mort [25,26,110,111]. Au niveau des chiffres, l'infection par l'HHV-6B chez les enfants symptomatiques représente 10-45% des cas admis à l'urgence dont 1% d'entre eux sont hospitalisés [112]. Les symptômes les plus communs de chez ces patients sont la fièvre (57%), l'agitation (69%) et la rhinorrhée (65%). D'autres symptômes moins fréquents d'HHV-6B dont la toux (33%), la diarrhée (26%) et des éruptions cutanées (31%) sont également observées [24].

À la suite de l'infection primaire, les HHV-6A/B sont maintenus en latence dans les monocytes/macrophages du sang périphérique [61,64,65], dans les glandes salivaires et dans les cellules du système nerveux central [28,113]. Tel que mentionné précédemment, le génome épisomale représentatif de l'état latent d'un herpesvirus reste à être démontré pour les HHV-6A/B. Nonobstant, le virus de la maladie de Marek (MDV pour « **M**arek **D**isease **V**irus »), un *α -herpesvirinae* chez la volaille, exerce son état de latence en intégrant son génome entier dans les chromosomes de l'hôte. Parallèlement chez l'humain, à partir de cellules de donneurs, l'intégration du génome complet de l'HHV-6A ou de l'HHV-6B a pu être détectée [99,114,115]. Il est également possible pour les HHV-6A/B de s'intégrer *in vitro* en infectant différentes lignées immortalisées utilisées pour la culture cellulaire. L'intégration des HHV-6A/B peut être évaluée par fluorescence conjuguée à l'hybridation *in situ* (FISH pour « **F**luorescence **i**n **s**itu **h**ybridization ») d'un étalement de chromosomes en métaphase suivi d'un marquage de l'ADN avec une sonde HHV-6 [116–118]. *Puisque mon projet de doctorat vise à mieux*

comprendre les mécanismes sous-jacents à l'intégration des HHV-6A/B, les informations disponibles à ce jour concernant ce mode de latence seront détaillées à la section 3 de l'introduction.

2.7 Réactivations et traitements

La réactivation des HHV-6A/B est problématique chez les personnes dont le système immunitaire est compromis. HHV-6B se réactive chez 20-30% des patients ayant subi une greffe d'organe solide et chez 30-50% des patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) (GCSH) [119,120]. Les réactivations chez ces patients sont détectées deux à quatre semaines suivant une greffe/transplantation et se manifestent entre autres par des encéphalites [121]. À ce propos, 1-10% des GCSH développent des encéphalites dont la présence de l'HHV-6B est détectée dans le CSF [122]. Un type spécifique d'encéphalite est développé chez ces individus, soit une encéphalite aiguë du système limbique post-transplantation (PALE pour « **P**ost-transplant **A**cute **L**imbic **E**ncephalitis ») qui est représentée dans 1-3% des cas et qui cause des symptômes plus sévères [63,123]. Chez des patients greffés, la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD pour « **G**raft **V**ersus **H**ost **D**isease ») se manifeste entre deux à quatre semaines post-transplantation à la suite à une réactivation de l'HHV-6B [124,125]. Dans d'autres cas, la réactivation mène à des épilepsies [126,127]. Une problématique additionnelle reliée à la réactivation de l'HHV-6B est la réactivation d'autres virus opportuns dont l'hCMV, l'EBV et le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [128–131]. Par ailleurs, 8% du génome humain est composé de séquences endogènes de rétrovirus (HERV pour « **H**uman **E**ndogenous **R**etrovirus »), ces gènes peuvent être activés par la réactivation des herpèsvirus qui possèdent des protéines transactivatrices de promoteurs hétérologues [34,132]. Dans ce contexte, la réactivation de l'HHV-6A est associée à l'induction de l'expression du gène de la protéine env, une protéine d'enveloppe des rétrovirus associée à la SEP (MSRV pour « **M**ultiple **s**clerosis-related **R**etrovirus »). Par ce fait, lorsqu'exprimée, la protéine env est reconnue par un récepteur de reconnaissance de motifs (PRR pour « **P**attern **R**ecognition **R**eceptor »), le TLR4 (« **T**oll-like **R**eceptor **4** »), ce qui mène à l'inflammation du tissu et à la SEP [133]. D'autres études suggèrent que la réactivation de l'HHV-6A est liée à la progression de la SEP ainsi que la maladie de l'Alzheimer puisque la présence d'ARNm de l'HHV-6A dans les cellules affectées a été détectée [134,135].

À ce jour, il n'existe aucun traitement spécifique aux HHV-6A/B pour traiter leurs réactivations [136]. Actuellement, les réactivations qui causent des encéphalites sont traitées avec des antiviraux contre l'hCMV comme le foscarnet ou le ganciclovir dont l'efficacité est mesurée par une EC₅₀ de 8.4µM et >25µM, respectivement [137,138]. Ces deux drogues résorbent les réactivations en bloquant la synthèse de l'ADN viral, en inhibant l'activité de l'ADN polymérase virale. Un autre antiviral comme le cidofovir est également

utilisé avec une EC₅₀ de 12-15µM, mais le ganciclovir demeure le plus efficace contre les HHV-6A/B [138]. En revanche, l'utilisation de ces antiviraux chez les personnes immunosupprimées à la suite d'une GCSH est toxique pour l'hématopoïèse et peut causer des effets secondaires cliniques graves [139,140]. De plus, certains HHV-6A/B ont acquis une résistance à ces antiviraux par des mutations de leur ADN polymérase [141,142]. Pour ces raisons, des compagnies pharmaceutiques et des groupes de recherches sur les HHV-6A/B s'intéressent activement aux développements de thérapies candidates dans le but de traiter des réactivations problématiques par les HHV-6A/B.

3. Intégration chromosomique des HHV-6A/B

L'intégration de segment de génomes d'herpèsvirus dans les chromosomes de leurs hôtes n'est pas un phénomène rare. En effet, il a été rapporté que les HSV ou les herpèsvirus équinaux 1 et 3 peuvent intégrer des fragments de leur génome à celui de la cellule hôte [143–146]. Or, puisque ces intégrations sont aléatoires, les effets précis associés aux intégrations sont peu documentés. Du moins, ces intégrations ne permettent pas la génération d'un cycle lytique dû à l'absence de génome viral complet intégré. Dans la même famille de virus, l'EBV peut intégrer son génome entier dans les chromosomes humains [147,148]. L'étude la plus récente concernant l'intégration de l'EBV indique qu'il y a 909 sites uniques d'insertion dans les cellules EBV positives (Raji et C666-1) et ce, dans différents chromosomes [149]. Théoriquement, un génome entier intégré serait capable de s'exciser, se répliquer et transcrire ses gènes viraux afin de mener à la production de nouveaux virions. Cependant, la réactivation de l'EBV de sa forme intégrée n'a toujours pas été documentée [150,151]. Durant plusieurs années, la présence de génomes d'HHV-6A/B dans les chromosomes humains était considérée comme des cas isolés d'intégration au hasard, comme c'est le cas les virus mentionnés précédemment. Il est maintenant évident à la suite des preuves directes et au recensement de plusieurs cas à travers le monde que les HHV-6A/B intègrent leur génome entier dans les chromosomes humains et ces intégrations peuvent être transmises à la descendance [152–154].

3.1 Découverte et transmission

En 1993, Luppi et collègues ont détectés dans la salive et dans les PBMCs de patients atteints de maladies lymphoprolifératives et de la SEP, l'intégration de l'HHV-6 [114]. Appuyée par des analyses ayant identifié les génomes intégrés dans différents types cellulaires, mais dans les mêmes chromosomes respectifs entre les individus, l'intégration aurait eu lieu à partir de cellules germinales. L'hypothèse qui suggère que l'intégration est héréditaire fut fortement acceptée à la suite d'une première étude réalisée par Daibata et collègues. En

effet, en traçant l'arbre généalogique d'un patient intégré, ils ont pu démontrer l'intégration fidèlement transmise de l'HHV-6 sur trois générations, et ce, dans le chromosome 1q44 de différents tissus [153]. La même année, ce même groupe publia un autre cas de transmission verticale d'un père asymptomatique avec l'intégration 1q44, et de la mère malade avec l'intégration 22q13 dont leur fille portait les deux intégrations soit, 1q44 et 22q13 [152]. Depuis, d'autres études de cas ont rapporté des intégrations héréditaires qu'on nomme aujourd'hui l'iciHHV-6A/B (pour « inherited chromosomally-integrated HHV-6A/B ») [99,155].

En lien avec l'intégration des HHV-6A/B dans des cellules germinales, il est intéressant de souligner qu'un groupe au Danemark a relevé la présence de l'ADN des HHV-6A/B dans le sperme de donneurs dans lesquels les HHV-6A/B pouvaient se lier aux spermatozoïdes [156,157]. Ces évidences apportent un poids supplémentaire à l'hypothèse qui suggère que l'intégration chromosomique héritée se passe lors de l'infection de cellules reproductrices et qui, en réponse à la fécondation, serait transmise à 50% de la descendance selon la loi de Mendel (Figure 7B). La prévalence mondiale de l'iciHHV-6A/B est de 1.1% [158]. Dans 60-80% des cas iciHHV-6A/B, les gens sont intégrés par l'HHV-6B et 20-40% des cas sont intégrés par l'HHV-6A, à l'exception du Japon où on retrouve que très rarement la forme héritée de l'HHV-6A. De plus, le nombre de cas iciHHV-6A/B varie selon la région géographique [155,159,160]. L'endroit qui semble le plus touché est le Royaume-Uni dont l'intégration varie entre 1 à 4% [161,162], totalisant une moyenne de 1 à 3% pour l'Europe [160,163,164]. En Amérique du Nord, la prévalence se situe entre 1 à 1.5% pour les États-Unis [125,165]. Une étude réalisée par notre équipe de recherche a permis d'estimer le pourcentage de prévalence de l'iciHHV-6A/B à 0.58% au Canada, à l'aide de la biobanque CARTaGENE [166]. Dans cette biobanque, des échantillons d'environ 20 000 individus canadiens entre l'âge de 40 à 69 ans, dont 55.7% provenant de la province du Québec et 17% qui venaient hors du Canada étaient disponibles. Parmi ceux-ci, 113 ont été positifs pour l'intégration des HHV-6A/B (0.58%). L'intégration de l'HHV-6B représentait 60% des cas intégrés et 40% des cas étaient iciHHV-6A. L'étude a également soulevé que le sexe n'était pas un facteur de prédisposition à l'intégration, pour 43% de femmes et 56% d'hommes intégrés, sans différence significative. Il est important de mentionner que la possibilité pour les HHV-6A/B de s'intégrer dans des cellules somatiques n'est pas exclue puisqu'il est possible pour les HHV-6A/B de s'intégrer *in vitro* (Figure 7A). Cependant, dû à l'impossibilité de détecter des événements rares, il est difficile de documenter des intégrations des HHV-6A/B à des cellules somatiques.

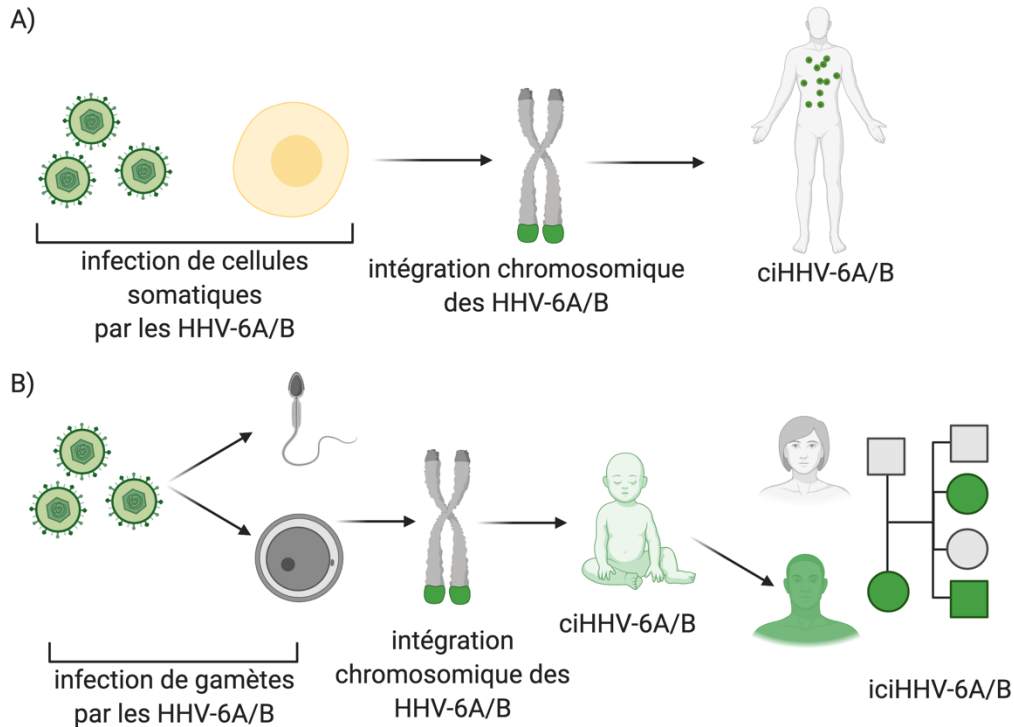
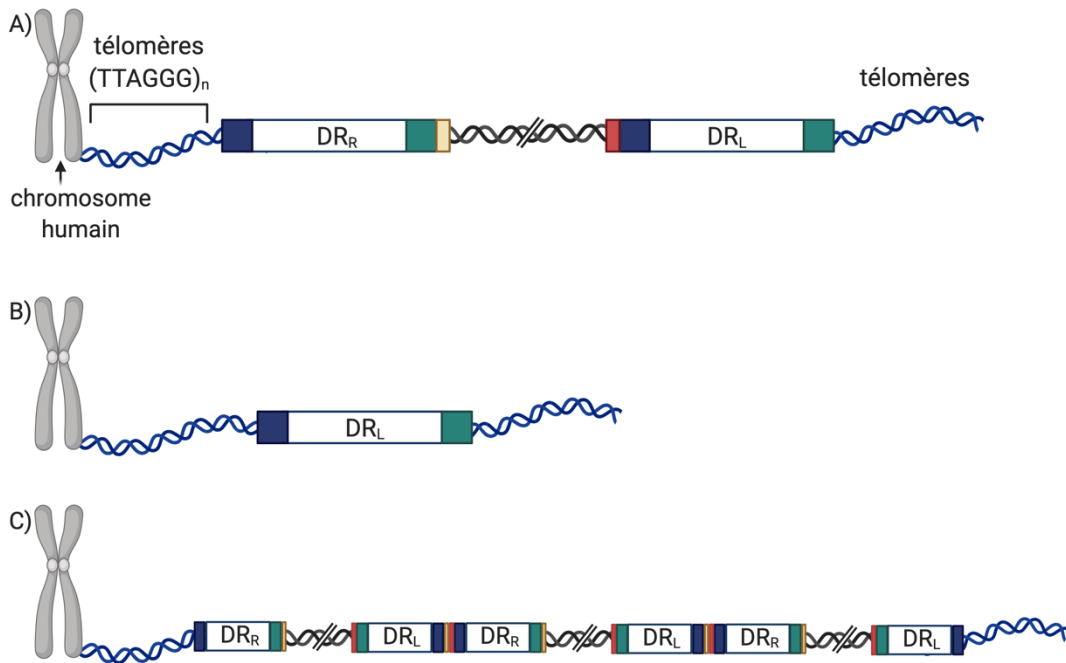


Figure 7. Modèles possibles de l'intégration des HHV-6A/B chez l'humain. A) Infection et intégration des HHV-6A/B dans des cellules somatiques de façon aléatoire chez l'hôte lors d'infections primaires et/ou secondaires à la suite de réactivations. B) Infection et intégration des HHV-6A/B dans une cellule reproductrice fécondée donnant un individu avec une copie d'HHV-6A ou B par cellule. L'individu avec une copie HHV-6A/B par cellule transmet l'intégration de façon héréditaire à 50% de sa descendance. ciHHV-6A/B (« chromosomally integrated HHV-6A/B »); iciHHV-6A/B (« inherited chromosomally integrated HHV-6A/B »). Figure inspirée de [167]. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com

3.2 Structures des génomes des HHV-6A/B intégrés aux chromosomes humains

Grâce aux technologies de séquençage, il a été possible d'identifier à partir de cellules iciHHV-6A/B de donneurs que les génomes des HHV-6A/B sont intégrés à partir de leur DR_R, à la région subtélomérique des télomères humains, soit à l'extrémité d'un chromosome de la cellule hôte (Figure 8) [168,169]. On note également une perte de la séquence pac2 au DR_R et la perte de la séquence pac1 au DR_L, soit à la terminaison du chromosome intégré [115]. L'absence de ces séquences serait compatible avec des événements de recombinaison homologue (RH) dans lesquelles les extrémités des séquences subissent une résection et dont les régions non homologues aux extrémités sont perdues. De plus, à la fin du DR_L du génome intégré se trouvent les impTMR qui semblent servir de gabarit pour l'élongation des télomères [170]. À l'occasion, la présence unique d'un DR ainsi que des individus qui possèdent l'intégration de concatémère de

génomés des HHV-6A/B peut être détectée (Figure 8B-C) [161,170,171]. À ce sujet, il est possible d'évaluer le nombre de génomes complets intégrés selon le nombre de DR dans la région télomérique.



3.3 L'intégration des HHV-6A/B comme mode de latence

Dans l'optique de se réactiver, les génomes viraux intégrés doivent être capables d'initier un cycle lytique et ainsi générer des virions. En 2015, Bell et collègues rapportent à partir de cellules de donneurs iciHHV-6 la présence d'un génome HHV-6 circulaire extrachromosomique possédant un seul DR [171]. À la lumière de cette observation, ils ont émis l'hypothèse que le génome viral s'excise des télomères par la formation d'une boucle en t (« t-loop ») à la suite d'un événement de recombinaison entre des séquences homologues (Figure 9). La notion des télomères sera détaillée dans la section 5. Brièvement, à chaque cycle cellulaire, les télomères perdent en longueur et forment une « t-loop » dans le but de protéger les chromosomes. Pour réaliser une « t-loop » dans un contexte de cellules ciHHV-6A/B, deux mécanismes pourraient être possibles et mèneraient à l'excision des génomes d'HHV-6A/B intégrés (Figure 9B-C). La résultante serait un génome

viral circulaire avec un seul DR qui possède une séquence pac1 et pac2 (Figure 9D). De plus, la présence d'un seul DR intégré pourrait s'expliquer par une des possibilités d'excisions du génome viral (Figure 8B et Figure 9B) [115]. Dans l'ensemble, ces possibilités suggèrent que l'intégration peut être un mode de latence pour les HHV-6A/B. Un point supplémentaire qui suggère que les génomes des HHV-6A/B servent de mode de latence est la conservation des génomes viraux intégrés. Ce point a été validé à partir de génomes intégrés des HHV-6A/B qui demeurent intacts et leurs ORFs conservés [158,173].

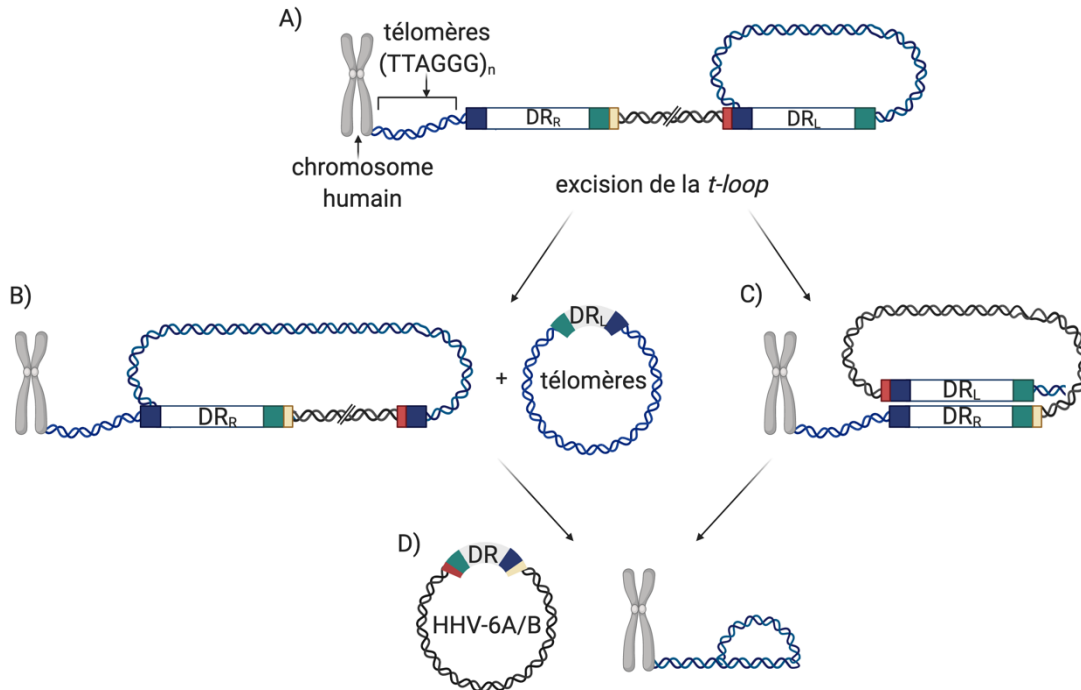


Figure 9. Mécanismes possibles de l'excision du génome des HHV-6A/B des télomères pour mener à la réactivation. A) Les répétitions télomériques forment une « t-loop » dans le TMR (bleu) du génome des HHV-6A/B. B) Possibilité 1 : La boucle s'excise laissant le génome intégré dépourvu de DR_L mais, gardant la séquence pac2 et le TMR de ce dernier. Le DR excisé se trouve sous forme d'ADN télomérique extrachromosomique circulaire avec une partie du DR_L d'HHV-6A/B. C) Possibilité 2 : Le DR_L se recombine avec le DR_R et s'excise, donnant D) Un génome complet d'HHV-6A/B avec un seul DR et un chromosome avec un télomère raccourci. DR_{L/R} (région directe répétée gauche/droite). Figure inspirée de [172]. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

Au-delà de la possibilité des génomes d'HHV-6A/B de s'exciser et de se répliquer, l'état de latence d'un herpesvirus est maintenu par l'expression de transcrits viraux associés à la latence. Il a été mentionné dans la section 2.5.2 que les protéines IE1 et U94 seraient associées à des transcrits de latence. Cette possibilité a également été étudiée à partir de cellules de donneurs intégrés. En effet, le gène *U94* semble être un candidat intéressant associé à la latence puisqu'il est exprimé dans 54.5% des cas iciHHV-6A/B. Dans cette même cohorte, 36.4% des gènes lytiques (*U22* et *U42*) sont également exprimés dans des PBMCs iciHHV-

6A/B, ce qui suggère que le virus peut se réactiver de son état intégré [48]. En plus d'*U94*, des études transcriptomiques démontrent que les gènes *U90* et *U100* sont exprimés dans des tissus de donneurs iciHHV-6A/B [115,174]. Ces données primaires exposent la possibilité pour des génomes intégrés d'être exprimés à un niveau basal ainsi qu'à s'exciser de leur état intégré, menant à un nouveau mode de latence possible pour un herpèsvirus humain.

3.4 Méthodes de détections

L'iciHHV-6A/B est associée aux faux diagnostics d'infection active des HHV-6A/B. Par conséquent, certains patients sont traités avec des antiviraux en l'absence d'une infection virale réelle. Ce traitement met ainsi à risque la santé des patients vulnérables tels que ceux ayant subi une GCSH. Il est donc primordial de pouvoir différencier la forme iciHHV-6A/B d'une infection active afin que le patient soit pris en charge de façon adéquate. Pour la plupart des herpèsvirus, la détection de l'ADN viral par PCR quantitative (qPCR pour « **quantitative PCR** ») à partir d'échantillons biologiques est associée à une infection active/réactivation. Dans le cas des HHV-6A/B, toutes les cellules possèdent une copie des HHV-6A/B. Dans ces circonstances, la charge virale semblera donc très haute. En particulier, si le spécimen prélevé pour la détection d'HHV-6A/B provient du sang et que celui-ci montre une charge HHV-6A/B très haute, cela sera assurément en raison d'une iciHHV-6A/B et non une infection active. En support, lors d'une infection active, le nombre de copies des HHV-6A/B par millilitre (mL) de sang est généralement entre 10^3 et 10^4 copies/mL, contrairement à un cas iciHHV-6A/B qui est largement supérieur avec une teneur d'environ 1×10^6 à 2×10^6 copies/mL. Dans la situation où une charge HHV-6A/B élevée est détectée, un deuxième test sur d'autres types de cellules tels les follicules pileux, doit être réalisé pour confirmer ou exclure l'iciHHV-6A/B. Si ce test confirme l'absence d'iciHHV-6A/B, le patient pourra être traité de façon non empirique avec des antiviraux. D'un autre point de vue, la validation d'une infection active par qPCR compose un défi puisqu'il existe seulement une courbe standard internationale pour HHV-6B [175]. En général, les laboratoires médicaux utilisent leurs courbes standards maison qui occasionnent beaucoup de variations. Heureusement, avec le développement des technologies, il est maintenant possible de détecter le nombre de copies exactes par cellule d'un échantillon grâce à la PCR digitale (ddPCR pour « **droplet digital PCR** »). Il est donc conseillé d'utiliser cette technologie pour faciliter la détection de l'iciHHV-6A/B [176]. *La méthodologie de la ddPCR et de son intérêt dans un contexte de détection des formes ciHHV-6A/B seront discutés au chapitre 1.*

3.5 Mécanismes d'intégration

À ce jour, peu d'information concernant les mécanismes de l'intégration des HHV-6A/B est connue. Puisque l'intégration des HHV-6A/B se produit aux télomères, notre groupe a étudié si la présence de l'enzyme responsable de la synthèse de télomères, la télomérase, était essentielle à l'intégration des HHV-6A/B. L'étude a révélé qu'à la suite de l'utilisation de l'inhibiteur de télomérase, BRACO-19, l'intégration des HHV-6A/B fut réduite, mais pas prévenue [117]. Ainsi, bien que la télomérase semble avoir une importance, elle n'est pas essentielle à l'intégration d'HHV-6A/B. Cette affirmation a été validée en effectuant des essais d'intégration dans des lignées cellulaires déficientes pour l'expression de la télomérase [116,117]. Dans un autre ordre d'idée, l'utilisation d'un inhibiteur de l'ADN polymérase virale, l'acide phosphonoacétique (PAA pour « *phosphonoacetic acid* »), a indiqué que la réplication des HHV-6A/B n'est pas essentielle à leur intégration [116]. Un modèle d'intégration chez un herpesvirus qui s'apparente le plus à l'intégration des HHV-6A/B est celui du MDV, également nommé *gallid herpesvirinae* (GaHV-2). Le MDV est un *herpesvirinae* aviaire responsable de lymphomes chez la volaille, une pathologie associée à de grosses pertes économiques dans l'industrie aviaire [177–179]. Le MDV peut s'intégrer dans au moins 15 chromosomes différents, mais toujours aux télomères [180]. Il est anticipé que le MDV utilise l'intégration de son génome comme niche de latence afin de pouvoir esquiver le système immunitaire puisqu'il peut s'exciser de son intégration et mener à une phase lytique [181]. Il est important de mentionner la présence de TMRs aux extrémités du génome du MDV, qui rappellent celles dans le génome des HHV-6A/B [182]. Cependant, comme les HHV-6A/B, les mécanismes liés à l'intégration du MDV demeurent encore incompris. Néanmoins, il a été rapporté que les séquences TMRs du génome du MDV sont essentielles à l'intégration du virus aux télomères [183]. Le même groupe de recherche, avec seulement le génome de l'HHV-6A à leur disponibilité, a alors mis en évidence la nécessité des TMRs dans le génome de l'HHV-6A pour son intégration [184]. Il serait alors possible que le mécanisme d'intégration soit associé à des événements de RH avec les télomères de la cellule hôte. *Puisque peu d'information est accessible au sujet de l'intégration des HHV-6A/B aux télomères humains, l'objectif principal de la thèse est d'approfondir nos connaissances sur le sujet. Les sections suivantes ont pour objectifs d'introduire les éléments impliqués dans la reconnaissance des cassures de l'ADN et leur réparation ainsi que la biologie des télomères, dans l'optique de mieux saisir quelles voies cellulaires les HHV-6A/B pourraient manipuler afin de s'intégrer.*

4. Voies de réparation et reconnaissance des cassures de l'ADN

Le génome humain est perpétuellement victime d'agressions qui, parmi celles-ci, causent des cassures de l'ADN. Les cassures de l'ADN représentent la forme la plus toxique de dommage à l'ADN et doivent être réparées promptement pour éviter le développement néoplasique des cellules ou leur sénescence prématurée. La reconnaissance et la réparation de ces cassures impliquent une multitude de protéines de signalisation et effectrices capables de reconnaître un génome étranger dont celui d'un herpèsvirus. À ce sujet, le génome linéaire d'ADNdb des herpèsvirus est sujet à l'activation d'une réponse aux dommages à l'ADN (DDR pour « **D**NA **D**amage **R**esponse ») par la cellule hôte, un événement délétère pour la propagation d'un virus. En effet, les extrémités non protégées des génomes viraux sont reconnues comme une cassure double brin (CDB) de l'ADN. Pour y remédier, les herpèsvirus circularisent leur génome et manipulent les protéines cellulaires, notamment celles de la DDR [185–190].

4.1 Choix des voies de réparation des cassures double brins à l'ADN

La DDR génère des foyers de signalisation de dommages aux sites de cassures de l'ADN pour y mobiliser des protéines de réparation et des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire. Il existe deux voies majeures impliquées dans la réparation des CDBs, la religature des extrémités non homologues (NHEJ pour « **N**on-**H**omologous **E**nd **J**oining ») et la RH. Il existe également trois voies mineures pour la réparation des CDBs basés sur l'homologie entre les séquences complémentaires : La liaison des extrémités par la voie alternative (alt-EJ pour « **A**lternative-**E**nd-**J**oining »), l'appariement des extrémités protubérantes simples brins (SSA pour « **S**ingle-**S**tranded **A**nnealing ») et la cassure induite par la réplication (BIR pour « **B**reak-**I**nduced **R**eplication »). Le choix de la voie de réparation des CDBs est basé sur différents éléments (Figure 10) dont :

1. La phase du cycle cellulaire;
2. L'état de la CDB;
3. La terminaison de l'ADN;
4. La structure de la chromatine;
5. Le niveau de transcription de la région cassée.

En lien avec ces éléments, la phase du cycle cellulaire est l'élément dominant qui régule la voie de réparation de l'ADN [191]. À ce sujet, la NHEJ est active tout au long de l'interphase, soit pendant les phases G0-G1, S

et G2 alors que la RH est seulement active lors des phases S et G2 [192,193]. Outre le cycle cellulaire, l'état de la CDB est également un facteur qui dicte le choix de la voie de réparation puisqu'une cassure franche est un substrat pour la NHEJ [194,195]. À l'inverse, la résection excessive de l'ADN en direction 5' vers 3' et par conséquent la présence d'un ADNsb en 3' favorise la RH [196]. De plus, lors d'une CDB avec une seule terminaison, c'est-à-dire en absence d'une autre extrémité cassée pour mener à leur liaison, l'ADN est réparé par homologie, plus précisément par la voie de BIR [197]. L'état transcriptionnel où se situe la CDB dicte la voie de réparation, et ce, en favorisant la RH lors d'une CDB à une région hautement transcrite [194,198]. Cependant, en dépit de ces éléments, c'est la présence de protéines dites « sensor » de CDBs et des protéines médiatrices et de signalisations qui recrutent celles responsables des voies de réparation de l'ADN.

4.2 Les acteurs de premier plan lors d'une cassure de l'ADN

Les voies de la DDR et de réparation de l'ADN sont parmi les voies de signalisation la plus étudiée et dont la compréhension demeure toutefois incomplète. De ce fait, la quantité énorme d'informations disponibles devient parfois contradictoire. En général, une CDB est détectée par des protéines « sensor », qui recrutent et activent les protéines de la famille des kinases phosphatidylinositol 3 (PI3K pour « **phosphatidylinositol 3-kinases** ») : ATM (« **A**taxia-**T**elangiectasia **M**utated »), ATR (« **A**taxia-**T**elangiectasia and **R**ad3 ») et protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PKcs pour « **DNA**-dependent **p**rotein **k**inase ») (Figure 10). Ces protéines de transductions du signal orchestrent la signalisation d'une cassure de l'ADN. Parmi les protéines « sensor », le complexe d'hétérodimères Ku70/Ku80 se lie aux CDBs franches ou avec un minimum de résection et active DNA-PKcs. Le complexe MRN (**M**RE11, **R**AD50 et **N**BS1) quant à lui détecte des CDBs lors de phase S/G2 et active la voie ATM. Dans l'ensemble, la reconnaissance de CDBs conduit à la phosphorylation du variant de l'histone **2AX** (H2AX) à la serine 139 (S139) dont la nomenclature de sa forme phosphorylée est gammaH2AX (γ H2AX). Le signal γ H2AX à la lésion est ensuite amplifié sur près de 500 kpb le long de la chromatine, ce qui permet le recrutement des facteurs de réparation de l'ADN [199,200]. C'est par ailleurs grâce aux foyers γ H2AX, utilisés comme marqueurs, qu'il est possible d'identifier en laboratoire la présence de cassures à l'ADN.

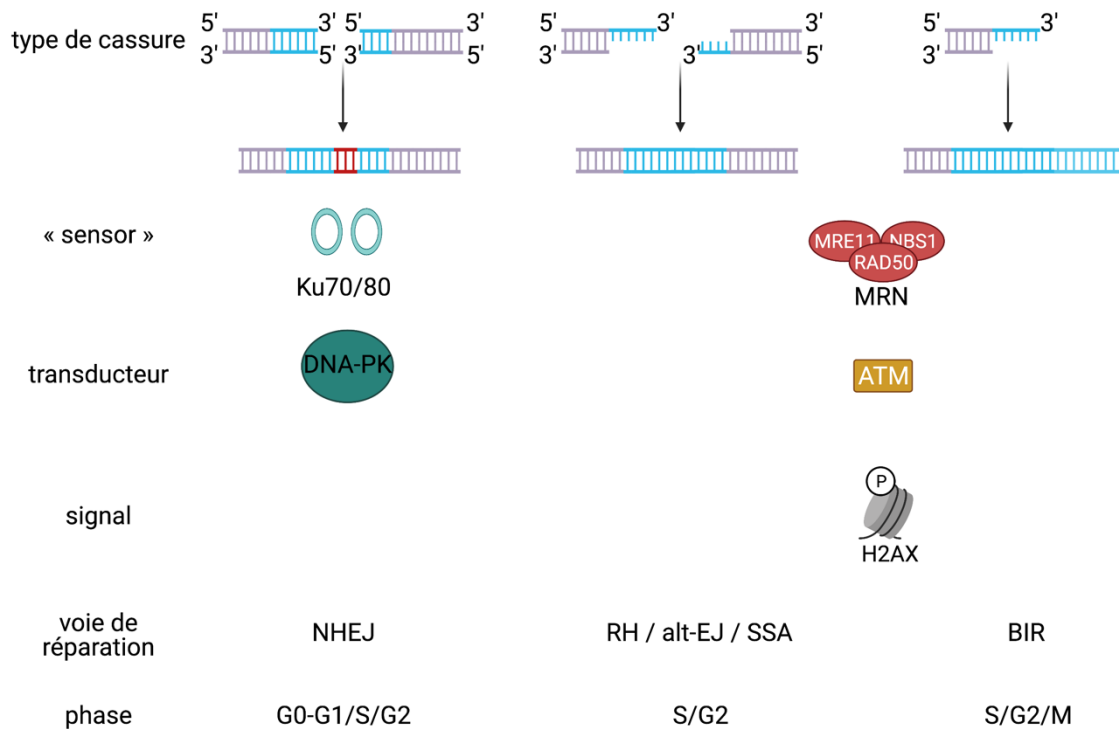


Figure 10. Résumés des voies de réparations des cassures doubles brins. La NHEJ a lieu lors de l'interphase (G0 à G2) et est active en présence d'une cassure double brin (CDB) franche. La CDB est reconnue par le complexe Ku70/80 qui active la protéine transductrice de signal DNA-PK. Les voies de la RH, alt-EJ, SSA et BIR sont activent en phase S/G2 et en présence d'une extrémité 3' simple brin, reconnu par le complexe MRN qui active la protéine transductrice ATM. ATM phosphoryle l'histone 2AX (H2AX) ce qui mène à la réparation de l'ADN. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

4.3 La voie de religature des extrémités non homologues

La NHEJ est la voie la plus utilisée par la cellule pour réparer les CDBs puisqu'elle requiert que la liaison des extrémités du brin cassé et, par conséquent, est plus rapide et moins exigeante au niveau énergétique. Comme mentionné dans la section précédente, lors d'une CDB le complexe Ku70/80 s'associe à la cassure et recrute DNA-PK qui maintient à proximité les deux brins d'ADN cassés (Figure 11). Puisque la liaison des extrémités nécessite que ces dernières soient franches, jusqu'à 5 nucléotides peuvent être excisés [201] ou ajoutés. À ce sujet, c'est l'état de la cassure qui commande les protéines qui vont s'y associer afin de traiter les extrémités [202]. Dans la situation où l'extrémité en 5' est protubérante, la nucléase Artémis qui possède une activité 5' vers 3' s'assure de générer des extrémités franches [203]. À l'inverse, lors d'une extrémité 3' en surplomb, des nucléotides sont ajoutés par les ADN polymérases μ et λ (pol μ/λ) [204]. Une fois les extrémités d'ADNdb franches générées, elles sont liées par le complexe XRCC4-ligase IV (LIG IV) dont

l'activité est favorisée en présence du facteur de type XRCC4, XLF (pour « **X**RCC4-**l**i**e** **F**actor ») et/ou le paralogue de XRCC4 et XLF, PAXX (pour « **P**aralogue of **X**RCC4 and **X**LF ») [205,206]. Le produit final de la NHEJ mène à des insertions/délétions (InDels) entre 1 à 5 nucléotides. Outre des polymorphismes de nucléotide unique (SNP pour « **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism ») et des mutations au niveau protéique, les InDels peuvent conduire à des changements de cadre de lectures par la perte d'information ou l'addition de nucléotides. En conséquence, la NHEJ est associée à une voie de réparation sujette aux erreurs.

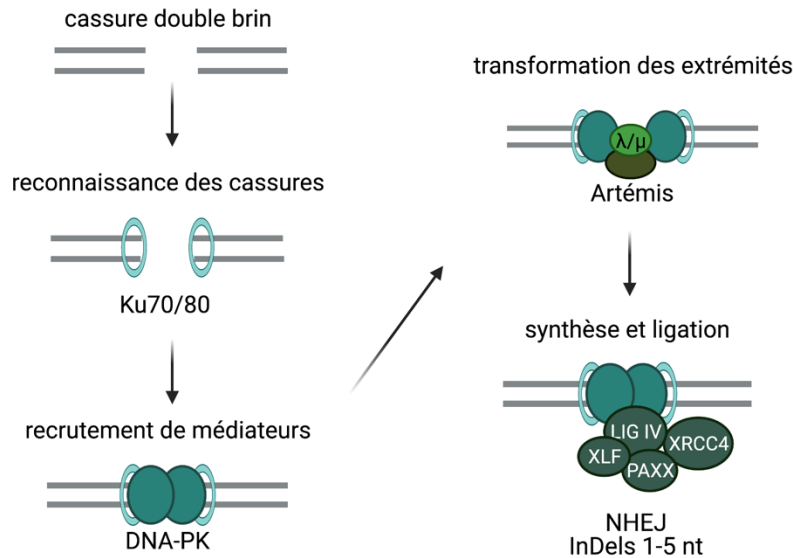


Figure 11. Voie de religature des extrémités non homologues. Le complexe Ku70/80 s'associe à la CDB franche et recrute DNA-PK. Si des nucléotides sont protubérants en 5', Artémis est recrutée à la CDB. Dans la situation où la région 3' de la CDB dépasse, les polymérases λ/μ (λ/μ) synthétisent des nucléotides au brin supérieur. Une fois les extrémités franches générées, elles sont liguées par les protéines LIGIV, XRCC4, XLF et PAXX. Le résultat de liaison peut mener à des insertions ou des délétions (InDels) de 1 à 5 nucléotides (nt). ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

4.4 Réparation de l'ADN en présence de séquences homologues

La réparation de l'ADN basée sur l'homologie des séquences est généralement réalisée par la voie majeure, la RH. Toutefois, d'autres voies connexes dont celle de BIR, alt-EJ et SSA existent et s'opèrent par la présence d'homologies. Les étapes qui divergent entre ces voies seront abordées dans des sections respectives. Néanmoins, elles sont initiées par le même mécanisme de reconnaissance et de résection primaire. En effet, en présence d'une CDB en phases S/G2, le complexe MRN reconnaît la CDB, recrute et active ATM par la partie N terminale de la protéine NBS1 du complexe MRN (Figure 12A). La liaison de NBS1 avec ATM permet à cette dernière de passer d'un état inactif (homodimère) à actif (monomère) en s'autophosphorylant à sa sérine 1981 (S1981) [207]. Une fois active, ATM phosphoryle ses substrats, dont

Chk2 (« **C**heckpoint **k**inase **2** ») pour engager l'arrêt du cycle cellulaire et H2AX pour l'amplification du signal et le recrutement de facteurs de réparation à la lésion. La forme γ H2AX est reconnue par MDC1, une protéine médiatrice qui reconnaît par son domaine BRCT (pour « **B**RCA1 **C**-terminal ») la S139 phosphorylée d'H2AX [208]. En plus de se lier à γ H2AX, le domaine FHA (pour « **F**orkhead-**a**ssociated ») de MDC1 est un substrat d'ATM [209]. Une fois phosphorylée, MDC1 se lie aux domaines FHA et BRCT de NBS1 [210,211]. Cette liaison permet le recrutement additionnel de complexes MRN, ce qui conditionne à plus d'ATM actives et par conséquent, une amplification du signal γ H2AX [200,212].

Parallèlement, les kinases dépendantes de cyclines (CDK pour « **c**ycline **d**ependent **k**inase ») favorisent la résection excessive de l'ADN. En phase S, la présence de CDK2 initie la résection de l'ADN en activant le complexe CtIP (pour « **C**-terminal **I**nteracting **P**rotein ») [213] par la phosphorylation de CtIP à la position S327 et T847 [214,215]. De plus, au centre de CtIP se trouvent cinq sites additionnels pour sa phosphorylation par des CDKs (5mCDK pour S233, T245, S276, T315 et S347), ce qui permet à CtIP d'interagir avec les domaines FHA/BRCT de NBS1 [216]. Par ce fait, CtIP s'associe au complexe MRN [217] et favorise l'activité nucléase de MRE11 afin d'obtenir une résection minimale de l'ADN créant ainsi un ADNsb libre en 3'. En addition, la phosphorylation de CtIP à la S327 rend possible l'interaction avec BRCA1, une protéine importante pour la RH [215,216].

4.4.1 La recombinaison homologue

La RH est une voie de réparation utilisée par les cellules méiotiques et mitotiques. Cependant, lors de la méiose, la RH diffère de celle des cellules en mitose. À ce sujet, la RH des cellules mitotiques est dite dépendante de la synthèse des brins appariés (SDSA pour « **S**ynthesis-**D**ependent **S**trand **A**nnealing »), menant à une réparation non croisée (NCO pour « non-crossover ») et par conséquent sans conversion de gène (CG). À l'inverse, la RH lors de la méiose peut être croisée (CO pour « crossover ») ou NCO. L'utilisation d'un CO lors de la RH conduit à la CG, responsable de l'échange génétique dans les cellules germinales. Plus spécifiquement, il y a un enjambement entre deux chromosomes, soit l'échange de loci entre ceux-ci, un événement accompli lors de la reproduction sexuée [218].

En réponse à la résection de l'ADN par CtIP/MRN, l'ADNsb est protégé par la protéine RPA. Parallèlement, la protéine BRAC1 préalablement recrutée par une CtIP phosphorylée permet une plus longue résection en recrutant les protéines EXO1, DNA2, BLM (Figure 12B). Cette résection est réalisée par les complexes MRN-RPA-EXO1-BLM et MRN-RPA-DN2-BLM, responsables de générer un ADNsb en 3' plus long et accessible afin d'envahir une séquence homologue de la chromatide sœur [219]. En général, l'ADN est digéré jusqu'à

3.5 kpb et requiert un minimum de 20-80 paires de bases (pb) d'homologie [220–222]. En plus de jouer un rôle dans la résection excessive de l'ADN, BRCA1 recrute PALB2 à l'ADNsb couvert de RPA [223]. PALB2 à son tour engage BRCA2 et ensemble le complexe BRCA1-PALB2-BRCA2 dissocie RPA de l'ADNsb pour y associer RAD51 [224,225]. RAD51 est une protéine de recombinaison qui entoure l'ADNsb qui a comme quête de trouver une séquence homologue de 20 à 80 paires de bases (pb) à partir de la chromatide sœur [220–222]. Une fois une séquence homologue trouvée, RAD51 s'introduit à l'ADNdb de la chromatide sœur et forme une boucle de déplacement communément appelée « D-loop ». La synthèse de l'ADN incorporé dans la « D-loop » est réalisée par l'ADN polymérase zêta et éta ($\text{pol}\eta$ et $\text{pol}\zeta$) [226,227]. Une fois l'ADN synthétisé, elle forme une jonction d'Holliday (JH), soit une jonction en forme de « X » entre le brin d'ADN de la chromatide sœur qui a servi de gabarit et le brin d'ADN nouvellement synthétisé qui rejoint son extrémité cassé pour y être lié. Cette réparation est effectuée de façon SDSA, c'est-à-dire qu'une fois l'ADN d'intérêt copié, le brin synthétisé se dissocie de la structure « D-loop » et de la JH, une réparation sans CO et CG. Les protéines impliquées dans la dissociation du brin synthétisé des structures secondaires « D-loop » et dJH est le complexe BTR formée des protéines BLM, TOP3A (topoisomérase III α) et RMI1-RMI2 (RecQ mediated genome instability 1-2) [228,229]. D'autre part, lors de la méiose, outre la SDSA, la RH mène au CO par la présence d'une recapture secondaire de terminaison en formant une deuxième JH ou double JH (dJH). Cette recapture est réalisée par l'invasion de l'extrémité 5' du même brin cassé dans la « D-loop ». La dJH est résolue par le complexe de résolvases SMX (MUS81, EME1, SLX1, SLX4, XPF, ERCC1) et GEN1 qui crée des brèches aux jonctions entre les brins afin de donner une CG lors de la reproduction sexuée [230–232].

4.4.2 La voie de BIR

La voie de BIR est active en présence d'une seule extrémité d'une cassure d'ADNdb («one-ended DSB »), c'est-à-dire qu'il y a absence de l'autre brin de la cassure pour y joindre l'ADN recopié. Cette situation se présente lorsqu'une fourche de réplication rencontre une brèche ou lorsqu'une des extrémités de la CDB ne trouve pas de région homologue [233]. Le mécanisme de BIR est mieux défini chez la levure et peu chez l'humain. Ainsi, la voie de BIR chez l'humain demeure incomprise bien que de tout récents progrès ont permis d'améliorer nos connaissances. Ces données suggèrent que les étapes subséquentes sont similaires à celles de la RH classique (Figure 12B), soit la résection d'environ 1 kpb de l'ADN en 5' vers 3' afin de générer un long ADNsb, lié par RPA [234]. Les étapes qui suivent peuvent être RAD51 dépendantes ou RAD51-indépendantes, mais requièrent la présence de RAD52. Dans un contexte RAD51-dépendant, RAD52 permet de dissocier la protéine RPA de l'ADNsb pour association RAD51 [235,236]. Une fois que l'ADNsb forme une « D-loop » dans une chromatide sœur ou un chromosome à proximité avec une homologie, l'ADN est

synthétisé de façon unidirectionnelle par la POLD3 et POLD4 jusqu'à la fin du chromosome, pouvant atteindre des centaines de kpb [236]. Cependant, la voie de BIR peut être active aux télomères et dans cette situation, elle s'avère RAD51-indépendante et utilise RAD52 [237]. À ce sujet, il a été rapporté chez la levure que les réparations par BIR RAD51-indépendante sont associées à la réparation de régions répétées [238]. Néanmoins, que la voie de BIR soit RAD51-dépendante ou RAD51-indépendante, elles dépendent des sous-unités de la polymérase POLD3 et POLD4 [237]. Inversement à la RH classique, la voie de BIR est mutagénique. À ce propos, en utilisant un rapporteur de Lys2 chez la levure, il a été observé que la réparation par la voie de BIR mène à des changements de cadres de lectures [197]. *Il est intéressant de noter que les revues de littérature en lien avec les mécanismes potentiels associés à l'intégration d'HHV-6A/B proposent un modèle impliquant la voie de BIR.*

4.4.3 La voie SSA

La voie de la SSA conduit à la résection de l'ADN jusqu'à l'obtention de séquences complémentaires d'environ 20 pb entre les deux brins cassés qui s'apparient ensemble par la présence de RAD52 [239]. Les nucléotides non homologues aux extrémités 3' sont retirés par le complexe XFP/ERCC1 [240] alors que ceux manquants sont ajoutés par un ADN polymérase et ensuite ligués. À ce jour, les informations concernant la polymérase et la ligase impliquée dans cette voie demeurent inconnues. Ensemble, les informations connues sur cette voie suggèrent que c'est une voie sujette à la perte d'information et aux erreurs [241]. Pour ces raisons, la voie SSA est utilisée comme voie de sauvetage par la cellule lorsque RAD51 est absente. De plus, la SSA semble avoir lieu particulièrement en présence de séquences répétées [242,243], mais diffère des voies précédentes puisqu'elle ne requiert pas de longues régions d'homologies entre deux chromatides pour permettre la réparation (Figure 12C).

4.4.4 La voie alt-EJ

La voie alt-EJ s'apparente à la NHEJ et la SSA. Bien que cette voie soit encore incomprise, les extrémités de la CDB sont d'abord liées par PARP-1 [244] et digérées par les complexes CtIP/MRN qui génèrent un brin d'ADNsb en 3' de 20-100 pb (Figure 12C) [245]. Cette résection permet d'exposer des séquences de microhomologies dont l'alignement de 2 à 20 nucléotides entre les deux brins complémentaires en 3' est réalisé par PARP-1, MRN et la polymérase thêta (pol θ) [246]. Les séquences non homologues en 3' sont retirées par les nucléases ERCC1/XFP et FEN1 [240,247]. Les brins peuvent ensuite être ligués entre eux par le complexe XRCC1-ligase 3 (LIGIII) [248]. La réparation de l'ADN par la alt-EJ est alors responsable

d'InDels de plus de 5 nucléotides et par conséquent, peut se traduire par des changements de cadres de lectures ou de la perte d'information [249].

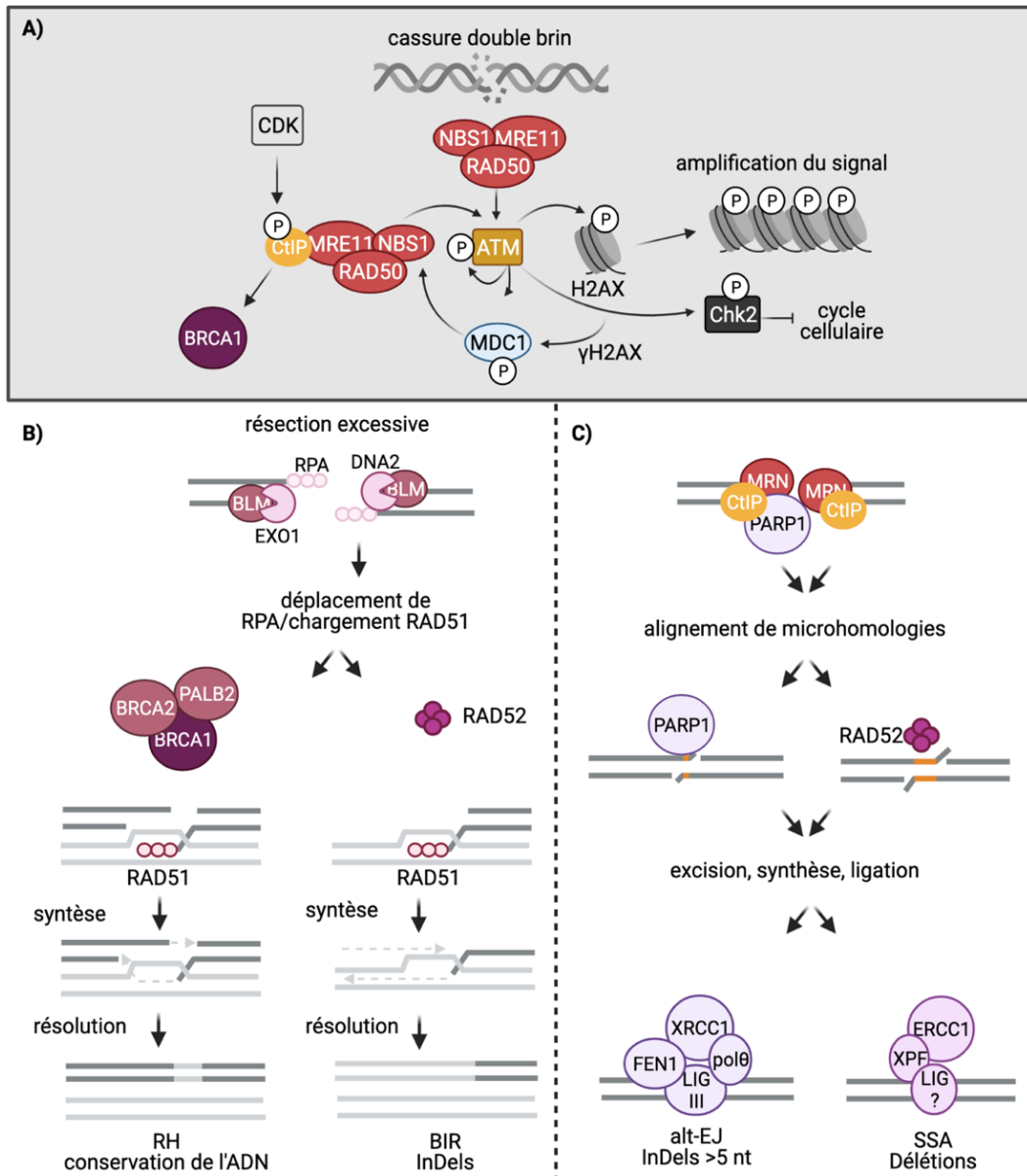


Figure 12. Schéma de la signalisation lors d'une cassure double brin à l'ADN en phase S/G2 et des voies de réparation par homologies. A) Une cassure double brin (CDB) est reconnue par le complexe MRN (MRE11, RAD50, NBS1) qui active la kinase ATM. L'activation d'ATM mène à son autophosphorylation ainsi qu'à la phosphorylation du variant d'histone 2AX (γ H2AX) et la kinase de point de contrôle Chk2. L'activation de Chk2 cause l'arrêt du cycle cellulaire. La forme γ H2AX est reconnue par MDC1 qui est à son tour phosphorylé par ATM et reconnu par NBS1. L'interaction MDC1/NBS1 amène des complexes MRN supplémentaires aux sites de dommages et cause une amplification du signal γ H2AX qui sera reconnu par les protéines de voies de réparation de l'ADN. Parallèlement, la présence de CDK active CtIP par sa phosphorylation, ce qui active la nucléase du complexe MRN. De plus, BRCA1 reconnaît CtIP phosphorylé.

B) En présence de longues séquences d'homologies, une résection excessive est réalisée par les protéines DNA2, BLM et EXO1. L'ADNsb en 3' est protégé par RPA et le complexe BRCA1/BRCA2/PALB2 amène RAD51 aux dommages pour déposer RAD51 sur l'ADNsb. Lors de la voie de BIR, RAD52 déplace RPA pour laisser RAD51 se charger sur l'ADNsb. Le complexe d'ADNsb/RAD51 envahit l'ADNdb de la chromatide sœur où l'ADN est synthétisé et l'invasion est résolue (HR et BIR). C) En présence de microhomologies, la cellule répare l'ADN par la alt-EJ ou par la SSA en recrutant PARP1. Les microhomologies entre les brins complémentaires sont alignées par PARP1 (alt-EJ) ou RAD52 (SSA). L'ADN non complémentaire en 3' de l'alignement est clivé et les brins sont synthétisés et ligués par la présence des protéines XRCC1, FEN1, pol θ , LIG III (alt-EJ) ou ERCC1, XPF et une ligase (LIG) (SSA). ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

5. Les télomères

Les cellules eucaryotes, différemment des procaryotes, ne circularisent pas les extrémités de leur génome afin d'être protégées d'éventuelles attaques par des nucléases. Au lieu, les eucaryotes protègent leur génome en adoptant une structure présente à toutes les terminaisons des chromosomes, les télomères. La caractérisation des extrémités chromosomique chez l'humain a débuté en 1988 lors d'un criblage d'une bibliothèque d'ADN répétitifs humains. Le séquençage a permis de générer une sonde pour la microscopie à fluorescence à la suite de FISH sur des étalements de métaphases afin d'observer la distribution des séquences répétées dans les chromosomes [250]. Cette structure nucléoprotéique que sont les télomères sert à la fois de zone tampon pour protéger contre la perte d'information génétique, mais sert également à empêcher des recombinaisons délétères entre des extrémités des différents chromosomes d'une cellule.

5.1 Structure des télomères

5.1.1 Composition en acides nucléiques

Les télomères représentent une structure nucléoprotéique, c'est-à-dire qu'ils sont composés de protéines et d'acides nucléiques. Leurs séquences nucléiques sont composées d'hexamères (TTAGGG)_n pouvant varier entre 5 à 15 kpb chez l'humain [250]. La terminaison en 3' des télomères est définie par une séquence riche en nucléotides G d'environ 50 à 200 pb. Cet ADNsb riche en G permet aux télomères d'adopter une structure tridimensionnelle en forme de boucle nommée une « t-loop » (Figure 13A) [251]. La génération d'une « t-loop » se fait par l'invasion de l'ADNsb dans une région complémentaire de l'ADNdb télomérique. Ainsi, la formation d'une boucle aux terminaisons des chromosomes empêche la reconnaissance de l'ADN télomérique comme étant une CDB. En outre, par des techniques de microscopie électronique, il a été

possible de mettre en évidence que le maintien de la « t-loop » était mis en place par la présence d'un complexe protéique, le complexe shelterin (Figure 13B) [252,253].

5.1.2 Les protéines des télomères – le complexe shelterin

Le complexe shelterin comprend les six protéines suivantes : TRF1 (« Telomere Repeat Binding Factor 1 »), TRF2 (« Telomere Repeat Binding Factor 2 »), POT1 (« Protection of Telomeres 1 »), TPP1 (« shelterin complex subunit and telomerase recruitment factor 1 »), RAP1 (« TRF2 Interacting Protein 1 ») et TIN2 (« TRF1 Interacting Nuclear Factor 2 »). Ensemble, le complexe nucléoprotéique que forment les télomères exécute des fonctions de structure, de maintien de l'intégrité génomique ainsi que du maintien de la division cellulaire.

5.1.3 Structures secondaires aux télomères

Les régions génomiques riches en séquences répétées sont souvent propices à la formation de structures secondaires (Figure 13C). Une structure secondaire fréquente aux télomères est la formation de G4 (quadruplex de guanines) dont les nucléotides G du brin riche en G se lient ensemble par des liaisons hydrogènes et créent une structure encombrante pour l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN télomérique [254]. Dans un contexte de transcription, les télomères peuvent être transcrits en TERRA (Telomeric repeat-containing RNA), un long ARN non codant impliqué dans la régulation de la longueur et de l'état de l'hétérochromatine des télomères [255,256]. Ces TERRA peuvent causer des « R-loops », le résultat d'hybrides ARN:ADN [257]. Outre les acides nucléiques, le complexe shelterin peut également être une source d'instabilité lors de la réplication des télomères si ses protéines ne se détachent pas pour laisser passer la fourche de réplication, notamment pour dissocier la « t-loop ». Ces structures créent du stress lors de la réplication des télomères et doivent être rapidement résolues afin de ne pas causer la sénescence ou une réparation non souhaitée.

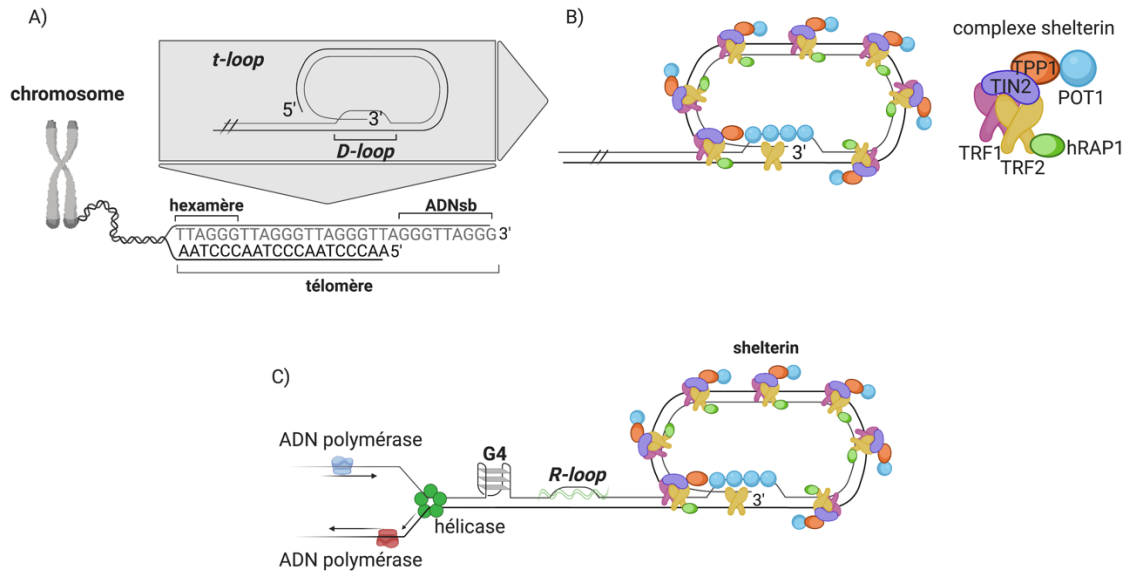


Figure 13. Représentation de la structure des télomères. A) Schéma qui représente les télomères aux extrémités des chromosomes. Les télomères sont composés de plusieurs hexamères TTAGGG ainsi qu'une terminaison d'ADN simple brin (ADNsb) en 3' riche en nucléotides G. L'ADNsb en 3' sert à former la « t-loop » par une « D-loop » dans l'ADN double brin du télomère. B) Protéines qui composent le complexe shelterin afin de maintenir la « t-loop » aux télomères. C) Structures secondaires (G4, R-loop, TERRA et les protéines shelterin) retrouvées aux télomères lors de la réplication de l'ADN. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

5.2 Fonctions des télomères

5.2.1 Intégrité génomique et prolifération cellulaire

Le rôle principal des télomères est dans l'intérêt de prévenir la perte de l'information génétique du génome [258]. Lorsqu'une cellule réplique son génome précédant la division cellulaire, une partie des séquences nucléiques se perd en raison de l'incapacité de l'ADN polymérase à synthétiser l'extrémité 3' du brin discontinu (Figure 14A) [259]. Pour y remédier, la cellule exprime la télomérase, un complexe composé de plusieurs sous-unités, dont la transcriptase inverse TERT (« **T**elomerase **R**everse **T**ranscriptase ») également appelée hTERT chez l'humain et la TERC (« **T**elomerase **R**NA **c**omponent »). Une fois le complexe assemblé, la hTERT synthétise l'ADN en utilisant TERC comme gabarit, ceci permet la synthèse des séquences TTAGGG aux terminaisons des chromosomes [260]. L'expression maximale de la hTERT est détectée dans les cellules germinales, les cellules souches embryonnaires et les cellules leucocytaires. En revanche, une fois les cellules différenciées en cellules somatiques, son expression est atténuée et devient éventuellement nulle

[261]. Par conséquent, les séquences des télomères servent de région tampon pour éviter une perte d'information génétique. À cet effet, les télomères agissent comme une horloge moléculaire qui dicte le pouvoir réplicatif d'une cellule puisque 50 à 100 pb sont perdus à chaque division cellulaire. Lorsque la longueur des télomères atteint le seuil critique de 13 hexamères, la cellule devient alors sénescence et cesse de se diviser, contribuant au vieillissement [262].

5.2.2 Prévention des dommages et entretien des télomères

Le deuxième rôle des télomères provient de la présence du complexe shelterin (Figure 14B). En absence des protéines shelterin, l'ADNdb des télomères n'est pas protégé et est perçu comme une CDB. L'activation de la DDR aux télomères mène à la nucléation de protéines de signalisation dont 53BP1, γ H2AX et MRN qui ensemble forment des TIFs (« Telomere Dysfunction-Induced Foci »), appréciables par microscopie de fluorescence [263]. Le résultat d'une réparation de l'ADN aux télomères peut :

1. Mener à la fusion des chromosomes, un phénotype nommé le « end-to-end fusion chromosome »;
2. Mener à la recombinaison des chromosomes aux télomères avec la chromatide sœur (« Telomere Sister Chromatid Exchange ») ou un chromosome à proximité.

Les phénotypes de ces réparations sont observables par étalement de chromosomes en métaphase marqués au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) [264,265]. Ces réparations créent de l'instabilité génomique dans les cellules ce qui peut provoquer une sénescence prématurée ou le développement néoplasique des cellules. Ainsi, les protéines shelterin sont présentes pour coordonner ces mécanismes aux télomères (Figure 14B). À ce propos, la protéine TRF2 forme des homodimères qui lient directement les séquences télomériques et empêche la reconnaissance de CDBs en inhibant directement la protéine kinase ATM [253]. Récemment, une étude remarquable du groupe de de Lange souligne l'importance de TRF2 à elle seule parmi le complexe shelterin pour former la « t-loop » [253,266]. La protéine POT1 lie l'ADNsb dont l'extrémité libre riche en G en 3' et est impliquée dans le blocage de la voie de reconnaissance des cassures simple brin en inhibant ATR [267]. Or, ce complexe protéique ne protège pas seulement contre les mécanismes de reconnaissance de cassure à l'ADN, mais contribue également à la régulation de la réplication et la longueur des télomères.

Les protéines shelterin sont également importantes pour pallier le stress réplicatif causé par les structures secondaires (Figure 14C). À cet égard, elles engagent des protéines accessoires et effectrices. L'importance de TRF1 dans la réplication des télomères fut supportée par la génération de télomères fragiles dont la fourche de réplication est perdue dans les cellules déficientes pour TRF1 [268]. TRF1 règne au maintien de la réplication des télomères par le recrutement de la protéine BLM (« Bloom Syndrom ») aux G4. D'autres

protéines shelterin peuvent jouer un rôle dans la résolution des G4 dont TRF2 qui recrute de l'hélicase WRN (« **W**erner Syndrom ») ou par POT1 qui empêche la formation de G4 en se liant à l'ADNsb [269–271]. Afin de dissocier la « t-loop » pour permettre le passage de la fourche de réplication, TRF2 recrute l'ADN hélicase RTEL1 (« **R**egulator of **T**elomere **L**enght **1** ») ou WRN qui dégagent la « t-loop » en dissociant la « D-loop » de l'ADNdb [272,273]. En absence de cette dissociation, TRF2 recrute SLX4 (« Structure Specific Endonuclease Subunit ») et créer l'excision de la « t-loop », menant ainsi à un cercle télomérique extrachromosomique (ECTR pour « **E**xtrachromosomal **T**elomere-**R**epeats ») et un télomère plus court [274]. TRF1 peut également participer à l'ouverture de la « t-loop » par le recrutement de BLM [268]. Les « R-loops » quant à eux peuvent être résolues par TPP1 qui recrute UPF1 (« Regulator of Nonsense Transcripts 1 »), une ATPase ARN/ADN-dépendante et hélicase [275]. Une fois les structures secondaires éliminées, la fourche de réplication peut continuer la synthèse de l'ADN.

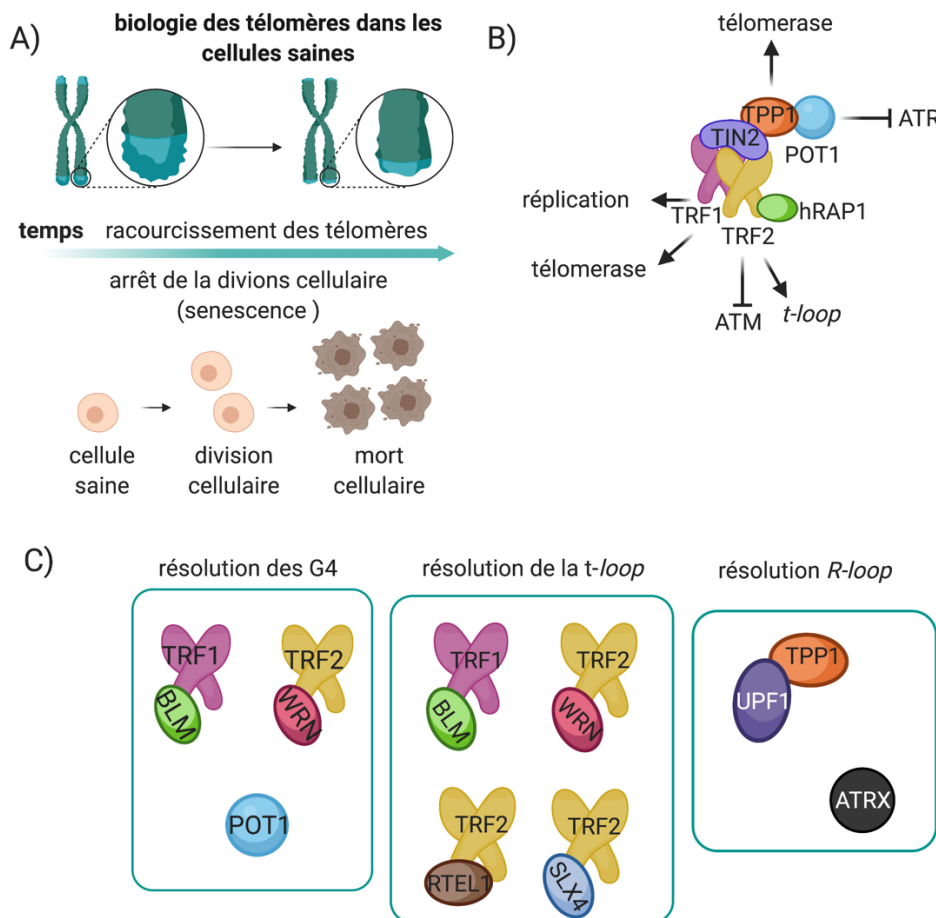


Figure 14. Schéma résumant les fonctions des télomères et des protéines shelterin. A) Raccourcissement des télomères à la suite de la division cellulaire. Lorsque les télomères sont trop courts, les cellules arrêtent de se diviser (senescence) et meurent éventuellement. B) Bref schéma des rôles des protéines shelterin. C) Identification des protéines shelterin impliquées dans la résolution de structures secondaires. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

5.3 Maintien des télomères

5.3.1 Élongation des télomères par la télomérase

Une fois les cellules différenciées (cellules somatiques), l'expression de la hTERT diminue graduellement jusqu'à son inhibition totale avec l'âge, à l'exception des cellules souches et des lymphocytes [276]. Une façon pour une cellule de se transformer en cellule néoplasique est par l'expression de la hTERT afin de se diviser indéfiniment [277]. Différents acteurs peuvent y jouer un rôle en se liant sur le promoteur de hTERT. C'est le cas pour les facteurs de transcription c-MYC, Sp1 (« specificity protein 1 ») et MAPK (« Mitogen-activated protein kinase ») qui possèdent des sites des liaisons dans le promoteur hTERT [278]. En général, une fois liés au promoteur, ils induisent l'acétylation des histones H3 et H4 au niveau de la chromatine autour du promoteur hTERT, ce qui mène à l'activation de la transcription de hTERT [279,280].

5.3.3 Voie alternative de l'élongation des télomères

En dépit de l'absence de l'expression de hTERT, 10 à 15% des cancers parviennent à allonger leurs télomères par un mécanisme alternatif d'élongation des télomères (ALT pour « Alternative Lengthening of Telomeres »). On observe chez ces cellules la présence de hauts niveaux de RH aux télomères, des télomères de longueurs très hétérogènes, la perte de fonction de protéines de remodelage de la chromatine ATRX (« Alpha-Thalassemia X-Linked Syndrome Protein ») et DAXX (« Death Domain-Associated Protein »), de hauts niveaux de transcrits TERRA, une forte présence d'ECTR, des échanges de télomères entre chromatides sœurs et la présence d'« ALT PML-Nuclear Bodies » (APBs) aux télomères. Les PML-NBs qui composent les ABPs sont formés par des monomères de la protéine PML qui, lorsqu'aux télomères, s'y trouve avec des protéines impliquées dans la voie DDR, dans la RH ainsi que des protéines shelterin [281–283]. La composition et la fonction des PML-NBs seront plus détaillées dans la partie 6. D'autre part, les ECTRs peuvent être divisés en « T-circles » (séquences télomériques circulaires riches en nucléotides T) et en « C-circles » (séquences télomériques circulaires riches en nucléotides C) (Figure 15A). Ces ECTRs sont des produits de l'excision de la « t-loop » à la suite des événements de résolution et de recombinaison des télomères lors de leur réplication. Ces résolutions donnent naissance à des ADNds circulaires (« T-circles ») ou des ADNsbs circulaires (« C-circles »). Les « C-circles » sont par ailleurs utilisés comme un marqueur additionnel pour la caractérisation des cellules ALT, bien qu'ils soient aussi observés chez les cellules souches embryonnaires [284–286].

Le mécanisme d'élongation des télomères dans ces cellules implique des évènements de RH (Figure 15B) [287]. Plusieurs études supportent l'hypothèse que l'élongation des télomères par le mécanisme ALT est réalisée par l'utilisation des « C-circles » comme gabarit pour la voie de BIR (Figure 15C) [284]. Les évènements qui activent la voie BIR aux télomères semblent être associés au stress réplcatif. En effet, les cellules cancéreuses sont sujettes aux stress réplcatifs, et ce particulièrement aux télomères en raison des structures secondaires. Ainsi, lors d'un stress réplcatif, la machinerie de réplication de l'ADN s'arrête afin de recruter les éléments essentiels à la résolution. S'il arrive que la fourche soit arrêtée trop longuement, une CDB sera la résultante. Dans d'autres situations, la cellule passe à la phase mitose avant même d'avoir réparé l'obstruction. Dans cette circonstance, la cellule utilise le mécanisme de synthèse de l'ADN lors de la mitose (MiDAS pour «Mitotic DNA Synthesis ». À ce sujet, il a récemment été observé que l'élongation des télomères dans les cellules ALT pouvait se produire à la suite du stress réplcatif de façon BIR dépendante lors de MiDAS [288]. Deux études subséquentes supportent cette possibilité suite à l'observation de foyers γ H2AX aux télomères suite à des étalements de métaphases de cellules ALT+ [289] et suite à la présence de foyers de synthèse de l'ADN aux télomères dans des cellules synchronisées en mitose [290]. Au point de vue moléculaire, lors de l'arrêt à la fourche qui génère une seule extrémité libre, l'ADNsb riche en G peut se lier à l'ADN des « C-circles » qui servent de gabarit. L'invasion de l'ADNsb dans un « C-circle » s'en suit alors de la réplication de l'ADN par le mécanisme BIR sous forme de RCA [284].

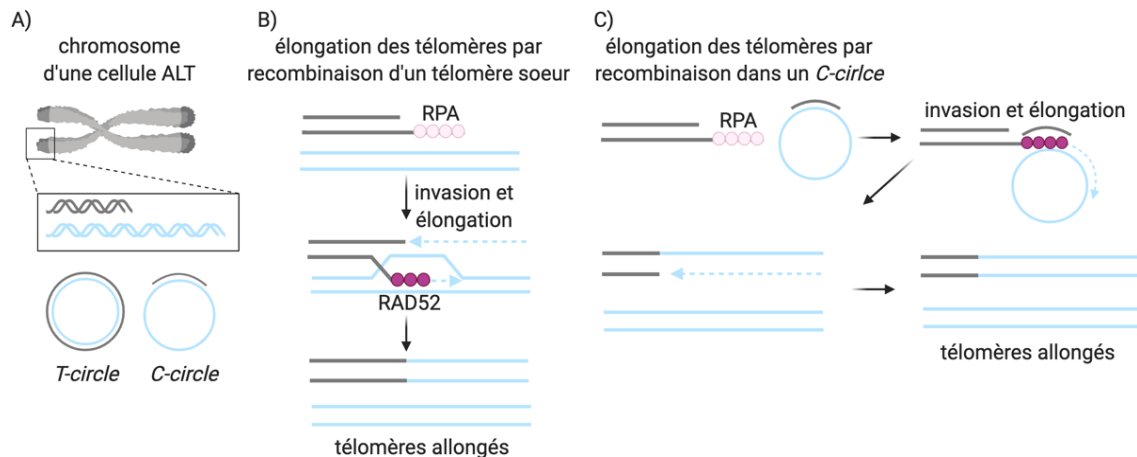


Figure 15. Élongation des télomères dans les cellules ALT. A) Présence de « T-circles » et « C-circles » à la suite de la recombinaison des télomères par la formation d'une « t-loop ». Les « T-circles » sont composés d'ADNdb et les « C-circles » sont riches en aDNsb télomérique. B) Mécanisme d'élongation des télomères par la recombinaison de l'extrémité en 3' de l'ADNsb d'un télomère à celui d'une chromatide sœur ou d'un chromosome à proximité, par le mécanisme de BIR. C) Mécanisme d'élongation des télomères par recombinaison de l'extrémité en 3' de l'ADNsb en utilisant un « C-circle » comme gabarit, suivant un mécanisme de BIR. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

6. Les corps nucléaires de la protéine de la leucémie promyélocytaire

Les corps nucléaires de la protéine de la leucémie aiguë promyélocytaire (PML-NBs pour « **P**romyelocytic **L**eukemia protein – **N**uclear **B**odies ») se présentent comme des structures subnucléaires ou des organelles sans membrane dans lesquelles se trouvent, de façon permanente et transitoire, diverses protéines cellulaires [291]. Ces corps nucléaires ont longtemps été considérés comme des endroits de stockages de protéines, sans fonctions pertinentes associées. Cependant durant la dernière décennie, différents groupes de recherche ont mis en évidence que ces structures nucléaires exercent diverses fonctions, suggérant leur importance pour l'homéostasie cellulaire et génomique. En effet, selon le stress présent dans une cellule, les PML-NBs participent à la régulation de mécanismes tels que des réponses antivirales, le cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, l'inflammation pour n'en énumérer que quelques-uns [292]. Les PML-NBs peuvent réguler la transcription et la traduction des gènes, la réponse aux dommages à l'ADN ainsi que la réparation, le maintien des télomères, la séquestration de protéines, la transduction de signal et surtout ils servent d'endroit pour des modifications post-traductionnelles (PTM pour « **P**ost **T**ranslational **M**odification ») de protéines [293–295]. À ce sujet, les PML-NBs sont considérés comme une plaque tournante pour une PTM en particulier, la SUMOylation. Ainsi, avant d'aborder la composition et les fonctions des PML-NBs plus en détail, il est important de définir la SUMOylation.

6.1 La SUMOylation, au cœur des PML-NBs

Par définition, la SUMOylation est la liaison covalente d'une petite protéine modificatrice de type ubiquitine (SUMO pour « **S**mall **U**biquitin-**L**ike **M**odifier ») d'environ 10 kDa, à un résidu de lysine dans la séquence d'acides aminés d'une protéine cible. Au niveau fonctionnel, la SUMOylation d'une protéine peut mener à l'activation ou l'inhibition de sa fonction, elle peut influencer sa stabilité et sa localisation cellulaire et elle permet de former un réseau d'interactions protéiques. Pour ces raisons, la SUMOylation est impliquée dans la majorité des mécanismes cellulaires. Les étapes de la SUMOylation ressemblent à celles de l'ubiquitinylation, c'est-à-dire qu'elles impliquent l'ouvrage de trois enzymes : E1 (activation), E2 (conjugaison) et E3 (ligase). Ces enzymes mènent à l'attachement d'une protéine SUMO à une protéine cible (Figure 16). La SUMOylation d'une protéine débute par le clivage d'une SUMO immature par une protéase SUMO/sentrine spécifique (SENP pour « sentrine/SUMO-specific protease ») afin de rendre les résidus diglycines (G-G) en C terminal de SUMO accessibles. Une fois exposés, les résidus G-G forment un lien thioester avec une cystéine (Cys) du complexe d'activation E1, formé des hétérodimères SAE1/SAE2. La présence d'ATP permet à E1 d'activer la SUMO et d'assurer son transfert à l'enzyme de conjugaison E2, Ubc9 (« **U**biquitin

conjugating enzyme 9 »), par transesterification sur une Cys d'E2. À son tour, E2 assure la liaison d'une protéine SUMO active sur une lysine d'une protéine cible. La présence d'une enzyme E3 SUMO ligase augmente l'efficacité et la spécificité de cette étape en interagissant directement avec Ubc9 et la protéine cible [296]. Un lien covalent entre la partie C terminale de SUMO et un groupe consensus d'acides aminés est à l'origine de la liaison entre la protéine cible et la protéine SUMO. Ce site consensus est composé de ψ -K-X-E, où ψ représente un acide aminé hydrophobe, K une lysine, X un acide aminé aléatoire et E un acide glutamique. Ainsi, une protéine peut être SUMOylée par la présence d'un complexe Ubc9-SUMO ou, par la présence d'un site pouvant lier une E3 SUMO ligase dont cette dernière s'associe à une Ubc9-SUMO à proximité. À propos des protéines E3 SUMO ligase, elles font partie de la famille TRIM (« **T**ripartite **M**otif ») dans laquelle les protéines possèdent un domaine RING (« **R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene ») [297]. Les E3, par leur domaine RING, se lient à Ubc9 en formant le complexe Ubc9-SUMO-E3 prêt à modifier une protéine cible [298]. À ce sujet, le site responsable pour la liaison d'une E3 SUMO ligase à une protéine cible est associé au motif d'interaction SUMO (SIM pour « **S**UMO **I**nteracting **M**otif »). Un SIM peut non seulement lier une E3 SUMO ligase, mais peut aussi lier d'autres protéines SUMOylées ou une protéine SUMO libre [299,300]. La présence d'un SIM peut influencer l'activation/inhibition d'une fonction d'une protéine, le niveau de SUMOylation d'une protéine et ainsi que ses partenaires d'interactions [301–304]. La séquence consensus d'un SIM se définit par la présence d'une séquence d'acides aminés hydrophobes tels que des valines (V) et des isoleucines (I). Enfin, la SUMOylation est une modification réversible et il peut donc y avoir une deSUMOylation des protéines par la présence de protéases SUMO [296].

Il existe plus d'une protéine SUMO, soit les paralogues SUMO-1, SUMO-2/3, SUMO-4 et SUMO-5. Le paralogue SUMO-1 est retrouvé plus en abondance et est exprimé de façon continue dans les cellules. Les paralogues SUMO-2/3 partagent 97% d'identité entre eux, 50% avec SUMO-1 et sont exprimés en présence de stress cellulaires qui peuvent endommager des protéines dont des protéines de choc thermique [305]. Par exemple, la conjugaison de SUMO-2/3 à des protéines lors de choc thermique permet d'influencer le repliement des protéines impliquées dans ce stress, de réguler la transcription, la traduction, la dégradation, l'apoptose, etc [306]. À ce jour, il n'existe aucun anticorps spécifique à SUMO-2 ou SUMO-3 et pour cette raison, ceux-ci sont souvent référés par SUMO-2/3. De plus, SUMO-2/3 possèdent dans leurs séquences d'acides aminés des sites accepteurs de SUMO (K7, K11, K21 et K33) leur permettant de faire du « SUMO-branching », autrement appelé de la poly-SUMOylation [307]. La formation d'une chaîne poly-SUMO favorise la reconnaissance d'ubiquitine spécifiques à la reconnaissance des protéines SUMOylées (STUbL pour « **S**UMO **t**argeted **U**biquitin **E**3 **S**UMO **L**igase ») [308]. Ce n'est que récemment que les paralogues SUMO-4 et SUMO-5 ont été découverts et leur fonction et utilité demeurent à être déterminées. En revanche, leur expression semble spécifique aux tissus [309]. SUMO-4 est exprimée dans les reins, la rate, le placenta et

les ganglions lymphatiques tandis que SUMO-5 est associé aux lymphocytes du sang périphériques [310,311]. En sommes, tous les éléments impliqués dans la SUMOylation peuvent se trouver dans les PML-NBs, un compartiment cellulaire qui favorise cette PTM.

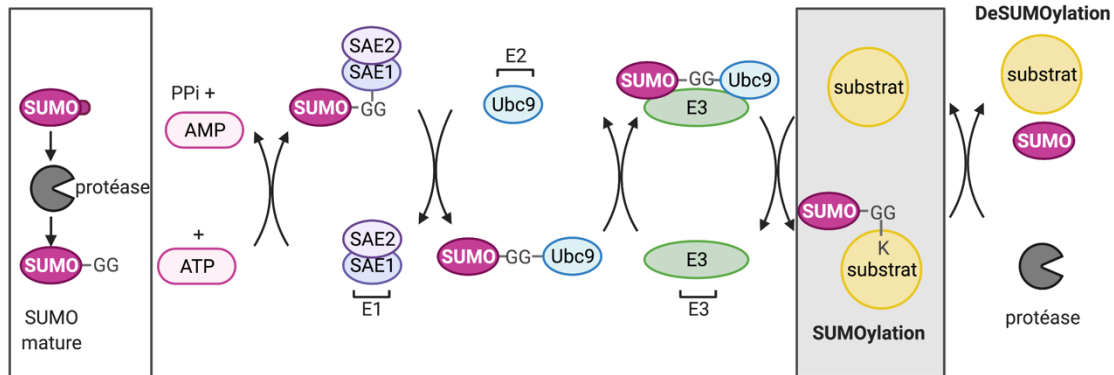


Figure 16. Étapes de la SUMOylation d'une protéine. Une SUMO immature devient mature par la présence de protéase qui permet d'exposer les diglycines (GG) de SUMO. En présence d'ATP, la SUMO peut être activée en liant ses GG au complexe de l'enzyme E1 SAE1/SAE2. Une fois activés, les GG de la SUMO sont conjugués à l'enzyme E2 Ubc9. En présence d'enzyme E3, l'Ubc9 chargée d'une SUMO s'y lie ce qui permet de transférer la protéine SUMO à une lysine (K) d'une protéine cible (substrat) en liant les GG de SUMO. En présence de protéase, la SUMOylation est réversible. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

6.2 PML et la formation des PML-NBs

Les PML-NBs sont formés par des monomères de la protéine PML ainsi que par ses partenaires d'interaction. La protéine PML est issue du gène *PML* qui possède neuf exons et dont son cadre de lecture permet la transcription de différents transcrits par épissage alternatif. À ce fait, il existe six isoformes nucléaires de PML (PMLI – PMLVI) et un isoforme cytoplasmique (PMLVII). Ils ont en commun les 418 premiers acides aminés, c'est-à-dire de l'exon 1 à l'exon 4 et ceux nucléaires partagent les exons 1 à 6 [312]. Ainsi, ils diffèrent en C terminal, mais tous peuvent de former des PML-NBs. Puisqu'il n'existe pas d'anticorps spécifique aux isoformes, les études mentionnent rarement les isoformes impliquées sauf lorsque ceux-ci sont étudiés individuellement par expression transitoire. La composition protéique de PML l'associe à la famille TRIM dont la structure générale possède un domaine RBCC (« RING/box/coiled-coiled »). Le domaine RBCC de PML comprend l'exon 1 à 3 [312]. De plus, tel que mentionné dans la section précédente, les protéines de la famille TRIM possèdent un domaine RING, associant PML à une fonction E3 SUMO ligase [313,314].

En laboratoire, à la suite d'un marquage par immunofluorescence, on observe qu'en moyenne les cellules de mammifères possèdent de 5 à 30 PML-NBs par cellule [315]. Récemment, à l'aide de technique LLP (« liquid-liquid phase »), les étapes primaires de la formation des PML-NBs ont été mises en évidence (Figure 17) [316]. Celles-ci débutent par un lien covalent bisulfite de monomères de PML oxydés, suivi d'une liaison non covalente entre les domaines RBCC, ce qui forme la coquille des PML-NBs. Contrairement aux autres E3 SUMO ligases, PML recrute Ubc9 par sa tétramérisation au lieu d'une dimérisation [314,317]. Le recrutement d'Ubc9 à PML conduit à la SUMOylation de PML et fortifie la liaison des monomères de PML. Dans ce contexte, PML est SUMOylée sur trois sites SUMO accepteurs (K65/K160/K490) et possède un site SIM dans son exon 7 (VVV) [318,319]. Enfin, le volume des PML-NBs est proportionnel au stress cellulaire qui mène au recrutement de partenaires d'interaction par des interactions SIM/SUMO. Mise à part PML, les protéines SP100 (« Speckle protein of 100 kDa ») et DAXX font partie intégrante des PML-NBs, toutes les deux impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes par des fonctions des répressions [303,320,321]. Jusqu'à présent, 170 protéines au sein des PML-NBs ont été identifiées [291]. Pour cette raison, les PML-NBs peuvent occuper des rôles dans divers processus. Bien qu'en laboratoire la délétion de PML ne conduit pas à la létalité, son absence cause toutefois des effets délétères sur la stabilité du génome, soulignant son importance dans le maintien de l'intégrité de l'ADN [322–324]. *Les paragraphes suivants aborderont seulement l'implication des PML-NBs dans les réponses aux dommages à l'ADN et la réponse antivirale pour la nécessité de la thèse.*

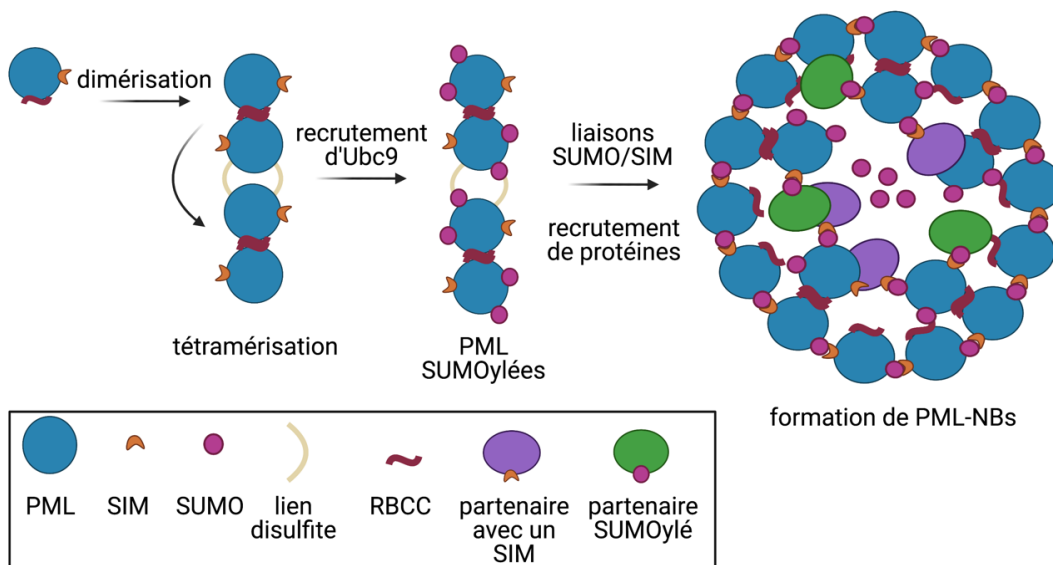


Figure 17. Formation des PML-NBs. Deux monomères de PML s'associent par leur domaine RBCC. La formation de tétramères est réalisée par deux liens bisulfites entre deux dimères de PML. La présence de tétramères de PML recrute l'Ubc9 qui SUMOyle PML. La SUMOylation de PML permet de former un plus grand corps nucléaire par des interactions SIM/SUMO entre les protéines PML et des partenaires d'interaction. Figure inspirée de [325]. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

6.3 Les PML-NBs, des régulateurs des réponses aux dommages à l'ADN

Dans un contexte de dommage à l'ADN, les PML-NBs sont considérés des acteurs importants pour leur implication dans la reconnaissance des cassures de l'ADN, mais aussi dans la réparation. Lors d'une cassure de l'ADN, PML est phosphorylée par les kinases ATM, ATR et Chk2. Cette phosphorylation crée une augmentation accrue de la formation de PML-NBs [326,327]. Par ailleurs, Dellaire et collègues [328] ont rapporté la formation des PML-NBs dose réponse dépendante suite à des dommages causés par des irradiations et des rayons UV. Au sein de ces PML-NBs se trouvent des protéines de la DDR qui y transitent de façon dynamique [328]. De plus, l'importance de PML dans la DDR a été soulignée par la génération de lignées cellulaires dont le gène PML a été supprimé [329]. Dans un contexte télomérique, les PML-NBs qui s'y associent ont souvent été considérés comme un marqueur de cellules ALT pour la présence d'APBs. Dans ces cellules, les APBs sont composés des protéines télomériques TRF1 et TRF2 ainsi que des protéines de la réparation de l'ADN dont NBS1, RPA, BLM, RAD52 et BRCA1 [283,288,330,331]. Cependant, il a été mis en évidence que les télomères courts et endommagés de cellules non néoplasiques étaient également décorés par des PML-NBs [322]. En absence de PML, les cellules non néoplasiques possèdent des TIFs, indicateur de dommages aux télomères [332]. D'autre part, en utilisant un système rapporteur de la RH dans des lignées sauvages et déficientes en PML, le groupe de Brenneman a souligné l'importance de PML. Dans cette étude, les cellules dépourvues de PML ne démontraient pas d'activité du système rapporteur de la RH [333,334]. En somme, les PML-NBs aux télomères servent de foyers de DDR et de la RH.

6.4 Les PML-NBs et la réponse antivirale lors d'infections aux herpèsvirus

Lors d'une infection virale, la première ligne de défense de l'organisme est réalisée par la production et la sécrétion de cytokines comme des interférons (IFN). Il existe trois familles d'IFNs, les IFNs type I (IFN α et β), les IFNs type II (IFN γ) et les IFNs de type III (λ). L'activation de la transcription d'IFNs débute par la reconnaissance de motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP pour « **P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns ») par un PRR. Par exemple, lors d'une infection par un virus à ADNdb qui se trouve dans le cytoplasme, un PRR reconnaît un PAMP et active les facteurs de transcription IRF3 et/ou IRF7 [335–337] (Figure 18). L'activation de ces facteurs de transcription mène à leur translocation du cytoplasme au noyau et à la transcription, la production et la sécrétion d'IFN α ou β [338,339]. Une fois dans le milieu extracellulaire, les IFN α/β se lient à leurs récepteurs cellulaires présents à la surface membranaire (IFNAR pour IFN α/β ou IFNGR pour IFN γ). La liaison d'un IFN à son récepteur active les tyrosines kinases tyk2 et JAK1 qui phosphorylent les protéines STAT1 et STAT2 afin de former des homodimères de STAT2 ou des

hétéromdimères STAT1/STAT2 [340]. Ces dimérisations forment le facteur de croissance 3 stimulé à l'IFN (IRGF3 pour « IFN-stimulated growth factor 3 ») en se liant avec l'IRF9 dans le cytoplasme. L'IRGF3 transloque ensuite au noyau où il se lie aux promoteurs de gènes stimulés à l'IFN (ISG pour « **IFN** stimulated genes »). En somme, la voie JAK/STAT promeut la restriction virale par l'activation de la transcription des gènes stimulés à l'IFN.

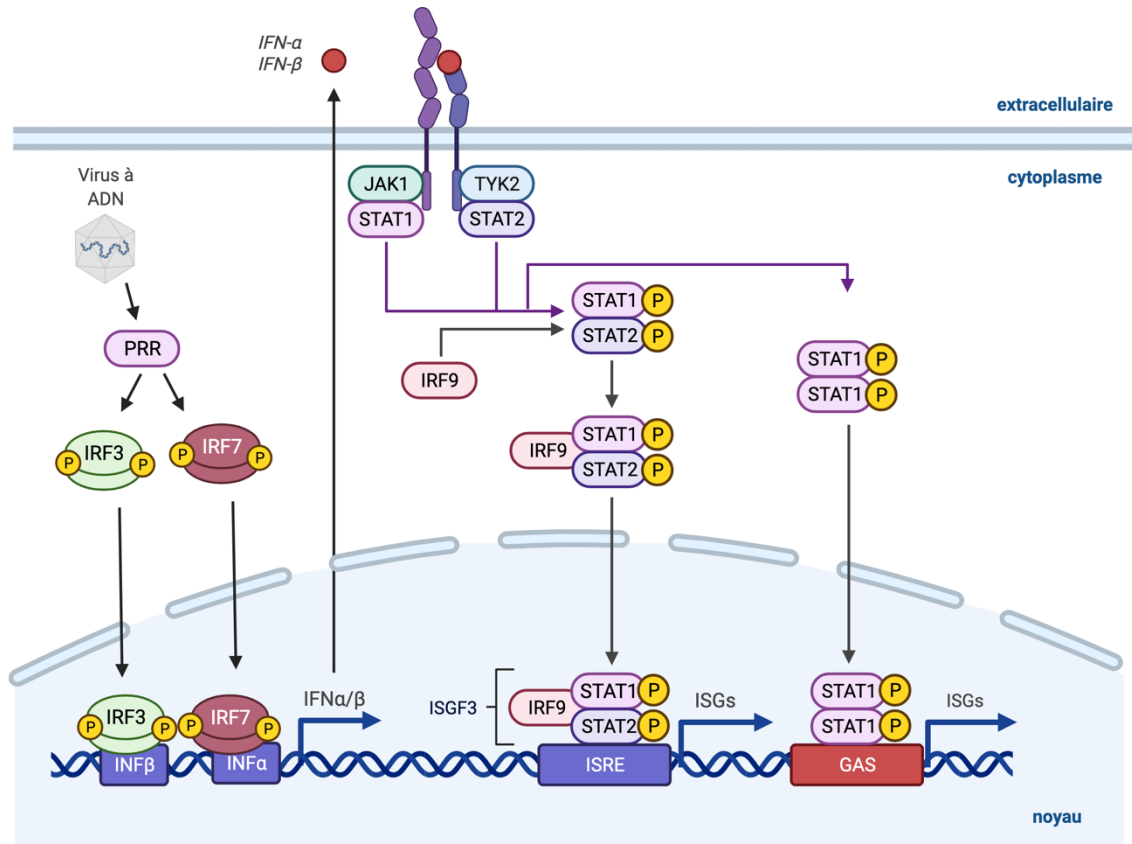


Figure 18. Bref résumé de la voie de signalisation de l'interféron de type I. Lors d'une infection, un récepteur de reconnaissance de patrons (PRR) détecte la présence d'un virus à ADN. Cette reconnaissance mène à la phosphorylation et la dimérisation d'IRF3 et IRF7 et transloquent au noyau aux promoteurs des gènes de l'interféron (INF) β et α respectivement. L'INF α/β sont sécrétés dans l'espace extracellulaire et se lie à son récepteur à la surface membranaire d'une cellule. Une fois une molécule de l'INF α/β lie son récepteur, JAK1 et YK2 s'activent et phosphorylent STAT1 et STAT2. Cette phosphorylation mène à des hétérodimères STAT1/STA2 et des homodimères STAT1/STAT1 qui transloquent au noyau afin d'activer la transcription des gènes stimulés à l'interféron (ISGs). ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

En présence d'un pathogène, les PML-NBs jouent un rôle dans la réponse immunitaire intrinsèque [341,342]. À ce sujet, la transcription de PML est activée et augmentée en réponse à l'INF β . Non seulement l'INF β active la transcription de PML (considéré un ISG), mais les PML-NBs participent à l'activation de la transcription des INF β [343]. Ainsi, en présence d'infection, les interférons induisent la transcription du gène PML grâce aux

éléments qui agissent en aval des facteurs de transcription de l'INF, STAT et IRF3/IRF7 [344,345]. De son côté, PML induit la synthèse d'INF β en augmentant son expression par l'activation d'IRF3 [343,346]. De plus, à l'intérieur des PML-NBs logent des joueurs importants dans la restriction virale soit SP100, DAXX et ATRX. Lors des évènements précoces d'infection, les PML-NBs s'associent aux génomes de plusieurs virus, ce qui mène à l'inhibition de l'expression des génomes viraux par des protéines liées à la chromatine [347–349]. Les génomes de certains virus possèdent des histones cellulaires avec des PTM, ce qui permet au génome viral d'être reconnu par des protéines de la chromatine pour la répression ou l'expression des gènes viraux à l'intérieur des PML-NBs [350,351]. Ainsi, les PML-NB peuvent agir au niveau de la régulation de la transcription des génomes viraux à la suite de leur chromatinisation et au niveau de la signalisation d'IFN.

L'effet inhibiteur des PML-NBs sur la réplication virale a été validé pour certains herpèsvirus en diminuant *in vitro* l'expression de PML [349,352,353]. Dans le cas d'HHV-6A, sa réplication est nettement augmentée en utilisant une lignée cellulaire dont l'expression des protéines DAXX, SP100 et PML a été diminuée [353]. Différents herpèsvirus détruisent l'intégrité des PML-NBs par l'expression de diverses protéines dont les protéines IE majoritairement. En effet, lors de l'infection par HSV-1, CMV, EBV et KSHV, leur génome et les protéines IE s'associent aux PML-NBs [354,355]. C'est le cas de la protéine BZLF1 de l'EBV [356]. Dans d'autres cas, la SUMOylation est utilisée par le virus afin de manipuler la réponse à l'IFN de la cellule hôte pour éviter une réponse immunitaire contre ce dernier [357,358]. Chez l'HSV-1, son ubiquitine ligase, ICP0, cible des protéines SUMOylées cellulaires et deSUMOyle PML, ce qui compromet la structure des PML-NBs [359]. Dans le cadre de l'hCMV, sa protéine IE1 empêche la SUMOylation *de novo* de PML et de SP100 tandis que sa protéine virale pp71 dégrade DAXX et déplace ATRX des PML-NBs [360–362]. En plus des herpèsvirus s'ajoutent des protéines d'adénovirus, des papillomavirus, de polyomavirus et de rétrovirus qui s'associent aux PML-NBs afin de les détruire [363]. Cependant, il a été démontré qu'IE1 des HHV-6A/B s'associe aux PML-NBs sans compromettre leur intégrité sans toutefois avoir évalué le rôle ou l'impact de cette association.

7. La protéine précoce immédiate 1 des HHV-6A/B

Les protéines IE, issues des locus IE-A et IE-B, représentent les premières exprimées suivant l'infection par un herpesvirus et servent à établir un environnement favorable à la réplication virale. Le loci IE-A possède plusieurs transcrits d'épissage alternatif [39,104,364]. Parmi ce locus, les protéines IE1 et IE2 sont issues d'épissage alternatif entre *U89* et *U90* dans le cas IE1 et *U86/87* et *U90* pour IE2 [42,103]. Le transcrit d'IE1 de l'HHV-6A (IE1A) est de 2.8 kpb et celui d'IE1 de l'HHV-6B (IE1B) est de 3.2 kpb, dont la traduction résulte en protéines composées de 941 et 1078 acides aminés, respectivement. En effet, les protéines IE1A et IE1B (IE1A/B) partagent seulement 62% d'homologie en acides aminés et 72% de similarité au niveau de la composition génique.

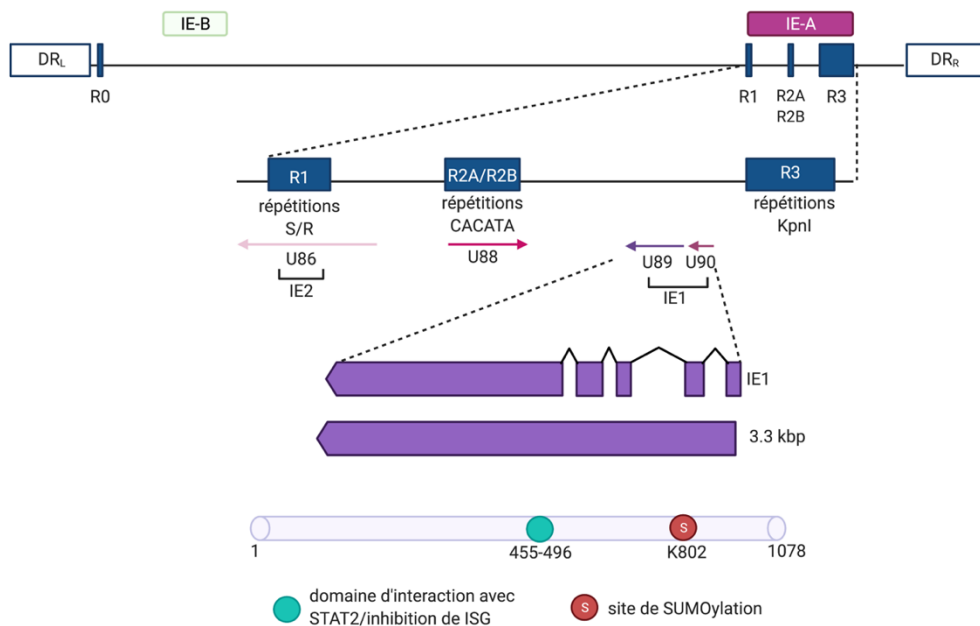


Figure 19. Schéma du transcrit de la protéine IE1B. La protéine IE1 est issue des cadres de lectures *U89* et *U90* du loci IE-A. Une fois épissé, l'ARNm de 3.3 kpb est traduit en 1078 acides aminés. IE1B possède un domaine de liaison à STAT2 ainsi qu'une lysine pouvant lier une protéine SUMO (K802). ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

Lors de l'infection par HHV-6A/B, les protéines IE1A/B sont les premières exprimées. Leurs transcrits d'ARNm peuvent être détectés dès 2 heures suivant l'infection et la protéine est produite et exprimée dans le noyau après 4 heures d'infection [365,366]. L'observation de la cinétique d'infection par immunofluorescence a permis d'apprécier le phénotype d'IE1A/B dans le temps. En effet, les foyers IE1A/B se présentent en forme ponctuelle dans le noyau [366,367]. Au cours de l'infection, le nombre de foyers est réduit, mais leur volume

augmente [366]. Dès 12 heures suivant l'infection, 8 à 10 foyers peuvent être observés, ce qui est réduit à 1 ou quelques plus gros foyers après 24 heures d'infection. À 72 heures et 96 heures, la présentation des foyers est mixte due à la réinfection de nouvelles cellules. IE1A/B demeurent des protéines dont les rôles sont peu connus. Puisqu'elles partagent que 62% d'identité, il est anticipé qu'IE1A/B exercent des fonctions différentes. En 1994, il a été démontré qu'IE1A, mais pas IE1B, active des promoteurs hétérologues, dont celui du virus de type 1 de la leucémie humaine des LTs (HTLV1 pour « **H**uman **T**-cell **L**ymphotropic **V**irus Type **1** ») [132,368]. D'autre part, IE1A/B modulent la réponse immunitaire en empêchant la signalisation de l'INF β [365]. Plus spécifiquement, IE1A/B affectent la translocation d'IRF3 au noyau et, par conséquent, la liaison d'IRF3 au promoteur d'INF- β [365]. En revanche, IE1B mais pas IE1A se lie à STAT2. Cette liaison IE1B/STAT2 transloque le complexe au noyau et empêche STAT2 de former l'ISGF3 et par conséquent empêche la transcription de protéines impliquées dans la réponse à l'INF- β . Ce domaine d'IE1B se situe à la position protéique 455 à 496, soit 41 acides aminés [369]. La fonctionnalité de cette région a été validée en générant un hybride d'IE1A avec la région 455-496 d'IE1B sous-clonée [369].

À ce jour, il est connu qu'IE1A/B peuvent être phosphorylées à des résidus sérines/tyrosines, toutefois le rôle de la phosphorylation de ces protéines n'a jamais été évalué [366]. Outre la phosphorylation, IE1A/B possèdent des sites pour la SUMOylation [366,367]. Des analyses *in silico* ont permis d'identifier des sites potentiels de SUMOylation pour IE1A (K665) et IE1B (K802) [370]. En revanche, seulement l'importance du site K802 d'IE1B pour la SUMOylation a été vérifiée et validée. À ce jour, le rôle ou l'importance de la SUMOylation pour les protéines IE1A/B demeure inconnu.

Problématique, contexte, hypothèse et objectifs de recherche

L'intégration d'HHV-6A/B est un mode de latence utilisé par ces herpesvirus afin de persister chez leurs hôtes. Il est connu qu'HHV-6A/B s'intègrent spécifiquement aux télomères des chromosomes humains par la présence de TMRs à chaque extrémité de leur génome viral. Bien que la présence de ces séquences soit essentielle pour l'intégration d'HHV-6A, suggérant un événement de recombinaison homologue, le mécanisme fondamental et les facteurs impliqués ne sont pas connus. En 2014, le Dr Flamand est allé peaufiner ses connaissances au niveau de la biologie des télomères, dans le laboratoire du Dr Eros Lazzerini-Denchi au Scripp Research Institute à San Diego en Californie. Durant sa sabbatique, il a observé la présence de foyers de la protéine IE1 d'HHV-6A/B (IE1A/B) aux télomères de la lignée cellulaire immortalisée U2OS. Particulièrement, il avait noté l'association des foyers IE1A/B avec les PML-NBs dans ces cellules. En parallèle, il s'est familiarisé avec la biologie des télomères, plus particulièrement au niveau du complexe protéique aux télomères, le complexe shelterin. Depuis, le laboratoire du Dr Flamand s'est outillé pour étudier les protéines d'HHV-6A/B aux télomères ainsi que le complexe shelterin. À la lumière de ces nouvelles notions apportées au laboratoire, mon rôle était de définir des facteurs impliqués dans l'intégration d'HHV-6A/B et ce, en gardant un intérêt particulier pour IE1A/B.

Contrairement aux autres herpesvirus, la protéine IE1A/B s'associe aux PML-NBs lors de l'infection sans détruire leur structure. Cependant, l'impact ou l'importance de cette association tant au niveau cellulaire que viral n'est pas connu. Outre leur rôle dans l'immunité cellulaire intrinsèque, les PML-NBs sont essentiels pour l'homéostasie télomérique en s'associant aux télomères endommagés afin d'y réparer les dommages. À cet égard, il est connu que les PML-NBs sont importants pour l'élongation des télomères des cellules U2OS par le mécanisme d'ALT, un mécanisme impliquant la recombinaison homologue des télomères. Considérant l'importance des séquences TMRs pour l'intégration d'HHV-6A, l'hypothèse est que l'intégration d'HHV-6A/B aux télomères de la cellule hôte est réalisée par recombinaison homologue.

Quatre objectifs ont été fixés pour cette thèse :

- 1) Caractériser l'association d'IE1B avec les PML-NBs dans un modèle cellulaire favorable à l'intégration d'HHV-6B et de définir l'importance des PML-NBs dans l'intégration d'HHV-6B.
- 2) Caractériser l'association d'IE1A avec les PML-NBs dans un modèle cellulaire favorable à l'intégration d'HHV-6A, définir l'importance des PML-NBs dans l'intégration d'HHV-6A et comparer les résultats à ceux obtenus avec HHV-6B.

- 3) Caractériser l'importance de la protéine shelterin majeure, TRF2, dans l'infection et l'intégration d'HHV-6A/B.
- 4) Définir un rôle pour IE1B dans un contexte de dommage et de réparation de l'ADN.

Bien que les génomes d'HHV-6A/B sont très rapprochés au niveau des séquences nucléiques, il est préférable d'étudier ces deux virus individuellement afin d'atteindre des objectifs réalistes et éviter la confusion. Dans l'ensemble, les objectifs fixés ont été atteints, bien que d'autres études exhaustives doivent être réalisées afin de définir le mécanisme de l'intégration d'HHV-6A/B.

Chapitre 1. The Promyelocytic Leukemia Protein facilitates human herpesvirus 6B chromosomal integration, immediate early protein multiSUMOylation and its localization at telomeres

Vanessa Collin¹, Annie Gravel¹, Benedikt B. Kaufer², Louis Flamand^{1,3*}

¹ Division of Infectious Disease and Immunity, CHU de Québec Research Center, Quebec City, Quebec, Canada

² Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

³ Department of microbiology, infectious disease and immunology, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Québec, Canada

* Lead contact:

Louis.Flamand@crchudequebec.ulaval.ca

1.1 Résumé

L'herpèsvirus humain de type 6B (HHV-6B), un bêta-herpèsvirus, intègre son génome aux télomères des chromosomes humains. Cependant, les protéines cellulaires et virales impliquées demeurent inconnues. Nous démontrons qu'une protéine cellulaire, celle de la leucémie promyélocytaire (PML) formant des corps nucléaires (PML-NBs), s'associe aux télomères avec la protéine IE1 d'HHV-6B. Nous rapportons l'augmentation des niveaux de SUMOylation d'IE1 en présence de PML et avons identifié un motif d'interaction avec une protéine SUMO dans la séquence d'acides aminés d'IE1, essentiel pour sa distribution nucléaire, sa SUMOylation globale et l'association aux PML-NBs. En outre, en utilisant des lignées cellulaires déficientes pour PML, nous avons fait l'observation originale que PML favorise l'intégration d'HHV-6B dans les chromosomes. Ensemble, nous avons démontré que les PML-NBs sont importants pour la multiSUMOylation d'IE1 et jouent un rôle important dans l'intégration d'HHV-6B dans les chromosomes, une stratégie développée par HHV-6B pour maintenir son génome dans son hôte sur de longues périodes.

1.2 Abstract

Human herpesvirus 6B (HHV-6B) is a *betaherpesvirus* capable of integrating its genome into the telomeres of host chromosomes. Until now, the cellular and/or viral proteins facilitating HHV-6B integration have remained elusive. Here we show that a cellular protein, the promyelocytic leukemia protein (PML) that forms nuclear bodies (PML-NBs), associates with the HHV-6B immediate early 1 (IE1) protein at telomeres. We report enhanced levels of SUMOylated IE1 in the presence of PML and have identified a putative SUMO Interacting Motif (SIM) within IE1, essential for its nuclear distribution, overall SUMOylation and association with PML to nuclear bodies. Furthermore, using PML knockout cell lines we made the original observation that PML is required for efficient HHV-6B integration into host chromosomes. Taken together, we could demonstrate that PML-NBs are important for IE1 multiSUMOylation and that PML plays an important role in HHV-6B integration into chromosomes, a strategy developed by this virus to maintain its genome in its host over long periods of time.

1.3 Introduction

Human herpesvirus 6B (HHV-6B) is a *betaherpesvirus* infecting nearly 90% of the population worldwide. HHV-6B is the etiologic agent of *exanthem subitum*, a childhood disease whose symptoms include fever, occasional skin rash and respiratory distress [1]. Following primary infection, HHV-6B enters in latency. In immunocompromised patients such as hematopoietic stem cell transplantation recipients, HHV-6B frequently reactivates from latency and can cause serious medical complications [2–4]. During latency, most herpesviruses maintain their genome as a circularized episome. Episomes of some herpesviruses (EBV and KSHV) can be tethered to human chromosomes, ensuring the transfer of the virus genome to both daughter cells following cell division [5,6]. Thus far, the state of the HHV-6B genome during latency remains elusive.

Importantly, HHV-6B can readily integrate its genome into host chromosomes [7–9]. HHV-6B integration can take place in various chromosomes but invariably occurs within the telomeric region [10–12]. Telomeres are non-coding (TTAGGG)_n hexanucleotides present at the chromosome termini. They protect chromosomes against the loss of genetic information by preventing the recognition of chromosome ends by the DNA damage response (DDR) machinery. Moreover, they serve as a buffer zone to prevent premature cell senescence due to the end replication problem of the cellular DNA polymerase. Interestingly, HHV-6B can integrate into the chromosomes of germinal cells and upon fertilization, the resulting embryo will carry a copy of the viral genome in every cell [8]. The resulting individual will transmit the integrated HHV-6B to half of its descendants. Such individual harbors one or more integrated copy of HHV-6B per cell and are referred to as inherited chromosomally-integrated HHV-6B (iciHHV-6B) subjects [3,13]. Large-scale studies have identified iciHHV-6 as a predisposing factor for angina pectoris as well as pre-eclampsia in pregnant women [14,15]. Viral integration into telomeres has been suggested to be an alternative mechanism to maintain the HHV-6B genome during latency [11] as reported for the highly oncogenic Marek's disease virus [16]. For an integrated viral genome to reactivate, replicate and form new virions, the integrated genome must remain whole. In support, the integrated HHV-6B genome is generally intact and conserved without any gross rearrangements or mutations [17]. Furthermore, the integrated HHV-6B genome can express genes and lead to complete viral reactivation [2,10,18,19]. Until now, viral, or cellular proteins involved in HHV-6B integration remains to be fully characterized. In a recent report, we have provided evidence that the telomeric shelterin protein TRF2 is required for efficient integration of HHV-6A and HHV-6B [20].

An interesting candidate that is potentially involved in HHV-6B viral integration is the immediate-early (IE) 1 protein (IE1) [21–23]. IE1 regulates early (E) gene expression and plays important roles in the replication of the virus during the lytic phase. Moreover, it establishes a favorable environment by manipulating PML-Nuclear

bodies (PML-NBs) which are part of the cellular antiviral defense [24]. In the context of a viral infection, PML-NBs have been shown to repress replication of several viruses in collaboration with SP-100 and DAXX.

PML-NBs are found mostly in the nucleus and contain large quantities of the PML protein [25,26]. Many herpesviruses have established ways to overcome this antiviral mechanism by degrading or manipulating PML-NBs. For instance, herpes simplex virus 1 (HSV-1) encodes the E3 ubiquitin ligase ICP0 that conjugates ubiquitin to PML and induces its degradation [27,28]. The IE1 of human cytomegalovirus (hCMV) de-SUMOylates PML-NBs resulting in PML redistribution and inhibits PML *de novo* SUMOylation [29]. PML-NBs are also involved in DNA damage repair. Marchesini et al. demonstrated that PML is essential for telomere maintenance in non-neoplastic cells, as cells undergo apoptosis in absence of PML after DNA damage at these sites [30]. Intriguingly, IE1 has been shown to colocalize with PML during HHV-6B infection without inducing the dispersal of PML-NBs [21–23,31]. However, the biological relevance of this PML-IE1 interaction remains unknown.

Considering that 1) PML localizes at telomeres, 2) PML-NBs associate with DNA repair proteins and 3) viral integration occurs at telomeres, we hypothesized that PML plays a role in HHV-6B chromosomal integration. Here we show that PML-NBs are an important site for multiSUMOylation of IE1. We also identified motifs providing that multiSUMOylation state proven to be essential for its nucleation and association with PML-NBs. We also demonstrate that IE1 not only localizes with PML, but also with the host telomeres. Lastly, we provide evidence that PML plays a role in HHV-6B chromosomal integration.

1.4 Results

1.4.1 IE1 associates with PML

Immediate early proteins of herpesviruses are the first expressed upon infection. We and Stanton et al. [23] have previously shown that IE1 of HHV-6B is found to localize with PML throughout infection, without destroying these nuclear bodies [20]. In this paper we found that the number of IE1 foci colocalizing with PML increases as infection progresses, as indicated by a higher Mander's coefficient of colocalization (MCC) at 72h of infection, compared to 24h (**Figure 1.1A**). Moreover, by comparing the volume of PML foci in non-infected (NI) relative to HHV-6B infected MOLT-3 cells (**Figure 1.1B**) we conclude that the mean volume of PML foci is enhanced after 72h of infection. Mean IE1 foci volume also increased as infection progressed (**Figure 1.1B**). Hence, the presence of HHV-6B does not disrupt or degrade PML-NBs formation but likely cause their fusion, in agreement with our previous results [21]. These experiments were performed in T lymphoblastoid cells fully permissive to HHV-6B lytic infection. We have previously shown that U2OS and HeLa cells are semi-permissive to infection

with HHV-6B DNA replication occurring in a minority of cells, despite considerable expression of IE and E proteins [32]. Both cell lines have been extensively used by our group to assess HHV-6B integration [20,33–35]. We studied whether ectopically expressed IE1 would be found associated with PML in these cells and in the absence of other viral proteins (**Figure 1.1C**). 3D reconstitutions of deconvoluted immunofluorescence (IF) images (right column) show that IE1 mostly colocalizes with PML (represented in yellow color). As control, we used the IE2 protein that also displays a punctate nuclear distribution. However, the fact that the only anti-IE2 antibody available is specific for HHV-6A IE2 [36] prevented us from using HHV-6B IE2 as control. Unlike IE1, the majority of IE2 did not colocalize with PML. A scatter plot graph quantification for the MCC of deconvoluted acquisitions indicates that IE1 colocalizes almost perfectly with PML compared to IE2A (**Figure 1.1D**). Considering that PML is a family of proteins (n=7) sharing common NH₂ terminals with varying C-terminal lengths, we studied the colocalization of IE1 with PML I-VI nuclear isoforms. IE1 was found to colocalize with all PML nuclear isoforms (**Figure S1.1**) suggesting that IE1 recognizes a motif within a region of the NH₂ terminus common to all PML isoforms.

Using co-immunoprecipitation assay, we were unsuccessful in pulling down IE1 in association with PML, suggesting either a weak or a lack of physical interaction between these two proteins. We therefore made use of the BioID system that identifies close proximity interactors within a 10 nm radius [37]. This system takes advantage of the fusion between a protein of interest with a biotin ligase, BirA. Following the addition of biotin, interactors are marked with biotin and they can be pull-down and analyzed by mass spectrometry (MS). Stable U2OS cell lines expressing doxycycline (Dox)-inducible BirA-GFP (as control) or BirA-IE1 were generated. Left panels of **Figure 1.1E** show BirA-GFP and BirA-IE1 expression after Dox treatment. Right panels of **Figure 1.1E** show biotin labeling of proteins following Dox treatment. In BirA-GFP expressing cells, biotinylation was observed throughout the cell, following the cellular distribution of BirA-GFP. In BirA-IE1 expressing cells, biotinylation was restricted to a few foci, similar to the distribution of BirA-IE1. BirA-IE1 colocalized with PML, indicating that the fusion partner did not affect the ability of IE1 to localize with PML (**Figure 1.1F**). Using BioID, we could immunoprecipitate biotinylated PML in the presence of BirA-IE1, confirmed by the detection of PML by mass spectrometry (**Figure 1.1G**). Taken together, these results indicate that the majority of IE1 colocalizes with PML and it does so in the absence of any other viral factors.

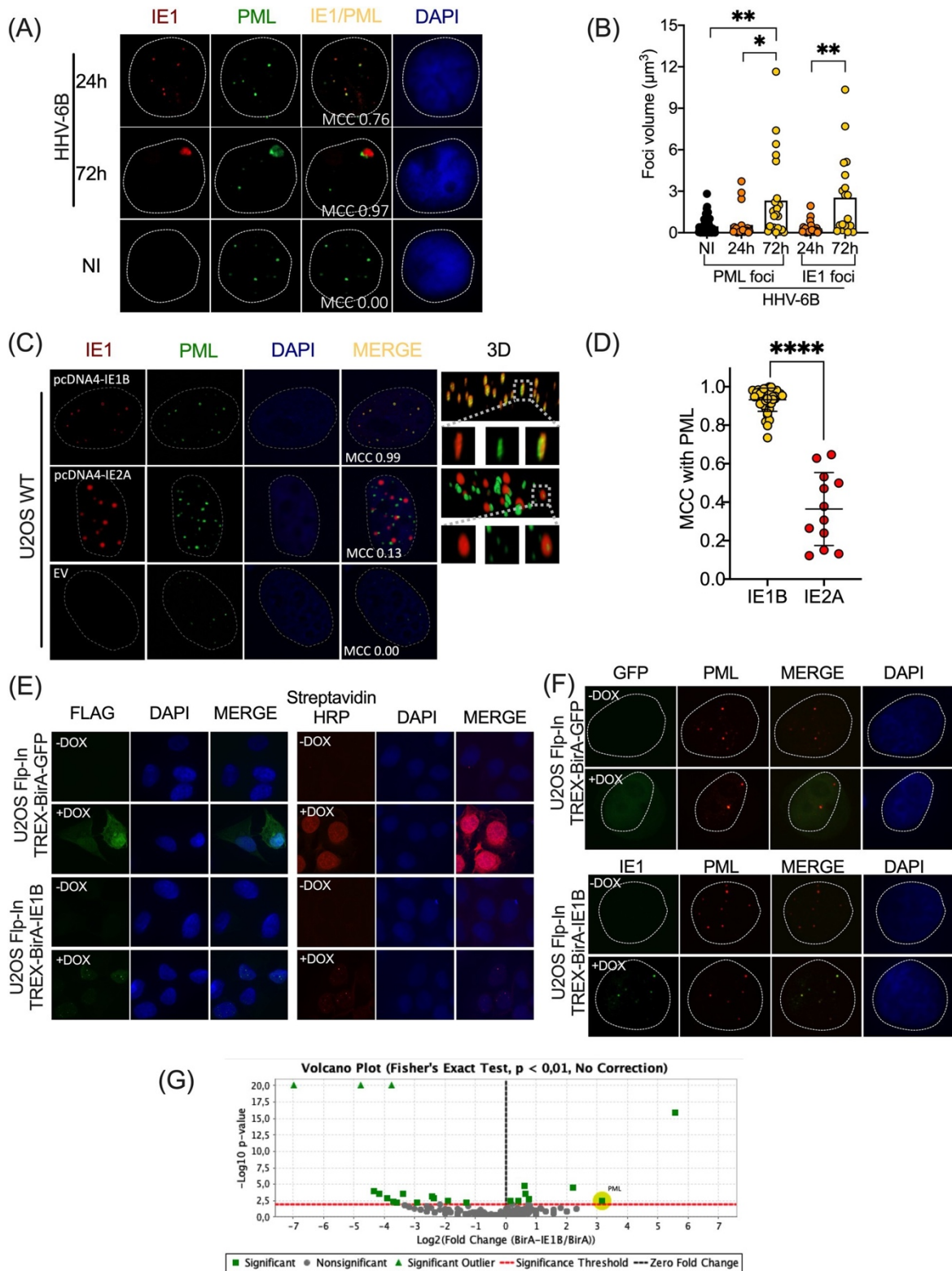


Figure 1.1 - IE1 associates with PML during infection and in the absence of other HHV-6B proteins. (A) Confocal microscopy of IF images representing PML-NBs in non-infected (NI) MOLT-3 cells and infected with HHV-6B for 24 and 72h, acquired at 40X. Colocalization is presented for each time point. PML was detected

using anti-PML with an anti-mouse-ALEXA-488 antibodies (green) and infected cells were detected with IE1 expression using anti-IE1-ALEXA-568 (red). **(B)** Graph showing the volume of PML and IE1 foci during infection. * $P < 0.01$; ** $P < 0.006$, Kruskal-Wallis test (One-Way ANOVA with multiple comparisons). **(C)** Confocal microscopy of IF images representing ectopically expressed IE1 colocalizing with endogenous PML in U2OS cells, acquired at 63X. Cells were transfected with pcDNA4/TO-IE1B, pcDNA4TO-IE2A or pcDNA4/ TO (EV: Empty Vector) vectors for 48 hours. IE1 and PML were detected with the same antibodies used in **Figure 1.1A**. IE2 was detected using anti-IE2-ALEXA-568 (red). 3D reconstitutions of deconvoluted acquisitions show perfect colocalization of IE1 with PML, represented by the yellow color. **(D)** Graph of MCC of IE1 (n=39) and IE2A (n=12) foci colocalizing with PML. Each dot represents a nucleus. **** $P < 0.0001$, Mann-Whitney test. **(E)** U2OS-Flp-In TREX cells were co-transfected with pcDNA5/TO expression vectors containing FLAG-BirA-GFP or FLAG-BirA-IE1B with pOG44 (flipase) and selected with hygromycin (250 μ g/ml) and blasticidin (50 μ g/ml). IF confirms BirA-GFP and BirA-IE1B expression (Flag) and biotinylation of proteins (Streptavidin-HRP-594) when induced with doxycycline. **(F)** Stable U2OS-BirA-GFP and U2OS-BirA-IE1 cells were induced or not with doxycycline and colocalization of IE1 with PML is demonstrated following PML and FLAG labelling. **(G)** Volcano plot of IE1 specific interacting partners following mass spectrometry and a Fisher's Exact test to identify specific IE1 interacting partners. PML was one of the specific interacting IE1 partner, compared to BirA alone, with a p value of $P < 0.0034$.

1.4.2 Expression of PML influences hyperSUMOylation of IE1

Next, we wanted to study how PML might recruit IE1 at PML-NBs and what effect it could have on IE1. PML is well-known for recruiting partners via SUMO-SUMO-Interacting Motif (SIM) interactions. PML-NBs are also a hotspot for SUMO modifications as proteins implicated in the SUMOylation process are found at PML-NBs [38–41]. We have previously shown that IE1 of HHV-6B is SUMOylated on lysine 802 (K802) [22]. To expand on these results, we have studied SUMOylation of IE1 in HEK293T cells overexpressing PML-I and HA-SUMO-1. HEK293T cells express low to no levels of PML and are easily transfectable [42]. Immunoprecipitation of IE1 followed by western blot for HA-SUMO-1 allowed us to detect HA-SUMO conjugated IE1 (**Figure 1.2A**). Expression of PML-I resulted in hyperSUMOylation of IE1, defined by a second and higher molecular weight SUMO-1-IE1 protein. SUMO-SUMO branching, resulting in polySUMOylated proteins [22,43]. To evaluate whether the formation of PML-NBs is directly responsible for IE1 SUMOylation, we generated a PML protein that can no longer form PML-NBs. We introduced a L73E mutation in the RING domain of PML-I (PML-I:L73E), a mutation proven to be essential for the tetramerization of PML monomers to form PML-NBs (**Figure 1.2C**) [44]. Compared to endogenous PML and ectopically expressed WT PML-I, PML-I:L73E has a diffuse nuclear pattern that does not allow the formation of PML-NBs (**Figure 1.2D**). We next determined if hyperSUMOylation of IE1 observed in **Figure 1.2A** was the results of SUMO-branching. Upon overexpression of WT PML-I, SUMO-IE1 was detected with all three SUMO paralogues (**Figure 1.2E**). Also of interest, hyperSUMOylated IE1 was only detected in the presence of WT PML-I and SUMO-1 but not with SUMO 2/3 or in the presence of PML-I:L73E. This suggests that hyperSUMOylation is not the result of SUMO-2/3 branching on IE1. Moreover, IE1 requires

the presence of PML-NBs to be hyperSUMOylated. These findings argue for the existence of more than one SUMO acceptor sites on IE1. Hence hereforward, hyperSUMOylation of IE1 will be referred to as multiSUMOylation.

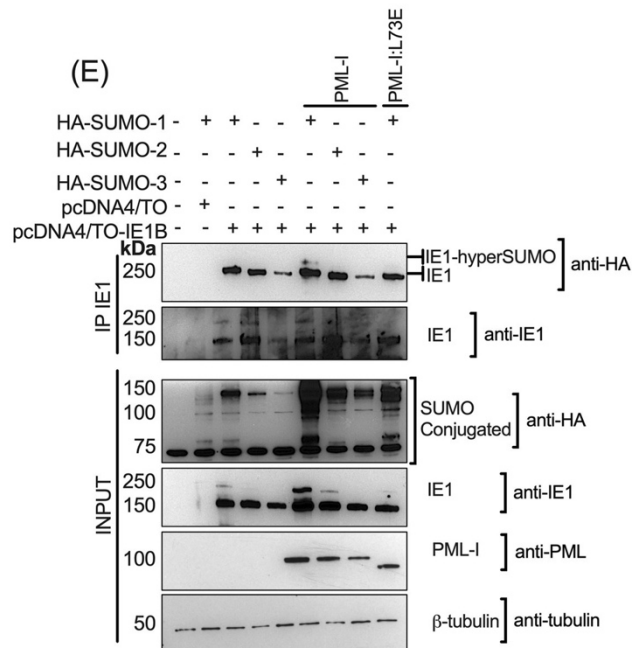
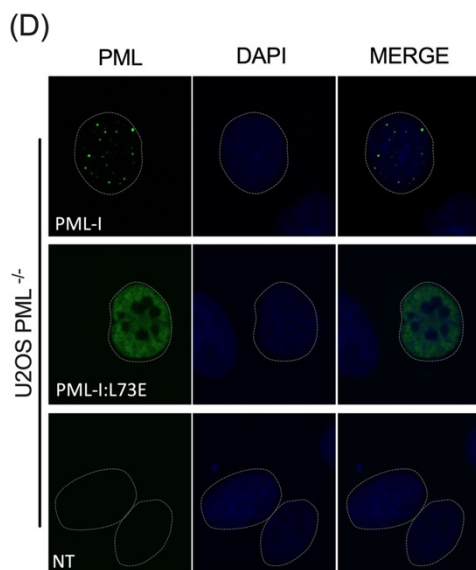
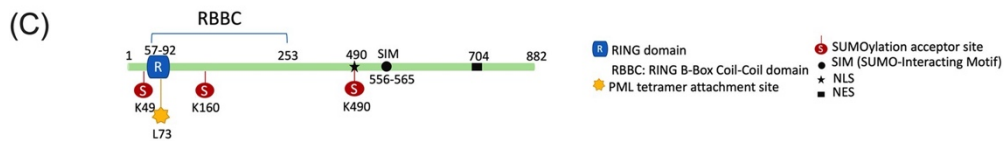
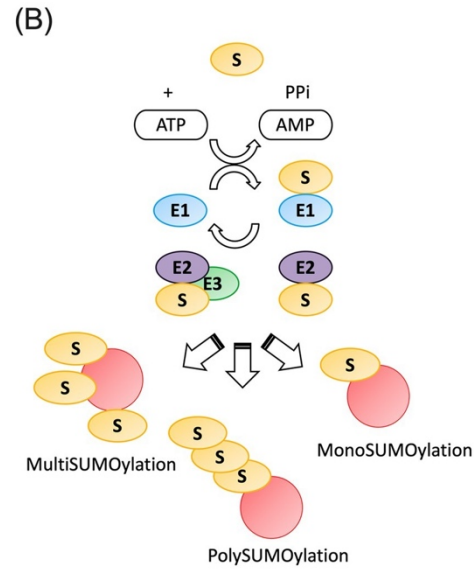
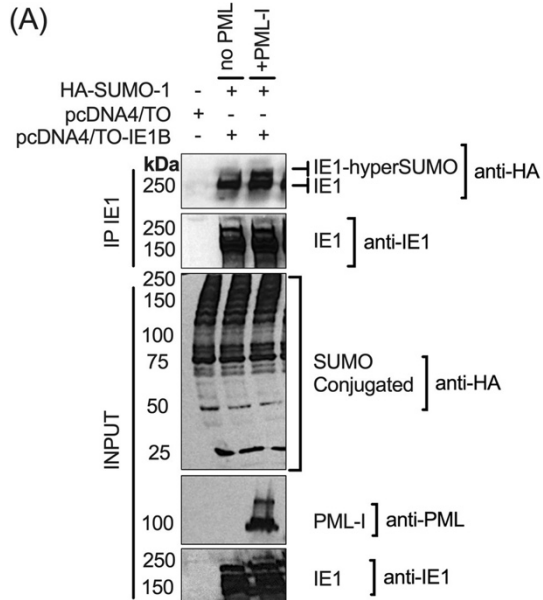


Figure 1.2 - Presence of PML-NBs leads to hyperSUMOylation of IE1. (A) HEK293T cells were co-transfected at a ratio of 1:1:1 with pCMV2N3T-HA-SUMO-1: pDEST-MYC-PML-I: pcDNA4/TO or pcDNA4/TO-IE1B plasmids. After 48h cells were collected and lysed in RIPA buffer. A portion (10%) of the lysate was used to monitor protein expression (input). The remaining portion of the lysate was used for IE1 immunoprecipitation. IE1-SUMO-1 conjugates were detected using anti-HA antibodies. In presence of PML, SUMOylation of IE1 is enhanced and that is shown by the presence of a second IE1-SUMO-1 band. (B) Illustration representing possible SUMOylation states of protein. Once mature, a SUMO protein is charged on a E1 activating enzyme and then transferred to a E2 conjugating enzyme. The SUMO-E2 complex can directly SUMOylate a protein on its acceptor lysine (K). Following conjugation to E2, the SUMO-E2 complex can be bound by a E3 SUMO ligase that will facilitate the discharge of the SUMO protein on the acceptor site of a target. The presence of a E3 SUMO ligase can influence or help reach those different levels of SUMOylation where polySUMOylation is realized by the presence of SUMO-2/3 paralogues that possess SUMO acceptor sites. (C) Scheme illustrating major domains and modification sites of PML protein. Leucine at position 73 allows the attachment of monomers of PML to form a tetramer, essential for the formation of PML-NBs [44]. (D) IF images representing the different PML-I phenotypes after transfection of PML-I WT or PML-I RING domain mutant (PML-I:L73E) in U2OS PML^{-/-} cells. PML RING mutant lost the ability to form nuclear bodies. (E) HEK293T cells were co-transfected at a ratio of 1:1:1 with pCMV2N3T-HA-SUMO-1/SUMO-2 or SUMO-3: pCMV-MYC-PML-I: pcDNA4/TO or pcDNA4/TO-IE1B plasmids. Cells were collected and processed as in (A). Enhancement of SUMOylation of IE1 is PML-I WT and SUMO-1 dependent. These results are the representation of three independent experiments (n=3).

1.4.3 MultiSUMOylation of IE1 is sequence motif and PML-NBs dependent

SUMOylation of a protein on its SUMO acceptor site can be influenced by the presence of a SUMO-Interaction Motif (SIM) that binds free SUMO or a SUMOylated protein in a non-covalent manner, allowing a change in the function or localization of a protein [45,46]. Using *in silico* analyses, we have identified putative SIM sites at position 573–575 (VVV) and position 775–777 (VIV) (**Figure 1.3A** and **Figure S1.3**). To characterize the importance of these sequence motifs, we generated IE1 mutants by substituting the VVV or VIV sites by AAA, a mutation reported to abolish the binding of SUMO to SIM sites [47,48] (**Figure 1.3A**). We have also generated from these mutants a point mutation in which the known SUMO acceptor site, K802, was substituted to an arginine (K802R). Upon immunoprecipitation of WT IE1, we could detect robust SUMO-1 conjugation (**Figure 1.3B**). In contrast, SUMOylation of the ⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷ mutant was much weaker while SUMOylation of the ⁵⁷³AAA⁵⁷⁵ mutant was equivalent to that of WT IE1. Complete loss of IE1 SUMOylation was observed with the IE1⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R double mutant. Residual SUMOylation was observed with the IE1⁵⁷³AAA⁵⁷⁵:K802R mutant, arguing for the existence of a SUMO acceptor site other than the previously reported K802 [22]. IE1 with both putative SIM sites mutated, also displayed residual SUMOylation (**Figure 1.3B**). Taking into account the low level of endogenous PML expression in HEK293T cells [42] no multiSUMOylation of IE1 was detected in the absence of PML overexpression. The experiments were therefore repeated in HEK293T cells overexpressing PML-I (**Figure 1.3C**). In the presence of PML-I, multiSUMOylation of WT IE1 was observed and lost with the

⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷ mutant, arguing in favor of a role for the VIV sequence motif in the multiSUMOylation process of IE1 by PML-I. Consistent with results of **Figure 1.3C**, mutation of the ⁵⁷³VVV⁵⁷⁵ had no effect on the multiSUMOylation of IE1 in presence of overexpressed PML-I. Overall, multiSUMOylation of IE1 in the presence of PML-I is greatly affected by mutation of the putative ⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷ SIM site. Moreover, and consistent with results of **Figure 1.3B**, IE1 SUMOylation was lost with the ⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R double mutant. Of interest, SUMOylation of IE1 could be detected with the K802R mutant, indicating the presence of an additional SUMO acceptor site on IE1 (**Figure 1.3D**). Taken together, our results indicate that in the presence of PML-NBs, multiSUMOylation of IE1 is observed and is dependent on the presence of the putative ⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷ SIM site.

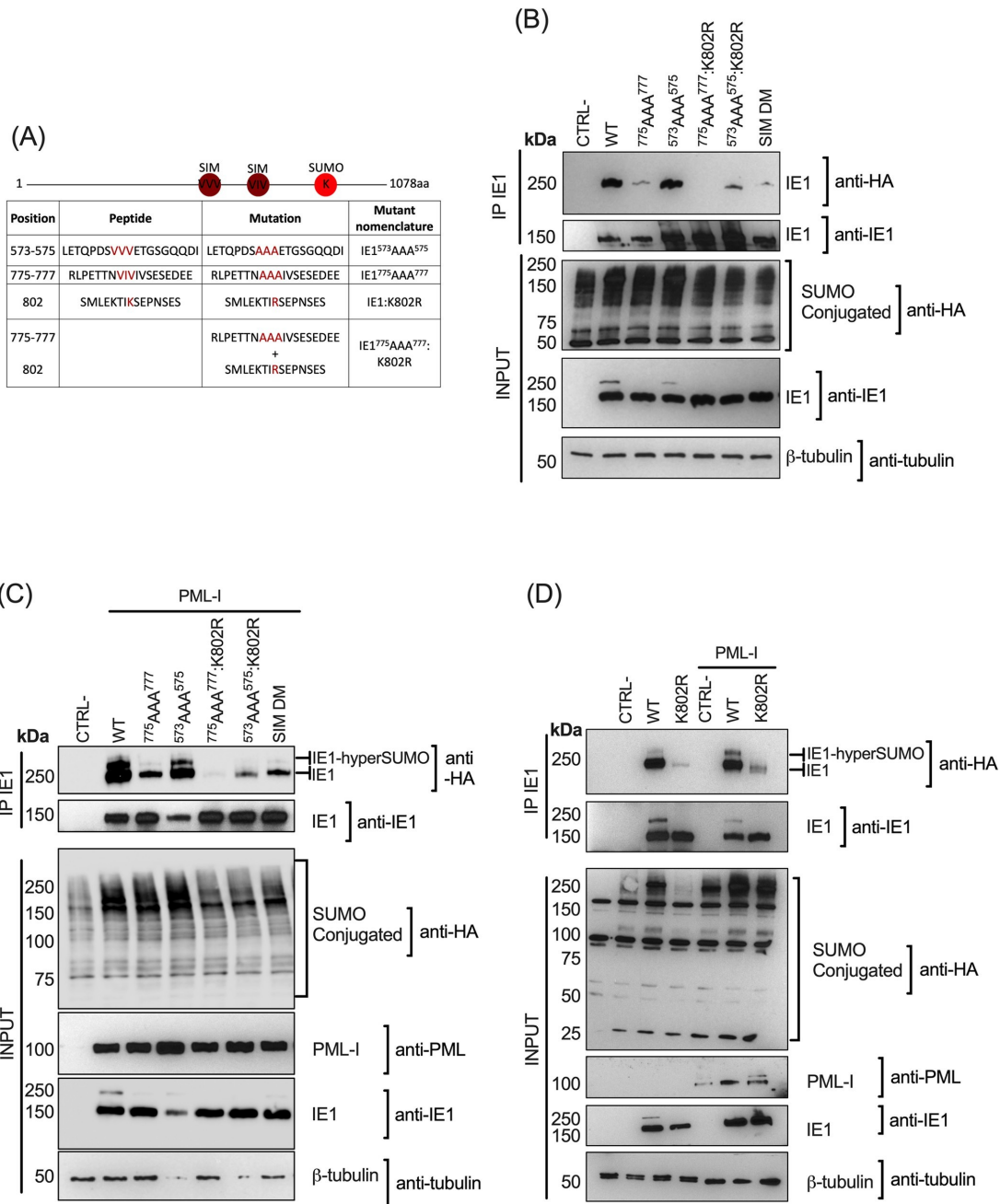


Figure 1.3 - Putative IE1 Sumo-Interacting Motif site is important for multiSUMOylation in presence of PML. (A) Scheme and table of potential SUMO acceptor sites and SUMO-interacting motifs (SIM) of IE1 and the nomenclature of the generated mutants. (B) HEK293T cells were co-transfected with a ratio of 1:1:1 of pCMV2N3T-HA-SUMO-1: pcDNA4/TO-IE1B WT, mutants or control: no plasmid, expression vectors. Cells were collected and processed as in **Figure 1.2**. The sequence motif at position ⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷ and the lysine at position 802 are essential for SUMOylation of IE1. (C) HEK293T cells were co-transfected with a ratio of 1:1:1 of pCMV2N3T-HA-SUMO-1: pcDNA4/TO-IE1B WT, mutants or control: PML, expression vectors. Cells were collected and processed as in **Figure 1.2A**. The sequence motif at position ⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷ and the lysine at position 802 are essential for higher SUMOylation state of IE1. (D) Western blot of WT and K802R SUMOylation of IE1 in HEK293T overexpressing or not PML-I. Cells were collected and processed as in **Figure 1.2A**.

1.4.4 MultiSUMOylated IE1 contributes to nuclear bodies accumulation

Until now, it was unknown how IE1 manages to agglomerate into distinct foci within the nucleus. Thereupon, we next studied the phenotypes of IE1 mutants. **Figure 1.4A** shows that WT IE1 forms dot-like patterns (punctate) in the nucleus. However, when analyzing the phenotype of IE1:⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R, we observed two types of patterns. One pattern had small dot-like foci with a slightly diffuse signal. The other pattern was a diffuse IE1 nuclear distribution. Quantification of these patterns in U2OS cells indicates that IE1:⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R forms less IE1 foci compared to WT (**Figure 1.4B**). This indicates that SUMOylation of IE1 is important for IE1 oligomerization. We next wanted to look at the colocalization of WT IE1 and IE1:⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R with PML. Because the signal of IE1:⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R foci were less abundant and diffused, we could not determine the MCC. From a qualitative point of view, **Figure 1.4C** shows in 3D that the colocalization of IE1 mutant is similar to the WT, after deconvolution and subtracting the diffuse pattern. We next looked at the ability of IE1:⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R to form nuclear bodies (NB) with PML by comparing the volume of PML and IE1 foci (**Figure 1.4D**). Presence of WT IE1 resulted in greater PML foci volumes. In the presence of IE1:⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R the mean volume of the PML foci was comparable to that of the empty vector (EV) condition. Similarly, the mean volume of the IE1 foci was much larger for WT IE1 relative to the IE1:⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R mutant. Taken together, the presence of PML-NBs causes multiSUMOylation of IE1 which could be responsible for the formation of a protein network, resulting in larger NBs at PML-NBs (**Figure 1.4E**).

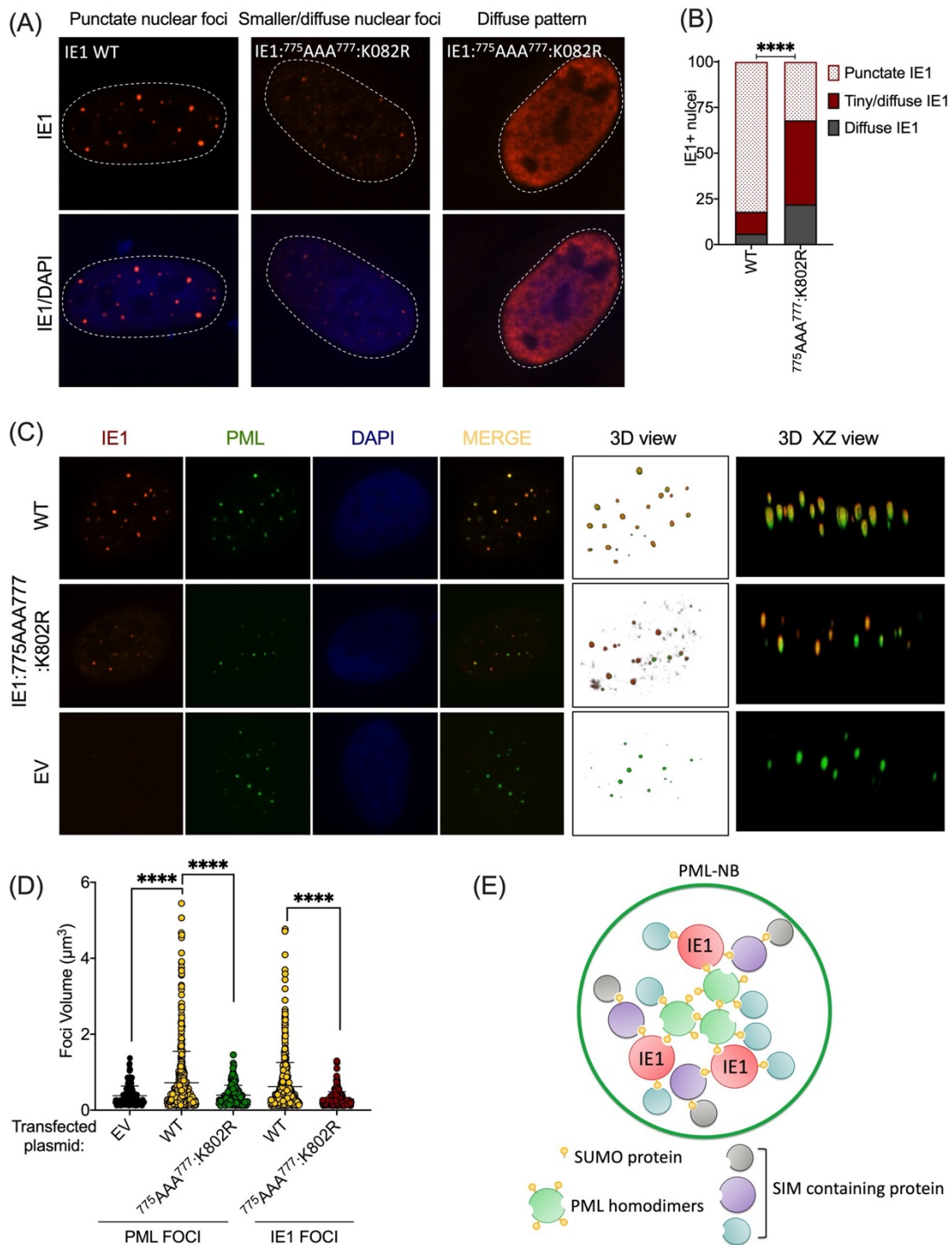


Figure 1.4 - MultiSUMOylated IE1 contributes to nuclear bodies accumulation. (A) Confocal microscopy showing IF images of patterns of IE1 in U2OS transfected with WT IE1 and $775AAA^{777}:K802R$ mutant. **(B)** Graph showing the quantification of pattern in U2OS between WT IE1 (n = 85) and $775AAA^{777}:K802R$ mutant (n=32). Total IE1⁺ nuclei were counted and divided in three categories: punctate, tiny dots/diffuse and totally diffuse patterns. Data were normalized on 100. ****P<0.0001, chi-square. **(C)** Deconvoluted IF of IE1 WT and $775AAA^{777}:K802R$ mutant, 48 hours post-transfection. **(D)** Graph representing the volume of each PML and IE1

foci per nucleus with EV (n=24) WT IE1 (n=45) and ⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷:K802R mutant (n=20) ****P<0.0001, chi-square. **(E)** Hypothesis of interacting network of IE1 following multiSUMOylation by PML. MultiSUMOylation of IE1 in PML-NBs allow the recruitment of SIM-containing interacting partners at the additional SUMOylated site of IE1, resulting in bigger nuclear bodies.

1.4.5 PML is required for efficient HHV-6B chromosomal integration

Considering that IE1 colocalizes with PML, is multiSUMOylated in the presence of PML-NBs and that a significant proportion of PML-NBs are present at telomeres (**Figure S1.4**), the site of HHV-6B integration, we wanted to study the role of PML in HHV-6B integration. We generated PML knockout (KO) U2OS cells using the CRISPR-Cas9 technology involving guide RNAs targeting a sequence in exon 1 of PML (**Figure S1.5**). Following transfection and selection of cells, the deletion of a part of exon 1 resulting in a pre-mature STOP codon was confirmed by sequencing (**Figure S1.5**).

U2OS PML^{+/+} and PML^{-/-} cell lines (**Figure 1.5A**) were infected with HHV-6B and integration frequencies were assessed four weeks post infection by droplet digital PCR, as described previously [33] (**Figure S1.6**). The percentage of integrated HHV-6B determined following ddPCR analysis indicated that the HHV-6B integration frequency was significantly reduced in both U2OS PML^{-/-} cell clones tested (**Table 1-1**). Next, we addressed whether the observed reduction in integration frequencies could be a consequence of increased lytic viral replication in PML^{-/-} cells, as it was recently described for lymphoblast cells infected with HHV-6A [31]. Results indicate that there is no difference in the number of HHV-6B genome copies between U2OS PML^{+/+} and PML^{-/-} cells 24h post infection (**Figure 1.5B**).

HeLa LT PML^{-/-} cells were also generated using the same procedure used for the U2OS cells. As additional control, PML expression was restored in HeLa LT PML^{-/-} clone #1 (**Figure 1.5C**). This was achieved by transducing the PML^{-/-} cells with the lentivirus PML-I. In the absence of PML, HHV-6B integration frequencies were lower in both clones tested compared to HeLa LT PML^{+/+} cells and recovered upon restoration of PML (**Table 1-2**). As with U2OS cells, there was no difference in the HHV-6B genome copy numbers between HeLa LT PML^{+/+} and PML^{-/-} cells 24h post infection, suggesting that the absence of PML does not enhance HHV-6B ability to replicate in semi-permissive U2OS and HeLa LT cells (**Figure 1.5D**). Collectively, our data demonstrate that PML is required for efficient HHV-6B integration in two distinct cell types.

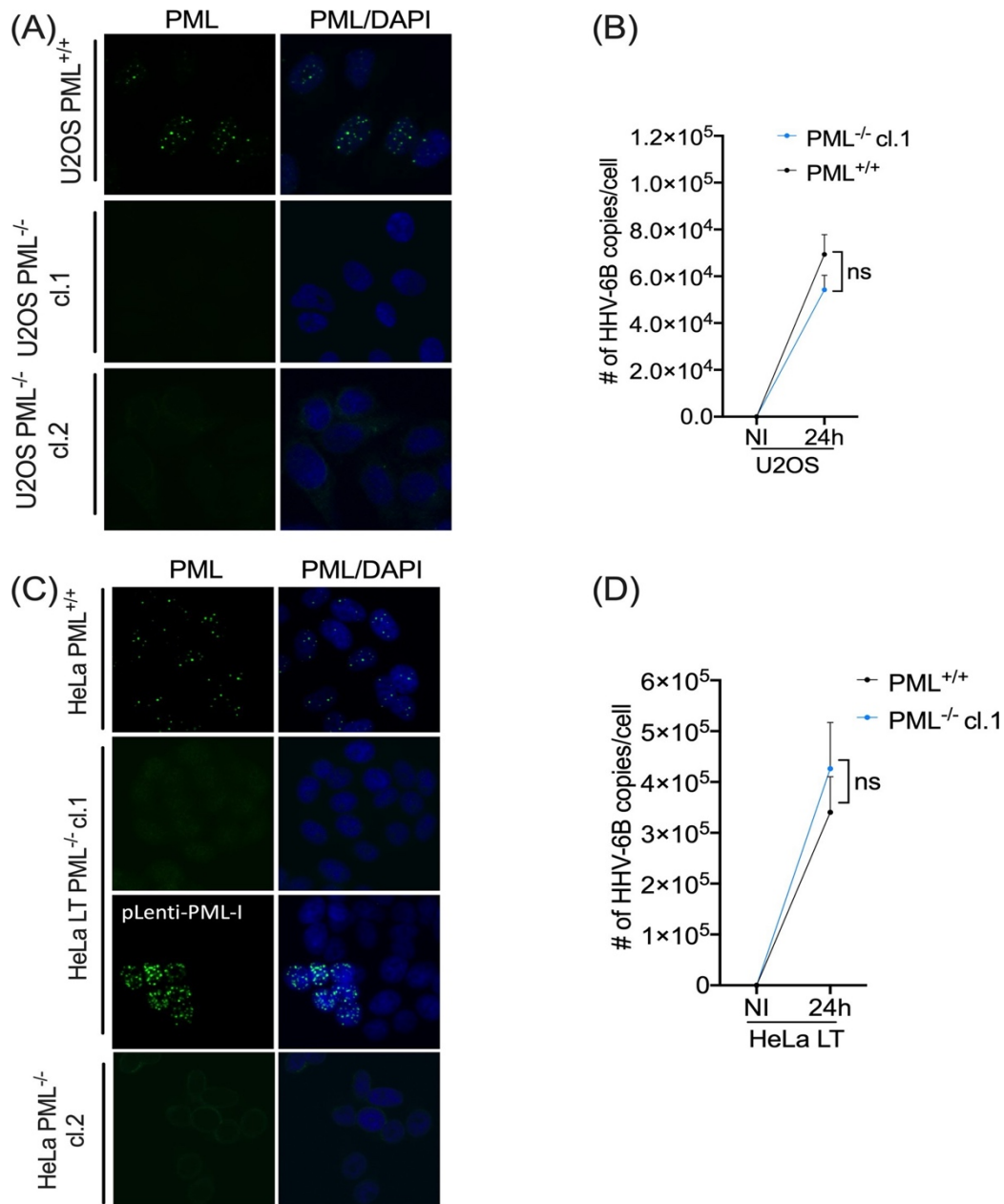


Figure 1.5 - Absence of PML affects HHV-6B integration efficiency. (A) IF images of PML expression in WT and PML^{-/-} U2OS cells. PML is shown in green. (B) PML^{+/+} and PML^{-/-} cells were infected at a MOI of 1 with HHV-6B and were collected at day 0 and 24 hours and cellular DNA was extracted. A qPCR was done to determine the number of copies of HHV-6B by using primers for *U65-66* gene for HHV-6B and *RPP30* as a cellular reference gene. Data presented are the mean of three independent experiments and were analyzed using the Mann-Whitney test. $P > 0.05$ (not significant). (C) IF images of PML expression in WT, PML^{-/-} and PML^{-/-} + PML-I HeLa LT cells. PML is shown in green. Restored expression of PML was done in HeLa PML^{-/-} clone 1. HeLa PML^{-/-} clone 1 cells were transduced with a lentivirus expressing PML-I (pLenti-PML-I). After hygromycin selection, HeLa LT PML^{+/+}, HeLa LT PML^{-/-}, HeLa LT PML^{-/-}-clone 1-PML restored were used for IF and for integration assay. (D) HeLa LT PML^{+/+}, PML^{-/-} and HeLa LT PML^{-/-}-clone 1-PML restored were infected at a MOI of 1 with HHV-6B. Cells were processed as in Figure 1.5B. $P > 0.05$ (not significant).

Table 1-1. Importance of PML for HHV-6B chromosomal integration in U2OS cells.

U2OS	% of cells with integrated HHV-6B * (n) **	p value
U2OS PML ^{+/+}	1.96±0.0570 (9450)	
U2OS PML ^{-/-} clone 1	0.86±0.2273 (33320)	<0.0001
U2OS PML ^{-/-} clone 2	0.90±0.08639 (33110)	<0.0001

* mean±SD of three independent cultures

** total number of analyzed cells

Table 1-2. Importance of PML for HHV-6B chromosomal integration in HeLa cells.

HeLa	% of cells integrated HHV-6B * (n) **	p value
HeLa PML ^{+/+}	2.66±0.8822 (32790)	
HeLa PML ^{-/-} clone 1	1.23±0.5894 (43030)	<0.0001
HeLa PML ^{-/-} clone 2	1.86±0.0796 (14480)	<0.0001
HeLa PML ^{-/-} clone 1 +PML restored	2.63±0.5729 (30516)	ns

* mean±SD of three independent cultures

** total number of analyzed cells

1.4.6 IE1 colocalizes at telomeres during HHV-6B infection

It is known that most PML-NBs can be found at telomeres of Alternative Lengthening of Telomeres+ (ALT+) cell lines such as U2OS cells [30,39]. This PML-NBs/telomere complex is called APBs (ALT-PML-Nuclear Bodies) and is a hallmark of ALT+ cell lines in which significant DNA repair occurs to allow telomere elongation through homologous recombination events [49,50]. Considering that PML is being often found at telomeres, that telomeres are the preferred sites of HHV-6B integration, and that PML deficient cells integrated HHV-6B less frequently, we were interested in knowing whether IE1 would localize at telomeres during infection in a cell line used to study integration. To answer this question, U2OS cells were infected with HHV-6B for 48 hours and analyzed for IE1 expression and localization by confocal microscopy. IE1 was detected as distinct nuclear foci during infection (**Figure 1.6A**) with a proportion of IE1 colocalizing with telomeres (yellow square). Following the deconvolution of each acquisition for each channel, 3D quantification of z stacks revealed that 31.3%±19.7 of IE1 foci colocalized with telomeres (**Figure 1.6B**). See also **Figure S1.2** for IF-FISH example of colocalization in the z stack. Additionally, IE1 colocalized with PML at telomeres of ALT cells such as HeLa LT cells (telomerase+) (**Figure S1.7**). We made use of HeLa LT cells (HeLa cells with long telomeres) to be able to visualize and quantify the colocalization events. This indicates that the associations of IE1/PML at telomeres

occurs in both ALT+ (U2OS) and telomerase expressing cells (HeLa) cells used for *in vitro* HHV-6B integration assays.

1.4.7 Localization at telomeres is influenced by the presence of PML

Considering that the presence of PML influences the level of HHV-6B integration and that IE1 colocalizes at telomeres, we asked whether the colocalization of IE1 at telomeres would be affected by the absence of PML in U2OS cells. Following transfection of IE1 expression vector in U2OS PML^{+/+} and PML^{-/-} cells, deconvoluted IF acquisitions showed that IE1 localization at telomeres was reduced in the absence of PML (**Figure 1.6C-6D**). The mean MCC of IE1 at telomeres was reduced from 0.36 to 0.12 (**Figure 1.6D**) (****p<0.0001). We also quantified whether the number of IE1 nuclear foci differed between the cell lines as a possible explanation for the observed lower frequency of IE1 at telomeres in U2OS PML^{-/-}. Results in **Figure 1.6E** show that there are no significant changes in the number of IE1 foci between PML^{+/+} and PML^{-/-} cells. Altogether, this indicates that IE1 localizes at a lower frequency at telomeres in the absence of PML, correlating with the results of the HHV-6B integration assay.

SUMOylation of IE1 was also studied in cells used for HHV-6B integration. U2OS PML^{+/+} and PML^{-/-} cells were co-transfected with pCMV2N3T-HA-SUMO-1 and pcDNA4-MYC-IE1B. Immunoprecipitation of IE1 showed that multiSUMOylation of IE1, characterized by a second and higher molecular weight band, was only present in U2OS PML^{+/+} (**Figure 1.6F**). Altogether, the presence of PML-NBs positively influences the multiSUMOylation of IE1 and its presence at telomeres.

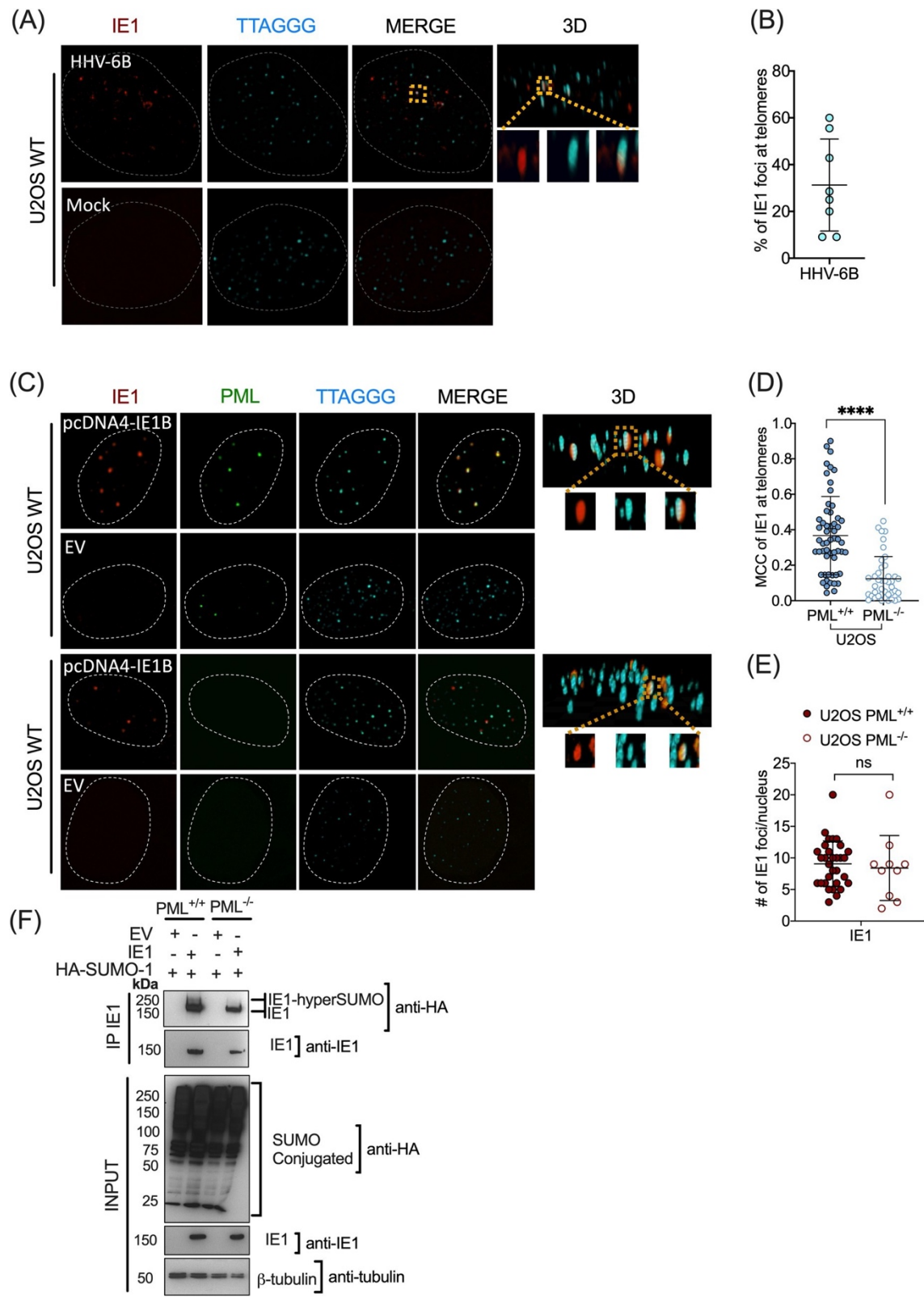


Figure 1.6 - Localization of IE1 at telomeres is influenced by the presence of PML. (A) Deconvoluted confocal microscopy images representative of IE1/telomere staining of U2OS cells infected with HHV-6B for 48

hours. Telomeres were detected using a Cy5-labeled telomeric probe (aqua). Yellow squares represent IE1 colocalizing with telomeres in 3D. **(B)** Graph showing the percentage \pm sd of IE1 (n=8) foci colocalizing at telomeres throughout the z stacks, in HHV-6B infected U2OS cells. **(C)** Confocal microscopy images of U2OS PML^{+/+} and PML^{-/-} cells transfected with pcDNA4/TO-IE1B or empty vector (EV). Yellow squares represent IE1 colocalizing with telomeres. **(D)** Graph showing the proportion (mean \pm sd) of IE1 foci localizing at telomeres throughout the z stacks, in U2OS PML^{+/+} (n=46) and PML^{-/-} (n=42) cells. Each dot represents one IE1⁺ nucleus. Data were transformed to log values and the normal distributions analyzed using an unpaired t test with Welch's correction to compare frequency of IE1 at telomeres. ****P<0.0001. **(E)** Graph showing the number of IE1 foci in PML^{+/+} and PML^{-/-} cell lines. P=ns, unpaired t test. **(F)** U2OS PML^{+/+} and PML^{-/-} cells were co-transfected at a ratio of 1:1:1 with pCMV2N3T-HA-SUMO-1: pcDNA4/TO or pcDNA4/TO-MYC-IE1B plasmids. After 48h cells were collected processed as in **Figure 1.2A**.

1.5 Discussion

In the current study we showed that: 1) IE1 colocalizes with all six PML nuclear isoforms, independently of other viral factors; 2) in the presence of PML, IE1 is multiSUMOylated; 3) the formation of PML-NBs is required for IE1 multiSUMOylation; 4) the IE1^{775VIV777} putative SIM site is required for efficient IE1 SUMOylation and multiSUMOylation; 5) IE1 association with PML nuclear bodies is dependent on the ^{775VIV777} site and K802; 6) PML is required for optimal HHV-6B integration in the telomeres of host chromosomes and 7) IE1 localization at telomeres is partly dependent on the presence of PML.

One major interest in the field is to identify proteins that participate in the HHV-6B chromosomal integration. One hypothesis initially raised was that HHV-6B chromosomal integration would require telomerase, the enzyme responsible for telomere elongation [51]. However, telomerase proved not essential as we have shown that HHV-6B integration occurs in both telomerase negative and positive cells [33,34]. Cellular telomeres are protected by a protein complex called shelterin, whose main function is to protect chromosome ends from being recognized as damaged DNA by DNA repair proteins. In recent work, we have demonstrated that TRF2 binds to HHV-6A/B telomeric repeats and that reducing the levels of TRF2, lower the rates of HHV-6A/B integration [20]. We have argued that TRF2 may serve to protect the viral DNA ends from DDR and maintain the viral genome integrity. Proteins other than shelterin are localized at telomeres. In telomerase negative cells such as U2OS cells, telomeres are mainly elongated by the presence of APBs [39,52,53]. These nuclear bodies are primarily formed by the PML protein itself that recruits hundreds of interacting partners at telomeres such as helicases implicated in G-quadruplex structure resolution like the Bloom syndrome protein (BLM), the Werner Syndrome Protein (WRN) and other proteins implicated in DNA recombination and repair [30,39,54–56]. Osterwalds et al. [39] have shown that in ALT⁺ cells such as U2OS, PML-NBs (APBs) are frequently present at telomeres. We have confirmed this result (**Figure S1.4**). We also noticed that a proportion of PML-NBs localized

to telomeres of telomerase expressing cells such as HeLa LT cell (**Figure S1.4**), in agreement with Marchesini et al [30]. These findings support the role for PML in the DNA repair mechanisms [30,49,57].

The HHV-6B genome is about 160 kilobase pairs (kbp) in length and contains a unique region (U) with close to 100 open reading frames [58–60]. This U region is flanked by identical direct repeat regions (DR_L and DR_R) of 8–9 kbp that contain telomere arrays identical to human telomeres at both ends [59,61]. Because of the existing homology between HHV-6B terminal sequences and telomeres, integration could be the result of homologous recombination events. The observation that a mutant of HHV-6A lacking telomeric repeats integrates much less efficiently supports this hypothesis [62]. Telomeres are protected by the shelterin complex to prevent DNA damage recognition at telomeres and repair. One shelterin protein in particular, TRF2, blocks DNA damage sensor and repair proteins such as the Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) at telomeres, a pathway that senses double-stranded DNA breaks [63–65]. Interestingly, when PML-NBs are present at telomeres, TRF2 is SUMOylated by MMS21, resulting in a lower density of TRF2 on telomeres, arguing that such site may be more prone to recombination events [66].

Here we reported that the IE1 protein is mainly found in association with PML. Among other purposes, PML-NBs serve as a hub for SUMO modifications. Briefly, the SUMOylation steps involve the activation of a mature SUMO protein by the activating enzyme E1(SAE1/2) in an ATP-dependent manner. Once SUMO is activated (terminal di-glycine motif) it is transferred to a E2 conjugating enzyme (Ubc9). SUMO can then be transferred to an acceptor lysine present within a SUMO consensus acceptor site (Ψ KXE/D) on a target protein. This transfer results in an isopeptide bond of the terminal glycine on SUMO. The transfer of a mature SUMO protein to a target protein can be aided by an E3 SUMO ligase that can directly bind the E2 enzyme or the targeted protein (**Figure 1.2B**) [67]. Considering that PML-NBs are a hub for SUMO modifications and that IE1 protein of HHV-6B can be SUMOylated [21,22] it was conceivable to us that the presence of PML might affect IE1 SUMOylation status. We demonstrated that not only the presence of PML-NBs enhances IE1 SUMOylation but also causes multiSUMOylation of IE1 (**Figure 1.2**). It is tempting to speculate that PML might act as a SUMO ligase for HHV-6B IE1, as was initially reported for the CMV IE1 protein [42]. However, recent results challenge these findings and rather propose that CMV IE1 SUMOylation occurs at the nucleosomes possibly via the PIAS1 E3 SUMO ligase [68]. Analysis of HHV-6B IE1 primary sequence revealed no homology with the CMV IE1 chromatin tethering domain [69]. Whether HHV-6B IE1 associates with nucleosomes remains to be examined experimentally with more work needed before concluding on the SUMO ligase role of PML responsible for IE1 multiSUMOylation.

Previous results prompted us to determine whether IE1 possesses SIM sites that could allow IE1 to interact with SUMOylated proteins (other than PML) at telomeres. Studies done with Varicella-Zoster Virus ORF16 protein

have shown that ORF16 SIM site is important for its role on disrupting PML-NBs [47]. Additionally, although Ubc9 can bind SUMO directly at a SIM site, the interaction is weak [70]. This can be strengthened with the help of E3 SUMO ligase [70]. Accordingly, we have demonstrated that the ⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷ putative SIM site is essential for complete SUMOylation of IE1 and for its multiSUMOylation in presence of PML-NBs (**Figure 1.3**). The double ⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷:K802R mutant lost its ability to be SUMOylated indicating that both the VIV and K802 are important for IE1 SUMOylation. Our results also indicate that K802R could still be SUMOylated, although not multiSUMOylated (**Figure 1.3D**). Because PML can bind Ubc9 (E2 enzyme) [71], we propose that SUMOylated PML interacts with the putative IE1 SIM site bringing along a SUMO-1 charged E2 that adds one more SUMO-1 on IE1 to a yet to be identified acceptor residue. Our work also demonstrated the importance SUMOylation of IE1 for its nuclear distribution as the ⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷:K802R mutant fails to properly form punctate foci (**Figure 1.4A and 4B**). Moreover, SUMOylation sites of IE1 are important for the association of IE1 with PML (**Figure 1.4**). Our results suggest that the multiSUMOylated state of IE1 enables the formation of bigger NBs which influences the interactome network of IE1 with a variety of other SUMOylated or SIM containing proteins (**Figure 1.4E**).

To further understand the role of PML in HHV-6B biology, we tested whether PML played a role in HHV-6B chromosomal integration. To do so, we used PML KO cell lines (**Figure 1.5**). For each cell line used, two independent PML KO clones were tested to ensure reproducibility and avoid potential CRISPR-mediated off-target effects. In U2OS cells (**Table 1-1**), HHV-6B integration was less frequent in PML^{-/-} cells (p<0.0001). In HeLa LT cells (**Table 1-2**), the same effect was observed and was rescued when PML was restored. Globally, both cell lines studied suggest a role for PML in HHV-6B integration. However, since integration still occurred in PML KO cells, this indicates that the contribution of PML although facilitating, is not absolutely required for this process. We would surmise that when PML-NBs are present at telomeres, SUMOylation of TRF2 is enhanced, predisposing telomeres to recombination events between the viral telomeric repeats and cellular telomeres. To dismiss the fact that less integration in PML KO cells might result from the skewing of infection toward a lytic cycle, we measured the HHV-6B DNA copy numbers in PML KO relative to WT cells. Results showed that both WT and PML KO U2OS and HeLa LT cells have similar viral DNA copy numbers suggesting that PML does not modify the course of HHV-6B infection in semi-permissive U2OS and HeLa LT cells (**Figure 1.5B and 5D**).

Considering the importance of PML on HHV-6B integration, we hypothesized that localization of IE1 at telomeres might be PML dependent. In PML^{-/-} cells, a significant but not total reduction of IE1 at telomeres was observed (**Figure 1.6D**). The residual association of IE1 with telomeres can be explained by SUMOylated IE1 interacting with SIM containing proteins present at telomeres. Alternatively, IE1 might reach telomeres through interactions between its putative SIM site and SUMOylated proteins implicated in DNA repair that are found at telomeres, such as the BLM, RAD52 or RPA proteins [72–77]. Our study is not without limitations. As it was the case in a study from another group, we were not able to make or maintain stable clones expressing PML-I [78]. Since viral

integration occurs promptly following infection in semi-permissive cells, we had to resort to transient PML-I expressing cells. However, because the expression of PML-I was lost in time, we could not do IF-FISH analysis to compare if the integrated genome was in fact in the U2OS PML+ restored cells. One way to improve, although quite challenging, would be to use recombinant viruses mutant for SUMOylation and use them in the same cell lines to assess the importance of SUMOylation of IE1 by PML for HHV-6B integration. Lastly, although our results suggest that ⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷ represents a functional SIM site, experiments designed to functionally prove this were not performed. In conclusion, we have demonstrated that HHV-6B IE1 protein is SUMO-modified at PML-NBs and colocalizes with PML and host telomeres. Abrogation of PML expression abolished multiSUMOylation of IE1, reduced its localization at telomeres and severely impaired HHV-6B integration into host chromosomes. To our knowledge, this is the first report describing a role of a non-shelterin cellular protein involved in HHV-6B integration.

1.6 Acknowledgements

We thank Julie-Christine Lévesque for technical help with the confocal microscopy analyses and thank the Bioimaging platform of the Infectious Disease Research Centre.

1.7 Author Contributions

Conceptualization: Vanessa Collin, Annie Gravel, Louis Flamand.

Data curation: Vanessa Collin.

Formal analysis: Vanessa Collin, Louis Flamand.

Funding acquisition: Louis Flamand.

Methodology: Vanessa Collin, Annie Gravel, Louis Flamand.

Resources: Benedikt B. Kaufer.

Supervision: Louis Flamand.

Writing – original draft: Vanessa Collin, Louis Flamand.

Writing – review & editing: Vanessa Collin, Annie Gravel, Benedikt B. Kaufer, Louis Flamand.

1.8 Material and methods

Cell lines and virus MOLT-3 (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Corning Cellgro, Manassas, VA, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), HEPES, sodium pyruvate (Wisent Inc., St-Bruno, Québec, Canada), and

5 µg/ml plasmocin (Invivogen, San Diego, CA, USA). HeLa LT (39) and HEK293T (ATCC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Corning Cellgro, Manassas, VA, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific), nonessential amino acids (NEM) (Corning Cellgro), HEPES, sodium pyruvate (Wisent Inc.), and 5 µg/ml plasmocin (Invivogen). U2OS (osteosarcoma) cells (ATCC) and U2OS-Flp-In TREX (kind gift from Dr. Jakob Nilsson, University of Copenhagen) were cultured in the same medium but supplemented with 10% of Nu Serum (Corning Cellgro) instead of FBS and U2OS-Flp-In TREX were maintained with 5 µg/ml of blasticidin (Invivogen). HHV-6B strain Z29 [79] was produced by our laboratory, as previously described [21].

Plasmids Expression vectors for HHV-6B IE1 (pcDNA4/TO-IE1B) and control vector (pcDNA4/TO) were described previously (40). Expression vector for HHV-6A IE2 (pcDNA4-IE2) was described previously [80]. Plasmids expressing pCS3-MT-MYC-PML isoforms were kindly provided by primers, respectively. The PCR amplicon was recombined into pDONR221 vector followed by a second recombination into pDEST-CMV Hygro vector (RRID:Addgene_17454), a kind gift from Eric Campeau and Paul Kaufman [82]. Mutation of the RING domain of PML-I in pLenti-CMV-Hygro-PML-I was generated with Q5 site-directed mutagenesis kit by changing the leucine at position 73 for a glutamate (pLenti-CMV-Hygro-PML-I:L73E). Mutation of SUMO site at K802 of IE1 was previously described [21]. SUMO Interacting Motif (SIM) sites of IE1 ⁵⁷³VVV⁵⁷⁵ and ⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷ were generated in pcDNA4/TO-IE1B and in pcDNA4/TO-IE1: K802R, using Q5 site-directed mutagenesis kit (New England Biolabs, Whitby, Ontario, Canada) by changing the amino acids VVV or VIV for three alanines (⁵⁷³AAA⁵⁷⁵ and ⁷⁷⁵AAA⁷⁷⁷). The PML Double Nickase Plasmids (h2) (sc-400145-NIC-2) were bought from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) (**Figure S1.5**). Expression vector pcDNA4-MYC-IE1B was previously described [83].

MOLT-3 infection assay 5×10^6 cells were infected or not (NI), at a MOI of 0.1 with HHV-6B-Z29 for 5 hours in a 15 ml tube at 37°C, 5% CO₂. Cells were pellet and washed three times with PBS 1X. The pellets were resuspended in 5 ml of fresh complete RPMI media and incubated in a 25 cm² flask for 24h and 72h. Upon collection day, 1 ml was taken from each flask, cells were pellet and washed 3 times in phosphate-buffered saline (PBS) 1X. Cells were then counted and put at a final concentration of 10×10^6 cells/ml. 10 µl was added to a microscope slide with reaction wells. Once dried, cells were fixed for 10 minutes at -20°C in 100% acetone. Dried slides were then kept at -20°C until immunofluorescence staining.

Transfection assays U2OS cells were seeded at 2×10^5 cells/well in a 6-well plate containing five glass coverslips in 2 ml of medium. Cells were transfected 24 hours post-seeding with 2.5 µg of pcDNA4/TO or pcDNA4/TO-IE1B expression vector using the *TransIT*-LT1 Transfection Reagent (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA). After 48 hours of transfection, cells were washed 3 times with PBS, fixed in 2% paraformaldehyde/PBS

for 10 minutes at room temperature, washed 10 minutes with PBS and processed for immunofluorescence assay. HeLa LT cells were seeded at 1×10^5 cells/well in a 6-well plate containing five glass coverslips in 2 ml of medium. Cells were transfected 24 hours post-seeding with 4 μg of pcDNA4/TO, or pcDNA4/TO-IE1B expression vector using Lipofectamine 2000 (Thermo Fischer Scientific). After 48 hours of transfection, cells were fixed as described above and used for immunofluorescence.

Immunofluorescence (IF) Fixed cells on coverslips were incubated for 30 minutes in blocking solution (1 mg/ml BSA; 3% goat serum; 0.1% Triton X-100; 1 mM EDTA pH 8.0, in PBS). After blocking, coverslips were incubated for 1 hour in primary antibody diluted in blocking solution. Coverslips were washed with PBS, three times for five minutes and were incubated for 30 minutes with secondary antibody diluted in blocking solution. Next, coverslips were washed three times for 5 minutes in PBS. Coverslips were air dried at room temperature, kept in dark and mounted with *SlowFade* Gold Antifade reagent containing DAPI (Invitrogen, Eugene, Oregon USA).

Foci volume quantification Image stacks were open in Fiji from ImageJ (Fiji, RRID:SCR_002285). Each nucleus was selected with a region of interest (ROI). Next, stack for each channel of the ROI were duplicated and background in the nucleus was subtracted. For each nucleus, the ROI area was measured. Foci volume for each nucleus was quantified with the 3D object counter plugin. To scale up the foci volume to the nucleus size, the area of a nucleus with an empty was used to normalize each foci of every nucleus according to their respective nucleus area.

Foci number counts Data generated from foci volume quantification were used to quantify the number of foci per nucleus. For each nucleus, different foci volume data were generated, representing the number of foci within that nucleus.

Colocalization quantification Images were first analyzed manually with PerkinElmer Volocity 5.4 software. Each antibody was tested with every laser channel to be sure that the signal was antibody specific (**Figure S1.2**). Colocalization was manually quantified by counting the number of IE1B foci colocalizing with PML, in a 3D (X, Y, Z) manner by going through the z stack of the images for all foci (**Figure S1.2B**). Manually counted colocalization was then confirmed with ImageJ software JACoP. Image stacks were open in Fiji. Each nucleus was selected with a ROI and background was deleted throughout the stack of every channels. Next, stack for each channel of the ROI were duplicated and background in the nucleus was corrected to avoid false colocalization. A Costes auto threshold was applied to avoid manual subjectivity. Colocalization was quantified into Mander's colocalization coefficient (MCC). Data of MCC can be interpreted as the proportion of the dye A that colocalize with dye B and vice versa. Indicated values are between 0 and 1 where 1 stands for perfect colocalization.

BioID stable cell lines pDEST-cDNA5-BirA-FLAG-N-term and pcDNA5-BirA-FLAG-GFP were kindly provided by Dr. Anne-Claude Gingras (University of Toronto) [84,85]. To be able to generate a stable cell line expressing BirA-IE1 of HHV-6B, the IE1 gene was PCR amplified with *attB1* and *attB2* sites added to the forward and reverse primers, respectively. The PCR amplicon was recombined into pDonor221 vector followed by a second recombination into the pDEST-pcDNA5-BirA-FLAG-N-term now called pcDNA-BirA-FLAG-IE1B. Stable cell lines were generated by seeding U2OS-Flp-In-TREX cells (2×10^5 cells/ well of a 6-well plate). The next day, 277 ng of pcDNA5-BirA-FLAG-GFP or pcDNA-BirA-FLAG-IE1B together with 2.22 μg of the Flp-recombinase pOG44 from Invitrogen (V6005-20) (ratio 1:9, respectively) were co-transfected using the *TransIT*-LT1 Transfection Reagent. 24 hours post transfection, cells were washed, and fresh medium was added. 48h post-transfection, cells were split at 25% confluence, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of hygromycin and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of blasticidin were added. Once selected, cells were then expanded for BioID assay as described by Roux and *al* (80). Briefly, cells were seeded in 10–15 cm dishes as well as seeded on coverslips for IF. Upon 80% confluency, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of doxycycline and 50nM of biotine were added for 24 hours. For IF, cells were fixed with paraformaldehyde 2% and labelled for BirA-GFP and BirA-IE1B expression (Flag) and biotinylated proteins (Streptavidin-HRP-594). For Mass Spectrometry, cells were harvested, lysed and sonicated with buffer as described (80). Biotinylated proteins were immunoprecipitated with streptavidin magnetic beads and resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate. Samples were then analyzed by the mass spectrometry platform. Using the scaffold 4 program, IE1 specific interactors were analyzed by doing a quantitative analysis from a Fisher's Exact Test.

Co-immunoprecipitation (Co-IP) HEK293T cells were seeded at a density of 500 000 cells/well in a 6-well plate with 2 ml of medium. 24 hours post-seeding, cells were co-transfected with 2 or 3 μg of total DNA depending on the condition, with a ratio of 3:1 of polyethylenimine at 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (PEI):DNA, in a total volume of 200 μl of DMEM without any serum and antibiotics. Transfection reactions were incubated for 15 minutes at room temperature and added drop-wise in the respective wells. 48 hours post-transfection, cells were harvested. Pellets were resuspended in 500 μl of RIPA lysis buffer (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40) containing 1X Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 10 mM of N-Ethylmaleimide (NEM), and were lysed at 4°C for 30 minutes under rotation. Lysates were centrifuged for 10 minutes at 12 000 x g, at 4°C. Supernatants were collected in a new tube. 10% (50 μl) of each sample was kept for the input analysis by lysis in 10 μl of 5X loading buffer (0.5 M Tris-HCl pH6.8, 500 mM dithiothreitol, 350 mM SDS, 7.5 mM bromophenol blue, 50% glycerin) and conserved at -20°C until western blot analysis. The rest of the lysate was used for immunoprecipitation. 2 μg of polyclonal rabbit antibody IE1 was added in each sample and they were incubated for 2 hours at 4°C under rotation. After 2 hours, protein A/G agarose beads (1:1) were added to each sample and incubated overnight at 4°C under rotation. Samples were washed three times in RIPA lysis buffer, resuspended in 100 μl of 2X loading

buffer (0.5 M Tris-HCl pH6.8, 15% β -mercaptoethanol, 1.2% SDS, 0.5% bromophenol blue, 30% glycerol) and boiled for 5 minutes at 95°C, as well as input samples, for western blot analysis (**Figure S1.3**).

Generation of PML Knockout (KO) cell line U2OS and HeLa LT cells were transfected with CRISPR-Cas9 and guide RNA expressing vector targeting PML (**Figure S1.5**). After 48 hours, cells were selected with 1 μ g/ml of puromycin. Selected cells were harvested, counted and seeded at a density of 1 cell per well in three 96-well flat-bottom plates. After 10 to 14 days, wells containing only a single clone were identified (**Figure S1.5**). Clones were propagated for an additional 3 weeks and transferred into wells of a 12-well plate. Clones were screened by PCR, sequenced and analyzed by IF for PML expression. PML negative clones were expanded and kept frozen until used.

HHV-6B integration assays Integration assays were performed as described previously (43) (**Figure S1.6**). Briefly, ten thousand cells per well (U2OS PML WT, U2OS PML^{-/-} #1, U2OS PML^{-/-} #2, HeLa LT PML WT, HeLa LT PML^{-/-} #1, HeLa LT PML^{-/-} #2 and PML restored) were seeded in 48-well plates. The next day, cells were infected with HHV-6B-Z29 at a multiplicity of infection (MOI) of 1 followed by overnight incubation at 37°C. Cells were washed three times with 1X PBS to remove unabsorbed virions prior to the addition of fresh culture medium. Upon infection, cells were passaged for 4 weeks and DNA was isolated using the QIAamp DNA Blood Mini Kit as described by the manufacturer (Qiagen Inc., Toronto, ON, Canada). The integration frequencies were determined by ddPCR as described (Gravel et al 2017). The HHV-6B chromosomal integration frequencies were estimated assuming a single integrated HHV-6/cell and calculated with the following formula: (number of HHV-6 copies)/(number of RPP30 copies/2 copies per cell) \times 100, as previously described [33]. This assay was previously extensively validated and provide comparable data to single-cell cloning and quantification [33]. A chi-square statistical test was done to compare total copy numbers between each condition as described below.

qPCR qPCR was performed as described previously by Gravel et al. (43). Briefly, DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Mini Kit as described by the manufacturer (Qiagen Inc.) and analyzed using primers and probes against *U65-66* (HHV-6B) and *RPP30* (reference gene). Data were normalized against the corresponding genome copies of the cellular *RPP30* gene.

U2OS infection assay U2OS cells were seeded at 2×10^5 cells/well in a 6-well plate containing five glass coverslips in 2 ml of medium. Cells were infected 24 hours post-seeding at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 with HHV-6B-Z29. At 48 hours post-infection, cells were washed 3 times with PBS and fixed in 2% paraformaldehyde/PBS as described above and used for immunofluorescence assay.

Immunofluorescence conjugated to *in situ* hybridization (IF-FISH) Fixed cells on coverslips were stained as for IF. Once IF was completed, cells were fixed for 2 minutes at room temperature with 1%

paraformaldehyde/PBS. Coverslips were washed two times for five minutes with PBS. Cells were dehydrated for 5 minutes in successive ethanol baths (70%, 95%, 100%). Once dried, coverslips were placed upside down on a drop of hybridizing solution (70% formamide; 0.5% blocking reagent; 10 mM Tris-HCl pH 7.2; 1/1000 Cy3 or Cy5-TelC PNA probe). Sample were denatured for 10 minutes at 80°C on a heated block. Coverslips were incubated over night at 4°C and kept in the dark. After hybridization, coverslips were washed two times for 15 minutes in washing solution (70% formamide; 10 mM Tris-HCl pH 7.2) and then washed 3 times for 5 minutes with PBS. Samples were air dried, mounting media was added and coverslips were sealed.

Statistical analysis Unpaired t-test was used to compare the foci levels, foci counts, MCC and viral DNA copies. For integration analysis, to total number of cells with integrated HHV-6B were compared to the total number of cells, analyzed using a Fisher's exact test. For the comparison of the patterns of IE1, a Chi-square test was done by comparing the total IE1+ nuclei with non-IE1+ nuclei.

1.9 References

1. Yamanishi K, Shiraki K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Asano Y, et al. Identification of Human Herpesvirus-6 as a Causal Agent for Exhantem Subitum. *Lancet*. 1988; 331(8594):1065–7.
2. Miura H, Kawamura Y, Hattori F, Tanaka M, Kudo K, Ihira M, et al. Late-phase human herpesvirus 6B reactivation in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2018;(May): e12916.
3. Miura H, Kawamura Y, Kudo K, Ihira M, Ohye T, Kurahashi H, et al. Virological analysis of inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in three hematopoietic stem cell transplant patients. *Transpl Infect Dis*. 2015; 17(5):728–31. PMID: 26176562
4. Quintela A, Escuret V, Roux S, Bonnafous P, Gilis L, Barraco F, et al. HHV-6 infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: From chromosomal integration to viral co-infections and T-cell reconstitution patterns. *J Infect*. 2016; 72(2):214–22. PMID: 26518057
5. Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* (80-)
6. Marechal V, Dehee A, Chikhi-Brachet R, Piolot T, Coppey-Moisan M, Nicolas JC. Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol*. 1999; 73(5):4385–92. PMID:10196336
7. Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood*. 1999; 94:1545–9. PMID: 10477678
8. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, et al. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol*
9. Potenza L, Barozzi P, Masetti M, Pecorari M, Bresciani P, Gautheret-Dejean a, et al. Prevalence of human herpesvirus-6 chromosomal integration (CIHHV-6) in Italian solid organ and allogeneic stem cell transplant patients. *Am J Transplant*. 2009; 9(7):1690–7. PMID: 19519818
10. Strenger V, Caselli E, Lautenschlager I, Schwinger W, Aberle SW, Loginov R, et al. Detection of HHV-6-specific mRNA and antigens in PBMCs of individuals with chromosomally integrated HHV-6 (ciHHV-6). *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(10):1027–32. PMID: 24698304
11. Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J, Hadley SH, Luegmayr A, Ablashi D, et al. The latent human

- herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(12):5563–8. PMID: 20212114
12. Saviola AJ, Zimmermann C, Mariani MP, Signorelli SA, Gerrard DL, Boyd JR, et al. Chromatin profiles of chromosomally integrated human herpesvirus. *Front Microbiol*. 2019; 10(JUN).
 13. Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol Preval Chromosom Integr Hum herpesvirus 6 genomes blood UK blood donors*. 2004; 73(3):465–73.
 14. Gravel A, Dubuc I, Morissette G, Sedlak RH, Jerome KR, Flamand L. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 as a predisposing risk factor for the development of angina pectoris. *Proc Natl Acad Sci*. 2015; 112(26):8058–63. PMID: 26080419
 15. Gaccioli F, Lager S, de Goffau MC, Sovio U, Dopierala J, Gong S, et al. Fetal inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 predisposes the mother to pre-eclampsia. *Nat Microbiol*. 2020;
 16. Kaufer BB, Jarosinski KW, Osterrieder N. Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *J Exp Med [Internet]*. 2011; 208 (3):605–15. PMID: 21383055
 17. Zhang E, Bell AJ, Wilkie GS, Sua' rez NM, Batini C, Veal CD, et al. Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 Genomes Are Ancient, Intact, and Potentially Able To Reactivate from Telomeres. *J Virol*. 2017; 91(22):1–19.
 18. Politikos I, Mcmasters M, Bryke C, Avigan D, Boussiotis VA. Possible reactivation of chromosomally integrated human herpesvirus 6 after treatment with histone deacetylase inhibitor. 2018; 2(12):1367–70. PMID: 29898877
 19. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Suzuki K, Matsubara T, Shimizu N, et al. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated human herpesvirus 6A in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2014; 59(4):545–8. PMID: 24803376
 20. Gilbert-Girard S, Gravel A, Collin V, Wight DJ, Kaufer BB, Lazzarini-Denchi E, et al. Role for the shelterin protein TRF2 in human herpesvirus 6A/B chromosomal integration. *PLOS Pathog*. 2020;16(4):e1008496 PMID: 32320442
 21. Gravel A, Gosselin J, Flamand L. Human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *JBiol Chem*. 2002; 277(22):19679–87. PMID: 11901159
 22. Gravel A, Dion V, Cloutier N, Gosselin J, Flamand L. Characterization of human herpesvirus 6 variant B immediate-early 1 protein modifications by small ubiquitin-related modifiers. *J Gen Virol*. 2004; 85 (5):1319–28.
 23. Stanton R, Fox JD, Caswell R, Sherratt E, Wilkinson GW. Analysis of the human herpesvirus-6 immediate-early 1 protein. *J Gen Virol*. 2002; 83(Pt 11):2811–20. PMID: 12388818
 24. Chen D, Feng C, Tian X, Zheng N, Wu Z. PML restricts enterovirus 71 replication by inhibiting autophagy. *Front Immunol*. 2018; 9(June):1268.
 25. Scherer M, Stamminger T. Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. 2016;90(13):5850–4.
 26. Xu P, Roizman B. The SP100 component of ND10 enhances accumulation of PML and suppresses replication and the assembly of HSV replication compartments. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;201703395.
 27. Xu P, Mallon S, Roizman B. PML plays both inimical and beneficial roles in HSV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci*. 2016; 113(21):E3022–8. PMID: 27162364
 28. Wang S, Long J, Zheng C fu. The potential link between PML NBs and ICP0 in regulating lytic and latent infection of HSV-1. *Protein Cell*. 2012; 3(5):372–82. PMID:22544561
 29. Ishov AM, Stenberg RM, Maul GG. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: Definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol*. 1997; 138(1):5–16. PMID: 9214377

30. Marchesini M, Matocci R, Tasselli L, Cambiaghi V, Orleth A, Furia L, et al. PML is required for telomere stability in non-neoplastic human cells. *Oncogene*. 2016; 35(14):1811–21. PMID: 26119943
31. Sanyal A, Wallaschek N, Glass M, Flamand L, Wight D, Kaufer B. The ND10 Complex Represses Lytic Human Herpesvirus 6A Replication and Promotes Silencing of the Viral Genome. *Viruses*. 2018; 10(8):401.
32. Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, Gilbert-Girard S, Collin V, Hall-Sedlak R, et al. Cell culture systems to study Human Herpesvirus 6A/B Chromosomal Integration. *J Virol*. 2017;(May):JVI.00437–17.
33. Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, Gilbert-Girard S, Collin V, Hall-Sedlak R, et al. Cell Culture Systems To Study Human Herpesvirus 6A/B Chromosomal Integration. *J Virol*. 2017; 91(14):e00437–17. PMID:28468878
34. Gilbert-Girard S, Gravel A, Artusi S, Richter SN, Wallaschek N, Kaufer BB, et al. Stabilization of telomere G-quadruplexes interferes with human herpesvirus 6A chromosomal integration. *J Virol*. 2017;(May):JVI.00402-17.
35. Wallaschek N, Gravel A, Flamand L, Kaufer BB. The putative U94 integrase is dispensable for humanherpesvirus 6 (HHV-6) chromosomal integration. *J Gen Virol*. 2016; 97(8):1899–903. PMID: 27170009
36. Arsenault S, Gravel A, Gosselin J, Flamand L. Generation and characterization of a monoclonal antibody specific for human herpesvirus 6 variant A immediate-early 2 protein. *J Clin Virol*. 2003; 28(3):284–90. PMID: 14522067
37. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2012; 196(6):801–10. PMID: 22412018
38. Tatemichi Y, Shibasaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tada H, Oikawa H, et al. Nucleus accumbens associated 1 is recruited within the promyelocytic leukemia nuclear body through SUMO modification. 2015;(22).
39. Osterwald S, Deeg KI, Chung I, Parisotto D, Worz S, Rohr K, et al. PML induces compaction, TRF2 depletion and DNA damage signaling at telomeres and promotes their alternative lengthening. *J Cell Sci*. 2015; 128(10):1887–900. PMID: 25908860
40. Chang HR, Munkhjargal A, Kim MJ, Park SY, Jung E, Ryu JH, et al. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutat Res—Fundam Mol Mech Mutagen*. 2018; 809(April 2017):99–107.
41. van Damme E, Laukens K, Dang TH, van Ostade X. A manually curated network of the pml nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci*. 2010;6(1):51–67. PMID: 20087442
42. Reuter N, Schilling E-M, Scherer M, Müller R, Stamminger T. The ND10 Component Promyelocytic Leukemia Protein Acts as an E3 Ligase for SUMOylation of the Major Immediate Early Protein IE1 of Human Cytomegalovirus. *J Virol*. 2017; 91(10):e02335–16. PMID: 28250117
43. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JMP, Botting CH, Naismith JH, et al. Polymeric Chains of SUMO-2 and SUMO-3 are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem*.2001; 276(38):35368–74. PMID: 11451954
44. Wang P, Benhenda S, Wu H, Lallemand-Breitenbach V, Zhen T, Jollivet F, et al. RING tetramerization is required for nuclear body biogenesis and PML sumoylation. *Nat Commun*. 2018; 9(1):1–10.
45. Lin D, Huang Y, Jeng J, Kuo H, Chang C, Chao T, et al. Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors. 2006;341–54. PMID: 17081986
46. Kim ET, Kim Y, Huh YH, Ahn J, AI KIMET, Irol J V. Role of Noncovalent SUMO Binding by the Human Cytomegalovirus IE2 Transactivator in Lytic Growth. 2010; 84(16):8111–23.
47. Wang L, Oliver SL, Sommer M, Rajamani J, Reichelt M, Arvin AM. Disruption of PML Nuclear Bodies Is Mediated by ORF61 SUMO-Interacting Motifs and Required for Varicella-Zoster Virus

- Pathogenesis in Skin. 2011; 7(8).
48. Marcos-Villar L, Lopitz-Otsoa F, Gallego P, Muñoz-Fontela C, González-Santamaría J, Campagna M, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein LANA2 disrupts PML oncogenic domains and inhibits PML-mediated transcriptional repression of the survivin gene. *J Virol*. 2009; 83(17):8849–58 PMID:19553342
 49. Attwood KM, Salsman J, Chung D, Mathavarajah S, Van Iderstine C, Dellaire G. PML isoform expression and DNA break location relative to PML nuclear bodies impacts the efficiency of homologous recombination. *Biochem Cell Biol*. 2019;1–42.
 50. Zhang JM, Yadav T, Ouyang J, Lan L, Zou L. Alternative Lengthening of Telomeres through Two Distinct Break-Induced Replication Pathways. *Cell Rep*. 2019; 26(4):955–968.e3. PMID: 30673617
 51. Sauerwald A, Sandin S, Cristofari G, Scheres SHW, Lingner J, Rhodes D. Structure of active dimeric human telomerase. *Nat Struct Mol Biol*. 2013 Apr; 20(4):454–60. PMID: 23474713
 52. Chang HR, Munkhjargal A, Kim M-J, Park SY, Jung E, Ryu J-H, et al. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2017;(May):0–1.
 53. Yeager TR, Neumann A a, Englezou A, Leukemia P, Body PML, Huschtscha LI, et al. Telomerase-negative Immortalized Human Cells Contain a Novel Type of Promyelocytic Leukemia (PML) Body Advances in Brief Telomerase-negative Immortalized Human Cells Contain a Novel Type of. 1999;4175–9.
 54. Shamanna RA, Lu H, de Freitas JK, Tian J, Croteau DL, Bohr VA. WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining. *Nat Commun*. 2016; 7(May):13785.
 55. Tikoo S, Madhavan V, Hussain M, Miller ES, Arora P, Zlatanou A, et al. Ubiquitin-dependent recruitment of the Bloom Syndrome helicase upon replication stress is required to suppress homologous recombination. *EMBO J*. 2013; 32(12):1778–92. PMID: 23708797
 56. Jiang WQ, Zhong ZH, Nguyen A, Henson JD, Toouli CD, Braithwaite AW, et al. Induction of alternative lengthening of telomeres-associated PML bodies by p53/p21 requires HP1 proteins. *J Cell Biol*. 2009; 185(5):797–810. PMID: 19468068
 57. Zhang J, Yadav T, Zhang J, Yadav T, Ouyang J, Lan L, et al. Alternative Lengthening of Telomeres through Two Distinct Break-Induced Replication Pathways Article Alternative Lengthening of Telomeres through Two Distinct Break-Induced Replication Pathways. *CellReports*. 2019; 26(4):955–968.e3.
 58. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol*. 1999; 73(10):8053–63. PMID: 10482554
 59. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol*. 1999; 73(10):8040–52. PMID: 10482553
 60. Martin ME, Nicholas J, Thomson BJ, Newman C, Honess RW. Identification of a transactivating function mapping to the putative immediate-early locus of human herpesvirus 6. *J Virol*. 1991; 65(10):5381–90. PMID: 1654446
 61. Gompels UA, Macaulay HA. Characterization of Human Telomeric Repeat Sequences from Human Herpesvirus-6 and Relationship to Replication. *J Gen Virol*. 1995; 76(1995):451–8.
 62. Wallaschek N, Sanyal A, Pirzer F, Gravel A, Mori Y, Flamand L, et al. The Telomeric Repeats of Human Herpesvirus 6A (HHV-6A) Are Required for Efficient Virus Integration. *PLoS Pathog*. 2016; 12(5):1–15.
 63. Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*. 2007 Aug 30; 448(7157):1068–71. PMID: 17687332
 64. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 Protects Human Telomeres from End-to-End Fusions. *Cell*. 1998; 92(3):401–13. PMID: 9476899
 65. Sfeir A, de Lange T. Removal of Shelterin Reveals the Telomere End-Protection Problem. *Science* (80-). 2012; 336(6081):593–7.
 66. Walker JR, Zhu XD. Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere

- maintenance. *Mech Ageing Dev.* 2012; 133(6):421–34. PMID: 22634377
67. Zhu H, Wang X, Yang Y, He Y, Liang S, Xu N, et al. Protein SUMOylation modification and its associations with disease. *Open Biol.* 2017; 7(10):170167. PMID:29021212
 68. Paulus C, Harwardt T, Walter B, Marxreiter A, Zenger M, Reuschel E, et al. Revisiting promyelocytic leukemia protein targeting by human cytomegalovirus immediate-early protein 1. Vol. 16, *PLOS Pathogens.* 2020. e1008537 PMID: 32365141
 69. Mucke K, Paulus C, Bernhardt K, Gerrer K, Schon K, Fink A, et al. Human Cytomegalovirus Major Immediate Early 1 Protein Targets Host Chromosomes by Docking to the Acidic Pocket on the Nucleosome Surface. *J Virol.* 2014; 88(2):1228–48. PMID: 24227840
 70. Kolesar P, Sarangi P, Altmannova V, Zhao X, Krejci L. Dual roles of the SUMO-interacting motif in the regulation of Srs2 sumoylation. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(16):7831–43. PMID: 22705796
 71. McManus FP, Bourdeau V, Acevedo M, Lopes-Paciencia S, Mignacca L, Lamoliatte F, et al. Quantitative SUMO proteomics reveals the modulation of several PML nuclear body associated proteins and an anti-senescence function of UBC9. *Sci Rep.* 2018; 8(1):1–15.
 72. Ouyang KJ, Yagle MK, Matunis MJ, Ellis NA. BLM SUMOylation regulates ssDNA accumulation at stalled replication forks. *Front Genet.* 2013; 4(SEP):1–11.
 73. Pond KW, de Renty C, Yagle MK, Ellis NA. Rescue of collapsed replication forks is dependent on NSMCE2 to prevent mitotic DNA damage. *PLoS Genet.* 2019; 15(2):1–25.
 74. Ouyang KJ, Woo LL, Zhu J, Huo D, Matunis MJ, Ellis NA. SUMO modification regulates BLM and RAD51 interaction at damaged replication forks. *PLoS Biol.* 2009; 7(12).
 75. Altmannova V, Eckert-boulet N, Arneric M, Kolesar P, Chaloupkova R, Damborsky J, et al. Rad52 SUMOylation affects the efficiency of the DNA repair. 2010; 38(14):4708–21. PMID: 20371517
 76. Franchet C, Hoffmann JS. When RAD52 allows mitosis to accept unscheduled dna synthesis. *Cancers (Basel).* 2020; 12(1):1–11.
 77. Dhingra N, Wei L, Zhao X. Replication protein A (RPA) sumoylation positively influences the DNA damage checkpoint response in yeast. *J Biol Chem.* 2019; 294(8):2690–9. PMID: 30591583
 78. Li C, Peng Q, Wan X, Sun H, Tang J. C-terminal motifs in promyelocytic leukemia protein isoforms critically regulate PML nuclear body formation. *J Cell Sci.* 2017; 130(20):3496–506. PMID: 28851805
 79. Lopez C, Pellett P, Stewart J, Goldsmith C, Sanderlin K, Black J, Warfield D FP. Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis.* 1988; 157(6):1271–3. PMID: 3259614
 80. Tomoiu A, Gravel A, Flamand L. Mapping of human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein transactivation domains. *Virology.* 2006; 354(1):91–102. PMID:16884756
 81. Kim Y-E, Ahn J-H. Positive Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Type I Interferon Response and Its Regulation by Human Cytomegalovirus. *PLOS Pathog [Internet].* 2015; 11(3):e1004785. PMID: 25812002
 82. Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, Fuss JO, et al. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One.* 2009; 4(8).
 83. Jaworska J, Gravel A, Flamand L. Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(18):8369–74. PMID: 20404187
 84. Couzens AL, Knight JDR, Kean MJ, Teo G, Weiss A, Dunham WH, et al. Protein interaction network of the mammalian hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Sci Signal.* 2013; 6(302).
 85. Youn JY, Dunham WH, Hong SJ, Knight JDR, Bashkurov M, Chen GI, et al. High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies. *Mol Cell.* 2018; 69(3):517–532.e11. PMID: 29395067

1.10 Supporting information

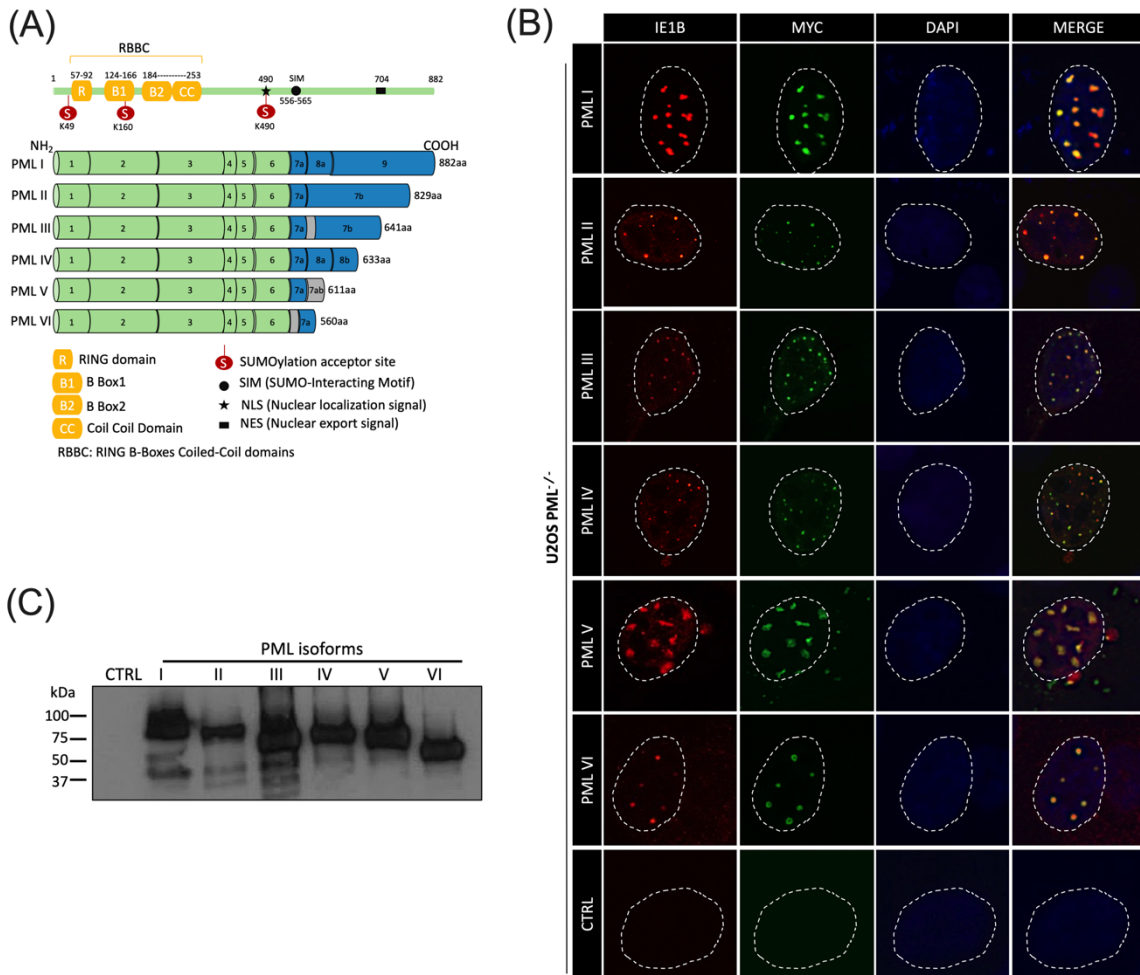


Figure S1.1 - IE1 colocalizes with all PML nuclear isoforms. **(A)** Illustration of the main features of the PML protein and its six nuclear isoforms after alternative splicing. The green and blue colors represent exons and the grey color represents introns. **(B)** U2OS PML^{-/-} were co-transfected using pcDNA4TO-IE1B along with vectors expressing the various Myc-tagged PML isoforms (I to VI). 48 hours post-transfection, cells were analyzed by IF using anti-Myc ALEXA-488-labeled (green) and anti-IE1 ALEXA-568-labeled (red) antibodies. **(C)** HEK293T were transfected with Myc-tagged PML isoforms expression vectors and analyzed by western blot using anti-Myc antibody.

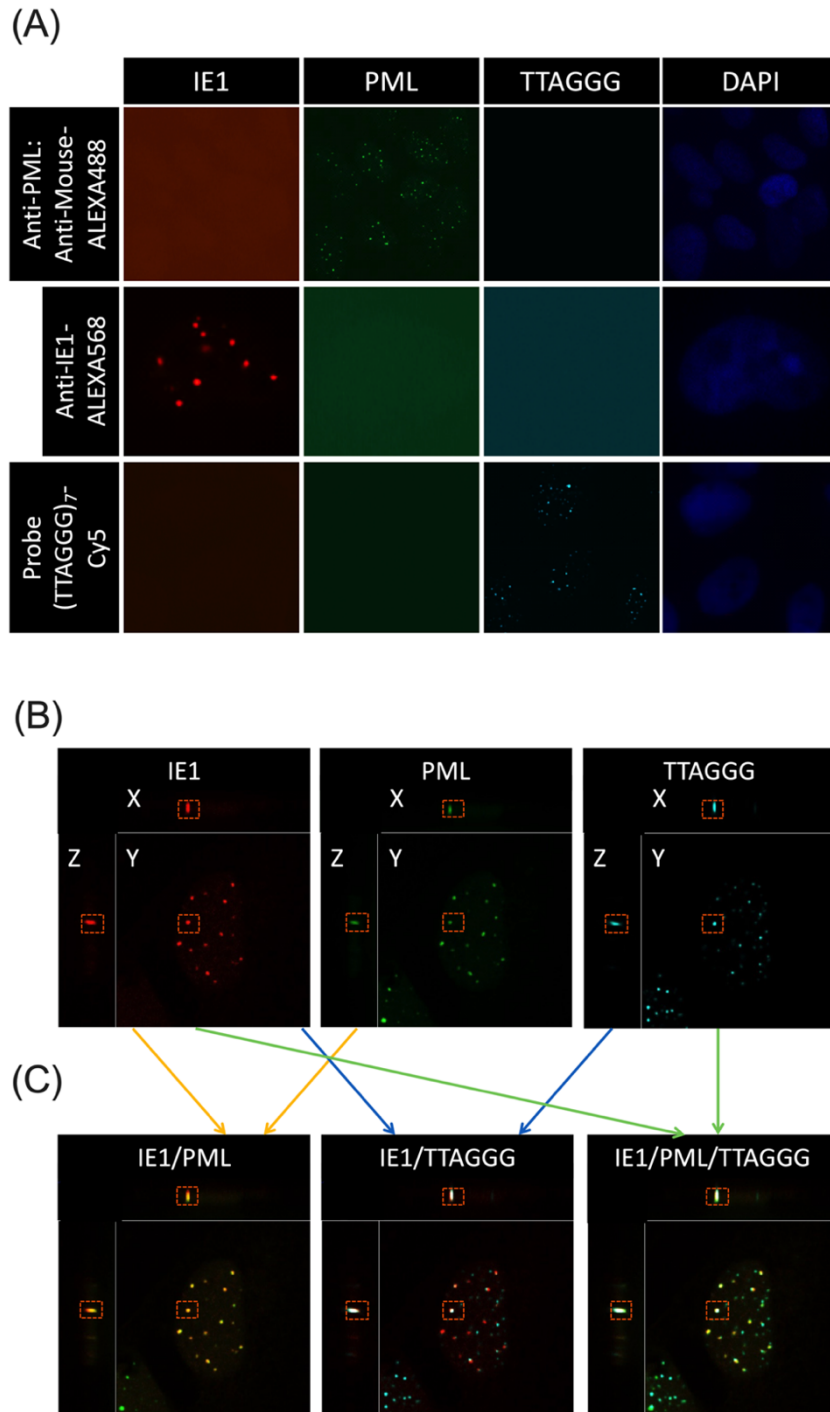
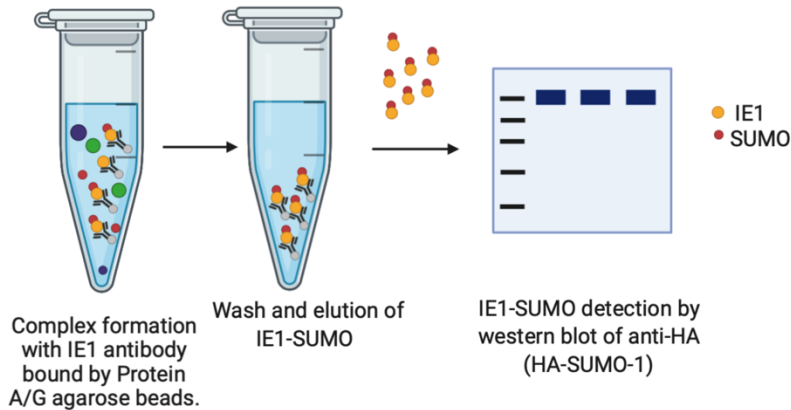


Figure S1.2 - Antibody test and IF-FISH example of colocalization of IE1 with PML at telomeres. (A) Controls for antibody specificity and fluorescence cross-leakage. U2OS pcDNA4/TO-IE1B transfected cells were labeled separately for anti-PML (green), anti-IE1 (red) and telomeric probe (aqua). Acquisitions were made for each sample to determine whether leakage of fluorophores occurred. All three filters were specific and did not allow fluorescence leakage. **(B)** Images representing fluorescence of each target protein/DNA in a X, Y, Z manner (3D) **(C)** Images representing colocalization of IE1 with PML, at telomeres in 3D (orange square). Combination for each channel can be observed. Triple colocalization gives white foci.

(A)



(B)

ID	Position	Peptide	Score	Cutoff	P-value	Type
Unnamed	52	EILEESLKC DVSFES	3.154	2.13	0.034	Sumoylation Consensus
Unnamed	122	ASVKAAMKQE QS NME	12.396	2.13	0.009	Sumoylation Consensus
Unnamed	281	CKQVNLLKQELLESR	7.88	2.13	0.015	Sumoylation Consensus
Unnamed	571 – 575	LETQPDSVVVETGSGQDDI	40.225	29.92	0.06	SUMO Interaction
Unnamed	637	DTLNPE SKLDKEMEA	3.82	3.32	0.533	Sumoylation Nonconsensus
Unnamed	765	PSKSKIKLDRLPET	2.249	2.13	0.041	Sumoylation Consensus
Unnamed	775 – 779	RLPETTNVIVISSESEDEE	54.707	29.92	0.012	SUMO Interaction
Unnamed	802	SMLEKTIKSEPNSES	40.105	2.13	0	Sumoylation Consensus

Figure S1.3 - SUMOylation assay and search for potential SIM sites. (A) SUMOylation assay protocol in brief. Total cellular lysate is first incubated with IE1 antibody for 1 hour after which Protein A/G agarose beads are added and incubated overnight. After several washes, samples are boiled at 100°C in 2X laemmli sample buffer for 5 minutes. Samples are separated by a 6% SDS-PAGE and SUMOylated IE1 detected using an anti-HA antibody (for HA-SUMO-1 detection on IE1). (B) The amino acid sequence of IE1 was screened (Q77PU6 from UniProt) with the SUMO and SIM site predictor GPS-SUMO (<http://sumosp.biocuckoo.org/online.php>). Potential SIM sites are indicated by the rectangles based on the calculated p-values.

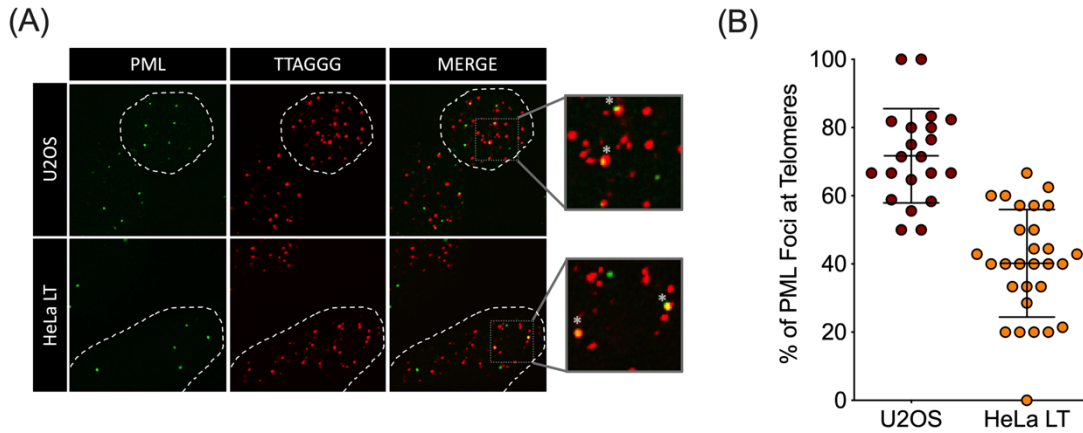


Figure S1.4 - PML localizes at telomeres in ALT+ and HeLa LT cells. (A) U2OS cells (ALT+) and HeLa LT cells (telomerase+) were grown on coverslips and fixed with 2% paraformaldehyde at sub confluence. Cells were analyzed by IF-FISH. The PML protein was detected using an anti-PML with an anti-mouse-ALEXA-488 (green) antibodies and telomeres were detected using a Cy3-labeled telomeric probe (red). (B) Graph representing mean \pm sd of the percentage of PML foci localizing at telomeres in U2OS (N = 20) and HeLa LT (N = 40) nuclei. 71.7% \pm 3.01 of PML colocalize at telomeres in U2OS cells and 40.18% \pm 2.92 in HeLa LT cells.

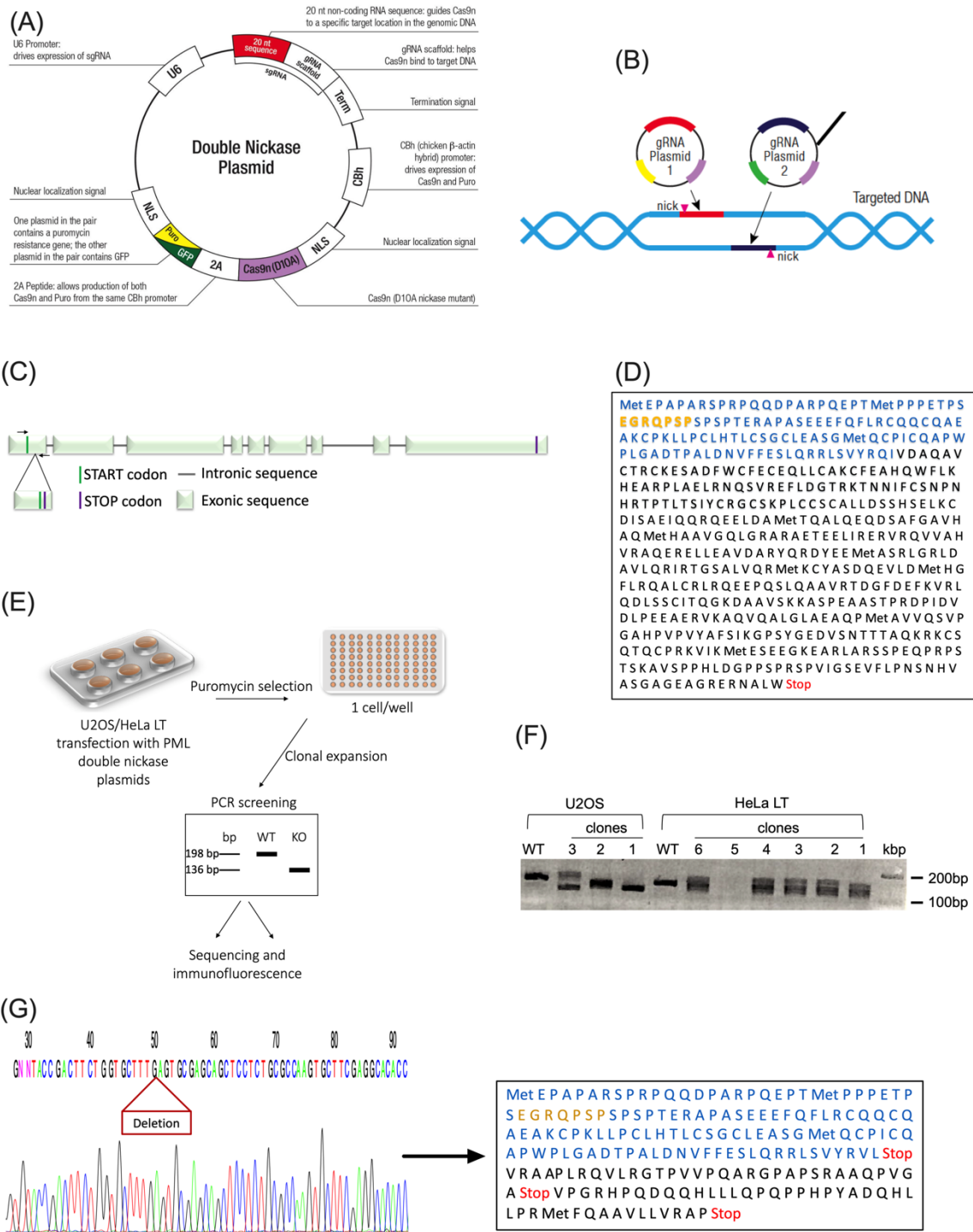
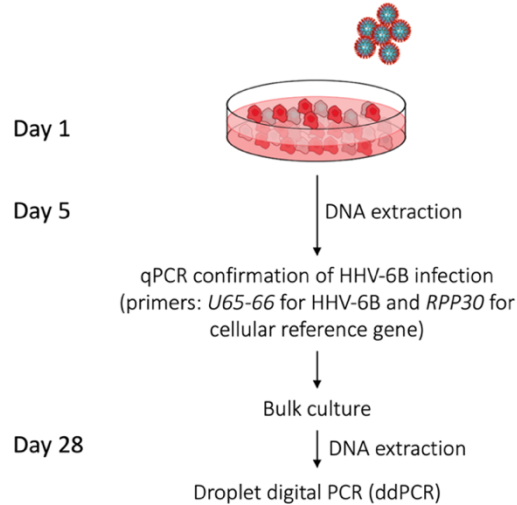


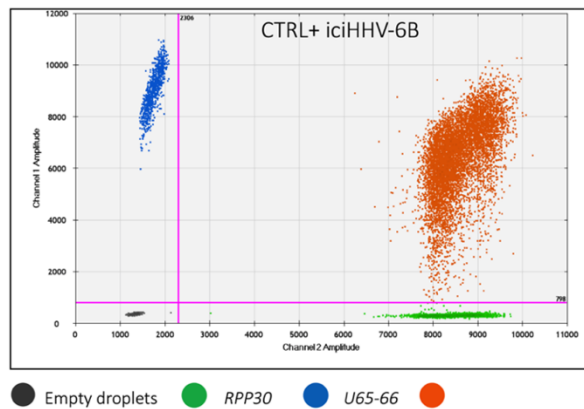
Figure S1.5 PML - KO cell line procedures. (A) Double nickase plasmid backbone. One plasmid is for a first guideRNA in the leading strand of exon 1 of PML, the expression of a Cas9n(D10A) and the puromycin resistance gene. The second plasmid has a guideRNA in the lagging strand overlapping with the first guideRNA, the expression of a Cas9n (D10A) and GFP. **(B)** Scheme of the double nickase cuts. **(C)** Schematic representation of the PML1 gene indicating where in exon 1 the deletion is introduced. Black arrows represent the primers used for PCR amplification. **(D)** PML gene translation before deletion. Sequence in blue represents

the length of the protein after deletion of a part of a sequence in exon 1. Truncated protein is from 1–222 amino acids. Sequence in yellow represents the antigen recognition sequence (aa 31–57) by the monoclonal mouse anti-PML antibody used and purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc (SC-966). **(E)** Experimental procedure used for the generation of PML KO cells. Plasmids expressing Cas-9 and the guide RNAs targeting exon 1 of the PML gene were transfected in U2OS and HeLa LT cells. 48 hours post-transfection, cells went under puromycin selection for a week. Selected cells were then plated into single cell per well in 96-wells plate to do a single cell cloning assay. Wells were screened every week for the presence of a unique colony. Once single cell clones were amplified, they were next transferred into more voluminous wells to amplify the clones and screened. **(F)** PCR amplifications of WT U2OS and HeLa LT cells and their clones with primers designed as in S5C. When mutated, the PML amplification band is at 136bp instead of 198bp, as observed for U2OS clones. WT and mutant bands were extracted and sequenced. For HeLa LT cells, because this cell line contains more than one chromosome 15 (chromosomal location of PML), these clones had more than one amplification band and were therefore screened by PCR and IF. We have selected clone 1 and 2 for each of the cell line for further experiments. **(G)** Chromatogram showing the deletion introduced by CRISPR-Cas9 and the PML gene translation after deletion within exon 1.

(A)



(B)



(C)

Calculations for percentage of integrated HHV-6B

Formula	Cell line	total U65-66 copies	total RPP30 copies	ciHHV-6B+ cells	non ciHHV-6B cells	% of integrated HHV-6B
	U2OS WT	80	8320	80	4080	1,92
	U2OS KO PML cl.1	102	20640	102	10218	0,99
	U2OS KO PML cl.2	102	22940	102	11368	0,89

Figure S1.6 - Integration assay. (A) Scheme representing the integration assay as previously described by Gravel et al. (36). Briefly, cells were infected at a MOI of 1 for 24 hours and kept in culture for 4 weeks. At day 5, cells were transferred to a bigger culture vessel and a portion of each condition were screen by qPCR to assure HHV-6B presence. HHV-6B copies were detected with U65-66 primers and normalized with the cellular reference gene (RPP30). (B) Scheme showing the results of an inherited chromosomally integrated HHV-6B sample estimated integration rate by ddPCR. Briefly, cell's DNA together with a Taq polymerase and primers with their specific fluorescent probe, for instance, are divided into 20 000 droplets of oil. These droplets are then PCR amplified for both of the target genes (U65-66 and RPP30). After the amplification, each droplet is quantified for their number of copies for each gene. (C) Example of calculations to determine the integration rate of HHV-6B. For statistical purposes, the total number of cells with integrated HHV-6B and cells without integration were used. The number of cells is estimated using the RPP30 gene, present at 2 copies/cell. A Fisher's exact test is done with these values.

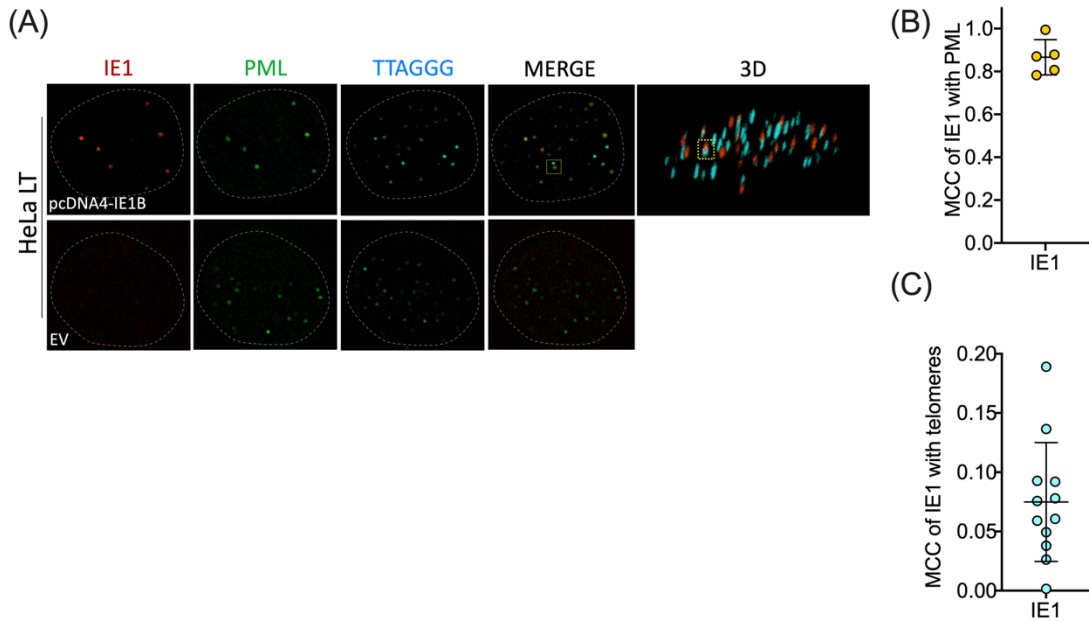


Figure S1.7 - IE1 localizes at telomeres in HeLa LT cells. (A) IF-FISH of transfected HeLa LT with pcDNA4/TO-IE1B. 48h post-transfection cells were fixed and labelled for IE1 (red), PML (green) and telomeres (aqua). (B) Graph representing the level of colocalization of IE1 with PML. (C) Graph representing the level of IE1 that localizes at telomeres.

Chapitre 2. SUMOylation: A convergence between Human Herpesvirus 6A/B Immediate Early Protein 1

Vanessa Collin^a, Annie Gravel^a, Louis Flamand^{a,b}

^aDivision of Infectious Disease and Immunity, CHU de Québec Research Center, Quebec City, Quebec Canada, G1V 4G2;

^bDepartment of microbiology, infectious disease and immunology, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Québec, Canada, G1V 0A6

* Lead contact:

Louis.Flamand@crchudequebec.ulaval.ca

2.1 Résumé

L'herpèsvirus humain 6A (HHV-6A) peut intégrer son génome dans les télomères des cellules humaines. Les mécanismes qui conduisent à l'intégration d'HHV-6A sont encore mal compris. Récemment, nous avons identifié que les corps nucléaires de la protéine de la leucémie promyélocytaire (PML) (PML-NBs) étaient importants pour une intégration efficace d'HHV-6B. Dans cette nouvelle étude, nous rapportons que les PML-NB jouent également un rôle important pour l'intégration d'HHV-6A. De plus, nous indiquons que la protéine précoce immédiate 1 d'HHV-6A (IE1A) se localise aux PML-NBs, qui à leur tour influencent la présence d'IE1A au niveau des télomères. Par ailleurs, nous apportons de nouvelles connaissances concernant la SUMOylation post-traductionnelle d'IE1A. Nous rapportons l'identification de la lysine 665 (K665) comme site accepteur de SUMO et ⁶³⁸VIV⁶⁴⁰ comme motif potentiel d'interaction avec une protéine SUMO (SIM). Ces deux sites sont essentiels pour la SUMOylation d'IE1A. En utilisant les isoformes de PML, nous suggérons que la partie C terminale de PML qui contient un site SIM (acides aminés à 556-562) est importante pour la SUMOylation IE1A. Enfin, nous proposons un modèle qui explique le recrutement d'IE1A aux PML-NB de manière dépendante de la SUMOylation afin de favoriser l'intégration d'HHV-6A.

2.2 Abstract

Human herpesvirus 6A (HHV-6A) can integrate its genome into the telomeres of cells. The mechanisms leading to the integration of HHV-6A are still poorly understood. Recently, we showed that the promyelocytic leukemia protein (PML) nuclear bodies (PML-NBs) were important for efficient HHV-6B integration. Here, we report that PML-NBs also play an important role for HHV-6A integration. Moreover, we provide data indicating that the immediate early protein 1 of HHV-6A (IE1A) localizes at PML-NBs, which in turn influence the presence of IE1A at telomeres. Additionally, we provide information regarding the post-translational SUMOylation of IE1A. We report the identification of K665 as a *bona fide* SUMO acceptor site and identified ⁶³⁸VIV⁶⁴⁰ as a potential SUMO-interacting motif (SIM), both of which are important for IE1A SUMOylation. Using PML isoforms, we provide evidence that the C terminal portion of PML that contains a SIM site (amino acids at 556-562) is important for IE1A SUMOylation. Lastly, we propose a model explaining the recruitment of IE1A to PML-NBs in a SUMOylation dependent manner in order to favor HHV-6A integration as mean to achieve latency.

2.3 Introduction

Human herpesvirus 6A (HHV-6A) is a Herpesviridae infecting individuals worldwide. Together with the human herpesvirus 6B (HHV-6B), the human herpesvirus 7 (HHV-7) and the human cytomegalovirus (hCMV), HHV-6A is part of the beta-Herpesvirinae sub-family. Interestingly, HHV-6A and HHV-6B (HHV-6A/B) share 94% of identity in amino acids sequences but are associated with different pathologies [1]. Pathologies related to HHV-6A are not clearly defined although a growing body of literature is linking HHV-6A infection/reactivation to neurodegenerative diseases (reviewed in [2]). Both HHV-6A/B have the unique ability to integrate their genomes in human chromosomes at the telomeres, the extremities of chromosome [3]. Chromosomally integrated HHV-6A/B (ciHHV-6A/B) can be inherited (iciHHV-6A/B) [4] and represents 1.1% of the world's population. However, the impact of iciHHV-6A/B on human health is still poorly defined [5–10]. As it is the case for the Marek's disease virus (MDV) [11], it is suggested that the ciHHV-6A/B is a form of latency used by HHV-6A/B. In point of fact, multiple studies reported *in vivo* and *in vitro* reactivation of HHV-6A from iciHHV-6A individuals [12,13]. Accordingly, reactivation amongst healthy people is generally harmless, but can be life-threatening for individuals with a precarious immune system. In these subjects, reactivation of HHV-6A can be problematic considering the existing limited therapeutic arsenal [14,15].

The genome of HHV-6A is composed of a unique region flanked by direct repeats (DR), each containing telomeric repeats (TMRs) [16]. Using a recombinant HHV-6A lacking TMRs, it was shown that viral integration was severely impaired [17], suggesting a link between homologous recombination pathways and viral integration. Recently we have identified a nuclear structure, the promyelocytic leukemia protein (PML) nuclear bodies (PML-NBs), to be important for HHV-6B integration [18]. PML-NBs are formed by monomers of PML and many cellular proteins that transit dynamically by SUMOylation and by the bindings of SUMO-conjugated proteins to SUMO-interacting motif (SIM) [19]. As such, PML-NBs respond to many cellular mechanisms including DNA damage/damaged telomere, DNA repair, viral infection and more (reviewed in [20,21]). In regard to SUMOylation, this post-translational modification (PTM) is the result of a covalently linked SUMO protein generally to a lysine (K) consensus sequence of a substrate, through the activity of an activating enzyme (E1), a conjugating enzyme (E2) and a SUMO ligase (E3) [22]. We have recently shown that PML-NBs are important for the SUMOylation of the immediate early protein 1 (IE1) of HHV-6B (IE1B) [18]. Moreover, we have identified a potential SIM in the amino acid sequence of IE1B, important for its multiSUMOylation in presence of PML-NBs. The multiSUMOylation represents the attachment of SUMO proteins to more than one SUMO acceptor site. Apart from a covalent attachment between a SUMO and a target protein, the latter can also bind non

covalently to a free SUMO protein or a SUMOylated protein through the presence of a SIM. This motif assures a protein to dynamically create interacting partners (reviewed in [23]).

One of the most divergent proteins between the HHV-6A/B is the IE1 protein, sharing 62% of identity [1,16]. Despite their differences, IE1A/B are both found with PML-NBs during infection of HHV-6A/B [24,25]. Unlike other herpesviruses that destroy PML-NBs for viral replication purposes [26–28], HHV-6A/B keep the PML-NBs intact [24,25]. Stanton et al. [24] showed that IE1A is SUMOylated and proposed that the SUMO acceptor site is K665, in agreement with the work by Gravel et al. [25]. However, characterization of K665 as a SUMO acceptor site was never formally demonstrated. This work was undertaken to characterize IE1A SUMOylation and determine the importance of PML-NBs for efficient HHV-6A chromosomal integration.

2.4 Results

2.4.1 IE1A colocalization at telomeres is partly PML-NBs dependent

In order to study HHV-6A integration, cells that are semi-permissive for HHV-6A replication are used [29]. Of these, U2OS are useful considering their ability to be infected by HHV-6A and their long heterogeneous telomeres that allow the study of viral proteins at telomeres [18]. Therefore, we made use of the U2OS cell line to study the localization of IE1A at telomeres. Following 48 hours of HHV-6A infection in U2OS, ~18% of IE1A foci located at telomeres (**Figure 2.1A**). We next wanted to determine whether ectopically-expressed IE1A would behave similarly to naturally-expressed IE1A in U2OS. After transfection, IE1A invariably colocalized at PML-NBs in U2OS cells (**Figure 2.1B**), represented by a Mander's colocalization coefficient (MCC) of 0.9545 ± 0.0649 (mean \pm sd) in which an MCC of 1 represents a perfect colocalization and an MCC of 0 is equal to no colocalization. Additionally, integrity of PML-NBs foci was not impaired in presence of IE1A. Next, we took advantage of a PML knockout (KO) U2OS cell line (U2OS PML^{-/-}) previously generated [18] to assess the colocalization of IE1A at telomeres upon transfection of wild-type (WT) U2OS cells (U2OS PML^{+/+}) and U2OS PML^{-/-} (**Figure 2.1C**). In cells expressing PML, the MCC of IE1A at telomeres was of 0.215 ± 0.162 (mean \pm sd). In contrast, in U2OS PML^{-/-} cells, colocalization of IE1A at telomeres was reduced by ~3 folds with a MCC of 0.072 ± 0.080 (mean \pm sd). These results showed that IE1A is responsible for its localization to PML-NBs in absence of other viral factors and suggest that PML-NBs favor localization of IE1A at telomeres.

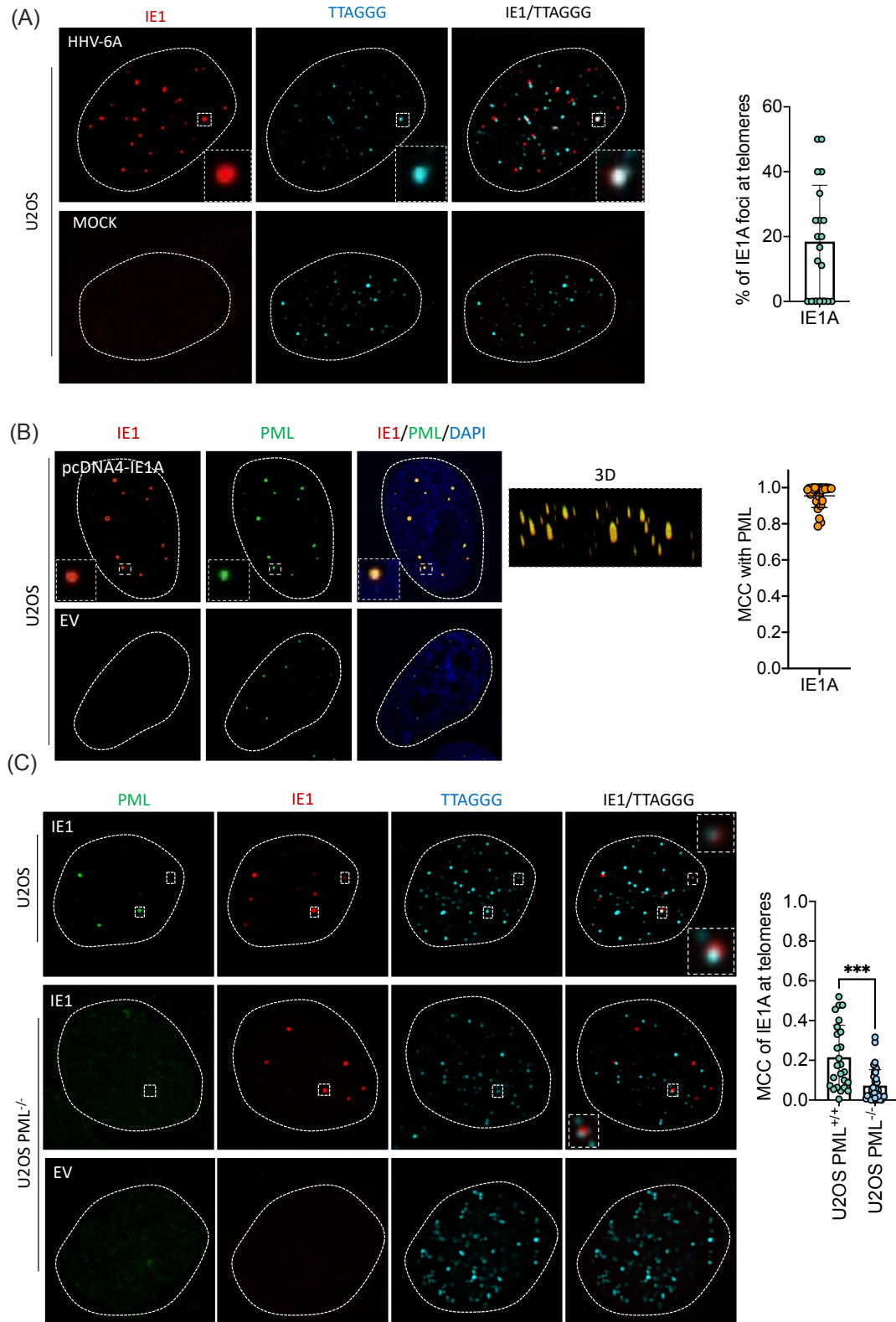


Figure 2.1. IE1A colocalization at telomeres is partly PML-NBs dependent. (A) Deconvoluted confocal microscopy images representative of IE1A/telomere staining of U2OS cells infected with HHV-6A for 48 hours.

Dotted squares represent enlarged image of IE1A at telomeres. Quantifications of IE1A at telomeres are presented in the graph. Each dot represents an IE1A+ nucleus. **(B)** Immunofluorescence images of deconvoluted confocal microscopy representing ectopically expressed IE1A foci with endogenous PML-NBs in U2OS cells. Dotted squares represent enlarged image of IE1A with PML. EV (Empty Vector). Quantifications of the Mander's colocalization coefficient (MCC) of IE1A with PML are presented in the graph. Each dot represents an IE1A+ nucleus. **(C)** Deconvoluted confocal microscopy images of U2OS PML^{+/+} and PML^{-/-} cells transfected for IE1A expression. Dotted squares represent enlarged image of foci. EV (Empty Vector). Quantifications of the MCC of IE1A at telomeres are presented in the graph. Each dot represents an IE1A+ nucleus. Data were transformed to log values and the normal distributions analyzed using an unpaired t test with Welch's correction to compare frequency of IE1A at telomeres. ***p<0.001.

2.4.2 PML-NBs are important for HHV-6A integration

As a follow-up to the results indicating a reduction of IE1A at telomeres in U2OS PML^{-/-} cells, we next determined whether HHV-6A integration would be impaired in PML KO cells. To study this, we used U2OS PML^{-/-} and HeLa with long telomeres (LT) PML KO (HeLa LT PML^{-/-}) cells that were previously generated (**Figure S1.1**) [18]. Two independent clones of PML KO cells were used for each cell line. In U2OS PML^{+/+}, 3.58% of cells contained integrated HHV-6A (**Table 2-1**). In contrast, the HHV-6A integration frequencies were reduced by 13 and 6 folds in U2OS PML^{-/-} clone 1 and clone 2, respectively (p<0.0001). These results were also observed using an HeLa LT cell line which HHV-6A integration frequencies decreased by 2.5 and 9 folds (p<0.0001) in clone 1 and clone 2, respectively (**Table 2-1**).

Table 2-1. Importance of PML for HHV-6A chromosomal integration in U2OS and HeLa LT cells.

Cells	% of cells with integrated HHV-6B * (n) **	p value
U2OS PML ^{+/+}	3,58±3.687 (13147)	
U2OS PML ^{-/-} clone 1	0,27±0.1848 (7725)	<0.0001
U2OS PML ^{-/-} clone 2	0,5833±0.07545 (6159)	<0.0001
HeLa LT PML ^{+/+}	3,445±3.335 (13653)	
HeLa LT PML ^{-/-} clone 1	1,343±1.426 (17869)	<0.0001
HeLa LT PML ^{-/-} clone 2	0,3467±0.5822 (36112)	<0.0001

* mean ± SD of three independent cultures

** total number of analyzed cells

2.4.3 PML-NBs are responsible for the multiSUMOylation of IE1A

PML-NBs is a prominent nuclear SUMOylation site [30, 31]. In addition, PML itself was recently reported to have SUMO ligase function [32,33]. Others and we have suggested that IE1A has the same SUMO acceptor

consensus site as IE1B [24, 25]. Moreover, we have previously reported that IE1B contains a potentially functional SIM site (⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷) within its amino acid (aa) sequence [18]. Alignment of the aa sequences of IE1A with IE1B indicated that in addition to the same SUMO acceptor consensus site (K665 for IE1A), IE1A/B shared an identical putative SIM (VIV) site (**Figure 2.2A**). These were also predicted by *in silico* analysis (**Figure S2.1**).

PML-NBs are a mixture composed of six nuclear isoforms, PML-I to PML-VI, with PML-I and PML-II being the most prevalent [34, 35]. All isoforms share the first six exons and differ at their C-terminal. In order to assess if PML-NBs influence IE1A SUMOylation, we used HEK293T cells that have low to no levels of PML expression [33]. Cells were co-transfected with an expression vector for PML-I or with the PML-I:L73E, a mutant incapable of assembling into PML-NBs (**Figure 2.2B**) [18, 36]. In the absence of PML overexpression, minimal IE1A SUMOylation was observed in cells expressing HA-SUMO-1. In the presence of PML-I, SUMOylation of IE1A was enhanced relative to non-PML and PML-I:L73E transfected cells ($p \leq 0.03$) (**Figures 2.2C-D**). IE1A multiSUMOylation, defined as a higher molecular weight (MW) specie of IE1A, was only detected in cells co-expressing HA-SUMO-1 and PML-I (**Figure 2.2D**). Such multiSUMOylation of IE1A was not observed with SUMO-2 and SUMO-3 paralogs. This suggests that no SUMO-branching between SUMO-2/3 occurred on IE1A as these SUMO paralogues are the only ones capable of being SUMOylated [37]. Therefore, these results showed that the presence of PML-NBs is important for the SUMOylation of IE1A and for its multiSUMOylation with the paralogue SUMO-1.

shown in D. Data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.03$. **(D)** Immunoblots representing SUMOylation of IE1A in HEK293T in different conditions (INPUT). Following 48 hours of transfection, IE1A was immunoprecipitated and its SUMOylation was detected with an anti-HA-SUMO-1 immunoblot. EV (Empty Vector).

2.4.4 Characterization of putative SUMOylation sites for IE1A

Considering that IE1A is multiSUMOylated in the presence of PML-NBs, this suggests that IE1A has more than a single SUMO acceptor site. To characterize IE1A SUMOylation, we generated an IE1A:K665R mutant lacking the putative SUMO acceptor lysine, a mutant for the putative ⁶³⁸VIV⁶⁴⁰ SIM site by substituting for three alanines (IE1A:VIVm) and a double mutant, IE1A: VIVm:K665R (IE1A:DM) (**Figure 2.3A**). In absence of PML-NBs, monoSUMOylation of IE1A could only be detected with WT IE1A and upon over long exposure (**Figure 2.3B**). In the presence of PML-I, WT IE1A multiSUMOylation was observed. Moreover, IE1A monoSUMOylation was more robust with WT IE1A relative to IE1A mutants. Using either of the IE1A:K665R or ⁶³⁸AAA⁶⁴⁰ single mutants, but not with IE1A:DM, a faint but noticeable multiSUMOylation was observed. This suggested that K665 and SIM (⁶³⁸VIV⁶⁴⁰) sites are required for the basal IE1A SUMOylation and multiSUMOylation in the presence of PML-I. Considering that IE1A:K665R undergoes SUMOylation, this indicated the presence of an additional SUMO acceptor site.

(A)

IE1A generated mutants		
IE1 HHV-6A WT	PKAADVIVISSESEDEEDGDNIIGNSILIKAIKSESDSESSSESND	678
IE1 HHV-6A K665R	PKAADVIVISSESEDEEDGDNIIGNSILIKAIRSESDSESSSESND	678
IE1 HHV-6A:VIVm	PKAADAAVISSESEDEEDGDNIIGNSILIKAIKSESDSESSSESND	678
IE1 HHV-6A:DM	PKAADAAISSESEDEEDGDNIIGNSILIKAIRSESDSESSSESND	678

(B)

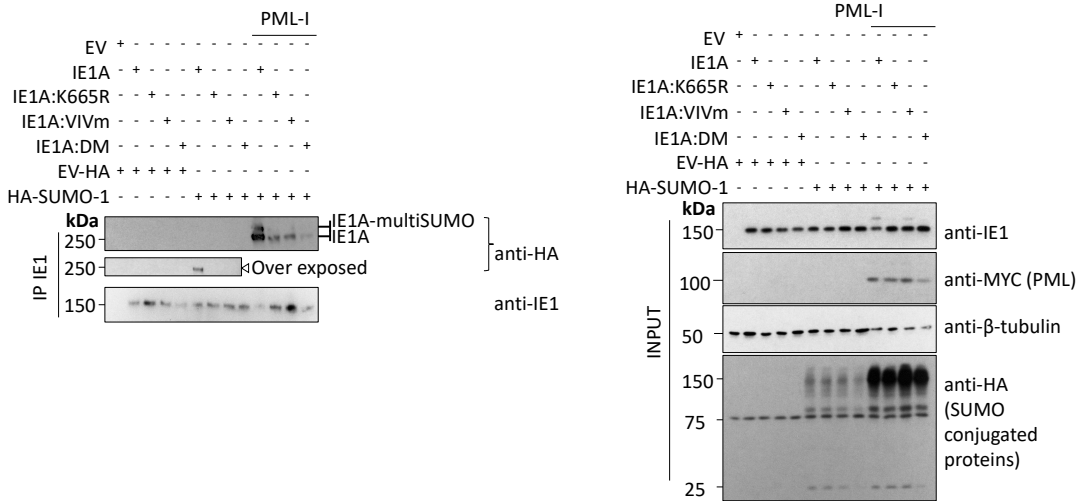


Figure 2.3. Characterization of putative SUMOylation sites for IE1A. (A) Partial sequences of IE1A generated mutants. **(B)** Immunoblots representing SUMOylation of WT and mutants IE1A after co-transfection (Right panels-INPUT). IE1A was immunoprecipitated and its SUMOylation detected using anti-HA-SUMO-1 antibodies on immunoprecipitated extracts. EV (Empty Vector).

2.4.5. Oligomerization of IE1A is dependent on SUMOylation and PML-NBs

SUMO and SIM sites are essential for the oligomerization of IE1B into punctate foci [18]. Here, we showed that in U2OS cells, IE1A mutants exhibited a punctate pattern that colocalized perfectly with PML-NBs (**Figure 2.4**), with a mean MCC of ≥ 0.95 (**Figure 2.4B**). We next assessed if this phenotype would be reproduced in U2OS PML^{-/-} cells. Interestingly, WT IE1A and IE1A:K665R formed punctate foci, but the IE1A:VIVm and IE1A:DM mutants had a diffused nuclear pattern (**Figure 2.4C**). Quantification of these phenotypes indicated that $94.98\% \pm 0.56$ and $80.32\% \pm 4.57$ (mean \pm sd) of IE1A+ nuclei had punctate IE1A foci in WT and K665R conditions, respectively. In contrast, only $2.88\% \pm 1.30$ (mean \pm sd) of the VIVm mutant was expressed with a punctate pattern. A similar result was obtained with IE1A:DM in which $3.92\% \pm 0.34$ (mean \pm sd) of IE1A+ nuclei had a punctate pattern. Taken together, the SUMOylation status of IE1A and the presence of PML-NBs are essential for its oligomerization.

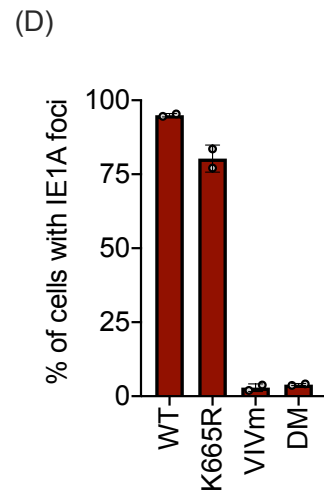
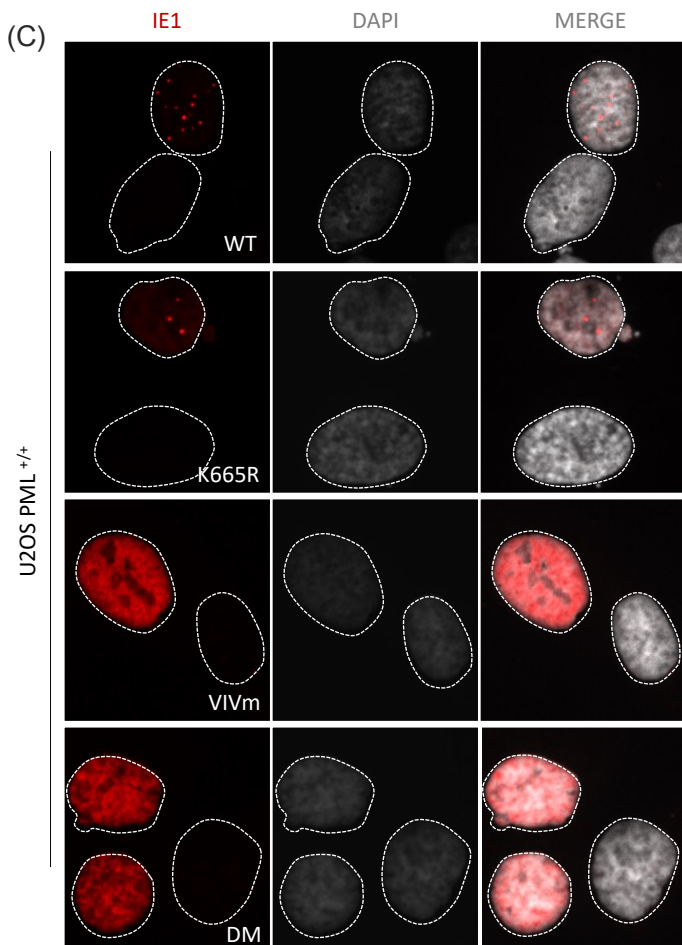
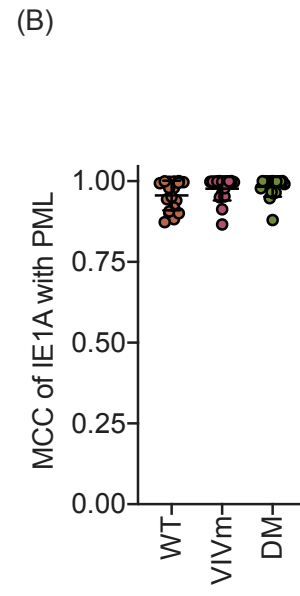
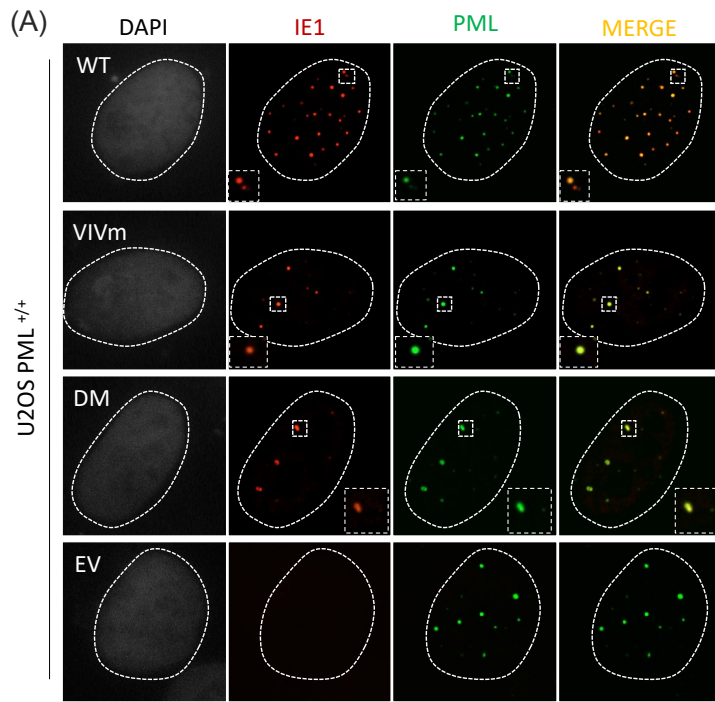


Figure 2.4. Oligomerization of IE1A is dependent on SUMOylation and PML-NBs. (A) Immunofluorescence images of confocal microscopy representing IE1A foci colocalizing with endogenous PML-NBs in U2OS PML^{+/+} cells. Dotted squares represent enlargement of colocalized foci. EV (Empty Vector). **(B)** Graph representing the Mander's colocalization coefficient (MCC) of WT and mutants IE1A foci with PML-NBs. Each dot represents an IE1A+ nucleus. Data are presented as mean±SD. **(C)** Immunofluorescence images representing the phenotypes of different IE1A proteins following transfection in U2OS PML^{-/-}. **(D)** Bar graph representing quantification of the punctate nuclear pattern between different IE1A constructs. Data are presented as mean±SD.

2.4.6. multiSUMOylation of IE1A is dependent of its SIM and the SIM of PML

All PML isoforms can be SUMOylated at three known sites: K65, K160 and K490 [38]. Moreover, there is a SIM (⁵⁵⁵VVV⁵⁵⁷) site within exon 7a of PML, present in PML-I through PMLV, but missing in PMLVI (**Figure 2.5A**) [39, 40]. In order to gain insights on how PML-NBs might favor multiSUMOylation of IE1A, we made use of the PML-I and PML-VI isoforms and compared the SUMOylation levels of WT IE1A and IE1A:DM. Following immunoblotting for HA-SUMO-1 after IE1 IP, we showed that in the presence of PML-VI, WT IE1A monoSUMOylation is greatly diminished. Furthermore, the IE1A:DM could not be SUMOylated in the presence of PML-VI (**Figure 2.5B**). These results suggested that both the PML and IE1A SIM sites are required for optimal IE1A SUMOylation.

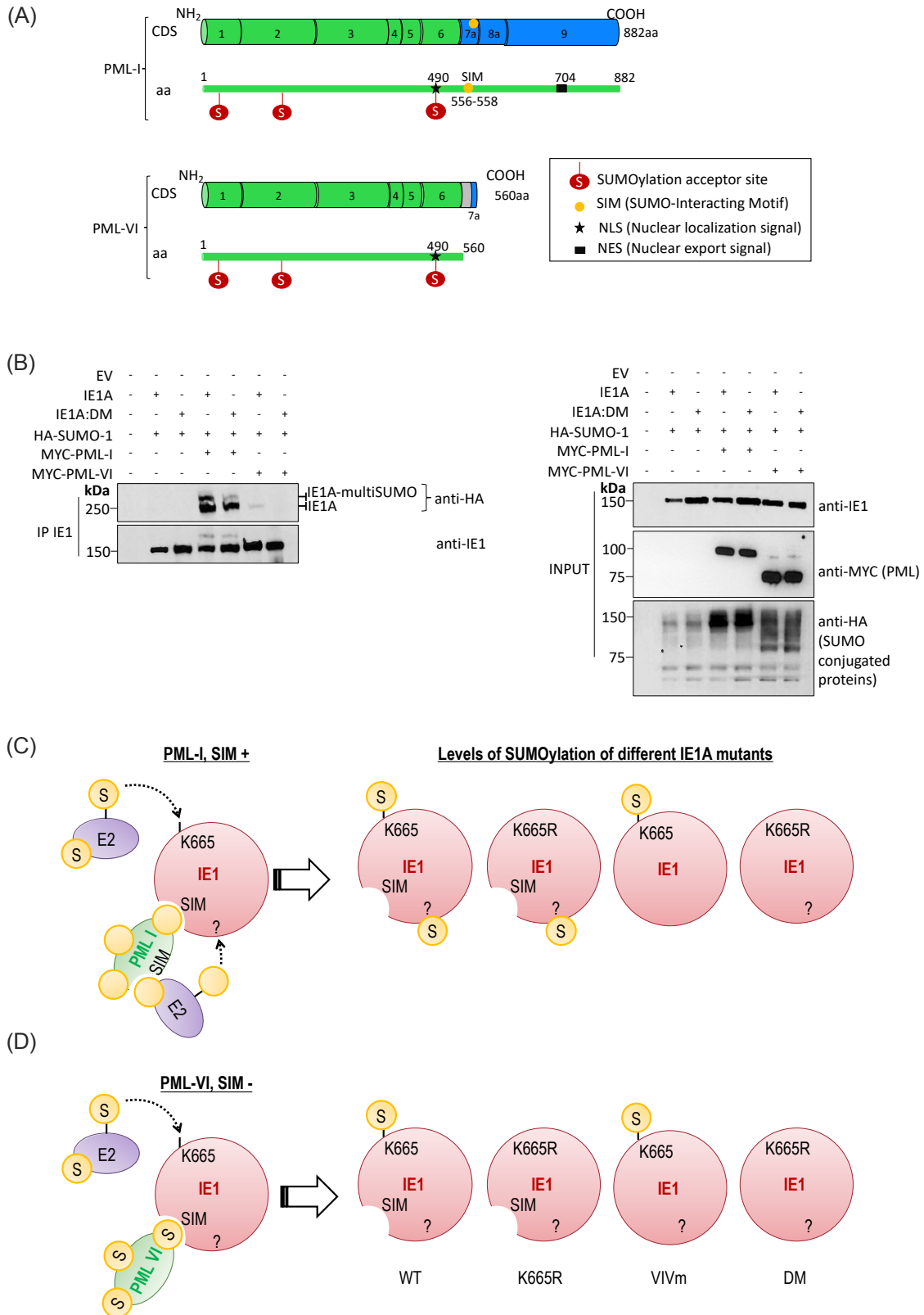


Figure 2.5. Optimal IE1A SUMOylation is dependent of PML SIM site. (A) Diagram showing PML isoform I and VI SUMO acceptor and SIM sites. Green bars represent shared exons between PML isoforms and blue bars

represent unique exons following splicing. PMLVI lacks the SIM site (yellow dot). **(B)** Immunoblots of IE1A SUMOylation (IP IE1) in the absence or in the presence of PML-I or PML-VI (INPUT). **(C-D)** Hypothetical views on how IE1A might bind to PML to influence its SUMOylation. SUMOylation levels of different IE1A constructs with PML-I (C) or PML-VI (D) isoforms are presented. SIM (SUMO-Interacting motif).

2.5 Discussion

Telomeres are composed of a telosome of which some proteins are implicated in regulating DNA damage, DNA repair and telomeric DNA replication. Additionally, telomeres are rich in heterochromatin marks [41, 42]. For these reasons it is conceivable that some herpesviruses exploit telomeres to achieve latency and/or viral replication [43, 44]. Among Herpesviridae, MDV and HHV-6A/B have the unique ability to use the viral integration at telomeres as a mean to achieve latency [45]. However, the mechanisms related to MDV and HHV-6A/B integrations are still unclear. However, how TRF2 favors HHV-6A/B integration is still not clear. To gain more insight on HHV-6A integration, here we presented that PML-NBs are important for efficient HHV-6A integration. This can be correlated to IE1A being less present at the site of integration in absence of PML-NBs. We therefore studied the effect of PML-NBs on IE1A and found that PML-NBs are essential for the multiSUMOylation status of IE1A. This evidence allowed us to identify key amino acids responsible for SUMOylation of IE1A.

In this study we provide knowledge that in HHV-6A infected U2OS cells, some of the IE1A foci located at telomeres (**Figure 2.1A**). Others and we have previously reported that during HHV-6A infection, IE1A colocalizes perfectly to PML-NBs and does not lead to PML-NB dispersal, unlike HSV, CMV and EBV. Moreover, destructions of PML-NBs by these herpesviruses are executed by their IE proteins [26-28]. Here, following transient expression of IE1A, we showed that IE1A perfectly colocalizes with PML-NBs and does not lead to PML-NBs destruction (**Figure 2.1B**).

U2OS maintain their telomeres by an alternative lengthening of telomeres (ALT) mechanism, in comparison to HeLa cells that induce telomerase expression [47]. The process of ALT is based on the homologous recombination (HR) pathway [48]. To do so, these cells exhibit ALT-PML-NBs (APBs) at their telomeres [49-51]. Proteins implicated in HR such as RAD51, RPA, BRCA1, RAD52, telomeric proteins like TRF1 and TRF2 and telomeric DNA are found in APBs [49, 52]. Using PML KO cell lines, we have provided evidence that PML-NBs are important for the localization of IE1A at telomeres (**Figure 2.1C**) and HHV-6A integration (**Table 2-1**). More importantly, we have confirmed the decrease in HHV-6A integration in a non-ALT PML KO HeLa LT cell line (**Table 2-1**) suggesting that HHV-6A/B integration is not restricted to ALT mechanisms. In support of this result, it was previously shown that PML-NBs are involved in telomere maintenance of non-ALT and non-neoplastic

cells [47]. The fact that reduced viral integration in PML KO cells was correlated with reduced localization of IE1 at telomeres, suggested that PML-NBs might have an indirect role in HHV-6A integration by favoring IE1A localization at telomeres.

PML-NBs are known to be a hub for SUMOylation and their partners transit dynamically upon stress responses, leading to activation or inhibition of proteins, cellular localization and creating new interacting partner through SIM-SUMO interactions [31, 53]. Here, we showed that despite IE1A/B sharing only 62% of identity, IE1A possess the same SUMO and SIM consensus sequences as IE1B (**Figure 2.2A**). When comparing the level of SUMOylation, we observed that PML-NBs are responsible for the multiSUMOylation of IE1A with overall SUMOylation levels enhanced in the presence of PML-NBs (**Figure 2.1C-D**). By co-expressing PML-I with SUMO paralogues SUMO-1, 2 and 3, we have confirmed that the multiSUMOylation was not due to SUMO branching as it was only detected upon SUMO-1 expression, a paralogue incapable of SUMO branching. Moreover, single and double mutants for the putative SUMO and SIM sites allowed us to identify that although important, the K665 is not the unique SUMO acceptor site within IE1A (**Figure 2.3B**). However, K665 and the SIM sites are essential for the multiSUMOylation status of IE1A. Additionally, we have reported that in PML KO cells, the SIM site of IE1A is essential for its oligomerization (**Figure 2.4C-D**). Using a PML isoform lacking the SIM site (PML-VI), we provided evidence that overall IE1A SUMOylation was decreased and IE1A multiSUMOylation was lost (**Figure 2.5**). Moreover, no SUMOylation was observed with IE1A:DM in presence of PMLVI. Considering that IE1A:DM can still be SUMOylated and form punctate foci in the presence of PML-NBs also supports the hypothesis that there is an additional SUMO acceptor site that would favor IE1A colocalization at PML-NBs, through interactions with the PML SIM site or other proteins present at PML-NBs. Based on previous and the current results, we propose a model describing how IE1A interacts with PML at PML-NBs (**Figure 2.5C-D**).

In conclusion, our results indicated SUMOylation convergence between the IE1 proteins of HHV-6A/B. Such features provide further knowledge in the mechanisms leading to HHV-6A/B integration. The generation of recombinant HHV-6A/B IE1 SUMO/SIM mutants would prove valuable reagents in our understanding of the role of PML, SUMOylation and viral integration.

2.6 Acknowledgement

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grants (MOP_123214 and PJT_156118) awarded to LF. VC currently holds a scholarship from the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQ-S). We

thank Julie-Christine Lévesque for technical help with the confocal microscopy analyses and thank the Bioimaging platform of the Infectious Disease Research Centre, funded by an equipment and infrastructure grant from the Canadian Foundation Innovation (CFI).

2.7 Author Contributions

Conceptualization: Vanessa Collin, Annie Gravel, Louis Flamand.

Data curation: Vanessa Collin.

Formal analysis: Vanessa Collin, Louis Flamand.

Funding acquisition: Louis Flamand.

Methodology: Vanessa Collin, Annie Gravel, Louis Flamand.

Resources: Louis Flamand

Supervision: Louis Flamand.

Writing – original draft: Vanessa Collin, Louis Flamand.

Writing – review & editing: Vanessa Collin, Annie Gravel, Louis Flamand.

2.8 Materials and methods

Cell lines and virus. All cells were cultured at 37°C, 5% CO₂. HEK293T (ATCC) and Hela LT were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Corning Cellgro, Manassas, VA, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), nonessential amino acids (NEM) (Corning Cellgro), HEPES, sodium pyruvate (Wisent Inc., St-Bruno, Québec, Canada), and 5 µg/ml plasmocin (Invivogen, San Diego, CA, USA). U2OS (ATCC) and U2OS PML^{-/-} [18] were cultured in the same medium but supplemented with 10% of Nu Serum (Corning Cellgro) instead of FBS. HHV-6A strain U1102 was produced by our laboratory, as previously described [54].

Plasmids. Expression vector for HHV-6A IE1 (pcDNA4/TO-IE1A) and empty vector pcDNA4/TO (EV) and expression vectors for SUMO paralogues (pCMV2N3T-HA-SUMO-1/SUMO-2 and SUMO-3) were previously described [55, 56]. Plasmids expressing pCS3-MT-MYC-PML isoforms were kindly provided by Jin-Hyun Ahn [57]. pLenti-CMV-Hygro-PML-I and pLenti-CMV-Hygro-PML-I:L73E were described previously [18]. Using Q5® site-directed mutagenesis kit (New England Biolabs, Whitby, Ontario, Canada), the IE1A SUMO site K665 was mutated for an arginine (K665R), the SUMO Interacting Motif site was substituted for three alanines (⁶³⁸AAA⁶⁴⁰) and double mutant was achieved in the ⁶³⁸AAA⁶⁴⁰ construct.

SUMO/SIM site identification. Protein sequence of IE1A (UniProt Q69567) was paste into the web server sumosp.biocuckoo.org/online.php and the threshold was set at high for SUMO and SIM consensus. Only p value ≤ 0.007 were considered. Alignment of IE1A and IE1B (UniProt Q9QJ15) protein was done using SnapGene software.

In vivo SUMOylation assay. HEK293T cells were seeded at a density of 500 000 cells/well in a 6-wells plate with 2 ml of complete medium for 24 hours. The next day, cells were co-transfected with 2 or 3 μg of total DNA respective of the condition, with a ratio of 3:1 of polyethylenimine at 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (PEI):DNA, in a total volume of 200 μl of DMEM without any serum and antibiotics. Transfection reactions were incubated for 15 minutes at room temperature and added drop-wise in the respective wells. 48 hours post-transfection, cells were harvested and centrifuged. Pellets were resuspended in 500 μl of RIPA lysis buffer (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40) containing 1X Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 10 mM of N-Ethylmaleimide (NEM) and were lysed at 4°C for 30 minutes under rotation. Lysates were centrifuged for 10 minutes at 12 000 x g, at 4°C. Supernatants were collected in a new tube. 10% (50 μl) of each sample was kept for the input analysis and 10 μl of 5X loading buffer (0.5 M Tris-HCl pH6.8, 500 mM dithiothreitol, 350 mM SDS, 7.5 mM bromophenol blue, 50% glycerin) was added and conserved at -20°C until western blot analysis. The rest of the lysate was used for IE1 immunoprecipitation. Immunoprecipitation was done by adding 2 μg of polyclonal rabbit antibody IE1 to each sample and incubating for 2 hours at 4°C under rotation. After 2 hours, protein A/G agarose beads mix (1:1) were added to each sample an incubated overnight at 4°C under rotation. Following centrifugation, samples were washed three times in RIPA lysis buffer, resuspended in 100 μl of 2X loading buffer (0.5 M Tris-HCl pH6.8, 15% β -mercaptoethanol, 1.2% SDS, 0.5% bromophenol blue, 30% glycerol) and boiled for 5 minutes at 95°C, as well as input samples, for western blot analysis. For input analysis of IE1, β -tubulin, MYC (PML), and HA (SUMO proteins), 5 μl of samples were loaded into 8% SDS-PAGE gels. For SUMOylation analysis, immunoprecipitated lysates were loaded into 6% SDS-PAGE gels and labeled with IE1 and HA (SUMO proteins).

Immunofluorescence and microscopy. U2OS cells were seeded at 2 x 10⁵ cells/well in a 6-well plate containing five glass coverslips in 2 ml of medium. For immunofluorescence of HHV-6A infected conditions, cells were infected at a multiplicity of infection of 1 for 48 hours. Immunofluorescences in which plasmids were transfected were done following transfection of 2.5 μg of pcDNA4/TO or pcDNA4/TO-IE1A expression vector (or a DNA ratio of 1:1 for co-transfection with PML isoforms) using the TransIT-LT1 Transfection Reagent (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA). After 48 hours of transfection or infection, cells were washed 3 times with PBS 1X, fixed in 2% (wt/vol) paraformaldehyde/PBS 1X for 10 minutes at room temperature, washed 10 minutes with

PBS 1x and processed for immunofluorescence assay. Fixed cells on coverslips were incubated for 30 minutes in blocking solution (1 mg/ml BSA; 3% goat serum; 0.1% Triton X-100; 1 mM EDTA pH 8.0, in PBS 1X). After blocking, coverslips were incubated for 1 hour in primary antibodies diluted in blocking solution. IE1 was labeled with an anti-IE1-rabbit, endogenous PML was labeled with an anti-PML-mouse and PML isoforms were labeled with an anti-MYC-mouse. Coverslips were washed with PBS 1X, three times for five minutes and were incubated for 30 minutes with secondary antibodies diluted in blocking solution. IE1 was detected with an anti-rabbit-ALEXA-594 and PML were detected with an anti-mouse-ALEXA-488. Next, coverslips were washed three times for 5 minutes in PBS 1X. Coverslips were air dried at room temperature, kept in dark and mounted with SlowFade Gold Antifade reagent containing DAPI (Invitrogen, Eugene, Oregon USA). For immunofluorescence conjugated to hybridization in situ (IF-FISH), following the staining of antibodies, cells were fixed for 2 minutes at room temperature with 1% paraformaldehyde/PBS 1X. Coverslips were washed two times for five minutes with PBS 1X. Cells were dehydrated for 5 minutes in successive ethanol baths (70%, 95%, 100%). Once dried, coverslips were placed upside down on a drop of hybridizing solution (70% formamide; 0.5% blocking reagent; 10 mM Tris-HCl pH 7.2; 1/1000 Cy3 or Cy5-TelC PNA probe). Sample were denatured for 10 minutes at 80°C on a heated block. Coverslips were incubated over night at 4°C and kept in the dark. After hybridization, coverslips were washed two times for 15 minutes in washing solution (70% formamide; 10 mM Tris-HCl pH 7.2) and then washed 3 times for 5 minutes with PBS 1X. Samples were air dried, mounting media with DAPI was added and coverslips were sealed. Images were acquired with Wave FX-Borealis-Leica DMI 6000B microscope with the camera Image EM (Hamamatsu, 512x512 pixels) and Orca-R2 (Hamamatsu, 1344x1024 pixels) at 63X (Quorum Technologies, Puslinch, Ontario, Canada) using glycerol for immersion. The specificity and possibility of cross-leakage were validated previously [18]. Colocalization was done using ImageJ software JACoP. Image stacks were open in Fiji. Each nucleus was selected with a ROI and background was deleted throughout the stack of every channels. Next, stack for each channel of the ROI were duplicated and background in the nucleus was corrected to avoid false colocalization. A Costes auto threshold was applied to avoid manual subjectivity. Colocalization was quantified into Mander's colocalization coefficient (MCC). Data of MCC can be interpreted as the proportion of the dye A that colocalize with dye B and vice versa. Indicated values are between 0 and 1 where 1 stands for perfect colocalization.

Integration assay. Integration assays were performed as described previously [18, 29, 46]. Briefly, ten thousand cells per well (U2OS PML WT, U2OS PML^{-/-} #1, U2OS PML^{-/-} #2, HeLa LT PML WT, HeLa LT PML^{-/-} #1, HeLa LT PML^{-/-} #2 and PML restored) were seeded in 48-well plates. The next day, cells were infected with HHV-6A (U1102 strain) at a multiplicity of infection (MOI) of 1 followed by overnight incubation at 37°C. Cells were washed three times with PBS 1X to remove unabsorbed virions prior to the addition of fresh culture medium. Upon infection, cells were passaged for a month and DNA was isolated using the QIAamp DNA Blood Mini Kit as

described by the manufacturer (Qiagen Inc., Toronto, ON, Canada). The integration frequencies were determined by ddPCR as described [29]. The HHV-6A chromosomal integration frequencies were estimated assuming a single integrated HHV-6/cell and calculated with the following formula: (number of HHV-6 copies)/(number of *RPP30* copies/2 copies per cell) × 100, as previously described [29]. A chi-square statistical test was done to compare total copy numbers between each condition as described below.

2.9 References

1. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol*. 1999;73(10):8053–63.
2. Komaroff AL, Pellett PE, Jacobson S. Human herpesviruses 6a and 6b in brain diseases: Association versus causation. *Clin Microbiol Rev*. 2021 Dec 16;34(1):1–36.
3. Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J, Hadley SH, Luegmayr A, Ablashi D, et al. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(12):5563–8.
4. Daibata M, Taguchi T, Sawada T, Taguchi H, Miyoshi I. Chromosomal transmission of human herpesvirus 6 DNA in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998;352(9127):543–4.
5. Gravel A, Dubuc I, Morissette G, Sedlak RH, Jerome KR, Flamand L. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 as a predisposing risk factor for the development of angina pectoris. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(26):8058–63.
6. Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol Preval Chromosom Integr Hum herpesvirus 6 genomes blood UK blood donors*. 2004;73(3):465–73.
7. Bell AJ, Gallagher A, Mottram T, Lake A, Kane E V., Lightfoot T, et al. Germ-line transmitted, chromosomally integrated HHV-6 and classical hodgkin lymphoma. *PLoS One*. 2014;9(11).
8. Hoe NL, Tuke PW, Tedder RS, Aysha BK, Eglin RP, Atkinson CE, et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol*. 2007;79(1):45–51.
9. Ward KN, Thiruchelvam AD, Couto-Parada X. Unexpected occasional persistence of high levels of HHV-6 DNA in sera: Detection of variants A and B. *J Med Virol*. 2005;76(4):563–70.
10. Hubacek P, Hrdlickova A, Spacek M, Zajac M, Muzikova K, Sedlacek P, et al. Prevalence of chromosomally integrated HHV-6 in patients with malignant disease and healthy donors in the Czech Republic. *Folia Microbiol (Praha)*. 2013;58(1):87–90.
11. Osterrieder N, Wallaschek N, Kaufer BB. Herpesvirus genome integration into telomeric repeats of host cell chromosomes. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):215–35.
12. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Suzuki K, Matsubara T, Shimizu N, et al. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated human herpesvirus 6A in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin Infect Dis*. 2014;59(4):545–8.
13. Miura H, Kawamura Y, Kudo K, Ihira M, Ohye T, Kurahashi H, et al. Virological analysis of inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in three hematopoietic stem cell transplant patients. *Transpl Infect Dis*. 2015;17(5):728–31.
14. Hill JA, Sedlak RH, Zerr DM, Huang ML, Yeung C, Myerson D, et al. Prevalence of Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 in Patients with Human Herpesvirus 6-Central Nervous System Dysfunction. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(2):371–3.
15. Quintela A, Escuret V, Roux S, Bonnafous P, Gilis L, Barraco F, et al. HHV-6 infection after allogeneic

- hematopoietic stem cell transplantation: From chromosomal integration to viral co-infections and T-cell reconstitution patterns. *J Infect.* 2016;72(2):214–22.
16. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol.* 1999;73(10):8040–52.
 17. Wallaschek N, Sanyal A, Pirzer F, Gravel A, Mori Y, Flamand L, et al. The Telomeric Repeats of Human Herpesvirus 6A (HHV-6A) Are Required for Efficient Virus Integration. *PLoS Pathog.* 2016;12(5):1–15.
 18. Collin V, Gravel A, Kaufer BB, Flamand L. The promyelocytic leukemia protein facilitates human herpesvirus 6B chromosomal integration, immediate-early 1 protein multiSUMOylation and its localization at telomeres. *PLoS Pathog.* 2020;16(7).
 19. Lin DY, Huang YS, Jeng JC, Kuo HY, Chang CC, Chao TT, et al. Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors. *Mol Cell.* 2006;24(3):341–54.
 20. Chang HR, Munkhjargal A, Kim MJ, Park SY, Jung E, Ryu JH, et al. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen.* 2018;809(April 2017):99–107.
 21. Scherer M, Stamminger T. Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. 2016;90(13):5850–4.
 22. Sarge KD. Analysis of protein sumoylation. *Curr Protoc Protein Sci.* 2016;2016(February):14.8.1-14.8.8.
 23. Pichler A, Fatouros C, Lee H, Eisenhardt N. SUMO conjugation - A mechanistic view. *Biomol Concepts.* 2017;8(1):13–36.
 24. Stanton R, Fox JD, Caswell R, Sherratt E, Wilkinson GWG. Analysis of the human herpesvirus-6 immediate-early 1 protein. *J Gen Virol.* 2002;83(11):2811–20.
 25. Gravel A, Gosselin J, Flamand L. Human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19679–87.
 26. Wang L, Oliver SL, Sommer M, Rajamani J, Reichelt M, Arvin AM. Disruption of pml nuclear bodies is mediated by orf61 sumo-interacting motifs and required for varicella-zoster virus pathogenesis in skin. *PLoS Pathog.* 2011;7(8).
 27. Wang S, Long J, Zheng C fu. The potential link between PML NBs and ICPO in regulating lytic and latent infection of HSV-1. *Protein Cell.* 2012;3(5):372–82.
 28. Ishov AM, Stenberg RM, Maul GG. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: Definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol.* 1997;138(1):5–16.
 29. Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, Gilbert-Girard S, Collin V, Hall-Sedlak R, et al. Cell Culture Systems To Study Human Herpesvirus 6A/B Chromosomal Integration. *J Virol.* 2017;91(14):e00437-17.
 30. McManus FP, Bourdeau V, Acevedo M, Lopes-Paciencia S, Mignacca L, Lamoliatte F, et al. Quantitative SUMO proteomics reveals the modulation of several PML nuclear body associated proteins and an anti-senescence function of UBC9. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–15.
 31. van Damme E, Laukens K, Dang TH, van Ostade X. A manually curated network of the pml nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci.* 2010;6(1):51–67.
 32. Chu Y, Yang X. SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene.* 2011;30(9):1108–16.
 33. Reuter N, Schilling E-M, Scherer M, Müller R, Stamminger T. The ND10 Component Promyelocytic Leukemia Protein Acts as an E3 Ligase for SUMOylation of the Major Immediate Early Protein IE1 of Human Cytomegalovirus. *J Virol.* 2017;91(10):e02335-16.
 34. Condemine W, Takahashi Y, Zhu J, Puvion-Dutilleul F, Guegan S, Janin A, et al. Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Res.* 2006;66(12):6192–8.
 35. Cuchet D, Sykes A, Nicolas A, Orr A, Murray J, Sirma H, et al. PML isoforms I and II participate in PML-dependent restriction of HSV-1 replication. *J Cell Sci.* 2011;124(2):280–91.
 36. Wang P, Benhenda S, Wu H, Lallemand-Breitenbach V, Zhen T, Jollivet F, et al. RING tetramerization is required for nuclear body biogenesis and PML sumoylation. *Nat Commun.* 2018;9(1):1–10.
 37. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JMP, Botting CH, Naismith JH, et al. Polymeric Chains

- of SUMO-2 and SUMO-3 are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35368–74.
38. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, Yeh ETH. Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem.* 1998;273(41):26675–82.
 39. Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, Pandolfi PP. The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation (DOI:10.1016/j.molcel.2006.09.013). *Mol Cell.* 2006;24(5):805.
 40. Stehmeier P, Muller S. Phospho-Regulated SUMO Interaction Modules Connect the SUMO System to CK2 Signaling. *Mol Cell.* 2009;33(3):400–9.
 41. Arnoult N, Van Beneden A, Decottignies A. Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1 α . *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19(9):948–56.
 42. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):299–309.
 43. Lippert TP, Marzec P, Idilli AI, Sarek G, Vancevska A, Bower M, et al. Oncogenic herpesvirus KSHV triggers hallmarks of alternative lengthening of telomeres. *Nat Commun.* 2021;12(1).
 44. Deng Z, Kim ET, Vladimirova O, Dheekollu J, Wang Z, Newhart A, et al. HSV-1 Remodels Host Telomeres to Facilitate Viral Replication. *Cell Rep [Internet].* 2014;9(6):2263–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.019>
 45. Aimola G, Beythien G, Aswad A, Kaufer BB. Current understanding of human herpesvirus 6 (HHV-6) chromosomal integration: HHV-6 chromosomal integration. *Antiviral Res.* 2020;176(December 2019):104720.
 46. Gilbert-Girard S, Gravel A, Collin V, Wight DJ, Kaufer BB, Lazzerini-Denchi E, et al. Role for the shelterin protein TRF2 in human herpesvirus 6A/B chromosomal integration. *PLoS Pathog.* 2020;16(4):e1008496.
 47. Marchesini M, Matocci R, Tasselli L, Cambiaghi V, Orleth A, Furia L, et al. PML is required for telomere stability in non-neoplastic human cells. *Oncogene.* 2016;35(14):1811–21.
 48. Zhang JM, Yadav T, Ouyang J, Lan L, Zou L. Alternative Lengthening of Telomeres through Two Distinct Break-Induced Replication Pathways. *Cell Rep.* 2019;26(4):955-968.e3.
 49. Osterwald S, Deeg KI, Chung I, Parisotto D, Wörz S, Rohr K, et al. PML induces compaction, TRF2 depletion and DNA damage signaling at telomeres and promotes their alternative lengthening. *J Cell Sci.* 2015;128(10):1887–900.
 50. Chung I, Leonhardt H, Rippe K. De novo assembly of a PML nuclear subcompartment occurs through multiple pathways and induces telomere elongation. *J Cell Sci.* 2011;124(21):3603–18.
 51. Loe TK, Zhou Li JS, Zhang Y, Azeroglu B, Boddy MN, Denchi EL. Telomere length heterogeneity in ALT cells is maintained by PML-dependent localization of the BTR complex to telomeres. *Genes Dev.* 2020;34(9–10):650–62.
 52. Acharya S, Kaul Z, Gocha AS, Martinez AR, Harris J, Parvin JD, et al. Association of BLM and BRCA1 during telomere maintenance in ALT cells. *PLoS One.* 2014;9(8).
 53. Tatemichi Y, Shibazaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tada H, Oikawa H, et al. Nucleus accumbens associated 1 is recruited within the promyelocytic leukemia nuclear body through SUMO modification. 2015;(22).
 54. Flamand L, Gosselin J, D'Addario M, Hiscott J, Ablashi D V, Gallo RC, et al. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Virol.* 1991;65(9):5105–10.
 55. Jaworska J, Gravel A, Fink K, Grandvaux N, Flamand L. Inhibition of Transcription of the Beta Interferon Gene by the Human Herpesvirus 6 Immediate-Early 1 Protein. *J Virol.* 2007;81(11):5737–48.
 56. Gravel A, Dion V, Cloutier N, Gosselin J, Flamand L. Characterization of human herpesvirus 6 variant B immediate-early 1 protein modifications by small ubiquitin-related modifiers. *J Gen Virol.* 2004;85(5):1319–28.
 57. Kim YE, Ahn JH. Positive Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Type I Interferon Response and Its Regulation by Human Cytomegalovirus. *PLoS Pathog.* 2015;11(3):1–2

2.10 Supporting Information

(A)

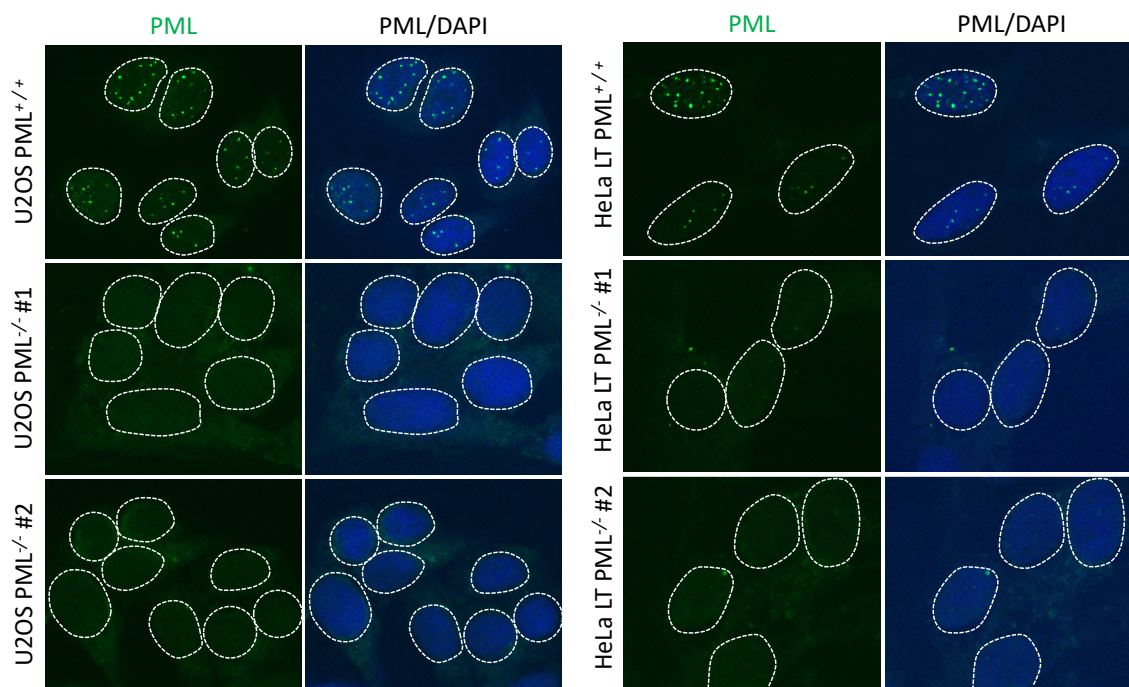


Figure S2.1. U2OS and HeLa LT $PML^{-/-}$ cells (A-B) Immunofluorescence images of PML expression in WT and $PML^{-/-}$ U2OS (A) and HeLa (B) cells.

ID	Position	Peptide	Score	Cutoff	P-value	Type
Unnamed	104	ASVKAAMKQEQSDME	11.245	2.13	0.011	Sumoylation Concensus
Unnamed	270	KQTLLEGKNEIVETN	3.643	3.32	0.048	Sumoylation Nonconcensus
Unnamed	329 – 333	ANTILQSIVICSNFESWQH	31.471	29.92	0.117	SUMO Interaction
Unnamed	408 – 412	TDPDSMILDLADFDHGR	41.132	29.92	0.089	SUMO Interaction
Unnamed	628	SPKNKKIKTDQLPKA	4.099	2.13	0.033	Sumoylation Concensus
Unnamed	638 – 642	OLPKAADVIVISESEDEE	60.511	29.92	0.007	SUMO Interaction
Unnamed	665	SILIKAIKSESDSES	33.713	2.13	0.001	Sumoylation Concensus
Unnamed	777	MNHFVPIKTDDEDYD	11.531	2.13	0.014	Sumoylation Concensus
Unnamed	923	SDGTEAFKLDGYPSD	3.063	2.13	0.043	Sumoylation Concensus

Figure S2.2. GPS-SUMO analysis for IE1A SUMO consensus/SIM sites. Shown in the green rectangle is the potential SIM site and shown in the red rectangle is the potential SUMO acceptor site.

Chapitre 3. Role for the shelterin protein TRF2 in human herpesvirus 6A/B chromosomal integration

Shella Gilbert-Girard^{1#}, Annie Gravel^{1#}, Vanessa Collin¹, Darren J. Wight², Benedikt B. Kaufer², Eros Lazzerini-Denchi³ and Louis Flamand^{1,4}

¹Division of Infectious Disease and Immunity, CHU de Québec Research Center, Quebec City, Quebec Canada, G1V 4G2;

²Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany;

³Laboratory of Genome Integrity, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA;

⁴Department of microbiology, infectious diseases and immunology, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Québec, Canada, G1V 0A6

#These authors contributed equally.

Email : Louis.flamand@crchudequebec.ulaval.ca

3.1 Résumé

Les herpesvirus humains 6A et 6B (HHV-6A/B) sont uniques parmi les herpesvirus humains par leur capacité à intégrer leur génome dans les chromosomes de l'hôte. L'intégration virale se produit aux extrémités des chromosomes, dans les télomères de l'hôte. Les extrémités des génomes d'HHV-6A/B contiennent des répétitions télomériques qui facilitent le processus d'intégration. Nous rapportons dans cette étude que les infections productives sont associées à une augmentation massive des séquences télomériques d'origine virale. La majorité des signaux télomériques viraux peuvent être détectés dans les compartiments de réplication virale (CRV) qui contiennent le facteur de processivité de l'ADN viral p41 et la protéine virale précoce immédiate 2 (IE2). Les composants du complexe protéique shelterin présents au niveau des télomères, TRF1 et TRF2, sont également recrutés dans le CRV pendant l'infection. L'immunofluorescence couplée l'hybridation *in situ* et l'immunoprécipitation de la chromatine ont démontré la liaison de TRF2 aux répétitions télomériques d'HHV-6A/B. De plus, environ 60 % des foyers de la protéine virale IE2 se localisent au niveau des télomères cellulaires au cours de l'infection. La déplétion transitoire de TRF2 a entraîné une localisation considérablement réduite (13 %) d'IE2 au niveau des télomères cellulaires ($p < 0.0001$). Enfin, la diminution de l'expression de TRF2 réduit la fréquence d'intégration HHV-6A/B ($p < 0.05$), alors qu'aucun effet n'a été observé sur l'efficacité de l'infection. Dans l'ensemble, notre étude a identifié que la protéine IE2 d'HHV-6A se localise aux télomères pendant l'infection et met en évidence le rôle de TRF2 dans l'infection par HHV-6A/B et l'intégration chromosomique.

3.2 Abstract

Human herpesviruses 6A and 6B (HHV-6A/B) are unique among human herpesviruses in their ability to integrate their genome into host chromosomes. Viral integration occurs at the ends of chromosomes within the host telomeres. The ends of the HHV-6A/B genomes contain telomeric repeats that facilitate the integration process. Here, we report that productive infections are associated with a massive increase in telomeric sequences of viral origin. The majority of the viral telomeric signals can be detected within viral replication compartments (VRC) that contain the viral DNA processivity factor p41 and the viral immediate-early 2 (IE2) protein. Components of the shelterin protein complex present at telomeres, including TRF1 and TRF2 are also recruited to VRC during infection. Biochemical, immunofluorescence coupled with *in situ* hybridization and chromatin immunoprecipitation demonstrated the binding of TRF2 to the HHV-6A/B telomeric repeats. In addition, approximately 60% of the viral IE2 protein localize at cellular telomeres during infection. Transient knockdown of TRF2 resulted in greatly reduced (13%) localization of IE2 at cellular telomeres ($p < 0.0001$). Lastly, TRF2 knockdown reduced HHV-6A/B integration frequency ($p < 0.05$), while no effect was observed on the infection efficiency. Overall, our study identified that HHV-6A/B IE2 localizes to telomeres during infection and highlight the role of TRF2 in HHV-6A/B infection and chromosomal integration.

3.3 Introduction

Human herpesvirus-6A (HHV-6A) and HHV-6B (HHV-6A/B) are two distinct betaherpesviruses with different epidemiological and biological characteristics [1]. HHV-6B is a ubiquitous virus that infects nearly 100% of world population and is the etiological agent of roseola infantum, an infantile febrile illness characterized by high fever and skin rash [2]. HHV-6B is also a concern in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients with frequent reactivation and medical complications [3]. Pathological and epidemiological data on HHV-6A remain scarce.

The viral genomes of HHV-6A/B are composed of a unique segment of approximately 143 kilo base pair (kbp) flanked at both extremities with identical and directly repeated (DR) termini of approximately 9 kbp each [4, 5]. Each DR contains two TTAGGG telomeric repeat arrays that are required for the integration of the HHV-6A/B genome into human chromosomes [6] and reviewed in [7, 8]. The number of TTAGGG telomeric repeats within each DR ranges from 15 to 180 in clinical isolates [9–12]. HHV-6A/B integration can occur in several distinct chromosomes, and it invariably takes place in the telomeric/sub-telomeric regions of chromosomes [13–16]. When integration occurs in a gamete, the viral genome can be inherited resulting in individuals carrying a copy of the viral genome in every cell, a condition called inherited chromosomally integrated HHV-6A/B (iciHHV-6A/B) [17]. Approximately 1% of the world population have this condition (reviewed in [8]). Chromosomally integrated HHV-6A/B are not silent and can spontaneously express viral genes with the U90 and U100 generally being the most abundant in various tissues [18, 19]. Expression of such viral genes is correlated with a greater antibody response in iciHHV-6A/B subjects relative to age and sex matched controls [19]. The consequences of having iciHHV-6A/B are not well defined, but a recent study suggests that these individuals are at greater risks of developing angina pectoris [20].

Mammalian chromosome extremities consist in 5–50 kbp of (TTAGGG)_n repeats followed by a single-stranded 3'-overhang of 200 +/-75 TTAGGG nucleotides [21]. With each cell division, the extremities of the chromosomes are not completely replicated due to the end replication problem of the cellular DNA polymerase [22]. As a consequence, the telomeres shorten with every cell division until they reach a minimal length threshold, which triggers DNA damage activation via the ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) or the ATM (ataxia telangiectasia mutated) pathway, ultimately leading to senescence or cell death (reviewed in [23, 24]). In the absence of telomere elongation processes, such as expression of telomerase or activation of the alternative lengthening of telomere (ALT) pathway, somatic cells are limited in their number of replication cycles.

To prevent activation of DNA damage recognition pathways, telomeres are protected by a six-member protein complex, termed shelterin [23]. The shelterin components TRF1 and TRF2 form homodimers that bind the double-strand TTAGGG repeats and recruit the rest of the complex (TPP1, RAP1, TIN2 and POT1) to chromosome ends [25–27]. The shelterin complex folds telomeric DNA into a secondary structure called the T-Loop, preventing the recognition of the telomere extremity as a double-strand break (DSB) [28]. TRF2 represses activation of the ATM pathway [29] and plays an essential role in end-to-end chromosome fusions mediated by the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway [30, 31]. POT1 binds to the single-strand section of the telomeres and protects the telomeres against activation of the ATR pathway [30, 32–34].

Certain viruses are reported to affect telomeres in different ways. For example, infection by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) alters telomere integrity through transcriptional activation of the telomeric noncoding RNA (TERRA), loss of total telomeric DNA, selective degradation of TPP1, reduction of telomere-bound shelterin and accumulation of DNA damage at telomeres [35]. Telomere remodeling is presumed to be required for ICP8-nucleation to form a pre-replication compartment that stimulates HSV-1 replication [35]. The Epstein-Barr virus (EBV) LMP1 protein was reported to downmodulate the expression of TRF1, TRF2 and POT1 shelterin genes resulting in telomere dysfunction, progression of complex chromosomal rearrangements, and multinuclearity [36, 37]. The impact of HHV-6A/B infection on telomere biology is currently unknown. Considering that telomeres are the preferred sites for HHV-6A/B integration, it is important to understand the dynamic processes occurring during the early phases of infection to gain insights into the integration mechanisms. In the present study, we analyzed the impact of HHV-6A/B infections on shelterin complex homeostasis and show for the first time that the shelterin components are recruited to the viral DNA during infection and play a critical role in HHV-6A/B chromosomal integration.

3.4 Results

3.4.1 Telomeric sequence accumulation during HHV-6A infection

Telomeres protect chromosomes from the loss of genetic information due to end replication problem and the shelterin complex prevents induction of a DNA damage response (DDR). Interestingly, each end of the HHV-6A/B genome also contains telomeric repeats arrays that vary in number between 15 and 180 [9–12] (**Figure 3.1A**). During infection, viral replication compartments (VRC) can be visualized by staining cells with antibodies against the DNA polymerase processivity factor p41, encoded by the U27 gene, that associates with the viral DNA during replication (**Figure 3.1B**). The majority (92% ± 7%) of HHV-6A immediate-early 2 (IE2) protein

colocalizes with the p41 protein and is used in subsequent experiments as marker of VRC [50]. Using immunofluorescence combined with fluorescent in situ hybridization (IF-FISH), we first studied the accumulation of telomeric sequences during active HHV-6A infection. Hybridization of mock-infected HSB-2 cells with a telomeric probe resulted in the detection of many discrete punctate telomeric signals corresponding to terminal chromosomal telomeric repeats (**Figure 3.1B and C**). In contrast, a mixture of small and large telomeric signals were observed during HHV-6A infection. At late stages of infection when viral genome replication is abundant, very intense telomeric signals were detected. These telomeric signals correspond to replicating virus genomes as they localize with the p41 (**Figure 3.1B**) and IE2 protein (**Figure 3.1C**). Similar accumulation of telomere signal resembling VRC were observed in HHV-6B-infected cells (**Figure 3.1D**). Considering that our IE2 antibody is specific for HHV-6A, staining for HHV-6B IE2 was not possible [46, 51]. Next, the increase in telomeric signals observed by IF-FISH was confirmed by dot blot hybridization. DNA from uninfected and HHV-6A/B infected cells was hybridized with a telomeric probe to estimate overall telomeric repeats. Hybridization with an Alu probe was used for normalization. HHV-6A/B infection resulted in a 2.5x to 2.9x increase in the total number of telomeric signals relative to uninfected cells (**Figure 3.1E**). To determine the origin (cellular or viral) of the increased telomeric signals, DNA from uninfected and HHV-6A/B infected cells was analyzed by terminal restriction fragment (TRF) analysis and southern blot hybridization with a telomeric probe. As shown in **Figure 3.1F**, HSB-2 and Molt-3 uninfected cells displayed telomeric signal with lengths \approx 4kbp. In addition to the cellular telomeric signal observed, HHV-6A/B-infected cells displayed abundant signals that were smaller in size (<2kbp) and much stronger in intensity, likely representing viral telomeric repeats. To confirm the viral origin of these telomeric repeats, J-Jhan cells were infected with HHV-6A U1102 (control), WT HHV-6A-BACs or HHV-6A Δ TMR BAC that lacks the viral telomeric sequences [6]. In J-Jhan cells, low molecular weight telomeric signals were detected in HHV-6A and WT HHV-6A BACs but were absent in cells infected with HHV-6A Δ TMR BAC confirming the viral origin of telomeric signal. Infection was confirmed by hybridizing the membrane with a probe corresponding to the HHV-6A U94 gene, expected to hybridize to a 964 bp viral DNA fragment.

The accumulation of telomeric sequences was also confirmed by IF-FISH using J-Jhan cells infected with HHV-6A recombinant BACs. As with HSB-2 cells, mock-infected J-Jhan showed typical telomeric staining (**Figure 3.1G**, first row). J-Jhan cells productively infected with HHV-6A demonstrated large telomeric signals that colocalized with the viral IE2 protein (second row). To demonstrate that the increased telomeric signals observed originates from viral DNA, we made use of HHV-6A mutants lacking either only the imperfect telomeric repeats (Δ impTMR) or all telomeric repeats (Δ TMR) [6]. Infection with the Δ impTMR mutant still resulted in a strong and patchy telomeric signals (**Figure 3.1G**, third row). In contrast, telomeric hybridization signals in Δ TMR-infected J-Jhan cells were similar to those observed in uninfected J-Jhan cells (**Figure 3.1G** last row), confirming that telomeric sequences within the viral genome were responsible for the increased telomeric signals observed.

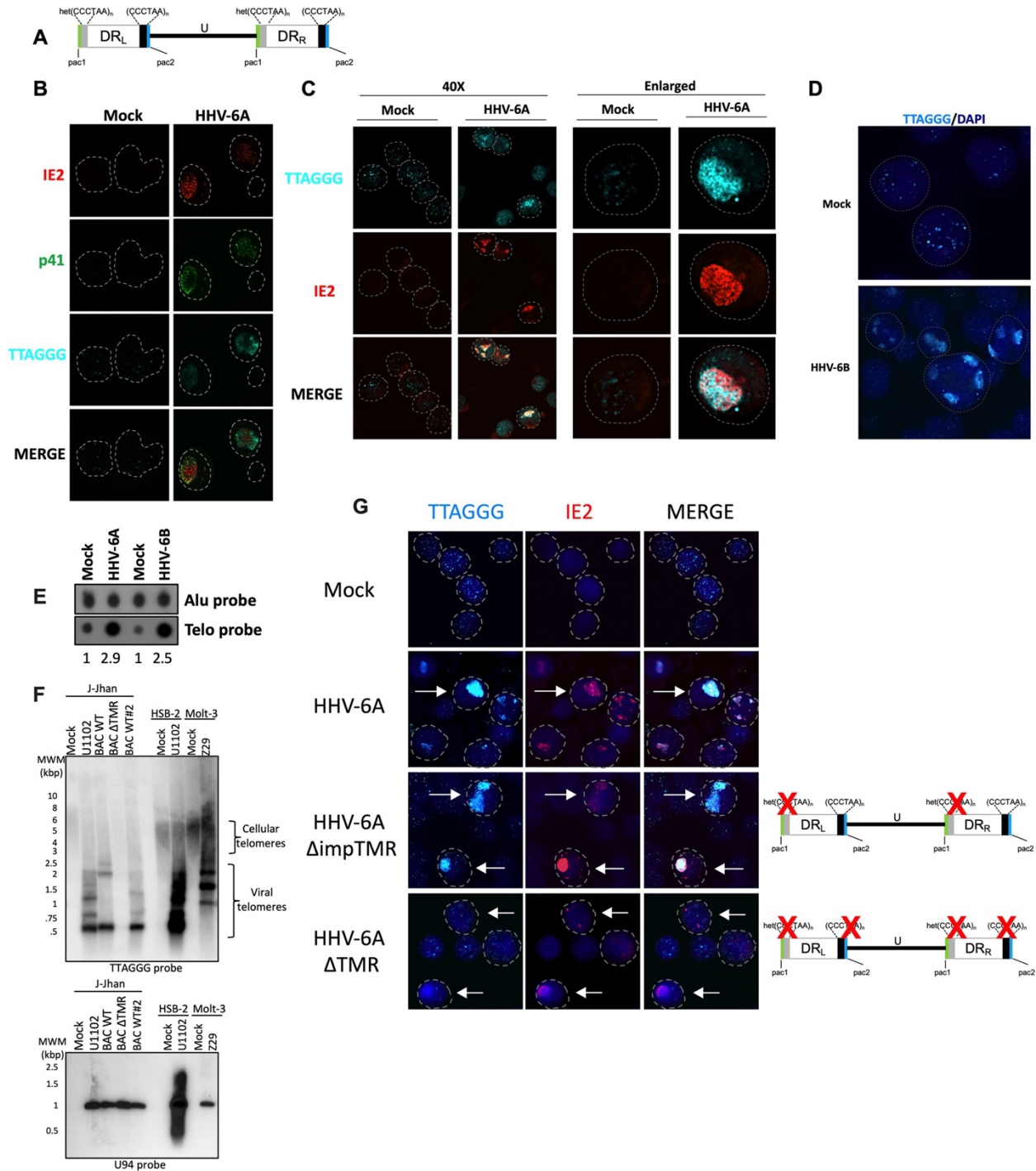


Figure 3.1 - Accumulation of viral telomeric signals during HHV-6A infection. (A) Schematic representation of the HHV-6A/B genome. The unique (U) region of the HHV-6A/B genome (143-145 kbp) is flanked by two direct repeat sequences (8-10 kbp) referred to as DR_L and DR_R. The DRs contain perfect (TTAGGG)_n and imperfect (het(TTAGGG)_n) telomeric sequences. The genome is not drawn to scale. **(B)** HSB-2 cells were mock treated or infected with HHV-6A. After 5 days, cells were processed for IF-FISH to detect HHV-6A IE2 protein (red), p41 (green) and telomeres (cyan) to appreciate HHV-6A VRC. Nuclei are outlined by the circular dashed lines. **(C)** Mock or HHV-6A-infected HSB-2 cells were processed for IF-FISH to detect IE2 and telomeric signals

patterns in presence of HHV-6A. Low and high magnifications of cells are presented. Nuclei are outlined by circular dashed lines. **(D)** Molt-3 cells were infected with HHV-6B for 4 days and hybridized with a telomeric probe (cyan) with nuclei stained with DAPI. Nuclei are outlined by circular dashed lines. **(E)** HSB-2 and Molt-3 cells were respectively infected with HHV-6A and HHV-6B. After 5 days, total DNA was isolated and analyzed by dot blot hybridization using Alu and telomeric probes. The relative increase in telomeric signals was determined by densitometry after normalization to uninfected controls. **(F)** HSB-2 and Molt-3 cells were respectively infected with HHV-6A and HHV-6B. J-Jhan cells were infected with HHV-6A U1102, WT HHV-6A BACs or HHV-6A BAC Δ TMR. After 4 days, DNA was extracted, digested with HinfI and RsaI and processed for southern blot hybridization using 32 P-labeled telomeric and U94 probes. **(G)** J-Jhan cells were infected with HHV-6A U1102, WT recombinant HHV-6A BACs, HHV-6A mutant lacking the imperfect telomeric repeats (Δ impTMR) or HHV-6A mutant lacking all telomeric repeats (Δ TMR). After 5 days of infection, cells were processed for IF-FISH to HHV-6A IE2 protein and telomeres (cyan). Some infected cells expressing IE2 are identified by arrows. Nuclei were stained with DAPI and outlined by dashed lines.

3.4.2 Binding of TRF2 to viral telomeric sequences

Telomeres are protected by the shelterin complex of which TRF1 and TRF2 bind directly to TTAGGG repeats; however, it remains unknown if shelterin proteins bind to viral telomeric sequences in the context of the HHV-6A/B genomes. To study TRF2 binding to viral TMRs, a recombinant MBP-TRF2 protein was generated. To validate that MBP-TRF2 was functional and capable of binding telomeric DNA, we performed EMSA. MBP-TRF2 efficiently bound dsDNA with telomeric sequences causing a mobility shift (**Figure 3.2A**). MBP alone did not bind the telomeric probe. The specificity of MBP-TRF2 binding was confirmed by competition with excess unlabeled telomeric and non-telomeric oligonucleotides. Excess (100–1000 fold) of unlabeled telomeric oligonucleotides efficiently competed with labeled telomeric probes. No such competition was observed with excess non-telomeric oligonucleotides. Lastly, no binding of MBP or MBP-TRF2 was observed using non-telomeric labeled probes (**Figure 3.2B**). After validation of the specific binding to telomere sequences of the recombinant MBP-TRF2 protein, we next determined if MBP-TRF2 could bind to HHV-6A TMR DNA. To study this, DIG-labeled HHV-6A-BAC DNA was digested with the HaeIII enzyme that cuts on both sides of the viral TMR and more than 250 times in the viral genome. MBP and MBP-TRF2 coated wells were incubated with the mixtures of DNA fragments (25 ng) and DNA binding was measured using anti-DIG antibodies. MBP did not bind viral DNA, in contrast to MBP-TRF2 that efficiently bound viral DNA (**Figure 3.2C**). Specificity of MBP-TRF2 binding to viral TMR was confirmed through competition with unlabeled ds oligonucleotides containing telomeric motifs (Telo comp) but not by ds oligonucleotides with non-telomeric motifs (non Telo comp). Our in vitro binding assay revealed that the recombinant MBP-TRF2 efficiently binds to viral DNA at TMRs.

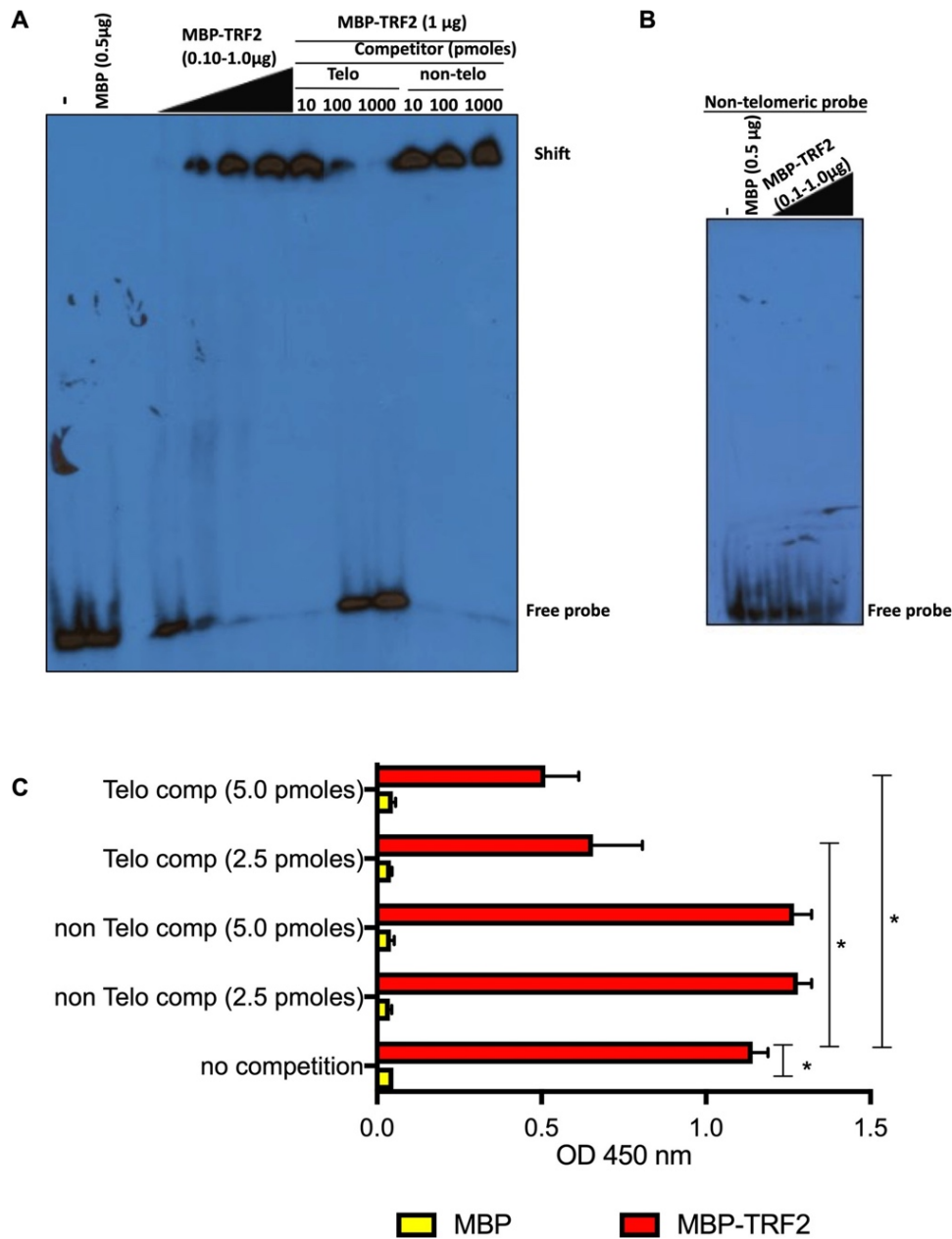


Figure 3.2 - Binding of TRF2 to HHV-6A viral DNA. (A) Recombinant MBP or MBP-TRF2 were incubated with ³²P-labeled telomeric dsDNA and binding was assessed by EMSA. Excess of unlabeled telomeric and non-telomeric dsDNA were added as competitors. Samples were migrated on non-denaturing acrylamide gel, dried and exposed to X-ray films. (B) Recombinant MBP or MBP-TRF2 were incubated with ³²P-labeled non-telomeric dsDNA and binding was assessed by EMSA. (C) Recombinant MBP and MBP-TRF2 were coated to the wells of a 96 well-plate and incubated with HaeIII digested DIG-labeled HHV-6A DNA (25 ng/condition) in the presence or absence of competitors. After washing, bound DNA was quantified by adding peroxidase-labeled anti-DIG antibodies and substrate. Results are expressed as mean absorbance +SD of triplicate values. Experiment is representative of two additional experiments. * P<0.001.

To provide additional support that TRF2 binding occurs during infection, we performed TRF2 ChIP in HHV-6A and HHV-6B productively-infected cells. Uninfected cells were used as negative controls. To discriminate between telomeres of cellular and viral origin, the TRF2 immunoprecipitated DNA was hybridized with the DR6 probe, corresponding to regions adjacent (1.5kbp) to the TMR in the virus genome (refer to **Figure 3.3A**). As positive control, binding of PolIII to the GAPDH promoter was analyzed by qPCR. As shown in **Figure 3.3B**, GAPDH promoter sequences were highly enriched following anti-PolIII precipitation. Next, DNA bound to TRF2 was immunoprecipitated (IP) using anti-TRF2 antibodies and the corresponding DNA analyzed by dot blot hybridization. Hybridization with a telomeric probe indicates that TRF2 efficiently bound telomeres in both uninfected and HHV-6A- and HHV-6B-infected cells (**Figure 3.3C–3F**). Compared to uninfected cells, a stronger telomeric signal was observed in infected cells. TRF2 also precipitated DNA that hybridized preferentially (10-fold) with the DR6 probe in HHV-6A-infected cells (**Figure 3.3C and 3D**). As negative control, DNA was immunoprecipitated with an irrelevant mouse anti-IgG. Similar results were obtained for HHV-6B (**Figure 3.3E and 3F**). In summary, these assays provide evidence that TRF2 binds the telomeric motifs present in HHV-6A/B DNA during productive HHV-6A/B infections

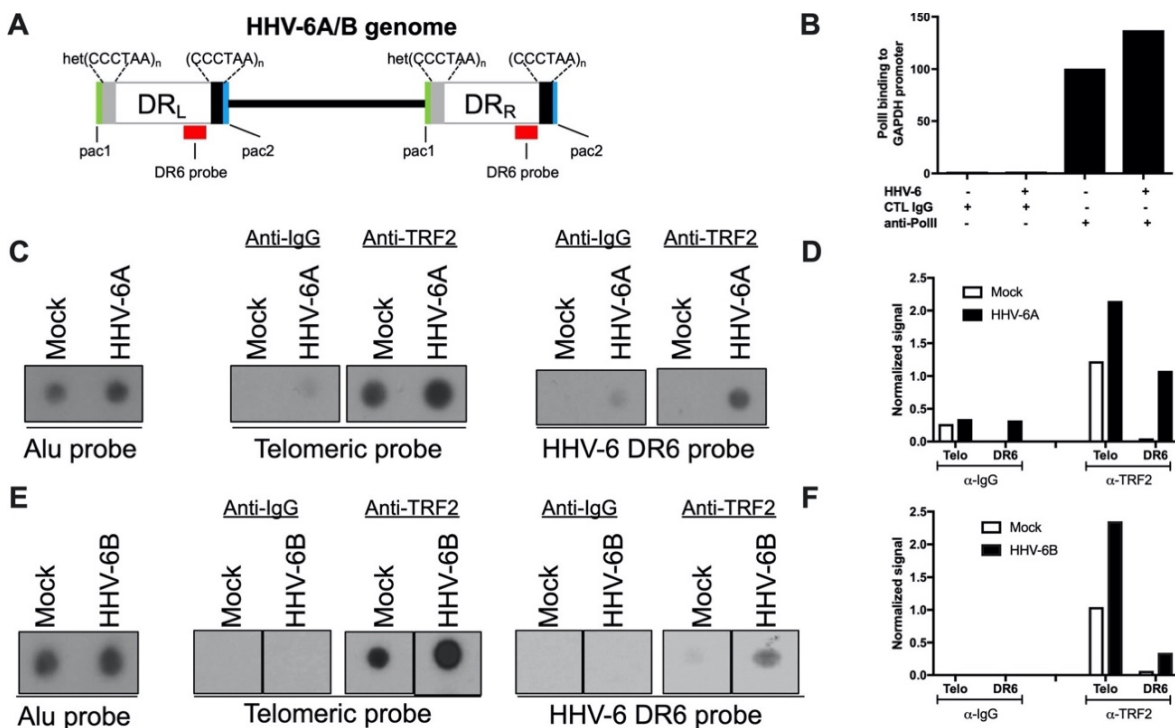


Figure 3.3 - Binding of TRF2 to viral DNA during HHV-6A/B infection. (A) Schematic representation of the HHV-6A/B genome. The DR6 probe used for hybridization is shown in red. Uninfected and HHV-6A-infected HSB-2 cells (B-D) or uninfected and HHV-6B-infected Molt-3 cells (E-F) were analyzed for TRF2 binding to viral DNA using ChIP. The input was hybridized with Alu probe to assess quantity of starting material. Anti-IgG (negative control), anti-PolIII (positive control) or TRF2 antibodies were used for immunoprecipitation. (B) qPCR

detection of GAPDH DNA following ChIP. Results are expressed as fold increase over control IgG. **(C and E)** Eluted DNA was hybridized with ³²P-labeled Alu, telomeric (TTAGGG)₃ or HHV-6A (DR6) probes. After hybridization the membranes were washed and exposed to X-ray films. **(D and F)** Densitometric analysis of relative binding of TRF2 to telomeric and viral DNA. Results of one experiment representative of three are presented and are expressed as signal after normalization to input.

3.4.3 HHV-6A and shelterin during infection of U2OS cells

Considering that HHV-6A/B integration invariably occurs in telomeres of infected cells, we surmise that shelterin proteins likely play a role in viral integration. As most T cells are lytically infected and subsequently killed, HHV-6A/B integration does not occur frequently in these cells. We therefore studied the fate of shelterin proteins in HHV-6A/B-infected U2OS cells that are semi-permissive to infection and used to study viral integration [18]. After 24h, 48h and 72h post-infection, individual cells were analyzed for TRF2 expression. Infected cells were distinguished from uninfected bystander cells using the HHV-6A specific anti-IE2 antibody (**Figure 3.4A**). Depending on the time of infection, between 38% (24 h post infection) and up to 60% (72h post-infection) of IE2 colocalized with TRF2. TRF2 fluorescence was quantified using ImageJ software. The results obtained indicate that starting at 24h post-HHV-6A infection, TRF2 expression gradually increases as infection progresses. TRF2 is expressed at significantly higher levels in infected cells relative to bystanders or uninfected cells ($p < 0.02$) (**Figure 3.4B**). No significant difference in TRF2 expression was detected between bystander and mock-treated cells. In summary, these results indicate that expression of TRF2 increases during HHV-6A-infection of U2OS cells.

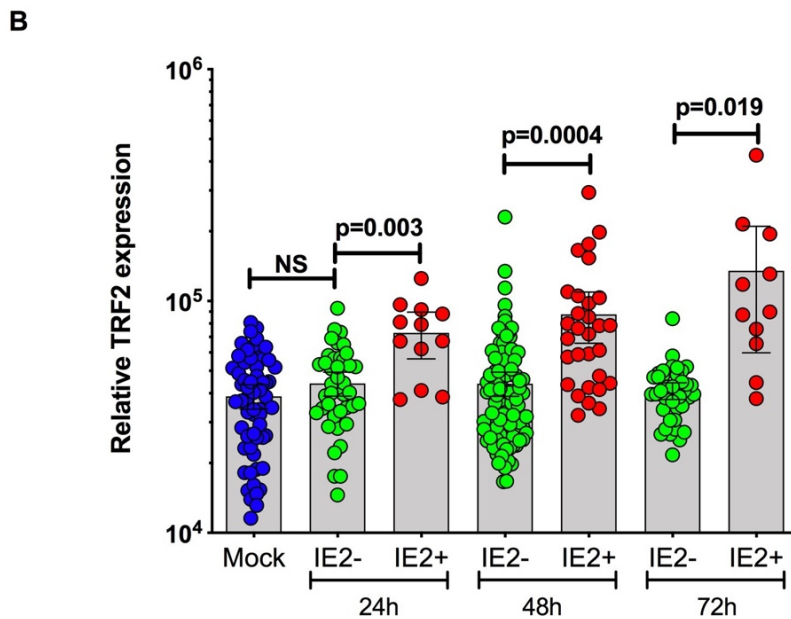
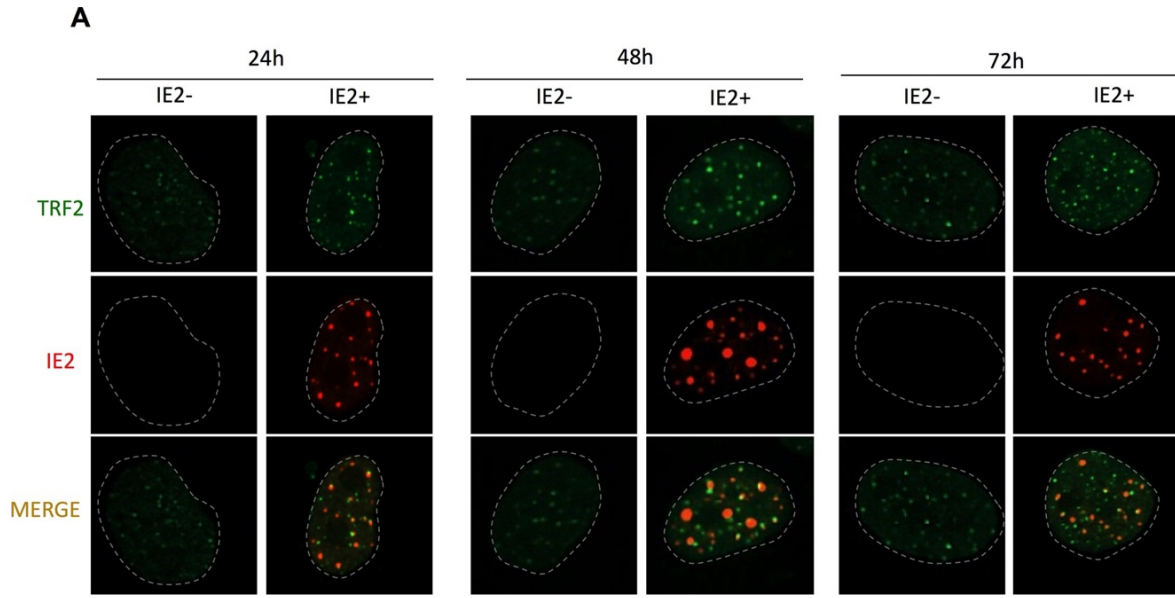


Figure 3.4 - TRF2 expression in HHV-6A-infected U2OS cells. U2OS cells were infected with HHV-6A and analyzed for TRF2 and IE2 expression at 24h, 48h and 72h post-infection by dual color immunofluorescence. **(A)** Representative immunofluorescence of TRF2 and IE2 expression in bystander and IE2 expressing cells at 24, 48h and 72h post infection. **(B)** Mean relative TRF2 expression \pm SD in uninfected (blue), IE2- (green-uninfected bystander) or IE2+ (red-infected) cells at 24h, 48h and 72h post infection. Each symbol represents the relative TRF2 expression from a single nucleus.

Colocalization of TRF2 with viral DNA during infection of U2OS cells was studied next. Although permissive to entry and expression of viral genes, viral DNA replication is observed only in a minority of HHV-6A/B infected U2OS cells. As shown in **Figure 3.5A** (middle row), some cells display large patchy IE2 staining similar to what is observed during productive infection of T cells (**Figure 3.1B and C**) and likely representing VRC. Such IE2 patches overlapped with diffuse TRF2 and telomeric signals. Uninfected cells (top row) only showed punctate and sharp TRF2 and telomeric signals. In the majority of cells, (bottom row), the presence of diffuse telomeric signals and “patchy” IE2 was not observed. In these cells, IE2 is present as small punctate structures. On average, $47\% \pm 25\%$ of punctate IE2 colocalized with TRF2 and telomeres. We next investigated whether TRF1, another shelterin protein binding to TTAGGG repeats, colocalizes with HHV-6A DNA during infection. U2OS were transfected with a myc-tagged-TRF1 expression vector, infected with HHV-6A and analyzed by IF-FISH. We used an expression vector to express a tagged version of TRF1 since available antibodies against TRF1 were not specific. As shown in **Figure 3.5B**, in addition to its typical punctate pattern, TRF1 also was distributed in diffuse patches that colocalized with IE2/VRC ($78\% \pm 20\%$).

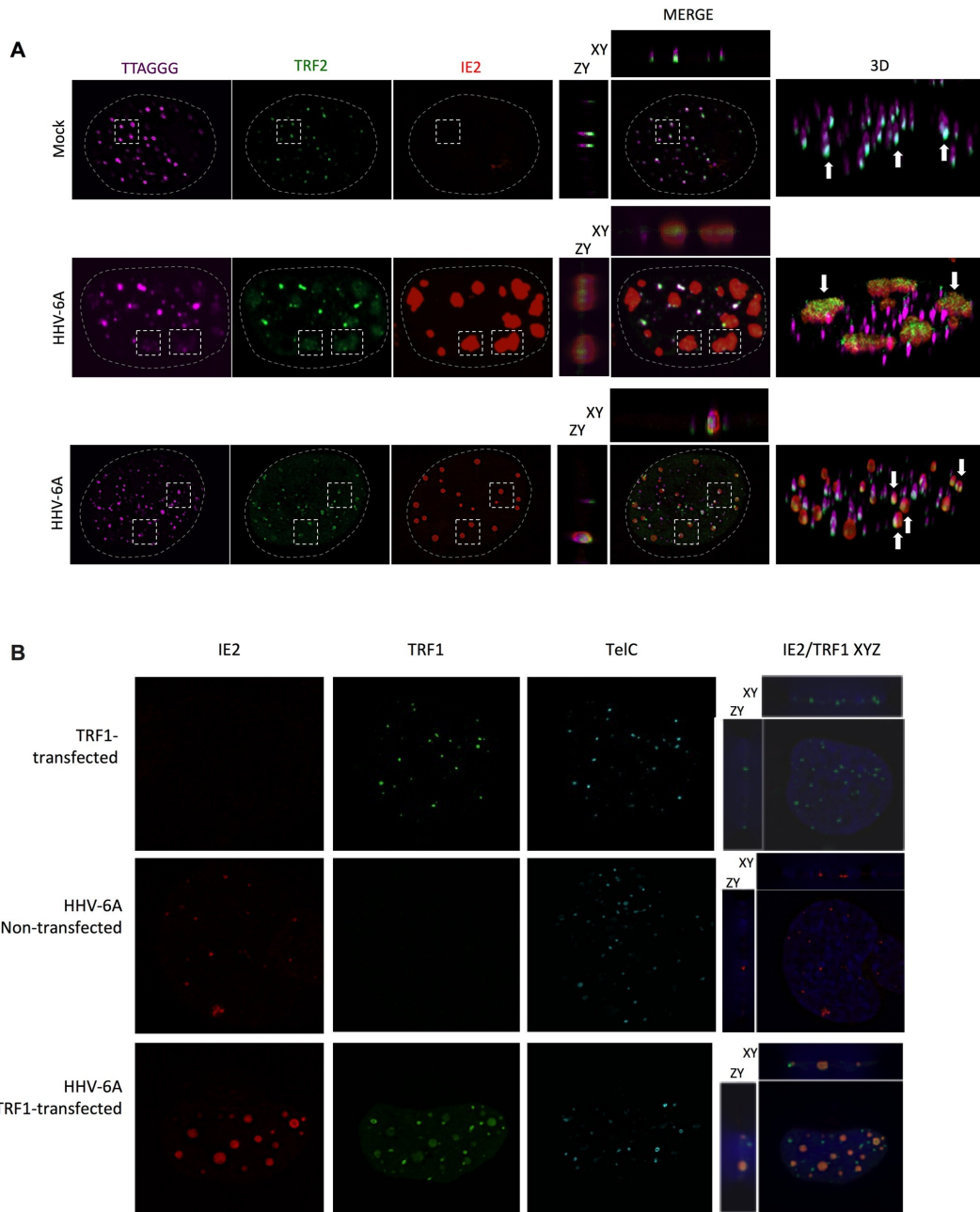


Figure 3.5 - Colocalization of shelterin complex proteins and HHV-6A IE2 protein at VRC and cellular telomeres. (A) U2OS cells were mock-infected or infected with HHV-6A for 48h after which cells were processed for IF-FISH. Telomeres were labeled in magenta, TRF2 in green and IE2 in red. The panels in the middle row show images of cells with IE2 patches overlapping with large, diffuse TRF2 and telomeric staining (rectangles). The panels in the third row represent infected cells with punctate IE2 pattern colocalizing with TRF2 and telomeres (dashed squares). The colocalization of IE2, TRF2 and telomeres are shown in both 2D and 3D images. (B) Uninfected and HHV-6A-infected U2OS cells were transfected with an empty vector, a myc-tagged-TRF1 expression vector. Forty-eight hours later cells were processed for IF-FISH. TRF1 was labeled in green and IE2 in red. Nuclei were stained with DAPI. Images on the far-right show 2D colocalization of TRF1 with IE2.

Results from **Figures 3.4** and **3.5** indicated that a significant proportion of IE2 colocalizes with TRF1, TRF2 and telomeres during infection. We next determined whether ectopically-expressed IE2 (**Figure 3.6A**) would also localize with telomeres in the absence of other viral proteins and viral DNA. U2OS were transfected with an empty vector or an IE2 expression vector and cells were analyzed by IF-FISH 48h later. In the absence of viral DNA, IE2 always distributes itself with a punctate nuclear distribution. In average, $58\% \pm 30\%$ of IE2 foci colocalized with cellular telomeres (**Figure 3.6B and 6C**). Considering that IE2 possesses a DNA-binding domain (DBD), its telomeric localization was studied next. The IE2 mutant ($\Delta 1290-1500$) lacking the DBD localized with telomeres with equal efficiency ($57\% \pm 22\%$) as WT IE2, indicating that the DBD is dispensable for IE2 localization with telomeres (**Figure 3.6B and 6C**). There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) in the telomere colocalization frequencies between IE2 expressed during infection and ectopically expressed IE2. Lastly and as further control, we analyzed the nuclear distribution and colocalization of ectopically expressed p41 viral protein with TRF2. As shown in **Figure 3.6D**, ectopically expressed p41 exhibited mostly a perinuclear distribution that did not colocalize with cellular telomeres.

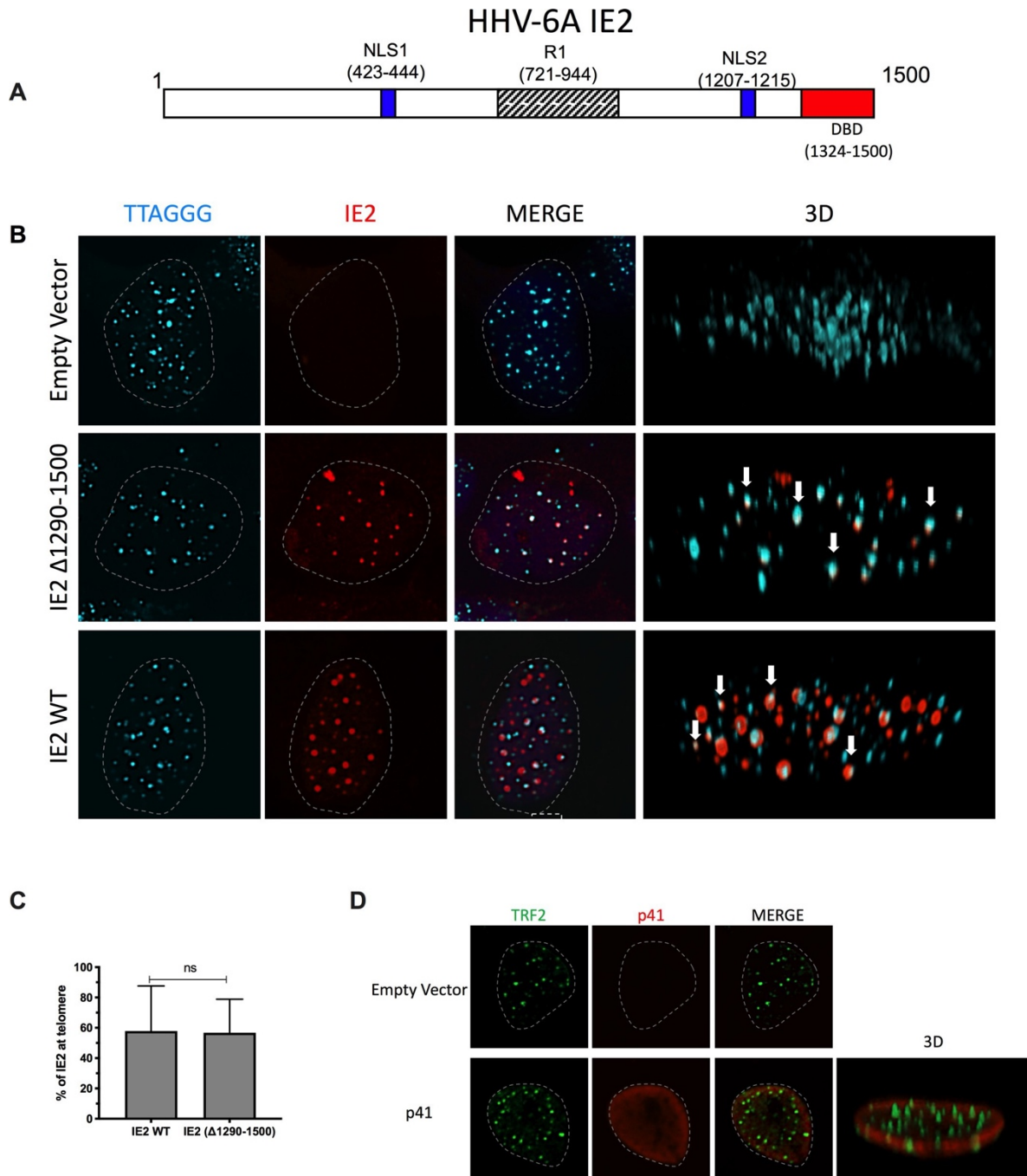


Figure 3.6 (A) A stick diagram of the IE2 protein with various domains identified is presented. (B) Colocalization of HHV-6A IE2 protein with telomeres in the absence of viral DNA. U2OS cells were transfected with an empty vector, with IE2 expression vector or with IE2 Δ 1290-1500 expression vector. Forty-eight hours later cells were processed for dual color immunofluorescence. Telomeres were labeled in cyan and IE2 in red. Nuclei are outlined by dashed lines. Examples of IE2 colocalizing with telomeres are presented in a 3D view (white arrows). (C) The graph represents the mean \pm SD % of WT IE2 and Δ 1290-1500 IE2 localizing with telomeres. (D) Lack of colocalization between HHV-6A p41 and telomeres in uninfected cells. U2OS cells were transfected with an empty vector or with a p41 expression vector. Forty-eight hours later cells were processed for dual color immunofluorescence. TRF2 was labeled green, p41 in red and nuclei outlined by a dashed line.

3.4.4 TRF2 is essential for efficient localization of IE2 at cellular telomeres

Considering that HHV-6A IE2 colocalizes with TRF2 at cellular telomeres and with TRF2 at VRC, we hypothesized that TRF2 might influence IE2 localization. We generated a U2OS cell line carrying a doxycycline (Dox)-inducible shRNA targeting TRF2 mRNA. Incubation of cells with Dox for 7 days resulted in TRF2 knockdown (**Figure 3.7A and B**). In both control and TRF2 knockdown cells, the IE2 nuclear distribution, whether as punctate foci or patches, was similar (**Figure 3.7B**). The percentage of HHV-6A-infected cells was also equivalent in the presence or absence of TRF2 (**Figure 3.7C**). However, when the localization of IE2 at cellular telomeres was estimated, we observed a significant reduction of IE2 at cellular telomeres in the absence of TRF2 (**Figure 3.7D**). In shCtrl cells (+Dox), 65±23% of IE2 foci were found localizing with telomeres while in shTRF2 (+Dox) treated cells, 13±6% of IE2 foci were found with telomeres ($p < 0.0001$). Confocal IF-FISH revealed the lack of localization of IE2 with telomeres in the absence of TRF2 (**Figure 3.7E**).

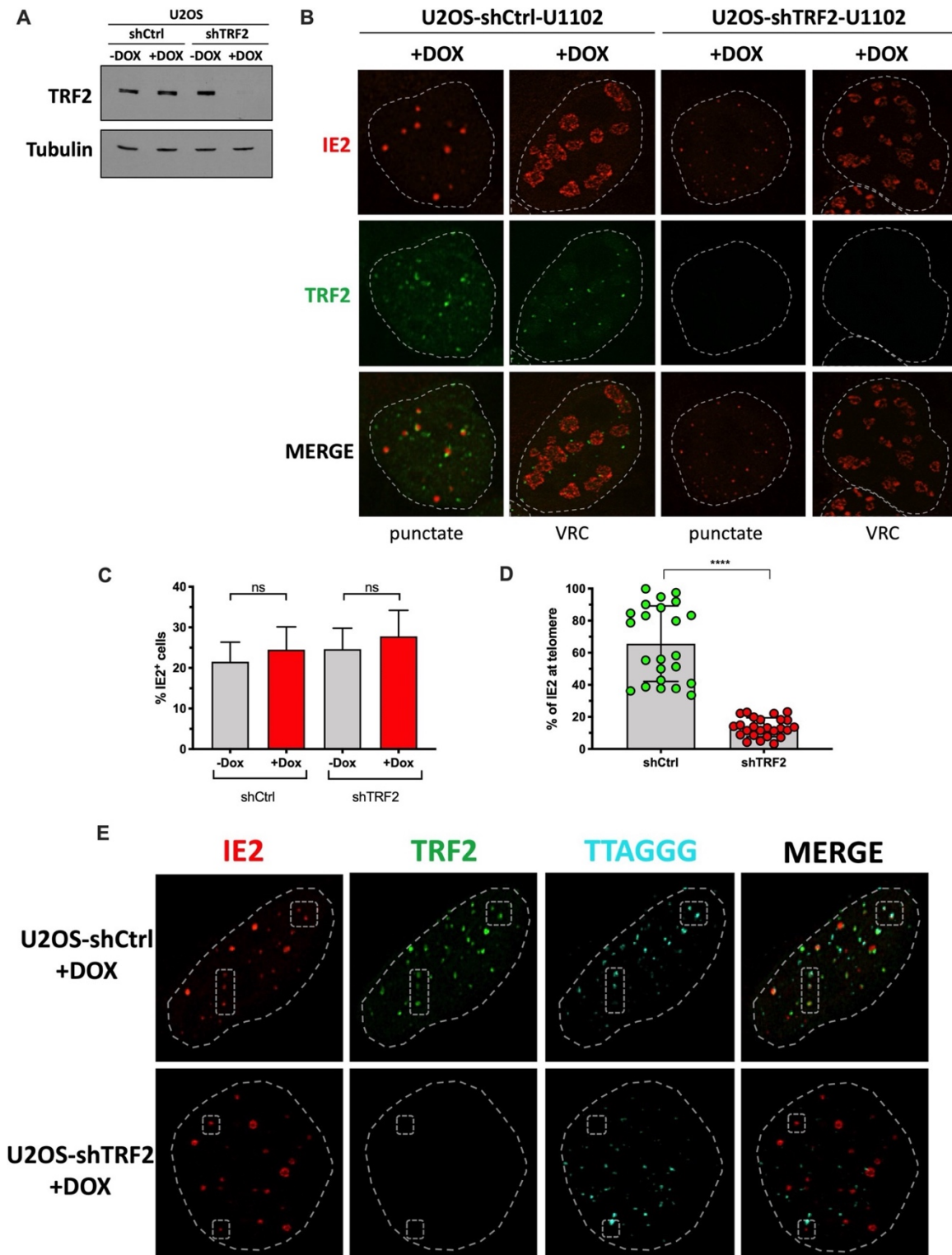


Figure 3.7 - TRF2 is required for IE2 localization with telomeres. U2OS cells were transduced with a lentiviral vector coding for a Dox inducible control shRNA (shCtrl) or a shRNA against TRF2 (shTRF2) and selected with puromycin +/- Dox for a week. **(A)** Western blot analysis of TRF2 expression one week post selection. Membranes were also probed with anti-tubulin antibodies to show the input material loaded. **(B)** One week post

selection, +Dox cells were infected with HHV-6A for 48h and processed for IFA using anti-TRF2 (green) and anti-IE2 (red). Cells with IE2 in punctate form and cells with large patchy IE2, likely to represent VRC, are shown. Nuclei are outlined by dashed lines. **(C)** The percentage of HHV-6A infected cells (from B) was estimated after counting a minimum of 700 cells and scoring the IE2⁺ ones. Results are expressed as mean %IE2⁺ cells \pm SD. **(D)** Mean percentage \pm SD of IE2 localizing with telomeres in the presence (shCtrl +Dox) and absence (shTRF2 +Dox) of TRF2. Each dot represents the % of IE2 foci localizing with telomeres in one nucleus. ****p<0.0001. **(E)** IF-FISH confocal images of shCtrl (+Dox) and shTRF2 (+Dox) cells analyzed for TRF2 (green), IE2 (red) and telomeres (cyan). Nuclei are outlined by dashed circles. Examples of IE2 localizing with telomeres (top row) or not found with telomeres (bottom row) are highlighted by the dashed polygons.

3.4.5 Importance of TRF2 for efficient HHV-6A/B chromosomal integration

Considering that TRF2 colocalizes and interacts with viral DNA during HHV-6A/B infections and that IE2 localization at cellular telomeres is influenced by TRF2, we next determined whether TRF2 knockdown would affect HHV-6A/B chromosomal integration. U2OS were transduced with lentiviral vectors constitutively expressing a scrambled shRNA (shCtrl) or shTRF2. After a week of puromycin selection, TRF2 expression and efficiency of knockdown was monitored by western blot analysis. Compared to the shCtrl, TRF2 expression was significantly reduced by the shTRF2 (**Figure 3.8A**). Control and TRF2 knockdown cells were then infected with HHV-6A or HHV-6B and infections allowed to proceed for a month, after which cells were analyzed by ddPCR to assess relative HHV-6A/B integration frequency, as previously described [18]. Integration frequency of HHV-6A and HHV-6B was reduced by more than 75% (p<0.05) in TRF2 knockdown cells compared to the shCtrl control (**Figure 3.8B**), suggesting that TRF2's presence is required for efficient HHV-6A/B chromosomal integration.

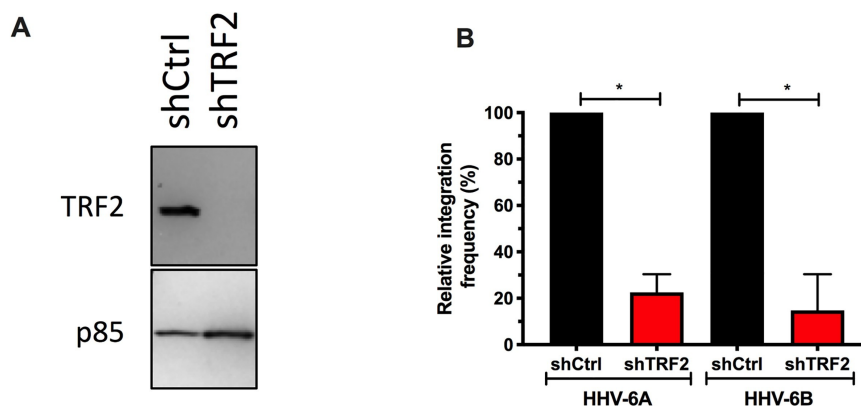


Figure 3.8. TRF2 knockdown affect HHV-6A/B chromosomal integration. (A) U2OS cells were transduced with lentiviral vectors expressing a scrambled shRNA (shCtrl) or a shTRF2. After a week of selection, cells were monitored for TRF2 expression by western blot. (B) After a week of selection, shCtrl and shTRF2 treated cells were infected with HHV-6A or HHV-6B. After 30 days, DNA was isolated and the relative frequency of integration, relative to shCtrl set at 100%, estimated by ddPCR. *p<0.05.

3.5 Discussion

Telomeres serve to protect chromosomes from the loss of genetic information. The ends of each chromosome contain several hundreds, even thousands, of tandemly repeated TTAGGG hexamers. Each time a cell divides approximately 150 nucleotides are lost due to the end replication problem [52]. When telomeres get short, these are extended either by the telomerase enzyme complex [53] or alternative lengthening mechanisms [54]. On the other hand, when telomeres get excessively long, proteins such as TZAP, can trim the excess telomeres [45].

Mechanisms sensing the length of telomeres are therefore present in cells to control telomere length. In the present study, we report that during HHV-6A/B infection, the number of TTAGGG repeats per cell increases 2.5 to 2.9 fold. The increase in telomeric sequences originates from replication of the viral genomes that contain between 15 and 180 TTAGGG repeats at each viral extremity [9–12]. An HHV-6A mutant lacking these telomeric sequences did not show this phenotype.

Chromosome telomeres are consistently bound by shelterin proteins that serve to protect the linear chromosome end from inappropriate repair through DDR [23]. Three shelterin proteins, TRF1, TRF2 and POT1 recognize and bind specifically to the TTAGGG motif [26, 32, 33]. Shelterin protein binding to DNA of viruses other than HHV-6A/B has been reported previously. Binding of TRF2, TRF1 and Rap1 to EBV oriP, that contains three TTAGGGTTA motifs, was reported to modulate EBV DNA replication. TRF2 also interacts with EBNA1, an EBV protein essential for episomal maintenance and replication [55]. While TRF2 and Rap1 promote the replication at oriP, TRF1 inhibits it [55–57]. TRF2, together with Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) LANA protein bind to the latent origin of replication.

Such region does not contain the TTAGGG motif and binding to this region of the viral DNA likely involves a yet to be identified protein [57]. Unlike EBV, the expression of a dominant negative TRF2 does not affect KSHV DNA replication. Whether the presence of telomeric repeats within the HHV-6A/B viral genome would initiate the binding of shelterin proteins was unknown. Our results indicate that during infection, TRF1 and TRF2 localize at viral replication compartments. Using ChIP, we could demonstrate that TRF2 physically associates with HHV-6A/B viral DNA during infection. Furthermore, using recombinant TRF2 and HHV-6A BAC viral DNA, we could show that TRF2 binds directly to viral DNA TMR in the absence of other viral or cellular proteins.

Joining TRF2 at viral replication compartments are the p41 and IE2 viral proteins. p41 is expected to localize with VRC being a DNA polymerase accessory factor. In contrast, the functions of IE2 are only partially known. IE2 is a large nuclear protein (~1500 amino acids) that behaves as a promiscuous transactivator in gene reporter

assays [39, 50]. We have previously reported that truncation of the C-terminus abolishes IE2's transactivating potential [39]. Recently, the crystal structure of the IE2 C-terminus revealed that it contains dimerization, DNA-binding and transcription factor binding domains explaining the importance of this region for IE2's transactivation functions [58]. The IE2 C-terminus core structure resembles those of the gammaherpesvirus factors EBNA1 of EBV and LANA of KSHV [58], involved in binding to viral DNA [59, 60]. Although IE2 localizes at VRC during infection, whether it binds viral DNA per se remains to be demonstrated. However, considering that IE2 localizes at VRC in cells infected with a mutant lacking telomeric repeats (HHV-6A Δ TMR), suggests that IE2 recruitment at VRC is independent of viral telomeric DNA sequences. Furthermore, considering that in the absence of viral DNA, IE2 localizes at cellular telomeres, suggest a potential affinity of IE2 for shelterin complex proteins. Deletion of the IE2 DNA binding domain had no impact on IE2 localization with telomeres, further strengthens the hypothesis the IE2 interacts with proteins found near or associated with telomeres. In support for an IE2-shelterin interaction is the observation that TRF2 knockdown greatly reduces the number of IE2 foci localizing with telomeres. Validation of a physical interaction between IE2 and TRF2 or other telomeric proteins is complicated by our difficulty in immunoprecipitating the IE2 protein. To our knowledge, this is the first report identifying an HHV-6A/B protein localizing at cellular telomeres. Previous work from our laboratory identified IE2 as a Ubc9-interacting protein [61]. Considering that TRF2 can be sumoylated [62] and that Ubc9 is an E2 SUMO conjugating enzyme, it is conceivable that by localizing at telomere, IE2 through its interaction with Ubc9, may influence TRF2 SUMOylation. Knowing that SUMOylated TRF2 is prone to degradation [62], IE2 may therefore regulate TRF2 levels at chromosomal ends to facilitate integration and/or at VRC to free viral DNA from TRF2.

During infection, many viruses provoke a DNA damage response, either because their unprotected genome is recognized as damaged DNA or because of viral proteins triggering a damage signal. While several viruses have ways to evade the DDR pathways, some have developed strategies to make use of the cellular DNA repair proteins to their advantage. Cellular DNA repair proteins have been observed in VRC in various cases and can be helpful or even necessary for completion of the infection [63]. During EBV infection, the proteins involved in the ATM pathway checkpoint and HR repair are found in replication compartments [64]. The use of the DDR machinery by EBV likely increases the possibility of molecular events, stimulating the damage signals causing instability and promoting carcinogenic transformations.

Whether viruses can use the DDR proteins in chromosomal integration is controversial, but some studies have suggested it [63]. One example is the Adeno-associated virus (AAV) that uses the cellular NHEJ mechanism for its site-specific integration [65]. HHV-6A/B chromosomal integration is not fully understood but it appears probable that these viruses integrate by HR between the virus' TMRs and the cellular telomeres. The integration occurs solely in telomeres and it has been shown that the telomeric sequences within the HHV-6A genome are essential for efficient integration into chromosomes [6]. Furthermore, the integrated virus has indicate that

knockdown of TRF2 impairs the ability of HHV-6A/B to integrate the host chromosomes without affecting the initial phases of infection. At least two non-mutually hypotheses can explain this result. First, TRF2 is known to protect telomeres from a DDR [69]. By binding to the viral TMR, TRF2 may play a similar role by shielding the end of the viral genome from DDR. Second, TRF2 has been shown to participate in HR [70, 71]. We therefore surmise that the presence of TRF2 at viral DNA favors chromosomal integration by facilitating HR events between the host telomeres and viral telomeric sequences.

Our studies have focused mostly on TRF2. However, our results indicate that during infection, TRF1 also localizes with VRC. This is not unexpected considering that TRF1, alike TRF2, binds with high affinity to double-stranded DNA containing TTAGGG repeats [26]. Considering that both TRF1 and TRF2 are docking sites for other shelterin proteins [72], it is expected that Rap1, TIN2 and TPP1 are likely to be recruited at VRC during infection. Furthermore, considering a similar role for TRF1 and TRF2 in maintenance of telomere stability, we speculate that knockdown of TRF1 would affect HHV-6A/B integration alike our TRF2 knockdown experiments.

Our work has unraveled the potential importance of the TRF2 during infection and integration. However, our studies are not without limitations. First, the fact that TRF2 null cell are non-viable [29] prevents us from conducting chromosomal integration studies in the complete absence of TRF2. Considering that the integration assay lasts a month, our results likely reflect 30 days survival of cells expressing minimal amounts of TRF2 and containing integrated

HHV-6A/B. At this point it therefore cannot be excluded with certainty that integration of HHV-6A/B in the absence of TRF2 can occur. Another limitation of our study is the reliance on immortalized cells to study integration processes. Considering that immortalized cells have telomere elongation mechanisms not typically observed in most primary cells, results from the use of primary cells could differ from those presented in the current study. Unfortunately, many of our protocols require prolonged culture periods, preventing us from using primary cells. Lastly, although our results suggest that shelterin proteins, such as TRF2, likely play a role in facilitating HHV-6A/B integration, the data provided does not prove it. Additional studies addressing the precise integration mechanism are needed before such a conclusion can be reached.

In summary, our studies indicate that during HHV-6A/B infection, the number of telomeric repeats increases significantly, as a result of the replicating viral DNA that contains many TMRs. In the presence of such abundant viral TMRs, TRF2 is recruited to VRCs where it colocalizes with the viral IE2 protein. Reciprocally, the IE2 protein efficiently localizes at cellular telomeres in the presence of TRF2. Lastly, knockdown of TRF2 negatively affected viral integration into host telomeres, highlighting potential new roles for TRF2, and likely IE2, during HHV-6A/B infection and integration.

3.6 Acknowledgement

We acknowledge the Bioimaging platform of the Infectious Disease Research Centre, funded by an equipment and infrastructure grant from the Canadian Foundation Innovation (CFI). SGG and VC are recipients of fellowships from the Fonds de Recherche Québec-Santé.

3.7 Author Contributions

Conceptualization: Shella Gilbert-Girard, Annie Gravel, Louis Flamand.

Data curation: Shella Gilbert-Girard, Annie Gravel, Vanessa Collin.

Formal analysis: Shella Gilbert-Girard, Annie Gravel, Vanessa Collin, Louis Flamand.

Funding acquisition: Louis Flamand.

Investigation: Annie Gravel, Louis Flamand.

Methodology: Shella Gilbert-Girard, Annie Gravel, Vanessa Collin, Darren J. Wight, Benedikt

B. Kaufer, Eros Lazzerini-Denchi, Louis Flamand.

Resources: Darren J. Wight, Benedikt B. Kaufer, Louis Flamand.

Supervision: Annie Gravel, Louis Flamand.

Writing – original draft: Shella Gilbert-Girard, Louis Flamand.

Writing – review & editing: Shella Gilbert-Girard, Annie Gravel, Vanessa Collin, Darren J. Wight, Benedikt B.

Kaufer, Eros Lazzerini-Denchi, Louis Flamand

3.8 Materials and Methods

Cell lines and viruses. U2OS cells (American Type culture collection (ATCC), Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Corning Cellgro, Manassas, VA, USA) supplemented with 10% Nu serum (Corning Cellgro), non-essential amino acids (Corning Cellgro), HEPES, sodium pyruvate (Multicell Wisent Inc., St-Bruno, Québec, Canada) and plasmocin 5 µg/ ml (InvivoGen, San Diego, CA, USA). Molt-3 (ATCC, CRL-1552), HSB-2 (ATCC, CCL-120.1), Sup-T1 (ATCC, CRL-1942), all human T lymphoblastic cell lines, were cultured in RPMI-1640 (Corning Cellgro) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), HEPES and plasmocin 5 µg/ ml. J-Jhan (RRID:CVCL_1H08) cells infected with wild type (WT) HHV-6A-BAC, HHV-6A mutants lacking telomeric repeats (TMR) termed Δ TMR and Δ impTMR [6] or HHV-6A BAC WT#2 (containing a red fluorescent protein downstream of the U11 gene) were cultured in RPMI-1640 supplemented

with 10% FBS. HHV-6B (Z29 strain) and HHV-6A (U1102 strain) were propagated and titered on Molt-3 and HSB-2 cells respectively, as previously described [38].

Plasmids. IE2 expression vectors (WT and Δ 1290–1500) were previously described [39]. pLPC-MYC-hTRF1 (Addgene plasmid #64164) [40], pLPC-NMYC TRF2 (Addgene plasmid # 16066) [41] and pSXneo 135(T2AG3) (Addgene plasmid#12402) [42] were gifts from Titia de Lange and obtained through Addgene. The generation of pLKO human shTRF2 was previously described [43]. The shTRF2 coding sequence was cloned into the Tet-pLKO-puro vector (Addgene #21915). The Tet-pLKO-puro vector was a gift from Dmitri Wiederschain [44].

Western blots. Cells were resuspended in Laemmli buffer and boiled for 5 minutes. Samples were loaded and electrophoresed through a SDS-polyacrylamide gel. Samples were transferred onto PVDF membranes and processed for western blot using rabbit anti-TRF2 (Novus Biologicals), mouse anti-tubulin (Sigma-Aldrich) and rabbit anti-p85 antibodies (Abcam). Peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG and peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG were used as secondary antibodies. The Bio-Rad Clarity ECL reagent was used for detection.

IF-FISH and microscopy. Immunofluorescence (IF) combined with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (IF-FISH) was performed as previously described [45]. U2OS cells were seeded at 5×10^4 cells per well in 6-well plates over coverslips, cultured 24 hours and infected with HHV-6A or HHV-6B at a multiplicity of infection (MOI) of 5 for 4 hours. Cells were then washed with PBS and cultured in media for a set period of time. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde. Molt-3 and HSB-2 cells were infected at a MOI of 1 and cultured for a set period of time before being deposited on a 10-well microscope slide, dried and fixed in acetone at -20°C for 10 minutes. The following primary antibody were used: mouse- α -IE2-Alexa-594 [46], mouse- α -p41 (NIH AIDS Reagent Program), rabbit- α -TRF2 (NB100-56694, Novus Biologicals), and mouse- α -Myc (clone 9E10). Secondary antibodies used were goat- α -rabbit-Alexa-488, goat- α -mouse-Alexa-488 and goat- α -mouse-Alexa-594 (Life Technologies). FISH was performed using a PNA probe specific to the telomeric sequence $(\text{CCCTAA})_3$ (TelC-Cy5, PNA BIO). Slides were observed at 40X and 63X using a spinning disc confocal microscope (Leica DMI6000B) and analyzed with the Volocity 5.4 software. To compare TRF2 expression in uninfected and HHV-6A-infected cells, cells were dually stained with HHV-6A IE2 protein and TRF2. The relative TRF2 fluorescence in IE2- and IE2+ individual cell was then determined using the ImageJ software. For colocalization, acquisitions were deconvoluted using the Volocity 5.4 software and Point Spread Function (PSF) respective to the objective and the immersion medium to remove the out-of-focus information from the acquisitions. 3D images were reconstructed using the same software to visualize colocalization. To quantify colocalization of IE2 with telomeres, TRF1, TRF2 or p41, Image J software with JACoP plugin was used. Briefly, after setting up thresholds, total fluorescence of IE2 colocalizing with the fluorescence of telomeres, TRF1, TRF2 or p41 was

given by Mander's colocalization coefficient (MCC) and reported in percentage were a coefficient of 1 represent 100% of colocalization and 0 equal no colocalization.

Telomere restriction fragment (TRF) analysis. DNA from uninfected, HHV-6A/B-infected cells and HHV-6A BAC (WT and Δ TMR)-infected cells was isolated using QIAamp DNA blood isolation kits as per the manufacturer's recommendations. Five μ g of DNA were digested overnight with RsaI and HinfI followed by electrophoresis through agarose gel and southern blot hybridization. The telomeric DNA probe was obtained following digestion of the pSXneo135(T2AG3) vector with EcoRI and NotI, gel purification of the 820 bp fragment and 32 P-labeling by nick translation. The HHV-6A U94 probe was obtained by digesting the pMalC2-U94A vector [47] with BamHI and HindIII, gel purification of the 1476 bp fragment and 32 P-labeling by nick translation. After hybridization and washes, the membranes were exposed to X-ray films.

ChIP and dot blot. The experiments were made using the Pierce Magnetic ChIP Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions with a few modifications. Equal quantities of HSB-2 and Molt-3 cells were used for all samples (4×10^6 cells/sample). Cross-linking lasted 10 minutes at RT. Two μ l of diluted MNase (1:10) were added to each sample for MNase digestion. Sonication was made with a Branson Sonifier 450, with an Output Control set at 1. Each sample was sonicated with five pulses of 20 seconds, each pulse followed by a 20 seconds incubation on ice. After sonication, an aliquot was saved for normalization purpose (input). Before immunoprecipitation, samples were incubated with magnetic beads alone for one hour at 4°C before discarding the beads. The immunoprecipitation was performed using 4 μ g of normal rabbit IgG (negative control), 10 μ l of anti-PolIII antibodies (positive control) and 4 μ g of rabbit anti-TRF2 antibody (NB100-56694, Novus Biologicals) with an overnight incubation at 4°C. Protein A agarose beads were added for 1h at 4°C followed by three washes. The DNA was eluted in 50 μ l of DNA column elution solution. Eluted DNA was analyzed by quantitative PCR (qPCR) for GAPDH promoter sequences using reagents and conditions provided by the manufacturers (Pierce Magnetic ChIP Kit, Thermo Scientific) or analyzed by dot blot hybridization using a telomeric probe or HHV-6A probe (DR6). The input was analyzed using an Alu probe. For dot blot hybridization, DNA was first denatured for 10 minutes at room temperature in 0.25 N NaOH and 0.5 M NaCl. Samples were then serially diluted in 0.1 X SSC and 0.125 N NaOH, on ice, loaded onto nylon membrane, neutralized in 0.5 M NaCl and 0.5 M Tris-HCl pH 7.5 and crosslinked using UV irradiation. Membranes were pre-incubated in Perfecthyb Plus hybridization buffer (Sigma-Aldrich) for 2h at 68°C before addition of 1×10^6 CPM/ml of 32 P-labeled probes. Hybridization was carried out for 16h at 68°C. Membrane was washed twice with 2X SSC-1% SDS, twice with 1X SSC-1% SDS and once with 0.5X SSC-1% SDS at 68°C, for 15 minutes each. Membrane was then exposed to X-ray films at -80°C. Hybridization signals were measured by densitometry.

Cloning and purification of MBP-TRF2. The TRF2 coding sequence was excised from pLPC-NMYC TRF2 vector using BamHI and XhoI and cloned in frame with the Maltose-Binding Protein (MBP) coding sequence of the pMAL-C2 vector (New England Biolabs) using BamHI and Sall enzymes. MBP and MBP-TRF2 proteins were expressed in BL21 DE3 RIL bacteria and purified by affinity chromatography, as described [47].

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). EMSA was performed essentially as described [47]. In brief, recombinant proteins (MBP and MBP-TRF2) were incubated with 1 pmole of double-stranded (ds) non-telomeric or telomeric labeled probes in 20 μ l of the following reaction buffer: 20 mM Hepes-KOH pH 7.9, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5% glycerol and 0.1 mg/ml BSA. For competition experiments, 10–1000-fold excess unlabeled double-stranded (ds) non-telo or telomeric probes were included in the reaction buffer. After a 30 minutes incubation at room temperature, 2 μ l of loading dye were added and the samples were electrophoresed through a non-denaturing 5% acrylamide:bis (29:1) gel. After migration, the gels were dried and exposed to X-ray films at -80°C.

Detection of TRF2 binding to HHV-6A telomeric sequence. The wells of a 96-well ELISA plate were coated with 0.6 pmoles of MBP or MBP-TRF2 proteins by overnight incubation at 4°C in pH 9.0 carbonate buffer. After rinsing, 1% BSA was added to block non-specific sites. Twenty-five nanograms of HaeIII-digested digoxigenin-labeled HHV-6A DNA (HaeIII cuts the viral genome 289 times) (approximately 0.16 pmoles) in EMSA reaction buffer were added. For competition experiments, 2.5 or 5.0 pmoles of non-telomeric or telomeric dsDNA were added 15 minutes prior to the addition of HHV-6A DNA. The plate was incubated for 2h at room temperature (RT). After 3 washes with TBS-0.1% Tween-20 (TBS-T), peroxidase-labeled mouse anti-DIG antibodies were added to each well for 1h at RT. After 3 additional TBS-T washes, TMB substrate was added and the reaction allowed to develop for 15 minutes before addition of 50 μ l of 2N sulfuric acid. Absorbance was measured at 450 nm.

HHV-6A/B integration assay. HHV-6A/B integration frequency in U2OS cells was determined by droplet digital PCR (ddPCR) as previously described [18]. In brief, cells were infected with either HHV-6A or HHV-6B for 5 h at 37°C and then washed 3 \times with PBS to remove unadsorbed virions prior to the addition of fresh culture medium. Upon confluence, cells were passaged into the well of a 6-well plate for a few days and further expanded into a 25-cm² flask for a month until analyzed by ddPCR. ddPCR uses TaqMan chemistry but instead of using a standard curve to estimate copy numbers, it partitions the reaction into thousands of droplets, which are each read as positive or negative for DNA template allowing absolute quantification of DNA copies [48, 49]. HHV-6A/B copy numbers were determined. The HHV-6A/B chromosomal integration frequencies were estimated assuming a single integrated HHV-6/cell and calculated with the following formula: (# of HHV6 copies / (# of

$RPP30 \text{ copies} / 2 \text{ copies per cell}) \times 100$. Such a procedure and protocol proved equivalent to estimation of ciHHV-6 frequency using single-cell cloning procedures [18].

Statistical analysis. TRF2 expression levels were compared using unpaired student t-test with Welch's correction. Binding of MBP-TRF2 to HHV-6A DNA and HHV-6A/B integration frequency were determined using the Mann-Whitney test. Colocalization of IE2 WT and $\Delta 1290$ –1500 IE2 mutant with telomeres was determined using a t-test. The % of HHV-6A infected cells in shCtrl and shTRF2 +/- Dox was compared using a one-way ANOVA with Tukeys multiple comparisons test. A p value <0.05 was considered significant.

3.9 References

1. Ablashi D, Agut H, Alvarez-Lafuente R, Clark DA, Dewhurst S, DiLuca D, et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch Virol*. 2014;159(5):863-70. doi: 10.1007/s00705-013-1902-5. PubMed PMID: 24193951; PubMed Central PMCID: PMC4750402.
2. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. 1988;1(8594):1065-7.
3. Phan TL, Carlin K, Ljungman P, Politikos I, Boussiotis V, Boeckh M, et al. Human Herpesvirus-6B Reactivation Is a Risk Factor for Grades II to IV Acute Graft-versus-Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.04.021. PubMed PMID: 29684567.
4. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol*. 1999;73(10):8040-52.
5. Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin ME, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology*. 1995;209(1):29-51. Epub 1995/05/10. doi: S0042-6822(85)71228-7 [pii] 10.1006/viro.1995.1228. PubMed PMID: 7747482.
6. Wallaschek N, Sanyal A, Pirzer F, Gravel A, Mori Y, Flamand L, et al. The Telomeric Repeats of Human Herpesvirus 6A (HHV-6A) Are Required for Efficient Virus Integration. *PLoS Pathog*. 2016;12(5):e1005666. doi: 10.1371/journal.ppat.1005666. PubMed PMID: 27244446; PubMed Central PMCID: PMC4887096.
7. Collin V, Flamand L. HHV-6A/B Integration and the Pathogenesis Associated with the Reactivation of Chromosomally Integrated HHV-6A/B. *Viruses*. 2017;9(7). doi: 10.3390/v9070160. PubMed PMID: 28672870; PubMed Central PMCID: PMC5537652.
8. Kaufer BB, Flamand L. Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Current opinion in virology*. 2014;9C:111-8. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.010. PubMed PMID: 25462442.
9. Achour A, Malet I, Deback C, Bonnafous P, Boutolleau D, Gautheret-Dejean A, et al. Length variability of telomeric repeat sequences of human herpesvirus 6 DNA. *J Virol Methods*. 2009;159(1):127-30. Epub 2009/05/16. doi: S0166-0934(09)00104-9 [pii] 10.1016/j.jviromet.2009.03.002. PubMed PMID: 19442857.
10. Gompels UA, Macaulay HA. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol*. 1995;76(Pt 2):451-8.

11. Kishi M, Harada H, Takahashi M, Tanaka A, Hayashi M, Nonoyama M, et al. A repeat sequence, GGGTTA, is shared by DNA of human herpesvirus 6 and Marek's disease virus. *J Virol.* 1988;62(12):4824-7. Epub 1988/12/01. PubMed PMID: 2846894.
12. Thomson BJ, Dewhurst S, Gray D. Structure and heterogeneity of the a sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini. *J Virol.* 1994;68(5):3007-14. Epub 1994/05/01. PubMed PMID: 8151770.
13. Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J, Hadley SH, Luegmayer A, Ablashi D, et al. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(12):5563-8. doi: 10.1073/pnas.0913586107. PubMed PMID: 20212114; PubMed Central PMCID: PMC2851814.
14. Daibata M, Taguchi T, Taguchi H, Miyoshi I. Integration of human herpesvirus 6 in a Burkitt's lymphoma cell line. *Br J Haematol.* 1998;102(5):1307-13. Epub 1998/09/30. PubMed PMID: 9753061.
15. Nacheva EP, Ward KN, Brazma D, Virgili A, Howard J, Leong HN, et al. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites. *J Med Virol.* 2008;80(11):1952-8. Epub 2008/09/25. doi: 10.1002/jmv.21299. PubMed PMID: 18814270.
16. Torelli G, Barozzi P, Marasca R, Cocconcelli P, Merelli E, Ceccherini-Nelli L, et al. Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Med Virol.* 1995;46(3):178-88. Epub 1995/07/01. PubMed PMID: 7561787.
17. Pellett PE, Ablashi DV, Ambros PF, Agut H, Caserta MT, Descamps V, et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev Med Virol.* 2012;22(3):144-55. Epub 2011/11/05. doi: 10.1002/rmv.715. PubMed PMID: 22052666; PubMed Central PMCID: PMC3498727.
18. Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, Gilbert-Girard S, Collin V, Hall-Sedlak R, et al. Cell culture systems to study Human Herpesvirus 6A/B Chromosomal Integration. *J Virol.* 2017;pii: JVI.00437-17. doi: 10.1128/JVI.-17. doi: 10.1128/JVI.00437-17. PubMed PMID: 28468878.
19. Peddu V, Dubuc I, Gravel A, Xie H, Huang ML, Tenenbaum D, et al. Inherited chromosomally integrated HHV-6 demonstrates tissue-specific RNA expression in vivo that correlates with increased antibody immune response. *J Virol.* 2019. Epub 2019/10/11. doi: 10.1128/JVI.01418-19. PubMed PMID: 31597766.
20. Gravel A, Dubuc I, Morissette G, Sedlak RH, Jerome KR, Flamand L. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 as a predisposing risk factor for the development of angina pectoris. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(26):8058-63. doi: 10.1073/pnas.1502741112. PubMed PMID: 26080419; PubMed Central PMCID: PMC4491735.
21. Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* 1997;11(21):2801-9. PubMed PMID: 9353250; PubMed Central PMCID: PMC316649.
22. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 1973;41(1):181-90. PubMed PMID: 4754905.
23. de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science.* 2009;326(5955):948-52. doi: 10.1126/science.1170633. PubMed PMID: 19965504; PubMed Central PMCID: PMC2819049.
24. Zhang J, Rane G, Dai X, Shanmugam MK, Arfuso F, Samy RP, et al. Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation. *Ageing Res Rev.* 2016;25:55-69. doi: 10.1016/j.arr.2015.11.006. PubMed PMID: 26616852.
25. Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet.* 1997;17(2):236-9. doi: 10.1038/ng1097-236. PubMed PMID: 9326951.
26. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet.* 1997;17(2):231-5. doi: 10.1038/ng1097-231. PubMed PMID: 9326950.

27. Zhong Z, Shiue L, Kaplan S, de Lange T. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol Cell Biol.* 1992;12(11):4834-43. PubMed PMID: 1406665; PubMed Central PMCID: PMC360416.
28. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.* 1999;97(4):503-14. Epub 1999/05/25. PubMed PMID: 10338214.
29. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53 and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science.* 1999;283(5406):1321-5. PubMed PMID: 10037601.
30. Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature.* 2007;448(7157):1068-71. doi: 10.1038/nature06065. PubMed PMID: 17687332.
31. Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell.* 2004;119(3):355-68. doi: 10.1016/j.cell.2004.10.011. PubMed PMID: 15507207.
32. Baumann P, Cech TR. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science.* 2001;292(5519):1171-5. doi: 10.1126/science.1060036. PubMed PMID: 11349150.
33. Lei M, Podell ER, Cech TR. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(12):1223-9. doi: 10.1038/nsmb867. PubMed PMID: 15558049.
34. Loayza D, Parsons H, Donigian J, Hoke K, de Lange T. DNA binding features of human POT1: a nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites. *J Biol Chem.* 2004;279(13):13241-8. doi: 10.1074/jbc.M312309200. PubMed PMID: 14715659.
35. Deng Z, Kim ET, Vladimirova O, Dheekollu J, Wang Z, Newhart A, et al. HSV-1 remodels host telomeres to facilitate viral replication. *Cell Rep.* 2014;9(6):2263-78. doi:10.1016/j.celrep.2014.11.019. PubMed PMID: 25497088; PubMed Central PMCID: PMC4356630.
36. Knecht H, Mai S. LMP1 and Dynamic Progressive Telomere Dysfunction: A Major Culprit in EBV-Associated Hodgkin's Lymphoma. *Viruses.* 2017;9(7). doi: 10.3390/v9070164. PubMed PMID: 28654015; PubMed Central PMCID: PMC5537656.
37. Lajoie V, Lemieux B, Sawan B, Lichtensztejn D, Lichtensztejn Z, Wellinger R, et al. LMP1 mediates multinuclearity through downregulation of shelterin proteins and formation of telomeric aggregates. *Blood.* 2015;125(13):2101-10. doi: 10.1182/blood-2014-08-594176. PubMed PMID: 25568351; PubMed Central PMCID: PMC4424269.
38. Gravel A, Gosselin J, Flamand L. Human Herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19679-87. PubMed PMID: 11901159.
39. Tomoiu A, Gravel A, Flamand L. Mapping of human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein transactivation domains. *Virology.* 2006;354(1):91-102. PubMed PMID: 16884756.
40. Zimmermann M, Kibe T, Kabir S, de Lange T. TRF1 negotiates TTAGGG repeat-associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling. *Genes Dev.* 2014;28(22):2477-91. Epub 2014/10/26. doi: 10.1101/gad.251611.114. PubMed PMID: 25344324; PubMed Central PMCID: PMC4233241.
41. Smogorzewska A, de Lange T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 2002;21(16):4338-48. Epub 2002/08/10. doi: 10.1093/emboj/cdf433. PubMed PMID: 12169636; PubMed Central PMCID: PMC126171.
42. Hanish JP, Yanowitz JL, de Lange T. Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(19):8861-5. Epub 1994/09/13. PubMed PMID: 8090736; PubMed Central PMCID: PMC44706.
43. Cesare AJ, Hayashi MT, Crabbe L, Karlseder J. The telomere deprotection response is functionally distinct from the genomic DNA damage response. *Mol Cell.* 2013;51(2):141-55. Epub 2013/07/16. doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.006. PubMed PMID: 23850488; PubMed Central PMCID: PMC3721072.

44. Wiederschain D, Wee S, Chen L, Loo A, Yang G, Huang A, et al. Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle*. 2009;8(3):498-504. Epub 2009/01/30. doi: 10.4161/cc.8.3.7701. PubMed PMID: 19177017.
45. Li JS, Miralles Fuste J, Simavorian T, Bartocci C, Tsai J, Karlseder J, et al. TZAP: A telomere-associated protein involved in telomere length control. *Science*. 2017;355(6325):638-41. doi: 10.1126/science.aah6752. PubMed PMID: 28082411; PubMed Central PMCID: PMC5518674.
46. Arsenault S, Gravel A, Gosselin J, Flamand L. Generation and characterization of a monoclonal antibody specific for human herpesvirus 6 variant A immediate-early 2 protein. *J Clin Virol*. 2003;28(3):284-90. PubMed PMID: 14522067.
47. Trempe F, Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, Collin V, Gilbert-Girard S, et al. Characterization of human herpesvirus 6A/B U94 as ATPase, helicase, exonuclease and DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(12):6084-98. doi: 10.1093/nar/gkv503. PubMed PMID: 25999342; PubMed Central PMCID: PMC4499131.
48. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83(22):8604-10. doi: 10.1021/ac202028g. PubMed PMID: 22035192; PubMed Central PMCID: PMC3216358.
49. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*. 2013;10(10):1003-5. doi: 10.1038/nmeth.2633. PubMed PMID: 23995387; PubMed Central PMCID: PMC4118677.
50. Gravel A, Tomoiu A, Cloutier N, Gosselin J, Flamand L. Characterization of the immediate-early 2 protein of human herpesvirus 6, a promiscuous transcriptional activator. *Virology*. 2003;308(2):340-53. PubMed PMID: 12706083.
51. Tomoiu A, Flamand L. Epitope Mapping of a Monoclonal Antibody Specific for Human Herpesvirus 6 Variant A Immediate-Early 2 Protein. *J Clin Virology*. 2007;38:286-91.
52. Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*. 1972;239(94):197-201. Epub 1972/10/18. PubMed PMID: 4507727.
53. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*. 1989;337(6205):331-7. Epub 1989/01/26. doi: 10.1038/337331a0. PubMed PMID: 2463488.
54. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*. 1995;14(17):4240-8. PubMed PMID: 7556065; PubMed Central PMCID: PMC394507.
55. Deng Z, Atanasiu C, Burg JS, Broccoli D, Lieberman PM. Telomere repeat binding factors TRF1, TRF2, and hRAP1 modulate replication of Epstein-Barr virus OriP. *J Virol*. 2003;77(22):11992-2001. Epub 2003/10/29. PubMed PMID: 14581536; PubMed Central PMCID: PMC254251.
56. Atanasiu C, Deng Z, Wiedmer A, Norseen J, Lieberman PM. ORC binding to TRF2 stimulates OriP replication. *EMBO Rep*. 2006;7(7):716-21. Epub 2006/06/27. doi: 10.1038/sj.embor.7400730. PubMed PMID: 16799465; PubMed Central PMCID: PMC1500828.
57. Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell*. 2009;139(7):1243-54. Epub 2010/01/13. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.017. PubMed PMID: 20064371; PubMed Central PMCID: PMC2824905.
58. Nishimura M, Wang J, Wakata A, Sakamoto K, Mori Y. Crystal Structure of the DNA-Binding Domain of Human Herpesvirus 6A Immediate Early Protein 2. *J Virol*. 2017;91(21). Epub 2017/08/11. doi: 10.1128/JVI.01121-17. PubMed PMID: 28794035; PubMed Central PMCID: PMC5640841.
59. Bochkarev A, Bochkareva E, Frappier L, Edwards AM. The 2.2 Å structure of a permanganate-sensitive DNA site bound by the Epstein-Barr virus origin binding protein, EBNA1. *J Mol Biol*. 1998;284(5):1273-8. Epub 1999/01/08. doi: 10.1006/jmbi.1998.2247. PubMed PMID: 9878348.
60. Hellert J, Weidner-Glunde M, Krausze J, Lunsdorf H, Ritter C, Schulz TF, et al. The 3D structure of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA C-terminal domain bound to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- 2015;112(21):6694-9. Epub 2015/05/08. doi: 10.1073/pnas.1421804112. PubMed PMID: 25947153; PubMed Central PMCID: PMC4450395.
61. Tomoiu A, Gravel A, Tanguay RM, Flamand L. Functional interaction between human herpesvirus 6 immediate-early 2 protein and ubiquitin-conjugating enzyme 9 in the absence of sumoylation. *J Virol*. 2006;80(20):10218-28. PubMed PMID: 17005699.
 62. Her J, Jeong YY, Chung IK. PIAS1-mediated sumoylation promotes STUbL-dependent proteasomal degradation of the human telomeric protein TRF2. *FEBS Lett*. 2015;589(21):3277-86. Epub 2015/10/10. doi: 10.1016/j.febslet.2015.09.030. PubMed PMID: 26450775.
 63. Weitzman MD, Lilley CE, Chaurushiya MS. Genomes in conflict: maintaining genome integrity during virus infection. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:61-81. Epub 2010/08/10. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134016. PubMed PMID: 20690823.
 64. Kudoh A, Iwahori S, Sato Y, Nakayama S, Isomura H, Murata T, et al. Homologous recombinational repair factors are recruited and loaded onto the viral DNA genome in Epstein-Barr virus replication compartments. *J Virol*. 2009;83(13):6641-51. Epub 2009/04/24. doi: 10.1128/JVI.00049-09. PubMed PMID: 19386720; PubMed Central PMCID: PMC2698542.
 65. Daya S, Cortez N, Berns KI. Adeno-associated virus site-specific integration is mediated by proteins of the nonhomologous end-joining pathway. *J Virol*. 2009;83(22):11655-64. Epub 2009/09/18. doi: 10.1128/JVI.01040-09. PubMed PMID: 19759155; PubMed Central PMCID: PMC2772704.
 66. Arbuckle JH, Pantry SN, Medveczky MM, Prichett J, Loomis KS, Ablashi D, et al. Mapping the telomere integrated genome of human herpesvirus 6A and 6B. *Virology*. 2013;442(1):3-11. doi: 10.1016/j.virol.2013.03.030. PubMed PMID: 23648233; PubMed Central PMCID: PMC3696530.
 67. Huang Y, Hidalgo-Bravo A, Zhang E, Cotton VE, Mendez-Bermudez A, Wig G, et al. Human telomeres that carry an integrated copy of human herpesvirus 6 are often short and unstable, facilitating release of the viral genome from the chromosome. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(1):315-27. doi: 10.1093/nar/gkt840. PubMed PMID: 24057213; PubMed Central PMCID: PMC3874159.
 68. Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, et al. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6. *Scientific reports*. 2014;4:4559. doi: 10.1038/srep04559. PubMed PMID: 24691081; PubMed Central PMCID: PMC3972506.
 69. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol*. 2003;13(17):1549-56. Epub 2003/09/06. doi: 10.1016/s0960-9822(03)00542-6. PubMed PMID: 12956959.
 70. Kong X, Cruz GMS, Trinh SL, Zhu XD, Berns MW, Yokomori K. Biphasic recruitment of TRF2 to DNA damage sites promotes non-sister chromatid homologous recombination repair. *J Cell Sci*. 2018;131(23). Epub 2018/11/09. doi: 10.1242/jcs.219311. PubMed PMID: 30404833.
 71. Mao Z, Seluanov A, Jiang Y, Gorbunova V. TRF2 is required for repair of nontelomeric DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(32):13068-73. Epub 2007/08/03. doi: 10.1073/pnas.0702410104. PubMed PMID: 17670947; PubMed Central PMCID: PMC1941808.
 72. Chen Y, Yang Y, van Overbeek M, Donigian JR, Baciú P, de Lange T, et al. A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. *Science*. 2008;319(5866):1092-6. Epub 2008/01/19. doi: 10.1126/science.1151804. PubMed PMID: 18202258.

Chapitre 4. The immediate early protein 1 of the human herpesvirus 6B counteracts NBS1 and prevent homologous recombination repair pathways

Vanessa Collin^{1,2,*}, Élise Biquand^{3,4,5,6,*}, Vincent Tremblay^{3,4,5}, Élise Gaudreau-Lavoie^{3,5}, Julien Dessapt^{3,4,5}, Annie Gravel^{1,2}, Louis Flamand^{1,2,†}, Amélie Fradet-Turcotte^{3,4,5,†}

¹ Division of Infectious Disease and Immunity, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec-Université Laval Research Center, Quebec City, Québec Canada, G1V 4G2;

² Department of microbiology, infectious disease and immunology, Faculty of Medicine, Université Laval, Quebec City, Québec, Canada, G1V 0A6;

³ Oncology Division, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec-Université Laval Research Center, Quebec City, Québec Canada, G1V 4G2;

⁴ Department of molecular biology, medical biochemistry and pathology, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec City, Québec, Canada, G1V 0A6;

⁵ Université Laval Cancer Research Center, Université Laval, Québec, QC, Canada G1V 0A6;

⁶ Current location: INSERM, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), UMR 1100, Tours, France – Université de Tours, Tours, France.

*Both authors contributed equally to this work

†Co-Corresponding authors:

E-mail: amelie.fradet-turcotte@crchudequebec.ulaval.ca

louis.flamand@crchudequebec.ulaval.ca

Keywords: DNA double-strand break signaling, telomere; integration; human herpesvirus 6A/B; immediate-early protein IE1

4.1 Résumé

L'intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules hôtes pour dissimuler l'infection en induisant une latence virale ou incidemment, déclenche une interaction hôte-pathogène dont les conséquences sont importantes pour le virus et les cellules infectées. Dans les cellules semi-permissives pour la réplication virale, l'herpèsvirus humain 6B (HHV-6B) s'intègre dans les séquences télomériques des cellules hôtes. Contrairement aux rétrovirus, le mécanisme qui conduit à l'intégration virale des virus à ADN et la conséquence de ces événements sur les cellules hôtes ne sont pas bien caractérisés. Cette étude rapporte que l'infection par HHV-6B supprime la signalisation de cassure double brin (CDB) de l'ADN et conduit à une accumulation concomitante d'instabilité dans le génome de la cellule hôte. À l'aide d'analyses de structure-fonction, nous avons découvert que ce phénotype est récapitulé par l'expression de la protéine précoce immédiate 1 (IE1) d'HHV-6B et médié par sa capacité à se lier, délocaliser et inhiber les fonctions du capteur de dommages à l'ADN, NBS1. Ces résultats soulèvent donc la possibilité que l'expression d'IE1 à partir de génomes intégrés contribue au développement de la maladie associée à HHV-6B en induisant une instabilité génomique dans ces cellules. L'observation est cohérente avec ce qui est rapporté pour d'autres types de virus, dont l'inhibition de la détection et de la signalisation de CDB favorise la réplication virale. Cependant, nous avons constaté que l'intégration d'HHV-6B n'est pas affectée dans ces conditions, soutenant des modèles où l'intégration du génome viral aux télomères est dictée par des mécanismes qui favorisent l'élongation des télomères dans une cellule infectée.

4.2 Abstract

Integration of viral DNA in the genome of host cells, either to dissimulate the infection by inducing viral latency or incidentally, triggers host-pathogen interaction that has important consequences for the virus and the infected cells. In cells semi-permissive for viral replication, the human herpesvirus 6B (HHV-6B) integrates into the telomeric sequences of host cells. Interestingly, HHV-6B integration in the genome of gametes leads to a condition called inherited chromosomally integrated HHV-6A/B (iciHHV-6A/B), where the newborn carries a copy of HHV-6A/B in every cell of its body and can transmit it to its offspring. It is estimated that ~1% of the world's population, representing almost 80 million people, is affected by such integration. Unlike retroviruses, the mechanism that leads to viral integration of DNA viruses and the consequence of these events on host cells are not well characterized. This study reports that HHV-6B infection suppresses DNA double-strand break (DSB) signaling and leads to concomitant accumulation of instability in the host cell genome. Using structure-function analyses, we discovered that this phenotype is recapitulated by the expression of the immediate-early HHV-6B protein IE1 and mediated by its ability to bind, delocalize, and inhibit the functions of the DNA damage sensor NBS1. These results thus raise the possibility that the expression of IE1 from integrated genomes contributes to the development of iciHHV-6B associated disease by inducing genomic instability in these cells. Consistent observation reported for other types of viruses, the inhibition of DSB sensing and signaling promotes viral replication. However, we found that HHV-6B integration is not affected in these conditions, supporting models where integration of the viral genome at telomeric sequence is dictated by mechanisms that promote telomere-elongation in a given infected cell.

4.3 Introduction

Human herpesvirus 6B (HHV-6B) is a betaherpesvirus that infects nearly 90% of the world's population in the first two years of life and is responsible for Roseola Infantum, a pathology defined by skin rashes, high fevers and respiratory distress [1-3]. In this DNA virus subfamily, HHV-6B shares 94% homology with HHV-6A, another lymphotropic virus. Like other herpesviruses, HHV-6A and HHV-6B (HHV-6A/B) establish lifelong latency in infected hosts and can reactivate occasionally. However, whereas most herpesviruses achieve latency through the circularization and silencing of their genome, HHV-6A/B viruses can integrate their genome at the host's chromosome terminal repeats called telomeres (chromosomally integrated HHV-6B (ciHHV-6B)) [4-5]. If integration occurred in gametes before fertilization, the newborn carries a copy of HHV-6A/B in every cell of its body and can transmit it to its offspring. This condition called inherited chromosomally integrated HHV-6A/B (iciHHV-6A/B) concerns ~1% of the world's population, representing almost 80 million people [6,7]. iciHHV-6A/B is more prevalent in diseased individuals compared to healthy subjects (reviewed in [8]). However, consequences of iciHHV-6A/B are still poorly understood due to lack of clinical associations.

The linear double-strand DNA (dsDNA) genome of HHV-6B is flanked by an array of direct repeats containing 15 to 180 reiterations of 5'-TTAGGG-3' perfect telomeric repeats (pTMRs) that are identical to human telomeric sequences, and which are important for HHV-6A integration [9]. HHV-6A/B genome integration occurs at telomeres in a process that is dependent on the integrity of these pTMRs [9]. Based on this observation, current models propose that viral integration is mediated through homology-directed repair (HDR) processes including single stranded annealing (SSA) or break-induced replication (BIR) [10]. These HR pathways are favored given that the integration occurs in an oriented manner that is driven by one of the pTMR [9, 11]. Briefly, HHV-6 genome would integrate at sites of DNA double-stranded break (DSB) that are caused following replication fork collapse at telomeres upon replication stress. In both scenarios, the annealing of the pTMR sequence to the 3' overhang generated by partial resection of DNA-ends of the telomere would drive integration [10, 12].

In mammalian cells, HDR uses homologous sequences as template to repair breaks in a faithful manner. During this process, broken DNA ends are first detected by the MRN complex (MRE11, RAD50, NBS1) [13]. The accumulation of the MRN complex at the break induces a signaling cascade that leads to the activation of the serine–threonine kinase ataxia–telangiectasia mutated (ATM) and concomitant phosphorylation of the histone variant H2AX on Ser139 (γ -H2AX). The interaction of MDC1 with γ -H2AX then triggers the ubiquitylation of the chromatin that surrounds the break by promoting the accumulation of the E3-ligases RNF8 and RNF168 [14, 15]. In S/G2 phase of the cell cycle, the recruitment of the DNA repair factor BRCA1 and the nuclease CtIP to ubiquitylated chromatin cooperates with EXO1 and BLM-DNA2 nucleases to facilitate extensive end resection.

Extensive accumulation of single-strand DNA (ssDNA) is generated through this process or by uncoordinated DNA unwinding and DNA synthesis that occurs at stalled replication forks, ultimately lead to the recruitment of recombinases that drives homology search [16]. RAD51 or RAD52 recombinases promote DNA repair by homologous recombination and SSA [17]. Both recombinases also promote DNA repair of one-end DSB, but their exact contribution to that latter pathway is still unclear [18].

HHV-6B expresses sequentially more than 97 proteins during the lytic cycle. Immediate early (IE) proteins are expressed early in the viral cycle and exhibit functions that regulate viral gene expression and promote the establishment of a favorable environment for infection. Interestingly, immediate early protein 1 (IE1) transcripts are detected in RNA-seq analysis on tissues extracted from iciHHV-6B+ individuals [19] suggesting that IE1 is expressed during latency. IE1 is the first protein expressed following HHV-6B infection [20] and although it is known to control the antiviral immune response by compromising type I interferon production and signaling [21,22], its role during infection and the integration of the viral genome is still poorly defined. In infected cells, IE1 is exclusively localized within promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (PML-NBs) [23], a nuclear structure that was recently implicated in DNA repair mediated by HDR [24-27]. Interestingly, depletion of PML reduces HHV-6B integration [28], suggesting that the IE1/PML-NBs may participate to viral integration.

In this study, we found that viral infection and more specifically the expression of IE1, leads to the accumulation of micronuclei and numerous DNA DSBs in cells. Further investigation revealed that the viral protein specifically prevents H2AX phosphorylation through a bipartite mechanism that relies on the ability of IE1 to interact with NBS1. While this function is independent of PML, structure function analysis identified a NBS1-interacting domain (NID) as well as NBS1-inhibitory domain (NBS1i) in the N-terminus and the C-terminus regions of IE1, respectively. Although current models propose that viral integration occurs through HDR DNA repair, we show that the expression of IE1 strongly inhibits all types of repairs that rely on homology. Consistently, we show that both viral replication and integration are not affected by the depletion of NBS1 in cells where telomeres are elongated in a human telomerase reverse transcriptase (hTERT) dependent manner, a finding that is coherent with a role of the telomerase complex in this process [29]. In contrast, in telomerase negative cells that rely on alternative telomere lengthening (ALT) mechanisms involving HR events, knockdown of NBS1 negatively affected HHV-6B integration. Thus, in addition to identifying a new bipartite mechanism for the inhibition of NBS1 by a viral protein, our findings reveal that viral integration relies on biological pathways that safeguard telomere extension in infected cells. Importantly, as IE1 expression has been detected in cells where HHV-6A/B is integrated [30], our results suggest a potential role of genomic instability in the development of diseases associated with iciHHV-6A/B.

4.4 Results

4.4.1 HHV-6B infection and IE1 expression induce genomic instability

Infection of the lymphoblast T cell line MOLT-3 by HHV-6B induces the formation of micronuclei (MN), suggesting that the virus leads to genomic instability during infection (**Figure 4.1A** and **Figure S4.1A**). Among the early HHV-6B proteins that are expressed upon infection, expression of IE1 in U2OS cell line is sufficient to promote the accumulation of MN over time (**Figure 1B** and **Figure S4.1B-C**). Such MN are compartmentally separated from the primary nucleus that are surrounded by an envelope (**Figure S4.1D-E**). They arise from unresolved genomic instability such as DSBs (i), lagging chromosome (ii) or by the rupture of anaphase bridges (ABs) (iii) (**Figure 4.1C**) [31]. Further analysis of the IE1-induced MN revealed that a much lower proportion of these MN exhibit centromere staining (**Figure 4.1D et Figure S4.1F**), suggesting that they are not induced by chromosome segregation defects. Although IE1 colocalizes with telomeres [32], fluorescence in situ hybridization revealed that IE1-induced MN accumulate similar levels of telomeric DNA than the micronuclei observed in parental U2OS cell (**Figure 4.1E** and **Figure S4.1G**). Moreover, IE1 is only detected in approximately 5-10% of these micronuclei (**Figure 4.1G**), suggesting that micronuclei are not arising from IE1-induced genomic stability at telomeres. Interestingly, metaphase spread assays revealed that IE1-expressing cells exhibit higher frequency of DNA breaks (**Figure 4.1F-G**), supporting the hypothesis that the micronuclei accumulation result from the accumulation of DSBs.

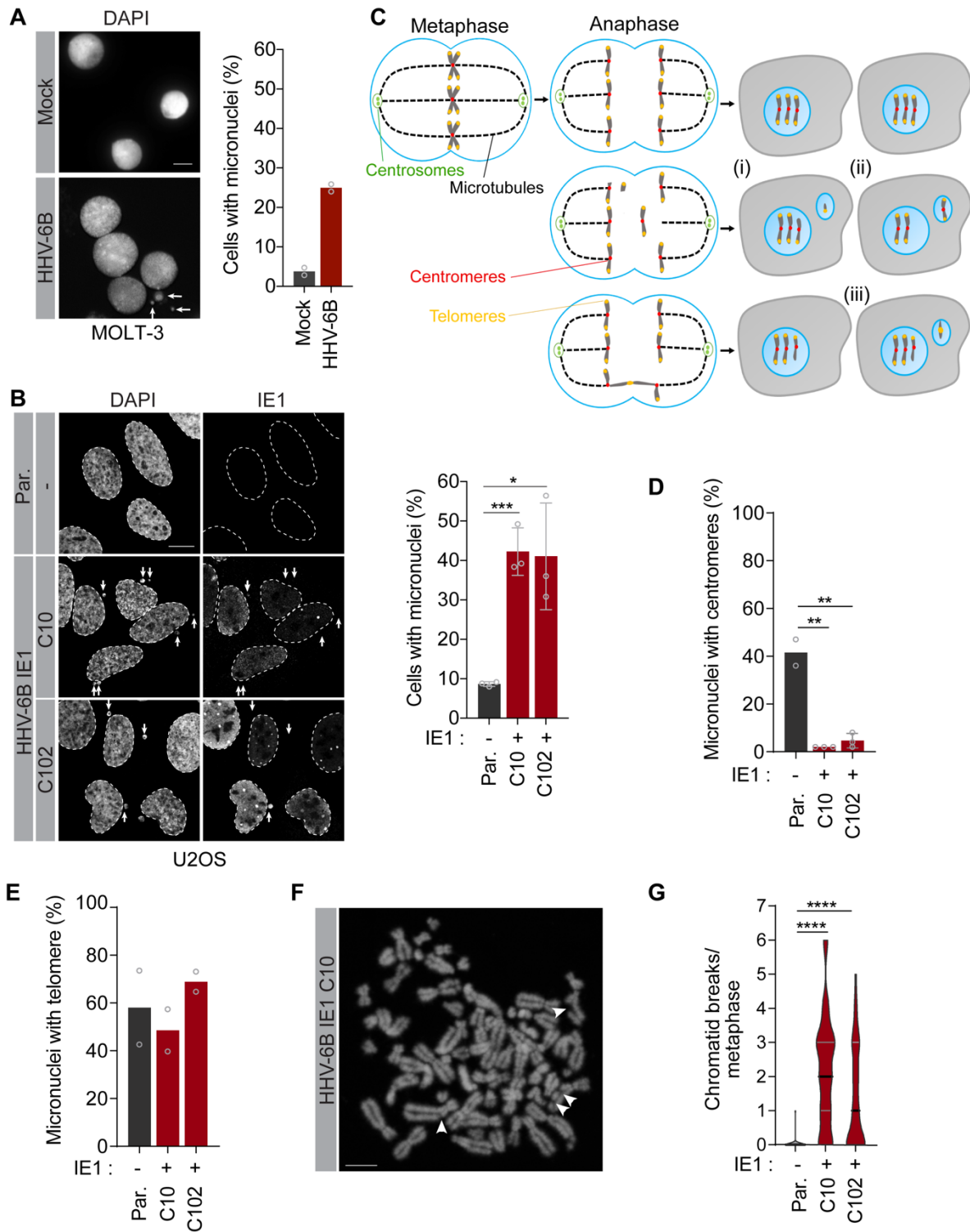


Figure 4.1. HHV-6B infection and IE1 expression leads to micronuclei formation. (A) Left panel: Representative images of micronuclei observed in HHV-6B infected MOLT-3 cells. Cells were infected and fixed 24 hours post-infection. DNA was counterstained with DAPI. Micronuclei are indicated by white arrows (scale bar, 5 μ m). Quantification of micronuclei are presented on the right panel. Data are presented as the mean ($n =$

2, >100 micronuclei/condition). **(B)** Left panel: representative images of U2OS cell line and U2OS clones stably expressing doxycycline (Dox)-inducible HHV-6B IE1 protein (C10 and C102). Expression of IE1 was induced for 48 hours with 1 $\mu\text{g/ml}$ of Dox prior to fixation. Cells were then processed for IE1 immunofluorescence and counterstained with DAPI. Micronuclei are indicated by white arrows (scale bar, 5 μm). Quantification of micronuclei are presented on the right panel. The parental cell line (Par.) was used as a negative control and data are presented as the mean \pm SD ($n = 3$). **(C)** Schematic representation of the mechanisms leading to micronuclei formation. Events leading to the formation of micronuclei induced by DNA double-strand breaks (DSBs) (i) and lagging chromosome (ii) or by anaphase bridges (ABs) (iii) are represented. **(D-E)** Quantification of micronuclei containing centromere (D) and telomere (E). Cells were treated as described in B and either processed for centromere immunofluorescence or by FISH for the detection of telomeres. Data are presented as mean \pm SD ($n = 3$) (D) and as the mean ($n = 2$, >100 micronuclei/condition) (E). **(F)** Representative image of a metaphase from IE1 expressing cells. Cells were exposed to 1 $\mu\text{g/ml}$ of dox for 48 hours, metaphase spread were prepared, fixed and processed for DNA counterstaining. **(G)** Quantification of chromosomal aberrations per metaphase. Data were analyzed with an unpaired t-test and are presented as mean \pm SD ($n = 31$). When indicated, statistical significance was assessed using unpaired t-tests, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

4.4.2 HHV-6B impairs DSB-signaling by interacting with NBS1

Accumulation of DSBs is either caused by increased source of DNA breaks or by defective DNA DSB-signaling and repair. To determine how IE1 promotes genomic stability, we first investigated whether U2OS clones that stably express the viral protein accumulate the DSB γ -H2AX marker. Surprisingly, γ -H2AX is dramatically reduced following exposure to irradiation (IR) in cells that express IE1 (**Figure 4.1A-B**). This inhibition is independent of the accumulation of IE1 within PML-NBs as a similar phenotype is observed in PML-deficient U2OS that transiently express IE1 (PML^{-/-}, **Figure 4.1C** and **Figure S4.2A-C**). Importantly, the inhibition of γ -H2AX by IE1 is recapitulated in irradiated HHV-6B-infected MOLT-3 cells (**Figure 4.2D-E**), indicating that DSB-signaling is also impaired by IE1 in the context of a natural infection.

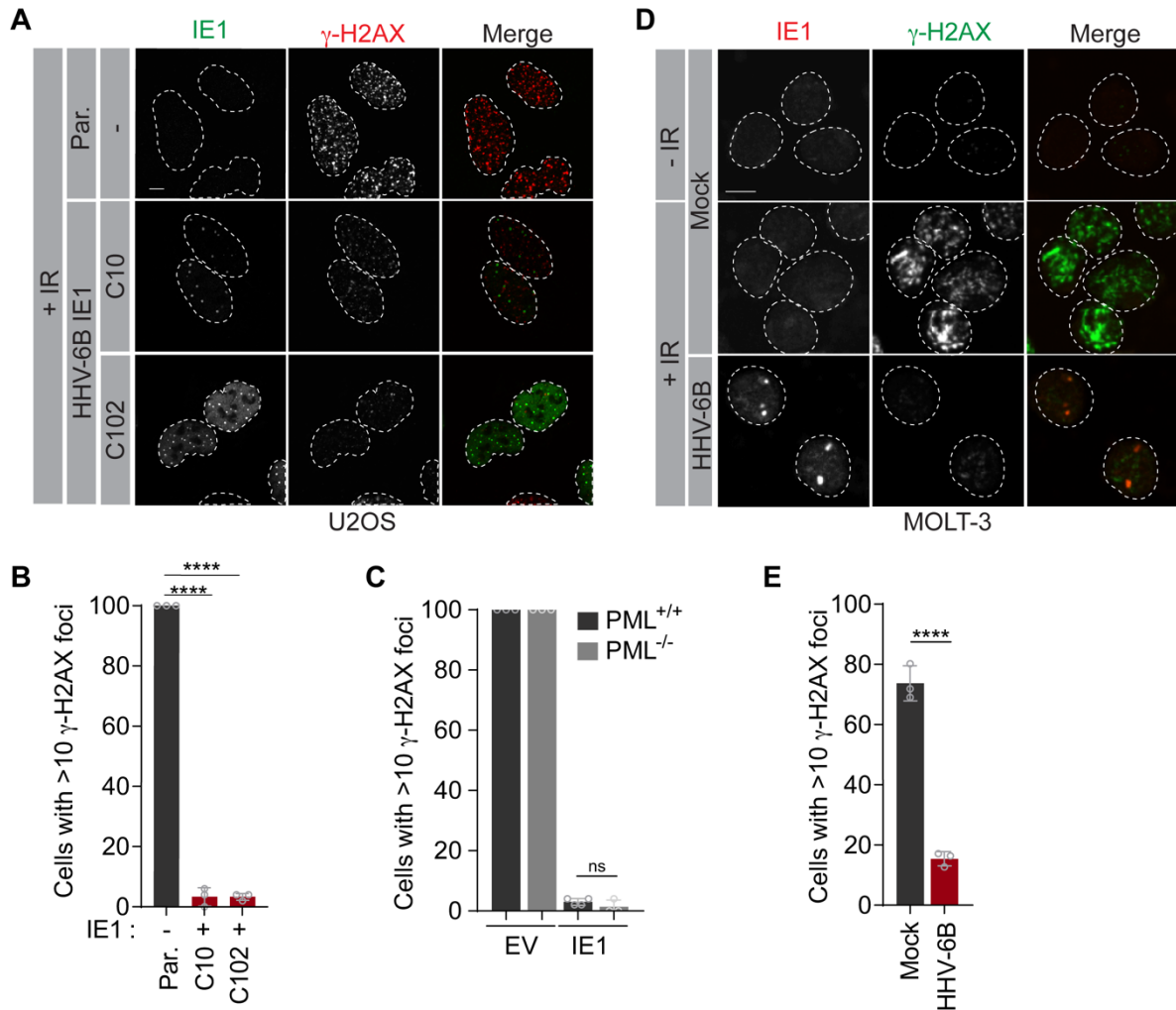


Figure 4.2. Phosphorylation of H2AX (γ -H2AX) is inhibited in HHV-6B infected and IE1 expressing cells. (A) Representative images of γ -H2AX in irradiated U2OS parental (Par.) and IE1-expressing cells. Cells were treated as described in Fig. 1B and irradiated with 1 Gy. One-hour post-irradiation, cells were fixed and processed for IE1 and γ -H2AX immunofluorescence (scale bar, 5 μ m). (B) Quantification of cells with more than 10 γ -H2AX foci in irradiated U2OS Par. and IE1-expressing cells. Data are presented as the mean \pm SD (n = 3). (C) Quantification of cells with more than 10 γ -H2AX foci in U2OS PML^{+/+} and ^{-/-} irradiated cells (1 Gy) that transiently express untagged IE1. An empty vector (EV) was used as negative control. Data are presented as the mean \pm SD (n = 3). (D) Representative images of γ -H2AX in HHV-6B infected MOLT-3 cell lines. Cells were irradiated with 4 Gy. One-hour post-irradiation, cells were fixed and processed for IE1 and γ -H2AX immunofluorescence (scale bar, 5 μ m). Mock-infected cells were used as a negative control. (E) Quantification of cells with more than 10 γ -H2AX foci in irradiated MOLT-3 infected cells. Data are presented as the mean \pm SD (n = 3). When indicated, statistical significance was assessed using unpaired t-tests, ****p<0.0001.

The histone variant H2AX is phosphorylated at DSBs following the activation of ATM by the MRN complex [13]. To determine how IE1 interferes with DSB-signaling, we first investigated the localization of NBS1 and MRE11 in U2OS clones expressing IE1. In the absence of irradiation, both NBS1 and MRE11 proteins colocalize with

IE1 foci (**Figure 4.3A-D** and **Figure S4.3A**). Interestingly, only NBS1 is relocated to IE1 foci following irradiation suggesting that the recruitment of MRE11 in absence of irradiation is mediated by NBS1 (**Figure S4.3B-C**). Consistent with this model, the recruitment of MRE11 to IE1 foci is impaired in NBS1-depleted U2OS cells that transiently express IE1 (**Figure S4.3D-F**). Furthermore, when mCherry-LacRnl-IE1 fusion protein is recruited to a *LacO* array in U2OS 2-6-5 transfected cells [33,34], only NBS1 is recruited to the array with an efficiency that is similar to its recruitment to the DSBs induced by the ER-mCherry-LacR-FOKI-DD endonuclease, which is used as a positive control in this assay (**Figure 4.3E-F** and **Figure S4.3G-H**). The absence of γ -H2AX signaling at the array upon the recruitment of mCherry-LacRnl-IE1 shows that the viral protein recruits NBS1 independently of DSB signaling. Altogether, these results suggest that IE1 recruits NBS1 and inhibits γ -H2AX signaling by preventing its recruitment to endogenous DNA breaks. As observed in **Figure 4.2**, the interaction of IE1 with NBS1 is independent of its localization to PML-NBs as NBS1 is recruited to IE1 foci with a similar efficiency in PML^{-/-} U2OS cells (**Figure S4.3I-J**).

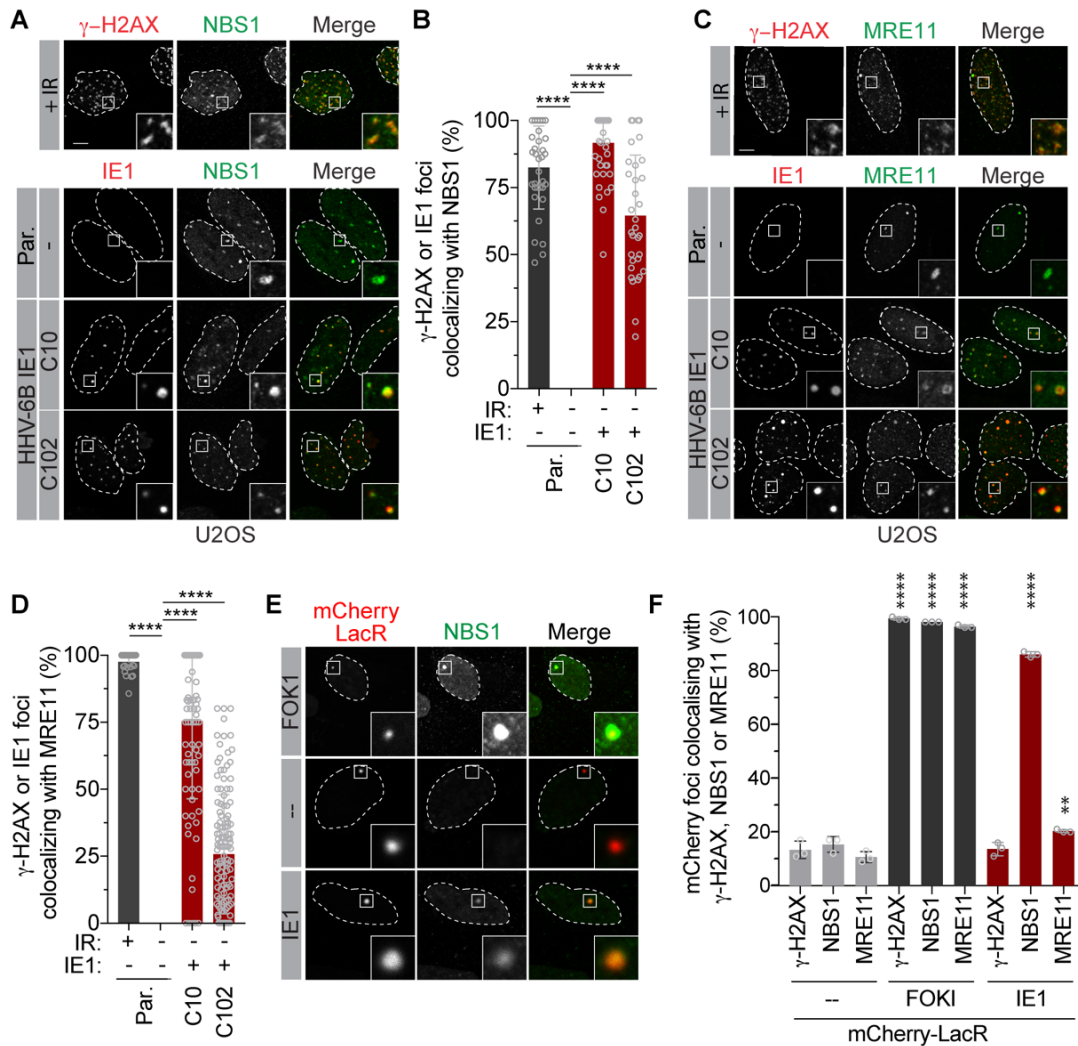


Figure 4.3. HHV-6B IE1 interacts with NBS1 and prevents its recruitment to DSBs. (A, C) Representative images of the colocalization between NBS1 (A) and MRE11 (C) with IE1. IE1-expressing cells were treated as described in Fig. 1B, fixed and processed for IE1, NBS1, or MRE11 immunofluorescence as indicated. As a positive control, irradiated U2OS cells (+IR) were fixed 15 minutes post-irradiation (1 Gy) and processed for γ -H2AX, NBS1, or MRE11 immunofluorescence as indicated (scale bar, 5 μ m). The parental cell line (Par.) was used as a negative control. **(B, D)** Quantification of γ -H2AX or IE1 foci that colocalized with NBS1 (B) and MRE11 (D) are presented as percentage of foci per cells that colocalized with the indicated protein. Data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. Statistical significance was assessed by a t-test, **** p <0.0001. **(E)** U2OS 2-6-5 cells transfected with plasmids expressing the indicated mCherry-LacR fusion protein or induced for the expression of ER-mCherry-LacR-FokI-DD were fixed and processed for NBS1 immunofluorescence (scale bars, 5 μ m). The mCherry-LacR backbone was used as a negative control (-). **(F)** Quantification of the mCherry-LacR foci colocalizing with NBS1 (E), γ -H2AX (**Figure S4.3F**), and MRE11 (**Figure S4.3G**). Data are presented as the mean \pm SD ($n = 3$). Unless stated otherwise, statistical significance was assessed using unpaired t-tests, **** p <0.0001.

4.4.3 Identification of NBS1 bipartite interaction and inhibition domain in IE1

The functional domains of IE1 are not well characterized aside from a STAT2 binding domain that was mapped in the N-terminal domain of the protein (amino acids 270-540) [21]. Guided by a secondary structure analysis of the protein, a series of IE1 fragments were fused to mCherry-LacRnls to assess their ability to recruit endogenous NBS1 to the *LacO*-array (**Figure 4.4**). Using this approach, we observed that the fragment comprising amino acids (aa) 1-540 is sufficient to recapitulate the level of NBS1 recruitment observed with the full-length protein (**Figure 4.4B** and **Figure S4.4A-B**). In this assay, the C-terminal domain of the viral protein aa 541-1078 was also able to partially recruit NBS1 to the *LacO*-array. As the fragment composed of aa 541-809 does promote NBS1 recruitment, we concluded that the domain 810-1078 also interacts with NBS1. Interestingly, we found that only WT and the C-terminal (aa 541-1078) domain of IE1 were able to inhibit γ -H2AX signaling in irradiated U2OS cells (**Figure 4.4C-D** and **Figure S4.4C-D**). Together, these results suggest that IE1 interacts and inhibits NBS1 using bipartite motifs. The N-terminal of IE1 is composed of a NBS1-interacting domain (NID) and the C-terminal domain independently inhibits the ability of NBS1 to activate ATM (**Figure 4.4A**).

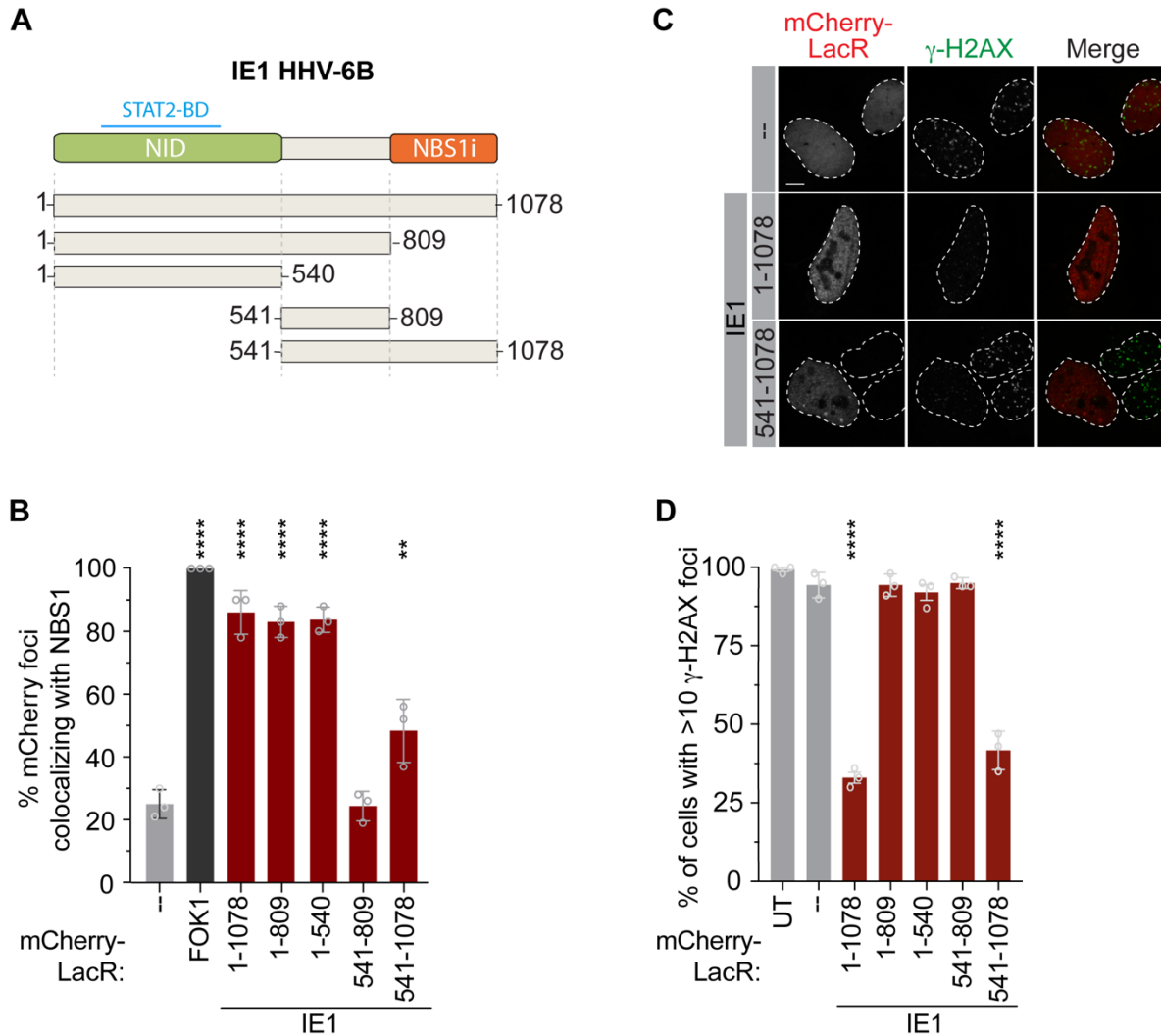


Figure 4.4. Bipartite binding and inhibition of NBS1 by HHV-6B IE1. (A) Schematic representation of HHV-6B IE1 protein and the fragments of the protein used in this study. NID, NBS1-interacting domain; NBS1i, NBS1 inhibitory domain, STAT2-BD: STAT2 binding-domain (aa 270-540). (B) U2OS 2-6-5 cells transfected with the plasmids expressing the indicated mCherry-LacR fusion protein or induced for the expression of ER-mCherry-LacR-FokI-DD were fixed and processed for NBS1 immunofluorescence (Figure S4.4A-B). The mCherry-LacR backbone was used as a negative control (--). (C) Representative images of the inhibition of γ -H2AX by IE1. Cells were transiently transfected with the indicated mCherry-LacR fusion protein and irradiated 24 hours later. One hour post-irradiation (1 Gy), cells were fixed and processed for γ -H2AX immunofluorescence. The mCherry-LacR backbone was used as a negative control (--). (D) Quantification of cells with more than 10 γ -H2AX foci. UT, untreated. When indicated, statistical significance was assessed using unpaired t-tests, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.4.4 IE1 inhibits HDR repair pathways

DSBs signaling is essential to trigger the activation of DNA repair pathways that have been proposed to drive HHV-6B integration [10]. As the functions of NBS1 are essential to promote the resection of DNA-ends that trigger homology-directed DNA repair (HDR), we investigated whether IE1 interferes specifically with this process using a panel of well-characterized DNA repair reporter assays. The efficiency of pathways that rely on homology-based DNA repair was assessed using DR-GFP and CRISPR-LMNA assays (homologous recombination) [37,38], a SA-GFP assay (single-strand annealing) [37] and a RAD51-dependent BIR-GFP assay (break-induced replication) [39] (**Figure 4.5A-C** and **Figure S4.5A, top panels**). In all assays, a condition without the endonuclease I-SceI was used as a negative control and the percentage of fluorescent-positive cells obtained with I-SceI was set to 1. Consistent with the ability of IE1 to inhibit the function of NBS1, both transient and stable expression of the viral protein drastically abolished all types of homology-directed DNA repair (**Figure 4.5A-C, lower panel**, and **Figure S4.5A-C**). As the clonal BIR-GFP U2OS cell line was generated in this study using previously described BIR-GFP reporter plasmid [39], we used siRNAs against RAD51 and RAD52 as additional controls (**Figure S4.5D-F**) [18]. As expected, BIR-GFP signal was specifically inhibited in cells depleted for RAD51 [39]. In contrast to homology-based DNA repair, IE1 only slightly decreased or increased DNA repair in reporter assays that assess the efficiency of NHEJ (NHEJ-GFP EJ7 **Figure 4.5D**, and NHEJ-pc222 **Figure S4.5G**). Altogether, these results are consistent with a model where homology-based DNA repair is specifically inhibited in cells that express HHV-6B IE1 and raise the point that either integration occurs in a context when the expression of the viral protein is minimal, absent or driven through a homology-independent mechanism.

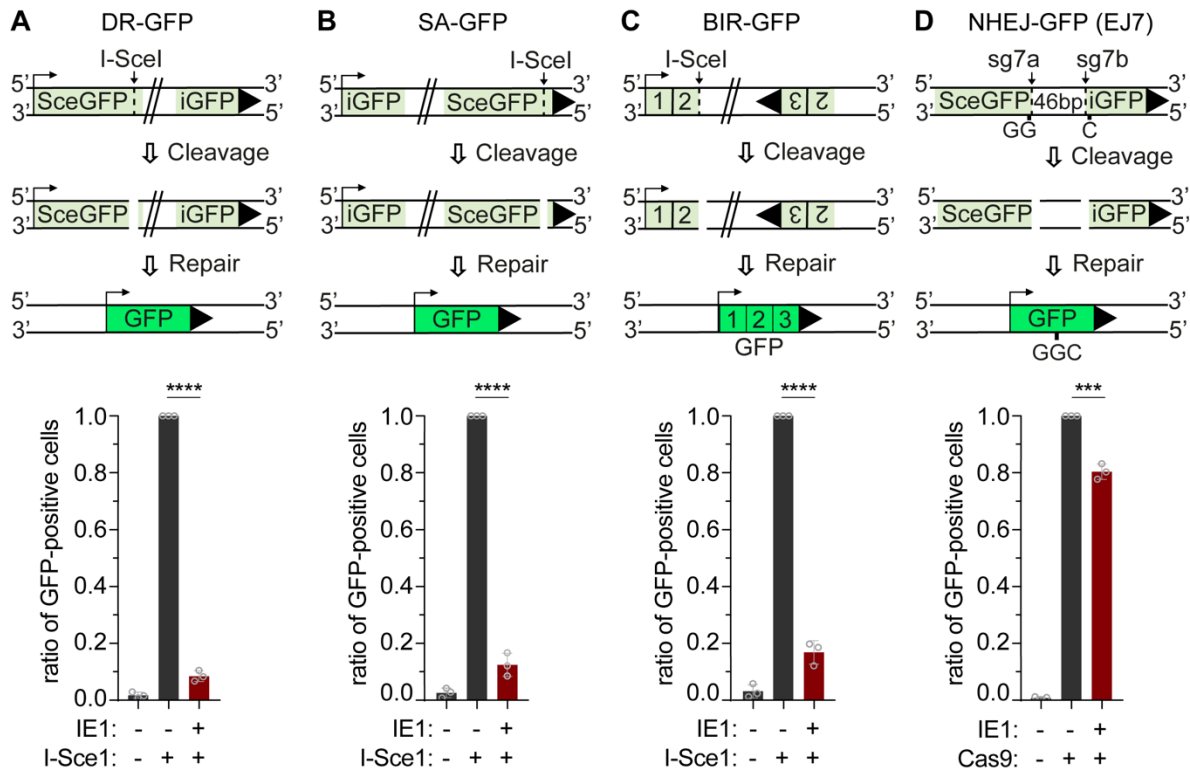


Figure 4.5. HHV-6B IE1 inhibits HR-mediated repair. DNA repair reporter assays for **(A)** homologous recombination (DR-GFP), **(B)** Single-strand annealing (SA-GFP), **(C)** Break-induced replication (BIR-GFP) and **(D)** Non-homologous end-joining (NHEJ-GFP (EJ7)). For each condition, a schematic representation of the assay is presented in the top panel and quantification of the GFP+ cells analyzed by flow cytometry is presented in the bottom panel. GFP-positive cells are normalized over GFP-positive cells quantified in the positive control (I-Sce1+, set to 1.0) in each replicate. Data are represented as the mean \pm SD ($n = 3$). Statistical significance was assessed using unpaired t-tests, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.4.5 Integration of HHV-6B relies on the pathway that safeguards telomere elongation

The MRN complex is commonly targeted by viruses to promote viral replication [40] however, the requirement of this complex for viral integration is unclear. HHV-6B infection leads to different outcomes depending on the nature of the infected cells (**Figure 4.6A**). In permissive cells, the expression of viral proteins promotes viral replication (lytic state). In contrast, in semi-permissive cells, integration of the viral genome at host's chromosome telomere is favored. The factors that lead to the reactivation of the integrated viral genome are still misunderstood. The fact that HHV-6B IE1 evolved to inhibit the function of NBS1 raises the possibility that the DNA repair protein negatively impact viral replication and/or integration. To investigate the role of NBS1 in these processes, permissive cells (MOLT-3) and semi-permissive cells (U2OS, HeLa, and GM847) depleted or not for

NBS1 were infected with HHV-6B (Figure S4.6A-D). In MOLT-3, increased replication is measured in cells depleted for NBS1, suggesting that the protein is detrimental for HHV-6B replication (Figure 4.6B). Interestingly, our results suggest that viral integration in semi-permissive cells relies on the molecular mechanisms that drive telomere elongation in these cells. Indeed, integration was not affected by the depletion of NBS1 in cells where telomeres lengthening is secured by hTERT (Table 4-1). However, integration is significantly reduced upon NBS1-depletion in both cell lines that rely on ALT to maintain telomere length (Table 4-1). In ALT-positive (ALT+) cells, telomere maintenance occurs on break-induced telomere synthesis, a RAD51-independent homology-directed DNA repair pathway [41]. Thus, our data support a model in which the mechanism of viral integration is dictated by the telomere lengthening pathway of the infected semi-permissive cell rather than a common mechanism only driven by viral protein. Importantly, our data also imply that the expression of IE1 must be repressed to promote integration in ALT+ cells.

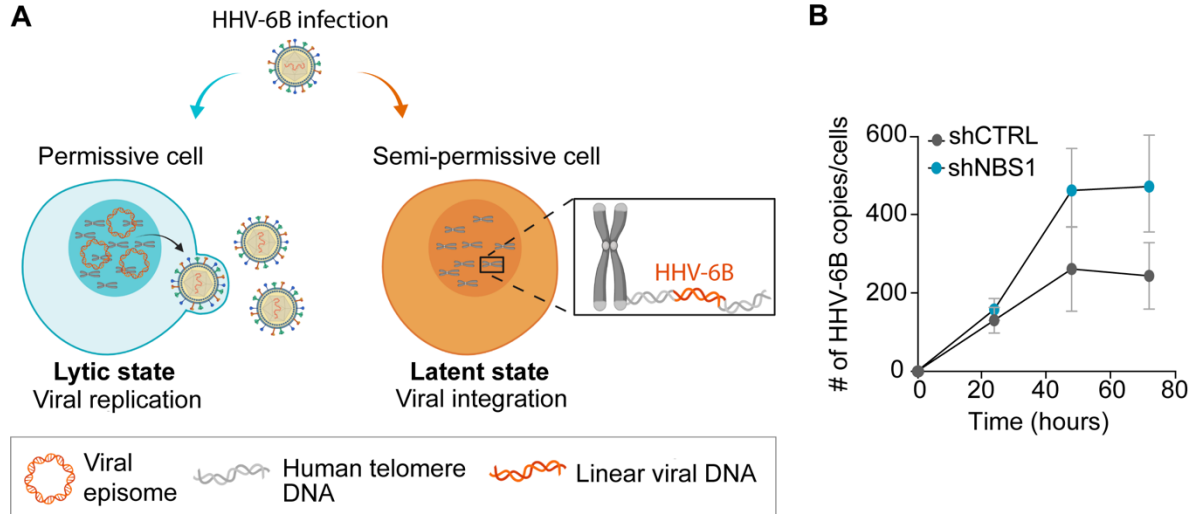


Figure 4.6. Depletion of NBS1 impairs viral integration in cells maintaining telomere by homology-directed repair. (A) Schematic representation of HHV-6B infection in permissive and semi-permissive cells. In semi-permissive cells for HHV-6B, where replication is inefficient, and the viral genome integrates at telomeres. **(B)** MOLT-3 cells depleted or not for NBS1 were infected at a MOI of 1 with HHV-6B and harvested at the indicated time points. Following cell lysis, DNA was extracted and the number of copies of HHV-6B were determined by qPCR using primers for *U67-68* gene for HHV-6B and *RPP30* as a cellular reference gene. Data presented are the mean of three independent experiment and presented as mean \pm SD (n = 3).

Table 4-1. Importance of NBS1 for HHV-6B chromosomal integration in ALT + and – cells.

Cell lines	ALT status	shRNA	% of cells integrated HHV-6B ^a (n) ^b	P value ^c
HeLa	Negative	CTRL	0.96 (36320)	<2.2e ⁻¹⁶
		NBS1	6.11 (33280)	
GM847	Positive	CTRL	0.65 (21820)	<2.2e ⁻¹⁶
		NBS1	0.01 (18320)	
U2OS	Positive	CTRL	1.60 (20000)	<2.2e ⁻¹⁶
		NBS1	0.69 (21520)	
U2OS PML ^{-/-}	Positive	CTRL	0.71 (28220)	ns
		NBS1	0.78 (30460)	

^a mean of three independent cultures

^b total number of cells analyzed

^c Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction

4.5 Discussion

In this study, we set out to understand how HHV-6B induces genomic instability in infected cells and how these processes contribute to the establishment of the latent state in semi-permissive cells. Using a series of microscopy and cytometry-based approaches to track the source of DNA breaks in infected cells and in cells expressing the immediate-early protein IE1, we discovered that in both conditions, DNA double-strand break signaling and repair are strongly inhibited through interference with the recruitment of the DNA repair protein NBS1 at the breaks. Specifically, we defined the molecular mechanism by which IE1 triggers the redistribution of the MRN complex to IE1-PML NBs by using a single-cell assay in which the colocalization of DNA repair factors with mCherry-tagged viral proteins is restricted to an integrated *LacO*-array. These findings revealed that IE1 specifically interacts with NBS1 through a NBS1-interacting domain (NID) that is located in the N-terminal part of the viral protein. We found that the expression of IE1 specifically abolishes NBS1-dependent DNA repair pathways by using an array of well-established DNA repair reporter assays. Altogether, our work argues against a model where viral integration is promoted solely by homology-based repair, but rather supports models where integration of the viral genome at telomeres is dictated by mechanisms that promote telomere-elongation in a given infected cell. Our work suggests that IE1 expression must be tightly regulated to enable viral integration in cells where telomeres are elongated by ALT. Finally, our results raise the possibility that expression of IE1 from integrated genomes might contribute to the development of icHHV-6B associated disease by inducing genomic instability in these cells. Using an RNA-seq approach, Peddu et al reported that the IE1 gene is among the most abundantly expressed genes in a variety of tissues from icHHV-6+ individuals [42]. Spontaneous and

inducible IE1 protein expression from integrated HHV-6 genomes was also documented [30]. At present, diseases associated with iciHHV-6A/B status include increased spontaneous abortion rates [43], pre-eclampsia [44] and angina pectoris [45]. Further characterization of the proteins expressed from integrated genomes as well as the disease associated with these conditions will be required to strengthen our understanding of the consequences associated with viral latency in iciHHV-6B subjects.

The functions of the MRN complex are required at DSBs, stalled replication forks and dysfunctional telomeres to safeguard genomic stability in cells [13]. Viruses have evolved different strategies to adapt to their host cell environment. Many of them develop specific mechanisms to manipulate DNA damage signaling to either promote viral processes such as replication and integration, or to protect the integrity of their genome upon infection [40]. A classic example comes from adenoviruses, where the MRN complex is targeted by concomitant viral protein to inhibit its function. Specifically, E4-ORF3-dependent relocalization of MRN proteins and E4-ORF6/E1B-55K-dependent degradation of MRN components is essential to enable efficient viral replication [46-50]. In contrast, other viruses rely on the activity of the complex to promote the integration of their genomes (adeno-associated virus (AAV)) [51,52] or to promote a DNA damage response that enhances infection levels (Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) and Human Papillomavirus (HPV)) [53-56]. While these findings demonstrate that some viruses hijack the function of DNA repair protein to support different steps of the infection, the mechanisms by which these processes benefit viral replication remains a long-standing mystery in the field [40]. In this study, we report that depletion of NBS1 results in increased HHV-6B replication in permissive cells, suggesting that HHV-6B also evolved to interfere with NBS1, or with the MRN complex, to prevent undesired recognition of viral DNA as broken DNA. This makes sense considering that during viral replication, numerous double-stranded linear genomes, which can be perceived as broken DNA, are generated. Interestingly, it has been proposed that the viral protein HSV-1 ICP0 interacts with NBS1 to redirect HDR to specific loci during the infection [58]. Here, the ability of IE1 to actively inhibit the NBS1-dependent activation of ATM at the LacO demonstrates that this is not the case for IE1 unless the NBS1i domain is post-translationally regulated during the infection. In contrast to AAV integration at the AAVS1 locus, the integration of HHV-6B at telomere is not strictly dependent on the MRN complex but rather on the processes used by infected cells to elongate telomeres (discussed below). Recent work by Tan et al. revealed that activation of DNA damage response is required to trigger a robust type I interferons response (IFNs) following mitochondrial DNA damage [59], it is plausible that viruses evolved to interfere with the activation of the DDR in order to counteract the activation of an efficient antiviral response in infected cells. This type of IFNs activation is different from the nuclear factor $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$)-dependent IFNs production that rely only on MRE11 and RAD50 [13]. Further studies will be required to investigate this possibility as well as the requirement of NSB1 for this process.

In germline, hematopoietic, stem and rapidly renewing cells, telomere elongation relies on the hTERT, a polymerase that catalyzes the extension of telomeric DNA repeats using RNA as template [60]. While hTERT is negatively regulated in somatic cells, senescence is overcome in cancer cells either through the re-activation of the hTERT enzyme or by an alternative homology-directed mechanism called ALT [61]. HHV-6B genomes contains conserved telomeric sequences that are required for viral integration [9]. In this study, we show that HHV-6B integration is independent of NBS1 in ALT- cells while it is dependent on NBS1 in ALT+ cells. These findings are consistent with previous report showing that the telomerase complex is required for optimal HHV-6B integration [29] as well as with the role of NBS1 in ALT [62,63]. While PML is not required for the interaction of IE1 with NBS1 and its concomitant ability to inhibit the phosphorylation of H2AX (this study), NBS1 is required for the assembly of functional ALT-associated PML bodies [64]. These concomitant roles are in line with the absence of phenotype associated with NBS1-depletion in integration assay performed on PML^{-/-} ALT+ U2OS. Intriguingly, we previously report that PML KO also reduces integration in the ALT- HeLa cells, reinforcing the hypothesis that PML plays ALT-independent role in this process [28]. Further studies will be required to elucidate this function.

In line with previous findings showing that HHV-6B integration is not altered upon inhibition of RAD51 [65,66], we found that IE1 inhibits homology-driven repair processes, and that integration is independent of NBS1 in ALT- cell lines. Together, these observations argue against models where integration mechanisms rely on RAD51-dependent BIR or SSA [67]. However, it is important to note that all homology-directed reporter assays used in this study rely on extensive DNA-end resection following the induction of breakage by the nucleases I-SceI or Cas9, a process that is dependent on NBS1 [57]. Thereby, integration models where SSA or RAD51-independent BIR trigger integration following extensive accumulation of single-strand DNA generated at stalled replication fork are still plausible. One attractive model is that integration of HHV-6B occurs during mitotic DNA synthesis (MiDAS), a RAD52-dependent BIR mechanism that is initiated upon replication fork stall that remain unresolved at the start of mitosis, a problem often observed at DNA locus that are hard to replicate such as telomeres [18,43,68]. Such mechanism is NBS1 and RAD51-independent and is mediated by RAD52, POLD3 as well as the structure-specific nuclease MUS81-EME1. Alternatively, upon entry into a cell and before the viral genome circularizes (and before IE1 is expressed), the viral DNA can be perceived as broken DNA. Under such circumstances, the MRN complex would be recruited to the ends of the viral genome and initiate 3' → 5' resections. The ssDNA-ends of eroded telomere (no longer efficiently protected by the shelterin complex) could anneal to the near terminal telomeric sequence at the right end of the genome in a process analogous to an ALT mechanism described in yeast (reviewed in [18]). Once the entire viral genome is copied, the telomeric repeats at the left end of the genome would serve as template for telomerase or ALT mechanisms to regenerate a telomere of appropriate length [69].

In conclusion, we provide a detailed characterization of the HHV-6B IE1 protein as an efficient inhibitor of DSB-signaling through the recruitment of NBS1. As such, IE1 contributes to the favorable establishment of a productive infection. Despite being a relatively abundant protein expressed very early upon entry, the functions of IE1 remain poorly defined. IE1 shares very little sequence homology with proteins from other herpesviruses (except HHV-6A and HHV-7) meaning that deductions based on primary sequence analysis are very limited. Our work adds to the growing knowledge surrounding HHV-6B integration processes and the potential importance of the IE1 protein during the infectious process.

4.6 Acknowledgement

We are grateful to Jacques Archambault, Alexandre Orthwein, and members of the A.F.-T. and L.F. laboratory for critical reading of the manuscript; and to Daniel Durocher, Jean-Yves Masson, Graham Dellaire, Roger Greenberg, and Jeremy Stark for essential reagents such as plasmids, purified proteins, and cell lines. E.B. and V.C. received a postdoctoral and a doctoral fellowship from the Fonds de Recherche du Québec - Santé (FRQS), respectively. V.T. received a master fellowship from the Fonds de recherche Nature et technologies (FQRNT). This work was supported by three Canadian Institutes of Health Research Grants (PDT_152948 to A.F.-T., and MOP_123214 and PJT_156118 to L.F.). A.F.-T. is a tier 2 Canada Research Chair in Molecular Virology and Genomic Instability and is supported by the Foundation J.-Louis Lévesque. We thank the Bioimaging platform of the Infectious Disease Research Centre, funded by an equipment and infrastructure grants from the Canadian Foundation Innovation (CFI).

4.7 Author contributions

Author contributions: V.C., E.B., L.F. and A.F.-T. designed research; V.C., E.B., V.T., E.G.L., J.D. and A.G. performed research and analyzed data; V.C., E.B., L.F. and A.F.-T. wrote the paper.

4.8 Material and methods

Plasmids and virus pcDNA4/TO/myc-His-HHV-6B IE1 was previously described [22]. The PiggyBac transposon-based (PB)-TetO and the PB-CA-rtTA-IRES-NEO plasmids were generated as previously described [70]. PB-TetO-HHV-6B IE1, mCherry-LacR and GFP expression vectors were generated using Invitrogen™ Gateway™ recombination cloning (Invitrogen) and the following destination vectors: pDEST-PB-TetO [70],

pDEST-mCherry-LacR [71] or pDEST-FRT-TO-GFP [72]. HHV-6B IE1 was PCR amplified from pcDNA4/TO-HHV-6B IE1. HHV-6B IE1 fragments (aa1-1078, aa1-809, aa1-540, aa1-182, aa183-363, aa364-540, aa541-809, and aa541-1078) and NBS1 fragments (aa1-754, aa1-733, aa1-638, aa1-327, aa109-754, aa201-754, and aa328-754) were PCR amplified from pcDNA4/TO-HHV-6B IE1 and pLXIN2-NBS1, a kind gift from Cary A. Moody (University of North Carolina at Chapel Hill, North-Carolina) [73]. HHV-6B strain Z29 [74] was produced by our laboratory, as previously described [75]. A list of the plasmids that were used in this study is provided in **Table S4-1**.

RNA interference SMARTPool siRNA targeting RAD51 and a non-targeting single siRNA duplex sequences were purchased from Dharmacon. Single siRNA duplexes targeting RAD52 was a kind gift from Jean-Yves Masson (Université Laval, Québec, Canada). siRNAs were transfected in a forward transfection mode 24 hours prior to cell processing using RNAiMax (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Plasmids carrying a NBS1 short hairpin RNA (shNBS1) (TRCN0000010393, Open Biosystems) or a control shRNA (shCTRL) (Mission® TRC2 pLKO.5-puro non-mammalian shRNA control plasmid DNA, Sigma #SHC202) in the pLKO background backbone were a kind gift from Cary A. Moody (University of North Carolina at Chapel Hill, North-Carolina) [73]. Lentiviruses were produced as previously described [73]. Briefly, plasmids expressing shRNAs with vesicular stomatitis virus G (pMD2.g) and lentiviral packaging (pPAX) plasmids were co-transfected into HEK-293T cells using polyethylenimine (PEI). 48-72 hours post-transfection, supernatants containing lentivirus were harvested and U2OS, MOLT-3, HeLa, and GM847 were transduced in the presence of 8 µg/ml hexadimethrine bromide (Polybrene) (Sigma). Knockdown of RAD51, RAD52 and NBS1 were confirmed for each experiment by Western blotting or qPCR analyses.

Cell Culture and transfections Cell lines were maintained at 37°C and 5% CO₂. All culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). MOLT-3 (American Type Culture Collection, ATCC) were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640; Corning Cellgro), 8.85 mM HEPES and 5 µg/ml plasmocin (Invivogen). GM847 and HeLa cell lines were obtained from ATCC and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Corning Cellgro), NEM (Corning Cellgro), 8.85 mM HEPES, and 5 µg/ml plasmocin (Invivogen). U2OS (U2OS, obtained from ATCC), U2OS PML^{-/-} [32], U2OS 2-6-5 (Gift from Roger Greenberg, University of Pennsylvania, Philadelphia) [76], U2OS DR-GFP, NHEJ-GFP (EJ7), and SA-GFP (Gift of Jeremy Stark (City of Hope National Medical Center, California) [77,78], and U2OS NHEJ-pc222 (Gift from Jacques Côté (Université Laval, Québec) [79] cell lines were cultured in McCoy's medium (Life Technologies). Doxycyclin-inducible U2OS HHV-6B IE1 clones 10 and 102 (C10 and C102) were established by co-transfecting PB-TetO-HHV-6B IE1, pCMV-hypBAse and PB-CA-rtTA-IRES-NEO plasmids, at a DNA ratio of 1:1:1 in the U2OS SA-GFP cell line using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Clones were selected using 40 mg/mL of G418 and isolated using a limit dilution approach. U2OS BIR were established

with a GFP-based reporter plasmid (pBIR-GFP) containing already characterized I-Sce1 reporter cassette to monitor BIR [80]. Plasmid transfection was carried out using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Clones were selected using 2 µg/ml puromycin and isolated using a limit dilution approach. Experiments were performed with a stable reporter clone which produce between 1.5% and 3% of GFP-positive cells after DSBs induction. Unless indicated otherwise, expression of IE1 was induced by adding 1 µg/ml doxycycline for 48h. HeLa DR-GFP (Gift from Roger Greenberg, University of Pennsylvania, Philadelphia) and HEK293T cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies). All cell lines were validated using short tandem repeat (STR) markers and tested negative for mycoplasma contamination.

Chemicals and sources of DNA damage Doxycycline (Dox, 1 µg/ml, D3447, Sigma) was used to induce the production of HHV-6B IE1 in stable U2OS cell lines C10 and C102 for 48h. In the FOK1 system, DSBs were created at the LacO array by promoting the nuclear localization (4-Hydroxytamoxifen (4-OHT, 100 nM, #3412, Tocris)) and stabilization (Shield-1 ligand, 0.5 µM, CIP-S1-0001, CheminPharma)) of mCherry-LacR-FOK1 nuclease fused to a destabilization domain (DD) and to a modified estradiol receptor (ER) (ER-mCherry-LacR-FOKI-DD) for six hours prior to immunofluorescence sample preparation. DNA damage were induced by exposing cells to ionizing irradiation (IR). U2OS were exposed to 1 Gy with a CellRad (Precision X-Ray Inc.) and MOLT-3 to 4 Gy with the Gammacell® 40 Extractor (Best Theratronics Ltd.).

Viral infection and integration assays For immunofluorescence assays on viral infection, 1×10^6 MOLT-3 cells were pelleted, infected or not (Mock) at a multiplicity of infection (MOI) of 1 with HHV-6B (strain Z29) and resuspended at final concentration of 1×10^7 cells/ml with fresh RPMI in a 1.5 ml tube for 5 hours at 37°C, 5%. The MOLT-3/HHV-6B prep was mixed every 30 minutes by flickering the tube. Cells were then washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in 1 ml of fresh RPMI in a 12-well plate. Twenty-four hours post-infection, cells were processed for immunofluorescence. For viral replication, 1.5×10^6 of MOLT-3 cells were pelleted into a 1.5 ml tube and infected or not (Mock) at a MOI of 1 with HHV-6B for 5 hours as described above. After 3 washes with PBS cells were resuspended in 3 ml of fresh RPMI, in a 6-well plate. At the indicated time point, 0.5×10^6 cells were harvested and processed for DNA extraction using QIAamp DNA Blood Mini Kit as described by the manufacturer (Qiagen Inc.) and analysed by qPCR. Integration assays were performed as described previously [81]. Briefly, 1×10^4 cells/well (U2OS shCTRL, U2OS shNBS1, HeLa shCTRL, HeLa shNBS1, GM847 shCTRL, GM847 shNBS1), cells were infected at MOI of 1 with HHV-6B in a 24-wells plate for 24 hours and washed with PBS 1X 3 times. Cells were then seeded in 6-well plates and passaged for 4 weeks prior to DNA extraction with the QIAamp DNA Blood Mini Kit as described by the manufacturer (Qiagen Inc.) and analyzed by ddPCR.

Quantitative PCR (qPCR) and droplet digital PCR (ddPCR) analyses qPCR was performed as previously described [75]. DNA was analyzed using primers and probes against *U67-68* (HHV-6B) and *RPP30* (reference gene). Data were normalized against the corresponding genome copies of the cellular *RPP30* gene. ddPCR was used to quantify integration frequency as previously described [81]. Briefly, the HHV-6B chromosomal integration frequencies were estimated assuming a single integrated HHV-6/cell and calculated with the following formula: (number of HHV-6 copies)/(number of *RPP30* copies/2 copies per cell) × 100, as previously described. This assay was previously extensively validated and provide comparable data to single cell cloning and quantification.

RNA extraction and RT-qPCR Total RNAs were extracted with the RNeasy mini kit following manufacturer's instructions (QIAGEN) and quantified by nanoDrop. 250-500 ng of total RNA was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Contaminant genomic DNA was removed by DNaseI (ThermoFisher) incubation prior to the reverse transcription (RT) reaction and confirmed by GAPDH RT-PCR performed on DNaseI treated reactions. qPCR was performed using the LightCycler 480 apparatus (Roche) with the LightCycler 480 SYBR Green 1 qPCR master mix (Roche) using the following program: 40 cycles of 94 °C denaturation for 15 sec, 56 °C annealing for 5 sec and 72 °C elongation for 15 sec. 5% of the RT-PCR reaction was used as template. Standard curve was performed with serial dilution using the U2OS cDNA as template. Relative expression of each gene was determined using the standard curve and normalized to the relative expression of the *GADPH*. The primers are listed in Table S4-1.

Immunofluorescence microscopy One hour post-irradiation, MOLT-3 cells were pelleted, washed 3 times in PBS and 1 × 10⁴ cells were added to each well of a microscope slide with 10 reaction wells (MP Biomedicals™ Multitest Slides, Fisher Scientific # ICN6041805). Once dried, cells were fixed for 20 minutes at room temperature with 2% paraformaldehyde (PFA), hydrated for 5 minutes with PSB and processed for immunofluorescence. U2OS and U2OS 2-6-5 cells were grown in 24-well plates on glass coverslips and fixed 24 hours later with either 2% (wt/vol) PFA in PBS for 20 minutes at room temperature or with 100% MeOH for 20 minutes at -20°C. When indicated, cells were treated with the indicated amount of Gy, 15 min or 1 hour prior to fixation. For immunostaining with anti-NBS1 and anti-MRE11 antibodies, nuclear extraction with ice-cold NuEx buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% NP-40, protease inhibitors (Complete, EDTA-free protease inhibitor, Sigma), and 1 mM DTT) for 20 min on ice for prior to fixation. U2OS PFA-fixed cells were further permeabilized with 0.3% (vol/vol) Triton X-100 for 20 minutes at room temperature. MOLT-3 and U2OS fixed cells were incubated with blocking buffer (2% BSA in PBS or 0.1% BSA, 3% goat serum, 0.1% Triton, 1 mM EDTA pH 8.0 in PBS) for 30 minutes at room temperature and then incubated with primary antibodies (Table S4-2) diluted in blocking buffer for 2 hours at room temperature, followed by washes in PBS. Next, cells were incubated for 1 hour at room temperature with secondary antibodies diluted in blocking buffer and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 0.4 µg/mL) in PBS. Cells were washed with PBS 1X and the coverslips

were mounted onto glass slides with Prolong Diamond mounting agent (Invitrogen). To visualize micronuclei in MOLT-3 infected or control cells, cells were collected processed with an hypotonic solution (75 mM KCl) for 20 minutes at 37°C. Cells were then fixed with fresh 3:1 methanol:acetic acid for 5 minutes and washed three times with 3:1 methanol:acetic acid solution. Washed pellets were resuspended in 500 µl of 3:1 methanol:acetic acid, dropped on a microscope slide and air dried prior to DNA counterstaining with DAPI. Images were either taken using a Zeiss LSM700 (and LSM900 recently acquired) laser-scanning microscope equipped with a 63x oil lens or a Wave FX-Borealis - Leica DMI 6000B microscope with the camera Image EM (Hamamatsu, 512x512 pixels) and Orca-R2 (Hamamatsu, 1344x1024 pixels) with a 40x (Quorum Technologies). Images were analyzed and quantified using ImageJ software [National Institutes of Health (NIH)]. In micrographs, dashed lines indicated nucleus outlines when DAPI is not shown. Unless stated otherwise, insets represent 10 X magnifications of the indicated fields.

in situ hybridization (FISH) Fixed cells were processed as described for immunofluorescence staining and then fixed for 2 minutes at room temperature with 1% PFA/PBS. Coverslips were washed twice with PBS for 5 minutes and dehydrated for 5 minutes in successive ethanol baths (70%, 95%, 100%). Once dried, coverslips were placed upside down on a drop of hybridizing solution (70% formamide; 0.5% blocking reagent; 10 mM Tris-HCl pH 7.2; 1/1000 Cy5-TeIC PNA probe (F1003, PNABio, Newbury Park, CA, USA)). Samples were denatured for 10 minutes at 80°C on a heated block. Coverslips were incubated overnight at 4°C and kept in the dark. After hybridization, coverslips were washed two times for 15 minutes in washing solution (70% formamide; 10 mM Tris-HCl pH 7.2) and then washed 3 times for 5 minutes with PBS. Samples were air dried, counterstained with DAPI, washed with PBS and coverslips were mounted onto glass slides with Prolong Gold mounting agent (Invitrogen).

Metaphase spread analysis U2OS SA-GFP HHV-6B IE1 cells were arrested in mitosis using 1 µM nocodazole for 3 hours at 37°C and 5% CO₂. Cells were then resuspended and incubated in pre-warmed hypotonic solution (KCl 75 mM, 15% SVF) at 37°C for 15 minutes to induce swelling and fixed in (75% ethanol, 25% acetic acid) overnight at 4°C. Droplets of cells were spread onto glass slides pre-cooled at -20°C and dried overnight in the dark at room temperature. Slides were then mounted with Vectashield Antifade Mounting Medium containing DAPI (VECTH20002, MJS BioLynx Inc.). Images were taken using a Zeiss LSM700 laser-scanning microscope equipped with a 40x water lens. Quantification was done on 3 biological replicates and 10 spreads were quantified per experiment.

Reporter-based DNA repair assays For DR-, NHEJ-, SA-, and BIR-GFP reporter assays in which HHV-6B IE1 was transiently transfected, U2OS or HeLa cells carrying the respective GFP expression cassette were plated at 125 000 cells/well in a 6 well plates. Twenty-four hours later, cells were co-transfected with the indicated

combination of plasmids: pcDNA4/TO-HHV-6B IE1 along with I-SceI plasmid (pCBASceI, Addgene #26477). The pcDNA4/TO/myc-His vector was used as negative control for conditions without I-SceI or IE1. A plasmid expressing iRFP was also transfected to correct for transfection efficiency in each assay. For the NHEJ-GFP (EJ7) assay, cells were co-transfected with Cas9 and sgRNA-expressing vectors p330X-sgRNA7a and p330X-sgRNA7b expressing plasmids instead of I-SceI [78]. After 48 hours (or 72 hours for NHEJ-GFP (EJ7)), cells were trypsinized, harvested, washed and re-suspended in PBS. The percentage of GFP-positive in iRFP-positive cells was determined by flow cytometry using an Accuri C6 (BD Biosciences). The data were analyzed using the FlowJo software (Flow Jo LLC). When indicated, cells were transfected with siRNA 24 hours prior to transfection with I-Sce1 expression plasmid. For SA-GFP and the CRISPR-LMNA HR assay that were done in U2OS SA-GFP HHV-6B IE1, cells were seeded at 10 000 cells per well in 24-well plates and induced with 1 µg/mL of doxycycline 24 hours post transfection with either I-Sce1 for SA-GFP assay or plasmid expressing Cas9 and LMNA sgRNA (pX330-LMNAsgRNA1) and CR2.1-mRuby-2-LMNA-Donor for CRISPR-LMNA HR assay [38]. At 48 hours post-transfection, cells were harvested and GFP-positive cells quantified by flow cytometry. mRuby-positive cells were analyzed by microscopy using a TIRF Ti-LAPP microscope (Nikon).

Statistical analysis Quantification was done on 3 biological replicates. Unless stated otherwise, unpaired t-tests were realized to assess statistical significance.

4.9 References

1. Yamanishi, K. et al. Identification of Human Herpesvirus-6 As a Causal Agent for Exanthem Subitum. *The Lancet* 331, 1065–1067 (1988).
2. Zerr, D. M. et al. A Population-Based Study of Primary Human Herpesvirus 6 Infection. *New England Journal of Medicine* 352, 768–776 (2005).
3. Hall, C. B. et al. Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *Journal of Pediatrics* 145, 472–477 (2004).
4. Arbuckle, J. H. et al. Mapping the telomere integrated genome of human herpesvirus 6A and 6B. *Virology* 442, 3–11 (2013).
5. Arbuckle, J. H. et al. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 5563–5568 (2010).
6. Tanaka-Taya, K. et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *Journal of Medical Virology* The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. 73, 465–473 (2004).
7. Daibata, M., Taguchi, T., Nemoto, Y., Taguchi, H. & Miyoshi, I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. *Blood* 94, 1545–1549 (1999).
8. Pellett, P. E. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Reviews in medical virology* 22, 144–55 (2012).
9. Wallaschek, N. et al. The Telomeric Repeats of Human Herpesvirus 6A (HHV-6A) Are Required for

- Efficient Virus Integration. *PLoS Pathogens* 12, 1–15 (2016).
10. Aimola, G., Beythien, G., Aswad, A. & Kaufer, B. B. Current understanding of human herpesvirus 6 (HHV-6) chromosomal integration. *Antiviral Research* vol. 176 (2020).
 11. Morissette, G. & Flamand, L. Herpesviruses and Chromosomal Integration. *Journal of Virology* 84, (2010).
 12. Collin, V. & Flamand, L. HHV-6A/B integration and the pathogenesis associated with the reactivation of chromosomally integrated HHV-6A/B. *Viruses* vol. 9 (2017).
 13. Syed, A. & Tainer, J. A. The MRE11-RAD50-NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annual Review of Biochemistry* vol. 87 (2018).
 14. Fradet-Turcotte, A. et al. 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* 499, (2013).
 15. Mattioli, F. & Penengo, L. Histone Ubiquitination: An Integrative Signaling Platform in Genome Stability. *Trends in Genetics* (2021) doi:10.1016/j.tig.2020.12.005.
 16. Maréchal, A. & Zou, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, (2013).
 17. Bhargava, R., Onyango, D. O. & Stark, J. M. Regulation of Single Strand Annealing and its role in genome maintenance Chromosomal break repair by the Single Strand Annealing (SSA) pathway. *Trends Genet* 32, 566–575 (2016).
 18. Kockler, Z. W., Osia, B., Lee, R., Musmaker, K. & Malkova, A. Repair of DNA Breaks by Break-Induced Replication. *Annual Review of Biochemistry* 90, (2021).
 19. Gravel, A. et al. Mapping the Human Herpesvirus 6B transcriptome. *Journal of Virology* (2021) doi:10.1128/JVI.01335-20.
 20. Schiewe, U., Neipel, F., Schreiner, D. & Fleckenstein, B. Structure and transcription of an immediate-early region in the human herpesvirus 6 genome. *J Virol* 68, 2978–2985 (1994).
 21. Jaworska, J., Gravel, A. & Flamand, L. Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8369–8374 (2010).
 22. Jaworska, J., Gravel, A., Fink, K., Grandvaux, N. & Flamand, L. Inhibition of Transcription of the Beta Interferon Gene by the Human Herpesvirus 6 Immediate-Early 1 Protein. *Journal of Virology* 81, 5737–5748 (2007).
 23. Bernardi, R. & Pandolfi, P. P. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 1006–1016 (2007).
 24. Yeung, P. L. et al. Promyelocytic leukemia nuclear bodies support a late step in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Journal of Cellular Biochemistry* 113, 1787–1799 (2012).
 25. Attwood, K. M. et al. PML isoform expression and DNA break location relative to PML nuclear bodies impacts the efficiency of homologous recombination. *Biochemistry and Cell Biology* 1–42 (2019) doi:10.1139/bcb-2019-0115.
 26. Dellaire, G. et al. Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *Journal of Cell Biology* 175, 55–66 (2006).
 27. Vancurova, M. et al. PML nuclear bodies are recruited to persistent DNA damage lesions in an RNF168-53BP1 dependent manner and contribute to DNA repair. *DNA Repair* 78, (2019).
 28. Collin, V., Gravel, A., Kaufer, B. B. & Flamand, L. The promyelocytic leukemia protein facilitates human herpesvirus 6B chromosomal integration, immediate-early 1 protein multiSUMOylation and its localization at telomeres. *PLoS Pathogens* 16, (2020).
 29. Gilbert-Girard, S. et al. Stabilization of telomere G-quadruplexes interferes with human herpesvirus 6A chromosomal integration. *Journal of Virology* JVI.00402-17 (2017) doi:10.1128/JVI.00402-17.
 30. Gravel, A. et al. Cell Culture Systems To Study Human Herpesvirus 6A/B Chromosomal Integration. *Journal of Virology* 91, e00437-17 (2017).
 31. Cassel, A. P. R., Barcellos, R. B., da Silva, C. M. D., de Matos Almeida, S. E. & Rossetti, M. L. R.

- Association between human papillomavirus (HPV) DNA and micronuclei in normal cervical cytology. *Genetics and Molecular Biology* 37, 360–363 (2014).
32. Collin, V., Gravel, A., Kaufer, B. B. & Flamand, L. The promyelocytic leukemia protein facilitates human herpesvirus 6B chromosomal integration, immediate-early 1 protein multiSUMOylation and its localization at telomeres. *PLoS Pathogens* 16, (2020).
 33. Tang, J. et al. Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nature Structural and Molecular Biology* 20, 317–325 (2013).
 34. Sitz, J. et al. Human papillomavirus E7 oncoprotein targets RNF168 to hijack the host DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116, (2019).
 35. Bian, L., Meng, Y., Zhang, M. & Li, D. MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: Implications for cancer treatment. *Molecular Cancer* vol. 18 (2019).
 36. Soutoglou, E. & Misteli, T. Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science* 320, (2008).
 37. Stark, J. M., Pierce, A. J., Oh, J., Pastink, A. & Jasin, M. Genetic Steps of Mammalian Homologous Repair with Distinct Mutagenic Consequences. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9305–9316 (2004).
 38. Boonen, R. A. C. M. et al. Functional analysis of genetic variants in the high-risk breast cancer susceptibility gene PALB2. *Nature Communications* 10, (2019).
 39. Costantino, L. et al. Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science* 343, 88–91 (2014).
 40. Weitzman, M. D. & Fradet-Turcotte, A. Virus DNA replication and the host DNA damage response. *Annual Review of Virology* 5, (2018).
 41. Dilley, R. L. et al. Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature* 539, (2016).
 42. Peddu, V. et al. Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 Demonstrates Tissue-Specific RNA Expression In Vivo That Correlates with an Increased Antibody Immune Response. *Journal of Virology* 94, (2019).
 43. Minocherhomji, S. et al. Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature* 528, (2015).
 44. Gaccioli, F. et al. Fetal inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 predisposes the mother to pre-eclampsia. *Nature Microbiology* 5, (2020).
 45. Gravel, A. et al. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 as a predisposing risk factor for the development of angina pectoris. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, (2015).
 46. Stracker, T. H., Carson, C. T. & Weitzman, M. D. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-Nbs1 DNA repair complex. *Nature* 418, (2002).
 47. Mathew, S. S. & Bridge, E. Nbs1-dependent binding of Mre11 to adenovirus E4 mutant viral DNA is important for inhibiting DNA replication. *Virology* 374, (2008).
 48. Evans, J. D. & Hearing, P. Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex by the Adenovirus E4 ORF3 Protein Is Required for Viral Replication. *Journal of Virology* 79, (2005).
 49. Karen, K. A., Hoey, P. J., Young, C. S. H. & Hearing, P. Temporal Regulation of the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex during Adenovirus Infection. *Journal of Virology* 83, (2009).
 50. Lakdawala, S. S. et al. Differential Requirements of the C Terminus of Nbs1 in Suppressing Adenovirus DNA Replication and Promoting Concatemer Formation. *Journal of Virology* 82, (2008).
 51. Millet, R. et al. Impact of the MRN Complex on Adeno-Associated Virus Integration and Replication during Coinfection with Herpes Simplex Virus 1. *Journal of Virology* 89, (2015).
 52. Schwartz, R. A. et al. The Mre11/Rad50/Nbs1 Complex Limits Adeno-Associated Virus Transduction and Replication. *Journal of Virology* 81, (2007).
 53. Anacker, D. C., Gautam, D., Gillespie, K. A., Chappell, W. H. & Moody, C. A. Productive Replication of Human Papillomavirus 31 Requires DNA Repair Factor Nbs1. *Journal of Virology* 88, 8528–8544 (2014).

54. Wilkinson, D. E. & Weller, S. K. Recruitment of Cellular Recombination and Repair Proteins to Sites of Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Replication Is Dependent on the Composition of Viral Proteins within Prereplicative Sites and Correlates with the Induction of the DNA Damage Response. *Journal of Virology* 78, (2004).
55. Mohni, K. N., Mastrocola, A. S., Bai, P., Weller, S. K. & Heinen, C. D. DNA Mismatch Repair Proteins Are Required for Efficient Herpes Simplex Virus 1 Replication. *Journal of Virology* 85, (2011).
56. Lilley, C. E., Carson, C. T., Muotri, A. R., Gage, F. H. & Weitzman, M. D. DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, (2005).
57. Sakamoto, S. et al. Homologous recombination repair is regulated by domains at the N and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene* 26, (2007).
58. Lou, D. I. et al. An Intrinsically Disordered Region of the DNA Repair Protein Nbs1 Is a Species-Specific Barrier to Herpes Simplex Virus 1 in Primates. *Cell Host and Microbe* 20, (2016).
59. Tigano, M., Vargas, D. C., Tremblay-Belzile, S., Fu, Y. & Sfeir, A. Nuclear sensing of breaks in mitochondrial DNA enhances immune surveillance. *Nature* 591, (2021).
60. Wu, R. A., Upton, H. E., Vogan, J. M. & Collins, K. Telomerase mechanism of telomere synthesis. *Annual Review of Biochemistry* vol. 86 (2017).
61. Cesare, A. J. & Reddel, R. R. Alternative lengthening of telomeres: Models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Genetics* vol. 11 (2010).
62. Zhong, Z. H. et al. Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. *Journal of Biological Chemistry* 282, (2007).
63. Jiang, W.-Q. et al. Suppression of Alternative Lengthening of Telomeres by Sp100-Mediated Sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 Complex. *Molecular and Cellular Biology* 25, (2005).
64. Wu, G., Jiang, X., Lee, W. H. & Chen, P. L. Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires nijmegen breakage syndrome 1. *Cancer Research* 63, (2003).
65. Wight, D. J. et al. Viral proteins U41 and U70 of human herpesvirus 6A are dispensable for telomere integration. *Viruses* 10, (2018).
66. Wallaschek, N., Gravel, A., Flamand, L. & Kaufers, B. B. The putative U94 integrase is dispensable for human herpesvirus 6 (HHV-6) chromosomal integration. *Journal of General Virology* 97, (2016).
67. Aimola, G., Beythien, G., Aswad, A. & Kaufers, B. B. Current understanding of human herpesvirus 6 (HHV-6) chromosomal integration. *Antiviral Research* vol. 176 (2020).
68. Bhowmick, R., Minocherhomji, S. & Hickson, I. D. RAD52 Facilitates Mitotic DNA Synthesis Following Replication Stress. *Molecular Cell* 64, (2016).
69. Huang, Y. et al. Human telomeres that carry an integrated copy of human herpesvirus 6 are often short and unstable, facilitating release of the viral genome from the chromosome. *Nucleic Acids Research* 42, (2014).
70. Ho, T.-H. et al. A Screen for Epstein-Barr Virus Proteins That Inhibit the DNA Damage Response Reveals a Novel Histone Binding Protein. *Journal of Virology* 92, (2018).
71. Orthwein, A. et al. A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature* 528, 422–426 (2015).
72. Escribano-Díaz, C. et al. A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* 49, 872–883 (2013).
73. Anacker, D. C., Gautam, D., Gillespie, K. A., Chappell, W. H. & Moody, C. A. Productive Replication of Human Papillomavirus 31 Requires DNA Repair Factor Nbs1. *Journal of Virology* 88, 8528–8544 (2014).
74. Lopez C, Pellett P, Stewart J, Goldsmith C, Sanderlin K, Black J, Warfield D, F. P. Characteristics of human herpesvirus-6. *The Journal of Infectious Diseases* 157, 1271–1273 (1988).
75. Gravel, A., Gosselin, J. & Flamand, L. Human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *Journal of Biological Chemistry* 277, 19679–19687 (2002).

76. Tang, J. et al. Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nature Structural and Molecular Biology* 20, 317–325 (2013).
77. Stark, J. M., Pierce, A. J., Oh, J., Pastink, A. & Jasin, M. Genetic Steps of Mammalian Homologous Repair with Distinct Mutagenic Consequences. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9305–9316 (2004).
78. Bhargava, R. et al. C-NHEJ without indels is robust and requires synergistic function of distinct XLF domains. *Nature Communications* 9, (2018).
79. Jacquet, K. et al. The TIP60 Complex Regulates Bivalent Chromatin Recognition by 53BP1 through Direct H4K20me Binding and H2AK15 Acetylation. *Molecular Cell* 62, 409–421 (2016).
80. Costantino, L. et al. Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science* 343, 88–91 (2014).
81. Gravel, A. et al. Cell Culture Systems To Study Human Herpesvirus 6A/B Chromosomal Integration. *Journal of Virology* 91, e00437-17 (2017).
82. Couzens, A. L. et al. Protein interaction network of the mammalian hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Science Signaling* 6, (2013).

4.10 Supporting information

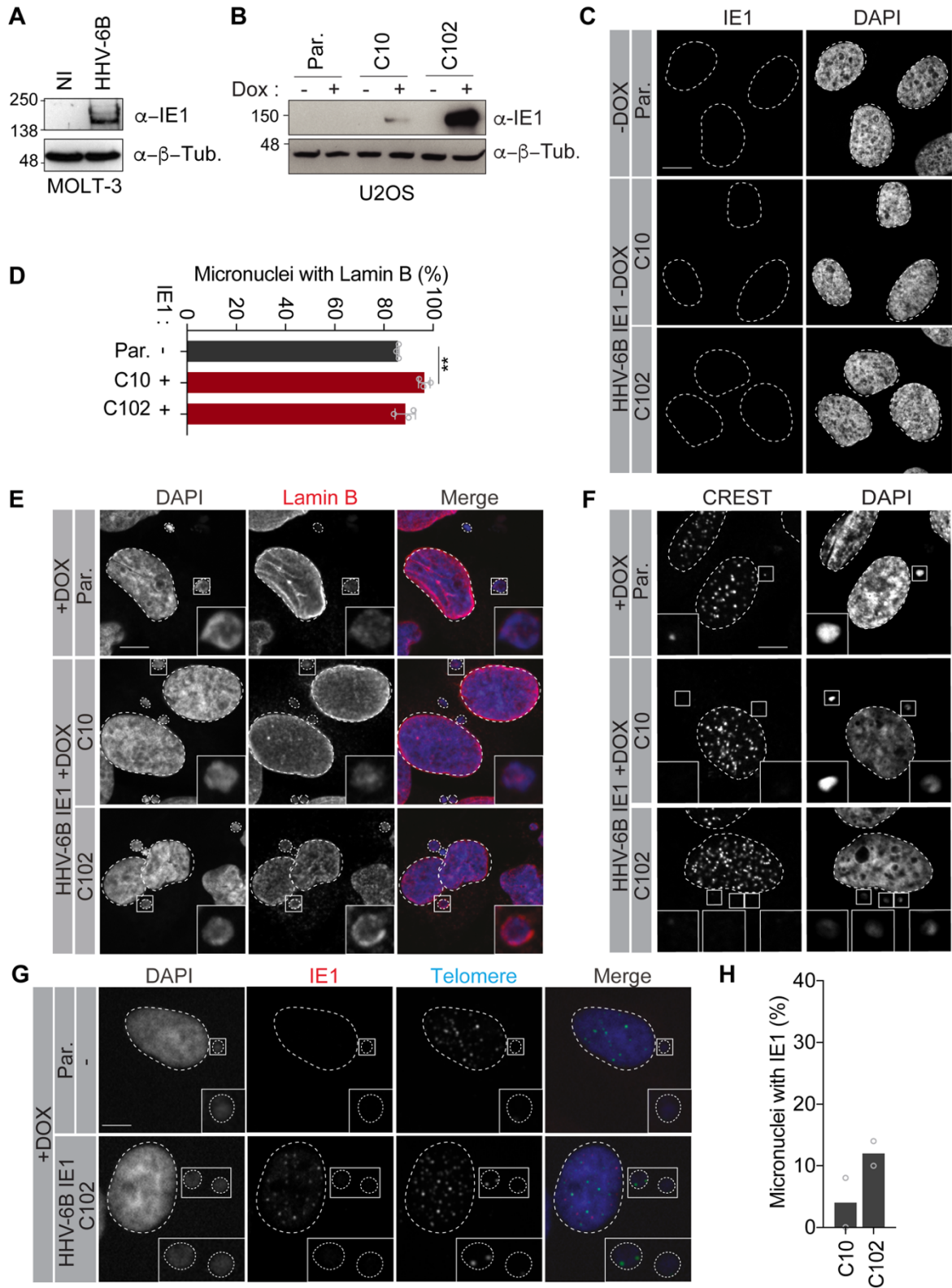


Figure S4.1. (A-B) Whole cell extracts (WCE) from infected MOLT-3 (A) and U2OS cells treated or not with 1 $\mu\text{g/ml}$ of Dox (B) were analyzed by immunoblotting with an antibody against IE1. β -tubulin was used as loading control. NI: non-infected, Par.: parental cell line. **(C, F, G)** Representative images of the U2OS (Par.) and U2OS IE1 stable cell lines with or without Dox induction (as indicated) for Figure 4.1B, D and E. Cells were treated as described in Figure 4.1B and either processed for IE1 (C, G) or centromeres (CREST) immunofluorescence (F) or by FISH for the detection of telomeres (G) (scale bar, 5 μm). **(D-E)** U2OS (Par.) and U2OS IE1 stable cell lines with Dox induction were treated as described in Figure 4.1B and processed for Lamin B fluorescence. Quantification of micronuclei with Lamin B signal is presented in (D) and representative images in (E). In (D), data are represented as mean \pm SD ($n = 3$) and analyzed with a t-test, $**p \leq 0.01$. **(H)** Quantification of micronuclei colocalizing with IE1 foci. IE1-expressing cells were treated as described in Figure 4.1C, fixed and processed for IE1 immunofluorescence. Data are presented as the mean \pm SD ($n = 2$, >100 nuclei/condition).

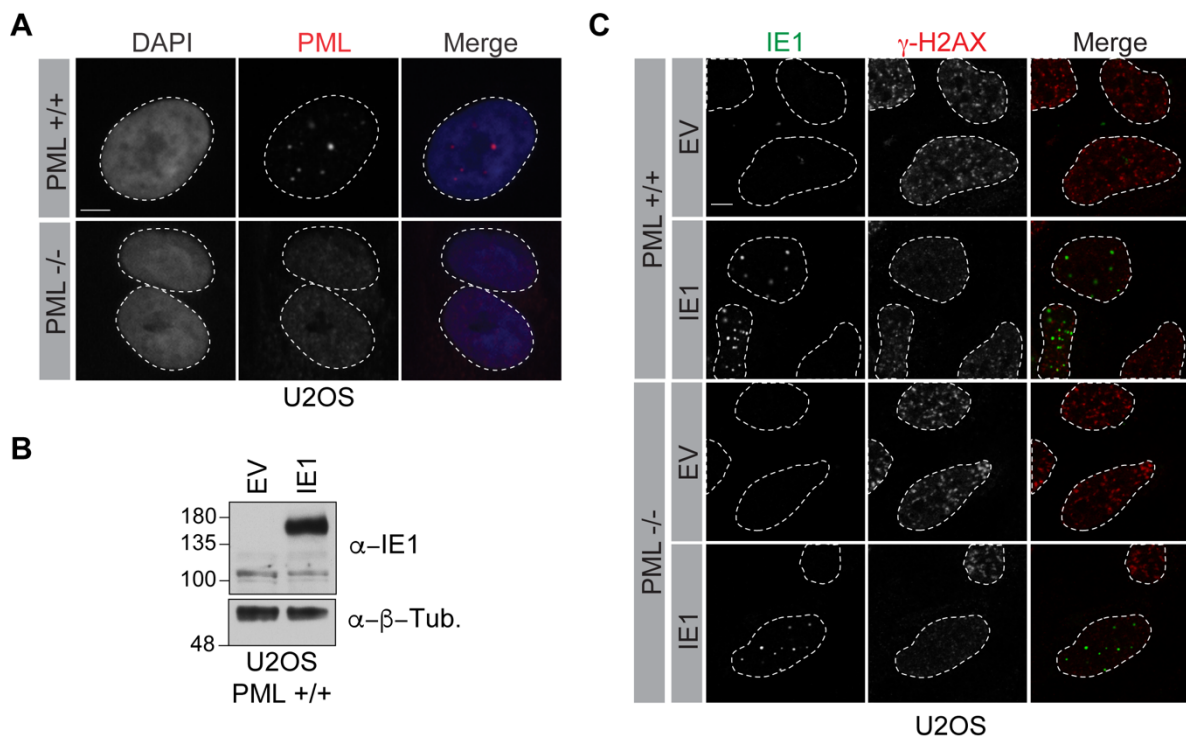


Figure S4.2. (A) Representative images of untreated U2OS PML^{+/+} and ^{-/-} cells fixed and processed for PML immunofluorescence. **(B)** Western blot analysis of U2OS transfected with untagged IE1 or an empty vector (EV) plasmids WCE. β -tubulin was used as loading control. **(C)** Representative images of U2OS PML^{+/+} and ^{-/-} cells transiently transfected with a plasmid expressing untagged IE1 or an empty vector (EV) as negative control. Cells were irradiated with 1 Gy, fixed 15 minutes post-irradiation and processed for IE1 and γ -H2AX immunofluorescence (scale bar, 5 μm).

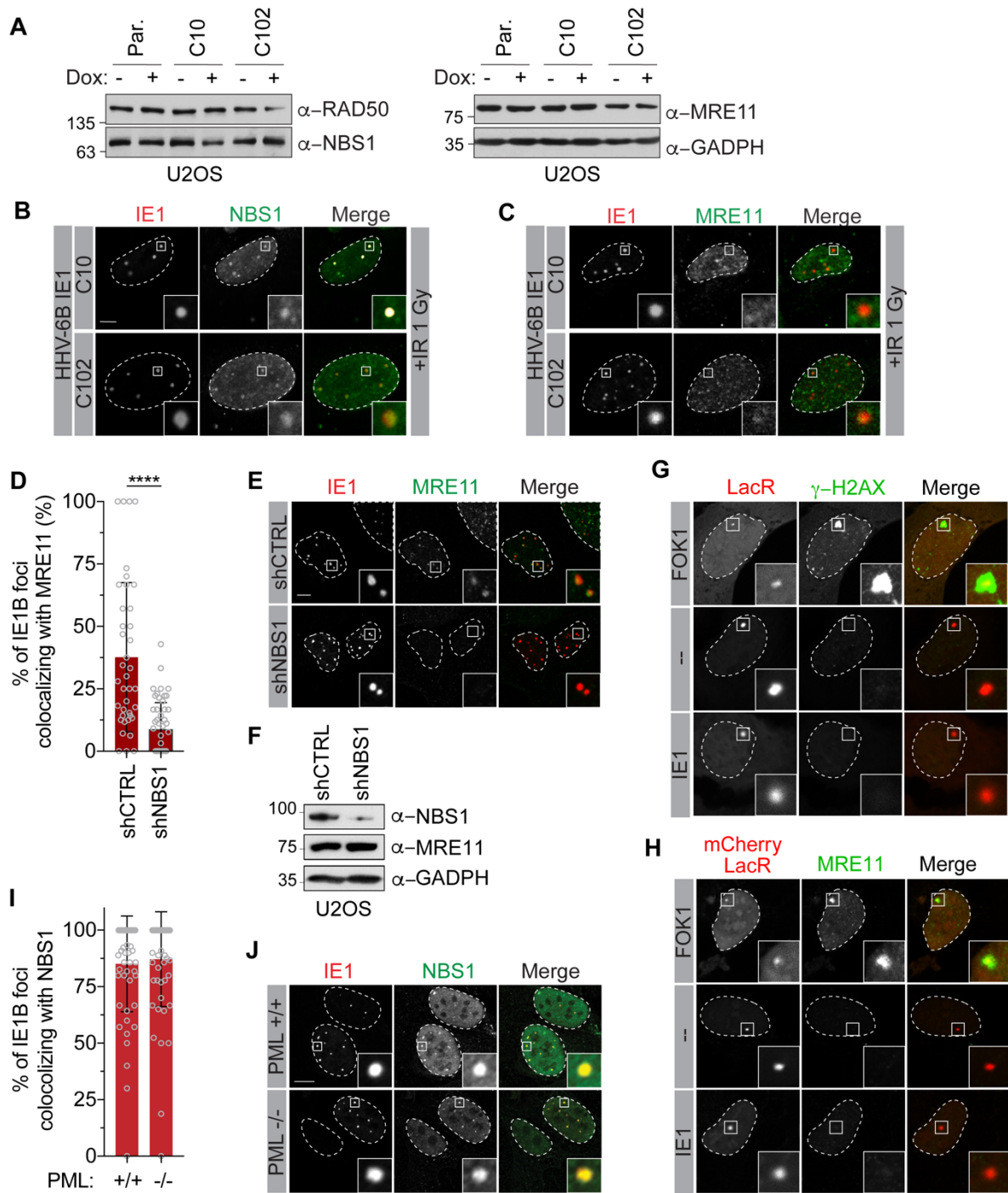


Figure S4.3. (A) WCE from U2OS cells (Par.) and IE1-expressing U2OS stable cell lines treated or not with 1 $\mu\text{g/ml}$ of Dox were analyzed by immunoblotting with antibodies against RAD50, NBS1 and MRE11. GAPDH was used as loading control. **(B-C)** Representative immunofluorescence of IE1-expressing U2OS stable cell lines induced with Dox and irradiated with 1 Gy. Cells were fixed 1 hour post-irradiation and processed as described in Figure 4.3A and C, respectively. **(D)** Quantification of IE1 foci that colocalize MRE11 in stable U2OS control cells (shCTRL) or depleted for NBS1 (shNBS1). Cells were transiently transfected with untagged IE1 and treated as described in Figure 4.3B. Percentage of IE1 foci per cells that colocalize with NBS1 are presented as the mean \pm SD ($n = 2$, at least 40 nuclei/condition). **(E)** Representative immunofluorescence of the data presented

in Figure S4.3D. **(F)** WCE from U2OS shCTRL and shNBS1 stable cell lines were analyzed by immunoblotting with antibodies against NBS1 and MRE11. GAPDH was used as loading control. **(G-H)** Representative immunofluorescence of the quantification presented in Figure 4.3F. **(I)** Quantification of IE1 foci that colocalize with NBS1 in U2OS PML^{+/+} and ^{-/-} cells transiently expressing untagged IE1. Cells were treated as described in Figure 4.3A. Percentage of IE1 foci per cells that colocalize with NBS1 are presented as the mean \pm SD (n = 3). **(J)** Representative immunofluorescence of the quantification presented in Figure S4.3I. Statistical significance was assessed by unpaired t-tests, ****p<0.0001.

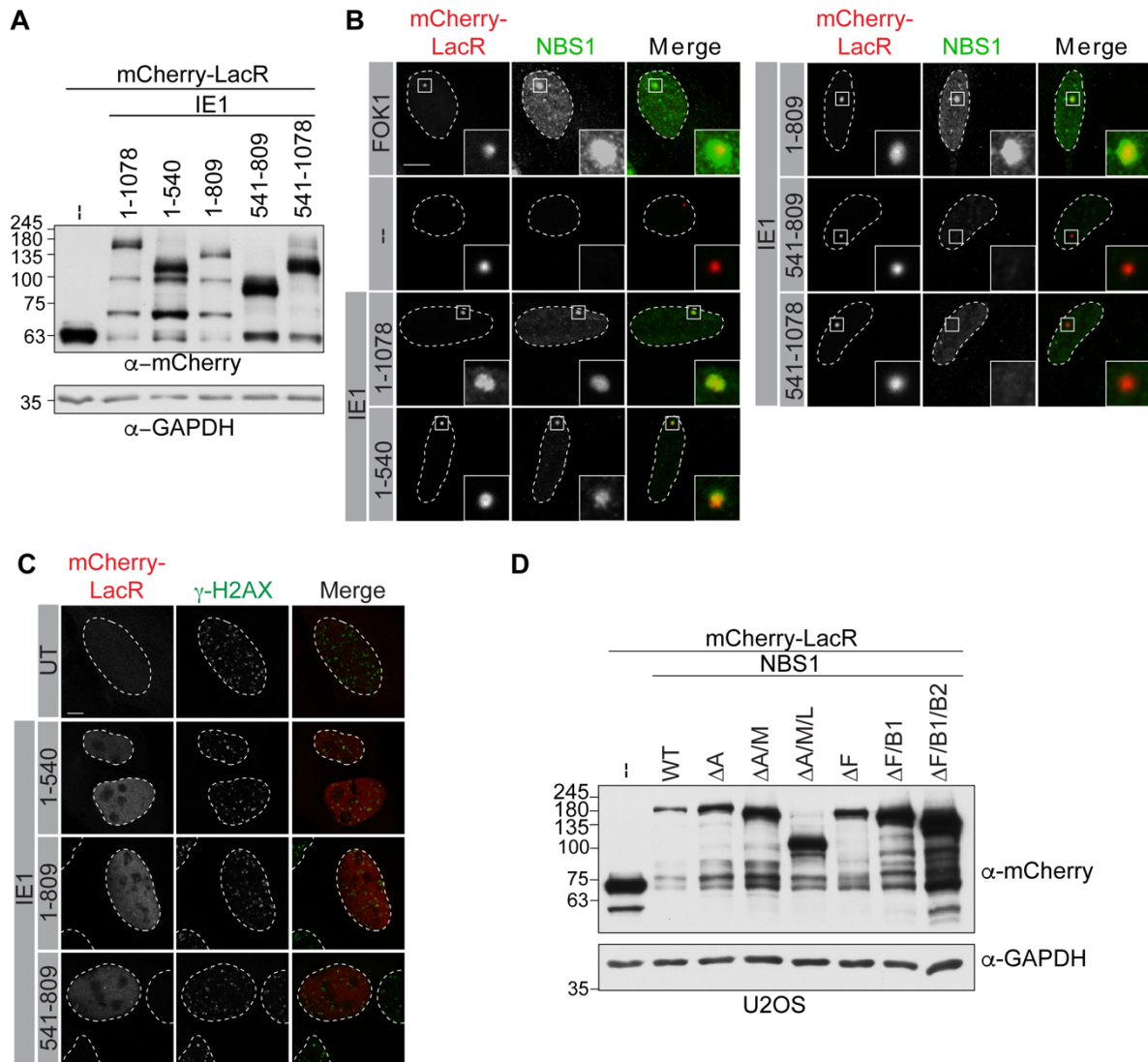


Figure S4.4. **(A, D)** WCE from U2OS cells that transiently express the indicated mCherry-LacR fusion protein were analyzed by immunoblotting with antibodies against mCherry. GAPDH was used as loading control. The mCherry-LacR backbone was used as a negative control (--) in (A). **(B-C)** Representative immunofluorescence images used for the quantification presented in Figure 4.4B (B) and Figure 4.4D (C) (scale bar, 5 μ m).

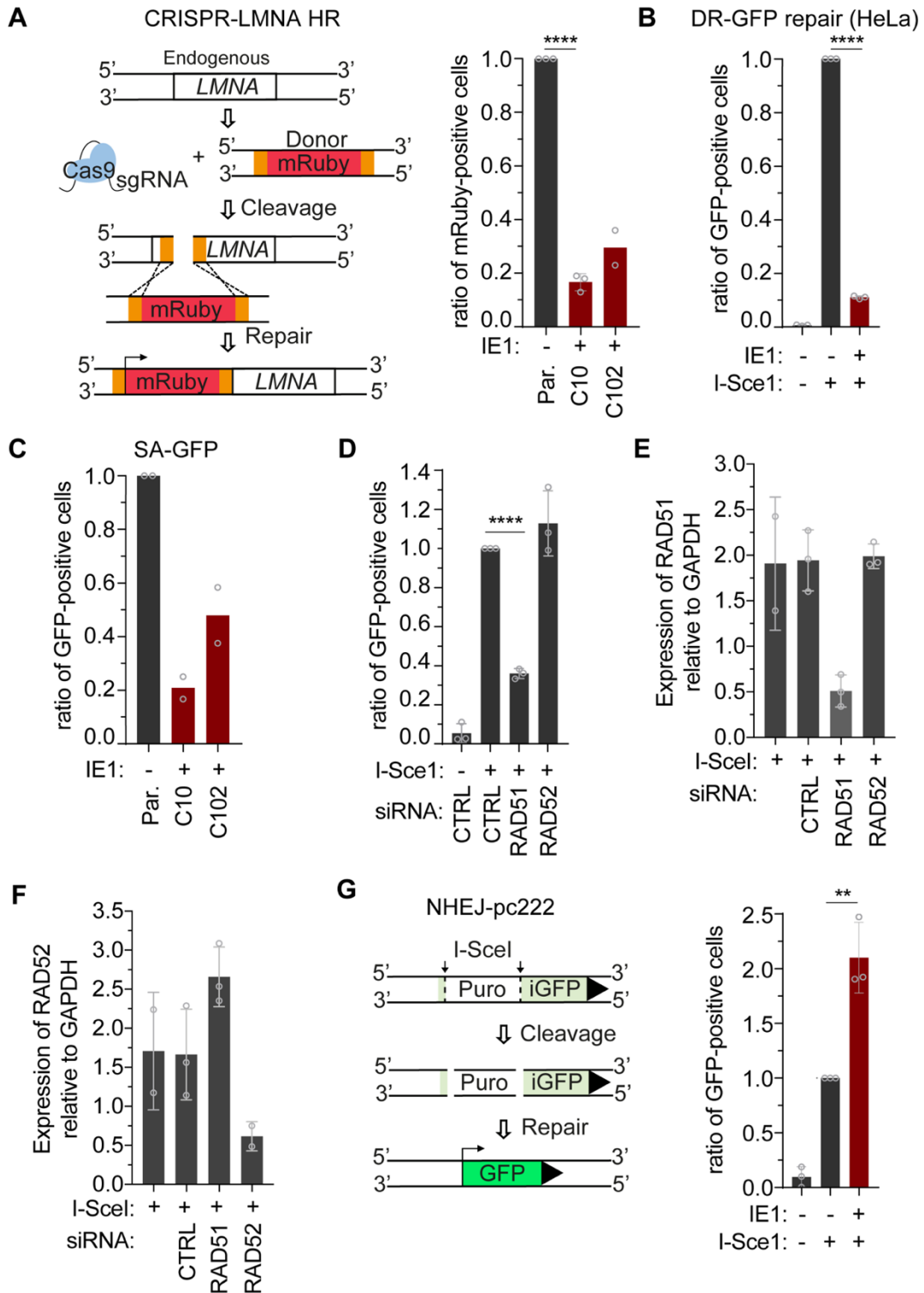


Figure S4.5. (A) CRISPR-LMNA HR assay was analyzed in Dox-inducible IE1 U2OS SA-GFP stable cell lines. Cell lines were plated and induced for IE1 expression for 24 hours prior to transfection with plasmids encoding Cas9, LMNA sgRNA, and mRuby2-LMNA donor. Percentage of mRuby-positive cells were analyzed by flow cytometry 48 h post-transfection and normalized over percentage of mRuby-positive U2OS SA cells (Par.) in

each replicate. **(B)** DNA repair assay for homologous recombination in HeLa cells were performed as described for U2OS cells in Figure S4.5A. **(C)** Single-strand annealing (SA) assay was analyzed in Dox-inducible IE1 U2OS SA-GFP stable cell lines. Cell lines were plated and induced for IE1 expression for 24 hours prior to transfection with plasmids encoding I-SceI endonuclease. Percentage of GFP-positive cells were analyzed by flow cytometry 48 h post-transfection and normalized over percentage of GFP-positive U2OS SA cells (Par.) in each replicate. Data are represented as the mean \pm SD (n = 2). **(D)** Validation of the BIR repair assay using siRNA against RAD51 and RAD52. A non-targeting siRNA (NT) was also used as control. **(E-F)** RT-qPCR was performed on U2OS BIR cells using gene-specific primers for RAD51(E) and RAD52(F). Expression of each transcript has been normalized against GADPH. **(G)** DNA repair assay for non-homologous end-joining (NHEJ-pc222) in U2OS cells were performed as described in Figure S4.5D. Unless stated otherwise, data are represented as the mean \pm SD (at least n = 3). Statistical significance was assessed by unpaired t-tests, **p<0.01, ****p<0.0001.

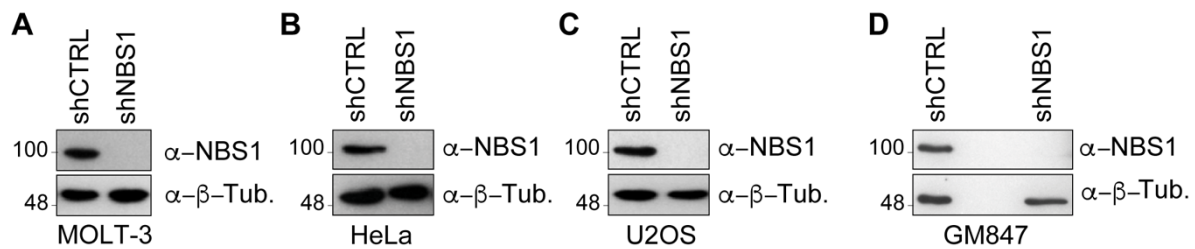


Figure S4.6. (A-D) WCE from MOLT-3 (A), HeLa (B), U2OS (C), and GM847 (D) cell lines expressing a shRNA against NBS1 (shNBS1) or control (shCTRL) were analyzed by immunoblotting with an antibody against NBS1. β -Tubulin was used as loading control.

Table S4-1. Primers, siRNA, shRNA and FISH probes sequences used in this study.

Name	sequence 5'-3'	Used for
shCTRL (Sigma: SHC202)	CCGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCA TCTTGTTGTTTT	Control shRNA in U2OS, MOLT-3, HeLa, GM847
shNBS1 (TRCN0000010 393)	GAAGAGTGGCTAAGGCAGGAA	KD NBS1 in U2OS, MOLT-3, HeLa, GM847
U67-68 FW	TTCCGGTATATGACCTTCGTAAGC	qPCR and ddPCR
U67-68 RV	GATGTCTCACCTCCAAATCTTAGAAAT	qPCR and ddPCR
U67-68 Probe	FAM-ACATTATAT-ZEN-RTCGAAYTGACR CTACCTCCG-IABkFQ Mix probe where R = A ou G, Y = C ou T to accommodate the sequence of HHV-6A and -6B	ddPCR ^c
RPP30 FW	GATTTGGACCTGCGAGCG	qPCR and ddPCR
RPP30 RV	GCGGCTGTCTCCACAAGT	qPCR and ddPCR
RPP30 Probe	HEX-TCTGACCTG-ZEN-AAGGCTCTGCGCG-IABkFQ	ddPCR ^c
GAPDH FW	CAACGTGTCAGTGGTGGACC	RT, qPCR ^b
GAPDH RV	TCGTTGAGGGCAATGCCAGC	RT, qPCR ^b
RAD51 FW	TCTCTGGCAGTGATGTCCTGGA	qPCR
RAD51 RV	TAAAGGGCGGTGGCACTGTCTA	qPCR
RAD52 FW	ATGCTTTGGACAGTGCCAGT	qPCR
RAD52 RV	CCAGCCATGCGGCTACTTAT	qPCR
siRAD52 (SO-2651934G)	GGUACAAUCUUCAUUUAAAdTdT	KD in U2OS BIR
siRAD51 (M-003530-04- 0005)	Smart pool : D-003530-02: GAAGCUAUGUUCGCCAUUA D-003530-05: GCAGUGAUGUCCUGGAUAA D-003530-07: CCAACGAUGUGAAGAAUU D-003530-08: AAGCUAUGUUCGCCAUUA	KD in U2OS BIR
siCTRL (D-001210-02- 02)	UAAGGCUAUGAAGAGAUAC	CTRL used in U2OS BIR
Cy5-TelC PNA probe (F1003)	[Cy5]-OO-CCCTAACCCCTAACCCCTAA	FISH

^a KD: knockdown, gDNA: genomic DNA

^b Used to validate the efficiency of DNase treatment prior to RT-PCR

^c FAM: fluorescein, HEX: HEX fluorophore, ZEN: ZENTM quencher, IABkFQ: 3' Iowa Black® forward quencher

Table S4-2. Antibodies used in this study

Primary antibodies		
Target	Catalog numbers	Used for ^a
mouse anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) (γ-H2AX)	05-636 (Millipore)	IF
rabbit anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) (γ-H2AX)	2577L (Cell signaling)	IF
Alexa Fluor 555 goat anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) (γ-H2AX)	05-636-AF555 (Millipore)	IF
rabbit anti-RAD51	70-001 (Bio Academia)	IF
mouse anti-β-Tubulin	CP06 (Sigma)	WB
mouse anti-GAPDH	39-8600 (Invitrogen)	WB
rabbit anti-E1	Homemade [75]	IF, WB
rabbit anti-Lamin B1	Ab16048 (Abcam)	IF
human CREST anti-centromere serum	HCT-0100 (Immunovision)	IF
mouse anti-PML (PG-M3)	Santa Cruz Biotechnology (sc-966)	IF
mouse anti-GFP IgG1κ (clones 7.1 and 13.1)	11814460001 (Millipore Sigma)	WB
mouse anti-NBS1 1D7	GTX70224 (GeneTex)	IF, WB
mouse anti-MRE11 12D7	GTX70212 (GeneTex)	IF, WB
mouse anti-RAD50 13D3	GTX70228 (GeneTex)	WB
rabbit anti-KAP1	A300-274A (Bethyl)	WB
rabbit anti-mCherry	NBP2-25157 (Novus)	WB
Secondary antibodies		
Target	Catalog numbers	Used for a
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit	A-11034 (Thermo Fisher Scientific)	IF
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit	A-21428 (Thermo Fisher Scientific)	IF
Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit	A-21244 (Thermo Fisher Scientific)	IF
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	A-11029 (Thermo Fisher Scientific)	IF
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse	A-21424 (Thermo Fisher Scientific)	IF
Alexa Fluor 647 goat anti-mouse	A-21236 (Thermo Fisher Scientific)	IF
Alexa Fluor 647 donkey anti-human	A-21445 (Thermo Fisher Scientific)	IF
Goat anti-rabbit HRP	7074 (Cell Signaling)	WB
Sheep anti-mouse-HRP	A-9044 (Sigma)	WB

^a IF: immunofluorescence, WB: Western blotting

Table S4-3. Plasmids used in this study

Plasmid	Source
pcDNA4/TO/ myc-His-HHV-6B IE1	Previously described [22]
pcDNA4/TO/myc-His	ThermoFisher, V103020
pDESTPB-TetO	Previously described [70]
PB-CA-rtTA-IRES-NEO	Previously described [70]
PB-TetO-HHV-6B IE1	This study
pDEST-mCherry-LacRnls	Previously described [71]
mCherry-LacRnls HHV-6B IE1 1-1078	This study
mCherry-LacRnls HHV-6B IE1 1-809	This study
mCherry-LacRnls HHV-6B IE1 1-540	This study
mCherry-LacRnls HHV-6B IE1 1-182	This study
mCherry-LacRnls HHV-6B IE1 183-363	This study
mCherry-LacRnls HHV-6B IE1 364-540	This study
mCherry-LacRnls HHV-6B IE1 541-809	This study
mCherry-LacRnls HHV-6B IE1 541-1078	This study
pDEST-FRT-eGFP-NLS	Previously described [72]
mCherry-LacRnls NBS1 1-754	This study
mCherry-LacRnls NBS1 1-733	This study
mCherry-LacRnls NBS1 1-638	This study
mCherry-LacRnls NBS1 1-327	This study
mCherry-LacRnls NBS1 109-754	This study
mCherry-LacRnls NBS1 201-754	This study
mCherry-LacRnls NBS1 328-754	This study
pLXIN2-NBS1	Gift from Cary A. Moody [73]
pLKO.1-Scramble	Addgene 136035
pLKO.1-shNBS1	Gift from Cary A. Moody [73]
pMD2.g	Addgene 12259
psPAX	Addgene 12260
pBIR-GFP	Addgene 49807
pCBAScel	Addgene 26477
pDEST-FRT-TO-3xFLAG	Gift from Anne-Claude-Gingras (V4978) [81]
pX330-LMNA-gRNA1	Gift from Jean-Yves Masson [38]
pCR2.a-mRuby2-LMNA-Donor	Gift from Jean-Yves Masson [38]
pX330-7a sgRNA (EJ7-GFP reporter)	Addgene 113620
pX330-7b sgRNA (EJ7-GFP reporter)	Addgene 113624

Discussion

5.1 Mise en contexte

L'établissement de la latence par l'intégration chromosomique du génome viral aux télomères est un mécanisme unique qui définit les HHV-6A/B parmi les herpèsvirus humains. Outre l'intégration dans les cellules somatiques, on estime qu'environ 1.1 % de la population mondiale possède la forme héritée (ici HHV-6A/B), ce qui signifie qu'environ 80 millions de personnes possèdent un génome d'HHV-6A/B dans un télomère de chaque cellule. Toutefois, l'identification des mécanismes associés à l'intégration d'HHV-6A/B fait face à plusieurs barrières au niveau des réalisations expérimentales ainsi que les connaissances actuelles disponibles en matière de biologie des télomères. Face à ces contraintes, peu d'équipes de recherche osent s'investir dans cette question. Depuis 2014, l'équipe du Dr Flamand s'est engagée à relever le défi d'élucider le processus d'intégration d'HHV-6A/B ainsi que les conséquences associées sur la santé humaine. Mon doctorat fait partie intégrante de ce volet. Cette discussion a comme objectif d'établir un sommaire des découvertes importantes respectives aux objectifs fixés en début de thèse. Elle permettra d'ouvrir une discussion sur les résultats présentés, notamment en lien avec la littérature actuelle, les limites et les alternatives, ainsi que les hypothèses et les perspectives sur l'avenir.

5.2 Les PML-NBs représentent des complexes importants pour l'intégration d'HHV-6B et pour l'état de SUMOylation d'IE1B

5.2.1. *La biologie des cellules U2OS, l'élément catalyseur*

Avant d'entreprendre une analyse sur les résultats présentés dans cette thèse, il est essentiel de souligner l'utilisation de différentes lignées cellulaires en fonction du but d'une expérience. Tel que mentionné dans l'introduction, HHV-6A/B exécutent leur cycle lytique dans les LT CD4+, mais peuvent toutefois infecter d'autres types cellulaires dans lesquelles les capacités de réplication virale sont limitées. Selon le dogme des herpèsvirus, lorsque la réplication n'est pas favorable, ces derniers deviennent latents. Sachant que la latence chez HHV-6A/B se réalise par l'intégration de leur génome entier, il est anticipé que dans une cellule semi-permissive et infectée par HHV-6A/B, ceux-ci s'y intégreront. Effectivement, il est difficile d'effectuer des essais d'intégration *in vitro* à partir de cellules LT CD4+ immortalisées puisque l'environnement est adéquat à la réplication virale. Dans ces conditions, les virus sont généralement en phase lytique ce qui mène éventuellement à la mortalité cellulaire de la culture en laboratoire. Il est donc difficile d'obtenir de hauts taux d'intégration *in vitro* en raison des capacités semi-permissives des cellules susceptibles à l'intégration d'HHV-6A/B. De ce fait,

le laboratoire a établi en 2017 une méthode qui permet la détection de cellules ciHHV-6A/B grâce à la technologie ddPCR [371]. L'arrivée de cet appareil sur le marché a révolutionné la façon de quantifier l'intégration d'HHV-6A/B puisqu'il est maintenant possible de détecter des événements rares dans une culture cellulaire de masse. Dans cette étude, différentes lignées cellulaires immortalisées ont été caractérisées pour l'intégration d'HHV-6A/B dont les cellules HEK293T, HeLa, MCF-7, U2OS, GM847 et HCT-116. Notamment, les cellules utilisées dans cette thèse ont préalablement été validées pour la susceptibilité à être ciHHV-6A/B [371].

En 2017, Gilbert-Girard et les collègues du laboratoire ont évalué l'importance de la hTERT dans l'intégration d'HHV-6A/B [117]. Bien que cette enzyme ait un effet important sur l'intégration d'HHV-6A/B dans des cellules immortalisées hTERT, HHV-6A/B peuvent toutefois s'intégrer dans les cellules qui utilisent un mécanisme alternatif d'élongation des télomères, le mécanisme ALT [117]. Ces résultats ont également été validés lors d'une autre étude du laboratoire [371]. Ce mécanisme alternatif est présent chez 10-15% des cellules cancéreuses [372,373]. Ces cellules sont particulièrement connues pour la surreprésentation de PML-NBs à leurs télomères, les APBs [374]. Les APBs permettent ainsi l'élongation des télomères par la présence de protéines impliquées dans la recombinaison homologue [333].

En caractérisant les complexes IE1B/PML-NBs dans les cellules U2OS (cellules ALT), nous avons noté que les foyers IE1B s'associent majoritairement avec les PML-NBs. À l'encontre d'un contexte de réplication virale active, l'association IE1B/PML-NBs dans ces cellules ne conduit pas à la fusion des PML-NBs. Cette observation évoque la pertinence de caractériser une association cible dans le modèle cellulaire approprié. L'absence du cycle lytique d'HHV-6B pourrait expliquer l'absence de fusion des complexes IE1B/PML-NBs dans les U2OS. À ce sujet, lors d'une infection lytique, les PML-NBs servent de facteurs principaux dans la réponse immunitaire intrinsèque face aux génomes viraux présents dans le noyau de l'hôte [347,375]. Ce rôle est réalisé par la présence de protéines clés aux PML-NBs, soit PML, Sp100 et hDaxx qui répriment l'expression des gènes viraux [347,376,377]. Par conséquent, la réplication virale ne peut être accomplie. En 2017, Sanyal et collègues ont étudiés l'effet de la déplétion simultanée des protéines PML, Sp100 et hDAXX sur le pouvoir répliatif d'HHV-6A [353]. Ces résultats suggèrent que l'absence du complexe, et par conséquent l'absence de PML-NBs, favorise la réplication d'HHV-6A. En tenant compte du phénotype similaire des PML-NBs lors de l'infection lytique d'HHV-6A/B, il est possible que la fusion des PML-NBs par le virus vise à tenir ces complexes à l'écart du génome d'HHV-6A/B, ce qui n'est pas le cas en contexte de latence.

5.2.3 La SUMOylation, l'élément central des liaisons PML-IE1B

Avec l'intention de déterminer la présence d'une interaction physique entre la protéine PML et IE1B, nous avons réalisé des essais de co-immunoprécipitation (co-IP) qui n'ont pas été présentés dans le chapitre 1. En effet, nous n'avons pas été en mesure de démontrer la présence d'IE1B dans l'immunoprécipitation (IP) de PML et vice-versa. Nous suggérons que l'interaction entre PML et IE1B peut être indirecte, c'est-à-dire par des liaisons SIM-SUMO entre PML et IE1B, à l'instar de plusieurs autres protéines qui localisent aux PML-NBs [292,315]. Dans cette situation, l'interaction peut ne pas être détectée par une co-IP puisque les interactions SIM-SUMO sont non covalentes et possiblement abolies dans le tampon de lyse cellulaire. Nous nous sommes donc tournés vers la spectrométrie de masse (MS pour « mass spectrometry ») afin d'identifier si PML était présente dans l'IP IE1B. Afin d'augmenter la spécificité, nous avons choisi la méthode de BioID en utilisant des lignées cellulaires générées à partir d'un lentivirus codant pour la biotine ligase (BirA) en fusion avec IE1B. L'ajout de la biotine dans le milieu de culture permet à la biotine ligase en fusion avec IE1B de biotinyler les protéines qui se trouvent à proximité d'IE1B. Une IP anti-streptavidine qui lie fortement la biotine et corollairement les protéines biotinylées permet d'identifier les partenaires d'interaction possible par une analyse de l'IP par MS. Dans notre étude, nous avons repéré la présence de PML dans l'interactome d'IE1B. Cependant, cette méthode ne confirme pas l'interaction physique entre PML et IE1B. Cette étude a permis d'identifier les protéines présentes dans un rayon de 10 nm, dont PML [378]. Dans le cadre de notre objectif, ce résultat était suffisant puisque notre objectif était de caractériser l'effet de PML/PML-NBs sur IE1B. Les résultats qui suivent ont également permis de dresser un meilleur portrait des interactions PML-IE1A/B.

Afin d'étudier la SUMOylation d'IE1B, nous avons arrêté notre choix sur la technique de co-IP puisque la liaison SUMO-lysine est covalente et est détectée par des protéines de plus hauts poids moléculaires que celui connu pour la protéine cible. De plus, cette technique permet d'étudier la SUMOylation de différents mutants plus rapidement puisque des protéines recombinantes n'ont pas à être générées. Nous avons observé un doublet de bandes SUMOylées en présence de PML, suggérant un état de polySUMOylation ou de multiSUMOylation. La polySUMOylation est associée aux paralogues de SUMO2 et 3, ainsi nous avons confirmé par des expériences de surexpression de SUMO-2/3 que le doublet de SUMOylation d'IE1B en présence de PML-NBs n'était pas associé à de la ramification de protéines SUMO-2/3 à un seul site d'IE1B. À la lumière de ce résultat, nous avons émis l'hypothèse qu'en plus de K802, un site SUMO accepteur supplémentaire existe dans la séquence d'acides aminés d'IE1B, ce qui fût validé à l'aide de nos mutants. Dans notre étude, vous aurez remarqué que tout au long de cet article le site SIM^{775VIV777} est mentionné à titre de site SIM potentiel. Puisqu'aucune méthode pour déterminer l'interaction physique entre le motif^{775VIV777} d'IE1B et les protéines SUMO n'a été réalisée, nous ne pouvons qu'affirmer qu'il s'agit d'un potentiel site SIM. Dans cette optique, nous

aurions pu générer et utiliser des vecteurs d'expression pour des protéines recombinantes sauvages et mutantes pour chaque site d'intérêt à étudier, et tester les interactions entre IE1B et SUMO-1/PML dans le système « Yeast Two-Hybrid » [379]. Nonobstant, nos analyses de phénotypes en immunofluorescence des différents mutants sont convaincantes indiquant que le site ⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷ représente bel et bien un site SIM fonctionnel.

D'autre part, aucun autre site accepteur de SUMO n'est apparu dans notre analyse *in silico* d'IE1B. Or, il est maintenant connu que le site consensus n'est pas restreint à la séquence d'acides aminés précédemment identifiée. Dans certains cas, les protéines SUMO peuvent être liées de façon covalente à d'autres acides aminés qu'une lysine [380,381]. Une perspective de ce projet serait d'identifier le site additionnel de SUMO dans la séquence d'IE1B. Récemment, une nouvelle méthode impliquant la MS permet d'identifier les sites SUMO et SIM des protéines. Cependant, cette méthode implique plusieurs défis. L'un d'eux est la signature que la digestion à la trypsine laisse sur la protéine cible avant de procéder à la MS. Une fois digérée, la protéine SUMO laisse une étiquette de 19 acides aminés sur la protéine cible, causant une interférence lors de l'identification des peptides [382]. De plus, puisque la SUMOylation est une modification réversible, la deSUMOylation des protéines par la présence de protéases et la faible abondance de certaines protéines SUMOylées inférieures à la limite de détection représentent des défis supplémentaires [383]. À ce jour, la méthode la plus efficace pour identifier des sites SUMO et SIM est celle décrite par Lumpkin et collègues en utilisant une digestion avec la protéase lytique alpha sauvage (WaLP) [384]. Une digestion avec la WaLP permet de cliver tous les paralogues de SUMO à leur région C-terminale en relâchant une séquence TGG qui s'associe au site SUMO d'une protéine cible, identifié par MS/MS. Cependant, à la suite de cette digestion, l'échantillon doit être enrichi par purification en utilisant un anticorps spécifique qui reconnaît la liaison K-ε-GG entre une protéine SUMOylée et le peptide de SUMO [385]. Dans un autre ordre d'idée, il serait pertinent d'étudier la SUMOylation des différents mutants d'IE1B dans un contexte plus physiologique. Ainsi, la génération de lignée cellulaire « knock-in » pour une protéine SUMO avec une étiquette, dans une lignée exprimant des niveaux moyens de PML permettrait d'éliminer la surexpression des protéines SUMO et PML. Néanmoins, avec à notre disposition un mutant IE1B dont la SUMOylation est affectée, nous avons validé l'importance de cette modification post-traductionnelle dans la nucléation d'IE1B en foyers ponctuels, un phénotype jamais rapporté auparavant. Ainsi, nous suggérons que le site SIM potentiel identifié ⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷ et la lysine 802 sont essentiels à l'oligomérisation d'IE1B bien qu'un site supplémentaire demeure à être identifié.

5.2.4 Les PML-NBs, un complexe pro-intégration virale ?

Nous avons évalué l'importance des PML-NBs dans l'intégration d'HHV-6B en utilisant deux modèles cellulaires différents [117,371]. Comme mentionné au début de la discussion, la lignée U2OS maintient et allonge ses télomères par le mécanisme ALT et ce, par la présence de PML-NBs aux télomères (APBs). Dans les APBs se trouvent les protéines impliquées dans une voie de la RH, la voie de BIR [386,387]. Dans les cellules U2OS, on estime que 75% des PML-NBs sont des APBs [322]. À l'inverse, dans la lignée HeLa exprimant la hTERT, seulement 25-35% des PML-NBs se trouvent aux télomères [322]. Dans des cellules primaires, 4-14% des PML-NBs se trouvent aux télomères [322,332,388]. Le rôle exact des PML-NBs aux télomères dans les lignées cellulaires hTERT+ et non néoplasiques n'est pas bien défini, mais ils sont essentiels pour maintenir la stabilité de ceux-ci puisque l'absence des PML-NBs cause une attrition prématurée de leurs télomères [322,332,388]. En effet, Marchesini et collègues ont souligné l'importance des PML-NBs dans les cellules ALT et non-ALT (hTERT+ et cellules normales) aux télomères endommagés [322].

Nos résultats révèlent que les PML-NBs sont importants pour l'intégration d'HHV-6B dans les lignées ALT+ et hTERT+. Cependant, l'intégration n'est pas abolie, ce qui suggère que le mécanisme d'intégration n'est pas strictement dépendant des PML-NBs. Ceci nous a amenés à nous questionner sur la présence d'IE1B aux télomères avec les PML-NBs ainsi qu'en absence de ceux-ci. Nous avons identifié que l'absence de PML-NBs réduit l'absence d'IE1B aux télomères, en accord avec les résultats d'intégration. Nous n'avons pas été en mesure de valider la fréquence de localisation d'IE1B aux télomères dans les lignées HeLa sauvages et PML KO en raison du faible signal télomérique dans ces cellules. Cependant, il serait possible de l'évaluer en utilisant la technique de « Proximity Ligation Assay » en marquant les cellules fixées avec une protéine télomérique essentielle et toujours présente, TRF2, ainsi qu'en marquant IE1. Cette technique repose sur le principe que si deux protéines sont très près l'une de l'autre, les anticorps secondaires couplés avec une séquence d'oligonucléotides entrent en contact. Le contact entre les deux séquences d'oligonucléotides permet au connecteur de lier ces dernières et l'ADN peut ensuite être amplifié par une ADN polymérase ajoutée à la réaction. Cette amplification est marquée par une sonde fluorescente et détectée par microscopie.

5.2.5 *L'intégration d'HHV-6B est-elle dépendante des PML-NBs ou de la longueur des télomères?*

Nos résultats proposent un rôle en faveur de la latence d'HHV-6B pour les PML-NBs. L'augmentation de la réplication d'HHV-6A dans les cellules susceptibles à son infection, en absence de ces protéines, suggère que les PML-NBs ne sont pas favorables à la réplication virale [353]. Il est anticipé que lorsque les conditions ne permettent pas la réplication virale, un herpesvirus devient latent. Par conséquent, on pourrait concevoir que les PML-NBs adoptent un rôle de pro-latence envers HHV-6A/B. Cependant, même si PML est absente dans nos modèles, les protéines Sp100 et DAXX, qui possèdent certaines activités antivirales, ne dépendent pas des PML-NBs pour être exprimées et s'associer ensemble [349]. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'absence de PML ne conduit pas à plus de réplication virale dans les U2OS.

Récemment, le groupe de Lazzerini-Denchi a identifié l'importance d'un complexe protéique, le BTR (BLM-TOP32A-RMI), dans le mécanisme de ALT [330]. En surexprimant ces protéines, ils ont été capables de démontrer de l'activité ALT dans les cellules HeLa (hTERT+). Cette localisation du complexe BTR est dépendante des PML-NBs. Ainsi, dans les cellules PML KO, l'activité ALT est nettement réduite. Cependant, en absence de PML, il y a toutefois une présence résiduelle de complexes BTR aux télomères dans des lignées ALT et non-ALT. Par conséquent, cette découverte pourrait expliquer pourquoi lorsqu'en absence de PML, HHV-6B s'intègre moins dans les deux modèles cellulaires. D'autre part, dans cette même étude, ils ont évalué la longueur des télomères des cellules U2OS WT et PML KO sur une durée de 100 jours. L'absence de PML a conduit à une perte de 30-80 pb par division cellulaire. Il pourrait donc être possible que la diminution du taux d'intégration d'HHV-6B soit associée à une perte du génome intégré à la suite des raccourcissements processifs des télomères dans ces cellules. Alternativement, les télomères de PML KO étant plus courts pourraient influencer la capacité d'HHV-6 à s'intégrer.

5.2.6 *Perspectives*

Nous considérons que notre étude de BioID n'était pas ciblée pour un contexte de réparation de CDBs. En tenant compte qu'un contexte de dommage à l'ADN est un pré requis pour la RH, il serait intéressant d'identifier et de comparer des partenaires d'interactions d'IE1B sauvage et mutantes pour les différents sites de SUMOylation, en présence de CDBs. Ces expériences pourraient permettre d'identifier globalement les partenaires d'interactions d'IE1B ainsi que la perte ou non de ceux-ci avec les mutants de SUMOylation d'IE1B. Bien que cette méthode ne permettrait pas d'identifier spécifiquement des partenaires présents lors de dommages aux télomères, elle permettrait toutefois d'identifier la possible importance pour un rôle potentiel de

la SUMOylation d'IE1B. Par ailleurs, la méthode pourrait être peaufinée en utilisant le TurboID dans des cellules exprimant ou non les différentes constructions d'IE1B. La technique de TurboID est basée sur le même principe que celui du BioID présenté dans ce chapitre, cependant la BirA du TurboID est plus courte et efficace et le temps de traitement à la biotine passe de 24h à 10-15 minutes, des conditions idéales pour identifier des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN dès l'induction de dommage. Ces expériences devraient être réalisées dans des cellules sauvages et PML KO afin d'avancer les connaissances sur l'implication des PML-NBs pour la localisation d'IE1B aux télomères et pour l'intégration d'HHV-6B.

Finalement l'association du mécanisme ALT dans l'intégration d'HHV-6B pourrait être validée par des essais *in vitro* d'intégration à partir de cellules BTR KO ainsi que dans des conditions de surexpression du complexe. Ces données pourraient appuyer ou réfuter l'hypothèse établie dans la littérature qu'HHV-6A/B s'intègrent par un mécanisme de BIR [288].

5.3 Corrélation entre IE1A et IE1B : L'implication des PML-NBs dans l'intégration d'HHV-6A et la SUMOylation d'IE1A.

5.3.1 IE1A et IE1B possèdent les mêmes sites de SUMOylation

Dans l'ensemble du génome d'HHV-6A/B, la région la plus variée entre les deux virus est celle du locus IE-A où se trouvent les ORFs d'*IE1*. En effet, le gène *IE1* partage seulement 62% d'identité entre HHV-6A et HHV-6B [39]. Or, IE1A/B se comportent de la même façon au niveau du phénotype des PML-NBs. Puisqu'HHV-6A/B s'intègrent tous les deux aux télomères et que les PML-NBs sont importants pour l'intégration d'HHV-6B, nous avons voulu comparer si ces deux protéines divergentes se comportent de la même façon dans un contexte d'intégration et par le fait même, définir l'importance des PML-NBs dans l'intégration d'HHV-6A. Nous avons rapporté par des essais d'immunofluorescence qu'IE1A s'associent aux télomères et cette association diminue en absence de PML-NBs. Comme HHV-6B, l'absence de PML-NBs affecte négativement l'intégration d'HHV-6A dans deux modèles cellulaires. Nous avons étudié si les PML-NBs avaient le même effet sur la SUMOylation d'IE1A que sur celle d'IE1B. Puisque IE1A possède la même séquence peptidique pour la région SUMO ainsi que le site SIM potentiel, nous avons émis l'hypothèse que la présence de PML-NBs favoriserait la multiSUMOylation d'IE1A. À l'inverse d'IE1B, IE1A est faiblement SUMOylée lorsque PML n'est pas surexprimée, ce qui note une première différence entre les deux virus au niveau d'IE1. Cependant, IE1A est multiSUMOylée en présence de PML-NBs. Nous avons donc cherché à caractériser les sites importants pour sa SUMOylation. En 2002, Stanton et collègues ainsi que Gravel et collègues ont soulevé dans leur discussion la présence d'un site SUMO dans la séquence d'acides aminés d'IE1A, à la position K665 [367,389]. Cependant,

aucune expérience en lien n'a été publiée depuis. Ainsi, nous avons déterminé que dans un contexte où PML est peu ou pas exprimée, la SUMOylation d'IE1A mutant K665 diminue. Cependant, en sur exprimant PML, le mutant K665R est SUMOylé bien que plus faiblement en comparaison au IE1A WT. Des résultats similaires ont été obtenus avec le mutant pour le site SIM potentiel, IE1A :VIVm. De la même manière qu'IE1B, le double mutant peut toutefois être monoSUMOylé en présence de PML, ce qui suggère la présence d'un site accepteur de SUMO supplémentaire.

5.3.2 Le site SIM de PML au cœur de l'association d'IE1A aux PML-NBs

À l'inverse du double mutant d'IE1B pour son site SUMO et ⁷⁷⁵VIV⁷⁷⁷, les mêmes mutations chez IE1A n'ont pas conféré un phénotype diffus d'IE1A dans les cellules qui expriment PML. Notre hypothèse est que le site supplémentaire de SUMO dans la séquence d'IE1A serait le site SUMO majeur et expliquerait pourquoi IE1A :VIVm :K665R s'associe aux PML-NBs. Or, lorsque nous avons regardé le phénotype de ces mutants dans la lignée U2OS PML KO, la mutation VIVm a aboli la capacité d'IE1A de former des foyers nucléaires ponctuels. Ceci suggère que le site ⁶³⁸VIV⁶⁴⁰ favoriserait la SUMOylation d'IE1A et les interactions SIM-SUMO avec PML. Dans le but de mieux comprendre l'association d'IE1A aux PML-NBs, nous avons exploité le vecteur d'expression de l'isoforme PMLVI en surexpression dans les cellules U2OS PML KO. L'isoforme PMLVI ne possède pas de site SIM et par conséquent PMLVI peut seulement se lier à des protéines par des interactions SUMO-SIM à partir de SUMO associées à ses trois sites de SUMOylation. Notre essai de SUMOylation d'IE1A sauvage et mutantes avec PMLI et PMLVI nous ont révélé que la présence du site SIM dans PML est critique pour la SUMOylation optimale d'IE1A dont celle-ci est perdue lorsque les sites K665 (K665R) et ⁶³⁸VIV⁶⁴⁰ (VIVm) sont mutés. Ainsi nous en sommes arrivés avec un modèle possible de l'interaction entre PML et IE1A. Nous proposons que PMLI s'associe avec IE1A par le site SIM potentiel d'IE1A. Cette interaction permet la SUMOylation sur un site accepteur additionnel d'IE1A et favorise son état multiSUMOylée. En somme, dans ce chapitre nous avons répondu nos objectifs principaux, soit d'évaluer la SUMOylation d'IE1A en présence de PML-NBs ainsi que l'importance de ces derniers dans l'intégration d'HHV-6A.

5.3.3 Perspectives

Il serait pertinent de valider l'importance du SIM de PML sur la SUMOylation d'IE1A en générant un mutant de l'isoforme PMLI. De plus, dans le même ordre d'idée d'IE1B, il serait pertinent d'évaluer les partenaires d'interaction de ces différents mutants par la technique de TurboID afin d'orienter de futures expériences avec l'objectif de caractériser le rôle de la SUMOylation d'IE1A. Lors de mon doctorat, j'ai eu la chance de générer des virus recombinants d'HHV-6A à partir d'un chromosome bactérien artificiel du génome complet du HHV-6A

(souche U1102). À partir de ce génome, l'ORF *IE1* a été supprimé ou *IE1A* a été mutée pour ses sites de SUMOylation connus. Les perspectives de ce projet sont donc d'évaluer les capacités de réplication et de prolifération de ces différents virus dans un modèle LT CD4+ ainsi qu'étudier leur capacité à s'intégrer. Les résultats présentés dans ce chapitre sont pertinents pour nos recherches puisque nous avons associé des similarités entre deux protéines divergentes dans un contexte convergent. Ceci nous encourage donc dans la pertinence d'étudier *IE1A/B* dans un contexte d'intégration d'*HHV-6A/B*.

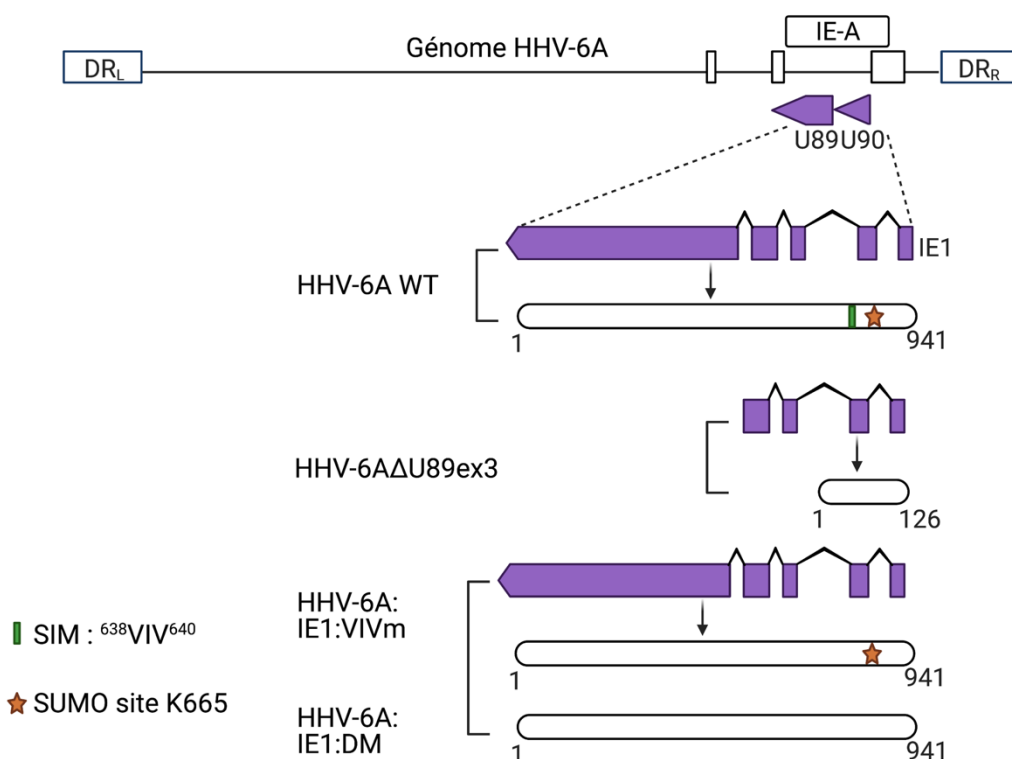


Figure 5.1. Schéma des virus recombinants HHV-6A générés. L'exon 3 du gène *U89* a été retiré afin de générer un virus HHV-6A mutant pour *IE1*. Un HHV-6A mutant pour le site SUMO d'*IE1* a été généré en mutant la lysine 655 (K665). À partir de ce virus, une deuxième mutation a été ajoutée afin de muter le site ⁶³⁸VIV⁶⁴⁰. Ces virus sont présentement à l'étape de la production virale.

5.4 La protéine cellulaire TRF2 s'associe aux télomères d'HHV-6A/B et est importante pour leur intégration

5.4.1 TRF2 au secours des extrémités libres d'HHV-6A/B?

À la suite d'une infection par un virus à ADNdb, son génome linéaire présent dans le noyau de l'hôte peut être perçu comme une CDB par la cellule. En générale, les génomes viraux adoptent une forme circulaire permettant d'être à l'abri cette reconnaissance. Au niveau cellulaire, les extrémités des télomères sont protégées par les protéines du complexe shelterin, particulièrement la protéine TRF2. TRF2 protège les télomères par la génération d'une « t-loop » en envahissant l'ADNsb télomérique en 3' dans l'ADNdb complémentaire, et en bloquant les protéines de signalisation de dommages à l'ADN [253]. Sachant que le génome d'HHV-6A/B est composé de TMRs à ses extrémités, l'intérêt de définir un rôle pour TRF2 dans l'infection et/ou l'intégration d'HHV-6A/B fut rapidement soulevé.

Au cours de la phase lytique d'HHV-6A/B, nous avons observé d'énormes signaux télomériques inhabituels, c'est-à-dire des signaux sous forme de taches aux lieux de petits foci et ponctuels. Ces signaux colocalisent avec les protéines virales aux CRV d'HHV-6A/B, les protéines p41 et IE2A [82], suggérant la réplication des télomères viraux. Heureusement, nous avons à notre disposition des virus recombinants HHV-6A mutants pour leurs TMRs, ce qui nous a permis d'identifier que les signaux sous forme de tâches étaient associés aux télomères viraux et non à ceux cellulaires. Nous avons ensuite évalué la capacité de TRF2 à s'associer aux télomères viraux. L'affirmative a été évaluée de trois manières distinctes, ce qui est une force pour ce projet. Bien que ces virus se répliquent peu dans les cellules U2OS et vont plutôt s'y intégrer, nous avons remarqué que les cellules infectées augmentent le niveau d'expression de TRF2. Dans les rares cellules démontrant des CR, TRF2 y était invariablement associée adoptant le même phénotype que les CR. Il pourrait donc être concevable que TRF2 exerce trois fonctions lors de l'infection d'HHV-6A/B, celle de protéger les extrémités de leurs génomes, celle d'être impliquée dans la réplication du virus et celle de rapprocher le génome viral des télomères humains.

5.4.2 TRF2 et son importance pour HHV-6A/B

En générale, il est possible que TRF2 s'associe aux TMRs dans une optique du virus à favoriser sa réplication. Outre la protection des extrémités libres, les régions répétées des génomes viraux sont sujettes aux stress réplicatifs par leur facilité à former des structures secondaires. La présence de structures secondaires non résolues pose une contrainte à l'ADN polymérase et par conséquent, ces structures doivent être résorbées pour

poursuivre la réplication. Comme il a été mentionné dans l'introduction, TRF2 recrute des protéines effectrices afin de résoudre des structures secondaires. Ainsi, puisque les extrémités d'HHV-6A/B sont composées de TMRs, sujets aux G4, HHV-6A/B pourraient tirer avantage de cette fonction de TRF2. En support, un virus HHV-6A dont les séquences TMRs ont été retirées se réplique davantage et produit plus de virions qu'un virus sauvage [184]. Dans ce contexte, la région de réplication OriP d'EBV possède des séquences capables de lier les protéines TRF1 et TRF2. Lors de l'infection par EBV, TRF2 est recrutée l'OriP et ce qui permet le recrutement du complexe de pré-réplication et de réplication au génome viral [390]. Par ailleurs, TRF2 n'exécute pas seulement une fonction de sécurité des télomères, mais participe également dans la reconnaissance des CDBs ailleurs dans le génome [391]. Il n'est donc pas surprenant de retrouver les génomes herpétiques près des télomères.

L'évaluation du signal de TRF2 en immunofluorescence lors de l'infection par HHV-6A, défini par le marquage IE2A, nous a permis de remarquer que certains foyers IE2A colocalisaient avec TRF2, suggérant donc une colocalisation d'IE2A aux télomères. Nous avons donc quantifié la fréquence de foyers IE2A aux télomères ainsi que caractérisé si son domaine liant l'ADN était essentiel à cette localisation. Cependant, nos quantifications nous ont dévoilé que la localisation d'IE2A aux télomères n'était pas dépendante de son domaine de liaison de l'ADN. En étudiant l'effet d'une suppression de l'expression de TRF2 lors de l'infection par HHV-6A, nous avons remarqué que l'absence de TRF2 avait réduit significativement la colocalisation d'IE2A aux télomères, suggérant ainsi qu'IE2A est présente aux télomères par son interaction avec TRF2. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de confirmer cette interaction par des essais de co-IP en raison des difficultés techniques engendrées par la taille d'IE2A de 250 kDa et de sa capacité à se lier à la chromatine. Pour confirmer cette interaction, des essais n'impliquant pas d'IP de protéines, notamment la technique de PLA, seraient de préférences.

Finalement, nos résultats indiquent que l'absence de TRF2 affecte significativement l'intégration d'HHV-6A/B. Toutefois notre étude fait face à quelques limites. Tout d'abord, l'absence de TRF2 à long terme est létale pour les cellules [392] et l'essai d'intégration est réalisé sur une période d'un mois à la suite de la sélection des cellules stables. Il aurait donc été important de réaliser des essais de mortalité cellulaire afin de déterminer si la diminution de l'intégration est associée ou non à une cellule intégrée qui ne tolère pas l'absence de TRF2. D'autre part, puisque TRF2 est crucial pour les télomères, il est anticipé qu'une érosion rapide des télomères soit la cause d'une détection plus faible des taux d'intégration. Dans un autre ordre d'idée, une étude remarquable du groupe de de Lange a démontré récemment l'importance de la présence unique de TRF2 parmi les protéines shelterin, pour former la « t-loop » [253,266]. Ces résultats suggèrent l'implication de TRF2 dans la recombinaison de séquences homologues.

5.4.3 Perspectives

Il est connu que certains herpèsvirus s'associent aux télomères afin de favoriser leur réplication virale puisque ce compartiment est riche en éléments impliqués dans la réplication et la réparation de l'ADN. Ainsi, les télomères sont un lieu facilement accessible pour obtenir les ressources nécessaires à la réplication virale. Bien que beaucoup de questions restent à répondre, cette étude a été la première à évaluer une protéine du télosome dans le contexte d'HHV-6A/B. La présence d'IE2A aux télomères soulève la possibilité qu'elle pourrait travailler de concert avec IE1. Une étude précédente du laboratoire a identifié qu'IE2A se lie à l'enzyme de conjugaison de protéines SUMO, E2 [393]. Puisque les protéines E3 SUMO ligases sont connues pour s'associer aux E2 chargées avec une SUMO afin de promouvoir la SUMOylation d'une protéine cible, il est possible qu'IE2A/B agissent à titre d'E3 SUMO ligase virale dans la SUMOylation d'IE1A/B. Un objectif préliminaire serait donc d'évaluer la SUMOylation d'IE1A/B en présence d'IE2A/B. Ces résultats pourraient permettre d'identifier une fonctionnalité additionnelle à la liaison IE2A-E2.

5.5 L'interaction d'IE1B avec la protéine NBS1 inhibe les voies de la recombinaison homologue

5.5.1 L'infection par HHV-6B et l'expression d'IE1B créent de l'instabilité génomique

Rationnellement, pour qu'un virus soit capable d'intégrer son génome à celui de l'hôte, il doit y avoir eu une cassure dans l'ADN afin de permettre une réparation. Il est connu que plusieurs virus contrôlent les voies de signalisation de dommages à l'ADN afin d'éviter la dégradation délétère de leur génome, l'activation d'une réponse immunitaire et pour favoriser leur réplication virale et/ou transiter vers la latence. À ce sujet, le contrôle de la voie de signalisation de dommage à l'ADN par les herpèsvirus n'est pas complètement défini en raison de la complexité puisqu'il semble y avoir un processus dynamique en fonction de l'état du cycle viral. Afin de faire suite dans la caractérisation d'IE1B et de son rôle hypothétique dans l'intégration d'HHV-6B, nous avons voulu déterminer si elle était impliquée dans les voies de réparation de l'ADN.

Dans un premier temps, nous avons démontré l'accumulation d'instabilité chromosomique en présence d'IE1B. Notre objectif principal était de déterminer la capacité d'IE1B à causer des CDBs. Cependant, puisque l'expression d'IE1B inhibe le marqueur de signalisation des CDBs, γ H2AX, nous étions limités dans les méthodes disponibles. Nous nous sommes donc tournés vers le système *LacO-LacR* qui permet de reconstituer artificiellement une signalisation de dommage à l'ADN afin d'étudier l'interaction des facteurs de signalisation de dommages à l'ADN avec une protéine cible. Ceci nous a permis d'identifier qu'IE1B recrute spécifiquement

NBS1 du complexe MRN. Puisque dans les cellules qui expriment IE1B, les signaux γ H2AX sont fortement inhibés, cela suggère que le recrutement de NBS1 par IE1B sert à entraver l'activation d'ATM. En effet, dans des cellules NBS, c'est-à-dire des cellules provenant d'individus mutants pour la protéine NBS1, la phosphorylation d'ATM est compromise [394]. D'autre part, la génération de lignées cellulaires exprimant NBS1 mutante pour ses sites de phosphorylation a montré également une diminution importante de la phosphorylation d'ATM [395]. L'absence de NBS1 est également représentée par de l'instabilité génomique, ce qui pourrait expliquer l'accumulation des micronoyaux et des cassures chromosomiques en présence d'IE1B [394]. En somme, la signalisation γ H2AX est affectée puisque les facteurs en amont sont compromis par IE1B.

5.5.2 NBS1 participe à l'intégration d'HHV-6B?

Puisque NBS1 est importante pour la voie de la RH, il était anticipé que l'expression d'IE1B inhibe les voies de la RH, à l'encontre de notre hypothèse initiale. L'utilisation de différents outils rapporteurs de voies de réparation de l'ADN indique de façon évidente l'effet délétère d'IE1B sur les voies associées à la RH. La génération de cellules stables dont l'expression de NBS1 a été réduite a permis d'observer que l'intégration d'HHV-6B était affectée dans les cellules ALT+, mais pas dans une lignée télomérase+. Ces résultats amènent des conclusions contradictoires puisqu'IE1B inhibe NBS1 et de ce fait inhibent les voies de la RH, mais, l'absence de NBS1 affecte négativement l'intégration d'HHV-6B. Une explication possible est que nos essais de réparation d'ADN ont été exécutés dans un contexte non viral. Il serait alors possible que d'autres protéines virales régulent IE1B, limitant ses capacités à inhiber NBS1. Cette situation serait logique puisqu'on peut anticiper qu'une inhibition des voies de réparation mène à l'accumulation excessive de dommages dans la cellule et par conséquent mène à la mort cellulaire [394]. Il serait donc important d'étudier l'activité de ces voies de réparation dans un contexte viral. Cependant, plusieurs limites se présentent. En effet, les outils rapporteurs de voies de réparations de l'ADN sont dépendants d'une transfection pour l'expression de l'enzyme I-SceI, responsable de créer la cassure au site ciblé. Ainsi, la quantité de cellules à étudier diminue en rapportant les cellules transfectées I-SceI/mCherry, mCherry étant utilisé comme marqueur de cellules transfectées. Un second défi est le faible taux de cellules infectées et d'expression virale. Des mises au point restent à être validées afin de déterminer si la méthode est adéquate pour détecter les cellules I-SceI/mCherry/IE1B positives lors de l'infection par HHV-6B.

Par ailleurs, NBS1 est non seulement impliquée dans la DDR, mais elle est importante pour la stabilité des télomères [396]. Il est donc envisageable que la diminution de l'intégration d'HHV-6B dans les U2OS soit causée par un raccourcissement des télomères. À ce sujet, il a été noté que dans les cellules NBS, les télomères perdent 30 pb plus rapidement à chaque cycle cellulaire [394]. Par ailleurs, l'absence ou la troncation de NBS1 mène à la surexpression de TRF2. La présence de TRF2 additionnelle aux télomères pourrait cimenter la structure de

la « t-loop » lors de la réplication de l'ADN ce qui mènerait à l'excision de la *t-loop* comme résolution de la structure secondaire. Dans cette situation, le télomère résultant aura perdu rapidement des séquences télomériques. Cependant, l'absence de NBS1 n'affecte pas la fonction de la télomérase [394]. Ces informations pourraient élucider pourquoi l'intégration d'HHV-6B n'est pas diminuée dans les cellules HeLa shNBS1 (hTERT+) en comparaison avec les U2OS et GM847 shNBS1 (cellules ALT+). Enfin, le fait qu'il y a tout de même un peu d'intégration dans les U2OS shNBS1 pourrait être expliqué par le fait que malgré l'absence de NBS1, il y a des niveaux basaux d'ATM, ce qui serait suffisant pour activer la recombinaison d'HHV-6B [394].

5.5.3. Perspectives

L'objectif principal serait de définir le rôle du BIR aux télomères dans le contexte de l'intégration d'HHV-6B. À ce jour, les experts en biologie des télomères travaillent activement pour développer une méthode pour étudier ce mécanisme. Nous nous trouvons donc avec une limite au niveau expérimentale. Cependant, lors du BIR réalisé aux télomères, le mécanisme est indépendant de la recombinaison RAD51, mais implique RAD52, POLD3 et POLD4 [288]. La génération de lignée U2OS et HeLa RAD52 KO et/ou POLD3/POLD4 permettraient de nous guider dans l'élucidation du rôle du BIR dans l'intégration d'HHV-6B. Selon les résultats obtenus, une collaboration avec des experts dans le domaine des télomères et du BIR serait indispensable.

5.6 Autres facteurs viraux intéressants dans l'étude de l'intégration d'HHV-6A/B

Les mécanismes liés à l'intégration de MDV et d'HHV-6A/B demeurent encore incompris. En générant des mutants dont les TMRs ont été retirées (Δ TMR) du génome viral, il a été possible de démontrer que celles-ci sont essentielles pour l'intégration de MDV, et de ce fait, pour l'établissement de sa latence [397]. Le même groupe a généré un virus HHV-6A Δ TMR, dont les capacités d'intégration ont largement été affectées [184]. Ces données suggèrent que le mécanisme serait relié à la RH avec les télomères de la cellule hôte. Puisque MDV possède des protéines qui s'apparentent à celles impliquées dans la SSA, UL12 et UL29, il est possible qu'il utilise cette voie pour s'intégrer. Chez HHV-6A/B, une étude propose que les protéines U70 et l'homologue d'ICP8, U41 ne sont pas responsables des événements d'intégration d'HHV-6A/B [398]. Cependant, l'importance d'U41 et U70 a été déterminée en utilisant des shRNA (pour « **s**mall **h**airpin **R**NA ») dont l'inhibition de l'expression des protéines était partielle. Il serait donc important d'étudier ces protéines à l'aide de mutants de délétions pour évaluer sans équivoque leurs rôles dans l'intégration d'HHV-6A/B.

5.7 Conséquences cliniques de l'intégration héréditaire des génomes des HHV-6A/B

L'iciHHV-6A/B aux télomères humains est un sujet qui gagne de l'importance dans la communauté scientifique des *Roseolovirus*. Cela va sans dire, l'insertion d'un génome dans une région importante pour l'homéostasie cellulaire et génomique que sont les télomères ne peut être sans conséquence. La Figure 5.2 illustre brièvement les conséquences générales possibles que pourrait causer l'intégration des HHV-6A/B, basées sur l'interprétation de cas rapportés. Dans cette thèse, les conséquences sont divisées en trois catégories : l'intégration du génome en soit, l'expression de gènes viraux et l'excision du génome des télomères.

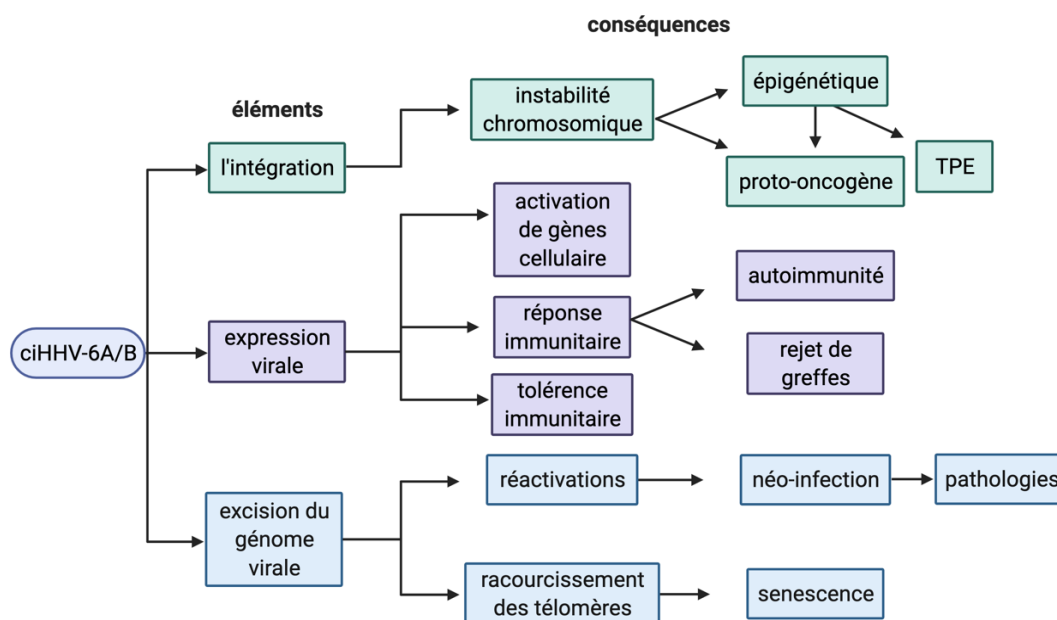


Figure 5.2. Organigramme des conséquences possibles de l'iciHHV-6A/B. ©Vanessa Collin, fait à partir de BioRender.com.

5.7.1 L'intégration

L'insertion d'un génome étranger à celui de l'hôte peut constituer en soi un élément d'instabilité génomique et de déstabilisation de l'architecture chromosomique en modifiant l'épigénétique. L'épigénétique est associée à l'état de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine de sorte que certains promoteurs soient accessibles afin de permettre la transcription des gènes ou, à l'inverse afin d'être inaccessible pour réprimer la transcription. Les télomères de mammifères sont enrichis des marques de H4K20me1 (méthylation de l'histone 4 à la lysine 20) liés à la répression des gènes, mais possèdent aussi des marques H3K27Ac (acétylation de l'histone 3 à la

lysine 27) qui représentent la transcription active [399]. Ainsi, l'insertion du génome des HHV-6A/B pourrait affecter l'épigénétique du chromosome intégré et par ailleurs avoir un effet de position télomérique (TPE pour « **T**elomeric **P**osition **E**ffet ») sur les gènes à proximité. À ce sujet, il est connu que la longueur des télomères joue sur l'expression des gènes dans la région subtélomérique [400]. De plus, la possibilité d'avoir un TPE sur une longue distance, c'est-à-dire que l'intégration a un effet plus loin sur le génome, n'est pas exclue. Par ailleurs, dans la région subtélomérique se trouve le promoteur pour un transcrit d'ARN télomérique long non codant, un TERRA (« **T**elomeric repeat-containing **R**NA »). À ce fait, l'état ciHHV-6A/B pourrait contrôler les transcrits des TERRA dont sa modulation est liée aux raccourcissements des télomères [401,402]. Par conséquent, bien que des preuves restent à être démontrées, on peut anticiper qu'à long terme ces intégrations dans le génome humain peuvent mener à de l'instabilité génomique.

5.7.2 Transcription et traduction virale

Puisque le rôle exact de toutes les protéines des HHV-6A/B n'est pas connu, mais sachant que certaines contribuent à l'immunomodulation du système immunitaire [47,369,403], la transcription de **microARN** (miARN) et/ou de gènes viraux, l'expression de celles-ci pourrait avoir différentes conséquences sur la cellule. Une étude transcriptomique à partir de cellules avec génomes HHV-6A/B intégrés a permis de détecter des transcrits viraux dans différents tissus [115]. Dans cette étude, la réactivité de sérums de sujets iciHHV-6A/B incubés avec les protéines IE1 et gp82/105 (U100) ainsi que d'autres protéines HHV-6 (U47, U57 et U72) ou des protéines contrôles (GST, EBV, FLU et CMV) a permis d'observer une augmentation d'anticorps contre IE1. À ce fait, il serait donc possible que l'expression spontanée ou continue d'IE1 mène à une réponse immunitaire accrue qui pourrait se traduire par une auto-immunité et/ou une destruction des tissus chez les individus iciHHV-6. De plus, l'expression de transcrits viraux HHV-6 à partir de l'organe transplanté pourrait mener au rejet de l'organe. Au niveau des maladies chroniques, il a été rapporté que l'iciHHV-6A/B est associé à un risque de maladies cardiovasculaires ainsi que de prééclampsies [166,404]. Dans l'optique de ces pathologies, il est pertinent de souligner que ces dernières peuvent être le résultat de tissus détruits [405–407] et par conséquent, il est permis de croire que l'expression de gènes viraux accélère ou soit responsable du développement de ces conditions.

5.7.3 Excision du génome viral

5.7.3.a Réactivations

La possibilité pour le génome des HHV-6A/B de s'exciser de sa forme intégrée, se répliquer et se réactiver a été démontrée en utilisant des cellules ciHHV-6A/B et stimulées avec des drogues TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) et HDAC (« Histone Deacetylase ») [154,169] qui favorisent la réactivation virale. La première preuve *in vivo* d'une réactivation de iciHHV-6 fut suggérée par notre équipe en 2013 [408]. Dans cette étude, il a été établi que les nouveau-nés ont acquis l'infection active de l'HHV-6 à la suite à la réactivation virale de la forme intégrée provenant des mères, qui a été transmise de façon transplacentaire. La réactivation des HHV-6A/B fut également observée chez des patients intégrés ayant subi une GCSH [409]. Au Japon, un enfant âgé de 2 ans atteint d'immunodéficience sévère liée au chromosome X (SCID-X pour « X-Linked Severe Combined Immunodeficiency ») présentait une virémie persistante selon ses tests sanguins. Il a été conclu que l'enfant était iciHHV-6A, transmis par son père ayant l'intégration dans son chromosome 22 et que la virémie provenait de la réactivation de la forme intégrée HHV-6A [99]. Ce cas souligne les risques de réactivation associés à la forme iciHHV-6A/B chez des patients avec une immunité compromise. Un cas *in vivo* plus récent fut la réactivation de l'HHV-6 d'une patiente iciHHV-6 suivant un traitement pour sa leucémie aiguë, par la prise d'inhibiteurs de HDAC [410]. Ces données montrent la possibilité pour les HHV-6A/B d'utiliser l'intégration comme mode de latence.

5.7.3.b Longueur des télomères

La section précédente suggère que l'excision/réactivation des HHV-6A/B mènerait à des télomères plus courts. Le raccourcissement excessif des télomères est responsable de la sénescence prématurée des cellules [411]. D'intérêt, les télomères intégrés représentent les télomères les plus courts dans une cellule [115]. Cliniquement, la littérature rapporte de plus en plus l'association du raccourcissement des télomères à des maladies cardiovasculaires [412,413]. À ce propos, une étude réalisée par notre laboratoire indique que les personnes ayant la forme iciHHV6/B sont 3 fois plus à risque de développer l'angine de poitrine [166]. Lors d'un congrès international sur les HHV-6A/B, un groupe en Écosse rapportait les mêmes résultats dans une cohorte du Royaume-Uni [414]. D'autres cas cliniques rapportés démontrent que la présence iciHHV-6A/B est liée avec des cas cardiovasculaires comme c'est le cas pour un enfant iciHHV-6 qui a succombé à de l'insuffisance cardiaque [415]. Chez des patients atteints de myocardite, on note la présence de l'intégration de l'HHV-6 dans les télomères des biopsies [416]. Certains chromosomes tels que 6p, 12p, 17q, 16q, 21p, 3p-q, 9p-q sont

propices à être/devenir plus courts et dont certains sont plus susceptibles d'être reliés à des maladies. Le tableau 2 rassemble les chromosomes intégrés documentés.

Tableau 2. Résumé des chromosomes ciHHV-6A/B identifiés.

Virus iciHHV-6	Chromosome intégré
HHV-6A	10q26 [417], 17p [418], 17p13 [169,417,419], 18q23 [169], 22q [418], 22q13 [169]
HHV-6B	1q [418], 9q34 [417,419], 16p [418], 11p15 [417,419], 17p13 [417,419], 19q13 [417], 20p [418], 22q [418], 22q13 [155,169], Xp [418], Yp [418]
*N/A	1 [420], 1q44 [152,154], 1q14 + 22q13 [152], 22q13 [152], 17p [421], 17p13 [422,423]

*N/A = l'espèce n'a pas été déterminée

Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse soulèvent pour la première fois l'implication de protéines cellulaires dans l'intégration d'HHV-6A/B. Cette thèse souligne également les défis qui se présentent dans l'étude de l'intégration d'HHV-6A/B. Le mécanisme et les conséquences de l'intégration d'HHV-6A/B demeurent un sujet sous-étudié, mais étant donné que 1.1% de la population mondiale possède la forme héritée, l'étude de ce mécanisme de persistance virale revêt toute son importance. Ces quatre années d'études ont fait avancer nos connaissances sur les protéines IE1A/B, particulièrement IE1B. De ce fait, nos résultats permettent de contribuer à l'avancement des conséquences biologiques qui se rattachent à l'intégration d'HHV-6A/B.

Bibliographie

1. Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven A, Watson MS, Cunningham C, et al. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol*. 2005;86(1):41–53.
2. Savin KW, Cocks BG, Wong F, Sawbridge T, Cogan N, Savage D, et al. A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virology*. 2010;7.
3. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order Herpesvirales. *Arch Virol*. 2009;154(1):171–7.
4. Brister JR, Ako-Adjei D, Bao Y, Blinkova O. NCBI viral Genomes resource. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(D1):D571–7.
5. Davison AJ. Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol*. 2002;86(1–2):69–88.
6. Human Herpesvirus-6 and -7 (HHV-6 and HHV-7). *Am J Transplant*. 2004;(4):66–71.
7. Das S, Ortiz DA, Gurczynski SJ, Khan F, Pellett PE. Identification of Human Cytomegalovirus Genes Important for Biogenesis of the Cytoplasmic Virion Assembly Complex. *J Virol*. 2014;88(16):9086–99.
8. Smith RM, Kosuri S, Kerry JA. Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly. *Viruses*. 2014;6(2):582–605.
9. Mocarski ES. Comparative analysis of herpesvirus-common proteins. In: *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. 2007. p. 44–58.
10. Huber MT, Compton T. The Human Cytomegalovirus UL74 Gene Encodes the Third Component of the Glycoprotein H-Glycoprotein L-Containing Envelope Complex. *J Virol*. 1998;72(10):8191–7.
11. Mori Y, Akkapaiboon P, Yonemoto S, Koike M, Takemoto M, Sadaoka T, et al. Discovery of a Second Form of Tripartite Complex Containing gH-gL of Human Herpesvirus 6 and Observations on CD46. *J Virol*. 2004;78(9):4609–16.
12. Akkapaiboon P, Mori Y, Sadaoka T, Yonemoto S, Yamanishi K. Intracellular processing of human herpesvirus 6 glycoproteins Q1 and Q2 into tetrameric complexes expressed on the viral envelope. *J Virol*. 2004;78(15):7969–83.
13. Sadaoka T, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus 7 U47 gene products are glycoproteins expressed in virions and associate with glycoprotein H. *J Gen Virol*. 2006;87(3):501–8.
14. Salahuddin SZ, Ablashi D V., Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* (80-). 1986;234(4776):596–601.
15. Braun D, Dominguez G, Pellett PE. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev*. 1997;521–67.
16. Yamanishi K, Shiraki K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Asano Y, et al. Identification of Human Herpesvirus-6 As a Causal Agent for Exanthem Subitum. *Lancet*. 1988;331(8594):1065–7.
17. Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, Okada S, Mukai T, Yamanishi K. Human herpesvirus 7: Another causal agent for roseola (exanthem subitum). *J Pediatr*. 1994;125(1):1–5.
18. Downing RG, Sewankambo N, Serwadda D, Honess R, Crawford D, Jarrett R, et al. Isolation of Human Lymphotropic Herpesviruses From Uganda. *Lancet*. 1987;330(8555):390.
19. Lopez C, Pellett P, Stewart J, Goldsmith C, Sanderlin K, Black J, Warfield D FP. Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis*. 1988;157(6):1271–3.
20. Ablashi D, Agut H, Alvarez-Lafuente R, Clark DA, Dewhurst S, DiLuca D, et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch Virol*. 2014;159(5):863–70.
21. De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(1):217–45.
22. Gautheret-Dejean A, Agut H. Practical Diagnostic Procedures for HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7. In: *Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7, Third Edition*. 3rd ed. 2014. p. 9–34.
23. Bates M, Monze M, Bima H, Kapambwe M, Clark D, Kasolo FC, et al. Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of sub-Saharan Africa. *J Med Virol*.

- 2009;81(5):779–89.
24. Zerr DM, Meier AS, Selke SS, Frenkel LM, Huang M-L, Wald A, et al. A Population-Based Study of Primary Human Herpesvirus 6 Infection. *N Engl J Med*. 2005;352(8):768–76.
 25. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Boettrich C, McDermott MP, Lofthus GK, et al. Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J Pediatr*. 2004;145(4):472–7.
 26. Tesini BL, Epstein LG, Caserta MT. Clinical impact of primary infection with roseoloviruses. *Curr Opin Virol*. 2014;9:91–6.
 27. Parker CA, Weber JM. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG and IgM antibodies to human herpesvirus type 6. *J Virol Methods*. 1993;41(3):265–75.
 28. Harberts E, Yao K, Wohler JE, Maric D, Ohayon J, Henkin R, et al. Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(33):13734–9.
 29. Rhoads MP, Magaret AS, Zerr DM. Family saliva sharing behaviors and age of human herpesvirus-6B infection. *J Infect*. 2007;54(6):623–6.
 30. Leibovitch EC, Brunetto GS, Caruso B, Fenton K, Ohayon J, Reich DS, et al. Coinfection of human herpesviruses 6A (HHV-6A) and HHV-6B as demonstrated by novel digital droplet PCR assay. *PLoS One*. 2014;9(3).
 31. Magalhães IM, Martins RVN, Cossatis JJ, Cavaliere RM, Afonso LA, Moysés N, et al. Detection of human herpesvirus 6 and 7 DNA in saliva from healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):925–7.
 32. Ward KN, Gray JJ, Efstathiou S. Brief report: Primary human herpesvirus 6 infection in a patient following liver transplantation from a seropositive donor. *J Med Virol*. 1989;28(2):69–72.
 33. Aimola G, Beythien G, Aswad A, Kaufer BB. Current understanding of human herpesvirus 6 (HHV-6) chromosomal integration: HHV-6 chromosomal integration. *Antiviral Res*. 2020;176(December 2019):104720.
 34. Martin MED, Thomson BJ, Honess RW, Craxton MA, Gompels UA, Liu MY, et al. The genome of human herpesvirus 6: Maps of unit-length and concatemeric genomes for nine restriction endonucleases. *J Gen Virol*. 1991;72(1):157–68.
 35. Deiss LP, Chou J, Frenkel N. Functional domains within the a sequence involved in the cleavage-packaging of herpes simplex virus DNA. *J Virol*. 1986;59(3):605–18.
 36. Achour A, Malet I, Deback C, Bonnafous P, Boutolleau D, Gautheret-Dejean A, et al. Length variability of telomeric repeat sequences of human herpesvirus 6 DNA. *J Virol Methods*. 2009;159(1):127–30.
 37. Thomson BJ, Dewhurst S, Gray D. Structure and heterogeneity of the a sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini. *J Virol*. 1994;68(5):3007–14.
 38. Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin MED, et al. The DNA Sequence of Human Herpesvirus-6: Structure, Coding Content, and Genome Evolution. *Virology*. 1995;209(1):29–51.
 39. Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol*. 1999;73(10):8040–52.
 40. Dewhurst S, Dollard SC, Pellett PE, Dambaugh TR. Identification of a lytic-phase origin of DNA replication in human herpesvirus 6B strain Z29. *J Virol*. 1993;67(12):7680–3.
 41. Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol*. 1999;73(10):8053–63.
 42. Papanikolaou E, Kouvatsis V, Dimitriadis G, Inoue N, Arsenakis M. Identification and characterization of the gene products of open reading frame U86/87 of human herpesvirus 6. *Virus Res*. 2002;89(1):89–101.
 43. Gravel A, Ablashi D, Flamand L. Complete Genome Sequence of Early Passaged Human Herpesvirus 6A (GS Strain) Isolated from North America. *Genome Announc*. 2013;1(3):e00012-13-e00012-13.

44. Thomson BJ, Honess RW. The right end of the unique region of the genome of human herpesvirus 6 U1102 contains a candidate immediate early gene enhancer and a homologue of the human cytomegalovirus US22 gene family. *J Gen Virol.* 1992;73(7):1649–60.
45. Kofod-Olsen E, Pettersson S, Wallace M, Abduljabar AB, Øster B, Hupp T, et al. Human herpesvirus-6B protein U19 contains a p53 BOX I homology motif for HDM2 binding and p53 stabilization. *Virology.* 2014;448:33–42.
46. Hayashi M, Yoshida K, Tang H, Sadaoka T, Kawabata A, Jasirwan C, et al. Characterization of the human herpesvirus 6A U23 gene. *Virology.* 2014;450–451:98–105.
47. Sullivan BM, Coscoy L. Downregulation of the T-Cell Receptor Complex and Impairment of T-Cell Activation by Human Herpesvirus 6 U24 Protein. *J Virol.* 2008;82(2):602–8.
48. Strenger V, Caselli E, Lautenschlager I, Schwinger W, Aberle SW, Loginov R, et al. Detection of HHV-6-specific mRNA and antigens in PBMCs of individuals with chromosomally integrated HHV-6 (ciHHV-6). *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(10):1027–32.
49. Trempe F, Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, Collin V, Gilbert-Girard S, et al. Characterization of human herpesvirus 6A/B U94 as ATPase, helicase, exonuclease and DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(12):6084–98.
50. Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell.* 1999;99(7):817–27.
51. Tang H, Serada S, Kawabata A, Ota M, Hayashi E, Naka T, et al. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(22):9096–9.
52. Ma J, Jia J, Jiang X, Xu M, Guo J, Tang T, et al. gp96 Is Critical for both Human Herpesvirus 6A (HHV-6A) and HHV-6B Infections. *J Virol.* 2020;94(13).
53. Li X, Sun L, Hou J, Gui M, Ying J, Zhao H, et al. Cell membrane gp96 facilitates HER2 dimerization and serves as a novel target in breast cancer. *Int J Cancer.* 2015;137(3):512–24.
54. Hou J, Li X, Li C, Sun L, Zhao Y, Zhao J, et al. Plasma membrane gp96 enhances invasion and metastatic potential of liver cancer via regulation of uPAR. *Mol Oncol.* 2015;9(7):1312–23.
55. Takahashi K, Sonoda S, Higashi K, Kondo T, Takahashi H, Takahashi M, et al. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol.* 1989;63(7):3161–3.
56. Linda S . Wyatt N. B and NF. Variations in the Replication and Antigenic Properties of Human Herpesvirus 6 Strains. *J Infect Dis.* 1990;162(4):852–7.
57. Ablashi D V., Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GRF, Kramarsky B, et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology.* 1991;184(2):545–52.
58. De Bolle L, Van Loon J, De Clercq E, Naesens L. Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism. *J Med Virol.* 2005;75(1):76–85.
59. Donati D, Martinelli E, Cassiani-Ingoni R, Ahlqvist J, Hou J, Major EO, et al. Variant-Specific Tropism of Human Herpesvirus 6 in Human Astrocytes. *J Virol.* 2005;79(15):9439–48.
60. Reynaud JM, Jegou J-F, Welsch JC, Horvat B. Human Herpesvirus 6A Infection in CD46 Transgenic Mice: Viral Persistence in the Brain and Increased Production of Proinflammatory Chemokines via Toll-Like Receptor 9. *J Virol.* 2014;88(10):5421–36.
61. Andre-Garnier E, Milpied N, Boutolleau D, Saiagh S, Billaudel S, Imbert-Marcille BM. Reactivation of human herpesvirus 6 during ex vivo expansion of circulating CD34+ haematopoietic stem cells. *J Gen Virol.* 2004;85(11):3333–6.
62. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Long C, Epstein LG, Insel RA, et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: Possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis.* 1998;26(1):132–7.
63. Seeley WW, Marty FM, Baden LR, Bromfield EB. Post-transplant acute limbic encephalitis: Clinical features and relationship to HHV6. *Neurology.* 2008;70(6):492–3.
64. Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Ymanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol.* 1991;72(6):1401–8.
65. Luppi M, Barozzi P, Morris C, Maiorana A, Garber R, Bonacorsi G, et al. Human Herpesvirus 6

- Latently Infects Early Bone Marrow Progenitors In Vivo. *J Virol.* 1999;73(1):754–9.
66. Spear PG, R L. Herpesvirus entry: an update. *J Virol.* 2003;
 67. Trybala E, Liljeqvist J-A, Svennerholm B, Bergstrom T. Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Differ in Their Interaction with Heparan Sulfate. *J Virol.* 2000;74(19):9106–14.
 68. Akula SM, Pramod NP, Wang FZ, Chandran B. Human herpesvirus 8 envelope-associated glycoprotein B interacts with heparan sulfate-like moieties. *Virology.* 2001;284(2):235–49.
 69. Vanarsdall AL, Chase MC, Johnson DC. Human Cytomegalovirus Glycoprotein gO Complexes with gH/gL, Promoting Interference with Viral Entry into Human Fibroblasts but Not Entry into Epithelial Cells. *J Virol.* 2011;85(22):11638–45.
 70. Tang H, Kawabata A, Yoshida M, Oyaizu H, Maeki T, Yamanishi K, et al. Human herpesvirus 6 encoded glycoprotein Q1 gene is essential for virus growth. *Virology* [Internet]. 2010;407(2):360–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.018>
 71. Torrisi MR, Gentile M, Cardinali G, Cirone M, Zompetta C, Lotti L V., et al. Intracellular transport and maturation pathway of human herpesvirus 6. *Virology.* 1999;257(2):460–71.
 72. Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* 1997;136(5):1007–21.
 73. Honess RW, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral protein. *J Virol.* 1974;(14):8–19.
 74. Honess RW, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(4):1276–80.
 75. Schierling K, Stamminger T, Mertens T, Winkler M. Human Cytomegalovirus Tegument Proteins ppUL82 (pp71) and ppUL35 Interact and Cooperatively Activate the Major Immediate-Early Enhancer. *J Virol.* 2004;78(17):9512–23.
 76. Lehman IR, Boehmer PE. Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem.* 1999;274(40):28059–62.
 77. Dewhurst S, Krenitsky DM, Dykes C. Human herpesvirus 6B origin: sequence diversity, requirement for two binding sites for origin-binding protein, and enhanced replication from origin multimers. *J Virol.* 1994;68(10):6799–803.
 78. Lawrence GL, Nicholas J, Barrell BG. Human herpesvirus 6 (strain U1102) encodes homologues of the conserved herpesvirus glycoprotein gM and the alphaherpesvirus origin-binding protein. *J Gen Virol.* 1995;76(1):147–52.
 79. Inoue N, Dambaugh TR, Rapp JC, Pellett PE. Alphaherpesvirus origin-binding protein homolog encoded by human herpesvirus 6B, a betaherpesvirus, binds to nucleotide sequences that are similar to ori regions of alphaherpesviruses. *J Virol.* 1994;68(7):4126–36.
 80. Nicholas J. Nucleotide Sequence Analysis of a 21-kbp Region of the Genome of Human Herpesvirus-6 Containing Homologues of Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early and Replication Genes. *Virology.* 1994;204(2):738–50.
 81. Teo IA, Griffin BE, Jones MD. Characterization of the DNA polymerase gene of human herpesvirus 6. *J Virol.* 1991;65(9):4670–80.
 82. Lin K, Ricciardi RP. The 41-kDa protein of human herpesvirus 6 specifically binds to viral DNA polymerase and greatly increases DNA synthesis. *Virology.* 1998;250(1):210–9.
 83. Vlazny DA, Kwong A, Frenkel N. Site-specific cleavage/packaging of herpes simplex virus DNA and the selective maturation of nucleocapsids containing full-length viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(5):1423–7.
 84. Lee CP, Chen MR. Escape of herpesviruses from the nucleus. *Rev Med Virol.* 2010;20(4):214–30.
 85. Flint S.J., Enquist L.W., Racaniello V.R. SAM. Genome Replication Strategies: DNA Viruses. In: Microbiology AS for, editor. *Principles of Virology.* third. Washington, DC; 2009. p. 324–9.
 86. Newcomb WW, Trus BL, Booy FP, Steven AC, Wall JS, Brown JC. Structure of the herpes simplex virus capsid: Molecular composition of the pentons and the triplexes. *J Mol Biol.* 1993;232(2):499–511.
 87. Butcher SJ, Aitken J, Mitchell J, Gowen B, Dargan DJ. Structure of the human cytomegalovirus B

- capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J Struct Biol.* 1998;124(1):70–6.
88. DeRussy BM, Tandon R. Human Cytomegalovirus pUL93 Is Required for Viral Genome Cleavage and Packaging. *J Virol.* 2015;89(23):12221–5.
 89. Nanbo A, Noda T, Ohba Y. Epstein-barr virus acquires its final envelope on intracellular compartments with Golgi markers. *Front Microbiol.* 2018;9(MAR).
 90. Mettenleiter TC. Herpesvirus Assembly and Egress. *J Virol.* 2002;76(4):1537–47.
 91. Mori Y, Koike M, Moriishi E, Kawabata A, Tang H, Oyaizu H, et al. Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic.* 2008;9(10):1728–42.
 92. Becerra-Artiles A, Santoro T, Stern LJ. Evaluation of a method to measure HHV-6B infection in vitro based on cell size. *Viol J.* 2018;15(1):4.
 93. Speck SH, Ganem D. Viral latency and its regulation: Lessons from the γ -Herpesviruses. *Cell Host Microbe.* 2010;8(1):100–15.
 94. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. *J Oral Microbiol.* 2013;5(1):22766.
 95. Mauch-Mücke K, Schön K, Paulus C, Nevels MM. Evidence for Tethering of Human Cytomegalovirus Genomes to Host Chromosomes. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10.
 96. Weidner-Glunde M, Kruminis-Kaszkiel E, Savanagounder M. Herpesviral latency—common themes. *Pathogens.* 2020;9(2).
 97. Pawlowska AB, Karras NA, Liu H, DiMundo J, Cheng JC, Sun W, et al. Reactivation of human herpesvirus 6 in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2021;23(1).
 98. Razonable RR. Human herpesviruses 6, 7 and 8 in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2013;13(SUPPL. 3):67–78.
 99. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Suzuki K, Matsubara T, Shimizu N, et al. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated human herpesvirus 6A in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin Infect Dis.* 2014;59(4):545–8.
 100. Yasukawa M, Ohminami H, Sada E, Yakushijin Y, Kaneko M, Yanagisawa K, et al. Latent infection and reactivation of human herpesvirus 6 in two novel myeloid cell lines. *Blood.* 1999;93(3):991–9.
 101. López-Guerrero JA, de la Nuez C, Praena B, Sánchez-León E, Krummenacher C, Bello-Morales R. Herpes Simplex Virus 1 Spread in Oligodendrocytic Cells Is Highly Dependent on MAL Proteolipid. *J Virol.* 2019;94(4).
 102. Liu H, Qiu K, He Q, Lei Q, Lu W. Mechanisms of Blood-Brain Barrier Disruption in Herpes Simplex Encephalitis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2019;14(2):157–72.
 103. Schiewe U, Neipel F, Schreiner D, Fleckenstein B. Structure and transcription of an immediate-early region in the human herpesvirus 6 genome. *J Virol.* 1994;68(5):2978–85.
 104. Kondo K, Shimada K, Sashihara J, Tanaka-Taya K, Yamanishi K. Identification of Human Herpesvirus 6 Latency-Associated Transcripts. *J Virol.* 2002;76(8):4145–51.
 105. Rotola A, Ravaioli T, Gonelli A, Dewhurst S, Cassai E, Di Luca D. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(23):13911–6.
 106. Caselli E, Bracci A, Galvan M, Boni M, Rotola A, Bergamini C, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) U94/REP protein inhibits betaherpesvirus replication. *Virology.* 2006;346(2):402–14.
 107. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NMH. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;84(3):223–43.
 108. Portaccio E, De Meo E, Bellinvia A, Amato MP. Cognitive Issues in Pediatric Multiple Sclerosis. *Brain Sci.* 2021;11(4).
 109. Kawamura Y, Sugata K, Ihira M, Mihara T, Mutoh T, Asano Y, et al. Different characteristics of human herpesvirus 6 encephalitis between primary infection and viral reactivation. *J Clin Virol.* 2011;51(1):12–9.
 110. Yoshikawa T, Ohashi M, Miyake F, Fujita A, Usui C, Sugata K, et al. Exanthem Subitum-Associated Encephalitis: Nationwide Survey in Japan. *Pediatr Neurol.* 2009;41(5):353–8.

111. Zerr DM. Human herpesvirus 6: A clinical update. *Herpes*. 2006;13(1):20–4.
112. Hall CB, Long CE, Schnabel KC, Caserta MT, Mcintyre KM, Costanzo MA, et al. Human herpesvirus-6 infection in children — A prospective study of complications and reactivation. *N Engl J Med*. 1994;331(7):432–8.
113. Ahlqvist J, Fotheringham J, Akhyani N, Yao K, Fogdell-Hahn A, Jacobson S. Differential tropism of human herpesvirus 6 (HHV-6) variants and induction of latency by HHV-6A in oligodendrocytes. *J Neurovirol*. 2005;11(4):384–94.
114. Luppi M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari S, Ceccherini-Nelli L, Batoni G, et al. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J Med Virol*. 1993;40(1):44–52.
115. Huang Y, Hidalgo-Bravo A, Zhang E, Cotton VE, Mendez-Bermudez A, Wig G, et al. Human telomeres that carry an integrated copy of human herpesvirus 6 are often short and unstable, facilitating release of the viral genome from the chromosome. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(1):315–27.
116. Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, Gilbert-Girard S, Collin V, Hall-Sedlak R, et al. Cell Culture Systems To Study Human Herpesvirus 6A/B Chromosomal Integration. *J Virol*. 2017;91(14):e00437-17.
117. Gilbert-Girard S, Gravel A, Artusi S, Richter SN, Wallaschek N, Kaufer BB, et al. Stabilization of telomere G-quadruplexes interferes with human herpesvirus 6A chromosomal integration. *J Virol*. 2017;(May):JVI.00402-17.
118. Saviola AJ, Zimmermann C, Mariani MP, Signorelli SA, Gerrard DL, Boyd JR, et al. Chromatin profiles of chromosomally integrated human herpesvirus. *Front Microbiol*. 2019;10.
119. Ogata M, Kikuchi H, Satou T, Kawano R, Ikewaki J, Kohno K, et al. Human Herpesvirus 6 DNA in Plasma after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Incidence and Clinical Significance. *J Infect Dis*. 2006;193(1):68–79.
120. Zerr DM, Boeckh M, Delaney C, Martin PJ, Xie H, Adler AL, et al. HHV-6 Reactivation and Associated Sequelae after Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(11):1700–8.
121. Schmidt-Hieber M, Schwender J, Heinz WJ, Zabelina T, Kühl JS, Mousset S, et al. Viral encephalitis after allogeneic stem cell transplantation: A rare complication with distinct characteristics of different causative agents. *Haematologica*. 2011;96(1):142–9.
122. Hill JA, Koo S, Guzman Suarez BB, Ho VT, Cutler C, Koreth J, et al. Cord-Blood Hematopoietic Stem Cell Transplant Confers an Increased Risk for Human Herpesvirus-6-Associated Acute Limbic Encephalitis: A Cohort Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012;18(11):1638–48.
123. Wainwright MS, Martin PL, Morse RP, Lacaze M, Provenzale JM, Edward Coleman R, et al. Human herpesvirus 6 limbic encephalitis after stem cell transplantation. *Ann Neurol*. 2001;50(5):612–9.
124. Rashidi A, Said B, Ebadi M, Weisdorf DJ. Human Herpesvirus-6 Reactivation and Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;000:7–8.
125. Hill JA, Magaret AS, Hall-Sedlak R, Mikhaylova A, Huang ML, Sandmaier BM, et al. Outcomes of hematopoietic cell transplantation using donors or recipients with inherited chromosomally integrated HHV-6. *Blood*. 2017;130(8):1062–9.
126. Wipfler P, Dunn N, Beiki O, Trinka E, Fogdell-Hahn A. The Viral Hypothesis of Mesial Temporal Lobe Epilepsy – Is Human Herpes Virus-6 the Missing Link? A systematic review and meta-analysis. *Seizure*. 2018;54:33–40.
127. Kawamura Y, Nakayama A, Kato T, Miura H, Ishihara N, Ihira M, et al. Pathogenic Role of Human Herpesvirus 6B Infection in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *J Infect Dis*. 2015;212(7):1014–21.
128. Grivel J-C, Santoro F, Chen S, Fagá G, Malnati MS, Ito Y, et al. Pathogenic Effects of Human Herpesvirus 6 in Human Lymphoid Tissue Ex Vivo. *J Virol*. 2003;77(15):8280–9.
129. Lusso P, Crowley RW, Malnati MS, Di Serio C, Ponzoni M, Biancotto A, et al. Human herpesvirus 6A accelerates AIDS progression in macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):5067–72.
130. Humar A, Kumar D, Caliendo AM, Moussa G, Ashi-Sulaiman A, Levy G, et al. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation*. 2002;73(4):599–604.
131. Rogers J, Rohal S, Carrigan DR, Kusne S, Knox KK, Gayowski T, et al. Human herpesvirus-6 in liver

- transplant recipients: Role in pathogenesis of fungal infections, neurologic complications, and outcome. *Transplantation*. 2000;69(12):2566–73.
132. Flamand L, Romero F, Reitz MS, Gallo RC. CD4 Promoter Transactivation by Human Herpesvirus 6. *J Virol*. 1998;72(11):8797–805.
 133. Charvet B, Reynaud JM, Gourru-Lesimple G, Perron H, Marche PN, Horvat B. Induction of Proinflammatory Multiple Sclerosis-Associated Retrovirus Envelope Protein by Human Herpesvirus-6A and CD46 Receptor Engagement. *Front Immunol*. 2018;9(December):2803.
 134. Readhead B, Haure-Mirande JV, Funk CC, Richards MA, Shannon P, Haroutunian V, et al. Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic, and Clinical Networks by Human Herpesvirus. *Neuron*. 2018;99(1):64-82.e7.
 135. Shao Q, Lin Z, Wu X, Tang J, Lu S, Feng D, et al. Transcriptome sequencing of neurologic diseases associated genes in HHV-6A infected human astrocyte. *Oncotarget*. 2016;7(30):48070–80.
 136. Prichard MN, Whitley RJ. The development of new therapies for human herpesvirus 6. *Curr Opin Virol*. 2014;9:148–53.
 137. Ward KN, Hill JA, Hubacek P, De La Camara R, Crocchiolo R, Einsele H, et al. Guidelines from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia for management of HHV-6 infection in patients with hematologic malignancies and after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2019;104(11):2155–63.
 138. HHV-6 foundation. HHV-6 Antivirals.
 139. Brum S, Nolasco F, Sousa J, Ferreira A, Possante M, Pinto JR, et al. Leukopenia in Kidney Transplant Patients With the Association of Valganciclovir and Mycophenolate Mofetil. *Transplant Proc*. 2008;40(3):752–4.
 140. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(10):1143–238.
 141. Imataki O, Uemura M. Ganciclovir-resistant HHV-6 encephalitis that progressed rapidly after bone marrow transplantation. *J Clin Virol*. 2015;69:176–8.
 142. Hiramatsu H, Suzuki R, Yamada S, Ihira M, Isegawa Y, Kawamura Y, et al. Analysis of ganciclovir-resistant human herpesvirus 6B clinical isolates using quenching probe PCR methodology. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(5):2618–24.
 143. Biegeleisen K, Rush MG. Association of herpes simplex virus type 1 DNA with host chromosomal DNA during productive infection. *Virology*. 1976;69(1):246–57.
 144. Biegeleisen K, Yanagi K, Rush MG. Further studies on the association of herpes simplex virus type 1 DNA with host DNA during productive infection. *Virology*. 1977;83(1):221–5.
 145. Moore DF, Kingsbury DT. Integration and transcription of virus DNA in herpes simplex virus transformed cell lines. *J Gen Virol*. 1980;48(1):123–33.
 146. Sullivan DC, Atherton SS, Caughman GB, Staczek J, O'Callaghan DJ. Oncogenic transformation of primary hamster embryo cells by equine herpesvirus type 3. *Virus Res*. 1986;5(2–3):201–12.
 147. Henderson A, Ripley S, Heller M, Kieff E. Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth-transformed in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(71):1987–91.
 148. Matsuo T, Heller M, Petti L, O'Shiro E, Kieff E. Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* (80-). 1984;226(4680):1322–5.
 149. Xiao K, Yu Z, Li X, Li X, Tang K, Tu C, et al. Genome-wide analysis of Epstein-Barr Virus (EBV) integration and strain in C666-1 and Raji cells. *J Cancer*. 2016;7(2):214-224.pdf.
 150. Bernasconi M, Berger C, Sigrist JA, Bonanomi A, Sobek J, Niggli FK, et al. Quantitative profiling of housekeeping and Epstein-Barr virus gene transcription in Burkitt lymphoma cell lines using an oligonucleotide microarray. *Virol J*. 2006;3.
 151. Klein G, Dombos L. Relationship between the sensitivity of EBV-carrying lymphoblastoid lines to superinfection and the inducibility of the resident viral genome. *Int J Cancer*. 1973;11(2):327–37.
 152. Daibata M, Taguchi T, Nemoto Y, Taguchi H, Miyoshi I. Inheritance of chromosomally integrated

- human herpesvirus 6 DNA. *Blood*. 1999;94:1545–9.
153. Daibata M, Taguchi T, Sawada T, Taguchi H, Miyoshi I. Chromosomal transmission of human herpesvirus 6 DNA in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998;352(9127):543–4.
 154. Daibata M, Taguchi T, Taguchi H, Miyoshi I. Integration of human herpesvirus 6 in a Burkitt's lymphoma cell line. *Br J Haematol*. 1998;102(5):1307–13.
 155. Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol Preval Chromosom Integr Hum herpesvirus 6 genomes blood UK blood donors*. 2004;73(3):465–73.
 156. Kaspersen MD, Larsen PB, Kofod-Olsen E, Fedder J, Bonde J, Höllsberg P. Human Herpesvirus-6A/B Binds to Spermatozoa Acrosome and Is the Most Prevalent Herpesvirus in Semen from Sperm Donors. *PLoS One*. 2012;7(11).
 157. Neofytou E, Sourvinos G, Asmarianaki M, Spandidos DA, Makrigiannakis A. Prevalence of human herpes virus types 1-7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. *Fertil Steril*. 2009;91(6):2487–94.
 158. Zhang E, Bell AJ, Wilkie GS, Suárez NM, Batini C, Veal CD, et al. Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 Genomes Are Ancient, Intact, and Potentially Able To Reactivate from Telomeres. *J Virol*. 2017;91(22):1–19.
 159. Pellett PE. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev Med Virol*. 2012;22(3):144–55.
 160. Ward KN, Thiruchelvam AD, Couto-Parada X. Unexpected occasional persistence of high levels of HHV-6 DNA in sera: Detection of variants A and B. *J Med Virol*. 2005;76(4):563–70.
 161. Bell AJ, Gallagher A, Mottram T, Lake A, Kane E V., Lightfoot T, et al. Germ-line transmitted, chromosomally integrated HHV-6 and classical hodgkin lymphoma. *PLoS One*. 2014;9(11).
 162. Hoe NL, Tuke PW, Tedder RS, Aysha BK, Eglin RP, Atkinson CE, et al. The prevalence of chromosomally integrated human herpesvirus 6 genomes in the blood of UK blood donors. *J Med Virol*. 2007;79(1):45–51.
 163. Hubacek P, Hrdlickova A, Spacek M, Zajac M, Muzikova K, Sedlacek P, et al. Prevalence of chromosomally integrated HHV-6 in patients with malignant disease and healthy donors in the Czech Republic. *Folia Microbiol (Praha)*. 2013;58(1):87–90.
 164. Potenza L, Barozzi P, Masetti M, Pecorari M, Bresciani P, Gautheret-Dejean A, et al. Prevalence of human herpesvirus-6 chromosomal integration (CIHHV-6) in italian solid organ and allogeneic stem cell transplant patients: Case report. *Am J Transplant*. 2009;9(7):1690–7.
 165. Hill JA, HallSedlak R, Magaret A, Huang ML, Zerr DM, Jerome KR, et al. Efficient identification of inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 using specimen pooling. *J Clin Virol*. 2016;77:71–6.
 166. Gravel A, Dubuc I, Morissette G, Sedlak RH, Jerome KR, Flamand L. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 as a predisposing risk factor for the development of angina pectoris. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(26):8058–63.
 167. Kaufer BB, Flamand L. Chromosomally integrated HHV-6: Impact on virus, cell and organismal biology. *Curr Opin Virol*. 2014;9:111–8.
 168. Arbuckle JH, Pantry SN, Medveczky MM, Prichett J, Loomis KS, Ablashi D, et al. Mapping the telomere integrated genome of human herpesvirus 6A and 6B. *Virology*. 2013;442(1):3–11.
 169. Arbuckle JH, Medveczky MM, Luka J, Hadley SH, Luegmayer A, Ablashi D, et al. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(12):5563–8.
 170. Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, et al. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6. *Sci Rep*. 2014;4:4559.
 171. Bell A, Brownlie C, Gallacher A, Campbell A, Porteous D, Smith B, et al. Relevance of inherited chromosomally integrated HHV-6 varies by geographical location/nationality within the UK. In Boston: 9th International conference on HHV-6 and HHV-7; 2015.

172. Collin V, Flamand L. HHV-6A/B integration and the pathogenesis associated with the reactivation of chromosomally integrated HHV-6A/B. *Viruses*. 2017;9(7):160.
173. Tweedy J, Spyrou MA, Pearson M, Lassner D, Kuhl U, Gompels UA. Complete genome sequence of germline chromosomally integrated human herpesvirus 6A and analyses integration sites define a new human endogenous virus with potential to reactivate as an emerging infection. *Viruses*. 2016;8(1).
174. Peddu V, Dubuc I, Gravel A, Xie H, Huang M-L, Tenenbaum D, et al. Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 Demonstrates Tissue-Specific RNA Expression In Vivo That Correlates with an Increased Antibody Immune Response . Vol. 94, *Journal of Virology*. 2019. 415–439 p.
175. Govind S, Hockley J, Morris C, Group CS. Collaborative Study to establish the 1st WHO International Standard for Human Herpes Virus 6B (HHV-6B) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays [Internet]. Geneva; 2017. Available from: https://www.who.int/biologicals/expert_committee/BS2321_HHV-6_WHO_ECBS_report_v5.pdf
176. Sedlak RH, Cook L, Huang ML, Magaret A, Zerr DM, Boeckh M, et al. Identification of chromosomally integrated human herpesvirus 6 by droplet digital PCR. *Clin Chem*. 2014;60(5):765–72.
177. Rozins C, Day T, Greenhalgh S. Managing Marek's disease in the egg industry. *bioRxiv*. 2018;
178. Payne LN, Venugopal K. Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis. *OIE Rev Sci Tech*. 2000;19(2):544–64.
179. Rushton J. The economics of animal health and production. *Econ Anim Heal Prod*. 2008;1–364.
180. Kaufer BB, Jarosinski KW, Osterrieder N. Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *J Exp Med*. 2011;208(3):605–15.
181. Kheimar A, Previdelli RL, Wight DJ, Kaufer BB. Telomeres and telomerase: Role in Marek's disease virus pathogenesis, integration and tumorigenesis. *Viruses*. 2017;9(7):1–13.
182. Kishi M, Harada H, Takahashi M, Tanaka A, Hayashi M, Nonoyama M, et al. A repeat sequence, GGGTTA, is shared by DNA of human herpesvirus 6 and Marek's disease virus. *J Virol*. 1988;62(12):4824–7.
183. Osterrieder N, Wallaschek N, Kaufer BB. Herpesvirus genome integration into telomeric repeats of host cell chromosomes. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):215–35.
184. Wallaschek N, Sanyal A, Pirzer F, Gravel A, Mori Y, Flamand L, et al. The Telomeric Repeats of Human Herpesvirus 6A (HHV-6A) Are Required for Efficient Virus Integration. *PLoS Pathog*. 2016;12(5):1–15.
185. Lilley CE, Chaurushiya MS, Boutell C, Everett RD, Weitzman MD. The intrinsic antiviral defense to incoming HSV-1 genomes includes specific DNA repair proteins and is counteracted by the viral protein ICP0. *PLoS Pathog*. 2011;7(6).
186. Singh V V., Dutta D, Ansari MA, Dutta S, Chandran B, Longnecker R. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Induces the ATM and H2AX DNA Damage Response Early during De Novo Infection of Primary Endothelial Cells, Which Play Roles in Latency Establishment. *J Virol*. 2014;88(5):2821–34.
187. Brown JC. Herpes simplex virus latency: The DNA repair-Centered pathway. *Adv Virol*. 2017;2017:1–6.
188. Marigliò G, Koch S, Zhang G, Weidner-Glunde M, Rückert J, Kati S, et al. Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV) Latency-Associated Nuclear Antigen (LANA) recruits components of the MRN (Mre11-Rad50-NBS1) repair complex to modulate an innate immune signaling pathway and viral latency. *PLoS Pathog*. 2017;13(4).
189. Hollingworth R, Horniblow RD, Forrest C, Stewart GS, Grand RJ. Localization of Double-Strand Break Repair Proteins to Viral Replication Compartments following Lytic Reactivation of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J Virol*. 2017;91(22).
190. Taylor TJ, Knipe DM. Proteomics of Herpes Simplex Virus Replication Compartments: Association of Cellular DNA Replication, Repair, Recombination, and Chromatin Remodeling Proteins with ICP8. *J Virol*. 2004;78(11):5856–66.
191. Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Florani S, Carotenuto W, et al. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature*. 2004;431(7011):1011–

- 7.
192. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA End joining. *J Biol Chem.* 2008;283(1):1–5.
193. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle.* 2008;7(18):2902–6.
194. Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, et al. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* 2011;30(6):1079–92.
195. Mimori T, Hardin JA. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem.* 1986;261(22):10375–9.
196. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:229–57.
197. Saini N, Ramakrishnan S, Elango R, Ayyar S, Zhang Y, Deem A, et al. Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature.* 2013;502(7471):389–92.
198. Aymard F, Bugler B, Schmidt CK, Guillou E, Caron P, Briois S, et al. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(4):366–74.
199. Seo J, Kim SC, Lee HS, Kim JK, Shon HJ, Salleh NLM, et al. Genome-wide profiles of H2AX and γ -H2AX differentiate endogenous and exogenous DNA damage hotspots in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(13):5965–74.
200. Stucki M, Jackson SP. γ H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst).* 2006;5(5):534–43.
201. Povirk LF, Zhou T, Zhou R, Cowan MJ, Yannone SM. Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by artemis nuclease. *J Biol Chem.* 2007;282(6):3547–58.
202. Chang HHY, Watanabe G, Gerodimos CA, Ochi T, Blundell TL, Jackson SP, et al. Different DNA end configurations dictate which NHEJ components are most important for joining efficiency. *J Biol Chem.* 2016;291(47):24377–89.
203. Chang HHY, Watanabe G, Lieber MR. Unifying the DNA end-processing roles of the artemis nuclease: Ku-dependent artemis resection at blunt DNA ends. *J Biol Chem.* 2015;290(40):24036–50.
204. Bertocci B, De Smet A, Weill JC, Reynaud CA. Nonoverlapping Functions of DNA Polymerases μ , λ , and Terminal Deoxynucleotidyltransferase during Immunoglobulin V(D)J Recombination In Vivo. *Immunity.* 2006;25(1):31–41.
205. Grawunder U, Wilm M, Wu X, Kulesza P, Wilson TE, Mann M, et al. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature.* 1997;388(6641):492–5.
206. Ochi T, Blackford AN, Coates J, Jhujh S, Mehmood S, Tamura N, et al. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science (80-).* 2015;347(6218):185–8.
207. Falck J, Coates J, Jackson SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature.* 2005;434(7033):605–11.
208. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Cell.* 2008;133(3):549.
209. Liu J, Luo S, Zhao H, Liao J, Li J, Yang C, et al. Structural mechanism of the phosphorylation-dependent dimerization of the MDC1 forkhead-associated domain. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(9):3898–912.
210. Chapman JR, Jackson SP. Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep.* 2008;9(8):795–801.
211. Hari FJ, Spycher C, Jungmichel S, Pavic L, Stucki M. A divalent FHA/BRCT-binding mechanism couples the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *EMBO Rep.* 2010;11(5):387–92.
212. Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, et al. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol*

- Cell. 2006;21(2):187–200.
213. Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet.* 2011;45:247–71.
 214. Huertas P, Jackson SP. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem.* 2009;284(14):9558–65.
 215. Yu X, Chen J. DNA Damage-Induced Cell Cycle Checkpoint Control Requires CtIP, a Phosphorylation-Dependent Binding Partner of BRCA1 C-Terminal Domains. *Mol Cell Biol.* 2004;24(21):9478–86.
 216. Wang H, Shi LZ, Wong CCL, Han X, Hwang PYH, Truong LN, et al. The Interaction of CtIP and Nbs1 Connects CDK and ATM to Regulate HR-Mediated Double-Strand Break Repair. *PLoS Genet.* 2013;9(2).
 217. Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature.* 2007;450(7169):509–14.
 218. Sun H, Treco D, Schultes NP, Szostak JW. Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature.* 1989;338(6210):87–90.
 219. Nimonkar A V., Genschel J, Kinoshita E, Polaczek P, Campbell JL, Wyman C, et al. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* 2011;25(4):350–62.
 220. Zhou Y, Caron P, Legube G, Paull TT. Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(3).
 221. Hua S bing, Qiu M, Chan E, Zhu L, Luo Y. Minimum length of sequence homology required for in vivo cloning by homologous recombination in yeast. *Plasmid.* 1997;38(2):91–6.
 222. Jakobsen KP, Nielsen KO, Løvschal K V., Rødgaard M, Andersen AH, Bjergbæk L. Minimal Resection Takes Place during Break-Induced Replication Repair of Collapsed Replication Forks and Is Controlled by Strand Invasion. *Cell Rep.* 2019;26(4):836-844.e3.
 223. Oliver AW, Swift S, Lord CJ, Ashworth A, Pearl LH. Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep.* 2009;10(9):990–6.
 224. Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: The roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4).
 225. Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC. Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature.* 2010;467(7316):678–83.
 226. Buisson R, Niraj J, Pauty J, Maity R, Zhao W, Coulombe Y, et al. Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase η in recombination-associated DNA Synthesis At Blocked Replication Forks. *Cell Rep.* 2014;6(3):553–64.
 227. Sharma S, Hicks JK, Chute CL, Brennan JR, Ahn JY, Glover TW, et al. REV1 and polymerase ζ facilitate homologous recombination repair. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(2):682–91.
 228. Raynard S, Bussen W, Sung P. A double holliday junction dissolvosome comprising BLM, topoisomerase III α , and BLAP75. *J Biol Chem.* 2006;281(20):13861–4.
 229. Bizard AH, Hickson ID. The dissolution of double Holliday junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(7).
 230. Osman F, Dixon J, Doe CL, Whitby MC. Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: A role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol Cell.* 2003;12(3):761–74.
 231. Wyatt HDM, Laister RC, Martin SR, Arrowsmith CH, West SC. The SMX DNA Repair Tri-nuclease. *Mol Cell.* 2017;65(5):848-860.e11.
 232. Wyatt HDM, West SC. Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(9).
 233. Costantino L, Sotiriou SK, Rantala JK, Magin S, Mladenov E, Helleday T, et al. Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science (80-).* 2014;343(6166):88–91.
 234. Bosco G, Haber JE. Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocations and telomere capture. *Genetics.* 1998;150(3):1037–47.
 235. Malkova A, Ivanov EL, Haber JE. Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: A

- possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(14):7131–6.
236. Malkova A, Naylor ML, Yamaguchi M, Ira G, Haber JE. RAD51-Dependent Break-Induced Replication Differs in Kinetics and Checkpoint Responses from RAD51-Mediated Gene Conversion. *Mol Cell Biol*. 2005;25(3):933–44.
237. Lydeard JR, Jain S, Yamaguchi M, Haber JE. Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature*. 2007;448(7155):820–3.
238. VanHulle K, Lemoine FJ, Narayanan V, Downing B, Hull K, McCullough C, et al. Inverted DNA Repeats Channel Repair of Distant Double-Strand Breaks into Chromatid Fusions and Chromosomal Rearrangements. *Mol Cell Biol*. 2007;27(7):2601–14.
239. Rothenberg E, Grimme JM, Spies M, Ha T. Human Rad52-mediated homology search and annealing occurs by continuous interactions between overlapping nucleoprotein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(51):20274–9.
240. Motycka TA, Bessho T, Post SM, Sung P, Tomkinson AE. Physical and Functional Interaction between the XPF/ERCC1 Endonuclease and hRad52. *J Biol Chem*. 2004;279(14):13634–9.
241. Bhargava R, Onyango DO, Stark JM. Regulation of Single Strand Annealing and its role in genome maintenance Chromosomal break repair by the Single Strand Annealing (SSA) pathway. *Trends Genet*. 2016;32(9):566–75.
242. Bzymek M, Lovett ST. Evidence for two mechanisms of palindrome-stimulated deletion in *Escherichia coli*: Single-strand annealing and replication slipped mispairing. *Genetics*. 2001;158(2):527–40.
243. Ithurbide S, Bentchikou E, Coste G, Bost B, Servant P, Sommer S. Single Strand Annealing Plays a Major Role in RecA-Independent Recombination between Repeated Sequences in the Radioresistant *Deinococcus radiodurans* Bacterium. *PLoS Genet*. 2015;11(10).
244. Yang G, Liu C, Chen SH, Kassab MA, Hoff JD, Walter NG, et al. Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(7):3446–57.
245. Sfeir A, Symington LS. Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? *Trends Biochem Sci*. 2015;40(11):701–14.
246. Newman JA, Cooper CDO, Aitkenhead H, Gileadi O. Structure of the Helicase Domain of DNA Polymerase Theta Reveals a Possible Role in the Microhomology-Mediated End-Joining Pathway. *Structure*. 2015;23(12):2319–30.
247. Sharma S, Javadkar SM, Pandey M, Srivastava M, Kumari R, Raghavan SC. Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end joining. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1697.
248. Wyatt DW, Feng W, Conlin MP, Yousefzadeh MJ, Roberts SA, Mieczkowski P, et al. Essential Roles for Polymerase θ -Mediated End Joining in the Repair of Chromosome Breaks. *Mol Cell*. 2016;63(4):662–73.
249. Patterson-Fortin J, D'Andrea AD. Exploiting the microhomology-mediated end-joining pathway in cancer therapy. *Cancer Res*. 2020;80(21):4593–600.
250. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)(n), present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6622–6.
251. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999;97(4):503–14.
252. de Lange T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu Rev Genet*. 2018;52(1):223–47.
253. Timashev LA, De Lange T. Characterization of t-loop formation by TRF2. *Nucleus*. 2020;11(1):164–77.
254. Lipps HJ, Rhodes D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol*. 2009;19(8):414–22.
255. Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM. TERRA RNA Binding to TRF2 Facilitates Heterochromatin Formation and ORC Recruitment at Telomeres. *Mol Cell*. 2009;35(4):403–13.
256. Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*. 2008;10(2):228–36.

257. Sagie S, Toubiana S, Hartono SR, Katzir H, Tzur-Gilat A, Havazelet S, et al. Telomeres in ICF syndrome cells are vulnerable to DNA damage due to elevated DNA:RNA hybrids. *Nat Commun.* 2017;8.
258. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345(6274):458–60.
259. Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F. In Vitro Reconstitution of the End Replication Problem. *Mol Cell Biol.* 2001;21(17):5753–66.
260. Sauerwald A, Sandin S, Cristofari G, Scheres SHW, Lingner J, Rhodes D. Structure of active dimeric human telomerase. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Apr;20(4):454–60.
261. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet.* 2019;20(5):299–309.
262. Capper R, Britt-Compton B, Tankimanova M, Rowson J, Letsolo B, Man S, et al. The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev.* 2007;21(19):2495–508.
263. Takai H, Smogorzewska A, De Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol.* 2003;13(17):1549–56.
264. Rai R, Zheng H, He H, Luo Y, Multani A, Carpenter PB, et al. The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. *EMBO J.* 2010;29(15):2598–610.
265. O’Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(3):171–81.
266. Doksan Y, Wu JY, De Lange T, Zhuang X. Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell.* 2013;155(2):345.
267. Lei M, Podell ER, Cech TR. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(12):1223–9.
268. Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL, et al. Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication. *Cell.* 2009;138(1):90–103.
269. Wang H, Nora GJ, Ghodke H, Opresko PL. Single molecule studies of physiologically relevant telomeric tails reveal POT1 mechanism for promoting G-quadruplex unfolding. *J Biol Chem.* 2011;286(9):7479–89.
270. Zaugg AJ, Podell ER, Cech TR. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(31):10864–9.
271. Opresko PL, Otterlei M, Graakjær J, Bruheim P, Dawut L, Kølvrå S, et al. The werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell.* 2004;14(6):763–74.
272. Vannier JB, Pavicic-Kaltenbrunner V, Petalcorin MIR, Ding H, Boulton SJ. RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity. *Cell.* 2012;149(4):795–806.
273. Edwards DN, Orren DK, Machwe A. Strand exchange of telomeric DNA catalyzed by the Werner syndrome protein (WRN) is specifically stimulated by TRF2. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):7748–61.
274. Fekairi S, Scaglione S, Chahwan C, Taylor ER, Tissier A, Coulon S, et al. Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases. *Cell.* 2009;138(1):78–89.
275. Chawla R, Redon S, Raftopoulou C, Wischnewski H, Gagos S, Azzalin CM. Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication. *EMBO J.* 2011;30(19):4047–58.
276. Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, June CH, Hodes RJ, Weng NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(9):5147–52.
277. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (80-).* 1994;266(5193):2011–5.

278. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 2000;28(3):669–77.
279. Nikiforov MA, Chandriani S, Park J, Kotenko I, Matheos D, Johnsson A, et al. TRRAP-Dependent and TRRAP-Independent Transcriptional Activation by Myc Family Oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 2002;22(14):5054–63.
280. Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y, et al. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 2000;60(19):5376–81.
281. Osterwald S, Deeg KI, Chung I, Parisotto D, Wörz S, Rohr K, et al. PML induces compaction, TRF2 depletion and DNA damage signaling at telomeres and promotes their alternative lengthening. *J Cell Sci.* 2015;128(10):1887–900.
282. Ho A, Wilson FR, Peragine SL, Jeyanthan K, Mitchell TRH, Zhu XD. TRF1 phosphorylation on T271 modulates telomerase-dependent telomere length maintenance as well as the formation of ALT-associated PML bodies. *Sci Rep.* 2016;6.
283. Wu G, Lee WH, Chen PL. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem.* 2000;275(39):30618–22.
284. Henson JD, Cao Y, Huschtscha LI, Chang AC, Au AYM, Pickett HA, et al. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative- lengthening-of-telomeres activity. *Nat Biotechnol.* 2009;27(12):1181–5.
285. Novakovic B, Napier CE, Vryer R, Dimitriadis E, Manuelpillai U, Sharkey A, et al. DNA methylation mediated up-regulation of TERRA non-coding RNA is coincident with elongated telomeres in the human placenta. *Mol Hum Reprod.* 2016;22(11):791–9.
286. Rivera T, Haggblom C, Cosconati S, Karlseder J. A balance between elongation and trimming regulates telomere stability in stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(1):30–9.
287. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.* 2000;26(4):447–50.
288. Zhang JM, Yadav T, Ouyang J, Lan L, Zou L. Alternative Lengthening of Telomeres through Two Distinct Break-Induced Replication Pathways. *Cell Rep.* 2019;26(4):955-968.e3.
289. Min J, Wright WE, Shay JW. Alternative Lengthening of Telomeres Mediated by Mitotic DNA Synthesis Engages Break-Induced Replication Processes. *Mol Cell Biol.* 2017;37(20).
290. Yang Z, Takai KK, Lovejoy CA, de Lange T. Break-induced replication promotes fragile telomere formation. *Genes Dev.* 2020;1–14.
291. van Damme E, Laukens K, Dang TH, van Ostade X. A manually curated network of the pml nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int J Biol Sci.* 2010;6(1):51–67.
292. Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(12):1006–16.
293. McManus FP, Bourdeau V, Acevedo M, Lopes-Paciencia S, Mignacca L, Lamoliatte F, et al. Quantitative SUMO proteomics reveals the modulation of several PML nuclear body associated proteins and an anti-senescence function of UBC9. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–15.
294. Maroui MA, Maarifi G, Mc Manus FP, Lamoliatte F, Thibault P, Chelbi-Alix MK. Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Requirement for Interferon-induced Global Cellular SUMOylation. *Mol Cell Proteomics.* 2018;17(6):1196–208.
295. Zhong S, Müller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood.* 2000;95(9):2748–53.
296. Chang HM, Yeh ETH. Sumo: From bench to bedside. *Physiol Rev.* 2020;100(4):1599–619.
297. Chu Y, Yang X. SUMO E3 ligase activity of TRIM proteins. *Oncogene.* 2011;30(9):1108–16.
298. Pichler A, Fatouros C, Lee H, Eisenhardt N. SUMO conjugation - A mechanistic view. *Biomol Concepts.* 2017;8(1):13–36.

299. Knipscheer P, Van Dijk WJ, Olsen J V., Mann M, Sixma TK. Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *EMBO J.* 2007;26(11):2797–807.
300. Song J, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, Chen Y. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(40):14373–8.
301. Hecker CM, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem.* 2006;281(23):16117–27.
302. Maroui MA, Kheddache-Atmane S, El Asmi F, Dianoux L, Aubry M, Chelbi-Alix MK. Requirement of PML SUMO Interacting Motif for RNF4- or Arsenic Trioxide-Induced Degradation of Nuclear PML Isoforms. *PLoS One.* 2012;7(9).
303. Lin DY, Huang YS, Jeng JC, Kuo HY, Chang CC, Chao TT, et al. Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors. *Mol Cell.* 2006;24(3):341–54.
304. Kim ET, Kim Y-E, Huh YH, Ahn J-H. Role of Noncovalent SUMO Binding by the Human Cytomegalovirus IE2 Transactivator in Lytic Growth. *J Virol.* 2010;84(16):8111–23.
305. Gong X, Ahner A, Roldan A, Lukacs GL, Thibodeau PH, Frizzell RA. Non-native conformers of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator NBD1 are recognized by Hsp27 and conjugated to SUMO-2 for degradation. *J Biol Chem.* 2016;291(4):2004–17.
306. Ahner A, Gong X, Schmidt BZ, Peters KW, Rabeh WM, Thibodeau PH, et al. Small heat shock proteins target mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator for degradation via a small ubiquitin-like modifier-dependent pathway. *Mol Biol Cell.* 2013;24(2):74–84.
307. Tatham MH, Jaffray E, Vaughan OA, Desterro JMP, Botting CH, Naismith JH, et al. Polymeric Chains of SUMO-2 and SUMO-3 are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem.* 2001;276(38):35368–74.
308. Hendriks IA, Vertegaal ACO. A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(9):581–95.
309. Liang YC, Lee CC, Yao YL, Lai CC, Schmitz ML, Yang WM. SUMO5, a novel poly-SUMO isoform, regulates PML nuclear bodies. *Sci Rep.* 2016;6:1–15.
310. Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, Hopkins D, et al. A functional variant of SUMO4, a new IκBα modifier, is associated with type diabetes. *Nat Genet.* 2004;36(8):837–41.
311. Baczyk D, Audette MC, Drewlo S, Levytska K, Kingdom JC. SUMO-4: A novel functional candidate in the human placental protein SUMOylation machinery. *PLoS One.* 2017;12(5).
312. Jensen K, Shiels C, Freemont PS. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene.* 2001;20(49 REV. IIS. 6):7223–33.
313. Reuter N, Schilling E-M, Scherer M, Müller R, Stamminger T. The ND10 Component Promyelocytic Leukemia Protein Acts as an E3 Ligase for SUMOylation of the Major Immediate Early Protein IE1 of Human Cytomegalovirus. *J Virol.* 2017;91(10):e02335-16.
314. Wang P, Benhenda S, Wu H, Lallemand-Breitenbach V, Zhen T, Jollivet F, et al. RING tetramerization is required for nuclear body biogenesis and PML sumoylation. *Nat Commun.* 2018;9(1):1–10.
315. Corpet A, Kleijwegt C, Roubille S, Juillard F, Jacquet K, Texier P, et al. Survey and summary PML nuclear bodies and chromatin dynamics: Catch me if you can! *Nucleic Acids Res.* 2020;48(21):11890–912.
316. Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(5):285–98.
317. Li Y, Ma X, Chen Z, Wu H, Wang P, Wu W, et al. B1 oligomerization regulates PML nuclear body biogenesis and leukemogenesis. *Nat Commun.* 2019;10(1).
318. Li C, Peng Q, Wan X, Sun H, Tang J. C-terminal motifs in promyelocytic leukemia protein isoforms critically regulate PML nuclear body formation. *J Cell Sci.* 2017;130(20):3496–506.
319. Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, Yeh ETH. Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem.* 1998;273(41):26675–82.
320. Xu P, Roizman B. The SP100 component of ND10 enhances accumulation of PML and suppresses replication and the assembly of HSV replication compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 2017;114(19):E3823–9.
321. Negorev DG, Vladimirova O V., Ivanov A, Rauscher F, Maul GG. Differential Role of Sp100 Isoforms in Interferon-Mediated Repression of Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate-Early Protein Expression. *J Virol.* 2006;80(16):8019–29.
 322. Marchesini M, Matocci R, Tasselli L, Cambiaghi V, Orleth A, Furia L, et al. PML is required for telomere stability in non-neoplastic human cells. *Oncogene.* 2016;35(14):1811–21.
 323. Dellaire G, Ching RW, Ahmed K, Jalali F, Tse KCK, Bristow RG, et al. Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *J Cell Biol.* 2006;175(1):55–66.
 324. Chang HR, Munkhjargal A, Kim M, Park SY. The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. 2018;809(May 2017):99–107.
 325. Hoischen C, Monajembashi S, Weisshart K, Hemmerich P. Multimodal light microscopy approaches to reveal structural and functional properties of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Front Oncol.* 2018;8(MAY).
 326. Bernardi R, Scaglioni PP, Bergmann S, Horn HF, Vousden KH, Pandolfi PP. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol.* 2004;6(7):665–72.
 327. Yang S, Kuo C, Bisi JE, Kim MK. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol.* 2002;4(11):1–6.
 328. Dellaire G, Bazett-Jones DP. PML nuclear bodies: Dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *BioEssays.* 2004;26(9):963–77.
 329. Guo A, Salomoni P, Luo J, Shih A, Zhong S, Gu W, et al. The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2000;2(10):730–6.
 330. Loe TK, Zhou Li JS, Zhang Y, Azeroglu B, Boddy MN, Denchi EL. Telomere length heterogeneity in ALT cells is maintained by PML-dependent localization of the BTR complex to telomeres. *Genes Dev.* 2020;34(9–10):650–62.
 331. Nabetani A, Ishikawa F. Alternative lengthening of telomeres pathway: Recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J Biochem.* 2011;149(1):5–14.
 332. Chang FTM, McGhie JD, Chan FL, Tang MC, Anderson MA, Mann JR, et al. PML bodies provide an important platform for the maintenance of telomeric chromatin integrity in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(8):4447–58.
 333. Yeung PL, Denissova NG, Nasello C, Hakhverdyan Z, Chen JD, Brenneman MA. Promyelocytic leukemia nuclear bodies support a late step in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *J Cell Biochem.* 2012;113(5):1787–99.
 334. Attwood KM, Salsman J, Chung D, Mathavarajah S, Van Iderstine C, Dellaire G. PML isoform expression and DNA break location relative to PML nuclear bodies impacts the efficiency of homologous recombination. *Biochem Cell Biol.* 2019;1–42.
 335. Ikeda F, Hecker CM, Rozenknop A, Nordmeier RD, Rogov V, Hofmann K, et al. Involvement of the ubiquitin-like domain of TBK1/IKK-i kinases in regulation of IFN-inducible genes. *EMBO J.* 2007;26(14):3451–62.
 336. Lin R, Mamane Y, Hiscott J. Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection. *J Biol Chem.* 2000;275(44):34320–7.
 337. Juckem LK, Boehme KW, Feire AL, Compton T. Differential Initiation of Innate Immune Responses Induced by Human Cytomegalovirus Entry into Fibroblast Cells. *J Immunol.* 2008;180(7):4965–77.
 338. Wathelet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco L V., Howley PM, Maniatis T. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN- β enhancer in vivo. *Mol Cell.* 1998;1(4):507–18.
 339. Kumari P, Narayanan S, Kumar H. Herpesviruses: Interfering innate immunity by targeting viral sensing and interferon pathways. *Rev Med Virol.* 2015;25(3):187–201.
 340. Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T. Regulation of the type I IFN induction: A current view. *Int Immunol.* 2005;17(11):1367–78.
 341. Regad T, Saib A, Lallemand-Breitenbach V, Pandolfi PP, De Thé H, Chelbi-Alix MK. PML mediates

- the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J.* 2001;20(13):3495–505.
342. Chee A V., Lopez P, Pandolfi PP, Roizman B. Promyelocytic Leukemia Protein Mediates Interferon-Based Anti-Herpes Simplex Virus 1 Effects. *J Virol.* 2003;77(12):7101–5.
 343. Chen Y, Wright J, Meng X, Leppard KN. Promyelocytic Leukemia Protein Isoform II Promotes Transcription Factor Recruitment To Activate Interferon Beta and Interferon-Responsive Gene Expression. *Mol Cell Biol.* 2015;35(10):1660–72.
 344. Stadler M, Chelbi-Alix MK, Koken MHM, Venturini L, Lee C, Saïb A, et al. Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene.* 1995;11(12):2564–73.
 345. Chelbi-Alix MK, Pelicano L, Quignon F, Koken MHM, Venturini L, Stadler M, et al. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia.* 1995;9(12):2027–33.
 346. Kim YE, Ahn JH. Positive Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Type I Interferon Response and Its Regulation by Human Cytomegalovirus. *PLoS Pathog.* 2015;11(3):1–24.
 347. Scherer M, Stamminger T. Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. 2016;90(13):5850–4.
 348. Günther T, Schreiner S, Dobner T, Tessmer U, Grundhoff A. Influence of ND10 Components on Epigenetic Determinants of Early KSHV Latency Establishment. *PLoS Pathog.* 2014;10(7).
 349. Xu P, Mallon S, Roizman B. PML plays both inimical and beneficial roles in HSV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(21):E3022–8.
 350. Shastrula PK, Sierra I, Deng Z, Keeney F, Hayden JE, Lieberman PM, et al. PML is recruited to heterochromatin during S phase and represses DAXX-mediated histone H3.3 chromatin assembly. *J Cell Sci.* 2019;132(6).
 351. Cohen C, Corpet A, Roubille S, Maroui MA, Poccardi N, Rousseau A, et al. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (NBs) induce latent/quiescent HSV-1 genomes chromatinization through a PML NB/Histone H3.3/H3.3 Chaperone Axis. Vol. 14, *PLoS Pathogens.* 2018. 1–39 p.
 352. Merkl PE, Orzalli MH, Knipe DM. Mechanisms of Host IFI16, PML, and Daxx Protein Restriction of Herpes Simplex Virus 1 Replication. *J Virol.* 2018;92(10):1–19.
 353. Sanyal A, Wallaschek N, Glass M, Flamand L, Wight DJ, Kaufer BB. The ND10 complex represses lytic human herpesvirus 6A replication and promotes silencing of the viral genome. *Viruses.* 2018;10(8):401.
 354. Zhang K, van Drunen Littel-van den Hurk S. Herpesvirus tegument and immediate early proteins are pioneers in the battle between viral infection and nuclear domain 10-related host defense. *Virus Res.* 2017;238(June):40–8.
 355. Full F, Ensser A. Early Nuclear Events after Herpesviral Infection. *J Clin Med.* 2019;8(9):1408.
 356. Adamson AL, Kenney S. Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein BZLF1 Is SUMO-1 Modified and Disrupts Promyelocytic Leukemia Bodies. *J Virol.* 2001;75(5):2388–99.
 357. Lowrey AJ, Cramblet W, Bentz GL. Viral manipulation of the cellular sumoylation machinery. *Cell Commun Signal.* 2017;15(1):1–14.
 358. Wimmer P, Schreiner S, Dobner T. Human Pathogens and the Host Cell SUMOylation System. *J Virol.* 2012;86(2):642–54.
 359. Everett RD, Freemont P, Saitoh H, Dasso M, Orr A, Kathoria M, et al. The Disruption of ND10 during Herpes Simplex Virus Infection Correlates with the Vmw110- and Proteasome-Dependent Loss of Several PML Isoforms. *J Virol.* 1998;72(8):6581–91.
 360. Hofmann H, Sindre H, Stamminger T. Functional Interaction between the pp71 Protein of Human Cytomegalovirus and the PML-Interacting Protein Human Daxx. *J Virol.* 2002;76(11):5769–83.
 361. Ishov AM, Vladimirova O V., Maul GG. Daxx-Mediated Accumulation of Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp71 at ND10 Facilitates Initiation of Viral Infection at These Nuclear Domains. *J Virol.* 2002;76(15):7705–12.
 362. Eva-Maria Schilling, Myriam Scherer, Nina Reuter, Johannes Schweininger, Yves A. Muller TS. The Human Cytomegalovirus IE1 Protein Antagonizes PML Nuclear Body- Mediated Intrinsic Immunity via

- the Inhibition of PML De Novo SUMOylation. *J Virol.* 2017;91(4):1–17.
363. Everett RD. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene.* 2001;20(49):7266–73.
 364. Martin MED, Nicholas J, Thomson BJ, Newman C, Honess RW. Identification of a transactivating function mapping to the putative immediate-early locus of human herpesvirus 6. *J Virol.* 1991;65(10):5381–90.
 365. Jaworska J, Gravel A, Fink K, Grandvaux N, Flamand L. Inhibition of Transcription of the Beta Interferon Gene by the Human Herpesvirus 6 Immediate-Early 1 Protein. *J Virol.* 2007;81(11):5737–48.
 366. Gravel A, Gosselin J, Flamand L. Human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19679–87.
 367. Stanton R, Fox JD, Caswell R, Sherratt E, Wilkinson GWG. Analysis of the human herpesvirus-6 immediate-early 1 protein. *J Gen Virol.* 2002;83(11):2811–20.
 368. Matsuura M, Takemoto M, Yamanishi K, Mori Y. Human herpesvirus 6 major immediate early promoter has strong activity in T cells and is useful for heterologous gene expression. *Virol J.* 2011;8(1):9.
 369. Jaworska J, Gravel A, Flamand L. Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(18):8369–74.
 370. Gravel A, Dion V, Cloutier N, Gosselin J, Flamand L. Characterization of human herpesvirus 6 variant B immediate-early 1 protein modifications by small ubiquitin-related modifiers. *J Gen Virol.* 2004;85(5):1319–28.
 371. Gravel A, Dubuc I, Wallaschek N, Gilbert-Girard S, Collin V, Hall-Sedlak R, et al. Cell culture systems to study Human Herpesvirus 6A/B Chromosomal Integration. *J Virol.* 2017;(May):JVI.00437-17.
 372. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med.* 1997;3(11):1271–4.
 373. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet.* 2010;11(5):319–30.
 374. Yeager TR, Neumann A a, Englezou A, Leukemia P, Body PML, Huschtscha LI, et al. Telomerase-negative Immortalized Human Cells Contain a Novel Type of Promyelocytic Leukemia (PML) Body Advances in Brief Telomerase-negative Immortalized Human Cells Contain a Novel Type of. 1999;4175–9.
 375. Komatsu T, Nagata K, Wodrich H. The role of nuclear antiviral factors against invading DNA viruses: The immediate fate of incoming viral genomes. *Viruses.* 2016;8(10):1–17.
 376. Seeler J-S, Marchio A, Losson R, Desterro JMP, Hay RT, Chambon P, et al. Common Properties of Nuclear Body Protein SP100 and TIF1 α Chromatin Factor: Role of SUMO Modification. *Mol Cell Biol.* 2001;21(10):3314–24.
 377. Voon HPJ, Wong LH. New players in heterochromatin silencing: Histone variant H3.3 and the ATRX/DAXX chaperone. *Nucleic Acids Res.* 2015;44(4):1496–501.
 378. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2012;196(6):801–10.
 379. Kroetz MB, Hochstrasser M. Identification of SUMO-interacting proteins by yeast two-hybrid analysis. *Methods Mol Biol.* 2009;497:107–20.
 380. Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(1):45–50.
 381. Yang SH, Galanis A, Witty J, Sharrocks AD. An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J.* 2006;25(21):5083–93.
 382. Matic I, Schimmel J, Hendriks IA, van Santen MA, van de Rijke F, van Dam H, et al. Site-Specific Identification of SUMO-2 Targets in Cells Reveals an Inverted SUMOylation Motif and a Hydrophobic Cluster SUMOylation Motif. *Mol Cell.* 2010;39(4):641–52.

383. Hay RT. SUMO: A history of modification. *Mol Cell*. 2005;18(1):1–12.
384. Lumpkin RJ, Gu H, Zhu Y, Leonard M, Ahmad AS, Clauser KR, et al. Site-specific identification and quantitation of endogenous SUMO modifications under native conditions. *Nat Commun*. 2017;8(1).
385. Xu G, Paige JS, Jaffrey SR. Global analysis of lysine ubiquitination by ubiquitin remnant immunoaffinity profiling. *Nat Biotechnol*. 2010;28(8):868–73.
386. Cho NW, Dilley RL, Lampson MA, Greenberg RA. Interchromosomal homology searches drive directional ALT telomere movement and synapsis. *Cell*. 2014;159(1):108–21.
387. Verma P, Dilley RL, Zhang T, Gyparaki MT, Li Y, Greenberg RA. RAD52 and SLX4 act nonepistatically to ensure telomere stability during alternative telomere lengthening. *Genes Dev*. 2019;33(3–4):221–35.
388. Slatter TL, Tan X, Yuen YC, Gunningham S, Ma SS, Daly E, et al. The alternative lengthening of telomeres pathway may operate in non-neoplastic human cells. *J Pathol*. 2012;226(3):509–18.
389. Gravel A, Gosselin J, Flamand L. Human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein colocalizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem*. 2002;277(22):19679–87.
390. Atanasiu C, Deng Z, Wiedmer A, Norseen J, Lieberman PM. ORC binding to TRF2 stimulates OriP replication. *EMBO Rep*. 2006;7(7):716–21.
391. Bradshaw PS. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet*. 2006;
392. Hayashi MT, Cesare AJ, Rivera T, Karlseder J. Cell death during crisis is mediated by mitotic telomere deprotection. *Nature*. 2015;522(7557):492–6.
393. Tomoiu A, Gravel A, Tanguay RM, Flamand L. Functional Interaction between Human Herpesvirus 6 Immediate-Early 2 Protein and Ubiquitin-Conjugating Enzyme 9 in the Absence of Sumoylation. *J Virol*. 2006;80(20):10218–28.
394. Hou YY, Toh MT, Wang X. NBS1 deficiency promotes genome instability by affecting DNA damage signaling pathway and impairing telomere integrity. *Cell Biochem Funct*. 2012;30(3):233–42.
395. Bai Y, Murnane JP. Telomere Instability in a Human Tumor Cell Line Expressing NBS1 with Mutations at Sites Phosphorylated by ATM. *Mol Cancer Res*. 2003;1(14):1058–69.
396. Lamarche BJ, Orazio NI, Weitzman MD. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett*. 2010;584(17):3682–95.
397. Kaufer BB, Jarosinski KW, Osterrieder N. Herpesvirus telomeric repeats facilitate genomic integration into host telomeres and mobilization of viral DNA during reactivation. *J Exp Med*. 2011;208(3):605–15.
398. Darren J, Wight J, Sanyal A, Kaufer B. Viral Proteins U41 and U70 of Human Herpesvirus 6A Are Dispensable for Telomere Integration. 2018;
399. Creighton, M, Cheng, A, Welstead, G, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21931–6.
400. D’Cunha J, Knight E, Haas AL, Truitt RL, Borden EC. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(1):211–5.
401. Kreilmeier T, Mejri D, Hauck M, Kleiter M, Holzmann K. Telomere transcripts target telomerase in human cancer cells. *Genes (Basel)*. 2016;7(8).
402. Wang C, Zhao L, Lu S. Role of TERRA in the regulation of telomere length. *Int J Biol Sci*. 2015;11(3):316–23.
403. Iampietro M, Morissette G, Gravel A, Flamand L. Inhibition of Interleukin-2 Gene Expression by Human Herpesvirus 6B U54 Tegument Protein. *J Virol*. 2014;88(21):12452–63.
404. Gaccioli F, Lager S, de Goffau MC, Sovio U, Dopierala J, Gong S, et al. Fetal inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 predisposes the mother to pre-eclampsia. *Nat Microbiol*. 2020;5(7):901–8.
405. Chatzidimitriou D, Kirmizis D, Gavrilaki E, Chatzidimitriou M, Malisiovas N. Atherosclerosis and infection: Is the jury still not in? *Future Microbiol*. 2012;7(10):1217–30.
406. Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans. *Immunity*. 2013;38(6):1092–104.

407. Lau SY, Guild SJ, Barrett CJ, Chen Q, Mccowan L, Jordan V, et al. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol.* 2013;70(5):412–27.
408. Gravel A, Hall CB, Flamand L. Sequence analysis of transplacentally acquired human herpesvirus 6 DNA is consistent with transmission of a chromosomally integrated reactivated virus. *J Infect Dis.* 2013;207(10):1585–9.
409. Miura H, Kawamura Y, Kudo K, Ihira M, Ohye T, Kurahashi H, et al. Virological analysis of inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in three hematopoietic stem cell transplant patients. *Transpl Infect Dis.* 2015;17(5):728–31.
410. Politikos I, Mcmasters M, Bryke C, Avigan D, Boussiotis VA. Possible reactivation of chromosomally integrated human herpesvirus 6 after treatment with histone deacetylase inhibitor. 2018;2(12):1367–70.
411. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25(3):585–621.
412. Chang ACY, Chang ACH, Kirillova A, Sasagawa K, Su W, Weber G. Telomere shortening is a hallmark of genetic cardiomyopathies. 2018;(6):1–6.
413. Saliques S, Zeller M, Lorin J, Lorgis L, Teyssier JR, Cottin Y, et al. Telomere length and cardiovascular disease. *Arch Cardiovasc Dis.* 2010;103(8–9):454–9.
414. Jarrett R. IchiHHV-6 prevalence and disease associations in the generation scotland study. In: 9th International Conference on HHV-6 and HHV-7. Boston, MA, USA; 2015.
415. Das BB. A neonate with acute heart failure: Chromosomally integrated human herpesvirus 6-associated dilated cardiomyopathy. *J Pediatr.* 2015;167(1):188-192.e1.
416. Kühn U, Lassner D, Wallaschek N, Gross UM, Krueger GRF, Seeberg B, et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6 in heart failure: Prevalence and treatment. *Eur J Heart Fail.* 2015;17(1):9–19.
417. Nacheva EP, Ward KN, Brazma D, Virgili A, Howard J, Hoe NL, et al. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites. *J Med Virol.* 2008;80(11):1952–8.
418. Miura H, Kawamura Y, Ohye T, Hattori F, Kozawa K, Ihira M, et al. Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 Is a Risk Factor for Spontaneous Abortion. *J Infect Dis.* 2020;
419. Ward KN, Leong HN, Nacheva EP, Howard J, Atkinson CE, Davies NWS, et al. Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1571–4.
420. Inoue K, Miura H, Hoshino A, Kamiya T, Tanita K, Ohye T, et al. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in a patient with XIAP deficiency. *Transpl Infect Dis.* 2020;22(5).
421. Mouammine A, Gravel A, Dubuc I, Feroz Zada Y, Provost S, Busseuil D, et al. Rs73185306 C/T Is Not a Predisposing Risk Factor for Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6A/B. *J Infect Dis.* 2020;221(6):878–81.
422. Torelli G, Barozzi P, Marasca R, Cocconcelli P, Merelli E, Ceccherini-Nelli L, et al. Targeted integration of human herpesvirus 6 in the p arm of chromosome 17 of human peripheral blood mononuclear cells in vivo. *J Med Virol.* 1995;46(3):178–88.
423. Clark DA, Nacheva EP, Leong HN, Brazma D, Li YT, Tsao EHF, et al. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: Implications for laboratory diagnosis. *J Infect Dis.* 2006;193(7):912–6.

Annexe A - HHV-6A/B Integration and the Pathogenesis Associated with the Reactivation of Chromosomally Integrated HHV-6A/B



Review

HHV-6A/B Integration and the Pathogenesis Associated with the Reactivation of Chromosomally Integrated HHV-6A/B

Vanessa Collin¹ and Louis Flamand^{1,2,*}

¹ Division of Infectious and Immune Diseases, CHU de Quebec Research Center-Laval University, Québec, QC G1V 4G2, Canada; Vanessa.Collin.2@ulaval.ca

² Department of Microbiology, Infectious Disease and Immunology, Faculty of Medicine, Laval University, Québec, QC G1V 0A6, Canada

* Correspondence: Louis.Flamand@crchudequebec.ulaval.ca; Tel.: +418-525-4444 (ext. 46164)

Academic Editors: Paul Lieberman and Benedikt B. Kaufer

Received: 30 May 2017; Accepted: 22 June 2017; Published: 26 June 2017

Abstract: Unlike other human herpesviruses, human herpesvirus 6A and 6B (HHV-6A/B) infection can lead to integration of the viral genome in human chromosomes. When integration occurs in germinal cells, the integrated HHV-6A/B genome can be transmitted to 50% of descendants. Such individuals, carrying one copy of the HHV-6A/B genome in every cell, are referred to as having inherited chromosomally-integrated HHV-6A/B (iciHHV-6) and represent approximately 1% of the world's population. Interestingly, HHV-6A/B integrate their genomes in a specific region of the chromosomes known as telomeres. Telomeres are located at chromosomes' ends and play essential roles in chromosomal stability and the long-term proliferative potential of cells. Considering that the integrated HHV-6A/B genome is mostly intact without any gross rearrangements or deletions, integration is likely used for viral maintenance into host cells. Knowing the roles played by telomeres in cellular homeostasis, viral integration in such structure is not likely to be without consequences. At present, the mechanisms and factors involved in HHV-6A/B integration remain poorly defined. In this review, we detail the potential biological and medical impacts of HHV-6A/B integration as well as the possible chromosomal integration and viral excision processes.

Keywords: inherited chromosomally-integrated HHV-6A/B; telomere; integration; human herpesvirus 6A/B; reactivation

1. Introduction

The human herpesvirus family is divided into three subfamilies: these include the betaherpesviruses, among which are the human herpesvirus 6A, 6B, and 7, and the cytomegalovirus (HHV-6A/B, 7 and CMV). The discovery of HHV-6A dates to 1986, while that of HHV-6B was first reported in 1988 [1–3]. In 2012, The Committee on Viruses Taxonomy recognized that two distinct HHV-6 existed and named them HHV-6A and HHV-6B [4]. Both viruses share the same architecture, share 90% homology in their nucleic acid sequences and have a tropism for T CD4+ lymphocytes. On the other hand, they exhibit epidemiological, biological and immunological differences [5–8]. HHV-6B is a ubiquitous virus that infects nearly 90% of the world's population in the first two years of life and is the etiologic agent of exanthema subitum [9]. Infection by HHV-6B is characterized by fevers, skin rashes, respiratory distress, and epileptic seizures [9,10]. On the other hand, HHV-6A infections are less characterized, presumably because it is acquired later in life and since most of the population has already been infected with HHV-6B, cross reactive immunity likely controls, at least partially, HHV-6A primary infections resulting in subclinical symptoms.

Certain herpesviruses have developed the ability to integrate their genomes into host chromosomes. Among animal herpesviruses, the lymphotropic alphaherpesvirus Marek's disease virus (MDV) readily integrates its genome in the telomeric regions of chromosomes upon infection of chicken cells (reviewed in [11]). MDV integration, combined with expression of the *Meq* oncogene and *vTR*, a viral telomerase homolog, are associated with lymphoma development in chicken and represent an important agricultural problem causing important economic losses to the industry. Presumably MDV uses integration as a mean to achieve latency. Integration is a very efficient way to evade immune surveillance. By a yet to be fully understood mechanism, the integrated MDV can excise itself from the host genome and return to the lytic phase of its life cycle.

Among human herpesviruses, HHV-6A/B are somewhat unique in their ability to integrate their viral genomes into the telomeres of the host's chromosomes. In 1993, Luppi et al. published a case report of three individuals with a chromosomally integrated HHV-6 (ciHHV-6) [12]. The particularity of these individuals resides in the fact that all three had ciHHV-6 in most peripheral blood cells. The hypothesis that ciHHV-6 could be inherited was validated by Daibata et al. [13,14]. Extrapolation from several studies indicate that approximately 1% of the world's population (75 million people) has inherited chromosomally-integrated HHV-6A/B (iciHHV-6A/B). Depending on the regions sampled, the proportion of iciHHV-6A ranges from 10% to 40% [15,16]. How integration occurs and a better understanding of the impact of integration on cellular homeostasis represent research priorities. In this review, potential impacts of HHV-6A/B integration at the cellular and the host levels and the biology behind HHV-6A/B integration will be discussed.

2. Biological and Medical Consequences Associated with HHV-6A/B Integration

One important biological aspect associated with HHV-6A/B integration is that viral integration can occur in germ cells. When fertilization occurs with a gamete containing ciHHV-6/B, this leads to individuals carrying one (or more) integrated HHV-6A/B copy in every somatic cell. Although the integration of a 160 kilobase pair (kbp) viral genome into telomeres might compromise the chromosomal integrity within cells, consequences are poorly understood due to the lack of clear-cut clinical associations. Pellet et al. gathered results from multiple independent studies and reported that iciHHV-6A/B was more prevalent in diseased individuals compared to healthy subjects [17]. The potential impacts of iciHHV-6A/B are listed below.

2.1. False Diagnostic of Active HH-6A/B Infection

One important problem associated with iciHHV-6A/B is the false diagnosis of active HHV-6A/B infections. For most herpesviruses, detection of viral DNA in biological samples is associated with ongoing active infection. In a subject with iciHHV-6A/B, considering that all cells carry a copy of HHV-6A/B, the viral load, especially when assaying whole blood, will be high and most often not be associated with active infections. During an active infection, the number of HHV-6A/B copies per milliliter of blood is generally lower than for iciHHV-6+ subjects. Viral loads associated with active HHV-6A/B infections typically vary between 10^3 and 10^4 HHV-6A/B copies/mL. In contrast, the iciHHV-6A/B DNA content is approximately $1-2 \times 10^6$ copies/mL [18,19]. Thus, when a high viral load is detected, a second assay (e.g., quantitative PCR of HHV-6A/B copies on hair follicles) to confirm or rule out iciHHV-6A/B should be performed. If negative for iciHHV-6A/B, the patient should be treated with antivirals. The fact that some patients are treated with antiviral drugs in the absence of an actual viral infection can be problematic, especially in vulnerable patients such as those that underwent hematopoietic stem cell transplantation. For this reason, it is very important to differentiate between active HHV-6A/B infection and iciHHV-6A/B.

2.2. iciHHV-6 and Immunodeficiency

Endo et al. reported in vivo reactivation of iciHHV-6A in a boy afflicted with severe combined immunodeficiency linked to X (SCID-X). Integrated HHV-6A reactivation led to the production of infectious virions that caused disease [20]. Fortunately, the boy was successfully treated with

antivirals and recovered. This is the first study to provide convincing evidence that, under profound immunosuppression, reactivation of iciHHV-6A/B can occur and cause disease.

2.3. Disease and Chromosome Associations

Pathologies associated with iciHHV-6A/B are still poorly understood. Although HHV-6A/B integrate in telomeres, the integration can occur in different chromosomes and for this reason, the pathologies associated with this condition are likely to vary greatly. iciHHV-6A/B was observed in chromosomes 9q, 10q, 13q, 17p, 18q, 19q and 22q [13,14,21,22]. For instance, chromosome 17 (C17), which appears to be a hotspot for HHV-6A/B integration, is associated with multiple genetic diseases. C17 codes for genes such as *TP53*, *BRCA1*, and *RDM1* that are responsible for DNA damage responses and the cell cycle arrest during cell damage. Moreover, loss of the short arm of C17, including telomeric regions, is often associated with rare diseases such as Miller–Dieker Syndrome. Hence, knowing that specific chromosomes are prone to mutations, HHV-6A/B's integration in such chromosomes could be a source for additional chromosomal instability.

2.4. iciHHV-6 and Telomeres Length

Telomeres are the main protectors of chromosomes and it is expected that a viral insertion at this site could compromise their integrity. In sperm cells, the telomere length of the chromosome carrying iciHHV-6A/B is as long if not longer than that of other chromosomes. In contrast, in somatic cells, the chromosome carrying iciHHV-6A/B is often the shortest [21]. Considering that the telomere erosion rate of chromosomes is similar (independent of iciHHV-6A/B), the reason why the telomere of the chromosome with iciHHV-6A/B is often the shortest remains unclear. One possible explanation is that HHV-6A/B integration might alter transcription of subtelomeric genes such as telomere repeat-encoding RNA (TERRA). In fact, it is known that alteration in TERRA transcription can contribute to telomeres shortening [23–25]. The long-term consequence of a shortened telomere could cause premature senescence or cell apoptosis when numerous cell divisions are required.

2.5. iciHHV-6 and Heart Disease

Recently, it was reported that iciHHV-6+ individuals have increased risks of developing heart disease than iciHHV-6- individuals. In fact, Gravel et al. carried out a study of 20,000 Quebecers among which 113 are iciHHV-6+ (57% HHV-6B and 43% HHV-6A). By comparing 50 chronic diseases, the results suggest that iciHHV-6+ individuals are 3.3× more at risk of developing angina pectoris [15]. In 2015, Das et al. published a case report in which a neonate was hospitalized due to acute heart failures (HF) [26]. After carrying out multiple tests in relation to HF, such as viral loads of CVM and EBV, every test came out negative. Interestingly, the only positive test was for the presence of HHV-6 DNA with one copy/cell, indicative of iciHHV-6. Unfortunately, the neonate died after 16 days of hospitalization but this case raises the possibility of linking iciHHV-6 and cardiomyopathy (DCM). Finally, HHV-6 presence was detected in myocardium biopsies of patients with myocarditis. HHV-6 transcripts and viral envelope proteins were detected in the same cells, indicating the presence of an active infection. When treated with ganciclovir, which eliminated the presence of active HHV-6 virus, the patient's myocarditis greatly improved [27]. Overall, whether the integration itself plays a role in heart disease remains to be clarified but several studies suggest a role for HHV-6 in heart diseases. There is an outgrowth body of literature linking telomere length with heart disease, in which the telomeres are shorter [28,29]. It can be hypothesized that the shortening of telomeres could be associated with susceptibility to heart disease and, by this very fact, the integration of HHV-6 might accelerate the onset of heart disease development.

2.6. Other Associated Impacts of HHV-6A/B Integration

Since iciHHV-6 individuals carry a viral copy in every cell, all cells are susceptible to express, at some point in time, viral antigens. Considering that everyone is immune to HHV-6B, detection of these proteins would cause tissue damage. Such immune attacks occurring over decades may lead to diseases

analogous to autoimmune disease. Moreover, when endothelial cells express HHV-6A/B antigens, cell destruction could lead to blood vessel damages that over time develop into chronic inflammation, plaque formation and stenosis of blood vessels. Studies suggesting spontaneous gene expression in cells isolated from chromosomally integrated HHV-6 do exist. Strenger et al. reported that freshly-isolated leukocytes from iciHHV-6+ individuals spontaneously express HHV-6 mRNA and proteins [30]. Several studies have also documented spontaneous or chemically-induced HHV-6 mRNA expression in cells isolated from iciHHV-6+ individuals [13,18,21]. Considering that spontaneous expression of HHV-6 antigens in iciHHV-6+ subjects can occur in every cell (theoretically), iciHHV-6+ individuals are expected to have a higher HHV-6 antigenic burden than iciHHV-6- subjects. In support, recent work by Strenger et al. suggests that iciHHV-6+ individuals have a higher frequency of circulating HHV-6-specific T cell relative to iciHHV-6- subjects [31]. Considering that another group failed to reach similar conclusions [32], more studies, including larger number of iciHHV-6+ subjects analyzed, are needed before firm conclusions can be drawn. Interestingly, recent work by Hill et al. indicates that acute graft versus host disease (aGVHD) grades 2–4 were more frequent when recipients or donors had iciHHV-6 [33]. Whether expression of HHV-6 antigens is a trigger for aGVHD in hematopoietic stem cell transplant recipients warrants investigation.

3. HHV-6's Home, the Telomeres

In vertebrates, each chromosome possesses several kbp of non-coding hexanucleotides (TTAGGG)_n that terminates with a single-stranded G rich 3' overhang of 30–500 nucleotides [34,35]. Telomeres play two major roles in protecting the chromosomes. First, they prevent the loss of genetic information. During DNA replication, the DNA polymerase is unable to copy the end of the lagging strand, which causes end replication problem. Consequently, at each cell division, telomeres are shortened by 50–100 nucleotides. When the number of hexameric repeats falls below 13, cells stop proliferating and undergo senescence or apoptosis [36,37]. Hence, in the absence of telomere elongation mechanisms, each cell has a predetermined number of cell divisions that is influenced by the length of the telomeric repeats. Second, telomeres protect chromosomes against the DNA damage response (DDR), DNA recombination and DNA end joining that causes chromosomes instability [38,39]. Protection against such events is realized when the single-stranded 3' overhang of telomeres is buried in the double stranded telomeric region to form a telomeric loop (t-loop) [40,41]. This t-loop is made and maintained by the shelterin complex that acts as the guardians of the telomeres.

3.1. Telomeres Replication and Transcription

Telomeres are synthesized and elongated in stem cells by the telomerase complex [42]. Telomerase is composed of a multi subunits complex such as telomerase reverse transcriptase (TERT), the telomerase RNA component template (TERC), DKC1, NoP10, Reptin, Pontin and NHP2. The replication of telomeres is made by telomerase TERT that uses TERC as a telomere template to elongate the latter [43,44]. When cells are differentiated, telomerase activity is barely detectable because of the silencing of TERT. In contrast, TERT expression is reactivated in 80–90% of cancer cells [45]. Moreover, it has long been thought that telomeres were transcriptionally silent until the discovery of TERRA non-coding RNA whose transcription is initiated in the sub-telomeric region and extends within the telomeric sequences. TERRA has been shown to stabilize shelterin proteins and promote heterochromatin state by interacting with telomeric repeat binding factors 1 and 2 (TRF1 and TRF2) [46]. In addition, TERRA acts as a long non-coding RNA to regulate telomerase activity [47].

3.2. Guardians of Telomeres

The shelterin complex is composed of six proteins: TRF1 and TRF2, protection of telomere 1 (POT1), telomere protection protein 1 (TPP1), TRF interacting nuclear protein 2 (TIN2) and repressor activation protein 1 (RAP1) [48]. Heterodimers of TRF1 and TRF2 bind to the double stranded telomeric DNA via their myb domain. TRF1 is involved in telomere replication and prevents blockage of the replication fork. The role of TRF2 is to protect telomeres against the DNA repair mechanisms by

inhibiting the Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) pathway. When ATM is not inhibited, the double stranded DNA break (DSDB) repair mechanisms are activated [38,49–51]. Ultimately, a loss of TRF2 leads to telomere recombination or end to end chromosomes fusions, and such consequences can lead to cell apoptosis or neoplastic cells [52,53]. The single stranded DNA (ssDNA) of telomeres is bound by POT1, a protein that inhibits the Ataxia-telangiectasia and Rad3 related (ATR) pathway that is responsible for single stranded DNA break (SSDB) damage repair mechanism activation. Moreover, TRF2, together with POT1 also inhibits homologous recombination (HR) [42]. The bond between the rest of the complex and POT1 is made by TPP1, and TIN2, which stabilize the whole complex. Finally, RAP1 binds TRF2, which prevents HR and non-homologous end joining (NHEJ) [52]. Thus, TRF2 is the pivotal protein for maintaining the integrity of telomeres and chromosomes.

4. Herpesviruses Infection and Latency

4.1. Viral Cycle of Herpesviruses

During herpesvirus infection, a series of sequential events occurs. First, the virus binds to cell surface receptors present on the host cell. Following fusion of viral envelope with the cell membrane, the viral capsid is released in the cytoplasm and degraded, liberating the viral DNA that is transported into the nucleus [54]. Once in the nucleus, the viral DNA circularizes and expresses immediate early genes (IE). Among many functions, the IE proteins activate the expression of the early genes, encoding proteins associated with viral DNA replication. Once DNA replication has occurred, expression of late genes is turned on. For the most part, late genes encode structural proteins required for the assembly of new virions. Once assembled, progeny viruses are released [55,56]. However, not all herpesvirus infections lead to a productive infection and release of infectious virions. In some cases, the virus enters a cell and enters a state of latency.

4.2. Herpesviruses Latency

The classical mode of latency is by maintaining the viral genome as episomes, tethered or not, to the human chromosomes. For example, the EBNA-1 protein of Epstein Barr Virus (EBV) and LANA protein of HHV-8 tether the viral episomes to the host chromatin ensuring that upon cell division, daughter cells will contain viral episomes [57,58]. Generally, infection of permissive cells (such as T lymphocytes) by HHV-6A/B results in a lytic infection with no latent phase detected. In fact, in vitro models of latency where the HHV-6A/B genome is maintained as episomes have yet to be identified or studied in sufficient detail. Using HHV-6-infected primary human macrophages, Kondo et al. reported latent HHV-6 infection, with the possibility of reactivating the virus using phorbol ester stimulation [59]. In latently-infected cells, large viral transcripts initiating upstream and extending beyond the major IE locus were detected [60, 61]. Unfortunately, the state (episome, linear, and integrated) of the HHV-6 genomes in these cells was not reported. In contrast to permissive cells, when HHV-6A/B infects semi- or non-permissive cells with little or no DNA replication, the outcome is either an abortive infection or chromosomal integration [62]. The latency-associated HHV-6 proteins are also unknown. Transcripts coding for the HHV-6A/B U94 protein were reported to be expressed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy subjects and hypothesized that U94 might play a role in latency [63]. This is supported by the fact that U94 expression represses HHV-6A/B DNA replication and therefore might favor the establishment of latency [64]. U94 is a protein that shares 24% homology with the REP68/78 integrase of the Adeno-associated virus type 2 (AAV-2), a protein responsible for AAV-2 chromosomal integration [65]. It was shown that U94 can bind DNA and complement the activity of REP68/78. For this reason, it was surmised that U94 might play a role in the establishment of latency and/or chromosomal integration [64,66]. Furthermore, because of its activities, it was thought that U94 was implicated in HHV-6A/B integration. However, Wallaschek et al. showed that a U94 deletion mutant of HHV-6A was as proficient as WT HHV-6A at integrating human chromosomes [67]. Hence, more investigation is required to identify HHV-6A/B models of latency, associated proteins and nature of the latent genome.

5. HHV-6A/B Genomes and Their Integrated Forms

5.1. Genome

During infection, the HHV-6A/B genome is present in three different forms. The first form of HHV-6A/B's genome is linear, which is present in the virus and the cell upon infection. Once in the nucleus, the viral genome circularizes to form an episome. The episome is used as a template for viral replication during which viral concatemers are formed. HHV-6A/B genome is approximately 160 kbp in length with a unique region (U) containing more than 100 open reading frames (ORFs) and encoding more than 97 proteins expressed sequentially throughout the lytic cycle of the virus [5,68,69]. The extreme end of the viral genome is flanked by two identical directly repeated (DR_L and DR_R) regions of 8–9 kbp. The 5' end of the DR contains a *pac1* sequence (56 bp) while the 3' end contains *pac2* sequence (80 bp), responsible for the cleavage and packaging of the viral genome. Adjacent to *pac2* are 15–180 reiterations of TTAGGG telomeric repeats (TMR), identical to human telomeric sequences. Adjacent to *pac1* are imperfect TMR (impTMR) (Figure 1A) [68,70,71].

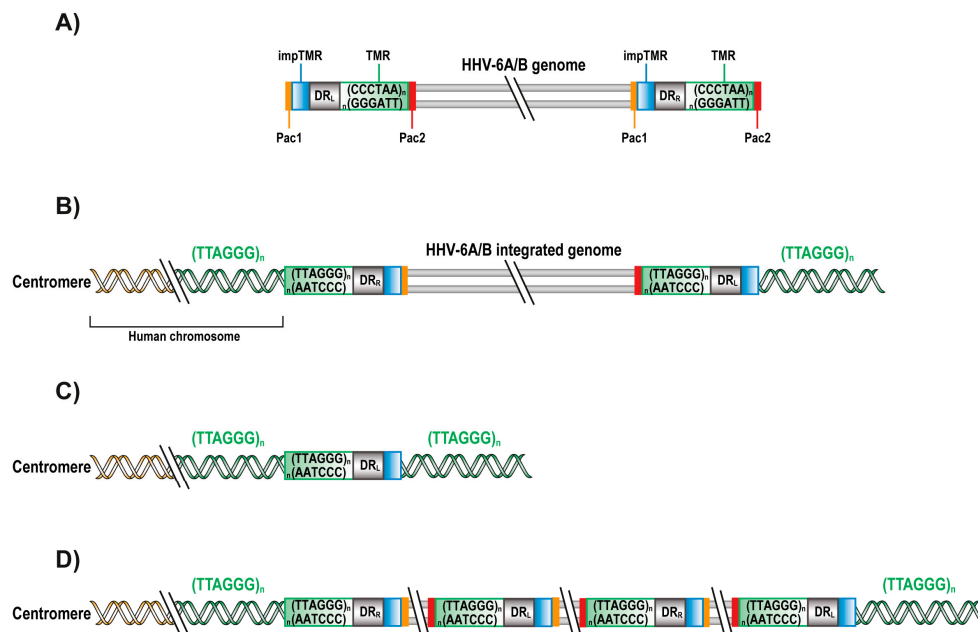


Figure 1. HHV-6A/B genomes and their integrated forms. Schematic representation of human herpesvirus 6A and 6B (HHV-6A/B) genomes and the reported integrated forms. (A) The unique region (U) of the 160 kbp HHV-6A/B genomes is flanked by identical direct repeats (DR_L and DR_R) of 8–9 kbp. The DRs possess a *pac1* (yellow) and *pac2* (red) sequences, adjacent to imperfect telomeric repeats impTMR (blue) and TMR (green) sequences, respectively. The genome is not drawn to scale; (B) Chromosomally integrated HHV-6A/B (ciHHV-6A/B) genome (with loss of *pac2* in DR_R and *pac1* in DR_L) with elongated telomeres at the DR_L; (C) Single integrated DR_L with elongated telomere; (D) Integrated HHV-6A/B concatemers. Genomes are not drawn to scale.

5.2. Integrated HHV-6A/B

For most herpesviruses, integration into host chromosomes is an unusual event. In some cases, it was observed that in the presence of DNA breaks induced by UV radiation, human herpes simplex virus type 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) can integrate into chromosomes. However, the integrated HSV-1 and HSV-2 genome were fragmented and mutated, not able to generate new virions [72]. In contrast to HSV-1 and HSV-2, HHV-6A/B integrated genomes remain largely intact with their ORFs conserved. Analysis of cells with ciHHV-6A/B indicates that these viruses are mostly integrated into telomeres with DR_R

fused to the chromosome (Figure 1B) [21,73]. In fact, HHV-6-A/B DR_R are adjacent to the subtelomeric portion of the human telomere with loss of the *pac2* sequence at DR_R and loss of the *pac1* sequence at DR_L. Such a structure is compatible with integration occurring by HR events. In addition, at the DR_L end of the integrated genome are impTMR that appear to serve as a template for telomere elongation by the telomerase complex or alternative lengthening mechanisms [74]. In occasional cases, integrated HHV-6A/B consists of a single DR fused to the chromosome, a structure that is compatible with integration occurring by HR events initiated at DR_L (Figure 1C). Alternatively, individuals containing multiple contiguous HHV-6A/B copies also exist. Such structure can be explained by integration of a viral concatemer (Figure 1D). By assessing the number of DR present, one can determine the number complete HHV-6A/B's genomes that is/are integrated.

5.3. Excision of Integrated HHV-6

To ensure their long-term maintenance in any given population, integrated viruses must be able to re-initiate a lytic cycle and generate progeny virions. A previous study has reported the presence of an extrachromosomal circular HHV-6 genome with a single DR in cells from an iciHHV-6 subject [21]. This led to the conclusion that the viral genome can be excised from telomeres by one or two t-loop formation and recombination. To explain the presence of a single DR in the excised viral genome, one hypothesis is that excision occurs by a two-step t-loop formation (Figure 2A). At each cell cycle, telomeres are shortened and reform a t-loop to protect the chromosomes. First, the telomere sequence at the end of the DR_L could form a t-loop by invasion of the TMR within DR_L itself. This t-loop formation would result in a t-loop excision, forming a telomeric circle with a single DR and an intermediate form of the HHV-6A/B integrated chromosome (Figure 2B). The intermediate form would lack the DR_L but still possess the TMR repeats capable of forming a second t-loop, recombine and excise in the TMR of the DR_R. This first possibility could also explain the presence of a single integrated DR if only one t-loop excision is made. Another possible excision mechanism could be a t-loop formation, recombination and t-loop excision of the DR_L in the DR_R directly (Figure 1B). The two possible mechanisms result into a circular viral genome with a single DR that has one *pac1* and one *pac2* sequence (Figure 2C). Because ciHHV-6A/B can be excised from chromosomes and form viral episomes, this suggests that integration is possibly a mode of latency for these viruses.

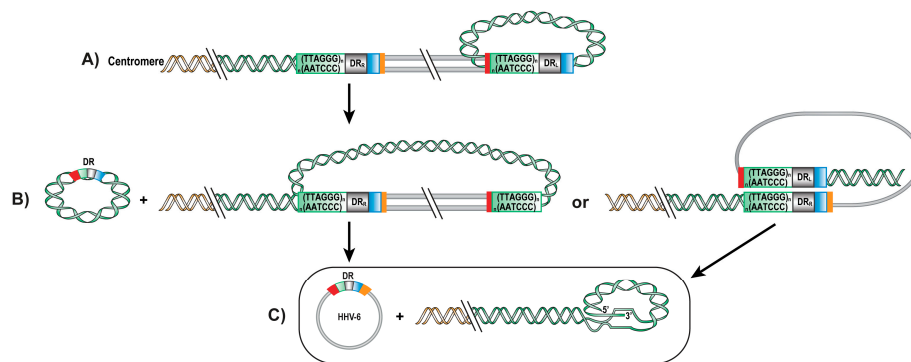


Figure 2. Possible mechanisms of HHV-6A/B genome excision from telomeres. Schematic representation of hypothetical processes of HHV-6A/B genome excision from telomeres. (A) Telomeric repeats form a t-loop in the TMR of HHV-6A/B DR_L, followed by recombination and excision, resulting into a first t-loop excision: a telomeric circle and a chromosomally integrated HHV-6A/B lacking a DR but still possessing TMR sequences. (B) A second t-loop formation is made by recombination of the TMR at the end of the genome into HHV-6A/B DR_R, resulting in a fully excised and circular HHV-6A/B genome containing a single DR with a single *pac1*, *pac2*, impTMR and TMR sequence. (C) Invasion of the telomeric repeats into the TMR of the DR_R, resulting into a HHV-6A/B free chromosome and a full viral genome with a complete DR.

6. How Does HHV-6A/B Integration Occurs?

Since HHV-6A/B both have TMRs and integrate into telomeres, it is presumed that these sequences play a role in viral integration. This hypothesis was confirmed by Wallascheck et al. that demonstrated that TMRs are important for HHV-6A/B telomeric integration [75]. However, the underlying mechanism of how HHV-6A/B integrates into chromosomes remains unknown. Sequence analysis of integrated HHV-6A/B genomes indicates that viral integration occurs very close to the subtelomeric region with few telomeric repeats between the viral genome and the chromosome [21,76]. Considering this, invasion of the viral TMR by the chromosome single-stranded 3' extremity appears unlikely (Figure 3A).

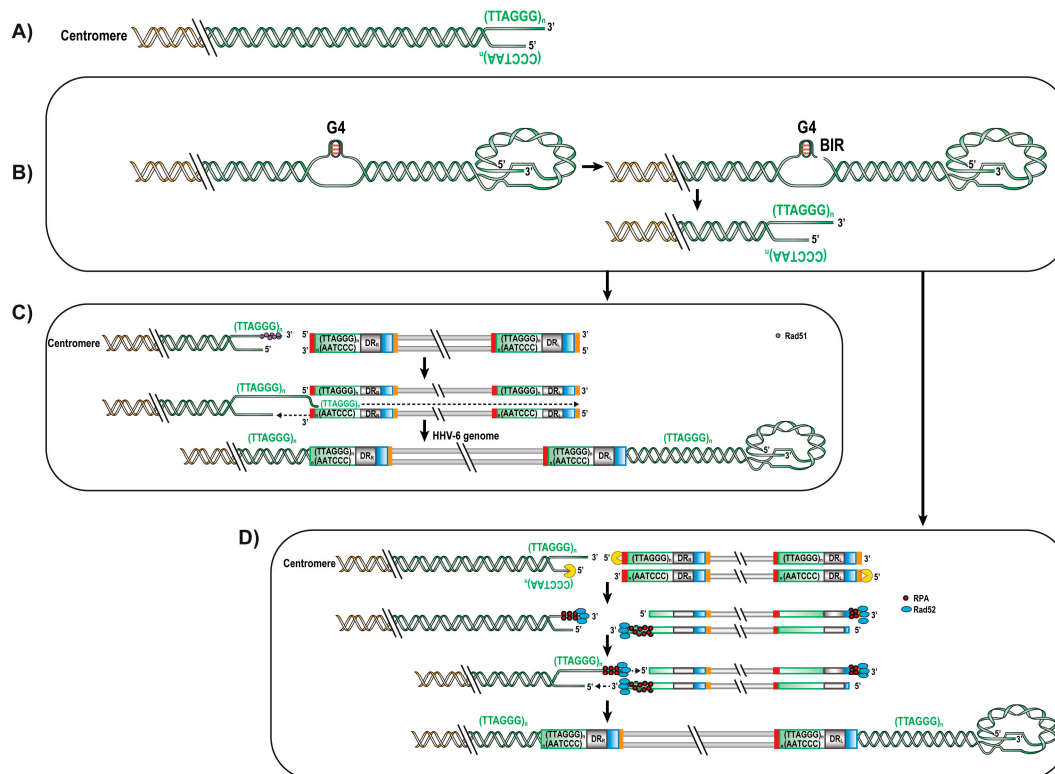


Figure 3. Possible mechanisms for HHV-6A/B integration. Schematic representation of HHV-6A/B chromosomal integration process. (A) Unfolding of the chromosome t-loop and invasion by the telomeric 3' overhang into HHV-6A/B's DR. This mechanism is unlikely to occur since all ciHHV-6A/B reported so far have lost most telomeric repeats. (B) Break induced replication (BIR) repair mechanism caused by G quadruplexes (G4) structure (or other blockage) in the lagging strand. (C) The free 3' strand is rescued by Rad51 protein that searches for proximal homologous sequences. If a HHV-6A/B genome is close to proximity, Rad51 invades the viral TMR, displacing one strand of the HHV-6A/B genome to allow the synthesis of the complementary strand. Upon cell divisions, the DR_L would lose *pac1* due to end replication problem and the *impTMR* would serve as telomeric template to elongate telomeres at the end of the genome. (D) Single stranded annealing (SSA) repair mechanism. Upon virus entry in the cell, DNA damage response is triggered, at the same time a break caused by a stalled replication fork at the human telomeres activate SSA. SSA activation leads to resection of both the viral and human DNA in a 5' to 3' direction to create complementary sequences. Meanwhile, the 3' strands of both genomes are protected by the replication protein A (RPA). Rad52 binds the RPA and searched for pairing in which *pac2* will be lost. Annealed sequences then lead to the copying of the viral genome. Genomes are not drawn to scale.

Homologous Recombination

Homologous recombination is a mechanism used by all cells in the human body to repair double stranded DNA breaks. Under normal conditions, cells experience an average of 50 breaks per cell cycle [77]. Interestingly, HR is also used by telomerase-deficient cells like certain cancer cells to extend their telomeres to become immortalized. This mechanism is called Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) [78,79]. As mentioned, telomeres must be able to prevent DNA damage responses to protect chromosomes. When a DNA break occurs, DNA damage response proteins such as H2AX, 53BP1, chK2, BRCA1 and p53 are recruited at the break [80]. ATM is then activated and recruits the MRN complex (Mre11, Rad50, NBS1) to the damaged sites. The accumulation of DNA damage response proteins leads to the recruitment of effector proteins such as Rad51, responsible for the 3' strand invasion of a homologous region to repair the break.

One possible scenario that could lead to HHV-6A/B integration is break-induced replication (BIR). During DNA replication, the cellular DNA polymerases can be stalled due to a variety of reasons including G quadruplex structures (G4). G4 are planar quaternary guanine rich secondary structures that can form after the unwinding of the DNA helix by DNA helicases [81–83]. G4 can block the replication fork and causes instability leading to DNA breaks that are generated to help repair this obstruction (Figure 3B). During replication of the telomere, it is the lagging strand-containing the TTAGGG motifs that can adopt G4 topologies and cause stalling of the replication fork. A break in the lagging strand generates a 3' overhang that in association with Rad51 will search for homologies in nearby DNA. If a HHV-6A/B genome is in proximity, invasion can take place in the viral TMR. Following invasion, one strand of the HHV-6A/B genome gets displaced to allow the synthesis of the complementary strand (Figure 3C). The structures of most integrated HHV-6A/B genomes suggest that invasion by the cellular telomeric DNA occurs in the DR_R's TMR [21,76,84]. In such orientation, the DR_L would be at the end of the chromosome. Upon cell division and DNA replication, there would be loss of *pac1* (due to the shortening of telomeres upon cell division) and the adjacent impTMR could serve as a template for the telomerase complex and telomere elongation, as previously reported [21,74]. On rare occasions, a single DR (without the rest of the genome) is detected suggesting that invasion can also occur in DR_L's TMR. Alternatively, such a structure could have arisen through partial excision of the viral genome as previously reported [21]. Interestingly, a recent report indicates that BRACO-19, a compound that binds and stabilizes G quadruplexes, affected the ability of HHV-6A to integrate into host chromosomes [62]. The exact mechanisms of BIR remain unknown but since BIR is a naturally-occurring mechanism, the presence of viral proteins may not be necessary except to bring the viral genome near the telomeres and/or DNA breaks.

A second mechanism that could lead to viral integration is the single stranded annealing (SSA) repair mechanism, an HR pathway that uses homologous ends to repair the breaks (Figure 3D) [85]. Upon entry of the virus into a cell, the presence of a viral linear genome is likely to trigger a DNA damage response. Activation of SSA would recruit MRN to the viral DNA, resecting the viral DNA at both extremities in a 5' to 3' direction. In doing so, the single-stranded TMR at the 3' extremity of DR_R would become complementary to the single-stranded DNA generated following the break at the stalled the replication fork (Figure 3B). The replication protein A (RPA) binds the single stranded sequences to protect them, Rad52 joins RPA and the complex searches for complementary pairing. During the pairing process, the *pac2* site is lost. Once the two strands are annealed, the viral genome is then copied. Integration through SSA would not allow for integration to occur via DR_L as the single-stranded 3' end would not complement the single-stranded DNA generated following the break at the stalled the replication fork.

7. Conclusions

Though reported 25 years ago, the study of HHV-6A/B integration remains understudied. With the development of HHV-6A/B integration systems [86] and genome editing technologies, scientists should be able to tease out in detail the mechanisms leading to viral integration. Considering a prevalence of approximately 1%, pinpointing the association between iciHHV-6A/B and diseases

is not trivial. This will require considerable effort, funding and access to large biobanks linked to detailed medical records. Scientists will likely need to share and pool their data to reach meaningful conclusions, especially for less-prevalent diseases. Furthermore, considering that appearance of a disease is likely to be influenced by the chromosome carrying the integrated HHV-6A/B as well of the sex of the individual, these variables should be taken into consideration during data analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lopez, C.; Pellett, P.; Stewart, J.; Goldsmith, C.; Sanderlin, K.; Black, J.; Warfield, D.; Feorino, P. Characteristics of human herpesvirus-6. *J. Infect. Dis.* **1988**, *157*, 1271–1273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Salahuddin, S.Z.; Ablashi, D.V.; Markham, P.D.; Josephs, S.F.; Sturzenegger, S.; Kaplan, M.; Halligan, G.; Biberfeld, P.; Wong-Staal, F.; Kramarsky, B.; et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* **1986**, *234*, 596–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ablashi, D.V.; Agut, H.; Berneman, Z.; Campadilli-Fiume, G.; Carrigan, D.; Ceccerini-Nelli, L.; Chandran, B.; Chou, S.; Collandre, H.; Cone, R.; et al. Human herpesvirus-6 strain groups: A nomenclature. *Arch. Virol.* **1993**, *129*, 363–366. [[CrossRef](#)]
4. Ablashi, D.; Agut, H.; Alvarez-Lafuente, R.; Clark, D.A.; Dewhurst, S.; DiLuca, D.; Flamand, L.; Frenkel, N.; Gallo, R.; Gompels, U.A.; et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 863–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Isegawa, Y.; Mukai, T.; Nakano, K.; Kagawa, M.; Chen, J.; Mori, Y.; Sunagawa, T.; Kawanishi, K.; Sashihara, J.; Hata, A.; et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J. Virol.* **1999**, *73*, 8053–8063. [[PubMed](#)]
6. Ablashi, D.V.; Balachandran, N.; Josephs, S.F.; Hung, C.L.; Krueger, G.R.; Kramarsky, B.; Salahuddin, S.Z.; Gallo, R.C. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* **1991**, *184*, 545–552. [[CrossRef](#)]
7. Jaworska, J.; Gravel, A.; Flamand, L. Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 8369–8374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Wyatt, L.S.; Balachandran, N.; Frenkel, N. Variations in the replication and antigenic properties of human herpesvirus 6 strains. *J. Infect. Dis.* **1990**, *162*, 852–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Yamanishi, K.; Okuno, T.; Shiraki, K.; Takahashi, M.; Kondo, T.; Asano, Y.; Kurata, T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* **1988**, *1*, 1065–1067. [[CrossRef](#)]
10. Zerr, D.M.; Meier, A.S.; Selke, S.S.; Frenkel, L.M.; Huang, M.L.; Wald, A.; Rhoads, M.P.; Nguy, L.; Bornemann, R.; Morrow, R.A.; et al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 768–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Osterrieder, N.; Wallaschek, N.; Kaufer, B.B. Herpesvirus genome integration into telomeric repeats of host cell chromosomes. *Ann. Rev. Virol.* **2014**, *1*, 215–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Luppi, M.; Marasca, R.; Barozzi, P.; Ferrari, S.; Ceccherini-Nelli, L.; Batoni, G.; Merelli, E.; Torelli, G. Three cases of human herpesvirus-6 latent infection: Integration of viral genome in peripheral blood mononuclear cell DNA. *J. Med. Virol.* **1993**, *40*, 44–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Daibata, M.; Taguchi, T.; Taguchi, H.; Miyoshi, I. Integration of human herpesvirus 6 in a Burkitt's lymphoma cell line. *Br. J. Haematol.* **1998**, *102*, 1307–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Tanaka-Taya, K.; Sashihara, J.; Kurahashi, H.; Amo, K.; Miyagawa, H.; Kondo, K.; Okada, S.; Yamanishi, K. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. *J. Med. Virol.* **2004**, *73*, 465–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gravel, A.; Dubuc, I.; Morissette, G.; Sedlak, R.H.; Jerome, K.R.; Flamand, L. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 as a predisposing risk factor for the development of angina pectoris. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 8058–8063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Jarrett, R. IciHHV-6 prevalence and disease associations in the generation scotland study. In Proceedings of the 9th International Conference on HHV-6 and HHV-7, Boston, MA, USA, 9–11 November 2015.

17. Pellett, P.E.; Ablashi, D.V.; Ambros, P.F.; Agut, H.; Caserta, M.T.; Descamps, V.; Flamand, L.; Gautheret-Dejean, A.; Hall, C.B.; Kamble, R.T.; et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: Questions and answers. *Rev. Med. Virol.* **2012**, *22*, 144–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Clark, D.A.; Nacheva, E.P.; Leong, H.N.; Brazma, D.; Li, Y.T.; Tsao, E.H.; Buyck, H.C.; Atkinson, C.E.; Lawson, H.M.; Potter, M.N.; et al. Transmission of integrated human herpesvirus 6 through stem cell transplantation: Implications for laboratory diagnosis. *J. Infect. Dis.* **2006**, *193*, 912–916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sedlak, R.H.; Cook, L.; Huang, M.L.; Magaret, A.; Zerr, D.M.; Boeckh, M.; Jerome, K.R. Identification of chromosomally integrated human herpesvirus 6 by droplet digital PCR. *Clin. Chem.* **2014**, *60*, 765–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Endo, A.; Watanabe, K.; Ohye, T.; Suzuki, K.; Matsubara, T.; Shimizu, N.; Kurahashi, H.; Yoshikawa, T.; Katano, H.; Inoue, N.; et al. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated human herpesvirus 6A in a patient with x-linked severe combined immunodeficiency. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59*, 545–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Huang, Y.; Hidalgo-Bravo, A.; Zhang, E.; Cotton, V.E.; Mendez-Bermudez, A.; Wig, G.; Medina-Calzada, Z.; Neumann, R.; Jeffreys, A.J.; Winney, B.; et al. Human telomeres that carry an integrated copy of human herpesvirus 6 are often short and unstable, facilitating release of the viral genome from the chromosome. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 315–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Nacheva, E.P.; Ward, K.N.; Brazma, D.; Virgili, A.; Howard, J.; Leong, H.N.; Clark, D.A. Human herpesvirus 6 integrates within telomeric regions as evidenced by five different chromosomal sites. *J. Med. Virol.* **2008**, *80*, 1952–1958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kreilmeier, T.; Mejri, D.; Hauck, M.; Kleiter, M.; Holzmann, K. Telomere transcripts target telomerase in human cancer cells. *Genes* **2016**, *7*, E46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Reig-Viader, R.; Garcia-Caldés, M.; Ruiz-Herrera, A. Telomere homeostasis in mammalian germ cells: A review. *Chromosoma* **2016**, *125*, 337–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, C.; Zhao, L.; Lu, S. Role of terra in the regulation of telomere length. *Int. J. Biol. Sci.* **2015**, *11*, 316–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Das, B.B. A neonate with acute heart failure: Chromosomally integrated human herpesvirus 6-associated dilated cardiomyopathy. *J. Pediatr.* **2015**, *167*, 188–192.e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kuhl, U.; Lassner, D.; Wallaschek, N.; Gross, U.M.; Krueger, G.R.; Seeberg, B.; Kaufer, B.B.; Escher, F.; Poller, W.; Schultheiss, H.P. Chromosomally integrated human herpesvirus 6 in heart failure: Prevalence and treatment. *Eur. J. Heart Fail.* **2015**, *17*, 9–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Butt, H.Z.; Atturu, G.; London, N.J.; Sayers, R.D.; Bown, M.J. Telomere length dynamics in vascular disease: A review. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2010**, *40*, 17–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Saliques, S.; Zeller, M.; Lorin, J.; Lorgis, L.; Teyssier, J.R.; Cottin, Y.; Rochette, L.; Vergely, C. Telomere length and cardiovascular disease. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **2010**, *103*, 454–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Strenger, V.; Caselli, E.; Lautenschlager, I.; Schwinger, W.; Aberle, S.W.; Loginov, R.; Gentili, V.; Nacheva, E.; DiLuca, D.; Urban, C. Detection of HHV-6-specific mRNA and antigens in PBMCs of individuals with chromosomally integrated HHV-6 (ciHHV-6). *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 1027–1032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Strenger, V.; Kayser, S.; Witte, K.E.; Lassner, D.; Schwinger, W.; Jahn, G.; Urban, C.; Feuchtinger, T. Individuals with inherited chromosomally integrated human herpes virus 6 (ciHHV-6) have functionally active HHV-6 specific T-cell immunity. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Barozzi, P.; Riva, G.; Vallerini, D.; Quadrelli, C.; Lagreca, I.; Eccheli, R.; Forghieri, F.; Coluccio, V.; Maccaferri, M.; Paolini, A.; et al. Circulating functional t cells specific to human herpes virus 6 (HHV6) antigens in individuals with chromosomally integrated HHV6. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 893–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hill, J.A.; Magaret, A.S.; Hall-Sedlak, R.; Mikhaylova, A.; Huang, M.L.; Sandmaier, B.M.; Hansen, J.A.; Jerome, K.R.; Zerr, D.M.; Boeckh, M. Outcomes of hematopoietic cell transplantation using donors or recipients with inherited chromosomally integrated HHV-6. *Blood* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Makarov, V.L.; Hirose, Y.; Langmore, J.P. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a c strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **1997**, *88*, 657–666. [[CrossRef](#)]

35. Moyzis, R.K.; Buckingham, J.M.; Cram, L.S.; Dani, M.; Deaven, L.L.; Jones, M.D.; Meyne, J.; Ratliff, R.L.; Wu, J.R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6622–6626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Capper, R.; Britt-Compton, B.; Tankimanova, M.; Rowson, J.; Letsolo, B.; Man, S.; Haughton, M.; Baird, D.M. The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 2495–2508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Schmidt, J.C.; Cech, T.R. Human telomerase: Biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 1095–1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. De Lange, T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science* **2009**, *326*, 948–952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sfeir, A.; de Lange, T. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* **2012**, *336*, 593–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Griffith, J.D.; Comeau, L.; Rosenfield, S.; Stansel, R.M.; Bianchi, A.; Moss, H.; de Lange, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **1999**, *97*, 503–514. [[CrossRef](#)]
41. Tong, A.S.; Stern, J.L.; Sfeir, A.; Kartawinata, M.; de Lange, T.; Zhu, X.D.; Bryan, T.M. ATM and ATR signaling regulate the recruitment of human telomerase to telomeres. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 1633–1646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lazzarini-Denchi, E.; Sfeir, A. Stop pulling my strings—What telomeres taught us about the DNA damage response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 364–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sauerwald, A.; Sandin, S.; Cristofari, G.; Scheres, S.H.; Lingner, J.; Rhodes, D. Structure of active dimeric human telomerase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 454–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Vulliamy, T.; Beswick, R.; Kirwan, M.; Marrone, A.; Digweed, M.; Walne, A.; Dokal, I. Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome Dyskeratosis congenita. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 8073–8078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Venteicher, A.S.; Meng, Z.; Mason, P.J.; Veenstra, T.D.; Artandi, S.E. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* **2008**, *132*, 945–957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Deng, Z.; Norseen, J.; Wiedmer, A.; Riethman, H.; Lieberman, P.M. TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol. Cell* **2009**, *35*, 403–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Azzalin, C.M.; Reichenbach, P.; Khoriauli, L.; Giulotto, E.; Lingner, J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* **2007**, *318*, 798–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Palm, W.; de Lange, T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* **2008**, *42*, 301–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Arnoult, N.; Karlseder, J. Complex interactions between the DNA-damage response and mammalian telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 859–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Doksani, Y.; de Lange, T. The role of double-strand break repair pathways at functional and dysfunctional telomeres. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a016576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Okamoto, K.; Bartocci, C.; Ouzounov, I.; Diedrich, J.K.; Yates, J.R., 3rd; Denchi, E.L. A two-step mechanism for TRF2-mediated chromosome-end protection. *Nature* **2013**, *494*, 502–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Rai, R.; Zheng, H.; He, H.; Luo, Y.; Multani, A.; Carpenter, P.B.; Chang, S. The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. *EMBO J.* **2010**, *29*, 2598–2610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Van Steensel, B.; Smogorzewska, A.; de Lange, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **1998**, *92*, 401–413. [[CrossRef](#)]
54. Henaff, D.; Radtke, K.; Lippe, R. Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment. *Traffic* **2012**, *13*, 1443–1449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Deng, H.; Dewhurst, S. Functional identification and analysis of cis-acting sequences which mediate genome cleavage and packaging in human herpesvirus 6. *J. Virol.* **1998**, *72*, 320–329. [[PubMed](#)]
56. Gruffat, H.; Marchione, R.; Manet, E. Herpesvirus late gene expression: A viral-specific pre-initiation complex is key. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ballestas, M.E.; Chatiss, P.A.; Kaye, K.M. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* **1999**, *284*, 641–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Marechal, V.; Dehee, A.; Chikhi-Brachet, R.; Pilot, T.; Coppey-Moisan, M.; Nicolas, J.C. Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J. Virol.* **1999**, *73*, 4385–4392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Kondo, K.; Kondo, T.; Okuno, T.; Takahashi, M.; Yamanishi, K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J. Gen. Virol.* **1991**, *72 Pt 6*, 1401–1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Kondo, K.; Sashihara, J.; Shimada, K.; Takemoto, M.; Amo, K.; Miyagawa, H.; Yamanishi, K. Recognition of a novel stage of betaherpesvirus latency in human herpesvirus 6. *J. Virol.* **2003**, *77*, 2258–2264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kondo, K.; Shimada, K.; Sashihara, J.; Tanaka-Taya, K.; Yamanishi, K. Identification of human herpesvirus 6 latency-associated transcripts. *J. Virol.* **2002**, *76*, 4145–4151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Gilbert-Girard, S.; Gravel, A.; Artusi, S.; Richter, S.N.; Wallaschek, N.; Kaufer, B.B.; Flamand, L. Stabilization of telomere G-quadruplexes interferes with human herpesvirus 6A chromosomal integration. *J. Virol.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Rotola, A.; Ravaoli, T.; Gonelli, A.; Dewhurst, S.; Cassai, E.; Di Luca, D. U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13911–13916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Caselli, E.; Bracci, A.; Galvan, M.; Boni, M.; Rotola, A.; Bergamini, C.; Cermelli, C.; Dal Monte, P.; Gompels, U.A.; Cassai, E.; et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) U94/REP protein inhibits betaherpesvirus replication. *Virology* **2006**, *346*, 402–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Thomson, B.J.; Efstathiou, S.; Honess, R.W. Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 REP gene by human herpesvirus type-6. *Nature* **1991**, *351*, 78–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Trempe, F.; Gravel, A.; Dubuc, I.; Wallaschek, N.; Collin, V.; Gilbert-Girard, S.; Morissette, G.; Kaufer, B.B.; Flamand, L. Characterization of human herpesvirus 6A/B U94 as ATPase, helicase, exonuclease and DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 6084–6098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Wallaschek, N.; Gravel, A.; Flamand, L.; Kaufer, B.B. The putative U94 integrase is dispensable for human herpesvirus 6 (HHV-6) chromosomal integration. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 1899–1903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Dominguez, G.; Dambaugh, T.R.; Stamey, F.R.; Dewhurst, S.; Inoue, N.; Pellett, P.E. Human herpesvirus 6B genome sequence: Coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J. Virol.* **1999**, *73*, 8040–8052. [[PubMed](#)]
69. Martin, M.E.; Thomson, B.J.; Honess, R.W.; Craxton, M.A.; Gompels, U.A.; Liu, M.Y.; Littler, E.; Arrand, J.R.; Teo, I.; Jones, M.D. The genome of human herpesvirus 6: Maps of unit-length and concatemeric genomes for nine restriction endonucleases. *J. Gen. Virol.* **1991**, *72 Pt 1*, 157–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Gompels, U.A.; Macaulay, H.A. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 451–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Thomson, B.J.; Dewhurst, S.; Gray, D. Structure and heterogeneity of the a sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini. *J. Virol.* **1994**, *68*, 3007–3014. [[PubMed](#)]
72. Moore, D.F.; Kingsbury, D.T. Integration and transcription of virus DNA in herpes simplex virus transformed cell lines. *J. Gen. Virol.* **1980**, *48*, 123–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Tweedy, J.; Spyrou, M.A.; Pearson, M.; Lassner, D.; Kuhl, U.; Gompels, U.A. Complete genome sequence of germline chromosomally integrated human herpesvirus 6A and analyses integration sites define a new human endogenous virus with potential to reactivate as an emerging infection. *Viruses* **2016**, *8*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Ohye, T.; Inagaki, H.; Ihira, M.; Higashimoto, Y.; Kato, K.; Oikawa, J.; Yagasaki, H.; Niizuma, T.; Takahashi, Y.; Kojima, S.; et al. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Wallaschek, N.; Sanyal, A.; Pirzer, F.; Gravel, A.; Mori, Y.; Flamand, L.; Kaufer, B.B. The telomeric repeats of human herpesvirus 6A (HHV-6A) are required for efficient virus integration. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Arbuckle, J.H.; Medveczky, M.M.; Luka, J.; Hadley, S.H.; Luegmayer, A.; Ablashi, D.; Lund, T.C.; Tolar, J.; De Meirleir, K.; Montoya, J.G.; et al. The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 5563–5568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

77. Lindahl, T.; Barnes, D.E. Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2000**, *65*, 127–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Bryan, T.M.; Englezou, A.; Gupta, J.; Bacchetti, S.; Reddel, R.R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* **1995**, *14*, 4240–4248. [[PubMed](#)]
79. Dunham, M.A.; Neumann, A.A.; Fasching, C.L.; Reddel, R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 447–450. [[PubMed](#)]
80. Pardo, B.; Gomez-Gonzalez, B.; Aguilera, A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: How to fix a broken relationship. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1039–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Sen, D.; Gilbert, W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* **1988**, *334*, 364–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Van Kregten, M.; Tijsterman, M. The repair of G-quadruplex-induced DNA damage. *Exp. Cell. Res.* **2014**, *329*, 178–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zahler, A.M.; Williamson, J.R.; Cech, T.R.; Prescott, D.M. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **1991**, *350*, 718–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Arbuckle, J.H.; Pantry, S.N.; Medveczky, M.M.; Prichett, J.; Loomis, K.S.; Ablashi, D.; Medveczky, P.G. Mapping the telomere integrated genome of human herpesvirus 6A and 6B. *Virology* **2013**, *442*, 3–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Bhargava, R.; Onyango, D.O.; Stark, J.M. Regulation of single-strand annealing and its role in genome maintenance. *Trends Genet.* **2016**, *32*, 566–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Gravel, A.; Dubuc, I.; Wallaschek, N.; Gilbert-Girard, S.; Collin, V.; Hall-Sedlak, R.; Jerome, K.R.; Mori, Y.; Carbonneau, J.; Boivin, G.; et al. Cell culture systems to study human herpesvirus 6A/B chromosomal integration. *J. Virol.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).