



Université de Montréal

**Identification des partenaires de gM du virus VHS-1 par  
BioID couplée à la spectrométrie de masse**

par Hugo Boruchowicz

Département de Microbiologie, d'Immunologie et d'Infectiologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)  
en Microbiologie, immunologie et infectiologie

Juillet 2019

© Hugo Boruchowicz, 2019

## Résumé

Parmi les glycoprotéines du VHS-1, la glycoprotéine M (gM) régule la fusion du virus avec la membrane plasmique. gM est la première à être détectée à la membrane nucléaire très tôt dans le cycle viral, 4 h après l'infection. Cependant, le mécanisme par lequel elle est ciblée aux membranes nucléaires, de même que pour les protéines de l'hôte, est encore inconnu. Les partenaires connus de gM trouvés précédemment par double hybride et par co-Immunoprécipitation ne sont pas impliqués dans ce ciblage. L'hypothèse est que d'autres protéines virales, ou cellulaires, y sont impliquées. Afin d'étudier de nouveaux partenaires de gM, une approche par BioID a été utilisée. Des lignées cellulaires exprimant gM couplée à BirA\* et d'autres lignées contrôles ont été infectées pendant 4 h ou 12 h avec le virus  $\Delta$ gM-2 VHS-1. Les échantillons purifiés ont été ensuite analysés par spectrométrie de masse où 177 protéines ont été identifiées. Parmi elles, les protéines SNX1, SNX2, SCAMP3, VPS33B, MTMR6, TMEM43 et XPO6 ont été choisies pour valider leur rôle potentiel par siRNA dans la délocalisation de gM. Leurs effets sur gM sont analysés par immunofluorescence et leurs répressions ont été confirmées par RT-qPCR. Éventuellement, ces cibles seront étudiées pour leur rôle dans la sortie du virus par essai de plaque. Dans le futur, cette étude permettra d'approfondir nos connaissances sur le mécanisme de ciblage à la membrane nucléaire de gM et des protéines cellulaires en proposant un modèle.

**Mots-clés** : virus herpès simplexe de type 1 (VHS-1), glycoprotéine M (gM), membranes nucléaires, transport nucléaire, TGN, Identification par biotine (BioID), spectrométrie de masse

## Abstract

Among the glycoproteins of HSV-1, glycoprotein M (gM) regulates the fusion between the envelope of the virus and the plasma membrane. gM is the first one of the viral glycoproteins to be detected in the nuclear membrane early in the viral cycle at 4 h post infection. However, the mechanism by which it's targeted to the nuclear membrane, as well as for the host's proteins, is still unknown. The known partners of gM that have been previously described by yeast two-hybrid and co-immunoprecipitation do not appear to be involved in this targeting. Herein, we hypothesize that other viral and/or cellular proteins are involved. To investigate the likelihood of new gM partners, a BioID approach was used. Cell lines expressing gM coupled to BirA\* and other control cell lines have been used and infected for 4 or 12 h with the  $\Delta$ gM-2 HSV-1. The purified samples were then analyzed by mass spectrometry where 177 hits were identified. Among them, the proteins SNX1, SNX2, SCAMP3, VPS33B, MTMR6, TMEM43 and XPO6, all implicated in intracellular transport or in the integrity of the internuclear membrane, were chosen to validate their putative role in the delocalization of gM by siRNA. The target knockdowns were validated by RT-qPCR and further confirmed using immunofluorescence. Eventually, these targets will be further studied to assess their role in viral egress using plaque assay. In the future, this study will deepen our understanding of the mechanism of viral egress and eventually might provide a new model that could explain how gM and host proteins are being targeted to the nuclear membranes.

**Keywords** : herpes simplex virus type 1 (HSV-1), glycoprotein M (gM), nuclear membranes, nuclear transport, TGN, Biotin-Identification (BioID), mass spectrometry

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	i
Liste des abréviations.....	i
Remerciements.....	i
1 Introduction.....	1
1.1 Caractéristiques du virus herpès simplex 1.....	1
1.1.1 Définition.....	1
1.1.2 Histoire et Épidémiologie.....	1
1.1.3 Pathogenèse virale.....	2
1.1.3.1 Transmission et établissement de la phase de latence.....	2
1.1.3.2 Symptômes et pathologies.....	2
1.1.3.3 Traitements.....	4
1.1.4 L'architecture du virus.....	6
1.1.4.1 Organisation génomique.....	7
1.1.4.2 La capsid : une structure icosaédrique.....	7
1.1.4.3 Le tégument.....	8
1.1.4.4 L'enveloppe.....	8
1.1.5 Le cycle viral.....	9
1.1.5.1 Le mécanisme d'entrée.....	9
1.1.5.2 Expression et Réplication du génome viral.....	11
1.1.5.3 Assemblage des capsides et encapsidation de l'ADN viral.....	13
1.1.5.4 Sortie nucléaire des virions : la traversée de l'enveloppe nucléaire.....	14
1.1.5.5 Tégumentation et enveloppement final.....	15
1.2 La glycoprotéine M.....	17

1.2.1	gM chez les Herpesviridae.....	17
1.2.2	De l'expression de son gène à sa maturation.....	17
1.2.3	Fonctions connues de gM.....	19
1.2.3.1	Rôles de gM à la membrane plasmique.....	19
1.2.3.2	Rôles de gM au TGN et au noyau.....	20
1.2.4	Les partenaires connus de gM.....	21
1.2.4.1	Le complexe gM/gN.....	21
1.2.4.2	Le complexe gK/pUL20.....	21
1.2.4.3	L'interaction gM/E-Syt1.....	22
1.2.4.4	Les autres partenaires.....	22
1.2.5	Les localisations de gM.....	23
1.2.5.1	La présence de gM au TGN.....	23
1.2.5.2	La présence de gM aux membranes nucléaires.....	23
1.3	Identification de nouveaux partenaires : la BioID.....	26
2	Objectifs et hypothèses de recherche.....	28
3	Matériels et Méthodes.....	29
3.1	Cellules et virus.....	29
3.2	Anticorps utilisés.....	29
3.3	Construction des plasmides.....	30
3.4	Génération des lignées cellulaires dans les cellules HEK293 FlpIn.....	30
3.5	Analyse par FACS.....	31
3.6	Isolation nucléaire.....	31
3.7	Immunobuvardage.....	32
3.8	Infections.....	33
3.9	Immunofluorescence.....	33
3.10	Purification BioID.....	33
3.11	Digestion des protéines biotinylées et LC-MS/MS.....	34
3.12	Identification des protéines.....	35
3.13	Traitement aux siRNA.....	35
3.14	Test de viabilité.....	36

3.15	RT-qPCR .....	36
3.16	Analyses statistiques .....	37
4	Résultats .....	38
4.1	Validation de la construction de gMBirA*HA et établissement d'une lignée cellulaire 38	
4.2	Confirmation de l'orientation de la glycoprotéine M .....	40
4.3	Localisations et expressions dans les lignées cellulaires .....	42
4.4	Purification des protéines biotinylées par BioID .....	44
4.5	Analyse des résultats obtenus par MS .....	45
4.6	Résultats préliminaires de la validation des hits .....	47
4.6.1	Choix des premières protéines à cibler pour la validation .....	47
4.6.2	Knockdown des cibles par dsRNA .....	49
4.6.3	Les protéines identifiées à 4 hpi et choisies pour validation ne semblent pas avoir d'impact sur la localisation de gM aux MN.....	50
4.6.4	XPO6 pourrait permettre à gM de sortir de la MN.....	53
5	Discussion .....	55
5.1	Les lignées cellulaires établies pour la BioID.....	55
5.2	Les localisations de gM-BirA*-HA pendant l'infection.....	56
5.3	La diversité des partenaires de gM .....	57
5.4	Le choix des cibles pour la validation ou invalidation .....	59
5.5	XPO6, un rôle potentiel dans le ciblage de gM ? .....	59
5.6	Alternative à la BioID : la TurboID et miniTurboID.....	61
6	Conclusion .....	62
	Bibliographie.....	63
	Annexe 1 .....	i
	Annexe 2 .....	iv

## Liste des tableaux

<b>Tableau I : Amorces pour PCR</b> .....	37
<b>Tableau II : Listes des protéines choisies pour validation</b> .....	48



## Liste des figures

Figure 1. Structure physique et génomique du virion VHS-1. ....	7
Figure 2 : Étapes du cycle viral du VHS-1 dans une cellule infectée. ....	10
Figure 3 : Mécanisme d'attachement et d'entrée lors de l'infection du VHS-1.....	11
Figure 4 : Réplication du génome viral de VHS-1.. ....	13
Figure 5 : Présentation de l'anatomie des différentes capsides du VHS-1.....	14
Figure 6: Mécanisme de sortie du VHS-1 avec le modèle d'enveloppement/développement/réveloppement.....	16
Figure 7 : Topologie membranaire prédite de gM.....	19
Figure 8 : Les quatre modèles de ciblage à la MNI. ....	25
Figure 9 : La construction gM-BirA*-HA est délocalisée dans les membranes nucléaires à 4 hpi et au TGN à 12 hpi. ....	39
Figure 10 : Le C-terminal de gM est cytoplasmique. ....	41
Figure 11 : Analyse de l'expression, localisation et activité de BirA* dans les lignées cellulaires. ....	43
Figure 12 : Les échantillons destinés à la spectrométrie de masse sont enrichis en protéines biotinylées. ....	45
Figure 13 : Résultats de l'identification des potentiels partenaires de gM à 4 h et 12 h d'infection.....	46
Figure 14 : Les dsRNA affectent plus ou moins la viabilité cellulaire et diminuent efficacement l'expression des cibles. ....	49
Figure 15 : Les protéines identifiées à 4 hpi ne semblent pas avoir d'effet. ....	52
Figure 16 : XPO6 semble permettre à gM de quitter la MN. ....	54

## Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	acide ribonucléique
BioID :	proximity-dependent Biotin IDentification
CGN :	<i>cis</i> -Golgi network
COPII :	<i>Coat protein complex II</i>
ERGIC :	Compartiment intermédiaire RE-Golgi
ESCRT :	<i>Endosomal sorting complexe required for transport</i>
EM :	Microscopie électronique
E-Syt1 :	Extended Synaptotagmin 1
gM :	Glycoprotéine M
hpi :	Heure post-infection
MNE :	Membrane nucléaire externe
MNI :	Membrane nucléaire interne
MTMR6 :	<i>Myotubularin-related protein 6</i>
MP :	Membrane plasmique
MS :	Spectrométrie de masse
ND10 :	Domaine nucléaire 10
NEC :	Complexe de sortie nucléaire
NPC :	Complexe de pore nucléaire
PKC :	Protéine kinase C
RE :	Reticulum endoplasmique
RT :	Température ambiante
SCAMP3 :	<i>Secretory Carrier-Associated Membran Protein 3</i>
SDS :	Dodécyle sulfate de sodium
siRNA :	small interfering RNA
SNC :	Système nerveux central
SNX1 :	Sorting nexin 1
SNX2:	Sorting nexin 2

TGN : *trans*-Golgi network  
TMEM43 : Transmembrane protein 43  
TK<sup>-</sup> : Thymidine kinase négative  
VHS-1 : Virus Herpès Simplex de type 1  
VPS33B : Vacuolar protein sorting-associated protein 33B  
wt : Wild-type  
XPO6 : Exportin-6

*À mes parents,  
À mon grand-père,  
À Sophie,  
Aux membres du Victoria's Crew,  
À toutes les personnes qui m'ont encouragé de loin ou de près,  
À tous ceux qui liront ce mémoire.*

## Remerciements

Je voudrais remercier en premier lieu mon directeur de recherche, Roger Lippé, professeur à l'Université de Montréal. Merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire, ce qui m'a permis par la même occasion de réaliser mon rêve : venir au Canada ! Même en sachant qu'expérimentalement je ne savais pas faire grand-chose. Tu m'as pourtant confié un projet ambitieux qui m'a permis d'apprendre énormément autant sur le point pratique que théorique en me tirant vers le haut.

Bitu, je ne te remercierais jamais assez. Tu m'as soutenu et encouragé dans les moments difficiles au laboratoire notamment pour l'obtention des lignées cellulaires ! Toujours souriante, tu es la touche d'énergie dont tout le monde a besoin pour travailler dans de bonnes conditions. Plus qu'une collègue, tu es devenue une amie très chère.

Je remercie Elisabeth, Mackenzie, Mayerline, Mélanie, Catherine, Kendra et Josianne qui ont mis de la vie dans le bureau étudiant durant ces années de maîtrise. Vous m'avez épaulé, supporté, mais surtout bien taquiné ! Elisabeth, merci pour tes explications, tes aides et tes conseils précieux notamment au début de cette maîtrise. Mayerline, je te dis merci pour la supérette que tu tiens au bureau et qui m'a permis de survivre pendant les longues soirées (nuits) au laboratoire. Mélanie ton soutien était précieux mais le Mont St-Michel appartient à la Bretagne est non à la Normandie. Mackenzie, merci pour tes danses improvisées dans les couloirs et ton énergie. Josianne, bien que restée que 4 mois pour ton stage d'été, ton aide m'a été très précieuse pour avancer convenablement dans l'analyse des protéines et m'encourager lorsque j'écrivais ce mémoire en parallèle des expériences. Merci également à Ahmed et Annie pour leurs conseils, les anticorps prêtés et leur sympathie.

Johanne tu es déjà partie avant que je finisse, mais tu as été d'une aide extrêmement précieuse. Considéré comme la maman du laboratoire, tu as toujours été là pour m'apporter tes connaissances indispensables pour le bon fonctionnement du laboratoire et de mes expériences. Merci beaucoup pour tous les petits mots que tu me faisais pour m'encourager ou me féliciter. Merci pour ton attitude toujours positive et souriante. Merci d'avoir partagé ta passion de la science avec moi.

Merci à toutes les personnes que j'ai rencontré à l'Université de Montréal qui n'ont fait qu'enrichir ces trois années de maîtrise. Joëlle, merci pour la confiance que tu m'as accordé pour les démonstrations. Diane, merci pour ta joie de vivre, ta positivité et nos discussions dans les couloirs.

Sophie, tu es extraordinaire. Merci beaucoup d'être resté à mes côtés alors que je partais pour le Canada au moment où tu revenais en France. Malgré les deux premières années de distance qui furent longues et difficiles, tu m'as encouragé sans cesse et cru en moi. Même si tu n'as pas de background scientifique, tu as toujours voulu savoir comment fonctionnent les « petites cellules » et mes expériences. Ta façon d'expliquer le fonctionnement d'un Western blot me fera toujours autant rire, mais me montre que tu portes un intérêt dans ce que je fais. Je t'aime.

Au Victoria's Crew, la colocation de 18 personnes où j'ai pu rencontrer des personnes extraordinaires de tous horizons. Vous m'avez permis de m'enrichir socialement et de me faire de nouveaux amis très chers. Plus que des amis, vous êtes devenu une seconde famille. Je vous remercie, vous les 40 personnes que j'ai pu rencontrer durant ces années. Je vous remercie également de m'avoir supporté, moi et mes bêtises. Je remercie d'avance ceux d'entre vous qui liront et qui ne liront pas ce mémoire.

Merci à toute ma famille qui m'a permis d'étudier dans un environnement propice à mon épanouissement et qui a cru en moi.

# 1 Introduction

## 1.1 Caractéristiques du virus herpès simplex 1

### 1.1.1 Définition

La famille des *Herpesviridae* regroupe plusieurs virus infectant les humains et d'autres organismes eucaryotes. Ils sont regroupés dans cette famille du fait de leur caractère architectural, leur rapidité de propagation en culture cellulaire et leur capacité à être en cycle lytique ou en phase de latence. Le virus herpès simplex de type 1 et 2 (VHS-1 et VHS-2), qui sont des virus à ADN enveloppés, font partie de cette famille et de la sous-famille des *Alphaherpesviridae* [1].

### 1.1.2 Histoire et Épidémiologie

Dans l'Histoire, le terme herpès est connu depuis la Grèce antique, soit depuis au moins 2000 ans, et désigne une formation d'une plaie cutanée orale ou génitale. Ce n'est qu'en 1873 que Jean Baptiste Émile Vidal, un dermatologue français, prouvera que l'herpès est une infection cutanée provoquée par un agent exogène. Il montre par son expérience que l'infection se fait directement par contact cutané entre une personne porteuse et une personne saine [2]. En 1919, la première isolation du VHS est faite à partir d'un bouton de fièvre par Lowenstein [3].

Le VHS-1 est un des virus les plus ubiquitaires dans les infections chez l'Homme. Les études épidémiologiques permettent de mieux connaître la prévalence du virus dans la population humaine mondiale et suscitent un intérêt pour la santé publique. Lors de ces études, le sexe, l'âge, l'appartenance ethnique et le nombre de partenaires sont des facteurs pris en compte. Afin d'estimer le nombre d'individus infectés par le VHS-1 (ou VHS-2), la majorité des études ont pris en compte les caractères précédents ainsi que le développement d'anticorps spécifique à ces espèces virales. Il est considéré que 90% de la population mondiale est infectée par le VHS-1 [4]. Pour avoir un ordre d'idée, aux États-Unis, la prévalence est plus importante pour le VHS-1 avec 69% contre 26% chez les femmes et 18% chez les hommes pour VHS-2 [5]. Selon une étude faite en Ontario (Canada), on estime la prévalence totale pour VHS-1 de

57% [6]. En contraste, sur l'ensemble du continent africain, ce serait plus de 90% de la population qui serait infectée par le VHS-1 montrant que les pays en développement sont les plus touchés [7]. Toutes ces informations permettent de montrer l'importante distribution du virus herpès à l'échelle mondiale et qu'une très grande majorité de la population mondiale est touchée par le virus. Ces chiffres importants, s'expliquent par le fait que les principaux réservoirs du VHS-1 sont les animaux et les humains. Seul l'Homme présente des signes symptomatiques et est le seul primate pour lequel il y a plus d'un virus herpès simplex (VHS-1 et VHS-2) [8].

### **1.1.3 Pathogenèse virale**

#### **1.1.3.1 Transmission et établissement de la phase de latence**

La transmission du VHS-1 se fait par contact direct entre une personne porteuse et une personne séronégative. L'infection initiale est appelée infection primaire, ou primo infection, et se fait via les muqueuses, le plus souvent buccale, via des lésions au niveau de la peau ou lors de contacts orogénitaux. Le virus va ensuite utiliser le système nerveux périphérique pour se diriger vers le ganglion trigéminal via les neurones par un transport rétrograde. Le virus entre dans une phase de latence et permet au virus de rester à vie dans son hôte. Durant cette période, l'hôte est toujours capable de propager l'infection vers d'autres hôtes [9]. Une variété de stimuli comme le stress, la fatigue, les UV, la transplantation d'organes ou encore un système immunitaire affaibli peut conduire à la réactivation du virus [10]. Cette réactivation conduit les particules virales nouvellement formées à retourner au site d'infection primaire où l'on va retrouver une réplication du virus dans les cellules épithéliales et provoquer l'apparition de symptômes intermittents comme les lésions cutanées [11].

#### **1.1.3.2 Symptômes et pathologies**

Contrairement à la croyance populaire, la plupart des personnes infectées ne présentent pas de symptômes. L'infection au VHS-1 peut entraîner plusieurs pathologies dont les symptômes peuvent être visibles chez certaines personnes comme les boutons de fièvre. Les zones de lésions dépendant des sites d'inoculation cependant, les boutons fièvres sont les plus communément trouvés au niveau de la bouche ou dans les zones génitales. Chez les plus jeunes



(néonataux et enfants), la primo-infection peut causer de graves ulcérations, des stomatites douloureuses et dans certains cas peuvent être accompagnées de fièvre et d'anorexie [12]. La gingivostomatite est un exemple de pathologie qui peut se développer à cet âge. Il s'agit d'une combinaison d'une stomatite et d'une gingivite, représentative d'une inflammation de la gencive et de la muqueuse orale dont VHS-1 en est la cause dans 90% des cas [13]. Les nouveau-nés sont des hôtes particulièrement sensibles et sont donc les plus sévèrement touchés. Lors de l'accouchement, ils peuvent développer des pathologies à cause des sécrétions génitales infectées de la mère, bien que dans ce cas il puisse s'agir aussi bien du VHS-1 que du VHS-2 [14].

Il est plus rare à l'âge adulte de développer une infection du VHS sévère ou fatale. Cependant, elle peut devenir sévère pour les personnes immunodéprimées ou possédant une pathologie dermatologique chronique telle que l'eczéma ([15], [16]). Cette dernière est appelée eczéma herpétique et peut entraîner une aggravation de l'état du patient avec un développement d'une encéphalite, pouvant entraîner dans 10% des cas la mort si non traitée [17]. Dans de rares cas, une kérato-conjonctivite (ou kératite herpétique) peut survenir suite à l'infection de la cornée. Chaque année aux États-Unis, environ 300 000 nouveaux cas sont déclarés. Lors de non-traitement ou de soins non appropriés, l'inflammation peut s'aggraver et provoquer des lésions récurrentes, entraîner une opacité de la cornée ou voir la perte de la vision ([18], [19]).

Depuis quelques années, des études tentent de montrer le rôle du VHS-1 dans l'établissement de la maladie d'Alzheimer. L'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par un déclin progressif des fonctions cognitives menant à la perte de mémoire et à la démence [20]. Elle est caractérisée par deux marqueurs majeurs dans l'hippocampe et le cortex : une agrégation de protéines amyloïdes- $\beta$  formant des plaques amyloïdes et une dégénérescence des neurofibrilles intra-neuronale causée par l'hyperphosphorylation de la protéine Tau [21]. Des études ont montré que l'encéphalite herpétique affecte la même zone du cerveau du système nerveux central (SNC) impliqué dans l'Alzheimer et ceci dans 60% des cas chez les personnes âgées ([22], [23]). Plusieurs cycles répétés de réactivation virale peuvent mener à une neurodégénérescence ([24], [25], [26]) et la présence d'ADN viral du VHS-1 dans les fluides cérébro-spinaux suggère une répllication dans le SNC [27]. Quoi qu'il en soit,

l'association entre le VHS-1 et l'Alzheimer a été montrée plusieurs fois sur le plan génétique, immunologique et moléculaire, mais la causalité reste à être prouvée [28].

### 1.1.3.3 Traitements

#### ➤ Les antiviraux

Le développement de la biologie moléculaire et de la virologie a permis l'étude et le développement de traitements que sont les agents antiviraux. Ils peuvent être utilisés comme stratégie thérapeutique, stratégie prophylactique pour la prévention ou encore prévenir une pathologie pouvant être contractée suite à l'infection. Il existe aujourd'hui plusieurs antiviraux que l'on peut utiliser contre l'activité de VHS-1 (et VHS-2). La plupart des antiviraux sont des nucléosides analogues comme l'acyclovir, le famciclovir/penciclovir et le valaciclovir (dérivé de l'acyclovir) [29]. Les antiviraux de premier choix en cas d'infection au VHS-1 sont généralement les nucléosides analogues, car sont plus spécifiques au VHS-1 (et VHS-2) [30].

L'acyclovir est l'un des premiers anti-VHS-1 connus. C'est un analogue de la déoxyguanosine [31], qui se fait phosphoryler par la thymidine kinase (TK) de VHS-1. Par la suite, l'acyclovir va être triphosphorylé par des enzymes de la cellule hôte permettant l'inhibition de la synthèse de l'ADN viral via l'inhibition de la polymérase à ADN virale [32]. Quant au valaciclovir, découvert en 1995, il s'agit d'un dérivé administré par voie orale qui est rapidement converti en acyclovir, la substance active, dans le foie [33]. Ce qui lui confère l'avantage d'avoir une biodisponibilité 3 à 5 fois supérieure à l'acyclovir, c'est-à-dire que la proportion de substance active disponible dans le sang circulant est beaucoup plus importante [34]. Il est donc l'antiviral le plus prescrit et le plus recommandé contre le VHS-1. Les autres caractéristiques pharmacocinétiques du valaciclovir sont similaires à l'acyclovir [35].

L'émergence de VHS-1 résistants aux antiviraux de type nucléosides analogues crée une véritable barrière au traitement et nécessite l'élaboration de nouvelles stratégies notamment pour les personnes immunocompromises. Ces dernières ciblent entre autres l'enzyme TK viral. Or, il a été montré que des mutations sur le gène TK (*UL23*) et de la polymérase à ADN (*UL30*) sont responsables de l'inefficacité de ces antiviraux. En effet, ces mutations provoquent une diminution de production de l'enzyme TK et une déficience complète de son activité rendant obsolète l'action de ces antiviraux ([36, 37]). C'est là qu'intervient l'utilisation d'une autre

classe d'antiviraux : les analogues au pyrophosphate comme le foscarnet. Cet antiviral agit également sur l'ADN polymérase viral en inhibant sélectivement les sites de fixation du pyrophosphate. Il n'est pas activé par la TK et conserve donc son activité chez les souches mutées du VHS-1 [38]. Cet antiviral est uniquement utilisé chez les patients immunocompromis infectés par le VHS-1 résistant à l'acyclovir.

### ➤ **Le VHS-1 comme anticancéreux**

Bien que le virus soit responsable de nombreuses pathologies chez l'Homme, il peut également servir d'arme contre d'autres pathologies. La virothérapie est une nouvelle stratégie apparue dans les années 1940 et refaisant surface depuis 1990, permettant de reprogrammer les virus afin de les utiliser contre les cellules cancéreuses [39]. En virothérapie, les virus sont utilisés comme virus anticancéreux dit virus oncolytiques.

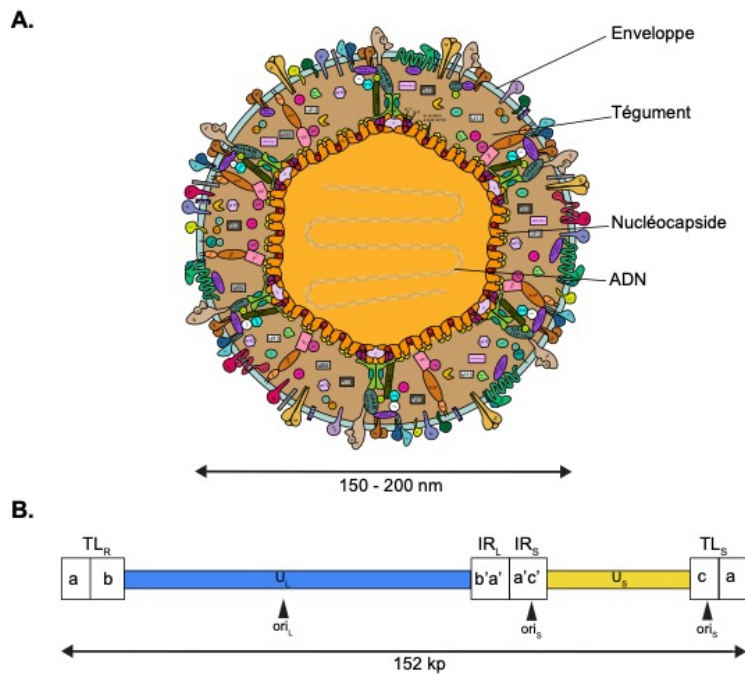
Les virus oncolytiques ont pour cible les cellules cancéreuses qu'ils vont infecter spécifiquement sans toucher aux cellules saines. Le choix d'utiliser le VHS-1 dans cette stratégie est basé sur certaines de ses propriétés dont sa capacité à être très infectieux et sa capacité à infecter un large éventail de cellules hôtes. Dans ce type de traitement du cancer, on considère deux formes de VHS-1 : les vecteurs défectueux pour la réplication et les vecteurs de répliquons conditionnés. Les vecteurs défectueux pour la réplication ne sont pas capables de se répliquer, mais expriment des transgènes qui sont insérés dans le génome viral où un ou plusieurs gènes essentiels sont supprimés [40]. Un groupe particulier de ces vecteurs sont les amplicons. Dans cette approche, une cassette d'expression de transgènes thérapeutique est placée dans un plasmide qui contient un signal d'empaquetage / clivage viral et une origine de réplication VHS-1 ([40], [41], [42]). L'avantage de l'amplicon est d'avoir une toxicité minimale, car il n'exprime pas les protéines virales essentielles. De plus, la probabilité d'avoir l'insertion d'une mutation dans le génome cellulaire est extrêmement faible, car le génome viral VHS-1 ne s'intègre pas dans celui de la cellule hôte ce qui diminue drastiquement les éventuels effets indésirables sur les cellules saines [43]. Concernant les vecteurs conditionnés, on a induit des délétions de gènes non essentiels lui permettant d'infecter, de se répliquer et de lyser les cellules cancéreuses. Il peut également porter un transgène pour augmenter l'effet contre la tumeur [40]. Un exemple de transgène dans ce type de vecteur est l'interleukine 12 (IL-12), dont son efficacité antitumorale a été montrée par plusieurs études. Cet effet antitumoral semble

induire une induction de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques aux tumeurs et une inhibition de l'angiogenèse tumorale ([44], [45], [46]).

La virothérapie offre également un avantage considérable envers les métastases, cellules cancéreuses se développant dans une zone du corps autre que la zone initiale où se développe le cancer. Dans le cas du cancer du sein, 5 à 8% des patientes sont touchées par l'évolution de métastases dans les méninges qui sont fatales et donnent un pronostic de survie de 4 à 6 semaines [47]. Une étude récente montre une utilisation encourageante de VHS-1 oncolytiques dans ce type de développement métastatique. Après injection d'un vecteur conditionné du VHS-1 dans la zone de développement de la métastase chez des souris, une réduction significative de la tumeur a été observée ainsi qu'une diminution progressive des symptômes liés à la pathologie [48]. Bien que prometteur, de plus amples recherches sont encore nécessaires avant de pouvoir utiliser cette stratégie chez les patients notamment pour étudier les éventuels effets secondaires que cela pourrait entraîner (mutations du virus, apparition de nouveaux symptômes...).

### 1.1.4 L'architecture du virus

Le virion mature VHS-1 contient 3 structures majeures : l'enveloppe, le tégment et la nucléocapside (ou capside) enfermant le génome viral (**Figure 1A**).



**Figure 1. Structure physique et génomique du virion VHS-1.** (A) Représentation de la structure globale du virion VHS-1 et la localisation des protéines virales. (B) Organisation générale du génome viral.  $U_L$  pour séquence unique et longue et  $U_S$  pour séquence unique courte.  $TR_L$  ou  $TR_S$  pour terminal repeat et  $IR_L$  ou  $IR_S$  pour inverted repeat. Les trois origines de réplifications  $ori_L$  et  $ori_S$ .

#### 1.1.4.1 Organisation génomique

Le génome viral de VHS-1 est un ADN double brin linéaire de 152kb empaqueté dans la nucléocapside. Il consiste en une séquence unique longue ( $U_L$ ) et une séquence unique courte ( $U_S$ ) dont la région  $U_L$  correspond à 82% du génome [49]. Ces deux régions sont flanquées de part et d'autre de séquences répétées inversées a, a', b, b', c' et c qui sont regroupées sous le terme de *terminal* ( $TR_L$  ou  $TR_S$ ) ou *inverted repeat* ( $IR_L$  ou  $IR_S$ ) (**Figure 1B**) [50]. Les noms des gènes sont associés à leur localisation dans le génome. Simplement, les gènes localisés dans le segment  $U_L$  sont appelés  $UL$  et  $US$  pour les gènes présents dans le segment  $U_S$ . Concernant les protéines virales, elles sont nommées en lien avec leur propriété générale i.e. protéine infectieuse cellulaire (ICP), protéine du virion (VP), selon leur nature (ex : glycoprotéine M = gM) nommé par rapport à leur fonction (ex : Thymidine kinase) ou en utilisant directement le nom du gène (ex : gène  $UL11$  = pUL11) (**Annexe I**). Le génome contient également trois origines de réplifications (*ori*) qui sont nommées en fonction de leur localisation,  $ori_L$  présent dans le segment  $U_L$  en une seule copie et  $ori_S$  dans le segment  $U_S$  en deux copies [51]. Plus précisément,  $ori_L$  est localisé entre les gènes  $UL29$  et  $UL30$  alors que les deux copies d' $ori_S$  sont dans la séquence c [49]. Les 84 gènes de VHS-1 sont disséminés à travers le génome. Ceux présents dans les segments  $U_L$  et  $U_S$ , sont en une seule copie alors que les gènes localisés dans les TR et IR sont en deux copies. Après le séquençage complet du génome en 1988 [52], une nomenclature a pu être mise en place afin d'identifier les gènes et leurs produits..

#### 1.1.4.2 La capsid : une structure icosaédrique

La capsid du VHS-1, ou nucléocapsid possède une structure bien définie de type icosaédrique  $T=16$  (nombre de triangulation) pour une taille d'environ 125nm [53]. Son rôle est de protéger l'ADN viral et permet sa relâche dans le noyau de la cellule hôte lors de l'infection. La présence de quatre protéines majeures de la capsid est directement responsable de cette morphologie. La protéine majeure de la capsid est VP5 avec 955 copies. Elle forme deux

structures de capsomère que sont les pentons et les hexons. Ces derniers contiennent respectivement 5 et 6 monomères de VP5. Les pentons correspondent aux sommets et les hexons aux faces de la capsidie [54]. La présence de 6 copies de VP26 dans chaque hexon, permet de former un anneau continu autour des hexons en interagissant avec la partie supérieure de VP5 [55]. Les capsomères sont connectés entre eux par des complexes hétérotrimériques, ou triplex, qui sont composés de deux protéines VP23 et d'une protéine VP19C [56]. Récemment, grâce aux techniques modernes comme la cryomicroscopie électronique (Cryo-EM), il est possible d'avoir une représentation 3D de la capsidie [57].

#### 1.1.4.3 Le tégment

L'espace compris entre l'enveloppe et la capsidie peut être qualifié de « soupe protéique », c'est le tégment (**Figure 1A**). Dans un virion, le tégment correspond à lui seul à 40% de la masse protéique [58]. Des analyses par spectrométrie de masse montrent que le tégment contient des milliers de protéines entassées aussi bien virales et cellulaires. Parmi ces protéines, 23 protéines virales et de nombreuses enzymes, de protéines chaperonnes et de structures cellulaires ont été identifiées [59]. Les protéines virales tégmentaires ont une abondance et une taille variées. La plus petite protéine retrouvée est pUL11 (10.5kDa) tandis que la plus grosse est pUL36 (335kDa) [59]. En termes d'abondance, les protéines les plus notables sont VP16 ( $\alpha$ -TIF, *UL48*), VP22 (*UL49*) et VP13-14 (*UL47*), présente en 600 – 1300 copies par virion [60]. Certaines protéines du tégment vont avoir un rôle de connexion entre le sommet de la capsidie et l'enveloppe via les glycoprotéines. Cette caractéristique permet de garder une certaine distance entre la membrane virale et la capsidie [61]. Toutes ces protéines ont un rôle structural, mais régulent également différents aspects de l'infection, tel que décrit dans les sections suivantes.

#### 1.1.4.4 L'enveloppe

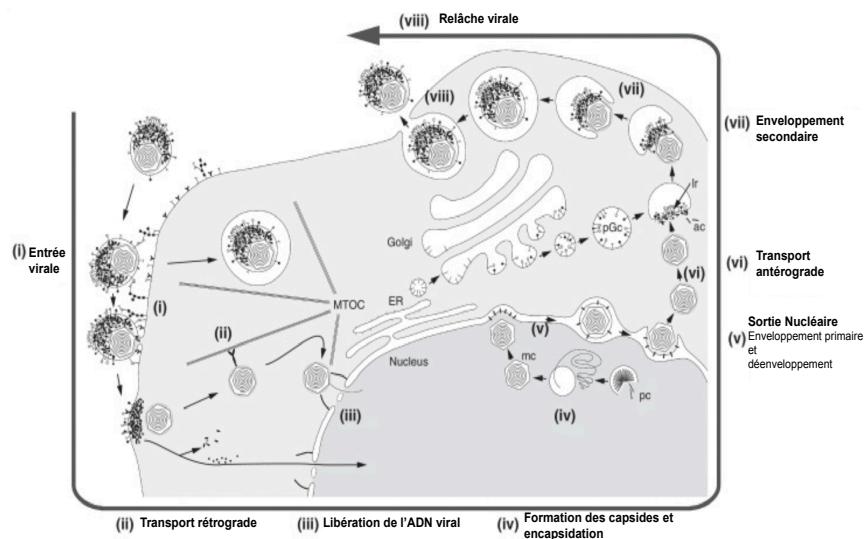
VHS-1 est un virus enveloppé dont l'enveloppe provient directement des membranes cellulaires des cellules hôtes. Cette enveloppe est une bicouche lipidique correspondant à la structure la plus externe du virion (**Figure 1A**). Sa composition lipidique se traduit par une concentration importante de sphingomyéline et de phosphatidylsérine qui a été acquise le plus probablement au *trans*-Golgi network (TGN) [62]. Par ailleurs, la présence de cholestérol

permet un maintien stable de l'enveloppe, de réduire sa perméabilité et permettrait de faciliter la fusion avec la membrane plasmique (MP) lors de l'infection [63]. L'enveloppe contient aussi toutes les glycoprotéines virales responsables du caractère infectieux du virion même si dans le cas du VHS-1 certaines d'entre elles ne sont pas absolument nécessaires [64]. On dénombre treize glycoprotéines présentes dans l'enveloppe du virion mature, dont gC, gD, gH, gG, gH, gI, gJ, gL, gB, gK, gN, gM et gE ainsi que d'autres protéines membranaires non glycosylées comme pUL20 et pUL56. Parmi les glycoprotéines, certaines vont former des complexes (gH/gL, gE/gI et gM/gN) ([65], [66]).

## 1.1.5 Le cycle viral

### 1.1.5.1 Le mécanisme d'entrée

La première étape de l'infection du VHS-1 est le ciblage et l'attachement aux cellules hôtes (**Figure 2 (i) et Figure 3**). VHS-1 est connu pour avoir plusieurs mécanismes d'entrée selon le type cellulaire. Dans les cellules Vero et les neurones humains, l'entrée se fera préférentiellement par fusion de l'enveloppe virale avec la MP ([67], [68]) alors que l'endocytose sera préférée pour les cellules épithéliales telles que les HeLa, les CHO et les kératinocytes [69]. La voie de l'endocytose peut différer d'un type de lignée cellulaire à une autre puisqu'elle peut dépendre, ou non, du pH [70] alors qu'un réarrangement du cytosquelette important est requis pour la phagocytose [71].

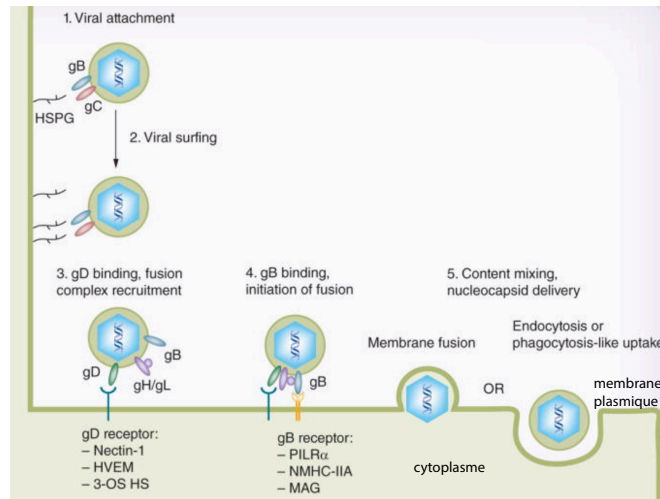


**Figure 2 : Étapes du cycle viral du VHS-1 dans une cellule infectée.** (i) Ciblage et attachement du virus à la cellule hôte suivie (ii) d'un transport rétrograde vers le noyau de la capsid. (iii) Libération de l'ADN viral dans le noyau. (iv) Formation des capsides et encapsidation en parallèle de la réplication de l'ADN viral. (v) Sortie nucléaire de la capsid contenant l'ADN viral via l'enveloppement primaire puis déenveloppement pour une libération dans le cytoplasme. (vi) Transport antérograde vers le site de réenveloppement. (vii) Site de réenveloppement. (viii) Relâche du virion mature dans le milieu extracellulaire. Modifiée de [72].

L'entrée est un mécanisme complexe qui requiert l'interaction de plusieurs glycoprotéines virales avec les récepteurs de l'hôte dans un processus séquentiel (**Figure 3**) [73]. Chaque glycoprotéine impliquée dans l'entrée peut interagir avec plusieurs récepteurs, d'autres glycoprotéines et/ou changer de conformation pour induire la fusion membranaire [74]. L'initiation de l'attachement commence avec gD qui est la principale protéine de liaison aux récepteurs du VHS-1. Lors de l'entrée elle interagit avec trois classes de récepteurs : les membres de la famille des récepteurs TNF (médiateur d'entrée des herpès virus (HVEM)), des molécules d'adhésion cellulaire (nectin-1 et nectin-2) et l'héparane 3-O sulfaté ([75], [76]). Brièvement, l'interaction de gD avec l'un de ses récepteurs entraîne une modification de sa conformation qui entraîne le déplacement d'un domaine particulier appelé domaine de profusion dans sa partie C-terminal (Ct). Différents sites localisés dans ce domaine de profusion peuvent interagir avec gH/gL et gB ([77], [74]). Cette interaction active le caractère fusogène de gB et lui permet d'interagir avec des récepteurs comme le récepteur alpha immunoglobuline de type 2 (PILR $\alpha$ ) entraînant la fusion de l'enveloppe virale à la MP ou la surface des endosomes ([78], [79], [80]).

Suite à cette fusion, la capsid non enveloppée se retrouve dans le cytoplasme et associée à quelques protéines tégmentaires. Parmi ces protéines, pUL36 et pUL37 restent associées à la capsid permettant son transport vers le noyau via les microtubules ([81], [82], [83]). Delà, la capsid est dirigée vers les complexes de pores nucléaires (NPC) où l'ADN viral va être libéré dans le noyau ([84], [85]). Suite à cette libération, la capsid vide est éventuellement libérée dans le cytosol ou reste attachée aux NPC [86].





**Figure 3 : Mécanisme d'attachement et d'entrée lors de l'infection du VHS-1.** *Le virus est ciblé et s'attache à la MP de la cellule hôte via l'interaction de ces glycoprotéines et des récepteurs cellulaires. Ceci entraîne l'initiation de la fusion membranaire entre l'enveloppe virale et la MP ou l'entrée par endocytose ou phagocytose. Modifiée de [70].*

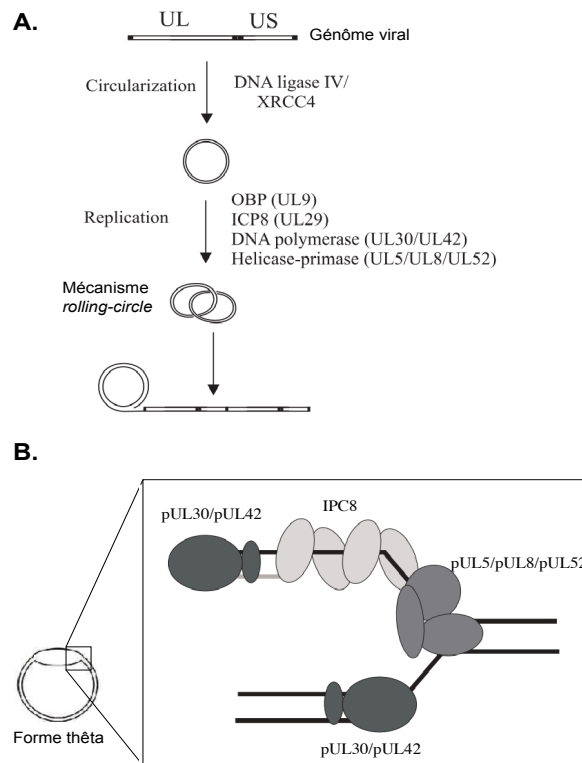
### 1.1.5.2 Expression et Réplication du génome viral

L'expression des gènes viraux est classée en 3 groupes distincts : les gènes immédiats précoces ( $\alpha$  ou IE), précoces ( $\beta$  ou E) et tardifs ( $\gamma$  ou L) [87]. Les gènes IE sont les premiers à être transcrits par la machinerie transcriptionnelle via l'ARN polymérase II de l'hôte [88] et sont stimulés par les protéines tégmentaires VP16, ICP0 et ICP4 qui proviennent du virus entrant [89]. Les gènes E, peuvent être transcrits lorsque les protéines IE ont été synthétisées et vont permettre l'initiation de la réplication de l'ADN viral ainsi que la transcription des gènes L. Les gènes L sont subdivisés en deux groupes sous les termes *leaky-late* ( $\gamma_1$ ) et *true-late* ( $\gamma_2$ ) et codent principalement pour des protéines de structures virales [87]. Les gènes  $\gamma_1$  ont une expression retardée par rapport aux gènes E. En revanche, l'expression des gènes  $\gamma_2$  dépend strictement de l'amplification de l'ADN [90].

La réplication du génome viral prend place dans le noyau dans une structure spéciale appelée compartiment de réplication [91]. Ce compartiment est associé à une sous-structure nucléaire impliquée dans de nombreux processus cellulaires (apoptose, réparation de l'ADN, l'oncogénèse *etc.* ...), le domaine nucléaire 10 (ND10) [92]. ND10 est capable de se déformer rapidement via le remodelage de la chromatine induit par des enzymes (acétyltransférases,

d'acétylases et méthyltransférases) et des histones chaperones lors d'une infection virale où son rôle est de réprimer l'expression des gènes viraux ([93], [94], [95]). Malgré ce mécanisme de défense cellulaire, VHS-1 est capable de le contourner grâce à ICP0 qui va dégrader le ND10 grâce à son activité ubiquitine ligase E3 [93].

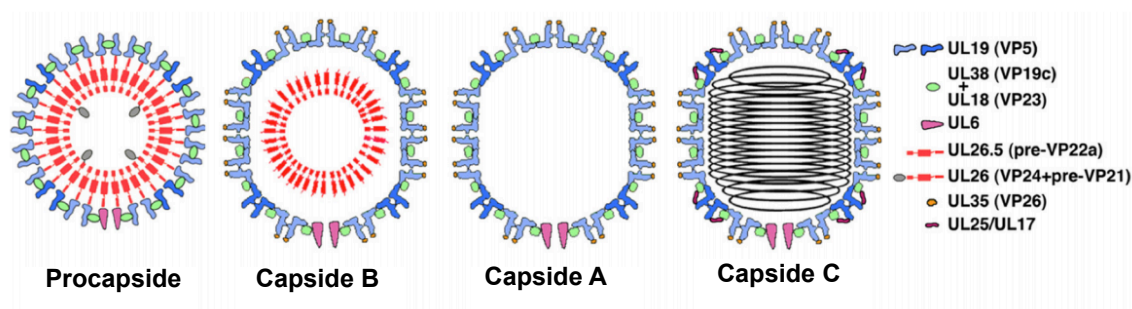
Une fois dans le noyau, l'ADN viral se circularise et la réplication est initiée à l'un des trois sites d'origines de réplication (**Figure 4**). Parmi les gènes que le génome contient, sept d'entre eux codent pour des protéines essentielles à la réplication. La protéine pUL9 s'associe à une des origines de réplication et forme un ADN simple brin (ou brin matrice) grâce à sa fonction hélicase [96] permettant la fixation de la protéine ICP8 [97]. Puis, un complexe hélicase-primase pUL5/pUL8/pUL52 et un second complexe d'une polymérase à ADN pUL30/pUL42 vont être recrutés par ICP8 permettant l'initiation de la réplication de l'ADN (**Figure 4B**) [98]. Celle-ci se fait en deux temps. Dans un premier temps, une structure intermédiaire en forme  $\theta$  se met en place dans la fourchette de réplication, permettant une réplication bidirectionnelle de l'ADN viral. Puis, un mécanisme de réplication de type *rolling-circle* produit une succession de plusieurs copies identiques d'ADN appelé concatémères et permet la production de nouveaux génomes viraux [99].



**Figure 4 : Réplication du génome viral de VHS-1.** (A) Mécanisme général de la réplication. (B) Implications et représentations des protéines dans la fourche de réplication responsable de la formation de la structure intermédiaire  $\theta$ . Modifiée de [100].

### 1.1.5.3 Assemblage des capsides et encapsidation de l'ADN viral

Dans les cellules infectées, quatre types de capsides vont se former dans le noyau : les procapsides et les capsides A, B et C (**Figure 2 (iv) et Figure 5**). L'assemblage des capsides du VHS-1 nécessite la participation de protéines d'échafaudage (*scaffold*) préVP22a (*UL26.5*) et la protéase UL26. Ces protéines d'échafaudage vont former une base interne et interagissent directement avec le triplex protéique formé de la protéine majeure de la capside VP5 (*UL19*), VP23 (*UL18*) et VP19C (*UL38*) [101]. Afin de permettre l'entrée et la sortie de l'ADN viral de la capside, 12 unités de pUL6 vont former une structure en anneau ou *portal* [102]. Ces protéines donnent naissance à une procapside ayant une forme plus sphérique plutôt qu'icosaédrique et moins stable que les capsides matures. Afin d'acquérir une meilleure stabilité, un processus de maturation s'initie avec la protéase UL26 qui s'autoclive et clive le produit du gène *UL26.5* pour donner respectivement, VP21 et VP24 et préVP22a. La protéase mature VP24 clive à son tour le produit préVP22a pour donner la VP22a [103]. Cette étape permet à la procapside de se stabiliser et de former les capsides matures ayant leur forme caractéristique icosaédrique que sont les capsides A, B et C (**Figure 5**). Chacune de ces capsides possède un aspect propre et distinguable en microscopie électronique (EM). Ces trois capsides ont une composition protéique similaire, mais seule la capside C contiendra le génome viral au complet et correspond à la forme mature de la capside trouvée dans les virions matures. La capside A se différencie par la perte des protéines d'échafaudage (VP24, VP21 et VP22a) et est incapable d'incorporer l'ADN alors que la capside B conserve quelques une de ces protéines, mais n'est pas optimisée pour l'empaquetage de l'ADN [104].



**Figure 5 : Présentation de l'anatomie des différentes capsides du VHS-1.** *Les différentes compositions protéiques des quatre différentes formes de capsides présentes dans le noyau au cours du cycle viral. Modifiée de [104].*

L'encapsidation est le mécanisme permettant à l'ADN viral nouvellement formé d'être contenu dans les capsides matures, essentiellement les capsides C. Des analyses génétiques ont montré que 7 gènes sont impliqués dans l'emballage de l'ADN dans les capsides (UL6, UL15, UL17, UL25, UL28, UL32 et UL33). Si VHS-1 présente un défaut sur un de ces gènes, la réplication se fait correctement, mais l'internalisation de l'ADN dans les capsides n'aura pas lieu [105]. Brièvement, l'ADN entre dans la capsidie via un site spécifique : les pentons où l'on trouve douze protéines *portal* UL6 [102]. L'ADN étant sous forme de concatémère, un complexe protéique de terminase (UL15 et UL28) va le cliver pour former de l'ADN monomérique permettant d'avoir une seule copie de génome viral par capsidie. Enfin, la pUL25 joue un rôle de rétention de l'ADN dans la capsidie en fermant le pore d'entrée de l'ADN dans la capsidie ([105], [87], [106]).

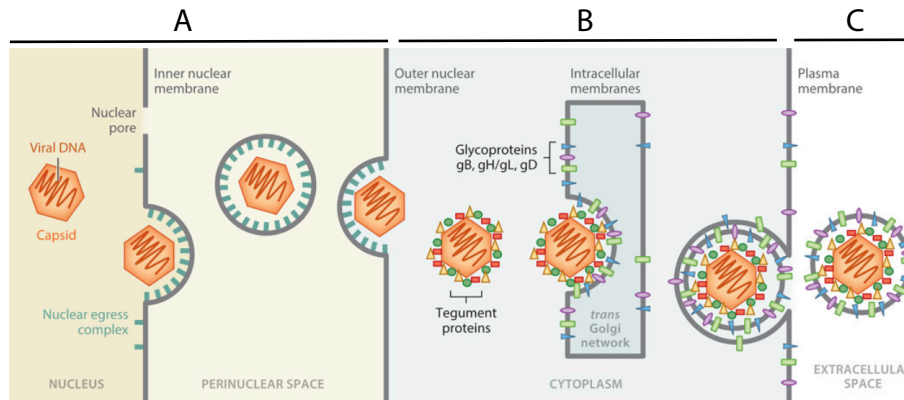
#### **1.1.5.4 Sortie nucléaire des virions : la traversée de l'enveloppe nucléaire**

Les capsides nouvellement formées doivent maintenant sortir du noyau (**Figure 2 (v)**). Dans la littérature, plusieurs modèles, plus ou moins controversés, sont proposés pour expliquer cette sortie nucléaire. Le modèle luminal émet l'hypothèse que la capsidie sort du noyau par bourgeonnement avec l'enveloppe nucléaire interne (MNI), donnant une capsidie enveloppée dans l'espace périnucléaire qui est contiguë avec le lumen du réticulum endoplasmique (RE). Les virions enveloppés seraient transportés par transport vésiculaire de la membrane externe du noyau (MNE) vers l'appareil de Golgi de la même façon que le sont les protéines destinées à la MP. Puis ils seront excrétés de la cellule dans le milieu extracellulaire par fusion membranaire entre les vésicules contenant les virions et la MP ([107], [108]). Le modèle des pores nucléaires suggère alternativement que les nucléocapsides sortent directement du noyau via les NPC [109]. Cette dernière a été émise à partir d'observations de cellules infectées en EM où des élargissements ont été observés, suggérant que les NPC pouvaient se dilater [110]. Cependant, les NPC présentent une flexibilité dans leur composition protéique permettant de moduler sa structure, mais son diamètre reste sensiblement le même et ne semble pas pouvoir être modifié [111]. Le modèle de dé-enveloppement-enveloppement propose quant à lui que le virion

enveloppé présent dans l'espace périnucléaire fusionne avec la MNE libérant la capsidie dans le cytoplasme, qui serait réenveloppée dans l'appareil de Golgi [112] (**Figure 6**). Ce dernier est le modèle le plus accepté [113]. Selon ce modèle, les capsides C sortent du noyau via l'utilisation d'un complexe viral, le complexe de sortie nucléaire (NEC) qui a un rôle clef [114]. Ce complexe est composé des protéines pUL31 et pUL34, localisé majoritairement aux abords de la MNI [115]. Les NEC vont jouer des rôles multiples comme de recruter les nucléocapsides à la MNI via les protéines pUL17 et pUL25 ([116]), de détruire une partie de la lamina nucléaire via le recrutement de p32, de protéine kinase C (PKC) et de protéines virales pUs3 ainsi que de permettre la déformation de la MNI ([117], [118]). Cette étape permet l'enveloppement primaire des nucléocapsides. Une fois dans l'espace périnucléaire, le virion va subir un dé-enveloppement suite à la fusion de son enveloppe primaire avec la MNE, potentiellement grâce aux glycoprotéines gB et gH ([119], [113]) ce qui est toutefois contesté ([108], [110]). Les capsides dans le cytoplasme poursuivent leur sortie à travers le cytoplasme afin de finaliser leur maturation (**Figure 5B**).

#### 1.1.5.5 Tégumentation et enveloppement final

La tégumentation est le processus par lequel le virion va acquérir sa couche tégumentaire. En 2008, 23 protéines tégumentaires d'origine virale ainsi que 49 protéines cellulaires ont été identifiées dans une étude de notre laboratoire par spectrométrie de masse (MS) [59]. La capsidie acquiert ces protéines au noyau, à la membrane nucléaire, dans le cytoplasme et au TGN (**Figure 2 (vi)** et **Figure 6**) [120]. On distingue le tégument interne et externe selon l'association des protéines avec la capsidie ou l'enveloppe virale [121]. La couche tégumentaire interne est majoritairement composée des protéines pUL36 et pUL37 qui forment ensemble une structure fibreuse en interaction avec la capsidie au niveau des pentons et est impliquée dans le transport de la capsidie via les microtubules [122]. D'autres protéines comme ICP0 et ICP4 sont également trouvées à ce niveau [123]. Les protéines du tégument interagissent avec la capsidie d'un côté et avec les queues cytoplasmiques des glycoprotéines de l'autre côté permettant le maintien de l'intégrité de la particule virale [121]. VP16 est une de ces protéines tégumentaires interagissant avec des glycoprotéines telles que gB, gD et gH [124].



**Figure 6: Mécanisme de sortie du VHS-1 avec le modèle d’enveloppement/déenveloppement/réenveloppement.** (A) Sortie du noyau, siège de l’enveloppement primaire et d’acquisition des protéines du tégument. (B) Enveloppement secondaire (protéines du tégument et enveloppe finale) qui commence dès la sortie du virus dans le cytoplasme et se poursuit dans le TGN. (C) Sortie du virion mature. Modifiée de [113].

Des études ont fourni des évidences que le site de l’enveloppement secondaire correspond le plus vraisemblablement au TGN (**Figure 6B**). En commun avec les autres *Alphaherpesvirus*, le site d’enveloppement final de VHS-1 a été trouvé par l’analyse de l’association capside/TGN via des marqueurs et l’utilisation de traitements perturbant le TGN ([108], [125], [126], [127]). Bien que plusieurs autres sites aient été proposés, comme les membranes des endosomes, les tubules émanant de la MP ([128], [128]), le TGN semble être le site majeur du réenveloppement. Par ailleurs, des études sur la composition lipidique des virions extracellulaires montrent une ressemblance avec la membrane du TGN/Golgi [62]. Le transport des capsides vers le TGN se fait via l’interaction entre des protéines tégumentaires pUL36 et pUL37 avec les kinésines des microtubules ([129], [130]). Certaines protéines du tégument et des glycoprotéines permettent le réenveloppement au TGN via un réseau complexe d’interactions protéiques. Des protéines comme pUL11 et pUL49 s’incorporent aux virions au moment de l’enveloppement. La protéine pUL11 interagit avec des protéines tégumentaires comme pUL16 et pUL21 [131] alors que pUL49 interagit avec les glycoprotéines gE/gI et gM et la protéine tégumentaire VP16 se lient elle-même à gD ([132], [133]). Les protéines comme VP16, gD et gE/gI jouent un rôle majeur et central dans cette maturation. En absence de VP16, il a été observé une accumulation dans le cytoplasme de capsides non enveloppées ([134], [135]). L’interaction entre toutes ces protéines, et d’autres montrent la complexité protéique

permettant la formation de l'enveloppe finale ([121], [136], [137], [138]). La capside enveloppée sort du TGN par transport vésiculaire qui fusionne avec la MP libérant par exocytose la nouvelle particule virale mature dont le processus dépend de la protéine kinase D (PKD) (**Figure 6C**) ([139], [140])

## **1.2 La glycoprotéine M**

### **1.2.1 gM chez les Herpesviridae**

La conservation de la glycoprotéine gM dans l'ensemble de la famille *Herpesviridae* suggère un rôle important dans le cycle viral ([141], [142], [143], [144]). Cependant, dépendamment des espèces virales considérées, gM va avoir un rôle plus ou moins important. En effet, chez le VHS-1, EHV, PRV et BHV-1 la délétion du gène *UL10* entraîne des impacts notables sur le cycle viral tel qu'une diminution du titre viral de 10 à 100 fois et un retard dans la cinétique du virus comparé aux virus sauvages ([145], [146], [147]). Bien que cette délétion ait un impact, il y a toujours production de virions infectieux, ce qui sous-entend un rôle non essentiel de gM dans la réplication de ces virus en condition *in vitro*. *A contrario*, une délétion de gM dans les virus herpès MDV, EBV, HCMV, HHV-6 et MHV-68 montre que gM est essentielle à leur réplication ([148], [149], [150], [151], [152]). Des treize glycoprotéines virales que le virus contient, gM est la première détectée dans les MN mais on ne sait toutefois pas comment elle y est ciblée.

### **1.2.2 De l'expression de son gène à sa maturation**

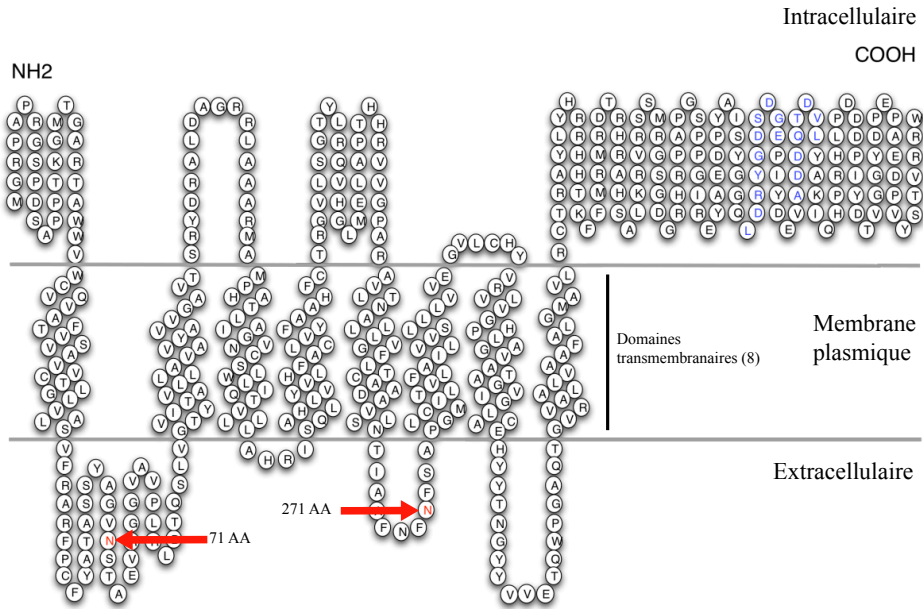
gM a été découverte en premier chez le cytomégalovirus (HCMV) et est commune à tous les *Herpesviridae* [153]. Bien que son gène est considéré comme un gène tardif, l'expression de son gène se fait très tôt dans le cycle et ce avant même la réplication de l'ADN viral qui a lieu vers 5 hpi (heures post-infection) ([154], [155]). Elle est codée par le gène *UL10* de 1422 pb, qui est transcrit et traduit pour donner une glycoprotéine de 473 acides aminés (AA) transmembranaire de type III, protéines possédant plusieurs domaines transmembranaires dans un seul polypeptide. gM est exprimée sous forme d'un précurseur de 47 kDa donnant après maturation une glycoprotéine mature de 53-63 kDa [156]. Par analyse bio-informatique, il est prédit que gM possède 8 domaines transmembranaires, avec un C-terminal (Ct) et N-terminal

(Nt) cytoplasmiques (**Figure 7**). En effet, l'absence de peptide signal clivable, prédit que le Nt de gM, exprimé à la surface cellulaire, est intracellulaire [157]. Toutefois, l'orientation réelle de gM dans la membrane reste à être défini expérimentalement.

La protéine gM contient 2 sites de N-glycosylation. Lors de la maturation, les N-glycosylations sont initiées au ER co-traductionnellement via les enzymes glucosidases et mannosidases. C'est dans à l'appareil de Golgi (cis, médial et trans) que les N-glycosylation vont subir des étapes supplémentaires d'élongation [158]. Le premier site est au 71e AA dans une région hydrophile conservée chez les homologues d'*UL10* chez le CMV et le virus varicella-zoster (VZV) et le deuxième site au 271e AA (**Figure 7**) ([156], [159], [160]). Cette modification post-traductionnelle joue un rôle de contrôle de qualité de la protéine au ER et est directement impliquée dans le repliement de la protéine permettant à gM d'acquérir sa forme mature [161]. La glycoprotéine gM contient également à l'extrémité Ct quatre motifs tyrosine de type YXXØ (Y : tyrosine; X : n'importe quel acide aminé; Ø : acide aminé hydrophobe). Ce motif joue un rôle important dans l'endocytose et le ciblage vers les compartiments intracellulaires via l'interaction avec des protéines adaptatrices de la clathrine ([162], [157]).

Parmi les glycoprotéines que VHS-1 contient, gM est la plus hydrophobe [156]. Cette propriété de la protéine est à prendre en compte, car elle a tendance à s'agréger lorsqu'elle est chauffée à 95°C en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) lors de la préparation des échantillons pour l'immunoblot. Ceci entraîne une précipitation de la protéine au fond du puit et empêche sa migration sur le gel. Afin d'empêcher cela, les échantillons contenant gM sont donc plutôt chauffés à 56°C [156].





**Figure 7 : Topologie membranaire prédite de gM.** Les flèches rouges indiquent la position des 2 sites de N-glycosylation. Le Ct (extrémité COOH) et Nt (NH<sub>2</sub>) sont extracellulaires. Les 8 domaines transmembranaires en hélices sont dans la MP. Schéma fait sur SOSUI (logiciel de prédiction) [163] et tiré de la thèse de J. Zhang (2009) [164].

## 1.2.3 Fonctions connues de gM

### 1.2.3.1 Rôles de gM à la membrane plasmique

L'expression par transfection des glycoprotéines gB, gH, gD et gL de VHS-1 à la MP est nécessaire et suffisante pour induire cette fusion cellulaire [165]. Dans ce contexte, gM joue un rôle important dans l'inhibition de la fusion cellule-cellule lorsque localisée à la MP [157]. En effet, des études ont montré dans un contexte de transfection que le complexe gM/gN de VHS-1, HHV-8, EHV-1, ILTV et gM (sans gN) de PRV ont un effet inhibiteur efficace dans cette fusion en délocalisant les glycoprotéines gD, gH et gL de la MP au TGN ([157], [143]). Le changement de localisation de ces glycoprotéines est partiellement dû à leur internalisation par endocytose médiée par la clathrine [157]. Il a également été démontré que gM, de PRV et VHS-1, est capable de relocaliser des protéines autres que les glycoprotéines herpétiques, tel que la protéine HRSV F de la surface cellulaire au TGN [157]. Ces observations sont corrélées avec la protéine humaine ou bovine RSV G et la protéine Env du virus leucémie murine

Moloney (MoMLV) ([143], [165]). À l'opposé de l'effet inhibiteur sur la fusion cellule-cellule, gM peut stimuler l'entrée du virus dans un contexte d'infection avec des souches syncytiales induisant la formation de syncytium et que cet effet est renforcé en présence de gN exogènes ([166], [167]).

### 1.2.3.2 Rôles de gM au TGN et au noyau

Il a été proposé que l'habilité du complexe gM/gN à causer la localisation des protéines gD et gH/gL vers le TGN contribue à maintenir une concentration suffisante de glycoprotéines au site d'enveloppement secondaire, permettant ainsi un assemblage et une sortie efficace du virus [157]. Cette possibilité concorde bien avec les observations montrant que la perturbation du gène gM dans le PRV et celle du gène gM ou gN dans le EHV-1, associées à l'absence de complexe gE/I dans ces virus, ont conduit à de graves défauts dans l'enveloppement secondaire ([168], [169]). Un grand nombre de nucléocapsides non enveloppées s'accumulent alors dans le cytoplasme et a pour conséquence une forte diminution de la relâche de virions enveloppés dans le milieu extracellulaire ([168], [169]). Il est donc suggéré que gM joue un rôle important dans le ciblage des nucléocapsides et leur maturation au site d'enveloppement secondaire. Des résultats similaires ont été observés avec le triple mutant PRV gE/gI/gM<sup>-</sup>, car il empêche l'incorporation de la protéine tégumentaire pUL49 dans les virions qui interagit par ailleurs avec le domaine cytoplasmique de gM ([146], [135]). D'autres délétions chez VHS-1 et PRV de la protéine gM et pUL11 a également pour conséquence une inhibition de l'enveloppement secondaire ([138], [170], [171]).

Connaissant le rôle de gM dans l'activité syncytiale et la relocalisation des protéines gB, gD et gH au TGN, *Zhang J et al.* ont suggéré que gM pourrait empêcher une fusion incontrôlée entre la MNI et MNE [155]. En effet, elle présente avant les autres glycoprotéines responsables de la fusion virale durant l'entrée et également présentes aux membranes nucléaires [155]. Du fait de la localisation précoce de gM à la MN, il se peut qu'elle régule ces molécules à la MN. Considérant le modèle de déenveloppement/réenveloppement, gM pourrait moduler la fusion des virions VHS-1 périnucléaires avec la MNE. Une autre hypothèse est que gM pourrait avoir un rôle dans les invaginations nucléaires notamment pour réduire la distance entre le site de

réplication intracellulaire et le cytoplasme [155]. Bref, le rôle de gM au noyau reste à être élucidé.

## 1.2.4 Les partenaires connus de gM

### 1.2.4.1 Le complexe gM/gN

La glycoprotéine gN comprenant 91 AA est codée par le gène *UL49.5*, exprimée tardivement dans le cycle viral. C'est une protéine transmembranaire de type I comprenant un seul domaine transmembranaire et est conservé chez les *Herpesviridae*. Lorsque gN est à la MP, son Nt est extracellulaire et son Ct est du côté cytosolique [172]. Comme c'est le cas pour gM, gN ne serait pas essentielle pour la réplication en condition *in vitro* chez les *Alphaherpesviridae* ([173], [141], [174]). Lors de l'infection, gN reste préférentiellement dans le ER sauf en cas d'interaction avec gM qui permet son transfert au TGN ([172], [167]). Dans le VHS-1, l'interaction gM/gN se fait via un unique pont disulfure entre la cystéine C46 du côté cytosolique de gN et de la cystéine C59 de gM [172]. Cette interaction physique entre gM et gN a également été trouvée et décrite chez PRV, HCMV, EBV, BHV-1, MDV et HHV-8 avec l'implication de cystéine à des positions différentes ([141], [173], [143], [144], [148], [142]). Cependant, cette interaction ne serait pas impliquée dans le transport du complexe gM/gN du RE au TGN, mais serait dû à une interaction non covalente via leur Nt [172]. Une étude de notre laboratoire a montré que les 132AA terminaux de gM sont importants pour une interaction efficace entre ces deux protéines et il a été suggéré que le complexe gN/gM induirait la formation de syncytium lors d'une infection avec un VHS-1 wt non syncytiaux en la présence de gN exogène [167]. De plus, il semblerait que ce soit gM qui dicte à gN d'aller au TGN et non l'inverse car en absence de gM, gN n'est pas retrouvée au TGN [167].

### 1.2.4.2 Le complexe gK/pUL20

La glycoprotéine gK (*UL53*) et la protéine membranaire pUL20 (*UL20*) font partie des protéines que l'on trouve dans l'enveloppe du VHS-1. Il a été montré que ces deux protéines forment un complexe fonctionnel et physique et que cette interaction est absolument nécessaire pour leur transport intracellulaire, leur expression à la surface cellulaire et à leur fonction de fusion membranaire lors de l'infection de VHS-1 ([175], [176]). Dans des cellules infectées, en

absence de gM, une réduction du niveau d'expression de pUL20 a été observée suggérant une fonction stabilisatrice de la part de gM ([166], [177]). Une expérience d'immunoprécipitation montre que gM interagit directement avec pUL20, elle-même lié à gK [166]. Cette interaction de gM avec le complexe gK/pUL20 permet le recyclage de gD et gH/gL de la MP vers le TGN par endocytose [177].

#### **1.2.4.3 L'interaction gM/E-Syt1**

Les protéines E-Syts (*Extended Synaptotagmines*) sont une famille de protéine transmembranaire qui fonctionnent comme capteurs de  $Ca^{2+}$  à la membrane du RE [178]. Leurs fonctions principales sont de médier l'attachement du RE à la MP [179], le transfert de lipides entre ces deux membranes [180] et de signalisation par récepteur [181]. Contrairement à E-Syt2 et E-Syt3 qui sont aux sites de contacts RE-PM, E-Syt1 est associée à la membrane du RE ([179], [178], [182]). Récemment, une étude de notre laboratoire a montré par spectrométrie de masse qu'E-Syt1 est un nouveau partenaire d'interaction de gM [183]. Cette interaction est retrouvée dans les cas d'infections et de transfections, suggérant que les protéines virales ne sont pas requises pour cette interaction. Le rôle que joue cette interaction est encore mal connu, mais on sait que E-Syt1, conjointement à E-Syt3; module négativement la sortie du VHS-1 dans le milieu extracellulaire, sa propagation cellule-cellule et son entrée dans les cellules voisines [183].

#### **1.2.4.4 Les autres partenaires**

Grâce à son domaine Ct, gM est capable d'interagir avec plusieurs autres protéines virales et/ou cellulaires permettant sa régulation durant le cycle viral. En 2012, une étude a démontré que gM est impliquée dans un gros complexe impliquant des protéines membranaire et tégumentaire [184]. Ce complexe est centré sur la protéine tégumentaire VP22 qui interagit directement avec gM ainsi qu'avec gE, formant le complexe gE-VP22-gM. À ce complexe s'ajoute les protéines ICP0 et gI donnant le complexe gE-VP22-gM-gI-ICP0 [184]. Il a été suggéré que la formation de ce complexe est corrélée à une morphogenèse et une propagation efficace du virus [184]. De plus, les protéines pUL31 et pUL34 interagissent avec gM afin qu'elles aient une localisation optimale à la membrane nucléaire tardivement dans le cycle [185].

Finalement, chez les virus HHV-6, il a été montré que la protéine v-SNARE VAMP3 interagit uniquement lorsque celles-ci sont en complexe [186].

### **1.2.5 Les localisations de gM**

Tout au long du cycle viral, gM va se retrouver à différentes localisations dans la cellule infectée. Lors de la phase d'entrée du virus, dans le cas de la fusion entre l'enveloppe virale et la MP, gM va être retrouvée à la MP [156]. Très tôt dans le cycle, vers 2 hpi le gène *UL10* va être transcrit, traduit et gM est retrouvée à la MNI à 4 hpi, dans l'enveloppe des virions périnucléaires puis à la MNE. Plus tard dans le cycle, gM est retrouvé au TGN à 12 hpi et enfin dans l'enveloppe du virion mature montrant une localisation très dynamique de gM au cours du cycle viral ([155], [187]). Cependant, lorsque gM est exprimée seule dans les cellules, en absence de toute protéine virale, gM présente une localisation exclusivement au TGN. Si ces cellules transfectées sont ensuite infectées avec un virus n'exprimant pas gM ( $\Delta$ gM-2 VHS-1), gM est retrouvée à la MN à 4 hpi et au TGN à 12 hpi suggérant un rôle important de la part de certaines protéines virales dans la localisation dynamique de gM [155].

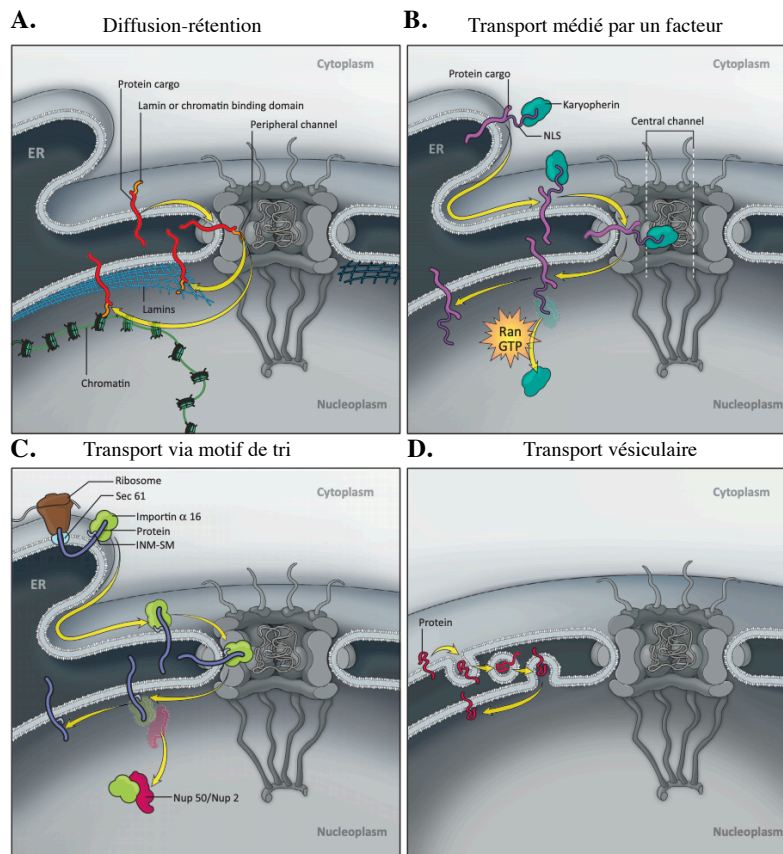
#### **1.2.5.1 La présence de gM au TGN**

Il a été suggéré que gM contient des signaux de localisation lui permettant d'être ciblée au TGN. Une étude du laboratoire a montré, avec plusieurs mutants, que gM atteint le TGN indépendamment d'autres protéines virales, d'homo-oligomérisation, et que d'autres informations de ciblage sont présentes dans les huit domaines transmembranaires de gM [188]. Ceci suggère que tous les domaines transmembranaires sont requis pour l'acquisition de la bonne conformation de gM et la sortie du RE. Plus précisément, il a été montré que ce sont les résidus 19 à 343, comprenant les domaines transmembranaires, qui sont suffisants pour cibler la protéine au TGN et pour soutenir les fonctions virales [188]. Cependant, on ignore comment cette protéine se retrouve aux membranes nucléaires et ce qui stimule sa relâche vers le TGN.

#### **1.2.5.2 La présence de gM aux membranes nucléaires**

On ne sait pas par quel mécanisme gM se retrouve aux membranes nucléaires. En outre, la localisation de gM au noyau ne dépend pas de ses partenaires d'interaction connus à ce jour puisque sa localisation au noyau n'est pas altérée par ces derniers et qu'ils ne colocalisent pas

avec gM au noyau à 4 hpi [155]. Les protéines membranaires destinées à la MN contiennent des signaux de ciblage et de rétentions spécifiques. Par exemple, les protéines transmembranaires de la MNE y sont ciblées grâce à leur domaine KASH (Klarsicht, ANC-1, Syne Homology) localisé à leur Ct [189]. Ce domaine est reconnu par les domaines SUN des protéines membranaires de la MNI générant ainsi un échafaudage protéique continu qui relie physiquement le nucléosquelette au cytosquelette, appelé complexe LINC, comme c'est le cas avec les protéines de type Nesprines [190]. Les protéines transmembranaires destinées à la MNI doivent passer le long de domaines qui forment la périphérie du canal des NPC (**Figure 8A**) [191]. En effet, les glycoprotéines étant des protéines hydrophobes, elles ne peuvent pas directement passer à travers les NPC [192]. Cependant, plusieurs modèles sont proposés pour expliquer le ciblage des protéines transmembranaires ou glycoprotéines vers la MNI. Quatre modèles de voies de signalisation sont proposés soit la diffusion-rétention, le transport médié par un facteur, le transport via un motif de tri et un transport par vésicules (**Figure 8**) [192].



**Figure 8 : Les quatre modèles de ciblage à la MNI.** (A) Modèle de diffusion-rétention où la protéine membranaire est prise en charge par une protéine cargo puis passe à travers d'un canal latéral du NPC. (B) Modèle du transport médié par un facteur tel que la karyophérine, transport actif avec libération du facteur par la Ran-GTP dans le noyau. (C) Modèle de transport via un motif de tri présent dans la protéine membranaire. Ce motif est reconnu par un transporteur comme les importines  $\alpha$  16 qui est libéré dans le noyau grâce à l'action du complexe Nup50/Nup2. (D) Modèle de transport vésiculaire avec invagination de la MNE pour transporter la protéine membranaire vers la MNI par fusion membranaire. Adaptée de [192].

Le modèle de diffusion-rétention suggère que la protéine de la MNI est capable de diffuser librement du RE à la MNE et de diffuser de la MNE vers la MNI en passant à la périphérie du canal des NPC (**Figure 8A**) ([193], [194], [195]). De plus, l'étude de l'ultrastructure des NPC révèle que le canal périphérique peut être suffisamment large pour le passage de protéines membranaires dont leur domaine nucléoplasmique ou extraluminal est relativement petit ([196], [197]). Par exemple, une étude sur le LBR (récepteur à la lamine B) montre une sélection de taille durant ce transport : une version de LBR avec sa région extraluminal de 22kDa est localisée à la MNI alors qu'une version de 70kDa ne l'est pas ([198], [199]). Le modèle du transport médié par un facteur propose que les protéines de la MNI contiennent une séquence NLS (*nuclear localisation sequence*) dans leur domaine extraluminal et facilite leur interaction avec les karyophérines dans le cytoplasme (**Figure 8B**) ([192], [200]). Les karyopherines jouent un rôle de transporteurs à travers le NPC puis sont libérées du cargo grâce au Ran-GTP dans le noyau. Beaucoup de protéines de la MNI possèdent une séquence NLS. Cependant, leur mutation ou délétion n'affecte pas toujours la localisation de la protéine, suggérant une autre caractéristique contribuant à ce ciblage ([201], [202]). Cette autre caractéristique est une séquence transmembranaire hydrophobe adjacente à une région contenant des acides aminés chargés positivement, est appelée INM-SM (*inner nuclear membrane sorting motif*) ([203], [204]). Ce troisième modèle implique cette séquence qui est reconnue par une version tronquée de la karyophérine- $\alpha$ , connue sous le nom d'importine- $\alpha$ -16 (**Figure 8C**) ([205], [206]). Le transport de la protéine transmembranaire se fait à travers la périphérie du canal du NPC et la relâche de l'importine- $\alpha$ -16 dans le noyau est stimulée par Nup50/Nup2 [206]. Le dernier modèle est un modèle vésiculaire (**Figure 8D**). La protéine transmembranaire est localisée à la MNE qui s'invagine pour former une vésicule dans l'espace périnucléaire et fusionne avec la MNI dont le mécanisme est indépendant des NPC ([192],

[207]). Ce modèle a notamment été observé lors d'une étude sur la signalisation des Wnt dans jonctions neuromusculaires chez la *Drosophila* [208], mais ce mécanisme est encore mal connu. Quoi qu'il en soit, que ce soit pour les protéines virales ou cellulaires, on ne sait pas comment les protéines sont ciblées à la MNI.

### 1.3 Identification de nouveaux partenaires : la BioID

Par le passé, l'identification de partenaires de gM potentiellement impliqués dans sa localisation a été étudiée, mais aucun ne semblent justifier la présence de gM au noyau, ni sa relâche vers le TGN. On a donc pris pour acquis que gM a des interactions transitoires ou de faibles affinités. Or, les techniques comme la co-Immunoprécipitation (co-IP) ou la *Proximity Ligation Assay* (PLA) n'ont pas la sensibilité requise pour détecter les interactions faibles ou transitoires [209]. Pour cette raison, on s'est penché sur l'utilisation d'une méthode de proximité telle que la BioID comme approche.

BirA est une enzyme de 35 kDa qui se lie à l'ADN et qui a été trouvée à l'origine chez *Escherichia coli*. Dans le système bactérien, le substrat naturel de BirA est la protéine *Biotin carboxyl carrier* (BCCP) et participe aux modifications post-traductionnelles de l'acétyl-coA carboxylase ([210], [211]). Du fait de sa petite taille, la biotine (244 Da) n'altère pas la plus part des propriétés des molécules [212]. La découverte du mutant BirA (R118G), appelé BirA\*, permet d'avoir une enzyme plus active et qui ne se fixe pas à l'ADN ([213], [214]). BirA\* est fusionnée à une protéine d'intérêt qui lorsqu'exprimée dans la cellule, permet la biotinylation de toutes les protéines proches de manière covalente et irréversible [215]. Cette activité a ensuite été confirmée chez les cellules de mammifères par l'équipe de Roux et *al.* [215]. Ces dernières années, la BioID (*proximity-dependent Biotin Identification*) s'est rapidement imposée comme nouvelle méthode de marquage des partenaires stables ou transitoires [216]. Ces protéines peuvent être purifiées grâce à des billes de streptavidine, qui présentent une forte affinité pour la biotine en formant des liens forts non covalents suffisants pouvant supporter des lavages dans des conditions extrêmes. Ceci permet à certaines protéines qui restent normalement insolubles dans des détergents faibles de devenir solubles et d'être capturées comme c'est le cas pour gM [217]. Suite à cette purification, les protéines purifiées peuvent être identifiées par spectrométrie de masse. Le grand avantage de cette approche est que BirA\* lie la biotine à toutes les protéines



qui sont en interaction directe ou à proximité, dans un rayon de 10nm environ, de la protéine de fusion [218]. Elle constitue donc une approche de choix pour identifier de nouveaux partenaires de gM.

## **2 Objectifs et hypothèses de recherche**

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est d'identifier de nouveaux partenaires de gM qui pourraient être impliqués dans son ciblage aux membranes nucléaires et comment elle y est relâchée en clarifiant le processus de ciblage. Puisque gM est retrouvée seule au TGN, qu'elle se retrouve au noyau à 4 hpi et au TGN plus tard dans l'infection, notre hypothèse est que de nouveaux partenaires viraux et/ou cellulaires sont impliqués dans cette localisation intracellulaire de gM. Afin d'atteindre notre objectif, notre approche se fera donc dans un cas d'infection à différents temps ; 4 hpi pour la MNI et 12 hpi pour le TGN. L'identification de nouveaux partenaires de gM se fera par BioID et les noyaux sont purifiés dans la condition 4 hpi afin de mieux séparer les deux processus. Cette identification permettra de proposer éventuellement un modèle pour expliquer ce ciblage et bonifier notre compréhension du mécanisme qui permet au virus de transiter au travers des membranes nucléaires.

## 3 Matériels et Méthodes

### 3.1 Cellules et virus

Les cellules 143B TK<sup>-</sup> (ostéosarcome humain, thymidine kinase négative) (ATCC CRL-8303) et les HEK293 FlpIn sont maintenues en culture dans le milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Sigma-Aldrich) supplémenté de 10% de sérum de bovin foetal (FBS, Medicorps), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline-streptomycine ainsi que de 15 mg/ml de 5-bromo-2 deoxyuridine (BuDr, Sigma-Aldrich) pour les cellules 143B TK<sup>-</sup> et de 100 µg/ml de Zéocine (Invivogen, ant-zn-05) pour les HEK293 FlpIn. Les cellules ont été maintenues dans du DMEM sans BuDr ou sans Zéocine 24h avant les transfections et les infections. Les cellules ont été testées pour l'absence de mycoplasmes contaminants.

Le virus VHS-1 17<sup>+</sup> wt fourni par Beate Sodeik et le virus ΔgM-2 (=ΔgM-2xATG) VHS-1 fourni par Gus Kousoulas, ont été produits sur les cellules BHK et titrés sur les cellules Vero (rein de singe vert d'Afrique). Le virus mutant VHS-1-gM/CTL, où gM est étiquetée avec VSV G, a été fait précédemment dans notre laboratoire via l'utilisation d'un bacmide [155]. Les cellules 143B TK<sup>-</sup> ont été infectées ou non à MOI 5 pendant 4 h ou 12 h.

### 3.2 Anticorps utilisés

Les anticorps primaires pour l'immunobuvardage et l'immunofluorescence ont été gracieusement obtenus de plusieurs sources. L'anti-gM PAS980 polyclonal nous a été offert par Lynn Enquist (Immunofluorescence (IF), 1 :300 ; Immunobuvardage, 1 :2000). Les autres anticorps ont été achetés commercialement : l'anti-HA monoclonal (IF, 1 :500 ; Immunobuvardage, 1 :2500, SantaCruz, SC-7392), l'anti-TGN46 polyclonal (Immunofluorescence, 5ug/ml, Abcam, Ab-50595), l'anti-LBR monoclonal (IF 1 :1000, Abcam, Ab-232731), l'anti-NPC mAb 414 monoclonal (IF, 1 :5000, Covance Research products) et l'anti-GAPDH monoclonal (Immunobuvardage, 1 :10000, Millipore, MAB374) et l'anti-CD81-APC (TAPA-1, cytométrie en flux, 1 :50 Biolegend #349509). Afin de détecter les protéines biotinylées par immunobuvardage, de la Streptavidin-HRP a été utilisée (1 :10 000, Abcam, Ab-7403). Tous les anticorps secondaires utilisés pour l'IF ont été commandés chez

Molecular Probes et ceux pour l'immunobuvardage ont été commandés chez Jackson ImmunoResearch.

### 3.3 Construction des plasmides

Des vecteurs pcDNA5FRT ont été envoyés à Mutagenex pour l'insertion de BirA\*-HA (Addgene #36047) et UL10(gM)-BirA\*-HA (construction 227-21) puis séquencées. Le plasmide pcDNA5FRT BirA\*-HA a été utilisé pour insérer la séquence SV40 NLS en amont de BirA\* avec le kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent, 210518) selon les instructions du manufacturier. Les amorces utilisées étaient cttacgatgtaccggattacgcagccgaaaaaaaaacgcaaagttcgagtctagag (séquence SV40 NLS soulignée, amorce forward) et ctctagactcgaactttgcggttttttttcggctgcgtaatccggtacatcgtaag (amorce reverse) et ont été purifiées par HPLC (IDT). Les bactéries ultra compétentes X10-Gold fournies avec le kit ont été transformées en ajoutant 1 µl de produit PCR et placées sur glace pendant 10 min. Un choc thermique a été fait pendant 45 s au bain-marie à 42°C. Les bactéries ont été mises en incubation à 37°C, 300 rpm pendant 1h dans le milieu Luria Bertani (LB) sans antibiotique. La préparation a ensuite été centrifugée à 1000xg 1 min et le culot est resuspendu dans 100 µl de LB avant de mettre les bactéries transformées sur de l'agar LB avec l'ampicilline (50 µg/ml) et incubées à 37°C toute la nuit.

### 3.4 Génération des lignées cellulaires dans les cellules HEK293

#### FlpIn

Les plasmides pcDNA5FRT BirA\*-HA, pcDNA5FRT NLS-BirA\*-HA et pcDNA5FRT gM-BirA\*-HA sont respectivement co-transfectées avec pOG44 dans les cellules HEK293 FlpIn en utilisant la LipoD293 (SigmaGen, SL100688) avec un ratio de 3 :1 LipoD (µg) : DNA(µg) comme indiqué par les instructions du manufacturier. Les cellules transformées ont été sélectionnées en présence de 200 µg/ml d'HygromycineB (Multicell, 450-141-xl). Les colonies ont été obtenues après 3-4 semaines et les colonies sélectionnées une par une à l'aide de cylindre de clonage et cultivées séparément. Les cellules ont ensuite été mises en culture dans un milieu de DMEM complété avec 200 µg/ml d'Hygromycine B pour maintenir la sélection. Toutes les lignées ont été testées pour l'absence de mycoplasmes contaminants.

### **3.5 Analyse par FACS**

Les cellules HEK293 gM-BirA\*-HA et HEK293 FlpIn ont été collectées à partir de pétris de 10 cm avec le tampon de collecte (5 mM EDTA, 1% phosphated-buffered saline (PBS 1X)) et incubées 10min à 37°C. Du DMEM complet a été ajouté aux cellules qui ont été resuspendues mécaniquement puis récupérées après centrifugation à 250xg, 5 min à 4°C. Le culot a été lavé 2 fois avec du PBS 1X 4°C. La concentration des cellules a été quantifiée par hémacytomètre. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans le volume approprié permettant d'ensemencer  $2 \times 10^6$  cellules dans un puit d'une plaque de 96 puits. Pour la condition non perméabilisée, les cellules sont bloquées avec une solution de blocage (0,5% BSA, 2% de FBS dans du PBS 1X) pendant 30 min à 4°C avec agitation, lavées avec du tampon FACS (0,5% BSA, 0,05% de sodium azide dans du PBS 1X) et centrifugées à 250xg 2min 4°C. Les anticorps primaires, anti-HA (1 : 50, Santa Cruz, sc-7392) ou anti- $\gamma$ Tubulin (1 :100, Sigma T6557) sont dilués dans le tampon FACS et ajoutés aux cellules pendant 30 min à 4°. Les cellules sont lavées avec le tampon FACS, suivie d'une centrifugation à 250xg 4°C 2 min et enlever le surnageant par inversion de la plaque. Les anticorps secondaires, anti-souris Alexa647 (1 : 1000, Molecular Probes, 1-31571) ou anti-CD81-APC (5 ul pour  $1.10^6$  cellules, Biolegend, 349509) ont été dilués dans du FACS Buffer et ajoutés aux cellules pour 1 h à 4°C dans le noir. Les cellules sont lavées comme décrit ci-dessus puis lavé deux fois avec du PBS 1X. Pour la condition perméabilisée, le même protocole a été utilisé sauf que le BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, 51-2090KZ) a été utilisé pendant 20min à 4°C avant l'utilisation de la solution bloquante. De plus, les solutions de FACS Buffer et de PBS 1X sont remplacées par la solution PermWash (BD biosciences, 51-2091KZ) pour le lavage et pour la dilution des anticorps. Dans les deux conditions, les cellules ont été resuspendues dans du PBS 1X dans des tubes de FACS avant analyse. L'acquisition a été faite avec le logiciel BD FACSDiva version 8.0.2 et les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo version 10.4.1.

### **3.6 Isolation nucléaire**

L'isolation des noyaux a été faite sur les cellules HEK293 NLS-BirA\*-HA en utilisant le Lysis Buffer (225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 5 mM Hepes pH 7.5, 1mM EGTA, complétée fraîchement avec la CLAP 1X et la benzonase 1X (Sigma Aldrich, E1014-25KU).

Les cellules sont gardées dans le Lysis Buffer sur glace pendant 30min et agiter toutes les 10 min pendant 30s au vortex, afin de déchirer la membrane plasmique, puis centrifugées à 1000xg pendant 5 min à 4°C. Le culot est lavé trois fois avec le Lysis Buffer pour enlever tout contaminant cytoplasmique. Les échantillons ont subi trois cycles de gel / dégel puis sont passés à travers une aiguille 18G<sup>1/2</sup> pour casser l'ADN cellulaire avant d'utiliser l'aiguille de 27G<sup>1/2</sup> cinq fois en éjectant l'échantillon sous haute pression. Les échantillons sont analysés par immunobuvardage comme décrit ci-dessous.

### 3.7 Immunobuvardage

Les lignées cellulaires HEK293 FlpIn, HEK293 BirA\*-HA, HEK293 NLS-BirA\*-HA et HEK293 gM-BirA\*-HA sont collectées pour récupérer le lysat cellulaire avec le Ripa Buffer (20% SDS, 1% NP-40, 1% acide deoxycholic, 150 mM NaCl, 10mM Tris-HCl ph 7.4, complété fraîchement avec de la CLAP 1X et Benzodase comme décrit plus haut) et incubé pendant 30 min à 4°C en rotation. Les échantillons sont centrifugés à 14 000xg 15 min 4°C. Les surnageants sont quantifiés par le test de Bradford (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada). Les échantillons sont chargés sur un gel SDS-PAGE (gels de 10% ou gels en gradients 5-20%) et la migration se fait sous un courant constant de 120 V. Les protéines ont été transférées avec un courant constant de 300 mA pendant 1h30 sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) (Biorad, #1620177). Les membranes sont bloquées avec du sérum albumine bovin 5% (BSA, Sigma-Aldrich, 17906) dans une solution de Tris saline et de 0.1% Tween 20 (TBST) (13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% Tween 20) pendant 1h à température ambiante (RT). Les anticorps primaires sont dilués dans du 5% BSA-TBST et incubés avec la membrane pendant 1h à RT ou toute la nuit à 4°C. Les membranes sont lavées trois fois 5 min avec du TBST et incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort diluée dans du 5% BSA-TBST pour 1h à RT. Pour la détection, les membranes sont incubées 5min avec le *Clarity Western ECL susbtrate* (Bio-Rad) et le système ChemiDoc MP est utilisé pour l'acquisition (Bio-Rad). Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel Image Lab version 6.0 (Bio-Rad).

### 3.8 Infections

Les lignées cellulaires HEK293 BirA\*-HA, HEK293 NLS-BirA\*-HA et HEK293 gM-BirA\*-HA sont mises en croissance dans des boîtes de 24,5cm ou dans des plaques de 24 puits prétraitées à la poly-lysine (Sigma-Aldrich, P8920) pour éviter le détachement des cellules durant l'infection. Les cellules 143B TK<sup>-</sup> ont seulement étéensemencées dans les plaques de 24 puits. Les cellules sont non infectées ou infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 5 pour la BioID ou MOI de 3 pour l'IF et sont incubées pendant 1 h à 37°C avec agitation pour l'adsorption du virus puis du DMEM a été ajoutée aux cellules pendant 4 h ou 12 h et incubées à 37°C.

### 3.9 Immunofluorescence

Les lamelles ont été préalablement traitées avec la poly-lysine pour éviter tout détachement des cellules. Les cellules ont été fixées avec 3% de paraformaldéhyde dans du PBS pendant 30min à 4°C. Deux étapes de lavage ont été effectuées avec du PBS avant la perméabilisation avec 0,1% Triton-X100 filtré (Sigma, T9284) dans du PBS 1X pendant 4 min à RT. Les échantillons sont ensuite lavés deux fois avec du PBS 1X et les sites de liaisons protéiques non spécifiques ont été bloqués avec 10% de FCS pendant 30 min à RT. Les échantillons ont été marqués pendant 1 h à RT avec les anticorps primaires dilués dans 10% de FCS puis lavés trois fois avec du PBS 1X pendant 5 min. Les anticorps secondaires dilués dans du PBS 1X ont été appliqués pendant 45 min à RT suivie de trois lavages au PBS 1X. Les lamelles ont été placées sur des lames préparées en avance avec une goutte de Dako (Dako, 53023) contenant 10 µg/ml de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) et incubés à RT toute la nuit. Les images ont été obtenues avec le microscope confocal LSM800 URGB. L'analyse a été effectuée avec le logiciel Zen Pro version 2.3 (Zeiss).

### 3.10 Purification BioID

Le protocole qui a été utilisé pour la purification BioID a été adapté pour nos besoins à partir du protocole du laboratoire d'Anne-Claude Gingras [219], lui-même adapté et modifié du protocole de *K.J Roux et al.* [217]. Les lignées HEK293 BirA\*-HA, HEK293 NLS-BirA\*-HA et HEK293 gM-BirA\*-HA ont été mises en croissance dans une plaque de 24,5 cm par condition

pour avoir une confluence de 75% pour le traitement à la D-Biotine (50  $\mu$ M) pendant 24 h. Avant que l'incubation avec la D-biotine ne se termine, les cellules ont été infectées pendant 4 h ou 12 h avec le  $\Delta$ gM-2 (2xATG) VHS-1 à MOI 5 de telle sorte que l'incubation à la biotine et l'infection se terminent en même temps. Pour récolter les cellules, les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS 1X puis après les avoir grattées, ont été collectées dans des tubes de 15 ml avant d'être centrifugé à 500xg pendant 5min à 4°C. Le surnageant est enlevé et du tampon Ripa froid a été ajouté au culot (fraîchement complété avec la benzonase et la CLAP 1X). Deux cycles de sonication ont été appliqués avec 30 *pulses* à une amplitude de 30% et à une puissance de 3 sur glace avec l'appareil Branson Sonifier 450. Ensuite, du Tris-HCl (50mM, pH 7.4) a été ajouté avant un autre cycle de sonication comme décrit ci-dessus puis les échantillons ont été centrifugés à 16 000xg 10 min à 4°C. Pour l'immunobuvardage, 10% du lysat total a été gardé. Au même moment, les billes de Streptavidin-Sepharose (GE Healthcare, 170969-01) ont été resuspendues et lavées trois fois dans 1 ml de Ripa Buffer avec une centrifugation de 2 000 rpm pendant 1 min à 4°C. Cette étape permet l'équilibration des billes dans le tampon. Les échantillons ont été ajoutés à 70  $\mu$ l de billes et incubés pendant 3 h à 4°C suivis d'une centrifugation à 2 000 rpm pendant 1 min à 4°C. Trois étapes de lavages successifs ont été effectuées dont les deux premiers avec le Ripa Buffer et le troisième avec l'ammonium bicarbonate (ABC) (50 mM) à 4°C avec une centrifugation à 2 000 rpm de 1 min à 4°C entre chaque lavage. Enfin, les échantillons ont été resuspendus dans 100  $\mu$ l d'ABC et ont été quantifiés avec le Kit Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay (PI23227).

### **3.11 Digestion des protéines biotinylées et LC-MS/MS**

Les échantillons purifiés ont été envoyés à la plateforme protéomique de l'Institut de Recherche Clinique de Montréal (IRCM) et la digestion des échantillons a été fait comme suit. Les protéines sur billes ont été digérées avec 0.5  $\mu$ g de trypsine (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega) toute la nuit à 37°C sous agitation. Les surnageants ont été collectés et les billes lavées deux fois avec 100  $\mu$ l d'eau. Les surnageants de chaque lavage ont été regroupés puis réduit et alkylés. L'étape de réduction a été faite avec 9 mM de dithiothreitol à 37°C pendant 30min et, après avoir refroidi pendant 10 min, l'étape d'alkylation a été faite avec 17 mM d'iodoacetamide à RT pendant 20 min dans le noir. Les surnageants ont été acidifiés avec l'acide



trifluoroacétique pour enlever les sels et tous résidus de détergents par MCX (Waters Oasis MCX 96-well Elution Plate) suivant les instructions du fabricant. Après l'élution dans 10% d'hydroxyde d'ammonium /90% méthanol (v/v), les échantillons ont été séchés avec un Speedvac et reconstitués sous agitation pendant 15 min dans 15 µl de 5%FA et chargés dans une colonne C18 Self-Pack (75 µm i.d. x 150 mm) installée dans le système Easy-nLC II (Proxeon Biosystems). Les tampons utilisés pour la chromatographie étaient 0.2% d'acide formique (A) et 90% d'acétonitrile / 0.2% d'acide formique (B). Les peptides ont été élués sur gradient avec un débit de 250 nl/min. Le système HPLC était couplé à un spectromètre de masse Q Exactive (Thermo Scientific) via une source d'ion de Nanospray Flex. Le voltage du Nanospray et de la S-lens était fixé à 1.3-1.8 kV et 50 V, respectivement. La température capillaire était de 225°C. Les spectres de sondage MS à balayage (m/z 360-2000) ont été acquis avec une résolution de 70 000. Les spectres MS/MS ont été analysés dans Orbitrap.

### **3.12 Identification des protéines**

La recherche dans la base de données de protéines a été effectuée avec Mascot 2.6 (Matrix Science) avec la base de données Refseq humaine couplée à la base de données du virus VHS-1. L'interprétation des données a été effectuée sur Scaffold (version 4.8). Seuls les hits prenant en compte les paramètres suivants ont été considérés : seuil de protéines et de peptides (>95%), nombre de peptides (>2), l'enrichissement (>10) et leur présence dans les triplicatas indépendants.

### **3.13 Traitement aux siRNA**

Les cellules 143Bensemencées dans des plaques de 6 puits ont été transfectées pendant 48h avec l'agent de transfection LipoJet (SignaGen laboratories, SL100468) selon les instructions du fabricant. Les cellules ont été transfectées avec les dsiRNA ciblant les protéines SNX1 (dsiSNX1, 25 nM), SNX2 (dsiSNX2, 50 nM), SCAMP3 (dsiSCAMP3, 25 nM), VPS33B (dsiVPS33B, 25 nM) (Integrated DNA Technologies). Les cellules ont également été traitées avec un siRNA contre Rab15 (siRab15, 50 nM) comme contrôle.

### 3.14 Test de viabilité

Un test de viabilité cellulaire a été effectué avec l'Alamar Blue (BioRad, BuF012A) sur les cellules 143B transfectées avec les dsRNA dans des plaques de 96 puits. Après 48h de transfection, 10% d'Alamar Blue a été ajouté aux cellules et les plaques ont été incubées pendant 3 h à 37°C. La mesure de la fluorescence a été faite avec le lecteur de plaque à fluorescence spectramax (GeminiEM) avec les paramètres d'excitation à 560 nm et d'émission à 590 nm. Les pourcentages de viabilité des cellules ont été normalisés sur la condition avec l'agent de transfection LipoJet.

### 3.15 RT-qPCR

Faisant suite à l'inhibition de l'expression des protéines SNX1, SNX2, SCAMP3 et VPS33B (voir plus haut), l'ARN total a été extrait en utilisant le kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Z3100). Les ARNs ont ensuite été transformés en ADNc avec une transcriptase inverse ADNc à haute capacité (Applied Biosystems) en suivant les instructions du fabricant. Les ADNc ont été analysés par PCR quantitative en utilisant le LightCycler 96 (Roche). Les gènes ont été quantifiés en utilisant une courbe standard et normalisés à un contrôle endogène (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)). Toutes les PCRs ont été effectuées en utilisant le SYBR Green (Molecular Probes) et les amorces listées dans le **tableau I**.

Gènes	Protéines	Amorces Forward (5' → 3')	Amorces Reverse (5' → 3')
SNX1	SNX1	caacaaagccacagatgcc	ttgcctcagagctccaag
SNX2	SNX2	aactccaatggcccaaaacc	aaagatcacgggagcagaca
VPS33B	VPS33B	cgtcttcggtggtgcttatg	cctttctctgcccaggaa
SCAMP3	SCAMP3	tcgtccaggatgtgctcttt	cggcgggtataaggagtggat

MTMR6	MTMR6	ggtgcattgttccgatggt	actgttcgggtcaaagccac
TMEM43	TMEM43	gctagtagccattctccacca	acagaaggcaaaggcttca
XPO6	XPO6	cagttccctgtggtggagtt	gcttccttgtctccaagacg
GAPDH	GAPDH	gagtcaacggatttggcgt	ttgattttggaggatctcg

**Tableau I : Amorces pour PCR.**

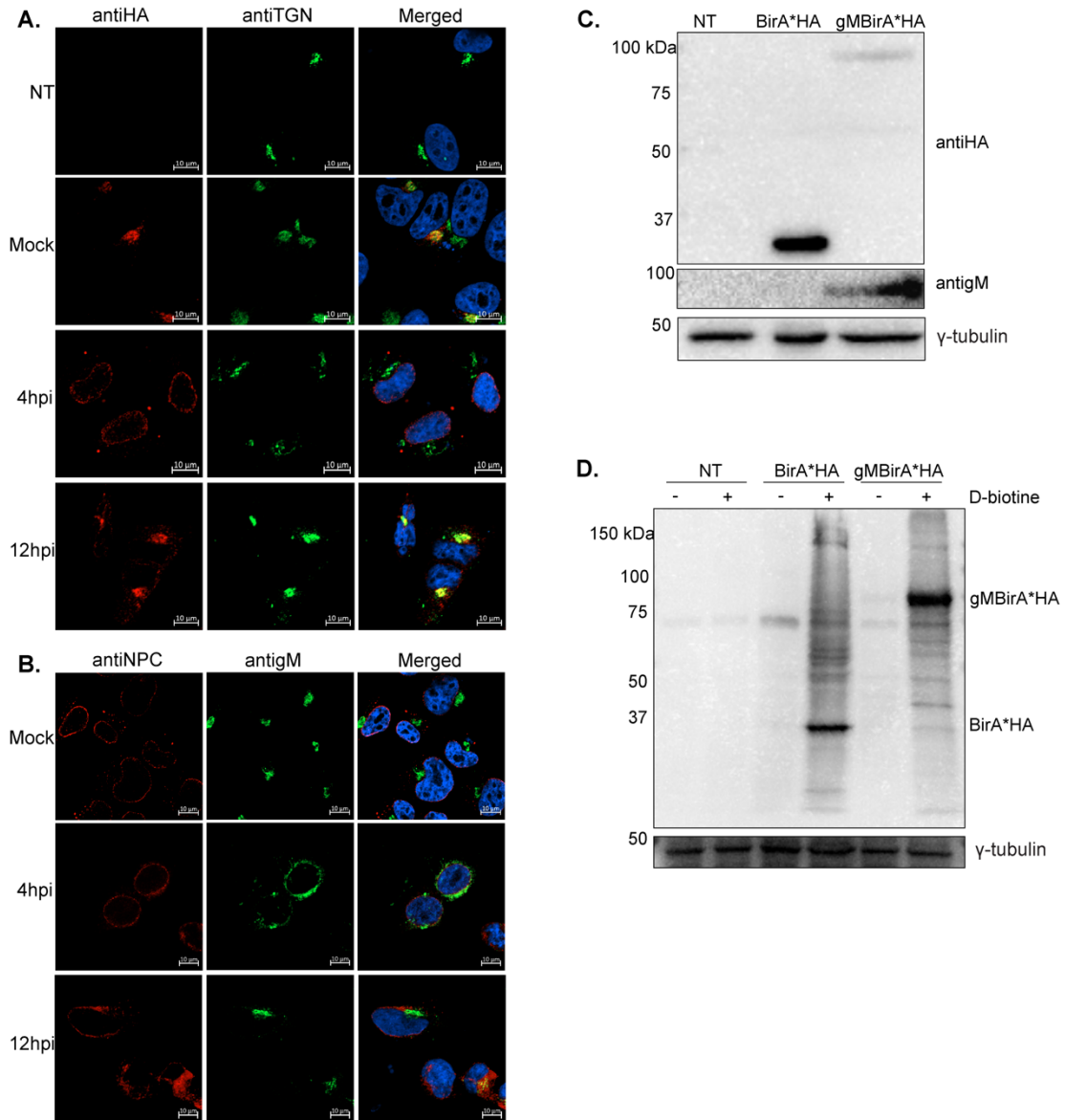
### **3.16 Analyses statistiques**

Toutes les données ont été exprimées avec les valeurs moyennes  $\pm$  la déviation standard de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées avec le test de Student bilatérale (Graphpad Prism version 8).

## 4 Résultats

### 4.1 Validation de la construction de gMBirA\*HA et établissement d'une lignée cellulaire

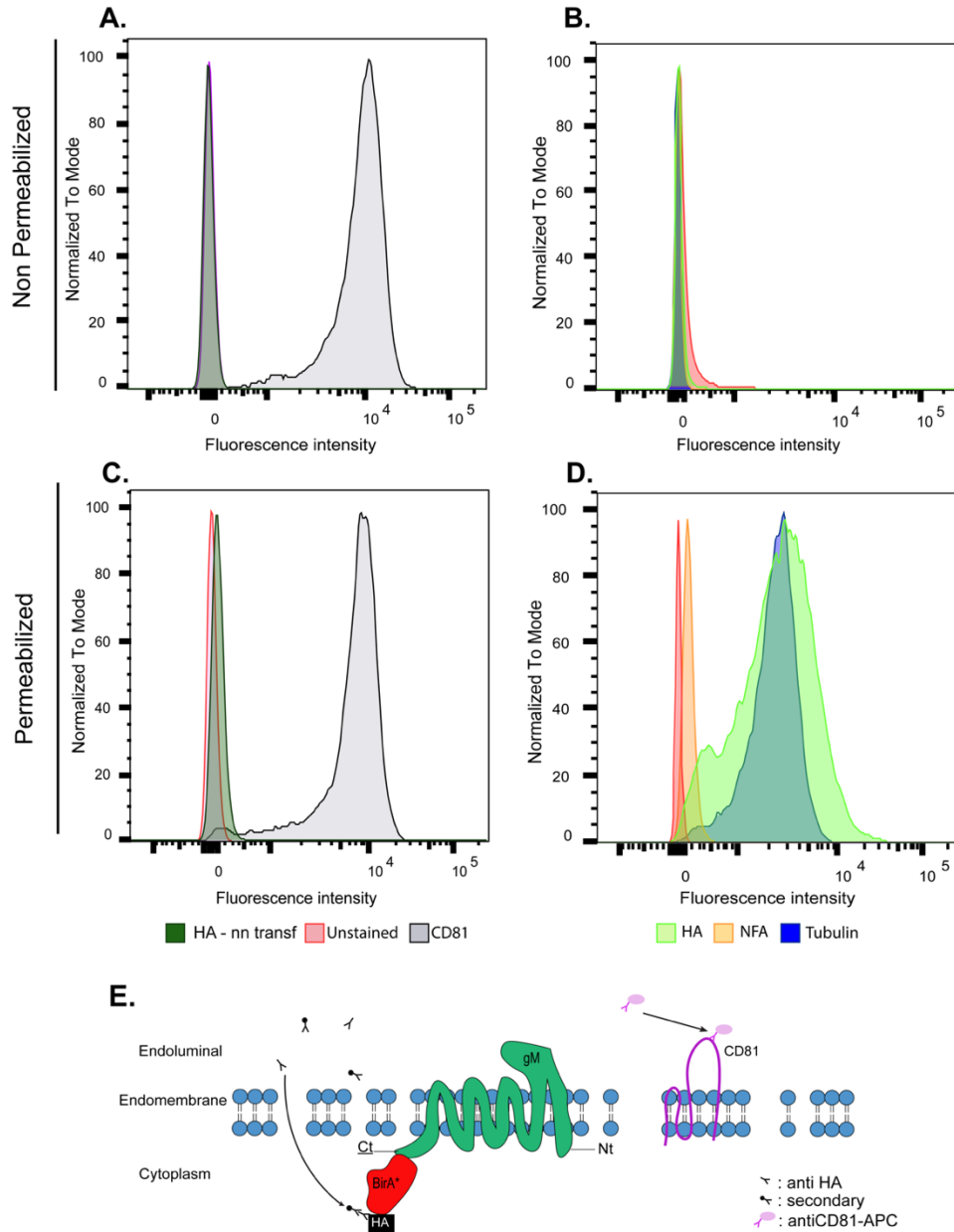
Il a été montré dans le laboratoire que lors d'une transfection transitoire, gM était localisée au TGN en absence d'infection puis à la MN et au TGN lorsque la transfection était suivie d'une infection (respectivement 4 hpi et 12 hpi) [155]. Nous nous sommes donc demandé si notre construction gM-BirA\*HA se comportait comme gM, ce qui était indispensable avant l'établissement des lignées cellulaires. Les cellules 143B TK<sup>-</sup> transfectées avec le plasmide pcDN5FRT gM-BirA\*-HA ont été infectées, ou non, avec le virus ΔgM-2 VHS-1 (4 h ou 12 h, MOI 5) afin d'éviter une sur expression de gM. En effet, ce virus mutant n'exprime pas gM car il possède une délétion des deux codons *start* ATG en amont du gène de gM qui l'empêche d'être exprimé. En absence d'infection, la construction a uniquement été retrouvée au TGN, visible avec la colocalisation entre le marquage à l'anti-HA et le TGN. Suite à l'infection de 4 hpi ou 12 hpi, la construction est respectivement délocalisée à la MN et au TGN (**Figure 9A**). La localisation nucléaire de la construction à 4 hpi a été confirmée par la colocalisation entre la protéine gM et les NPC (**Figure 9B**). Ceci montre que la construction est fonctionnelle et qu'elle peut être utilisée pour l'établissement d'une lignée HEK293 gM-BirA\*-HA. En parallèle, on a également généré la lignée contrôle HEK293 BirA\*-HA. L'expression et l'activité de biotinylation des constructions dans les lignées établies depuis les cellules HEK293 FlpIn ont été vérifiées par immunobuvardage (**Figure 9 C et D**).



**Figure 9 : La construction gM-BirA\*-HA est délocalisée dans les membranes nucléaires à 4 hpi et au TGN à 12 hpi.** (A-B) Transfection transitoire des cellules 143B TK<sup>-</sup> avec le plasmide pcDNA5FRT gM-BirA\*-HA puis infectées avec le ΔgM-2 VHS-1 (4 ou 12 h, MOI 5). (A) IF sur les cellules marquées à l'anti-HA ou l'anti-TGN46 ou (B) avec l'anti-NPC et l'anti-gM. (C) Immunobuvardage pour vérifier l'expression des constructions dans les lignées HEK293 BirA\*-HA et HEK293 gM-BirA\*-HA. (D) Validation de l'activité de biotinylation de BirA\* dans les constructions. Les protéines biotinylées sont détectées avec la Streptavidin-HRP. La γ-tubuline est utilisée comme témoin de charge. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

## 4.2 Confirmation de l'orientation de la glycoprotéine M

La prédiction faite sur la topologie de gM indique une orientation cytoplasmique pour le Ct et le Nt. Sachant que gM est localisée à la MNI et à la MNE lors d'une infection (4 hpi), la prédiction indiquerait que le Ct et le Nt pourraient être cytoplasmiques ou nucléoplasmiques, selon la membrane où gM se trouve. Dans la lignée cellulaire HEK293 gM-BirA\*-HA, le segment BirA\*-HA est au Ct de gM dans la construction et BirA\* se retrouverait donc au cytoplasme ou le nucléoplasme. Toutefois, dans notre lignée contrôle HEK293 BirA\*-HA, BirA\* ne peut être que nucléaire. Pour cette raison, nous avons opté de vérifier l'orientation de M et au besoin de générer une lignée contrôle supplémentaire en ciblant BirA\* au noyau par l'ajout d'un signal NLS. La lignée HEK293 gM-BirA\*-HA a donc été utilisée pour étudier l'orientation de gM par FACS. Cette expérience se base sur la capacité de l'anticorps à reconnaître l'étiquette HA de la construction selon la condition de perméabilisation des cellules. La perméabilisation permet l'entrée des anticorps dans les cellules et donc de reconnaître sa cible si celle-ci est uniquement cytoplasmique (**Figure 10C-D**), contrairement à la condition non perméabilisée où l'anticorps restera en surface (**Figure 10A-B**). Les résultats indiquent que les cellules HEK293 gM-BirA\*-HA non perméabilisées ne présentent aucun signal avec l'anti-HA (**Figure 10B**). De plus, aucun signal n'est détecté par le marquage à la tubuline qui a été utilisé comme témoin cytoplasmique appuyant le résultat négatif du marquage à l'anti-HA. En revanche, un fort signal est obtenu par le marquage HA dans la condition où les cellules HEK293 gM-BirA\*-HA ont été perméabilisées, ainsi qu'avec le marquage à la tubuline permettant d'affirmer que les cellules ont été perméabilisées (**Figure 10D**). Étant donné qu'il s'agit de la seule condition où l'on a un signal avec HA ceci suggère que l'étiquette HA est cytoplasmique. Par conséquent, on peut conclure que le Ct de gM, où y est fusionné BirA\*-HA, est cytoplasmique (**Figure 10E**). L'orientation prévue de gM est donc confirmée pour l'orientation du Ct dans le cytoplasme signifiant une orientation nucléoplasmique lorsque gM est à la MNI.

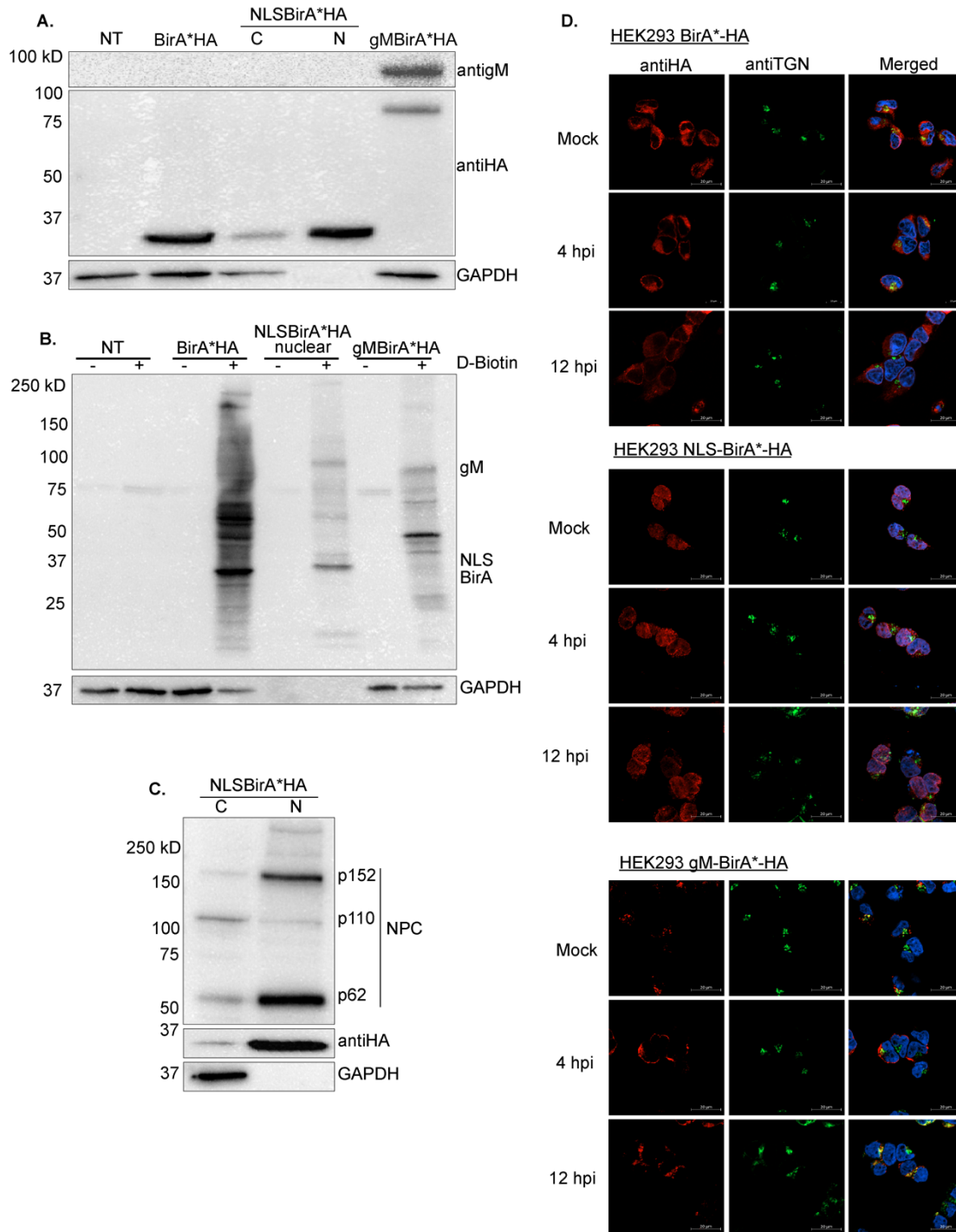


**Figure 10 : Le C-terminal de gM est cytoplasmique.** Les lignées HEK293 FlpIn et HEK293 gM-BirA\*-HA ont été utilisées pour évaluer, par cytométrie de flux (FACS), l'orientation de gM. Les cellules ont été perméabilisées (A-B) ou non perméabilisées (C-D). (A-C) Les cellules HEK293 FlpIn ont été utilisées comme contrôles négatifs et non marquées ou marquées à l'anti-HA ou à l'anti-CD81-APC qui a été utilisé comme marqueur de surface. (B-D) Les deux lignées ont été non marquées ou marquées avec l'anti-HA, sans premier anticorps (NFA) ou avec l'anti  $\gamma$ -tubulin. (E) Schéma de la condition perméabilisée montrant l'orientation de gM-BirA\*-HA suite au résultat du FACS confirmant que le Ct de gM est cytoplasmique. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

### 4.3 Localisations et expressions dans les lignées cellulaires

L'orientation de gM confirmée, la lignée HEK293 BirA\*-HA a été utilisée pour l'établissement de la lignée HEK293 NLS-BirA\*-HA. Par mutagenèse dirigée, la séquence SV40 NLS a été insérée en amont de BirA\*-HA dans le plasmide. Après vérification de la construction par séquençage, la lignée cellulaire HEK293 NLS-BirA\*-HA a été établie. Cette séquence de signalisation nucléaire permet à la construction d'être spécifiquement ciblée au noyau. Toutes les lignées expriment stablement et respectivement les constructions BirA\*-HA (35 kDa), NLS-BirA\*-HA (35 kDa) ou gM-BirA\*-HA (89 kDa) (**Figure 11A**). L'activité de biotinylation de BirA\* a également été analysée dans ces lignées après avoir été incubées pendant 24 h avec la D-Biotine. Suite à cette incubation, le lysat cellulaire total des lignées est collecté sauf pour la lignée HEK293 NLS-BirA\*-HA où l'on procède à une isolation nucléaire puisque que la construction est nucléaire. Les échantillons sont ensuite analysés par immunobuvardage. Dans toutes les lignées, on détecte des protéines biotinylées en présence de D-Biotine montrant que l'enzyme BirA\* est active dans les lignées (**Figure 11B**). De plus, il semble que l'on ait plus de protéines biotinylées dans la lignée HEK293 BirA\*-HA que dans les autres. Ceci peut s'expliquer par le fait que BirA\*-HA est cytoplasmique, et par conséquent biotinylise tout ce qui passe à côté tandis que dans les cellules HEK293 gM-BirA\*-HA, seules les protéines qui interagissent potentiellement avec gM sont biotinylées. L'isolation nucléaire faite sur les HEK293 NLS-BirA\*-HA montre une expression nucléaire de la construction dont la technique d'isolation nucléaire est confirmée avec le signal obtenu avec le marquage du NPC et de GAPDH (**Figure 11C**). En parallèle, l'influence de l'infection sur la localisation de chacune des constructions a été étudiée par IF. Le virus  $\Delta$ gM-2 VHS-1 a été choisi afin d'éviter une sur expression de gM dans la lignée HEK293 gM-BirA\*-HA. Les localisations des constructions BirA\*-HA (cytoplasmique) et NLS-BirA\*-HA (nucléaire) ne sont pas affectées par l'infection (**Figure 11D**) contrairement à la lignée HEK293 gM-BirA\*-HA où l'on a une délocalisation de la construction concordant à ce qui a été vu par transfection transitoire (**Figure 9A-B**). Ces résultats permettent de montrer que les lignées cellulaires expriment stablement leur construction et peuvent être utilisées pour la BioID.



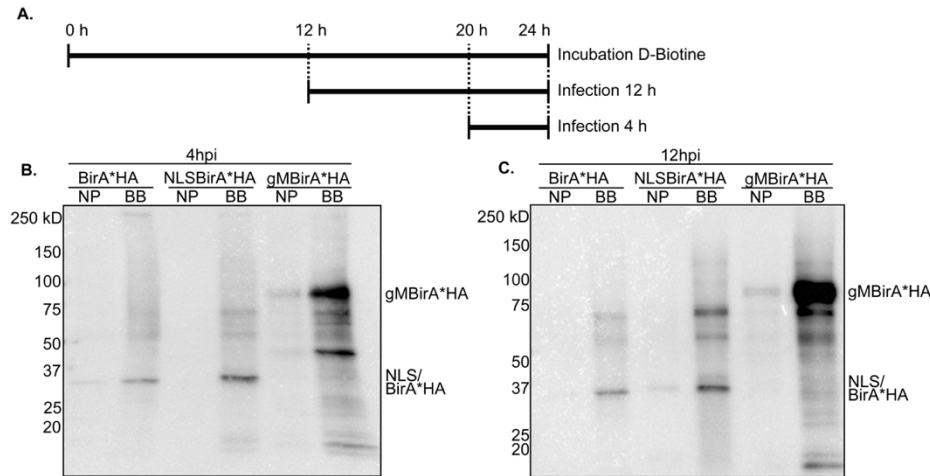


**Figure 11 : Analyse de l'expression, localisation et activité de BirA\* dans les lignées cellulaires.** (A) Les cellules ont été collectées pour avoir le lysat cellulaire total ou collectées par isolation nucléaire et analysées par immunobuvardage. (B) Les cellules ont été collectées avec ou sans incubation à la D-Biotine (24 h, 50 μM) pour évaluer l'activité de BirA\* par immunobuvardage. Les protéines biotinylées sont marquées avec la Streptavidin-HRP. (C) Isolation nucléaire sur la lignée HEK293 NLS-BirA\*-HA. L'anti-NPC est

utilisé comme autre contrôle que GAPDH pour l'isolation nucléaire. GAPDH est utilisée comme témoin de charge. (D) Immunofluorescence sur les lignées sans ou avec infections  $\Delta$ gM-2 VHS-1 (MOI 5, 4 hpi ou 12 hpi) avec marquage du TGN et des constructions via l'anti-HA. (NT : non transfectées; C : cytoplasme; N : noyau). Des barres d'échelles ont été appliquées aux images (10 $\mu$ m). Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

## 4.4 Purification des protéines biotinylées par BioID

Avant d'envoyer les échantillons pour analyse au MS, il est nécessaire de vérifier l'enrichissement des protéines biotinylées après purification. D'après l'équipe de Roux *et al.* [215], le temps optimal d'incubation à la biotine avec l'enzyme BirA\* est de 24h. C'est pourquoi les lignées cellulaires HEK293 BirA\*-HA, HEK293 NLS-BirA\*-HA et HEK293 gM-BirA\*-HA ont été incubées avec la D-Biotine pendant 24h (50  $\mu$ M). Au même moment, les lignées sont infectées avec le virus  $\Delta$ gM-2 VHS-1 (4 hpi ou 12 hpi) de tel sorte à ce que la fin de l'infection coïncide avec la fin de l'incubation à la D-biotine et permet la collecte des échantillons en même temps (**Figure 12A**). Afin de différencier le processus de ciblage de gM à la MN à 4 hpi de son ciblage au TGN à 12 hpi, les noyaux des lignées cellulaires infectées 4 h ont été isolés tandis que le lysat cellulaire total a été collecté pour la condition 12 hpi. Les protéines biotinylées ont été purifiées sur colonne à l'aide de billes de Sepharose-Streptavidine qui présentent une forte affinité à la biotine. Une fraction des protéines biotinylées purifiées (BB = *bead bound*) destinées à la spectrométrie de masse (MS) a été gardée pour analyse par immunobuvardage (**Figure 12 B-C**). L'immunobuvardage permet de montrer un enrichissement des échantillons BB comparativement aux échantillons NP (**Figure 12 B-C**). Ceci indique que toutes les protéines biotinylées ont été correctement purifiées et que les échantillons sont suffisamment enrichis pour la MS.

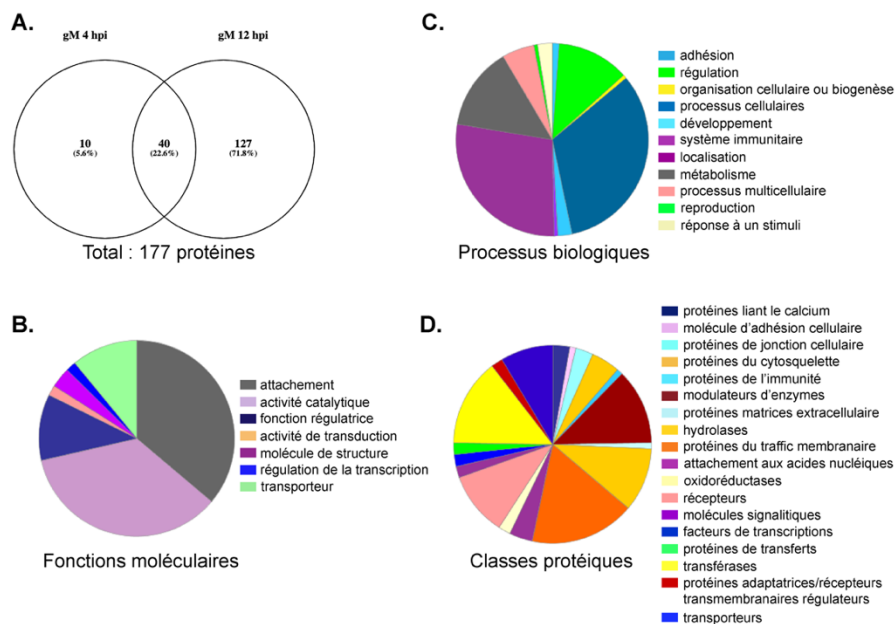


**Figure 12 : Les échantillons destinés à la spectrométrie de masse sont enrichis en protéines biotinylées.** (A) Représentation de la stratégie adoptée pour l'incubation et les infections des lignées cellulaires sur 24 h. Les lignées cellulaires ont été incubées avec la D-Biotine (50 μM, 24h) et infectées avant la fin de cette incubation avec le virus ΔgM-2 VHS-1 à 4 h ou 12 h (MOI 5). (B et C) Les cellules ont été collectées pour obtenir le lysat cellulaire total ou les noyaux isolés. Les échantillons non purifiés (NP) et purifiés (BB = bead bound) sont analysés par Immunobuvardage selon le temps d'infection, 4 hpi (B) ou 12 hpi (C). Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

## 4.5 Analyse des résultats obtenus par MS

Les protéines biotinylées et purifiées ont été identifiées par MS et analysées avec le logiciel Scaffold en prenant compte des paramètres suivant : nombre de peptides (>2), seuil de protéines et de peptides (95%) et leur présence dans les triplicatas indépendants. Ces trois paramètres permettent d'exclure un grand nombre de faux positifs. L'analyse des protéines restantes a été basée sur l'utilisation de diagrammes de Venn qui permet l'exclusion rapide des protéines identifiées entre les lignées contrôles et la lignée HEK293 gM-BirA\*-HA (4 hpi ou 12 hpi). À la fin de cette analyse, c'est un total de 177 partenaires potentiels de gM qui ont été trouvés et qui pourraient être impliqués dans sa délocalisation (**Figure 13A, Annexe 2**). Parmi les protéines identifiées, gM est la seule protéine d'origine virale qui a été trouvée à 4 hpi et 12 hpi. Il est logique de la trouver puisque BirA\* biotine dans un rayon de 10 nm environ et étant couplé à gM, cette dernière est donc biotinylée. Aucun partenaire viral connu de gM n'a été identifié lors de cette analyse ce qui confirme qu'ils ne sont effectivement pas impliqués dans ses délocalisations ([183], [155]). Étonnamment, aucune autre protéine virale, excepté gM, n'a

été trouvée dans l'analyse. Or, il a été montré que les délocalisations de gM sont dépendantes de l'infection et on en a déduit que de nouveaux partenaires viraux interviendraient en interagissant avec gM. N'ayant trouvé aucune protéine virale, il se peut que le virus participe indirectement au ciblage de gM en recrutant des protéines de l'hôte ou en stimulant des voies cellulaires comme celles impliquées dans le transport. D'ailleurs, les autres protéines identifiées sont des protéines cellulaires intervenant dans toutes sortes de processus cellulaires



**Figure 13 : Résultats de l'identification des potentiels partenaires de gM à 4 h et 12 h d'infection.** (A) Le diagramme de Venn a été fait en utilisant le logiciel disponible en ligne Venny 2.0 [220]. (C-D) Les gènes des protéines identifiées ont été classifiés, à l'aide de PANTHER [221], selon leurs fonctions de trois manières différentes : processus biologique, fonctions moléculaires ou leur classe protéique. Voir l'annexe 2 pour la liste des protéines identifiées.

Afin de mettre en lumière la diversité protéique identifiée, une analyse ontologique des gènes de ces protéines a été effectuée en utilisant PANTHER ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org)) [221] (Figure 13 B-D). Dans les processus biologiques, les clusters les plus représentatifs identifiés sont regroupés dans les processus cellulaires et de localisations (Figure 13C). Par exemple, les processus cellulaires regroupent les protéines jouant un rôle dans l'homéostasie, la mort cellulaire (exécution de l'apoptose) et la polarité cellulaire alors que les processus de localisation regroupent les protéines du transport. En minorité, le cluster de réponse à un stimulus regroupe les protéines qui deviennent actives suite à l'intervention d'un autre facteur. En revanche, les

clusters d'attachement et d'activité catalytique dominant dans les fonctions moléculaires (**Figure 13 B et C**). Les classes protéiques les plus représentatives sont les transférases (méthyltransférases, kinases ...), les récepteurs, les protéines du trafic membranaire ou vésiculaire (protéines SNAREs, protéines du manteau des vésicules ...) et les enzymes modulatrices (protéines G, phosphatases ...) (**Figure 13D**). À noter que le cluster des transférases et des protéines de transferts correspond à la même chose. De manière générale ce sont les protéines intervenantes dans le trafic vésiculaire qui dominant dans notre analyse et sont présentes dans les conditions de 4 h, de 12h ou les deux (**Annexe 2**). Ceci suggère que l'infection permet le recrutement de protéines de l'hôte, du moins certaines d'entre elles, et permettrait la délocalisation de gM au noyau et au TGN. Évidemment, bien que l'analyse montre une quantité importante de protéines identifiées, il est nécessaire de passer par une étape de validation afin de vérifier la véracité de leur interaction avec gM et leur impact sur sa localisation.

## 4.6 Résultats préliminaires de la validation des hits

*Les résultats concernant les protéines TMEM43, MTMR6 et XPO6 ont été obtenus avec l'aide de Josiane Hawkins, étudiante en stage à l'été 2019 au sein de notre laboratoire.*

### 4.6.1 Choix des premières protéines à cibler pour la validation

L'étape de validation des cibles permettra de valider ou invalider, leur rôle en tant que partenaire de gM dans son ciblage. Parce que le processus de ciblage des protéines à la MNI est encore très mal connu, nous nous concentrons dans un premier temps sur la validation de certaines protéines trouvées dans la condition 4 hpi. Comme indiqué, les protéines SNX1 et SNX2 (*Sorting nexin 1 et 2*), VPS33B (*Vacuolar protein sorting-associated protein 33B*), SCAMP3 (*Secretory Carrier-Associated Membran Protein 3*) et MTMR6 (*Myotubularin-related protein 6*) sont présentes dans la condition où les cellules ont été infectées pendant 4 h et représentent donc de bons candidats pour le ciblage de gM aux différentes membranes nucléaires (**Tableau II**).

Numéro d'accession	Gènes	Protéines	MW (kDa)	Temps d'infection (4 hpi, 12 hpi ou les deux)
--------------------	-------	-----------	----------	---

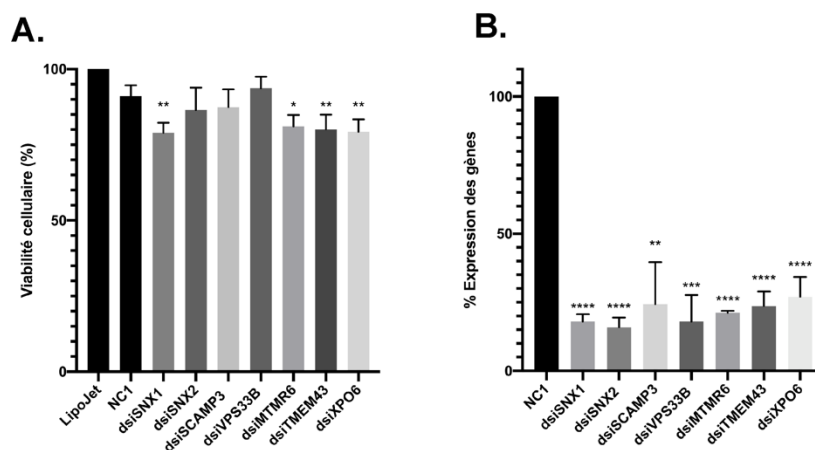
B3KW08_HUMAN / XP06_HUMAN	XP06	Exportin-6	127	12 hpi
MTMR6_HUMAN	MTMR6	Myotubularin-related protein 6	72	4 hpi
Q6FHJ5_HUMAN	SCAMP3	Secretory carrier-associated membrane protein 3	38	4 hpi
SNX1_HUMAN	SNX1	Sorting nexin 1	59	4 hpi
SNX2_HUMAN	SNX2	Sorting nexin 2	58	4 hpi
TMM43_HUMAN	TMEM43	Transmembrane protein 43	45	4 hpi et 12 hpi
VP33B_HUMAN	VPS33B	Vacuolar protein sorting-associated protein 33B	71	4 hpi

**Tableau II : Listes des protéines choisies pour validation.**

SNX1 et SNX2 sont impliquées dans de nombreuses étapes du trafic vésiculaire. Par exemple, SNX1 fait partie du complexe SNX-BAR qui permet le transport rétrograde des protéines vers le TGN et serait impliqué dans la déformation des membranes en induisant une courbure de celle-ci facilitant l'assemblage de complexes protéiques pour la formation de vésicules ([222], [223]). Par ailleurs, SCAMP3 est impliquée dans la voie post-Golgi et pourrait donc être un partenaire potentiel pour gM [224]. Lors de notre analyse, des protéines ont été identifiées à la fois dans les lignées contrôles et dans la lignée exprimant gM-BirA\*-HA. Cependant, on obtenait pour certaines protéines un enrichissement dix fois supérieur (>10) dans la lignée gM-BirA\*-HA par rapport aux lignées contrôles. Il a donc été décidé de considérer ce paramètre dans notre analyse. La protéine TMEM43 (*Transmembrane protein 43*), retrouvée dans la condition 4 hpi et 12 hpi, est un exemple de protéine enrichie. Elle est intéressante car c'est une protéine transmembranaire localisée à la MNI [225]. Il se pourrait qu'elle y soit ciblée de la même manière que gM. Enfin, l'exception de cette étape de validation est la protéine XPO6 (*Exportine-6*) qui est trouvée dans la condition 12 hpi. Son rôle est de recruter des cargos dans le nucléoplasme grâce à la Ran-GTP et permet l'exportation nucléaire du complexe profiline/actine à travers les NPC [226]. Cette dernière pourrait être une cible intéressante afin d'expliquer la sortie de gM depuis la MN voire même une éventuelle implication sur la sortie du virus depuis le noyau.

## 4.6.2 Knockdown des cibles par dsRNA

Pour montrer si les protéines identifiées choisies pour validation sont bien impliquées dans les localisations de gM, ces protéines ont été ciblées par dsRNA afin d'inhiber leur expression. Le temps d'incubation de 48h a été choisi du fait de la demi-vie de la plupart des protéines (4 à 30 h) (ProtParam, <https://web.expasy.org/protparam/>). En premier lieu, l'effet des knockdowns des protéines sur la viabilité cellulaire a été testé avec l'Alamar Blue. Ce test permet de connaître l'effet des knockdowns des cibles sur le métabolisme des cellules. Dans l'ensemble, il n'y a pas d'effet observé sauf pour SNX1, MTMR6, TMEM43 et XPO6. Leur inhibition semble avoir un effet sur la viabilité cellulaire avec une diminution de la viabilité de 20% environ (**Figure 14A**). L'inhibition des cibles est directement responsable de cette diminution de viabilité, comme le montre les résultats de RT-qPCR indiquant que chacune des cibles est correctement inhibée à hauteur de 75-80% environ. (**Figure 14B**).



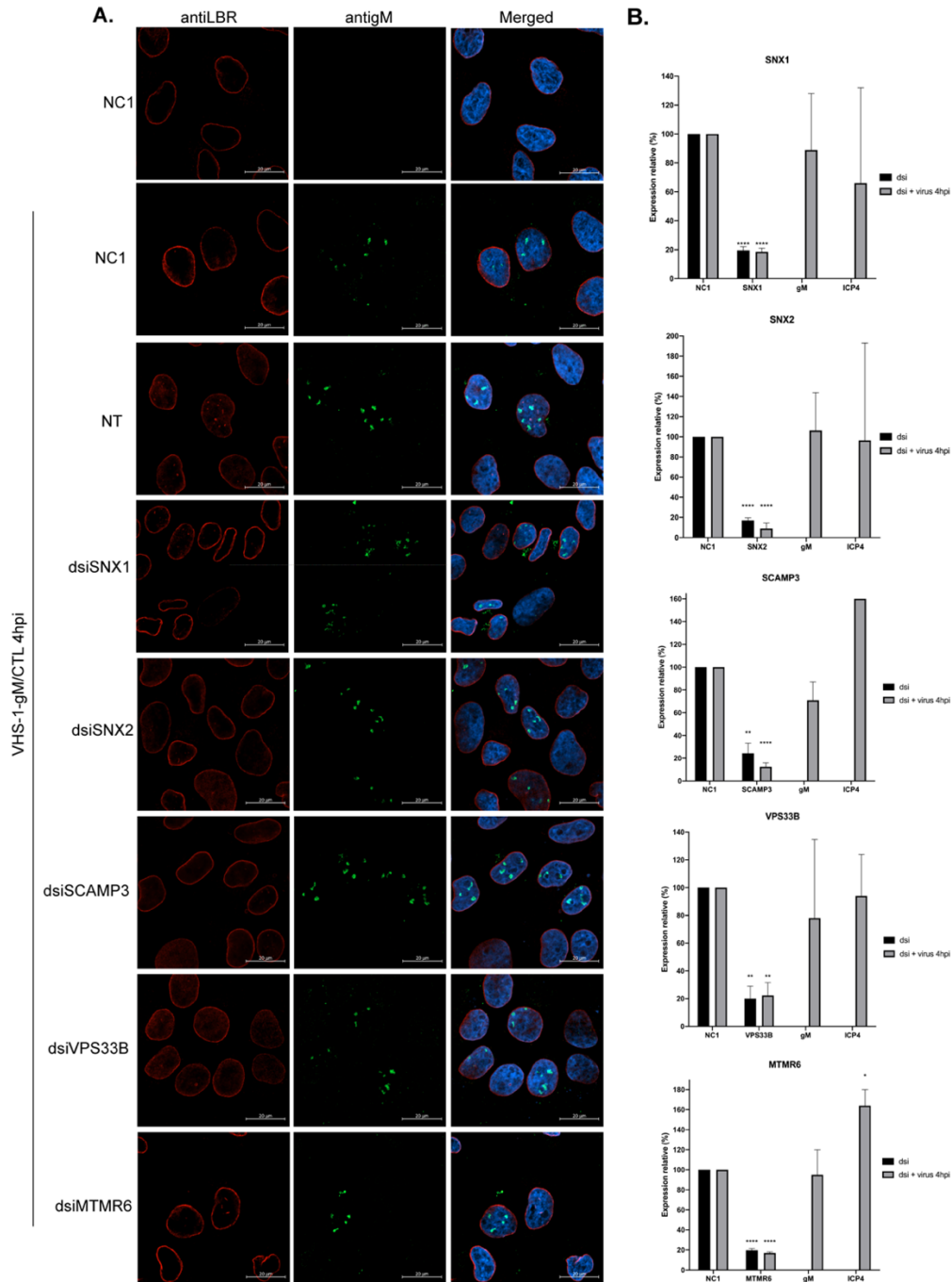
**Figure 14 : Les dsRNA affectent plus ou moins la viabilité cellulaire et diminuent efficacement l'expression des cibles.** Les cellules ont été transfectées avec les dsRNA dirigés contre leur cible pendant 48 h avec le LipoJet. (A) La viabilité cellulaire des 143B TK<sup>+</sup> est mesurée avec l'Alamar Blue. (B) Effets des dsRNA sur l'expression des gènes (%) a été mesurée par RT-qPCR. Les valeurs moyennes et l'erreur type des moyennes proviennent de trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre les conditions traitées et le LipoJet seul ou le contrôle NCI (non-targeting control) ont été analysées avec le test de Student bilatéral sur la moyenne des échantillons (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ ).

### 4.6.3 Les protéines identifiées à 4 hpi et choisies pour validation ne semblent pas avoir d'impact sur la localisation de gM aux MN

Nous souhaitons maintenant observer si les knockdowns des cibles affectent la délocalisation de gM dans les cellules 143B TK<sup>-</sup> au cours d'une infection. Les cellules sont transfectées 48 h avec les dsiRNA, ou le NC1 (*non-targeting control*), puis infectées pendant 4 h avec le virus VHS-1-gM/CTL où gM est taguée avec l'étiquette VSV-G. Nous n'avons pas encore d'anticorps disponible contre les cibles mais des RT-qPCR sont faites en parallèle des IF pour montrer les knockdowns des cibles. De plus, l'expression de gM est observée pour s'assurer que les dsiRNA n'affectent pas son expression. De même, bien que l'expression de gM puisse être un contrôle en soi de l'infection, nous regardons également l'expression d'ICP4 (*Infected-cell polypeptide 4*), une protéine précoce du VHS-1, permettant d'apprécier l'infection des cellules. Il est à noter que l'anti-LBR est utilisé comme marqueur de MNI mais étant une protéine transmembranaire, ce marquage permet également de contrôler si les knockdowns des cibles affectent son transport vers la MNI. L'utilisation du virus HSV-1-gM/CTL permettait l'utilisation d'un anti-VSV-G, étiquette sur gM, afin de résoudre le problème de spécificité d'espèce des anticorps dans la condition d'IF où l'on marquait gM et le TGN simultanément. En effet, les anti-TGN46 (commercial) et anti-gM (non commercial) disponibles au laboratoire proviennent tous deux du lapin. L'anti-VSV G (anti mouse) était donc l'alternative pour l'anti-gM. Cependant, l'anti-VSV G n'ayant pas fonctionné, ces résultats ne sont pas présentés. Nous cherchons encore un contrôle additionnel pour montrer que les éventuels effets de localisation des cibles sur gM soient spécifiques en ciblant une autre protéine du trafic vésiculaire. Cette protéine cible doit respecter le fait qu'elle n'interviendrait en rien aux localisations de gM en choisissant une voie de transport éloignée comme celle entre les exosomes et les lysosomes. Précédemment, nous avons choisi RAB7A et RAB15 mais leur knockdown ne fonctionnait pas dans les conditions infectées ou non. Quoiqu'il en soit, il semblerait que le knockdown de SNX1, SNX2, SCAMP3, VPS33B et de MTMR6 n'ait pas d'impact sur la délocalisation de gM à 4 hpi. En effet, on observe une distribution de gM dans les invaginations nucléaires lorsque les cellules sont traitées aux dsiRNA dont le signal est le même que pour les conditions non traitées (NC1 et NT) (**Figure 15A**). Le knockdown des cibles est efficace et ne semble pas affecter l'infection, comme le montre les données de RT-qPCR, même si de grandes variations



entre les triplicatas pour l'expression de gM et d'ICP4 lors des knockdowns de SNX1, SNX2 et VPS33B sont à noter (**Figure 15 B**). Par ailleurs, les signaux de gM au noyau ne montrent pas une localisation à la MN comme on a pu le voir avec la construction gM-BirA\*-HA (**Figure 9 A et D et 11D**), mais montrent une localisation dans les invaginations nucléaires. Cette observation a également été observée précédemment au laboratoire [155]. Il se peut que BirA\*-HA affecte la localisation de gM et l'empêche de se retrouver aux invaginations membranaires. Les protéines identifiées à 4 hpi ne semblent donc pas participer au ciblage de gM à la MN.

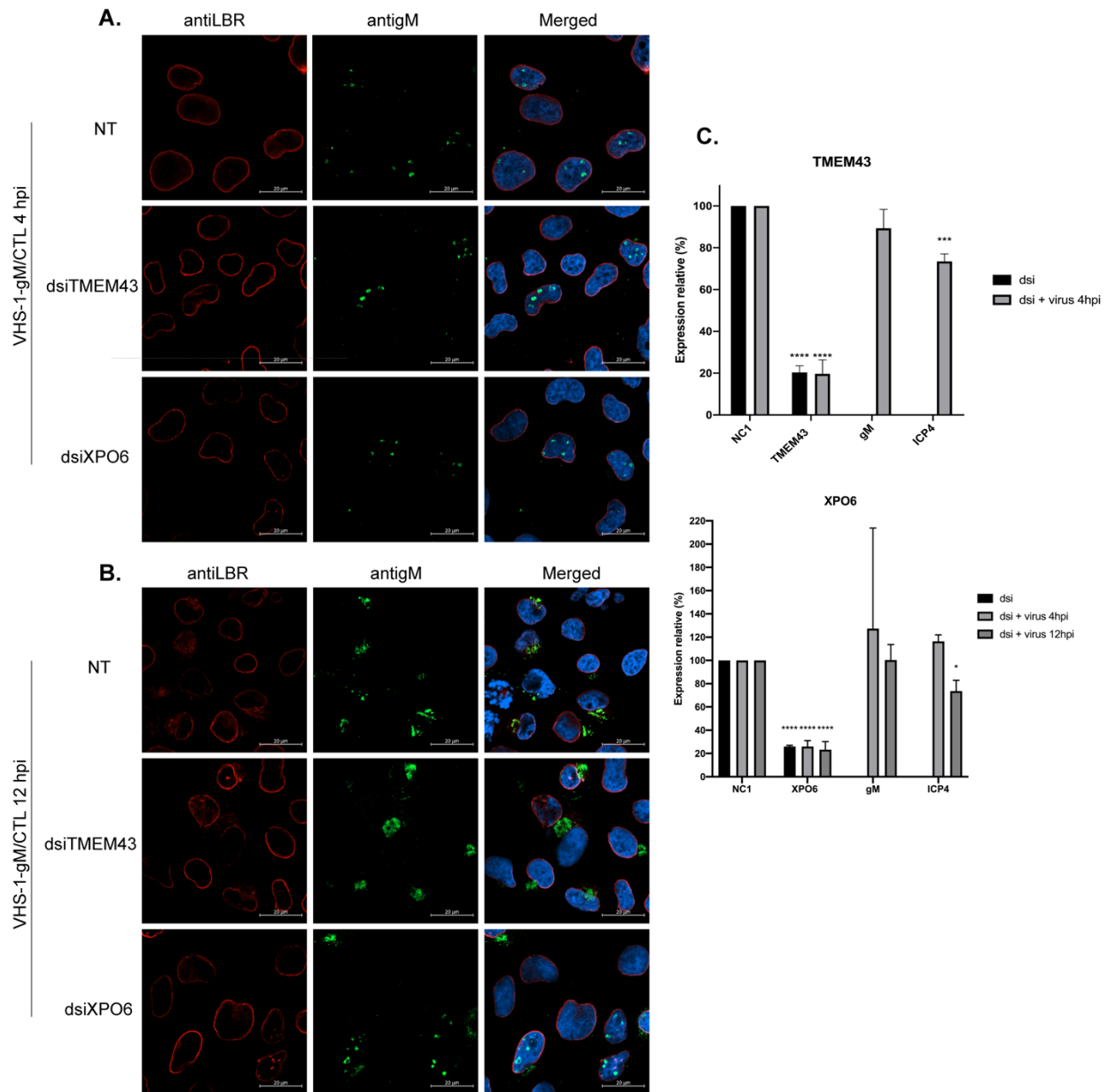


**Figure 15 : Les protéines identifiées à 4 hpi ne semblent pas avoir d'effet.** Les cellules 143B TK ont été transfectées avec des dsiRNA pendant 48 h puis infectées avec le virus VHS-1-gM/CTL (MOI 2) pendant 4 h. (A) Les cellules 143B tk- ont été traitées comme décrit ci-dessus et analysées par IF au Microscope confocal avec un marquage du LBR et de gM. (B) L'expression des gènes (%) a été évaluée par RT-qPCR après traitement aux dsiRNA avec ou sans infection. Les valeurs moyennes et l'erreur type des moyennes proviennent de trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre les conditions le contrôle NC1 ont été analysées

avec le test de Student bilatéral sur la moyenne des échantillons (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

#### 4.6.4 XPO6 pourrait permettre à gM de sortir de la MN

Parmi les cibles identifiées, TMEM43 a été trouvée à 4 hpi et 12 hpi alors que XPO6 a uniquement été identifié à 12 hpi (**Tableau II, Annexe 2**). Étant donné que TMEM43 a été identifiée dans les deux temps d'infection, on a regardé si celle-ci a un rôle dans les localisations de gM à la MN à 4 hpi et/ou au TGN à 12 hpi. Bien que XPO6 n'a été trouvée qu'à 12 hpi, nous regardons également son effet à 4 hpi mais ne devrait logiquement pas avoir d'effet sur le ciblage de gM puisqu'elle n'a pas été identifiée à 4 hpi. À l'exception de l'infection pendant 12 h, les conditions d'expériences sont exactement les mêmes que précédemment. Le knockdown de TMEM43 et de XPO6 ne montre pas de changement de localisation de gM à 4 hpi qui est toujours présent dans les invaginations nucléaires alors que leur inhibition est significative (**Figure 16A-C**). De même, TMEM43 n'a pas d'effet sur gM à 12 hpi puisque celle-ci est parfaitement localisée au TGN (**Figure 16B**). Néanmoins, nous n'avons pas les résultats de RT-qPCR pour TMEM43 dans la condition 12 hpi et ne nous permet pas d'apprécier son knockdown. Cependant, la protéine XPO6 semble avoir un rôle important pour la sortie de gM depuis la MN puisque celle-ci est restée au noyau au lieu de se trouver au TGN à 12 hpi comme on peut le voir dans la condition NT (**Figure 16B**). De plus, XPO6 est significativement réprimée suite à son knockdown, renforçant l'interprétation faite à partir de l'IF (**Figure 16C**). Concernant le rôle de XPO6, il est encore trop tôt pour affirmer son rôle puisque certains contrôles sont encore manquants, mais déjà ces résultats préliminaires semblent être encourageants quant à son implication dans la sortie de gM depuis la MN.



**Figure 16 : XPO6 semble permettre à gM de quitter la MN.** Les cellules 143B TK ont été transfectées avec des dsiRNA contre TMEM43 ou XPO6 pendant 48 h puis infectées avec le virus VHS-1-gM/CTL (MOI 2) pendant 4 h ou 12 h. (A-B) Les cellules 143B TK ont été traitées comme décrit ci-dessus et analysées par IF au Microscope confocal avec un marquage du LBR et de gM. (C) L'expression des gènes (%) a été évaluée par RT-qPCR après traitement aux dsiRNA avec ou sans infection. Les valeurs moyennes et l'erreur type des moyennes proviennent de trois expériences indépendantes. Les différences significatives entre les conditions le contrôle NC1 ont été analysées avec le test de Student bilatéral sur la moyenne des échantillons (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ).

## 5 Discussion

### 5.1 Les lignées cellulaires établies pour la BioID

La méthode de BioID nécessite l'établissement de lignées cellulaires exprimant la protéine d'intérêt couplée à l'enzyme de biotinylation BirA\*. Pour ce projet, ce sont les lignées cellulaires HEK293 BirA\*-HA, HEK293 NLS-BirA\*-HA et HEK293 gM-BirA\*-HA qui ont été établies et utilisées avec succès (**Figures 9 et 11**). Cependant, il a été initialement planifié au début du projet d'établir deux lignées cellulaires supplémentaires avec les constructions myc-BirA\* et myc-BirA\*-gM où BirA\* est au Nt de gM. Cette approche nous aurait permis d'identifier les protéines interagissant au Ct ou au Nt de notre protéine d'intérêt et d'éviter qu'un changement de conformation lié au tag (BirA) ne perturbe les interactions de gM avec ses partenaires. Lors de la vérification des constructions par transfection transitoire tous les plasmides ont fonctionné (données non montrées). Pour obtenir ces lignées cellulaires, l'agent de sélection Hygromycine B a été utilisé dans le milieu de croissance des cellules afin de sélectionner les cellules ayant incorporer ces constructions. Toutes les lignées cellulaires ont été obtenues hormis la lignée devant exprimer la construction myc-BirA\*-gM. Quelques colonies cellulaires ont été obtenues pour cette construction, mais aucune ne l'exprimait. Sachant que la construction est exprimée lors d'une transfection transitoire, mais pas dans les lignées cellulaires, il se pourrait que l'absence de Nt libre sur gM affecte sa survie dans le temps en empêchant, par exemple, l'obtention de sa conformation finale. Étant une glycoprotéine, sa maturation se déroule dans le RE et l'appareil de Golgi où des protéines vérifient leur bonne conformation. Si celle-ci n'acquiert pas la conformation qu'elle doit avoir, elle est dégradée. Une autre possibilité est que la construction est exprimée, acquiert correctement sa conformation, mais son ciblage membranaire est impossible, car le Nt n'est pas reconnaissable par les protéines partenaires. Considérant ceci, il serait possible que la construction soit dirigée dans la voie du protéasome pour dégradation, expliquant l'absence de détection de la construction par immunobuvardage. L'hypothèse de la cytotoxicité de la construction a été émise, mais écartée étant donné qu'aucune mortalité cellulaire apparente n'a été observée après la croissance des colonies sélectionnées. Du fait de l'impossibilité d'obtenir cette lignée

cellulaire, la suite du projet a donc été réalisée avec les lignées HEK293 exprimant seulement les constructions BirA\*-HA, NLS-BirA\*-HA ou gM-BirA\*-HA.

## 5.2 Les localisations de gM-BirA\*-HA pendant l'infection

Pour montrer les localisations de gM aux différents temps d'infections (4 hpi ou 12 hpi), des IF ont été effectuées sur les cellules transfectées avec le plasmide gM-BirA\*-HA ou sur la lignée cellulaire gM-BirA\*-HA (**Figure 9 A-B et 11D**). Dans les deux cas, les localisations de la construction sont retrouvées. En effet, en absence d'infection la construction est exclusivement au TGN alors que suite à l'infection, elle est retrouvée à la MN à 4 hpi et à nouveau au TGN à 12 hpi. La présence de protéines virales stimulerait donc les changements de localisations de gM et concordent avec les observations obtenues dans une précédente étude de notre laboratoire [155].

Il a été précédemment décrit que gM, exprimée précocement dans le cycle viral, possède uniquement une glycosylation immature. Par conséquent elle ne transiterait pas à travers l'appareil de Golgi et le TGN à 4 hpi, obtenant ses sucres matures que plus tard [155]. Ces résultats ont été obtenus à la suite d'un traitement avec l'enzyme EndoH, permettant l'analyse de la composition en résidus N-glycosylés de gM par immunobuvardage et dans un contexte d'infection. De plus, le virus VHS-1 gM/ER, où gM possède la séquence KKSL au Ct (signal de rétention au RE), a montré que gM était retrouvée à la MN à 4 hpi. Ceci sous-entend que directement après son expression au RE, gM est ciblée à la MN à 4 hpi. Basée sur ces données, il a été conclu que gM ne transite pas à travers l'ERGIC (compartiment intermédiaire RE-Golgi), l'appareil de Golgi ou le TGN [155]. Dans la lignée cellulaire HEK293 gM-BirA\*-HA, la construction est retrouvée au TGN lorsque la cellule n'est pas infectée. Lorsque la lignée cellulaire est infectée pendant 4 h, la construction gM-BirA\*-HA est retrouvée à la MN. Il est donc probable que la présence de gM au noyau à 4 hpi dans la lignée gM-BirA\*-HA résulte de l'expression de nouvelles molécules de gM plutôt que la redirection au TGN du gM existant avant l'infection (**Figure 12A**).

La construction n'est jamais observée à la MN (apparence en anneau) qu'à 4 hpi, que ce soit dans le cas de la transfection transitoire ou de la lignée cellulaire. Par contre, lors d'une infection avec un virus VHS-1 contenant un gM wt, cette dernière est exclusivement localisée

dans les invaginations intranucléaires à 4hpi (**Figure 15A**, [155]). Cette différence est dû au fait qu'il s'agit d'une infection avec gM seule alors que dans la protéine de fusion, gM est couplée à BirA\* (35 kDa). Une première hypothèse est que la taille de la construction l'empêcherait d'être localisée dans ces invaginations. Une autre hypothèse pourrait être que les partenaires de gM ne puissent pas jouer leur rôle de ciblage vers ces invaginations à cause de la présence de BirA\* empêchant la reconnaissance de gM. Une autre possibilité est que le ciblage de gM dans ces invaginations dépend de son Ct. Si c'est le cas, on ne pourra pas l'expliquer avec la construction gM-BirA\*-HA. On pourrait éventuellement le montrer par transfection transitoire puis infection par IF avec la construction myc-BirA\*-gM et voir si elle est retrouvée dans ces invaginations. On sait que gM est présent à la MNE et à la MNI à 4 h, il serait donc logique de penser que gM serait répartie sur l'ensemble de la MN donnant tout aussi bien un signal en anneau que ponctué pour les invaginations, mais il n'en est rien. Quoiqu'il en soit, il n'est pas encore connu pourquoi gM est spécifiquement présent dans ces invaginations.

### 5.3 La diversité des partenaires de gM

L'identification des 177 partenaires potentiels de gM par MS rend compte de l'efficacité de la méthode de BioID (**Figure 13**) avec une grande diversité protéique. En effet, les protéines identifiées seraient impliquées dans pas moins de 11 processus de biologiques, 7 fonctions moléculaires et 18 classes protéiques différentes. Un certain nombre de ces protéines pourraient bien sûr correspondre à de faux positifs. Si l'on s'intéresse aux classes protéiques, regroupant un nombre plus ou moins important de protéines identifiées, quatre classes se démarquent : les modulateurs d'enzymes (13 protéines), les hydrolases (11 protéines), les transférases (15 protéines) et les protéines du trafic membranaire ou vésiculaire (18 protéines) (**Figure 13D**). Il sera donc important de valider leur rôle expérimentalement.

Les protéines modulatrices d'enzymes sont des protéines qui par leur interaction avec des enzymes, comme les protéines G, vont modifier leur activité. Parmi ces protéines, la protéine SEC23A est un bon exemple. Cette protéine participe à l'élaboration de vésicules à partir du RE et est une composante du complexe COPII. COPII est le complexe protéique responsable de la formation de vésicules depuis le RE. De plus, la protéine SEC23A n'est retrouvée que dans la condition 12hpi, là où gM est ciblée vers le TGN et pourrait donc faire partie des partenaires

potentiels expliquant ce ciblage. L'intersectin-1 et 2 ont également été identifiées à 12 hpi dans cette classe protéique qui sont impliquées dans l'endocytose.

Un total de 11 protéines identifiées appartiendrait à la classe protéique des hydrolases, contenant entre autres les enzymes responsables de la dégradation dans les lysosomes. Il a été montré qu'il est tout à fait possible d'avoir des protéines biotinylées dans les lysosomes [227]. La protéine MTMR6, une phosphatase, fait partie de cette classe protéique et fait partie des protéines choisies pour les premières étapes de validation. Elle serait impliquée dans la régulation négative du transport des protéines entre le RE et le Golgi [228], mais son rôle n'a pas encore été validé.

Les transférases sont des molécules permettant le transfert d'un groupe fonctionnel d'une molécule donneuse à une molécule receveuse. Des transférases de types acétyltransférases, acyltransférases, glycosyltransférases, kinases, transaminases, méthyltransférases et nucléotidyltransférases ont été identifiés dont certaines d'entre elles sont transmembranaires. S'agissant de protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles, elles peuvent jouer un rôle dans le ciblage de gM.

Les protéines du trafic vésiculaire représentent la classe de protéine identifiée la plus attrayante. Étant donné que l'étude se porte sur le ciblage d'une glycoprotéine, il n'est pas surprenant que ces protéines dominent dans notre analyse. Parmi ces protéines, environ 50% d'entre elles font partie des SNAREs (*SNAP Receptors*). Le rôle premier des SNAREs est de médier la fusion des vésicules entre la membrane donneuse et receveuse, propriété qui rend ces protéines particulièrement intéressantes pour nous. Parmi ces SNAREs, deux familles de protéines ont été identifiées : les protéines SNAP (*Synaptosomal associated protein* ; SNAP23 et SNAP29) et les protéines Syntaxine (STX6, 7, 8, 9, 16). De plus, ces protéines ont toutes été trouvées uniquement à 12 hpi, temps pendant lequel gM est ciblée au TGN (**annexe 2**). Partant de cette observation, gM pourrait être prise en charge à la MN ou à la membrane du RE pour être ciblée au TGN via un transport vésiculaire impliquant les protéines SNAREs. Le 50% restant représente des protéines du manteau des vésicules (SEC24B et AP-3S1, 12 hpi) et des protéines régulatrices du transport vésiculaire dont SNX1, SNX2 et VPS33B (4 hpi) et VPS45 (*vacuolar protein sorting associated protein 45*, 4 hpi et 12 hpi), VAPB (*vacuolar associated membrane protein-associated protein B*, 12 hpi) et STXBP3 (*Syntaxin binding protein 3*, 12 hpi) (**annexe 2**).



Les 14 autres classes protéiques représentent entre 1 et 4% des protéines identifiées. Dans ces classes on trouve par exemple les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, l'immunité, des protéines de la matrice extracellulaire ou bien encore des protéines de types oxydo-réductases.

Aucun des partenaires viraux connus de gM n'ont été retrouvés lors de l'analyse des données et concordent avec ce qui a été précédemment observé [155]. Ce résultat est surprenant, car la glycoprotéine M n'est délocalisée que lorsqu'il y a infection suggérant une participation de protéines virales, on s'attendait donc à identifier de nouveaux partenaires viraux. Il est à rappeler que l'enzyme de biotinylation BirA\* fonctionne dans un rayon de 10 nm environ [218]. Par conséquent, les protéines virales pourraient intervenir sur le ciblage de gM par interaction indirecte via des protéines cellulaires et qu'elles seraient en dehors de la zone de biotinylation. Une autre possibilité est que lors de l'infection, les protéines virales n'ont aucun effet direct sur gM mais mobiliseraient certaines des protéines identifiées permettant le ciblage gM dans les localisations observées à 4 hpi (noyau) et à 12 hpi (TGN).

## **5.4 Le choix des cibles pour la validation ou invalidation**

Étant donné le nombre de protéines identifiées, nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur la validation de 7 protéines. Elles ont été choisies majoritairement en se focalisant sur les protéines trouvées à 4 hpi puisqu'elles expliqueraient comment gM est ciblée à la MN. Les protéines choisies sont SNX1, SNX2, SCAMP3, VPS33B, MTMR6 et TMEM43 qui ont été trouvées également à 12 hpi (**Tableau II**) mais aucune de ces protéines ne semblent avoir un effet sur la localisation de gM (**Figures 15 et 16**). De plus, une protéine supplémentaire, XPO6, a également été choisie bien qu'elle ait été trouvée dans la condition 12 hpi exclusivement. Cette dernière, si validée, n'expliquera pas le ciblage vers la MN mais le transport de gM depuis la MN.

## **5.5 XPO6, un rôle potentiel dans le ciblage de gM ?**

Les résultats obtenus avec le knockdown de XPO6 semblent être prometteurs (**Figure 16 B-C**). Après que les cellules 143B TK<sup>-</sup> aient été transfectées (dsiXPO6) et infectées pendant 12 h, gM a été localisée dans les invaginations nucléaires. Pour rappel, gM n'est trouvée que

dans les invaginations membranaires à 4 hpi. Ceci suggérerait que XPO6 aurait un rôle dans la sortie de gM depuis les invaginations nucléaires puisque gM semble être restreint à la MN à 12 hpi au lieu d'être localisée au TGN (**Figure 16B**). La protéine XPO6 fait partie de la famille des karyophérines- $\beta$  dont leur rôle est de faire transiter des molécules entre le cytoplasme et le noyau en passant par le NPC. XPO6 joue un rôle essentiel dans l'exportation nucléaire de l'actine monomérique due à son affinité à la profiline-RanGTP [229]. En absence de XPO6 dans les cellules, une accumulation d'actine est observée au noyau montrant son rôle essentiel dans l'export de l'actine nucléaire [226]. Ni RanGTP ni la profiline n'ont été identifiés par l'analyse de MS, ce qui est possible s'ils n'interviennent pas au niveau de gM ou s'ils sont localisés trop loin dans un potentiel complexe (le rayon d'action de BirA\* est de 10 nm). Précédemment, il a été présenté quatre modèles qui pourraient expliquer comment les protéines transmembranaires sont ciblées à la MNI (**Figure 8**). Parmi eux, le modèle de transport médié par un facteur, impliquant les karyophérines, est intéressant puisque XPO6 appartient à ces protéines. Bien que ce dernier est présenté dans un cas d'importation, on peut émettre l'hypothèse qu'un modèle similaire pourrait être appliqué dans le cas d'une exportation. Ceci permettrait d'expliquer comment une protéine telle que gM sort de la MNI à 12 hpi. Élément intéressant, la liaison XPO6-actine-profilineRanGTP n'implique pas de séquence signal d'exportation nucléaire (NES) [230]. Étant donné que gM ne possède pas de signal NES également [188], on peut poser l'hypothèse que XPO6 pourrait exporter gM de la MNI vers la MNE et rejoint le TGN à 12 hpi. Si tel est le cas, il pourrait y avoir plusieurs façons pour expliquer comment XPO6 prend en charge l'exportation de gM. Déjà, le mécanisme nécessiterait du RanGTP étant donné qu'il s'agit d'un transport actif et la profiline-RanGTP pourrait être un candidat. De ce fait, la délocalisation de gM pourrait se faire via l'interaction entre XPO6, gM et la profiline-RanGTP, ou autre donneur d'énergie, avec ou sans l'actine. Une autre alternative est que XPO6 pourrait être recrutée via d'autres protéines virales permettant son action sur la délocalisation de gM. Afin de clarifier ces hypothèses, des expériences complémentaires devront être effectuées pour valider que XPO6 et gM interagissent physiquement ensemble par co-immunoprécipitation dans un premier temps. De plus, s'il s'avère que ces deux protéines interagissent ensemble il serait intéressant de regarder si

l'actine et / ou la prolifine interviennent. De même, il faudrait vérifier l'implication de RanGTP dans ce transport, en utilisant un mutant dominant de Ran par exemple.

## 5.6 Alternative à la BioID : la TurboID et miniTurboID

Dans ce projet, les lignées cellulaires expriment l'enzyme BirA\* qui présente la mutation R118G et permet d'éviter sa liaison à l'ADN. Cependant, le temps optimal pour la biotinylation des protéines avec cette enzyme est de 24 h et a donc l'inconvénient de présenter une cinétique lente [217]. Dans notre plan expérimental, les infections ne se font que 12 h ou 18 h après le début de l'incubation à la D-Biotine (**Figure 12A**). Ceci sous-entend que l'on obtient une grande quantité de protéines biotinylées avant même que les cellules ne soient infectées, augmentant le nombre de faux positifs. Une méthode récente de la BioID permet de diminuer drastiquement le temps d'incubation et donc le nombre de faux positifs. La TurboID et la miniTurboID utilisent une version améliorée de BirA\* qui présente une activité grandement augmentée [231]. Cette différence d'activité provient d'une modification de la mutation de BirA\*. Au lieu d'avoir une mutation de type R118G pour la BioID, une mutation de type R118S a été effectuée et présente une activité deux fois plus importante [231]. La séquence BirA R118S a été utilisée pour des réactions PCR afin d'induire des mutations aléatoires donnant environ  $10^7$  mutants. L'utilisation de levures a permis de sélectionner et séparer les mutants enzymatiques hautement actifs des mutants moyennement actifs. Ainsi, la TurboID se caractérise par une enzyme BirA de 35 kDa présentant 15 mutations et d'une enzyme sans N-terminal avec 13 mutations pour la miniTurboID. Il a été montré par immunobuvardage que la TurboID et la miniTurboID marquent les protéines endogènes à la biotine beaucoup plus rapidement que la BioID (BirA R118G). Dans le cas de ce projet, ces mutants auraient permis de réaliser une véritable cinétique. C'est-à-dire de réaliser une incubation des lignées cellulaires avec la D-biotine pendant le temps d'infection de 4 h ou 12 h et diminuer ainsi les faux positifs.

## 6 Conclusion

En phase précoce de l'infection, gM est retrouvée dans les invaginations nucléaires dans les MNE et MNI. Plus tard dans le cycle, elle est retrouvée exclusivement au TGN qui participe à l'enveloppement final des virions matures. Dans le cadre de ce projet de maîtrise, la méthode de BioID a permis l'identification de 177 protéines qui gravitent, de près ou de loin, dans l'environnement de gM. Parmi ces protéines, certaines d'entre elles pourraient être potentiellement impliquées dans le ciblage de gM. Cette identification rend compte de l'importance des interactions hôte-pathogène mais aussi de la diversité protéique impliquée. Ces nouveaux partenaires potentiels ont été identifiés dans les différents temps d'infection suggérant qu'ils peuvent être impliqués spécifiquement dans le ciblage de gM à la MN ou au TGN respectivement. Bien que certains résultats préliminaires soient encourageants, il est encore trop tôt pour dire si ces protéines sont vraiment impliquées dans ces processus et nécessite des expériences complémentaires. Par exemple, dans le cas de la protéine XPO6, il serait nécessaire de montrer qu'elle interagit avec gM par co-immunoprécipitation. Dans le futur, d'autres cibles identifiées pourront être étudiées afin de valider leur interaction ou leur rôle dans le ciblage de gM ainsi que d'étudier leur effet sur la sortie virale. À terme, ces validations permettront l'établissement d'un modèle pour expliquer ces différents ciblages et qui pourrait être également applicable aux protéines de l'hôte.

## Bibliographie

1. Roizman, B. and J. Baines, *The diversity and unity of Herpesviridae*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1991. **14**(2): p. 63-79.
2. Vidal, J.B.E., *Inoculabilite des Pustules d'Ecthyma*. Annales de dermatologie et de syphiligraphie, 1873. **4**: p. 350.
3. A, L., *Aetiologische Untersuchungen über den fieberhaften Herpes*. Munch Med Wochenschr., 1919. **66**: p. 769-70.
4. Wald, A. and L. Corey, *Persistence in the population: epidemiology, transmission*, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, et al., Editors. 2007: Cambridge.
5. Xu, F., et al., *Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988-1994*. J Infect Dis, 2002. **185**(8): p. 1019-24.
6. Howard, M., et al., *Regional distribution of antibodies to herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and HSV-2 in men and women in Ontario, Canada*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(1): p. 84-9.
7. Smith, J.S. and N.J. Robinson, *Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review*. J Infect Dis, 2002. **186 Suppl 1**: p. S3-28.
8. Wertheim, J.O., et al., *Evolutionary origins of human herpes simplex viruses 1 and 2*. Mol Biol Evol, 2014. **31**(9): p. 2356-64.
9. Akhtar, J. and D. Shukla, *Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry*. FEBS J, 2009. **276**(24): p. 7228-36.
10. Pires de Mello, C.P., D.C. Bloom, and I.C. Paixao, *Herpes simplex virus type-1: replication, latency, reactivation and its antiviral targets*. Antivir Ther, 2016. **21**(4): p. 277-86.
11. Whitley, R.J. and B. Roizman, *Herpes simplex virus infections*. Lancet, 2001. **357**(9267): p. 1513-8.
12. Amir, J., et al., *The natural history of primary herpes simplex type 1 gingivostomatitis in children*. Pediatr Dermatol, 1999. **16**(4): p. 259-63.

13. Kolokotronis, A. and S. Doumas, *Herpes simplex virus infection, with particular reference to the progression and complications of primary herpetic gingivostomatitis*. Clin Microbiol Infect, 2006. **12**(3): p. 202-11.
14. Whitley, R.J., *Herpes Simplex Virus Infections of the Central Nervous System*. Continuum (Minneapolis, Minn), 2015. **21**(6 Neuroinfectious Disease): p. 1704-13.
15. Hambrick, G.W., Jr., R.P. Cox, and J.R. Senior, *Primary herpes simplex infection of fingers of medical personnel*. Arch Dermatol, 1962. **85**: p. 583-9.
16. Liaw, F.Y., et al., *Eczema herpeticum: a medical emergency*. Can Fam Physician, 2012. **58**(12): p. 1358-61.
17. Finlow, C. and J. Thomas, *Disseminated herpes simplex virus: a case of eczema herpeticum causing viral encephalitis*. J R Coll Physicians Edinb, 2018. **48**(1): p. 36-39.
18. Azher, T.N., et al., *Herpes simplex keratitis: challenges in diagnosis and clinical management*. Clin Ophthalmol, 2017. **11**: p. 185-191.
19. Farooq, A.V. and D. Shukla, *Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update*. Surv Ophthalmol, 2012. **57**(5): p. 448-62.
20. Piacentini, R., et al., *HSV-1 and Alzheimer's disease: more than a hypothesis*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 97.
21. Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe, *Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 4044-8.
22. Ando, Y., et al., *Primary target cells of herpes simplex virus type 1 in the hippocampus*. Microbes Infect, 2008. **10**(14-15): p. 1514-23.
23. Itzhaki, R.F., et al., *Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease*. Lancet, 1997. **349**(9047): p. 241-4.
24. Burgos, J.S., et al., *Involvement of apolipoprotein E in the hematogenous route of herpes simplex virus type 1 to the central nervous system*. J Virol, 2002. **76**(23): p. 12394-8.
25. Burgos, J.S., et al., *ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1*. Neuroreport, 2003. **14**(14): p. 1825-7.
26. Burgos, J.S., et al., *Herpes simplex virus type 1 infection via the bloodstream with apolipoprotein E dependence in the gonads is influenced by gender*. J Virol, 2005. **79**(3): p. 1605-12.

27. Bearer, E.L., *HSV, axonal transport and Alzheimer's disease: in vitro and in vivo evidence for causal relationships*. *Future Virol*, 2012. **7**(9): p. 885-899.
28. Itzhaki, R.F., *Corroboration of a Major Role for Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer's Disease*. *Front Aging Neurosci*, 2018. **10**: p. 324.
29. Jiang, Y.C., et al., *New strategies against drug resistance to herpes simplex virus*. *Int J Oral Sci*, 2016. **8**(1): p. 1-6.
30. Kimberlin, D.W. and R.J. Whitley, *Antiviral therapy of HSV-1 and -2*, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, et al., Editors. 2007: Cambridge.
31. Wagstaff, A.J., D. Faulds, and K.L. Goa, *Aciclovir. A reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy*. *Drugs*, 1994. **47**(1): p. 153-205.
32. Reardon, J.E. and T. Spector, *Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mechanism of inhibition by acyclovir triphosphate*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(13): p. 7405-11.
33. Jacobson, M.A., *Valaciclovir (BW256U87): the L-valyl ester of acyclovir*. *J Med Virol*, 1993. **Suppl 1**: p. 150-3.
34. Soul-Lawton, J., et al., *Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. **39**(12): p. 2759-64.
35. Nadal, D., et al., *An investigation of the steady-state pharmacokinetics of oral valacyclovir in immunocompromised children*. *J Infect Dis*, 2002. **186 Suppl 1**: p. S123-30.
36. Karaba, A.H., et al., *Longitudinal Characterization of Herpes Simplex Virus (HSV) Isolates Acquired From Different Sites in an Immune-Compromised Child: A New HSV Thymidine Kinase Mutation Associated With Resistance*. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2012. **1**(2): p. 116-24.
37. Burrell, S., et al., *Genotypic characterization of UL23 thymidine kinase and UL30 DNA polymerase of clinical isolates of herpes simplex virus: natural polymorphism and mutations associated with resistance to antivirals*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(11): p. 4833-42.
38. Crumacker, C.S., *Mechanism of action of foscarnet against viral polymerases*. *Am J Med*, 1992. **92**(2A): p. 3S-7S.

39. Kelly, E. and S.J. Russell, *History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering*. Mol Ther, 2007. **15**(4): p. 651-9.
40. Shen, Y. and J. Nemunaitis, *Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment*. Cancer Gene Ther, 2006. **13**(11): p. 975-92.
41. Federoff, H.J., M.W. Halterman, and A.I. Brooks, *Use of the herpes amplicon system as a vehicle for somatic gene transfer*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **27**(1): p. 29-39.
42. Fraefel, C., D.R. Jacoby, and X.O. Breakefield, *Herpes simplex virus type 1-based amplicon vector systems*. Adv Virus Res, 2000. **55**: p. 425-51.
43. Jerusalinsky, D., M.V. Baez, and A.L. Epstein, *Herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors for fundamental research in neurosciences and gene therapy of neurological diseases*. J Physiol Paris, 2012. **106**(1-2): p. 2-11.
44. Toda, M., et al., *In situ cancer vaccination: an IL-12 defective vector/replication-competent herpes simplex virus combination induces local and systemic antitumor activity*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4457-64.
45. Jarnagin, W.R., et al., *Neoadjuvant treatment of hepatic malignancy: an oncolytic herpes simplex virus expressing IL-12 effectively treats the parent tumor and protects against recurrence-after resection*. Cancer Gene Ther, 2003. **10**(3): p. 215-23.
46. Wong, R.J., et al., *Angiogenesis inhibition by an oncolytic herpes virus expressing interleukin 12*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(13): p. 4509-16.
47. Harstad, L., K.R. Hess, and M.D. Groves, *Prognostic factors and outcomes in patients with leptomeningeal melanomatosis*. Neuro Oncol, 2008. **10**(6): p. 1010-8.
48. Kuruppu, D. and K.K. Tanabe, *HSV-1 as a novel therapy for breast cancer meningeal metastases*. Cancer Gene Ther, 2015. **22**(10): p. 506-8.
49. Boehmer, P.E. and I.R. Lehman, *Herpes simplex virus DNA replication*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 347-84.
50. Wadsworth, S., R.J. Jacob, and B. Roizman, *Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions*. J Virol, 1975. **15**(6): p. 1487-97.
51. Taylor, T.J., et al., *Herpes simplex virus*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d752-64.
52. McGeoch, D.J., et al., *The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1*. J Gen Virol, 1988. **69** ( Pt 7): p. 1531-74.



53. Caspar, D.L. and A. Klug, *Physical principles in the construction of regular viruses*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1962. **27**: p. 1-24.
54. Bowman, B.R., et al., *Structure of the herpesvirus major capsid protein*. EMBO J, 2003. **22**(4): p. 757-65.
55. Zhou, Z.H., et al., *Assembly of VP26 in herpes simplex virus-1 inferred from structures of wild-type and recombinant capsids*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(11): p. 1026-30.
56. Spencer, J.V., et al., *Assembly of the herpes simplex virus capsid: preformed triplexes bind to the nascent capsid*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 3944-51.
57. Dai, X. and Z.H. Zhou, *Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes*. Science, 2018. **360**(6384).
58. Gibson, W., *Structure and assembly of the virion*. Intervirology, 1996. **39**(5-6): p. 389-400.
59. Loret, S., G. Guay, and R. Lippe, *Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8605-18.
60. Newcomb, W.W., et al., *Role of a reducing environment in disassembly of the herpesvirus tegument*. Virology, 2012. **431**(1-2): p. 71-9.
61. Schmid, M.F., et al., *A tail-like assembly at the portal vertex in intact herpes simplex type-1 virions*. PLoS Pathog, 2012. **8**(10): p. e1002961.
62. van Genderen, I.L., et al., *The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei*. Virology, 1994. **200**(2): p. 831-6.
63. Wudiri, G.A., S.M. Schneider, and A.V. Nicola, *Herpes Simplex Virus 1 Envelope Cholesterol Facilitates Membrane Fusion*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2383.
64. Komala Sari, T., et al., *Contributions of herpes simplex virus 1 envelope proteins to entry by endocytosis*. J Virol, 2013. **87**(24): p. 13922-6.
65. Rajcani, J. and A. Vojvodova, *The role of herpes simplex virus glycoproteins in the virus replication cycle*. Acta Virol, 1998. **42**(2): p. 103-18.
66. Alconada, A., et al., *Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 377-87.
67. Lycke, E., et al., *Herpes simplex virus infection of the human sensory neuron. An electron microscopy study*. Arch Virol, 1988. **101**(1-2): p. 87-104.

68. Arii, J. and Y. Kawaguchi, *The Role of HSV Glycoproteins in Mediating Cell Entry*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1045**: p. 3-21.
69. Nicola, A.V., A.M. McEvoy, and S.E. Straus, *Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5324-32.
70. Agelidis, A.M. and D. Shukla, *Cell entry mechanisms of HSV: what we have learned in recent years*. Future Virol, 2015. **10**(10): p. 1145-1154.
71. Clement, C., et al., *A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry*. J Cell Biol, 2006. **174**(7): p. 1009-21.
72. Zeev-Ben-Mordehai, T., C. Hagen, and K. Grunewald, *A cool hybrid approach to the herpesvirus 'life' cycle*. Curr Opin Virol, 2014. **5**: p. 42-9.
73. Eisenberg, R.J., et al., *Herpes virus fusion and entry: a story with many characters*. Viruses, 2012. **4**(5): p. 800-32.
74. Connolly, S.A., et al., *Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 369-81.
75. Campadelli-Fiume, G., et al., *The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells*. Rev Med Virol, 2000. **10**(5): p. 305-19.
76. Spear, P.G., R.J. Eisenberg, and G.H. Cohen, *Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry*. Virology, 2000. **275**(1): p. 1-8.
77. Gianni, T., M. Amasio, and G. Campadelli-Fiume, *Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain*. J Biol Chem, 2009. **284**(26): p. 17370-82.
78. Satoh, T., et al., *PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B*. Cell, 2008. **132**(6): p. 935-44.
79. Atanasiu, D., et al., *Cascade of events governing cell-cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH/gL, and gB*. J Virol, 2010. **84**(23): p. 12292-9.
80. Hannah, B.P., et al., *Herpes simplex virus glycoprotein B associates with target membranes via its fusion loops*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6825-36.
81. Roberts, A.P., et al., *Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 105-16.

82. Dohner, K., et al., *Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(8): p. 2795-809.
83. Wolfstein, A., et al., *The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro*. Traffic, 2006. **7**(2): p. 227-37.
84. Padeloup, D., et al., *Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6610-23.
85. Ojala, P.M., et al., *Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: Reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro*. Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(13): p. 4922-4931.
86. Sodeik, B., M.W. Ebersold, and A. Helenius, *Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus*. J Cell Biol, 1997. **136**(5): p. 1007-21.
87. Everett, R.D., *HSV-1 biology and life cycle*. Methods Mol Biol, 2014. **1144**: p. 1-17.
88. Alwine, J.C., W.L. Steinhart, and C.W. Hill, *Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEp-2 and KB cells*. Virology, 1974. **60**(1): p. 302-7.
89. Triezenberg, S.J., R.C. Kingsbury, and S.L. McKnight, *Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression*. Genes Dev, 1988. **2**(6): p. 718-29.
90. Gruffat, H., R. Marchione, and E. Manet, *Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key*. Frontiers in Microbiology, 2016. **7**.
91. Quinlan, M.P., L.B. Chen, and D.M. Knipe, *The Intranuclear Location of a Herpes-Simplex Virus DNA-Binding Protein Is Determined by the Status of Viral-DNA Replication*. Cell, 1984. **36**(4): p. 857-868.
92. Everett, R.D., *DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies*. Oncogene, 2001. **20**(49): p. 7266-7273.
93. Gu, H.D. and Y. Zheng, *Role of ND10 nuclear bodies in the chromatin repression of HSV-1*. Virology Journal, 2016. **13**.
94. Cho, S., J.S. Park, and Y.K. Kang, *Dual functions of histone-lysine N-methyltransferase Setdb1 protein at promyelocytic leukemia-nuclear body (PML-NB): maintaining PML-*

- NB structure and regulating the expression of its associated genes.* J Biol Chem, 2011. **286**(47): p. 41115-24.
95. Wu, W.S., et al., *The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2259-68.
96. Elias, P., et al., *A DNA binding protein specific for an origin of replication of herpes simplex virus type 1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(17): p. 6322-6.
97. Conley, A.J., et al., *Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Characterization of a temperature-sensitive mutant produced by in vitro mutagenesis and defective in DNA synthesis and accumulation of gamma polypeptides.* J Virol, 1981. **37**(1): p. 191-206.
98. Purifoy, D.J., R.B. Lewis, and K.L. Powell, *Identification of the herpes simplex virus DNA polymerase gene.* Nature, 1977. **269**(5629): p. 621-3.
99. Jacob, R.J., L.S. Morse, and B. Roizman, *Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA.* J Virol, 1979. **29**(2): p. 448-57.
100. Muylaert, I., K.W. Tang, and P. Elias, *Replication and recombination of herpes simplex virus DNA.* J Biol Chem, 2011. **286**(18): p. 15619-24.
101. Newcomb, W.W., et al., *Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation.* J Mol Biol, 1996. **263**(3): p. 432-46.
102. Newcomb, W.W., et al., *The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid.* J Virol, 2001. **75**(22): p. 10923-32.
103. Preston, V.G., et al., *The herpes simplex virus gene UL26 proteinase in the presence of the UL26.5 gene product promotes the formation of scaffold-like structures.* J Gen Virol, 1994. **75 ( Pt 9)**: p. 2355-66.
104. Wu, W., et al., *Internal Proteins of the Procapsid and Mature Capsids of Herpes Simplex Virus 1 Mapped by Bubblegram Imaging.* J Virol, 2016. **90**(10): p. 5176-86.
105. Homa, F.L. and J.C. Brown, *Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus.* Rev Med Virol, 1997. **7**(2): p. 107-122.

106. Beard, P.M., N.S. Taus, and J.D. Baines, *DNA cleavage and packaging proteins encoded by genes U(L)28, U(L)15, and U(L)33 of herpes simplex virus type 1 form a complex in infected cells*. J Virol, 2002. **76**(10): p. 4785-91.
107. Campadelli-Fiume, G., *The egress of alphaherpesviruses from the cell*, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, et al., Editors. 2007: Cambridge.
108. Granzow, H., et al., *Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study*. J Virol, 2001. **75**(8): p. 3675-84.
109. Leuzinger, H., et al., *Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 13047-59.
110. Wild, P., et al., *Exploring the nuclear envelope of herpes simplex virus 1-infected cells by high-resolution microscopy*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 408-19.
111. Knockenhauer, K.E. and T.U. Schwartz, *The Nuclear Pore Complex as a Flexible and Dynamic Gate*. Cell, 2016. **164**(6): p. 1162-1171.
112. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: a tale of two membranes*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(4): p. 423-9.
113. Bigalke, J.M. and E.E. Heldwein, *Nuclear Exodus: Herpesviruses Lead the Way*. Annu Rev Virol, 2016. **3**(1): p. 387-409.
114. Bigalke, J.M. and E.E. Heldwein, *Structural basis of membrane budding by the nuclear egress complex of herpesviruses*. EMBO J, 2015. **34**(23): p. 2921-36.
115. Reynolds, A.E., et al., *Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8939-52.
116. Yang, K. and J.D. Baines, *Selection of HSV capsids for envelopment involves interaction between capsid surface components pUL31, pUL17, and pUL25*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(34): p. 14276-81.
117. Klupp, B.G., et al., *Vesicle formation from the nuclear membrane is induced by coexpression of two conserved herpesvirus proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(17): p. 7241-6.
118. Maeda, F., et al., *Herpes Simplex Virus 1 UL34 Protein Regulates the Global Architecture of the Endoplasmic Reticulum in Infected Cells*. J Virol, 2017. **91**(12).

119. Farnsworth, A., et al., *Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10187-92.
120. Mettenleiter, T.C., *Budding events in herpesvirus morphogenesis*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 167-80.
121. Mettenleiter, T.C., *Herpesvirus assembly and egress*. J Virol, 2002. **76**(4): p. 1537-47.
122. Dodding, M.P. and M. Way, *Coupling viruses to dynein and kinesin-1*. EMBO J, 2011. **30**(17): p. 3527-39.
123. Henaff, D., et al., *Analysis of the early steps of herpes simplex virus 1 capsid tegumentation*. J Virol, 2013. **87**(9): p. 4895-906.
124. Zhu, Q. and R.J. Courtney, *Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1*. Virology, 1994. **204**(2): p. 590-9.
125. Henaff, D., K. Radtke, and R. Lippe, *Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment*. Traffic, 2012. **13**(11): p. 1443-9.
126. Komuro, M., M. Tajima, and K. Kato, *Transformation of Golgi Membrane into the Envelope of Herpes-Simplex Virus in Rat Anterior-Pituitary Cells*. European Journal of Cell Biology, 1989. **50**(2): p. 398-406.
127. Hambleton, S., M.D. Gershon, and A.A. Gershon, *The role of the trans-Golgi network in varicella zoster virus biology*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(24): p. 3047-56.
128. Hollinshead, M., et al., *Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus*. Embo Journal, 2012. **31**(21): p. 4204-4220.
129. Lyman, M.G. and L.W. Enquist, *Herpesvirus interactions with the host cytoskeleton*. J Virol, 2009. **83**(5): p. 2058-66.
130. Sandbaumhuter, M., et al., *Cytosolic herpes simplex virus capsids not only require binding inner tegument protein pUL36 but also pUL37 for active transport prior to secondary envelopment*. Cell Microbiol, 2013. **15**(2): p. 248-69.
131. Klupp, B.G., et al., *Complex formation between the UL16 and UL21 tegument proteins of pseudorabies virus*. J Virol, 2005. **79**(3): p. 1510-22.
132. Mettenleiter, T.C., *Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle*. Vet Microbiol, 2006. **113**(3-4): p. 163-9.

133. Chi, J.H., et al., *The cytoplasmic tail of herpes simplex virus envelope glycoprotein D binds to the tegument protein VP22 and to capsids*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 2): p. 253-61.
134. Mossman, K.L., et al., *Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event*. J Virol, 2000. **74**(14): p. 6287-99.
135. Farnsworth, A., K. Goldsmith, and D.C. Johnson, *Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8481-94.
136. Loomis, J.S., et al., *Intracellular trafficking of the UL11 tegument protein of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2001. **75**(24): p. 12209-19.
137. Stylianou, J., et al., *Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 occurs via glycoprotein E-specific recruitment to the late secretory pathway*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 5204-18.
138. Leege, T., et al., *Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 2009. **83**(2): p. 896-907.
139. Roussel, E. and R. Lippe, *Cellular Protein Kinase D Modulators Play a Role during Multiple Steps of Herpes Simplex Virus 1 Egress*. J Virol, 2018. **92**(23).
140. Remillard-Labrosse, G., et al., *Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane*. Traffic, 2009. **10**(8): p. 1074-83.
141. Jons, A., J.M. Dijkstra, and T.C. Mettenleiter, *Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 550-7.
142. Lake, C.M., S.J. Molesworth, and L.M. Hutt-Fletcher, *The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 5559-64.
143. Koyano, S., et al., *Glycoproteins M and N of human herpesvirus 8 form a complex and inhibit cell fusion*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 6): p. 1485-91.
144. Wu, S.X., X.P. Zhu, and G.J. Letchworth, *Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3029-36.

145. Dijkstra, J.M., et al., *Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component*. J Virol, 1996. **70**(8): p. 5684-8.
146. Browne, H., S. Bell, and T. Minson, *Analysis of the requirement for glycoprotein m in herpes simplex virus type 1 morphogenesis*. J Virol, 2004. **78**(2): p. 1039-41.
147. Konig, P., K. Giesow, and G.M. Keil, *Glycoprotein M of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is nonessential for replication in cell culture and is involved in inhibition of bovine respiratory syncytial virus F protein induced syncytium formation in recombinant BHV-1 infected cells*. Vet Microbiol, 2002. **86**(1-2): p. 37-49.
148. Tischer, B.K., et al., *The products of the UL10 (gM) and the UL49.5 genes of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 5): p. 997-1003.
149. May, J.S., S. Colaco, and P.G. Stevenson, *Glycoprotein M is an essential lytic replication protein of the murine gammaherpesvirus 68*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3459-67.
150. Lake, C.M. and L.M. Hutt-Fletcher, *Epstein-Barr virus that lacks glycoprotein gN is impaired in assembly and infection*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 11162-72.
151. Kawabata, A., et al., *Human herpesvirus 6 glycoprotein M is essential for virus growth and requires glycoprotein N for its maturation*. Virology, 2012. **429**(1): p. 21-8.
152. Hobom, U., et al., *Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes*. J Virol, 2000. **74**(17): p. 7720-9.
153. Lehner, R., H. Meyer, and M. Mach, *Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses*. J Virol, 1989. **63**(9): p. 3792-800.
154. MacLean, C.A., et al., *Investigation of herpes simplex virus type 1 genes encoding multiply inserted membrane proteins*. J Gen Virol, 1991. **72** ( Pt 4): p. 897-906.
155. Zhang, J., et al., *Early, active, and specific localization of herpes simplex virus type 1 gM to nuclear membranes*. J Virol, 2009. **83**(24): p. 12984-97.
156. Baines, J.D. and B. Roizman, *The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1441-52.



157. Crump, C.M., et al., *Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 12): p. 3517-27.
158. Hulsmeier, A.J., M. Welti, and T. Hennet, *Glycoprotein maturation and the UPR*. Methods Enzymol, 2011. **491**: p. 163-82.
159. Chee, M.S., et al., *Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **154**: p. 125-69.
160. Davison, A.J. and J.E. Scott, *The complete DNA sequence of varicella-zoster virus*. J Gen Virol, 1986. **67 ( Pt 9)**: p. 1759-816.
161. Lehrman, M.A., *Oligosaccharide-based information in endoplasmic reticulum quality control and other biological systems*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8623-6.
162. Favoreel, H.W., *The why's of Y-based motifs in alphaherpesvirus envelope proteins*. Virus Res, 2006. **117**(2): p. 202-8.
163. Hirokawa, T., S. Boon-Chieng, and S. Mitaku, *SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins*. Bioinformatics, 1998. **14**(4): p. 378-9.
164. Jie, Z., *Contribution de la Glycoprotéine M dans la Sortie de HSV-1*, in *Département de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de médecine*. Juin, 2010, Université de Montréal.
165. Klupp, B.G., R. Nixdorf, and T.C. Mettenleiter, *Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 6760-8.
166. Kim, I.J., et al., *Herpes simplex virus 1 glycoprotein M and the membrane-associated protein UL11 are required for virus-induced cell fusion and efficient virus entry*. J Virol, 2013. **87**(14): p. 8029-37.
167. El Kasmi, I. and R. Lippe, *Herpes simplex virus 1 gN partners with gM to modulate the viral fusion machinery*. J Virol, 2015. **89**(4): p. 2313-23.
168. Brack, A.R., et al., *Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5364-72.
169. Rudolph, J., et al., *The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M*. J Virol, 2002. **76**(6): p. 2952-63.

170. Kopp, M., et al., *Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 3024-34.
171. Fuchs, W., et al., *Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49*. J Virol, 2002. **76**(16): p. 8208-17.
172. Striebinger, H., et al., *Subcellular Trafficking and Functional Relationship of the HSV-1 Glycoproteins N and M*. Viruses, 2016. **8**(3): p. 83.
173. Fuchs, W. and T.C. Mettenleiter, *The nonessential UL49.5 gene of infectious laryngotracheitis virus encodes an O-glycosylated protein which forms a complex with the non-glycosylated UL10 gene product*. Virus Res, 2005. **112**(1-2): p. 108-14.
174. Ross, J., M. Williams, and J.I. Cohen, *Disruption of the varicella-zoster virus dUTPase and the adjacent ORF9A gene results in impaired growth and reduced syncytia formation in vitro*. Virology, 1997. **234**(2): p. 186-95.
175. Melancon, J.M., et al., *Herpes simplex virus type 1 gK is required for gB-mediated virus-induced cell fusion, while neither gB and gK nor gB and UL20p function redundantly in virion de-envelopment*. J Virol, 2005. **79**(1): p. 299-313.
176. Foster, T.P., G.V. Rybachuk, and K.G. Kousoulas, *Glycoprotein K specified by herpes simplex virus type 1 is expressed on virions as a Golgi complex-dependent glycosylated species and functions in virion entry*. J Virol, 2001. **75**(24): p. 12431-8.
177. Lau, S.Y. and C.M. Crump, *HSV-1 gM and the gK/pUL20 complex are important for the localization of gD and gH/L to viral assembly sites*. Viruses, 2015. **7**(3): p. 915-38.
178. Min, S.W., W.P. Chang, and T.C. Sudhof, *E-Syts, a family of membranous Ca<sup>2+</sup>-sensor proteins with multiple C2 domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 3823-8.
179. Giordano, F., et al., *PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins*. Cell, 2013. **153**(7): p. 1494-509.
180. Saheki, Y., et al., *Control of plasma membrane lipid homeostasis by the extended synaptotagmins*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(5): p. 504-15.
181. Herdman, C. and T. Moss, *Extended-Synaptotagmins (E-Syts); the extended story*. Pharmacol Res, 2016. **107**: p. 48-56.

182. Fernandez-Busnadiego, R., Y. Saheki, and P. De Camilli, *Three-dimensional architecture of extended synaptotagmin-mediated endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): p. E2004-13.
183. El Kasmi, I., et al., *Extended Synaptotagmin 1 Interacts with Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein M and Negatively Modulates Virus-Induced Membrane Fusion*. J Virol, 2018. **92**(1).
184. Maringer, K., J. Stylianou, and G. Elliott, *A network of protein interactions around the herpes simplex virus tegument protein VP22*. J Virol, 2012. **86**(23): p. 12971-82.
185. Wills, E., F. Mou, and J.D. Baines, *The U(L)31 and U(L)34 gene products of herpes simplex virus 1 are required for optimal localization of viral glycoproteins D and M to the inner nuclear membranes of infected cells*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 4800-9.
186. Kawabata, A., et al., *Human herpesvirus 6 gM/gN complex interacts with v-SNARE in infected cells*. J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 12): p. 2769-77.
187. Baines, J.D., et al., *Glycoprotein M of herpes simplex virus 1 is incorporated into virions during budding at the inner nuclear membrane*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 800-12.
188. Striebinger, H., et al., *Subcellular trafficking and functional importance of herpes simplex virus type 1 glycoprotein M domains*. J Gen Virol, 2015. **96**(11): p. 3313-25.
189. Wilhelmsen, K., et al., *KASH-domain proteins in nuclear migration, anchorage and other processes*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 24): p. 5021-9.
190. Crisp, M., et al., *Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex*. J Cell Biol, 2006. **172**(1): p. 41-53.
191. Holmer, L. and H.J. Worman, *Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(12-13): p. 1741-7.
192. Katta, S.S., C.J. Smoyer, and S.L. Jaspersen, *Destination: inner nuclear membrane*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(4): p. 221-9.
193. Powell, L. and B. Burke, *Internuclear exchange of an inner nuclear membrane protein (p55) in heterokaryons: in vivo evidence for the interaction of p55 with the nuclear lamina*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2225-34.
194. Smith, S. and G. Blobel, *The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane*. J Cell Biol, 1993. **120**(3): p. 631-7.



















195. Wu, W., F. Lin, and H.J. Worman, *Intracellular trafficking of MAN1, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 7): p. 1361-71.
196. Maimon, T., et al., *The human nuclear pore complex as revealed by cryo-electron tomography*. Structure, 2012. **20**(6): p. 998-1006.
197. Reichelt, R., et al., *Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components*. J Cell Biol, 1990. **110**(4): p. 883-94.
198. Soullam, B. and H.J. Worman, *Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane*. J Cell Biol, 1995. **130**(1): p. 15-27.
199. Soullam, B. and H.J. Worman, *The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal*. J Cell Biol, 1993. **120**(5): p. 1093-100.
200. Lusk, C.P., G. Blobel, and M.C. King, *Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(5): p. 414-20.
201. Tapley, E.C., N. Ly, and D.A. Starr, *Multiple mechanisms actively target the SUN protein UNC-84 to the inner nuclear membrane*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(10): p. 1739-52.
202. Turgay, Y., et al., *A classical NLS and the SUN domain contribute to the targeting of SUN2 to the inner nuclear membrane*. EMBO J, 2010. **29**(14): p. 2262-75.
203. Braunagel, S.C., et al., *Trafficking of ODV-E66 is mediated via a sorting motif and other viral proteins: facilitated trafficking to the inner nuclear membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8372-7.
204. Saksena, S., et al., *Cotranslational integration and initial sorting at the endoplasmic reticulum translocon of proteins destined for the inner nuclear membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12537-42.
205. Saksena, S., et al., *Importin-alpha-16 is a translocon-associated protein involved in sorting membrane proteins to the nuclear envelope*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(6): p. 500-8.
206. Braunagel, S.C., et al., *Early sorting of inner nuclear membrane proteins is conserved*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9307-12.

























207. Zuleger, N., et al., *System analysis shows distinct mechanisms and common principles of nuclear envelope protein dynamics*. J Cell Biol, 2011. **193**(1): p. 109-23.
208. Speese, S.D., et al., *Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling*. Cell, 2012. **149**(4): p. 832-46.
209. Mehus, A.A., R.H. Anderson, and K.J. Roux, *BioID Identification of Lamin-Associated Proteins*. Methods Enzymol, 2016. **569**: p. 3-22.
210. Cronan, J.E., Jr., *Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10327-33.
211. Beckett, D., E. Kovaleva, and P.J. Schatz, *A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation*. Protein Sci, 1999. **8**(4): p. 921-9.
212. Diamandis, E.P. and T.K. Christopoulos, *The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology*. Clin Chem, 1991. **37**(5): p. 625-36.
213. Kwon, K. and D. Beckett, *Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases*. Protein Sci, 2000. **9**(8): p. 1530-9.
214. Streaker, E.D. and D. Beckett, *Nonenzymatic biotinylation of a biotin carboxyl carrier protein: unusual reactivity of the physiological target lysine*. Protein Sci, 2006. **15**(8): p. 1928-35.
215. Roux, K.J., et al., *A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells*. J Cell Biol, 2012. **196**(6): p. 801-10.
216. Trinkle-Mulcahy, L., *Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping*. F1000Res, 2019. **8**.
217. Roux, K.J., *Marked by association: techniques for proximity-dependent labeling of proteins in eukaryotic cells*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(19): p. 3657-64.
218. Varnaite, R. and S.A. MacNeill, *Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID*. Proteomics, 2016. **16**(19): p. 2503-2518.
219. Kean, M.J., A.L. Couzens, and A.C. Gingras, *Mass spectrometry approaches to study mammalian kinase and phosphatase associated proteins*. Methods, 2012. **57**(4): p. 400-8.
220. Oliveros, J.C., *Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams*. 2007.

221. Mi, H., et al., *Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0)*. Nat Protoc, 2019. **14**(3): p. 703-721.
222. Bhatia, V.K., et al., *Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing*. EMBO J, 2009. **28**(21): p. 3303-14.
223. van Weering, J.R., et al., *Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules*. EMBO J, 2012. **31**(23): p. 4466-80.
224. Singleton, D.R., T.T. Wu, and J.D. Castle, *Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions*. J Cell Sci, 1997. **110 ( Pt 17)**: p. 2099-107.
225. Rajkumar, R., et al., *Functional effects of the TMEM43 Ser358Leu mutation in the pathogenesis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy*. BMC Med Genet, 2012. **13**: p. 21.
226. Stuken, T., E. Hartmann, and D. Gorlich, *Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes*. EMBO J, 2003. **22**(21): p. 5928-40.
227. Liu, X., et al., *An AP-MS- and BioID-compatible MAC-tag enables comprehensive mapping of protein interactions and subcellular localizations*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1188.
228. Mochizuki, Y., et al., *Phosphatidylinositol 3-phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is regulated by small GTPase Rab1B in the early secretory and autophagic pathways*. J Biol Chem, 2013. **288**(2): p. 1009-21.
229. Falahzadeh, K., A. Banaei-Esfahani, and M. Shahhoseini, *The potential roles of actin in the nucleus*. Cell J, 2015. **17**(1): p. 7-14.
230. Immanuel Dhanasingh, J.M.C.a.S.H.L., *Karyopherins and Nuclear actin transport* BioDesign, 2015: p. p 88-97.
231. Branon, T.C., et al., *Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID*. Nature Biotechnology, 2018. **36**: p. 880.









# Annexe 1

Liste des gènes et des protéines chez le VHS-1. Les représentations des protéines présentes dans le virion mature extracellulaire et utilisée dans la **Figure 1A** sont dans le tableau. (\*) Interactions entre les protéines virales représentées dans le virion mature (**Figure 1A**). (?) : Inconnu ou incertains. Adaptée de [59].

Localisations	Gènes	Protéines	Représentations	Interactions*	Fonctions
<i>Enveloppe</i>	ul6	gL		gH	Encapsulation de l'ADN ?
	ul10	gM		gN; VP22	Propagation d'une cellule à une autre
	ul20	UL20		gK	Sortie du virus
	ul22	gH		gL; VP16	Impliquée dans l'entrée, sortie et propagation du virus
	ul27	gB			Formation d'un dimère, essentiel pour l'entrée
	ul34	UL34		UL31	Sortie du noyau
	ul43	UL43			Protéine associée à la membrane
	ul44	gC			Participe à l'adsorption : attachement à la cellule
	ul45	UL45			Protéine membranaire
	ul49.5	gN		gM	Complexe avec gM, Stimule la fusion membranaire
	ul53	gK		UL20; gB	Formation de syncytium
	ul56	UL56			Associée au Golgi et endosomes
	us4	gG			Impliquée dans entrée et sortie du virus
	us5	gJ			Protection contre l'apoptose induite par Fas
	us6	gD		VP22	Nécessaire à l'entrée
	us7	gI		gE	Forme un complexe avec gE Propagation cellulaire à une autre
	us8	gE		VP22; gI	Forme un complexe avec gI Activité récepteur Fc
	us9	US9			Transport antérograde des glycoprotéines de l'enveloppe ?

<b>Tégument</b>	ul7	pUL7		pUL51; ulS1	Encapsidation de l'ADN ?
	ul11	pUL11		pUL16	Protéine myristoylée, sortie du virus
	ul13	pUL13			Activité kinase
	ul14	pUL14		ulS1	Molécule chaperone
	ul16	pUL16		pUL11; gE; VP22; pUL21	Encapsidation de l'ADN ?
	ul21	pUL21		pUL16; US3	Associée aux microtubules
	ul23	Thymidine kinase			Activation sélective de l'acyclovir et du ganciclovir
	ul31	pUL31		pUL34	Sortie du noyau Protéine de liaison à la matrice nucléaire
	ul36	pUL36; VP1/2		VP5; pUL37; pUL47; VP16	Impliquée dans la sortie du virus
	ul37	pUL37		pUL36	Impliquée dans la sortie du virus
	ul41	pUL41; VHS		VP16; pUL47	Dégradation de l'ARNm
	ul46	VP11/12		ICP0; pUL47, pUL48	Régule/Interagit avec pUL48
	ul47	pUL47; VP13/14		pUL46; VHS; pUL36; gM; VP16	Stimule l'expression des gènes précoces immédiats, lie l'ARN
	ul48	VP16		gH; VP22; VHS; pUL36	Stimule l'expression des gènes précoces immédiats
	ul49	UL49A=VP22		ICP0; gM; gE	Impliquée dans le trafic intracellulaire
	ul50	pUL50			Métabolisme des acides nucléiques
	ul51	pUL51		pUL7	Associée avec le Golgi
	us2	US2			Interagit avec la cytotkératine
	us3	US3		pUL21	Protéine kinase avec activité anti-apoptotique
	us10	US10			Etroitement associée aux capsides
	us11	US11; Vmw21			Activité de liaison à l'ARN; activité de trafic intracellulaire
	rs1	ICP4; IE175			Régulation des gènes; protéine régulatrice majeure
	rl2	ICP0; IE110; a0		VP22; pUL46	Transactivateur de proximité avec des domaines d'ubiquitine ligase E3
	rl1	RL1; ICP34.5			Module la synthèse des protéines



<b>Capside</b>	ul6	portal protein UL6		VP5	Encapsidation de l'ADN, sous-unité du complexe portal
	ul17	UL17		VP5; UL25	Encapsidation de l'ADN Associée à la capsid B et C
	ul18	VP23		VP19C; VP5	Assemblage de la capsid
	ul19	VP5		VP19C; VP23; VP26; UL25	Assemblage de la capsid Protéine majeure de la capsid
	ul25	processing and packaging DNA		UL17	Encapsidation de l'ADN
	ul26	P40; <b>VP24</b> ; VP22A		on peut retrouver VP24 dans la capsid. UL26 donne différentes protéines après clivage lors du processus	Assemblage de la capsid
	ul35	VP26		VP5	Assemblage de la capsid
	ul38	UL38; VP19C		VP23	Assemblage de la capsid

<b>Absent du virion</b>	ul2	UL2		Métabolisme acide nucléique
	ul3	UL3		Phosphoprotéine nucléaire
	ul4	UL4		Protéine nucléaire
	ul5	UL5		Réplication de l'ADN
	ul8	UL8		Réplication de l'ADN
	ul9	UL9		Protéine de liaison dans la réplication
	ul12	UL12		Métabolisme acide nucléique
	ul15	Terminase, expected in capsid		Encapsidation de l'ADN
	ul24	UL24		Associée à la membrane
	ul28	ICP18.5, expected in capsid		Encapsidation de l'ADN
	ul29	UL29; ICP8		Réplication de l'ADN
	ul30	DNA polymerase		Réplication de l'ADN
	ul33	UL33, expected in capsid		Encapsidation de l'ADN
	ul32	UL32 (Env?)		Encapsidation de l'ADN
	ul39	UL39; RR-1; ICP6		Métabolisme acide nucléique
	ul40	UL40; RR-2		Petite sous unité de la ribonucléotide réductase
	ul42	UL42		Réplication de l'ADN
	ul52	UL52		Réplication de l'ADN
	ul54	IE63; ICP27		Régulation génique post-transcriptionnelle
	ul55	UL55		Protéine liant la matrice nucléaire
us1	ICP22; IE68		Stimule l'expression des gènes tardifs	
us12	ICP47; IE12		Contrôle la réponse immunitaire	
lrp1	LRP1		Protéine associée à la latence	
lrp2	LRP2		Protéine associée à la latence	
LAT	none		Protéine associée à la latence	

## Annexe 2

Liste des protéines exclusivement biotinylées par gM-BirA\*-HA après analyse des données obtenus par MS. Certaines protéines ont été identifiées en prenant compte d'un enrichissement 10 fois supérieur aux contrôles. Le poids moléculaire des protéines est indiqué (PM en kDa).

Classes protéique	Numéro d'accession	Gènes	Protéines	PM (kDa)	4 hpi et/ou 12 hpi
Adhésion cellulaire	ITB1_HUMAN	ITGB1	Integrin beta-1	88	12 hpi
Développement cellulaire	GRIN1_HUMAN	GPRIN1	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	102	12 hpi
Division Cellulaire	A0A024R6C4_HUMAN	NUMB	Numb homolog	61	4 -12 hpi
Différenciation	Q6ZQN2_HUMAN / AHNK_HUMAN	AHNAK	Neuroblast differentiation associated protein AHNAK (Fragment)	181	12 hpi
Jonctions	A0A0G2JMZ8_HUMAN	OCLN	Occludin	59	4 – 12 hpi
	JPH1_HUMAN	JPH1	Junctophilin-1	72	4- 12 hpi
Enzymes	A0A024QZR3_HUMAN	hCG_2002731	Protein pelota homolog	43	12 hpi
	A0A0A0MSZ1_HUMAN	MARK3	Non-specific serine/threonine protein kinase	84	12 hpi
	A0A0D9SGJ6_HUMAN	SYNJ1	Synaptojanin-1	168	12 hpi
	A0A0S2Z3F2_HUMAN	ARAF	V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene-like protein isoform 2	68	12 hpi
	A0A0S2Z3Y3_HUMAN	AGFG1	ArfGAP with FG repeats 1 isoform 4	60	12 hpi

A0A0S2Z472_HUMAN	PRKAR2A	Protein kinase cAMP-dependent regulatory type II alpha isoform 1	43	12 hpi
A8K321_HUMAN / TMTC3_HUMAN	TMTC3	Transmembrane and TPR repeat-containing protein 3	104	12 hpi
AAPK1_HUMAN	PRKAA1	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	64	12 hpi
AR13B_HUMAN	ARL13B	ADP-ribosylation factor-like protein 13B	49	12 hpi
B2R673_HUMAN / H0YD97_HUMAN	PDHX	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	54	12 hpi
B3KMB8_HUMAN / FAKD2_HUMAN	FASTKD2	FAST kinase domains-containing protein 2, mitochondrial	81	12 hpi
B4DLN7_HUMAN / Q567U3_HUMAN	CYP20A1	CYP20A1 protein	53	12 hpi
B4E1E2_HUMAN / HGS_HUMAN	HGS	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	75	12 hpi
B7ZAV4_HUMAN / DHC24_HUMAN	DHCR24	cDNA, FLJ79318, highly similar to 24-dehydrocholesterol reductase	55	12 hpi
CBPD_HUMAN	CPD	Carboxypeptidase D	153	4 – 12 hpi
CLPP_HUMAN	CLPP	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial O	30	12 hpi

	CMTD1_HUMAN	COMTD 1	Catechol O- methyltransferase domain-containing protein 1	29	12 hpi
	DJC10_HUMAN	DNAJC1 0	DnaJ homolog subfamily C member 10	91	12 hpi
	E9PC69_HUMAN	MARK2	Non-specific serine/threonine protein kinase	87	12 hpi
	ICMT_HUMAN	ICMT	Protein-S- isoprenylcysteine O- methyltransferase	32	12 hpi
	KC1A_HUMAN	CSNK1 A1	Casein kinase I isoform alpha	39	12 hpi
	MTMR6_HUMAN	MTMR6	Myotubularin-related protein 6	72	4 hpi
	PAK4_HUMAN	PAK4	Serine/threonine- protein kinase PAK 4	64	12 hpi
	PEAK1_HUMAN	PEAK1	Pseudopodium- enriched atypical kinase 1	193	12 hpi
	PFKAP_HUMAN	PFKP	ATP-dependent 6- phosphofructokinase, platelet type	86	12 hpi
	PHAR4_HUMAN	PHACT R4	Phosphatase and actin regulator 4	78	12 hpi
	PLCA_HUMAN	AGPAT1	1-acyl-sn-glycerol-3- phosphate acyltransferase alpha	32	12 hpi
	PTPRG_HUMAN	PTPRG	Receptor-type tyrosine- protein phosphatase gamma	162	12 hpi
	Q59E91_HUMAN / RPOM_HUMAN	POLRM T	DNA-directed RNA polymerase (Fragment)	121	12 hpi

	RHG01_HUMAN	ARHGA P1	Rho GTPase-activating protein 1	50	12 hpi
	SAC1_HUMAN	SACM1 L	Phosphatidylinositide phosphatase SAC1	67	12 hpi
	SPTC1_HUMAN	SPTLC1	Serine palmitoyltransferase 1	53	12 hpi
	SPTC2_HUMAN	SPTLC2	Serine palmitoyltransferase 2	63	4 – 12 hpi
	STEA3_HUMAN	STEAP3	Metalloreductase	55	4 – 12 hpi
	TMX1_HUMAN	TMX1	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	32	12 hpi
	TRM5_HUMAN	TRMT5	tRNA (guanine(37)- N1)-methyltransferase	58	12 hpi
	VPP1_HUMAN	ATP6V0 A1	V-type proton ATPase subunit a	96	4 hpi
	UBIA1_HUMAN	UBIAD1	UbiA prenyltransferase domain-containing protein 1	37	4 – 12hpi
	UB2G2_HUMAN	UBE2G2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G2	19	12 hpi
	UBE2N_HUMAN	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	17	12 hpi
	UGDH_HUMAN	UGDH	UDP-glucose 6- dehydrogenase	55	12 hpi
<b>Facteur de transcription</b>	C2D1A_HUMAN	CC2D1A	Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	104	12 hpi
<b>Protéines adaptatrices</b>	A0A0S2Z4E4_HUMAN	NCK1	NCK adaptor protein 1 isoform 3	28	12 hpi
	AP3S1_HUMAN	AP3S1	AP-3 complex subunit sigma-1	22	12 hpi
	B2RBH1_HUMAN / PKHA1_HUMAN	PLEKH A1	Pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide	46	12 hpi

			binding specific) member 1		
	B4DHK5_HUMAN / A0A024RAY7_HUMAN	PLEKH A5	Pleckstrin homology domain-containing family A member 5	136	12 hpi
	BAIP2_HUMAN	BAIAP2	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	61	12 hpi
	FCHO2_HUMAN	FCHO2	F-BAR domain only protein 2	89	12 hpi
	NCK2_HUMAN	NCK2	Cytoplasmic protein NCK2	43	12 hpi
	Q6NT31_HUMAN	STON2	Stonin 2 OS=Homo sapiens	101	12 hpi
	Q14BD4_HUMAN	ITSN1	ITSN1 protein OS=Homo sapiens GN=ITSN1 PE=2 SV=1	195	12 hpi
<b>Protéines d'ancrages</b>	A0A1B0GUZ7_HUMAN	EFR3A	Protein EFR3 homolog A	96	12 hpi
	CKAP4_HUMAN	CKAP4	Cytoskeleton- associated protein 4	66	12 hpi
	Q5CZB5_HUMAN	DKFZp6 86M043 0	Putative uncharacterized protein DKFZp686M0430	125	12 hpi
<b>Protéines motrices</b>	D3DTH7_HUMAN	MYO1C	Myosin IC, isoform CRA_a	99	12 hpi
<b>Protéine Scaffold</b>	A0A0C4DFT3_HUMAN	DLG1	Disks large homolog 1	100	4 – 12 hpi
	A8K6S3_HUMAN / A0A0U1RRM8_HUMAN	FERMT2	Fermitin family homolog 2	78	12 hpi

	E7EMK3_HUMAN	FLOT2	Flotillin-2 OS=Homo sapiens GN=FLOT2 PE=1 SV=1	53	12 hpi
<b>Protéines de régulation</b>	A0A140LJL2_HUMAN	CBARP	Voltage-dependent calcium channel beta subunit-associated regulatory protein	74	4 – 12 hpi
	A8K4L6_HUMAN	VANGL	Vang-like protein	60	12 hpi
	B9EGI2_HUMAN	MPRIP	Myosin phosphatase Rho interacting protein	118	12 hpi
	BI2L1_HUMAN	BAIAP2L1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1	57	12 hpi
	C9JA28_HUMAN	SSR3	Translocon-associated protein subunit gamma	20	12 hpi
	CHP1_HUMAN	CHP1	Calcineurin B homologous protein 1	22	12 hpi
	CPNE8_HUMAN	CPNE8	Copine-8 OS=Homo sapiens	63	12 hpi
	DAD1_HUMAN	DAD1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1	12	12 hpi
	DERL2_HUMAN	DERL2	Derlin-2 OS=Homo sapiens	28	12 hpi
	EPS15_HUMAN	EPS15	Epidermal growth factor receptor substrate 15	99	12 hpi
	FA83B_HUMAN	FAM83B	Protein FAM83B	115	12 hpi
	FITM2_HUMAN	FITM2	Fat storage-inducing transmembrane protein 2	30	12 hpi
	KDIS_HUMAN	KIDINS220	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa	197	12 hpi

	LSR_HUMAN	LSR	Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor	71	12 hpi
	MARCS_HUMAN	MARCK S	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	32	12 hpi
	MRP_HUMAN	MARCK SL1	MARCKS-related protein	20	12 hpi
	OCRL_HUMAN	OCRL	Inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL-1	104	12 hpi
	ORML1_HUMAN	ORMDL 1	ORM1-like protein 1	17	12 hpi
	P85A_HUMAN	PIK3R1	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	84	12 hpi
	RICTR_HUMAN	RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR	192	12 hpi
	SRRT_HUMAN	SRRT	Serrate RNA effector molecule homolog	101	12 hpi
	US6NL_HUMAN	USP6NL	USP6 N-terminal-like protein OS=Homo sapiens GN=USP6NL PE=1 SV=3	94	12 hpi
	VANG1_HUMAN	VANGL 1	Vang-like protein 1	60	12 hpi
	VAPB_HUMAN	VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	27	12 hpi
	WASF2_HUMAN	WASF2	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	54	12 hpi
	WASL_HUMAN	WASL	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	55	12 hpi
<b>Récepteurs</b>	AGRL2_HUMAN	ADGRL 2	Adhesion G protein-coupled receptor L2	163	12 hpi
	EPHA2_HUMAN	EPHA2	Ephrin type-A receptor 2	108	4 – 12 hpi



	ITM2B_HUMAN	ITM2B	Integral membrane protein 2B	30	4 hpi
	MPRI_HUMAN	IGF2R	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	274	4 – 12 hpi
	NBEA_HUMAN	NBEA	Neurobeachin	328	4 hpi
	ROR2_HUMAN	ROR2	Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor	105	4 – 12 hpi
	SNP23_HUMAN	SNAP23	Synaptosomal-associated protein 23	23	4 – 12 hpi
	TR10B_HUMAN	TNFRSF	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B	48	4 hpi
<b>Structures</b>	B2R4V2_HUMAN	RPL36A L	cDNA, FLJ92227, highly similar to Homo sapiens ribosomal protein L36a-like	13	12 hpi
	B7Z1G8_HUMAN	SURF4	Surfeit 4, isoform CRA_b	25	4 – 12 hpi
	TMM43_HUMAN	TMEM4 3	Transmembrane protein 43	45	4 – 12 hpi
	B4DEI4_HUMAN / G0RS2_HUMAN	G0RASP 2	Golgi reassembly-stacking protein 2	42	12 hpi
	GCP60_HUMAN	ACBD3	Golgi resident protein GCP60	61	12 hpi
<b>Synthèse protéique</b>	SELB_HUMAN	EEFSEC	Selenocysteine-specific elongation factor	65	12 hpi
<b>Translocase</b>	ATP7A_HUMAN	ATP7A	Copper-transporting ATPase 1	163	12 hpi
<b>Transport ionique</b>	A0A024RAL3_HUMAN	ZFYVE1 6	Zinc finger, FYVE domain containing 16	169	12 hpi
	B4DF30_HUMAN	SLC12A 4	Solute carrier family 12 member 4	121	4 hpi
	B4DT03_HUMAN /	GPR89A	Golgi pH regulator B (A?)	51	12 hpi

	A0A087WW82_HUMAN				
	B7ZLR2_HUMAN	ATP7B	ATP7B protein	150	12 hpi
	C9JRP1_HUMAN	SLC4A7	Anion exchange protein	118	4 – 12 hpi
	CNNM3_HUMAN	CNNM3	Metal transporter CNNM3	76	12 hpi
	F8VX04_HUMAN	SLC38A1	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1	56	4 – 12 hpi
	H7C3C4_HUMAN	SLC4A7	Anion exchange protein	90	4 – 12 hpi
	LAT1_HUMAN	SLC7A5	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	55	12 hpi
	Q68CX0_HUMAN	DKFZp761I0921	Transporter	81	4 – 12 hpi
	S12A2_HUMAN	SLC12A2	Solute carrier family 12 member 2	131	12 hpi
	S38A2_HUMAN	SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	56	4 – 12 hpi
	ZNT1_HUMAN	SLC30A1	Zinc transporter 1	55	12 hpi
	ZNT5_HUMAN	SLC30A5	Zinc transporter 5 OS=Homo sapiens GN=SLC30A5 PE=1 SV=1	84	12 hpi
	4F2_HUMAN	SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	68	4 – 12 hpi
<b>Transport protéique</b>	A0A024R2H0_HUMAN	TBC1D5	TBC1 domain family, member 5	89	12 hpi
	G3V4K3_HUMAN	VIPAS39	Spermatogenesis-defective protein 39 homolog	60	4 – 12 hpi

	Q6FHJ5_HUMAN	SCAMP 3	Secretory carrier-associated membrane protein	38	4 hpi
	A8K5H3_HUMAN / RBNS5_HUMAN	RBSN	Rabenosyn-5	89	12 hpi
	B3KW08_HUMAN / XP06_HUMAN	XP06	Exportin-6	127	12 hpi
	STAM1_HUMAN	STAM	Signal transducing adapter molecule 1	59	12 hpi
<b>Transport lipidique</b>	H3BMF4_HUMAN	SPNS1	Protein spinster homolog 1	61	12 hpi
<b>Transport vésiculaire</b>	A0A024RC31_HUMAN	KIAA1012	KIAA1012	161	12 hpi
	A7XZY7_HUMAN	ITSN1	Intersectin 1 short form variant 4	134	12 hpi
	A0A087WVF7_HUMAN	ITSN2	Intersectin-2	192	12 hpi
	A0A087WWM0_HUMAN	TRAPPC3	Trafficking protein particle complex subunit 3	21	12 hpi
	A0A0A0MRI2_HUMAN	SNX6	Sorting nexin	48	12 hpi
	A8K0M6_HUMAN	TMEM87A	Transmembrane protein 87A	63	4 – 12 hpi
	B3KU05_HUMAN / TCP11_HUMAN	TRAPPC11	Trafficking protein particle complex subunit 11	129	12 hpi
	B4DMP4_HUMAN / VAC14_HUMAN	VAC14	Vac14 homolog	80	12 hpi
	B4DSQ5_HUMAN / SEC23A_HUMAN / F5H365_HUMAN	SEC23A	Protein transport protein Sec23A	83	12 hpi
	B4E2S3_HUMAN / RFTN1_HUMAN	RFTN1	Raftlin	87	12 hpi

B5BU81_HUMAN	YKT6	YKT6 v-SNARE protein	22	12 hpi
C9JN9_HUMAN	VPS8	Vacuolar protein sorting-associated protein 8 homolog	162	12 hpi
EPN4_HUMAN	CLINT1	Clathrin interactor 1	68	4 – 12 hpi
F8WCA0_HUMAN	VAMP2	Vesicle-associated membrane protein 2	13	12 hpi
F91A1_HUMAN	FAM91A1	Protein FAM91A1	94	4 – 12 hpi
GGA3_HUMAN	GGA3	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA3	78	12 hpi
GOGA4_HUMAN	GOLGA4	Golgin subfamily A member 4	261	4 – 12 hpi
H3BU86_HUMAN / H0YEW0_HUMAN	STX16	STX16-NPEPL1 readthrough (NMD candidate)	43	12 hpi
K319L_HUMAN	KIAA0319L	polycystic kidney disease 1-related	116	4 – 12 hpi
K7EY4_HUMAN	STX10	Syntaxin-10 (Fragment)	26	12 hpi
SC24B_HUMAN	SEC24B	Protein transport protein Sec24B	129	4 – 12 hpi
SCAM1_HUMAN	SCAM1	Secretory carrier-associated membrane protein 1	38	4 – 12 hpi
SNP29_HUMAN	SNAP29	Synaptosomal-associated protein 29	29	12 hpi
SNX1_HUMAN	SNX1	Sorting nexin 1	59	4 hpi
SNX2_HUMAN	SNX2	Sorting nexin 2	58	4 hpi
STAM1_HUMAN	STAM	Signal transducing adapter molecule 1	59	12 hpi
STAM2_HUMAN	STAM2	Signal transducing adapter molecule 2	58	12 hpi

	STX6_HUMAN	STX6	Syntaxin-6	29	12 hpi
	STX7_HUMAN	STX7	Syntaxin-7	30	12 hpi
	STX8_HUMAN	STX8	Syntaxin-8	27	12 hpi
	STXB3_HUMAN	STXBP3	Syntaxin-binding protein 3	68	12 hpi
	TPC10_HUMAN	TRAPPC 10	Trafficking protein particle complex subunit 10	142	12 hpi
	TPC2A_HUMAN	TRAPPC 2	Trafficking protein particle complex subunit 2	16	12 hpi
	TPC6B_HUMAN	TRAPPC 6B	Trafficking protein particle complex subunit 6B	18	12 hpi
	TPPC5_HUMAN	TRAPPC 5	Trafficking protein particle complex subunit 5	21	12 hpi
	TPPC9_HUMAN	TRAPPC 9	Trafficking protein particle complex subunit 9	129	12 hpi
	VAMP3_HUMAN	VAMP3	Vesicle-associated membrane protein 3	11	4 – 12 hpi
	VP33B_HUMAN	VPS33B	Vacuolar protein sorting-associated protein 33B	71	4 hpi
	VPS45_HUMAN	VPS45	Vacuolar protein sorting-associated protein 45	65	4 – 12 hpi
	VPS50_HUMAN	VPS50	Syndetin OS=Homo sapiens GN=VPS50 PE=1 SV=3	111	12 hpi
<b>Autres</b>	A0A0C4DG21_HUMAN	ABI2	Abl interactor 2	55	12 hpi
	A8K4K9_HUMAN / EMC2_HUMAN	EMC2	ER membrane protein complex subunit 2	35	12 hpi

	F234B_HUMAN	FAM234 B	Protein FAM234B	67	4 – 12 hpi
	LRBA_HUMAN / E9PEM5_HUMAN	LRBA	Lipopolysaccharide- responsive and beige- like anchor protein	319	4 – 12 hpi
	B2R9T9_HUMAN	?	cDNA, FLJ94551	26	12 hpi
	B4DSW9_HUMAN	?	cDNA FLJ59415, highly similar to Beta- catenin	78	12 hpi
	BASP1_HUMAN	BASP1	Brain acid soluble protein 1	23	12 hpi
<b>Protéines identifiées en considérant un enrichissement &gt;10 dans la lignée gM-BirA*-HA</b>	GRIN1_HUMAN	GPRIN1	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	102	12 hpi
	NBEA_HUMAN	NBEA	Neurobeachin	328	4 hpi
	TMM43_HUMAN	TMEM4 3	Transmembrane protein 43	45	4 – 12 hpi
	4F2_HUMAN	SLC3A2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	68	4 – 12 hpi
	EPN4_HUMAN	CLINT1	Clathrin interactor 1	68	4 – 12 hpi
	F91A1_HUMAN	FAM91 A1	Protein FAM91A1	94	4 – 12 hpi
	VPS45_HUMAN	VPS45	Vacuolar protein sorting-associated protein 45	65	4 – 12 hpi
	LRBA_HUMAN / E9PEM5_HUMAN	LRBA	Lipopolysaccharide- responsive and beige- like anchor protein	319	4 – 12 hpi

