

Université de Montréal

**Rôle des modulateurs de la protéine kinase D dans la  
propagation du virus herpès simplex de type 1**

par Élisabeth Roussel

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie  
Faculté de Médecine

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

Juin, 2018

© Élisabeth Roussel, 2018

## Résumé

Le virus herpès simplex de type 1 affecte la population mondiale en entraînant des lésions bénignes comme les feux sauvages, mais aussi des complications sévères telles que la cécité. Les traitements actuels ne permettent toutefois pas d'éradiquer ce virus, car ce dernier a notamment un rapide et complexe cycle de vie. Les acteurs moléculaires impliqués dans les différentes étapes du cycle viral sont encore peu connus, mais le laboratoire a précédemment démontré l'implication de la protéine kinase D de l'hôte et du diacylglycérol, sa principale molécule d'ancrage, dans la sortie du virus du réseau *trans*-Golgien vers la membrane plasmique. Ce projet de maîtrise va plus loin en étudiant le rôle des différents modulateurs de la protéine kinase D dans la propagation virale. Suite à des expériences d'ARN d'interférence, de surexpression et l'utilisation de drogue, les résultats démontrent que, contrairement à la protéine kinase D, plusieurs de ses modulateurs comme CERT, GGA1 et Nir2 régulent négativement la relâche extracellulaire du virus. Ces effets seraient d'ailleurs indépendants des niveaux intracellulaires totaux de diacylglycérol. La microscopie électronique suggère enfin que la protéine kinase D et Nir2 ne jouent pas seulement un rôle au niveau du réseau *trans*-Golgien, mais affectent également d'autres étapes de la propagation virale comme la sortie nucléaire. Au final, ces résultats contribuent à une meilleure compréhension du transport du virus herpès simplex de type 1 et de ses interactions avec la cellule hôte. Ces nouvelles données pourraient éventuellement mener au développement de nouveaux traitements, puisqu'elles peuvent s'appliquer à d'autres virus ou aux larges cargos cellulaires.

**Mots-clés** : Virus herpès simplex de type 1, réseau *trans*-Golgien, protéine kinase D, CERT, GGA, Nir2, transport intracellulaire

## Abstract

Herpes simplex virus type 1 affects the world's population by causing benign lesions such as cold sores, but also severe complications such as blindness. However, current treatments do not eradicate this virus, because the latter has a fast and complex life cycle. The molecular actors involved in the various stages of the viral cycle are still little known, but the laboratory has previously demonstrated the involvement of the host protein kinase D and diacylglycerol, its main anchoring molecule, in the release of the virus from the *trans*-Golgi network to the plasma membrane. This project goes further by studying the role of different modulators of protein kinase D in viral propagation. Following RNA interference, overexpression and drug experiments, the results demonstrate that, unlike protein kinase D, several of its modulators such as CERT, GGA1 and Nir2 negatively regulate the extracellular release of the virus. These effects are, moreover, independent of the total intracellular levels of diacylglycerol. Finally, electron microscopy suggests that protein kinase D and Nir2 do not only play a role in the *trans*-Golgi network, but also affect other steps of viral propagation such as nuclear release. These results contribute to a better understanding of the transport of herpes simplex virus type 1 and its interactions with the host cell. These new data could eventually lead to the development of new treatments, since they can be applied to other viruses or large cellular cargos.

**Keywords:** Herpes simplex virus type 1, *trans*-Golgi network, protein kinase D, CERT, GGA, Nir2, intracellular transport

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	vii
Remerciements.....	xi
1. Introduction.....	1
1.1 Généralités.....	1
1.1.1 Historique et définition des virus.....	1
1.1.2 Virus herpès simplex de type 1 : Un bon modèle de recherche.....	1
1.2 Virus herpès simplex de type 1.....	2
1.2.1 Classification.....	2
1.2.2 Problématique : Épidémiologie, pathogenèse, antiviraux et résistance.....	3
1.2.3 Structure du VHS-1.....	4
1.2.4 Cycle viral.....	7
1.2.5 Latence.....	13
1.3 Interactions hôte-pathogène.....	14
1.4 Protéine kinase D.....	15
1.4.1 Structure et fonctions.....	15
1.5 Transport vésiculaire du TGN vers la MP.....	16
2 Résultats.....	22
2.1 Objectifs et approche du projet de recherche.....	22
2.2 Présentation sous forme d'article.....	23
2.2.1 Notes sur le texte.....	23
2.2.2 Contribution des auteurs.....	23
2.2.3 Article.....	24
3 Discussion.....	51
3.1 Les modulateurs de la PKD agissent comme antiviraux.....	51

3.2	CERT régule la sortie virale indépendamment du transport des lipides.....	53
3.3	Les modulateurs de la PKD agissent à plusieurs étapes du cycle viral .....	54
3.4	Analyse des différents isoformes de la PKD .....	55
3.5	Rôle de la PKD et de ses modulateurs... ..	55
3.5.1	...Dans les cellules polarisées.....	55
3.5.2	...Dans le transport des gros cargos cellulaires .....	56
3.5.3	...Chez d'autres virus .....	56
3.5.4	...Dans le développement d'un traitement .....	58
3.6	Aspect novateur et contribution à l'avancement des connaissances.....	59
4	Conclusion .....	60
	Bibliographie.....	xiv
	Annexe 1 : Génome du VHS-1 .....	xxxii

## Liste des tableaux

Tableau I.	Classification et principales pathologies associées aux neuf virus herpès humains de la famille des <i>Herpesviridae</i> .....	2
Tableau II.	Caractéristiques des principaux modulateurs de la PKD .....	20
Tableau III.	Demi-vie estimée des protéines ciblées dans l'étude .....	52
Tableau IV.	Liste des gènes du VHS-1 et leurs principales caractéristiques .....	xxxii

## Liste des figures

Figure 1.	Représentation schématique du VHS-1.....	6
Figure 2.	Schématisation de la réplication de l'ADN viral .....	9
Figure 3.	Représentation schématique des quatre types de capsides du VHS-1 retrouvées au noyau .....	10
Figure 4.	Voie de dé-enveloppement / ré-enveloppement.....	12
Figure 5.	Représentation schématique des différents isoformes de la PKD chez plusieurs organismes.....	16
Figure 6.	Transport des lipides par Nir2.....	18
Figure 7.	Role of PKD and its modulators in vesicular cargo transport at the TGN.....	29
Figure 8.	Impact of PKD modulators on HSV-1 yields.....	31
Figure 9.	CERT overexpression hinders viral production.....	32
Figure 10.	Inhibition of CERT with the HPA-12 drug does not affect the egress of the virus .....	33
Figure 11.	CERT reagents function as expected .....	34
Figure 12.	Total intracellular DAG levels are not affected by the RNAi, CERT overexpression or HPA-12 drug.....	35
Figure 13.	The PKD pathway can modulate distinct steps along the viral egress pathway	38
Figure 14.	Implication of PKD modulators on HSV-1 egress.....	42

## Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Arf1	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
ARF1P1	Arfapтин1 ou <i>ADP-ribosylation factor-interacting protein 1</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN d'interférence
ARNm	ARN messenger
CDP	Cytidine diphosphate
CERT	<i>Ceramide transfer protein</i>
COL4A3BP	<i>Collagen type IV alpha-3-binding protein</i>
CRD	Domaine cysteine-rich Zinc-finger like
DAG	Diacylglycérol
dsiRNA	<i>Dicer-substrate RNA</i>
E	Précoce
EBV	Virus Epstein-Barr
Etc.	Et cætera
Ex.	Exemple
FAPP2	<i>Phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein 2</i>
GGA	<i>ADP-ribosylation factor-binding protein</i> ou <i>Golgi-localizing <math>\gamma</math>-adaptin ear homology domain Arf-binding protein</i>
GlcCer	Glucosylcéramide
HRV	Rhinovirus humain
ICP	<i>Infected cell protein</i>
IE	Précoce immédiat



INM	Membrane nucléaire interne
L	Tardif
LAT	Transcrit associé à la latence
LPA	Lyso-PA
MP	Membrane plasmique
MPR	Récepteurs mannose 6-phosphate
ND10	Domaine nucléaire 10
Nir2	<i>Pyk2 N-terminal domain-interacting receptor</i>
nPKC	Nouvelle protéine kinase C
ONM	Membrane nucléaire externe
Ori	Origine de réplication
OSBP	<i>Oxysterol-binding protein 1</i>
P	Région riche en proline
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PDZ	<i>Domaine postsynaptic density protein-95/disc-large tumor suppressor protein/zonula occludens-1</i>
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI	Phosphatidylinositol
PI(4,5)P2	Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PI4KIII $\beta$	Phosphatidylinositol-4-kinase III $\beta$
PI4P	Phosphatidylinositol 4-phosphate
PITPNM1	<i>Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1</i>
PKD	Protéine kinase D

PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PLEKHA8	<i>Pleckstrin homology domain-containing family A member 8</i>
RE	Réticulum endoplasmique
siRNA	Petit ARN d'interférence
SM	Sphingomyéline
TGN	Réseau <i>trans</i> -Golgien
U <sub>L</sub>	Séquence unique longue
U <sub>s</sub>	Séquence unique courte
VHS-1	Virus herpès simplex de type 1
VP	<i>Virion protein</i>
VSV G	Virus de la stomatite vésiculeuse
VZV	Virus Varicella-Zoster
$\alpha$	<i>Alpha</i> / précoce immédiat
$\beta$	<i>Bêta</i> / précoce
$\gamma$	<i>Gamma</i> / tardif
$\gamma 1$	<i>Gamma 1</i> / tardif fuyant
$\gamma 2$	<i>Gamma 2</i> / vrai tardif

*À tous mes supports*

## Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux que j'ai côtoyés, de loin ou de près, au cours des deux dernières années et qui ont rendu mon parcours à l'Université de Montréal si agréable et enrichissant. Plus particulièrement, merci Roger de m'avoir accueillie, si bien encadrée et offert de si belles opportunités. Je ne pensais plus pouvoir y arriver, mais ta détermination et ton optimisme ont finalement eu raison de moi. Johanne, merci pour ta bonne humeur de tous les jours, ton écoute attentive, ta collaboration et ton aide précieuse. Tu es un gros atout pour le laboratoire et nos petits échanges me manqueront. Merci aussi à tous les membres de l'équipe Lippé et Desjardins pour votre soutien et vos conseils avisés, mais surtout pour avoir fait de mon environnement de travail (ou plutôt d'études) un endroit plaisant et amical. Finalement, merci à mes amis et à ma famille de m'avoir écoutée, appuyée et encouragée dans les moments heureux tout comme les moments plus difficiles, même si, la plupart du temps, vous ne compreniez pas la moitié de ce que je vous racontais. Vous m'avez permis de souffler en dehors des innombrables heures passées au laboratoire. Encore une fois, merci à tous. Grâce à vous, je ne suis que plus prête pour la suite!

# **1. Introduction**

## **1.1 Généralités**

### **1.1.1 Historique et définition des virus**

Les références aux infections virales remontent à plusieurs siècles. En effet, on y faisait déjà allusion dans les hiéroglyphes de l'Égypte Antique ou encore dans les écrits de la Grèce Antique où le terme herpès, qui signifie ramper, était alors employé pour désigner les lésions cutanées semblant « ramper » à la surface de la peau des sujets infectés [1, 2]. Le terme virus, qui signifie quant à lui poison en latin, ne commença toutefois à prendre sens qu'en 1898 suite aux expériences d'Ivanovski et Beijerinck sur le virus de la mosaïque du tabac [3]. Ce n'est que bien plus tard avec l'apparition de la microscopie électronique dans les années 1930 que les virus purent enfin être visualisés et éventuellement mieux caractérisés.

Les virus, qui peuvent être retrouvés chez les mammifères, les végétaux et les bactéries, étaient au départ définis par leur petite taille. Aujourd'hui, suite aux énoncés du biologiste André Lwoff en 1953, trois critères permettent de les identifier : i) le génome viral est composé d'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN); ii) ils se reproduisent par réplication de leur matériel génétique et iii) ce sont des parasites intracellulaires obligatoires [4].

### **1.1.2 Virus herpès simplex de type 1 : Un bon modèle de recherche**

Malgré le fait que les virus soient évoqués depuis longtemps et que de grandes avancées dans le domaine de la science nous aient permis de développer des techniques pour mieux les étudier, plusieurs notions concernant leur cycle viral nous échappent encore aujourd'hui. Les recherches en virologie demeurent donc d'actualité et plus que pertinentes, surtout que les virus représentent entre autres des outils intéressants pour mieux comprendre le fonctionnement des cellules. En effet, ceux-ci peuvent être perçus comme des systèmes simplifiés qui permettent d'étudier plus facilement différents mécanismes cellulaires et moléculaires [5-7]. De plus, au cours des dernières années, plusieurs études prometteuses se sont penchées sur le rôle des virus comme vecteurs thérapeutiques [8-10]. Le virus herpès simplex de type 1 (VHS-1) représente

d'autant plus un bon modèle de recherche, puisqu'il a la capacité d'infecter un grand nombre de types cellulaires *in vitro* et de se répliquer rapidement [11]. Aussi, ses séquences génomiques et protéiques sont disponibles de même que plusieurs produits et réactifs facilitant ainsi son étude. Le VHS-1 entraîne également un faible risque pour la santé des expérimentateurs et les connaissances acquises peuvent souvent s'appliquer aux autres virus de la famille des *Herpesviridae*. D'ailleurs, en raison de sa distribution mondiale et de ses diverses complications médicales (cécité, encéphalite, etc.), les recherches menant à une meilleure compréhension du VHS-1 demeurent très importantes.

## 1.2 Virus herpès simplex de type 1

### 1.2.1 Classification

La taxonomie virale permet de classer les virus entre autres grâce à leurs caractéristiques structurales et les espèces qu'ils infectent. L'ordre des *Herpesvirales* est ainsi sous-catégorisé en trois familles : les *Herpesviridae* (pouvant infecter les mammifères, oiseaux et reptiles), *Alloherpesviridae* (pouvant infecter les poissons et grenouilles) ainsi que *Malacoherpesviridae* (pouvant infecter les bivalves). La famille des *Herpesviridae*, qui tient d'ailleurs son nom du VHS-1, comprend neuf virus pouvant être infectieux chez l'humain. Ils sont subdivisés en trois sous-familles : *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae* (voir **Tableau I**) [12]. Le VHS-1 fait quant à lui plus précisément partie de la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* qui possèdent les caractéristiques communes d'infecter un grand nombre de types cellulaires, de se propager rapidement et d'être latents dans les ganglions sensoriels [2].

**Tableau I. Classification et principales pathologies associées aux neuf virus herpès humains de la famille des *Herpesviridae***

Sous-famille	Virus herpès humain	Principales pathologies associées
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Herpès simplex de type 1	Lésions orolabiales, cécité, encéphalites
	Herpès simplex de type 2	Lésions génitales et anales
	Varicella-Zoster	Varicelle, zona

<i>Betaherpesvirinae</i>	Cytomégalovirus	Anomalies congénitales, rejet de greffe, mononucléose hétérophile-négative
	Virus herpès humain 6 de type A et B	Roséole, hépatite, encéphalite, rejet de greffe
	Virus herpès humain 7	Exanthème subit (roséole infantile), pityriasis rosea
<i>Gammapherpesvirinae</i>	Virus associé au sarcome de Kaposi	Sarcome de Kaposi, maladie de Castleman, lymphome primitif des séreuses
	Epstein-Barr	Mononucléose hétérophile-positif, lymphome de Burkitt africain, plusieurs cancers

### 1.2.2 Problématique : Épidémiologie, pathogenèse, antiviraux et résistance

Le VHS-1 est responsable de l'une des principales infections virales chez l'humain après les infections causées par les virus de la grippe et du rhume. Il est en fait présent dans plus de 80% de la population [13, 14], sa prévalence variant selon la localisation géographique, l'âge et le statut économique. C'est-à-dire que la séroprévalence est plus grande dans les pays en voie de développement et augmente avec l'âge [15]. Le VHS-1 est transmis par contact direct avec un individu porteur, la primo-infection s'étalant de l'enfance à l'âge adulte. Comme le virus a la capacité d'entrer en latence, ce dernier persiste dans le corps et les individus infectés restent porteurs toute leur vie [16]. Ils sont alors susceptibles aux réactivations du virus qui peuvent survenir lors d'un stress, la fatigue, les menstruations, les rayons ultra-violet ou encore la fièvre [17, 18].

Le VHS-1 est responsable de plusieurs pathologies, allant de bénignes à mortelles. Il entraîne le plus fréquemment des lésions orolabiales, plus communément appelées feux sauvages, mais il est également l'une des principales causes de cécité d'origine infectieuse en Amérique du Nord [19]. Il peut aussi entraîner l'herpès génital et causer des encéphalites [15]. L'infection par le VHS-1 peut entraîner des complications fatales chez les nouveau-nés et chez les patients immunodéficients. Des études établissent également un lien entre le VHS-1 et la paralysie de Bell [20, 21] ou encore l'Alzheimer [22-24].

Différents médicaments sont disponibles sur le marché, les antiviraux les plus connus étant l'acyclovir et ses dérivés (valaciclovir, penciclovir, ganciclovir et cidofovir) de même que le foscarnet. Ce sont des analogues de nucléosides, respectivement le 2'-déoxyguanosine et le pyrophosphate. Ces composés s'incorporent à l'ADN et inhibent la réplication virale [25, 26]. Certaines études démontrent également que cibler le complexe hélicase-primase viral permet d'inhiber la réplication de l'ADN viral [27, 28]. D'autres approches consistent plutôt à inhiber la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique (MP), empêchant ainsi l'entrée du virus dans la cellule et diminuant de ce fait sa propagation [29]. Dans tous les cas, ces thérapies antivirales ne permettent que de contrôler la phase active du virus et de réduire la charge virale pour atténuer les symptômes. Étant donné qu'elles ne permettent pas de cibler le virus en phase latente et de l'éliminer complètement, avec le temps, le VHS-1 présent dans l'organisme subit des mutations qui lui permettent de s'adapter, le rendant ainsi résistant aux médicaments actuels, un enjeu particulier pour les immunosupprimés [30, 31]. Malgré le fait que les agents actuels soient peu toxiques puisqu'ils inhibent beaucoup plus efficacement les protéines virales que cellulaires [32], de nouvelles thérapies doivent être développées pour éviter ces résistances. La recherche sur de nouveaux agents anti-herpétiques s'oriente donc maintenant vers des cibles cellulaires [33], d'où l'importance d'identifier les partenaires cellulaires du virus à différentes étapes de son cycle viral.

### 1.2.3 Structure du VHS-1

Le VHS-1 a une structure bien particulière qui est semblable entre les virus de la famille des *Herpesviridae*. Globalement, le virion mature est composé d'ADN bicaténaire linéaire protégé dans une capsidie icosaédrique, elle-même entourée d'une couche de tégument et d'une enveloppe lipidique [2] (**voir Figure 1A**).

#### 1.2.3.1 Génome viral

La séquence génomique complète du VHS-1 a été publiée en 1988 et se compose de 152 kilobases paires de bases [34]. Le génome consiste en deux séquences uniques longue ( $U_L$ ) ou courte ( $U_S$ ) ayant chacune à leurs extrémités des séquences répétées inversées (terminales ou internes) (**voir Figure 1B**). Le génome comprend également trois origines de réplication (Ori), une Ori<sub>L</sub> et deux copies d'Oris, même si une seule de ces copies pourrait suffire pour amorcer la



réplication [35]. Le génome viral possède plus de 80 cadres de lecture et code pour au moins 75 gènes différents. Quarante de ces gènes seraient d'ailleurs conservés chez les *Herpesviridae* [36]. Les produits de ces gènes ne seraient cependant pas tous essentiels à la réplication du virus *in vitro* [37]. Un tableau résumant les différents gènes, leurs produits, cinétique d'expression, localisation dans le virion extracellulaire, principales fonctions et importance est présent en annexe (**voir Annexe 1**). Pour s'y retrouver, il est bon de savoir que les gènes viraux sont nommés en fonction de leur localisation dans le génome (par exemple segment UL ou US suivi de leur position relative) alors que les protéines virales peuvent être nommées selon le gène à partir duquel elles sont transcrites, d'après les termes *Infected Cell Protein* (ICP) et *Virion Protein* (VP) ou plusieurs autres appellations parallèles (ex : VHS,  $\alpha$ -TIF, etc.).

### **1.2.3.2 Capside icosaédrique**

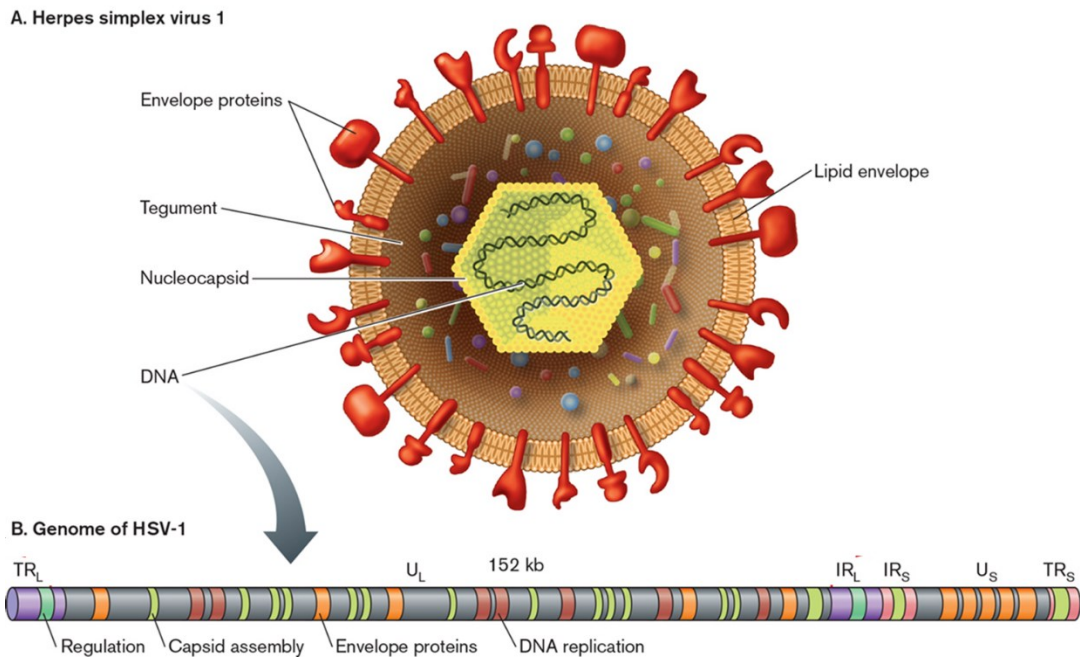
La capside est constituée de 162 sous-unités protéiques appelées capsomères formant un icosaèdre (20 faces) d'environ 125 nm. Elle est composée de quatre protéines virales : VP5 (la protéine majeure de la capside) formant les capsomères, VP26 se liant aux hexons de VP5 ainsi que VP19C et VP23 (sous forme de dimère) qui connectent les capsomères ensemble [2, 38].

### **1.2.3.3 Tégument**

Le tégument entourant la capside correspond à une couche de protéines hétérogènes. Il est composé d'au moins 24 protéines virales différentes (UL7, UL11, UL13, UL14, UL16, UL21, UL23, UL36, UL37, UL41, UL46, UL47, UL48, UL49, UL50, UL51, UL55, US2, US3, US10, US11, RI1, RL2 et RS1) et jusqu'à 49 protéines cellulaires [39, 40]. Ces protéines forment des liens complexes avec les protéines de la capside, les protéines intégrées dans l'enveloppe du virus ou encore entre elles [41, 42]. Ces protéines peuvent être acquises au niveau du noyau, du cytoplasme ou encore du site d'enveloppement final selon une séquence spécifique tout au long du voyage du virus dans la cellule [43]. Malgré le fait que le rôle de plusieurs de ces protéines de même que leur séquence exacte d'acquisition soient encore méconnus, le tégument jouerait un rôle primordial dans la maturation du virus. Effectivement, certaines protéines sont impliquées dans le transport du virus, la régulation de l'expression des gènes ou encore l'assemblage du virion [40, 41, 44].

### 1.2.3.4 Enveloppe lipidique

L'enveloppe des virions matures, qui dérive d'un compartiment intracellulaire, est essentielle pour l'infection. Elle est enrichie en sphingomyéline et phosphatidylsérine [45, 46]. Elle est également composée d'une dizaine de glycoprotéines (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM, gN) et de quelques protéines virales (UL20, UL43, UL45, UL56 et US9) [2, 47]. Les glycoprotéines sont impliquées dans plusieurs processus, mais elles sont surtout caractérisées pour leurs rôles dans l'entrée du virus dans la cellule hôte, la relâche nucléaire ou encore la relâche des virions au niveau des jonctions intercellulaires [48-50]. Avec cette enveloppe, le virion mature atteint ainsi un diamètre de 200-300 nm [51].



**Figure 1. Représentation schématique du VHS-1**

**A.** Structure générale d'un virion mature enveloppé. Les différents composants sont identifiés.  
**B.** Identification des principales régions du génome viral. IR : Séquences répétées inversées internes. TR : Séquences répétées inversées terminales. U<sub>L</sub> : Séquence unique longue. U<sub>S</sub> : Séquence unique courte. Modifié de [52].

## 1.2.4 Cycle viral

### 1.2.4.1 Entrée

Selon le type cellulaire, le VHS-1 utilise différents mécanismes d'entrée dans la cellule hôte. C'est-à-dire qu'il peut entrer par fusion directe entre l'enveloppe virale et la MP ou par endocytose dépendante/indépendante du pH [53, 54]. L'endocytose est cependant surtout observée chez les cellules *in vitro*, car les cellules habituellement infectées chez l'humain ne favorisent pas cette voie [55]. Pour entrer dans la cellule, le virus s'attache à la surface de la cellule via l'interaction entre la glycoprotéine gC ou gB à l'héparine sulfate [56]. Cette interaction ne serait toutefois pas essentielle à l'infection du VHS-1 [57]. Suite à l'attachement du virion, la glycoprotéine gD peut interagir avec trois récepteurs, soient la nectine-1, le médiateur de l'entrée des virus herpès ou encore une forme d'héparine sulfate modifiée par des 3-O-sulfotransférases [58, 59]. La liaison de gD à un récepteur entraîne un changement de conformation et l'activation de la machinerie de fusion composée de gB et gH/gL [60, 61]. Ainsi, les récepteurs permettent que l'infection par le VHS-1 soit spécifique à une cellule permissive en plus de s'assurer que la machinerie de fusion s'active seulement lorsque le virion est à proximité d'une membrane cellulaire [62]. Quel que soit le mécanisme d'entrée, suite à la fusion avec la MP ou les endosomes, le virus se retrouve nu (capside non enveloppée) dans le cytoplasme. Sous l'action des protéines du tégument pUL36 et pUL37, la capsid voyage le long des microtubules vers le noyau où seul son ADN est injecté à travers les pores nucléaires [63, 64]. Effectivement, la capsid (100 000 KDa) est trop volumineuse pour passer au travers de ces pores (40-70 KDa) [65].

### 1.2.4.2 Expression des gènes viraux

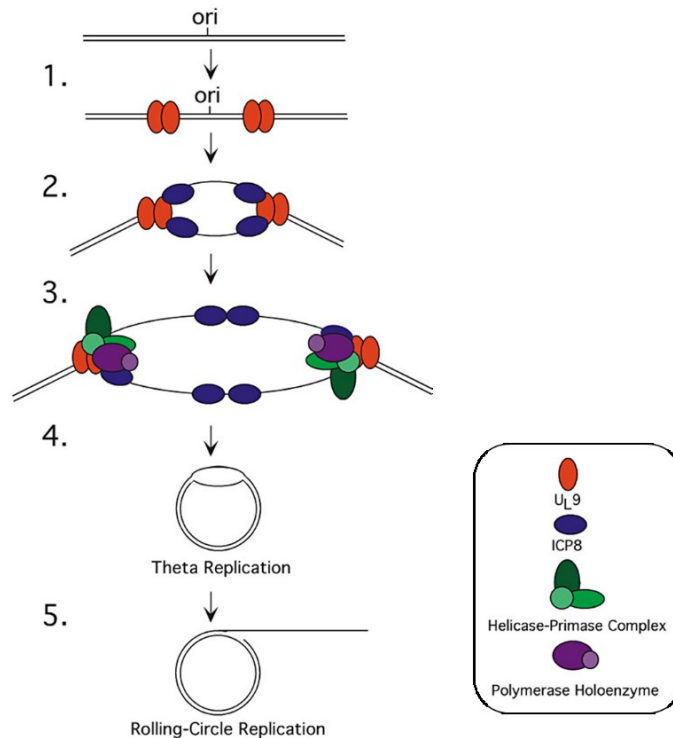
Les gènes viraux transcrits par l'ARN polymérase cellulaire II [66] sont exprimés de façon séquentielle et peuvent être classés en trois groupes selon leur régulation, soient les gènes précoces immédiats (IE), précoces (E) et tardifs (L) [37]. La transcription des gènes IE ne nécessite pas la synthèse de nouvelles protéines virales, car elle est initiée par un complexe entre autres formé de la protéine tégumentaire VP16 et des facteurs de transcription cellulaires [67-69]. Cette première phase de transcription mène à la production de protéines *alpha* ( $\alpha$ ) deux à quatre heures suivant l'entrée du virus [70]. Ces protéines  $\alpha$  sont nécessaires à l'expression des

gènes E qui entraînent la production des protéines *bêta* ( $\beta$ ) cinq à sept heures suivant le début de l'infection. Les protéines  $\beta$  sont quant à elles nécessaires à la réplication de l'ADN et la transcription des gènes L [71]. Finalement, les protéines *gamma* ( $\gamma$ ) provenant des gènes L sont nécessaires à la production de la capside et peuvent être divisées en deux classes : tardifs fuyants ( $\gamma 1$ ) et vrais tardifs ( $\gamma 2$ ). C'est-à-dire que les protéines  $\gamma 1$  sont exprimées à de faibles niveaux avant même que la réplication de l'ADN viral ait débutée, alors que les protéines  $\gamma 2$  sont absolument dépendantes de cette réplication [2].

### 1.2.4.3 Réplication de l'ADN viral

La réplication de l'ADN a lieu dans des sites spécialisés, appelés compartiments de réplication, situés près des domaines nucléaires 10 (ND10) [72]. Ces ND10 sont formés de plusieurs protéines cellulaires pouvant être régulées par l'interféron et jouant un rôle dans différents processus, notamment la réponse antivirale [73]. L'importance des ND10 pour la réplication du VHS-1 demeure incertaine [74], mais le virus aurait développé une façon de contourner les mécanismes de défense de l'hôte pour pouvoir se répliquer efficacement. En effet, le VHS-1 affecte l'intégrité des ND10 pour inhiber la réponse à l'interféron, notamment via la protéine virale ICP0 qui dégrade les protéines *promyelocytic leukemia protein* et sp100 [75, 76].

Une fois dans le noyau, l'ADN se circularise rapidement et, tel que mentionné précédemment, la réplication du génome viral débute lorsqu'il y a production de protéines  $\beta$ . De façon générale, sept protéines virales sont nécessaires à la réplication (**voir Figure 2**). Brièvement, pUL9 est recrutée à une origine de réplication alors que ICP8 lie l'ADN simple brin [77]. Le complexe hélicase-primase (pUL5, pUL8 et pUL52) [78] et l'ADN polymérase virale (pUL30 et pUL42) permettent la première phase de réplication de type *thêta* afin d'obtenir une matrice d'ADN qui servira pour la deuxième phase de réplication de type *rolling circle* qui produit une longue chaîne de concatémères [79, 80].



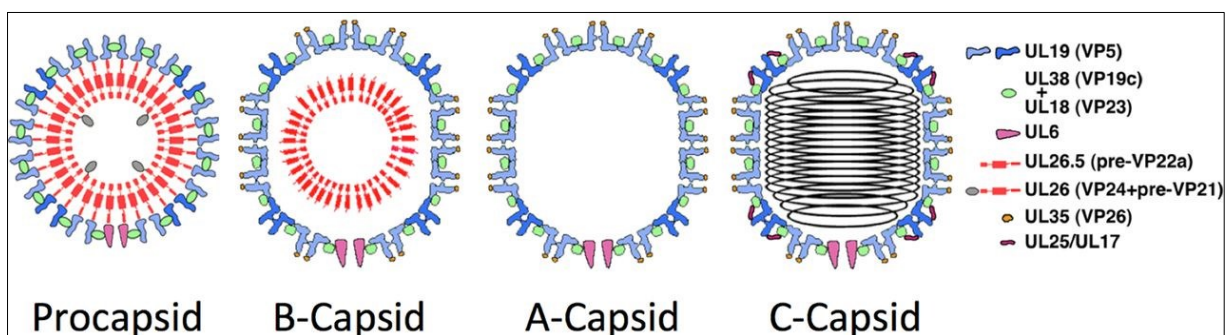
**Figure 2. Schématisation de la réplication de l'ADN viral**

1) La protéine virale pUL9 se lie à une origine de réplication et initie le déroulement de l'ADN. 2) La protéine virale ICP8 peut alors se lier à l'ADN simple brin exposé. 3) pUL9 et ICP8 recrutent le complexe hélicase-primase et l'ADN polymérase virale. 4) Il y a alors initiation de la première phase de réplication *thêta* pour former une matrice d'ADN. 5) La deuxième phase de réplication *rolling circle* génère une longue chaîne de concatémères. Modifié de [35].

#### 1.2.4.4 Assemblage de la capsid et encapsidation du génome

Il y a formation d'une procapside sphérique (*large B core capsid*) via l'interaction des protéines virales VP5, VP19C, VP23 et des protéines d'échafaudages pré-VP22a et pré-UL26 [81, 82]. La dégradation protéolytique des protéines d'échafaudage et l'ajout de la protéine VP26 entraînent la formation d'une capsid icosaédrique stable [83, 84]. L'assemblage de la capsid se fait de façon concomitante à l'encapsidation de l'ADN qui fait intervenir sept protéines virales. En fait, pUL6 forme le portail nécessaire à l'entrée du génome dans la capsid et le complexe terminase formé de pUL15 et pUL28 clive la chaîne de concatémères en génomes uniques [80]. La protéine pUL33 sert quant à elle de pont entre le clivage du génome et l'encapsidation de l'ADN monomère via l'action des protéines pUL17, pUL25 et pUL32 [85, 86].

Quatre types de capsides peuvent être retrouvées au niveau du noyau (**voir Figure 3**). La procapside décrite précédemment correspond à une capside immature plutôt ronde renfermant les protéines d'échafaudage. La maturation de la procapside entraîne la formation de la capside B qui contient la protéine d'échafaudage pré-VP22a et les formes clivées d'UL26, soit VP21 et la protéase VP24 [82]. L'expulsion complète de pré-VP22a et VP21 permet l'encapsulation de l'ADN et la formation d'une capside C mature infectieuse [87]. On peut également isoler des capsides A qui ne contiennent ni protéines d'échafaudage ni ADN. Elles résulteraient de tentatives échouées d'incorporation de l'ADN [81, 88]. Dans tous les cas, les capsides A, B et C peuvent être isolées sur gradient de sucrose, car elles sont plus stables que les procapsides [87]. Il a également été observé qu'une grande proportion des virions produits sont non fonctionnels, c'est-à-dire non infectieux. Il peut s'agir de capsides A et B ou encore de particules légères retrouvées dans le cytoplasme qui n'ont pas de capside ni d'ADN, mais des protéines du tégument et une enveloppe lipidique. Elles seraient formées indépendamment de la maturation des virions [89].



**Figure 3. Représentation schématique des quatre types de capsides du VHS-1 retrouvées au noyau**

La **procapside** est formée d'une coque extérieure majoritairement composée de la protéine structurale VP5 et d'une coque interne d'échafaudage composée des protéines pré-VP22a et pré-UL26. La **capside B** résulte d'une protéolyse des protéines d'échafaudage, renfermant pré-VP22a, VP21 et VP24. De cette façon, la coque interne se détache de la surface externe de la capside. La **capside A** est une capside vide, c'est-à-dire exempte de protéine d'échafaudage et d'ADN. L'expulsion complète des protéines d'échafaudage permet l'encapsulation de l'ADN et la formation d'une **capside C**. Tiré de [90].

#### **1.2.4.5 Bourgeoisement nucléaire : Voie de dé-enveloppement/ré-enveloppement**

Les capsides nouvellement formées doivent ensuite quitter le noyau pour poursuivre leur maturation. Comme les capsides sont trop larges pour passer au travers des pores nucléaires [65] et que ces derniers ne sont pas assez déformés par l'infection virale [91], le virus a développé une autre stratégie de sortie, soit la voie de dé-enveloppement/ré-enveloppement. Selon ce modèle le plus couramment accepté, les capsides nucléaires acquièrent une enveloppe primaire en bourgeonnant au travers de la membrane nucléaire interne (INM). Elles se retrouvent donc enveloppées dans l'espace périnucléaire en contigu avec le réticulum endoplasmique (RE) avant de fusionner rapidement avec la membrane nucléaire externe (ONM), relâchant ainsi des capsides non enveloppées dans le cytoplasme. Les capsides sont ensuite acheminées vers un compartiment intracellulaire pour acquérir leur enveloppe finale (**voir Figure 4**) [92].

##### **1) Enveloppement primaire**

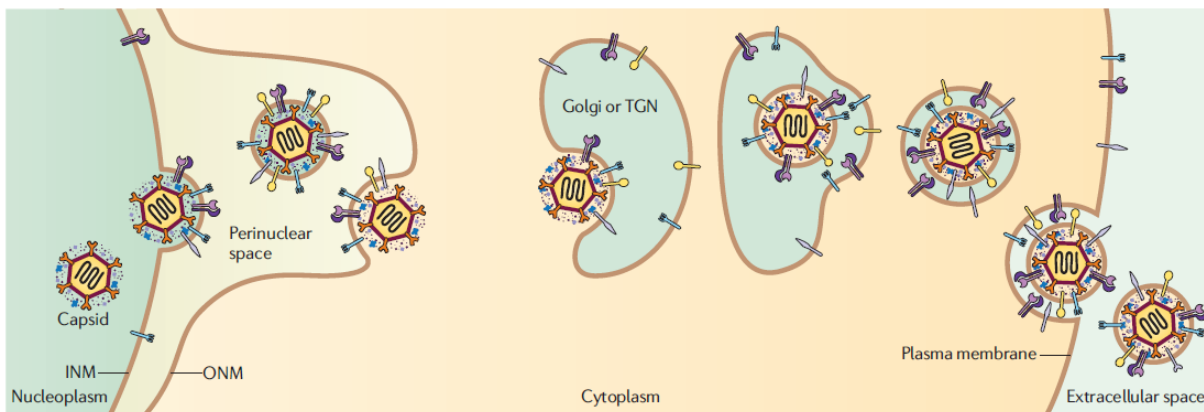
L'enveloppement primaire au travers de la INM nécessite l'altération de la lamina nucléaire, un réseau dense de microfilaments de lamines A, B et C à la surface interne de la INM [93]. Pour ce faire, les protéines virales pUL31 et pUL34 interagissent avec les lamines et recrutent les nouvelles protéines kinase C (nPKC $\delta$  et  $\alpha$ ) [94] qui phosphorylent la lamine B de la lamina nucléaire [95]. La protéine virale pUS3 phosphoryle également les lamines A et C entraînant la perturbation locale de la lamina nucléaire et permettant le bourgeoisement de la capsid avec la INM [96]. Bien que présentes en moindre quantité sur les capsides nucléaires A et B, les protéines pUL17/25 et pUL31/34 contribueraient, avec d'autres facteurs à définir, à la sélection préférentielle des capsides C pour l'enveloppement primaire [43, 97, 98].

##### **2) Dé-enveloppement**

Suite au bourgeoisement de la capsid à la INM, les capsides se retrouvent enveloppées dans l'espace périnucléaire. Via l'action des glycoprotéines gB et gH/gL, les capsides fusionnent ensuite avec la ONM [99], relâchant des capsides non enveloppées dans le cytoplasme et associées aux protéines du tégument pUL36, pUL37, pUL41, VP22 et VP16 [100]. Les protéines du tégument VP16 et pUL51 pourraient d'ailleurs jouer un rôle dans le dé-enveloppement des capsides, puisque leur inhibition entraîne l'accumulation de particules virales dans l'espace périnucléaire [101, 102].

### 3) Enveloppement final (ré-enveloppement)

Les capsides acquièrent ensuite d'autres protéines du tégument dans le cytoplasme et au site d'enveloppement final alors qu'elles voyagent le long des microtubules [103]. À ce site, les glycoprotéines gD, gE/gI et gM de même que la protéine du tégument VP22 jouent un rôle essentiel dans l'enveloppement secondaire du virus [43]. Bien que divers sites d'enveloppement final aient été proposés au fil du temps (tégusomes [104], endosomes précoces [51] et tardifs [105], vacuoles post-Golgi [106], aggrésomes [107], etc.), le site le plus communément accepté est le réseau *trans*-Golgien (TGN). En effet, plusieurs rapports de microscopie électronique [108, 109] et d'immunofluorescence [110, 111] pointent le TGN comme étant un important site de ré-enveloppement. Cela est également appuyé par la composition lipidique des virions extracellulaires qui s'apparente à celle du Golgi [45] et la co-purification biochimique des particules du VHS-1 avec le TGN lors d'une infection synchronisée [46, 51]. De plus, plusieurs protéines virales devant être incorporées dans le virion mature ont été retrouvées au TGN. Le laboratoire a notamment démontré que les glycoprotéines virales précédaient les capsides au TGN [46].



**Figure 4. Voie de dé-enveloppement / ré-enveloppement**

Une fois les capsides assemblées dans le noyau, elles bourgeonnent avec la membrane nucléaire interne (INM) pour former des particules enveloppées dans l'espace périnucléaire. Ces particules fusionnent rapidement avec la membrane nucléaire externe (ONM) pour donner des capsides nues dans le cytoplasme (dé-enveloppement). Ces capsides bourgeonnent ensuite au réseau *trans*-Golgien (TGN) pour acquérir leur enveloppe finale (ré-enveloppement). Elles sont par la suite acheminées à la membrane plasmique via des vésicules. Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique, relâchant ainsi des virions enveloppés dans l'espace extracellulaire. Tiré de [43].



#### **1.2.4.6 Sortie du virus**

L'étape finale du cycle viral correspond au transport du virus du TGN vers la MP et son relâchement dans le milieu extracellulaire. Pour ce faire, les particules virales enveloppées dans la lumière du TGN sont à leur tour relâchées dans le cytoplasme dans des vésicules de 200 à 300 nm ou des tubules allant jusqu'à 10 µm de long [112, 113]. La protéine kinase D (PKD) de l'hôte y joue un rôle clé. Effectivement, la sortie du virus de ce site est dépendante de la PKD puisque l'utilisation de petits ARNs d'interférence (siRNAs), drogues, dominants négatifs et mutants inhibant la PKD entraîne la tubulation du TGN et la rétention de cargos [114, 115]. Ces vésicules contenant le virus enveloppé voyagent ensuite jusqu'à la surface de la cellule via les microtubules pour fusionner à la MP et relâcher des capsides enveloppées dans l'espace extracellulaire [116]. Il a été démontré que la myosine Va, Rab6 et ERC1 sont requis en aval du TGN pour le transport du virus [117, 118].

Il est intéressant de noter que le transport du virus du TGN vers la MP se fait surtout de façon basolatérale chez les cellules polarisées, telles que les cellules épithéliales, de façon à promouvoir la propagation rapide du virus via les jonctions intercellulaires [119]. De cette façon, le virus échappe par le fait même aux anticorps circulants [120]. Chez les cellules neuronales, le transport serait dirigé de façon antérograde du corps cellulaire vers la terminaison axonale le long des microtubules à l'aide des protéines motrices kinésines [43]. Plusieurs voies de transport sont possibles et coexistent en même temps dans un même axone [121, 122]. C'est-à-dire que les capsides peuvent être transportées le long de l'axone séparément de leur membrane lipidique pour acquérir leur enveloppe finale seulement dans la terminaison axonale (modèle séparé – majoritaire) [123, 124] ou encore qu'elles acquièrent leur enveloppe finale dans le corps cellulaire avant d'être transportées jusqu'à la terminaison axonale (modèle marié) [125]. Dans tous les cas, les protéines virales gE/gI et pUS9 aideraient au transport dirigé en ciblant les particules virales sur les protéines motrices des microtubules [126].

#### **1.2.5 Latence**

Tel que mentionné précédemment, le virus a la capacité d'entrer en latence et d'être réactivé suite à divers stimuli. De façon générale, lors d'une infection lytique, le plus souvent dans les cellules épithéliales, les virus infectent les cellules adjacentes et éventuellement les

axones des neurones sensoriels. Les virions se déplacent alors le long de l'axone par transport rétrograde jusqu'au noyau de ces neurones [127, 128]. À cet endroit, le génome se circularise et l'expression des gènes lytiques est inhibée [129]. En effet, le génome latent est très condensé et incapable de se répliquer puisqu'il est associé à plusieurs histones hypoacétylées [130]. Durant la latence, malgré l'absence de réplication virale, le gène associé à la latence (LAT) est tout de même transcrit et épissé en plusieurs microARNs qui ont pour fonction de maintenir l'état de latence en inhibant entre autres l'apoptose des neurones infectés (notamment via l'inhibition de la caspase 8) de même que les protéines virales ICP0 et ICP4 nécessaires à l'initiation de la réplication [127, 131, 132]. Lors d'une réactivation, la quantité de transcrits LAT diminue alors que les transcrits des gènes lytiques augmentent, menant ainsi à une production virale [133]. Les virus nouvellement formés sont par la suite transportés de façon antérograde le long des axones, le plus souvent jusqu'au site de l'infection initiale [129]. Il y a alors réplication et infection, laquelle est associée ou non à des symptômes cliniques.

### **1.3 Interactions hôte-pathogène**

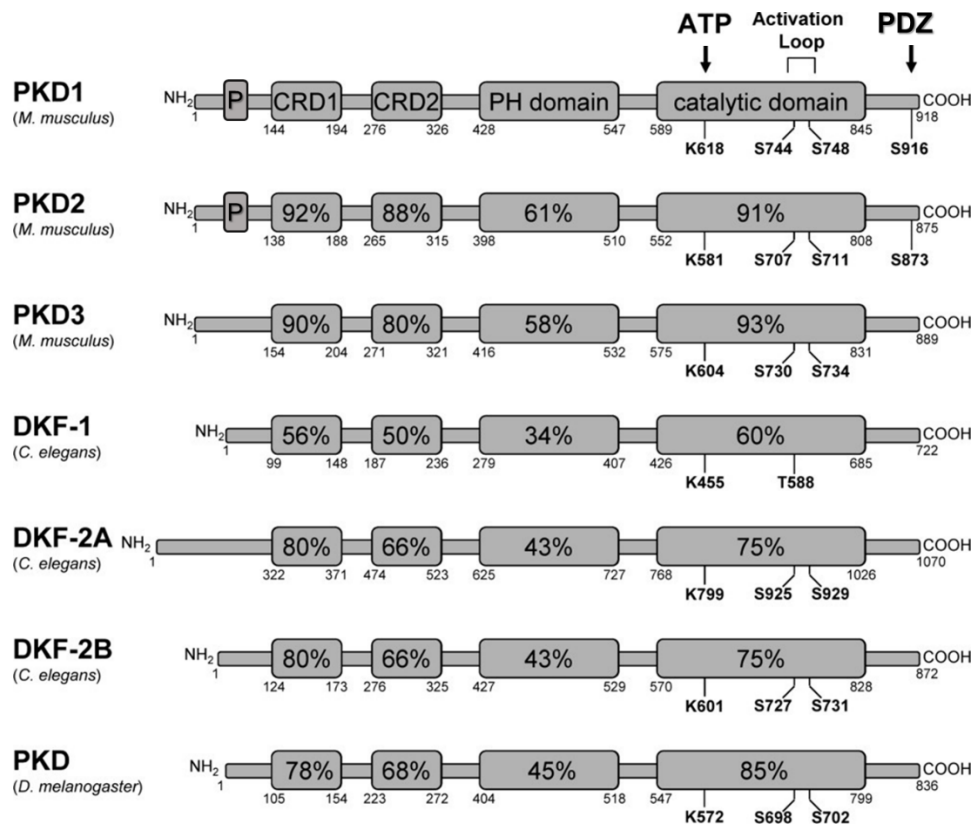
Les virus sont des parasites obligatoires et de ce fait, ils ont absolument besoin d'une cellule hôte vivante pour se répliquer. Pour ce faire, ils utilisent souvent la machinerie de l'hôte, que ce soit en coopération avec la cellule ou en détournant les molécules cellulaires pour leur propre bénéfice. Les virus incorporent aussi plusieurs protéines cellulaires [134] et le VHS-1 n'échappe pas à cette règle. En effet, le laboratoire a démontré que plusieurs facteurs cellulaires impliqués dans différents processus tels que le transport cellulaire, la régulation de la réponse immunitaire ou encore la régulation de l'expression génique sont incorporés dans le virion mature du VHS-1 [40, 135]. Les sections précédentes ont également apporté plusieurs exemples où le virus interagit avec des facteurs cellulaires pour compléter son cycle viral : interaction avec les récepteurs cellulaires lors de son entrée dans la cellule hôte, utilisation de l'ARN polymérase II pour la transcription de ses gènes viraux, interaction avec les différents filaments du cytosquelette pour son transport au travers de la cellule ou encore utilisation de la PKD pour sa sortie au niveau du TGN. D'ailleurs, compte tenu du rôle démontré de la PKD dans le transport des protéines cellulaires à la surface basolatérale de la cellule, son rôle dans le transport du VHS-1 du TGN vers la MP est hautement significatif [113].

## 1.4 Protéine kinase D

### 1.4.1 Structure et fonctions

La PKD fait partie de la famille des serine-thréonine kinases de la superfamille des protéines kinases dépendantes des calmodulines. Elle est très conservée et retrouvée chez plusieurs organismes [136-138]. Chez les mammifères, trois isoformes ont été identifiées (PKD1 ou PKC $\mu$ , PKD2 et PKD3 ou PKC $\nu$ ) [137], les niveaux de chacun d'eux variant d'un tissu cellulaire à l'autre [139]. Tous les isoformes de la PKD comprennent deux domaines *cysteine-rich zinc-finger like* (CRD1 et CRD2), un domaine *pleckstrin homology* (PH) auto-inhibiteur et un domaine catalytique en carboxy-terminal, alors que seules les PKD1 et PKD2 contiennent en plus une région hydrophobe riche en proline (P) dans le domaine amino-terminal [113]. De la même façon, seules les PKD1 et PKD2 possèdent également un motif de liaison pour le *postsynaptic density protein-95/disc-large tumor suppressor protein/zonula occludens-1* (PDZ) à leur carboxy-terminal [140] (**voir Figure 5**).

Les différents domaines de la PKD jouent un rôle dans sa régulation spatio-temporelle. Par exemple, le domaine CRD1 lie le diacylglycérol (DAG) avec davantage d'affinité que le CRD2 qui a plutôt une haute affinité pour les *phorbol esters* [138]. Ces deux domaines possèdent aussi des séquences d'importation et d'exportation nucléaire [141]. De plus, il a été démontré que le domaine PH interagit avec d'autres protéines et joue un rôle dans l'exportation nucléaire de la PKD [142]. Le motif de liaison à PDZ lie quant à lui d'autres substrats tels que *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1*, une protéine d'échafaudage retrouvée à la MP [143], et la *kinase D-interacting substrate of 220-kDa*, une protéine neuronale membranaire [140]. Ainsi, selon l'activité de liaison au ligand de ces domaines, de leur sélectivité et accessibilité, mais aussi des différences dans les séquences des différents isoformes, la PKD se localise à différents endroits dans la cellule tels que le cytosol, le noyau, la mitochondrie, la MP et le TGN. À ces endroits, la PKD est impliquée dans différents processus tels que l'expression des gènes, le réarrangement du cytosquelette d'actine, la fission et le trafic des vésicules [138, 139, 144]. La réponse cellulaire engendrée dépend donc de la localisation de la PKD et de la disponibilité des substrats [137, 145]. Tel que décrit plus bas, la fonction de la PKD la mieux caractérisée est son rôle dans le transport vésiculaire du TGN vers la MP.



**Figure 5. Représentation schématique des différents isoformes de la PKD chez plusieurs organismes**

Les différents domaines des isoformes retrouvés chez *Mus musculus* (PKD1, 2 et 3), *Caenorhabditis elegans* (DKF-1, DKF2A et B) et *Drosophila melanogaster* (PKD) sont représentés. Leurs séquences d'homologie avec la PKD1 sont indiquées en pourcentage. Les sites de régulation (phosphorylation) sont indiqués, soit les résidus lysines (K) pour la liaison de l'ATP et sérines (S) (ou thréonine (T) pour DKF-1) pour la boucle d'activation dans le domaine catalytique de même que les résidus S au niveau du domaine *postsynaptic density protein-95/disc-large tumor suppressor protein/zonula occludens-1* (PDZ) pour les PKD1 et PKD2. La taille des isoformes est indiquée en acide aminé. Les domaines ne sont pas à l'échelle. P : domaine riche en proline. CRD: *cysteine-rich zinc-finger like domain*. DKF: *D-kinase family*. PKD: protéine kinase D. PH: *pleckstrin homology*. Modifié de [137].

## 1.5 Transport vésiculaire du TGN vers la MP

### 1) Recrutement de la PKD au TGN : Implications du DAG et de Arf1

Le transport des molécules du TGN vers la surface de la cellule implique des domaines spécialisés sur le TGN. En fait, la composition lipidique de ces microdomaines détermine les molécules qui y sont recrutées pour entraîner la formation de vésicules tandis que les molécules recrutées déterminent quant à elles les cargos qui y seront emmagasinés. Ainsi, le DAG présent

à la membrane lipidique du TGN recrute la PKD en se liant à son domaine CRD1 [145]. La protéine *ADP-ribosylation factor 1* (Arf1) présente au TGN lie également le domaine CRD2 [146, 147] alors que la région P des PKD1/2 s'insère dans la membrane externe du TGN, fournissant un ancrage supplémentaire [113].

## 2) Activation multiple de la PKD

La PKD a une activité enzymatique minimale lorsqu'elle n'est pas activée par phosphorylation. En effet, sa phosphorylation induit un changement de conformation qui maximise son activité catalytique [139]. La PKD peut être régulée de différentes façons, notamment en étant activée par le calcium [148] ou par l'inhibition de son domaine PH via la phosphorylation de deux sérines par la MAPKp38 $\delta$  ou encore la liaison de la protéine trimérique G $\beta\gamma$  [113]. Cependant, les membres de la famille des nPKCs ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  ou  $\eta$ ) sont ses principaux activateurs [142]. Suivant cette dernière voie, le DAG active une nPKC qui active à son tour la PKD par phosphorylation de son domaine catalytique [149].

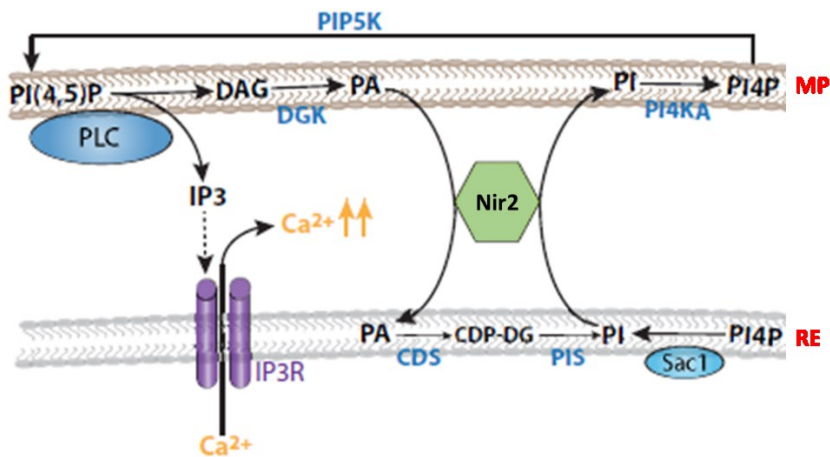
## 3) Accumulation de DAG : Implications de FAPP2, OSBP, CERT et Nir2

Une fois activée, la PKD régule l'activité de la phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase de type II qui convertit le phosphatidylinositol 5-phosphate en phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) [150]. La phospholipase C (PLC $\beta$  ou PLC $\gamma$ ) clive alors le PI(4,5)P<sub>2</sub> pour générer du DAG et de l'inositol 1,4,5-triphosphate. Les PKD1/2 activent également la kinase lipidique phosphatidylinositol-4-kinase III $\beta$  (PI4KIII $\beta$ ), recrutée au TGN par Arf1. Cette kinase génère du phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) à partir de phosphatidylinositol (PI) [151]. La liaison subséquente de la protéine 14-3-3 à PI4KIII $\beta$  inhibe sa déphosphorylation et la maintient donc active [152, 153].

PI4P, qui est un site de liaison pour le domaine PH des lipides ou des protéines [153], recrute plusieurs protéines dont *phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein 2* (FAPP2), *oxysterol-binding protein 1* (OSBP) et *ceramide transfert protein* (CERT). En fait, FAPP2 est recruté au TGN suite à sa liaison avec le PI4P et Arf1. L'accumulation de FAPP2 et l'insertion de sa queue hydrophobe dans la MP favoriserait la courbure de la membrane [154]. De plus, FAPP2 régule le transport non vésiculaire du glucosylcéramide (GlcCer) du TGN vers la MP [155]. Même si des études rapportent des évidences sur l'impact du transport du GlcCer

via FAPP2 dans le transport vésiculaire du TGN vers la MP, le mécanisme d'action n'est pas encore connu. Il pourrait agir en modulant la disponibilité des lipides pour les substrats en se liant notamment au PI4P au TGN ou encore en favorisant la formation de microdomaines lipidiques spécifiques [156]. OSBP transfère quant à lui le cholestérol du RE au TGN alors que CERT transporte la céramide du RE vers le TGN [157]. OSBP forme aussi un complexe avec CERT pour accélérer le transfert de ces molécules [153]. La céramide et la phosphatidylcholine (PC) sont ensuite converties en sphingomyéline (SM) et DAG par l'action de la sphingomyéline synthase [113]. L'accumulation de ces lipides entraîne la formation de microdomaines enrichis d'un côté en SM et cholestérol qui servent à la génération de cargos apicaux et de l'autre en DAG qui servent à la génération de vésicules basolatérales [113].

La protéine *Pyk2 N-terminal domain-interacting receptor 2* (Nir2) serait également responsable de la régulation des niveaux de DAG au TGN. En effet, Nir2 est impliqué dans le métabolisme du DAG via la voie cytidine diphosphate-choline (CDP-choline). En fait, Nir2 inhiberait l'activité de la cytidine diphosphate-choline transférase-phosphocholine cytidylyltransférase, minimisant ainsi la conversion du DAG et CDP-choline en PC [158]. Entre les membranes du RE et de la MP, Nir2 permettrait aussi de contrôler l'échange de PI et d'acide phosphatidique (PA), établissant un lien avec la génération de DAG via la PLC [159] (**voir Figure 6**).



**Figure 6. Transport des lipides par Nir2**

Le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P) est clivé en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) par la phospholipase C (PLC), ce qui conduit à la libération de calcium (Ca<sup>2+</sup>) du réticulum endoplasmique (RE), augmentant ainsi la concentration de Ca<sup>2+</sup> cytosolique. Le DAG est converti en acide phosphatidique (PA) par la DAG kinase (DGK) et

est transporté au RE par la protéine Nir2. Le PA est converti par la CDP-DG synthase (CDS) en cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DG) qui est converti à son tour en phosphatidylinositol (PI) par PI synthase (PIS). Nir2 transporte le PI vers la membrane plasmique (MP) en utilisant le contre-transport de PA. Le PI est ensuite converti en phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) par PI 4-kinase alpha (PI4KA) et phosphorylé par PI4P 5-kinase (PIP5K) pour reconstituer le PI(4,5)P dans la MP. Le PI4P du RE est ensuite converti en PI par Sac1 phosphatase. IP3R : récepteur IP3. Modifié de [159].

#### **4) Boucle de rétroaction négative : Implications de Arfaptin1 et Arf1**

Lorsque la concentration cruciale de DAG est atteinte à la base du bourgeon, la PKD phosphoryle alors OSBP et CERT qui se dissocient du TGN. En effet, cette phosphorylation réduit l'affinité de CERT et OSBP pour le PI4P [160]. Cette régulation négative prévient ainsi les niveaux toxiques de cholestérol et SM [139]. La PKD phosphoryle également la protéine Arfaptin1 qui est présente au TGN via sa liaison avec le PI4P et qui possède un domaine *Bin/amphiphysin/Rvs* permettant de capter le degré de courbure de la membrane lipidique [161], de prévenir la fission précoce et la formation de vésicules non fonctionnelles via la régulation négative de Arf1 [162]. La phosphorylation de Arfaptin1 entraîne sa dissociation du TGN, où Arf1 [162] peut alors activer la phospholipase D (PLD). La PLD catalyse la production de PA à partir des réserves de PC [163, 164]. Sinon, le DAG formé peut aussi être converti en PA via la DAG kinase. La phospholipase A2 convertit ensuite le PA en lyso-PA (LPA) [165] qui entraîne la courbure de la membrane du Golgi et ultimement un bourgeon mature [113, 166]. La consommation du DAG en LPA entraîne une diminution de sa concentration au TGN et, par le fait même, le détachement de la PKD du TGN [113].

#### **5) Vésiculation au TGN : Implications de Arf1 et GGAs**

Le laboratoire a également précédemment démontré l'incorporation d'Arf1 dans les virions matures de même que son implication dans le cycle de vie du VHS-1 [40, 135]. Arf1 est en fait une petite protéine G de la superfamille des Ras inactive sous la forme GDP et active sous la forme GTP. Elle passe d'une forme à l'autre suite à la régulation positive des *guanine-nucleotide-exchange factor* ou négative des *GTPase-activating proteins* [167]. Sous sa forme active et suite à son recrutement au site d'action, Arf1 peut recruter plusieurs effecteurs jouant des rôles différents. Par exemple, au TGN, Arf1 recrute des molécules adaptatrices interagissant de façon spécifique avec les protéines cargo devant être transportées [112]. Elle recrute

notamment les *Golgi-localizing  $\gamma$ -adaptin ear homology domain Arf-binding proteins 1-3* (GGA1-3) [168]. Ces dernières se lient à Arf1 via leur domaine GAT. Au TGN, les GGAs recrutent alors la clathrine pour la formation de vésicules de clathrine [169]. Certaines études démontrent que GGA2 pourrait aussi recruter PI4KIII $\beta$  au TGN, mais les rôles distincts des trois isoformes sont encore à déterminer [170].

Bref, la vésiculation au TGN via la voie de la PKD (voir **Figure 7**) démontre bien l'étroite régulation entre la composition lipidique et l'action de multiples modulateurs. Le tableau II résume d'ailleurs les fonctions majeures de ces principaux modulateurs (voir **Tableau II**).

**Tableau II. Caractéristiques des principaux modulateurs de la PKD**

Noms & autres appellations (abréviations)	Rôles dans la vésiculation	Autres fonctions proposées	Expression*
<i>Arfaptin1</i> ; <i>ADP-ribosylation factor-interacting protein 1</i> (ARF1P1)	- Régule l'activité de Arf1	- Impliquée dans la sécrétion d'insuline [144]	Ubiquitaire
<i>Ceramide transfer protein</i> (CERT); <i>Collagen type IV alpha-3-binding protein</i> (COL4A3BP)	- Transporte la céramide entre le RE et le TGN; - Interagit avec VAPA et PI4P		Largement exprimée
<i>Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding protein 1-3</i> (GGA1-3); <i>ADP-ribosylation factor-binding protein GGA1-3</i>	- Recrute la clathrine au TGN; - Interagit avec Arf1 et d'autres GGAs	- Régule la localisation des récepteurs de triage (ex. : M6PR) [169, 171]; - Interagit avec le complexe Rabaptin-5-Rabex-5 régulant la fusion des endosomes [172]	Ubiquitaire
<i>Oxysterol-binding protein 1</i> (OSBP)	- Transporte le cholestérol entre le RE et le TGN; - Interagit avec VAPA et PI4P	- Régule les niveaux de cholestérol via ERK1/2 et ABCA1 [173]	Largement exprimée
<i>Phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein 2</i> (FAPP2); <i>Pleckstrin homology domain-containing family A member 8</i> (PLEKHA8)	- Transporte le GlcCer entre le TGN et la MP; - Interagit avec PI4P et Arf1	- Impliquée dans la formation de cils [174]; - Impliquée dans l'apoptose [175]	Exprimée dans les cellules de rein



<p><i>Pyk2 N-terminal domain-interacting receptor 2 (Nir2); Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 1 (PITPNM1)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Régule les échanges lipidiques entre le RE et la MP;</li> <li>- Régule le métabolisme du DAG via la voie CDP-choline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Régule les voies de signalisation MAPK, PI3K/AKT via les niveaux de lipides [176];</li> <li>- Affecte la structure du RE [177];</li> <li>- Impliquée dans le rapprochement des membranes (via E-Syst1) [178];</li> <li>- Régule la petite GTPase Rho impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine [179]</li> </ul>	<p>Ubiquitaire</p>
---	--	---	--------------------

\* Information tirée de <http://www.uniprot.org/>

## 2 Résultats

### 2.1 Objectifs et approche du projet de recherche

Normalement, comme le VHS-1 se réplique de façon continue, des virions se retrouvent à toutes les étapes du cycle viral et dans plusieurs compartiments différents à la fois, ce qui peut rendre l'étude du virus plus difficile. L'utilisation du virus mutant V701 thermosensible permet de suivre une seule population de particules virales s'assemblant et voyageant de façon synchronisée. En effet, le virus V701 code pour une protéase virale Pra thermosensible. Ainsi, lors d'une incubation à la température non-permissive de 39°C, la Pra est non-fonctionnelle et la protéine d'échafaudage pré-VP22 n'est pas clivée. Il n'y a donc pas de capsides matures relâchées du noyau. L'incubation subséquente des cellules à la température permissive de 31°C permet de poursuivre le processus de maturation normal des capsides [51, 180, 181]. L'incubation des cellules à 20°C permet également d'arrêter le transport intracellulaire du TGN vers la PM, ce qui a pour effet d'accumuler le virus à ce site et de bloquer sa sortie [46]. Bref, cette technique permet de mieux visualiser une étape particulière du cycle de vie du virus. Cette technique a d'ailleurs permis d'étudier plus facilement le rôle de la PKD dans la sortie du VHS-1 du TGN vers la MP. En effet, tel que discuté plus tôt, le laboratoire a précédemment démontré que la PKD régule la fission des vésicules au niveau du TGN et facilite la sortie du virus de ce compartiment vers la MP [115, 182]. Comme la PKD interagit avec plusieurs molécules, l'impact des différents modulateurs de la voie de la PKD dans la propagation virale reste encore à déterminer, mais il est probable qu'ils y jouent également un rôle. Ensuite, comme la PKD est retrouvée à plusieurs endroits dans la cellule, elle pourrait également jouer un rôle à plusieurs étapes du cycle de vie du virus. Ainsi, à la différence de la première étude réalisée en contexte d'infection synchronisée, ce projet de maîtrise se penche sur le rôle de la voie vésiculaire médiée par la PKD dans la propagation virale au travers de la cellule hôte dans un contexte d'infection non synchronisée. Plus précisément, ce projet a pour but d'identifier de nouvelles interactions hôte-pathogène, d'indiquer quels modulateurs de la PKD sont impliqués dans la propagation virale et de mieux comprendre le transport intracellulaire du VHS-1. Pour ce faire, la PKD et ses modulateurs Arfaptin1, CERT, FAPP2, GGA1-3, OSBP et Nir2, sélectionnés en fonction de leur interaction démontrée avec la PKD au TGN et de la disponibilité des réactifs, ont été ciblés

par ARN d'interférence (ARNi), surexpression ou drogue. Leurs impacts sur la propagation virale ont été mesurés par essais de plaque et microscopie électronique.

## **2.2 Présentation sous forme d'article**

### **2.2.1 Notes sur le texte**

La section Résultats présente l'article complet en cours de révision suite aux commentaires des évaluateurs de la revue *Journal of Virology* (l'article a été soumis le 4 juin et les commentaires reçus le 18 juin 2018). Des modifications mineures ont également été apportées pour uniformiser et faciliter la lecture de ce mémoire, notamment la renumérotation des figures pour suivre celles de l'introduction.

### **2.2.2 Contribution des auteurs**

- Élisabeth Roussel : Conception et réalisation des expériences, analyse des données, montage des figures et participation à la rédaction de l'article.
- Roger Lippé : Création et supervision du projet, participation à la conception des expériences et l'analyse des données, rédaction de l'article.

### 2.2.3 Article

## **Cellular Protein Kinase D Modulators Play a Role during Multiple Steps of Herpes Simplex Virus Type 1 Egress**

By

Élisabeth Roussel and Roger Lippé<sup>#</sup>

Department of Pathology and Cell biology, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale  
Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Running title: PKD machinery regulates distinct HSV-1 egress steps

Keywords: HSV/ egress / transport / PKD / protein kinase D / CERT / Nir2 / GGA1 / Arfaptin  
/ Arf

Word count for the abstract: 228

Word count for the text: 4959

<sup>#</sup> Corresponding author:

Roger Lippé

Email: roger.lippe@umontreal.ca

Tel.: (+1) 514 343-5616

## **Abstract**

The assembly of new herpes simplex virus type 1 particles takes place in the nucleus. These particles then travel across the two nuclear membranes and acquire a final envelope from a cellular compartment. The contribution of the cell to the release of the virus is, however, little known. We previously demonstrated using a synchronized infection that the host protein kinase D and diacylglycerol, a lipid that recruits the kinase to the TGN, promote the release of the virus from that compartment. Given the role this cellular protein plays in the herpes simplex virus type 1 life cycle and the many molecules that modulate its activity, we aimed to determine to what extent this virus utilizes the protein kinase D pathway during a non-synchronized infection. Several molecular PKD regulators were targeted by RNA interference and viral production monitored. Surprisingly, many of these modulators negatively impacted the extracellular release of the virus. Overexpression studies, use of pharmacological reagents and assays to monitor intracellular lipids implicated in the biology of PKD suggested that these effects were oddly independent of total intracellular diacylglycerol levels. Instead, mapping of the viral intermediates by electron microscopy suggested that some of these modulators could modulate distinct steps along the viral egress pathway, notably nuclear egress. Altogether, this suggests a more complex contribution of PKD to HSV-1 egress than originally anticipated and new research avenues to explore.

## **Importance**

Viruses are obligatory parasites that hijack numerous cellular functions. This is certainly true when it comes to transport viral particles within the cell. Herpesviruses share the unique property to travel through the two nuclear membranes by subsequent budding and fusion and to acquire their final envelope from a cellular organelle. Albeit disputed, the overall evidence from many laboratories points to the TGN as the source of that membrane. Moreover, past findings revealed that the host protein kinase D plays an important role at that stage, which is significant given the known implication of that protein in vesicular transport. The present findings suggest that the PKD machinery not only affects the late stages of herpes simplex virus type I egress but also modulates earlier steps such as nuclear egress. This opens up new means to control these viruses.

## Introduction

Protein kinase D (PKD) is a pleiotropic kinase with multiple roles in the cell, including survival, proliferation, cell motility, transcription, innate immunity and vesicular transport [1, 2]. Though cytosolic when inactive, it relocates to the outer mitochondrial membrane, plasma membrane, nucleus and *trans*-Golgi network (TGN) upon activation [2]. At the TGN, where PKD is best described, it plays a central role in the transport of cellular cargos from the TGN to the cell surface [3]. Most interestingly, it promotes the formation of tubules into which the proteins are packaged. Not surprisingly, inactivation of PKD's enzymatic activity abrogates such transport.

The PKD machinery at the TGN is a complex pathway that depends on the initial recruitment of the kinase to the TGN (fig. 7, step 1) by diacylglycerol (DAG) and ADP-ribosylation factor 1 (Arf1), an important mediator of cargo transport whose function is discussed below [4-6]. While PKD's kinase activity can be triggered by a variety of stimuli, a chief method is through DAG, which notably acts on the novel protein kinase C family (nPKC) that phosphorylates and turns on PKD (fig. 7, step 2) [7]. Active PKD can then phosphorylate phosphatidylinositol 4-kinase  $\beta$  (PI4KIIIK $\beta$ ), which converts phosphoinositide (PI) to phosphoinositol 4-phosphate (PI4P) [8]. Aside from DAG, PI4P is a critical lipid as it mediates the binding of several cellular proteins modulating cargo exit from the TGN. For instance, it recruits Arfaptin1, whose role is to prevent premature fission at the TGN by binding Arf1 and blocking the recruitment of its downstream effectors [9]. PI4P, along with Arf1, also recruits the phosphatidylinositol-four-phosphate adapter protein 2 (FAPP2), a lipid transfer protein that shuttles glucosylceramide (GlcCer) from the Golgi to the cell surface in an Arf1 dependent manner and which is required for the transport of VSV G to the cell surface from the TGN [10]. PIP4 additionally binds with the ceramide transfer protein (CERT), a second lipid transfer protein whose function is to transfer ceramide from the ER to the Golgi/TGN and which can subsequently be converted to DAG [11]. Finally, PI4P interacts with oxysterol-binding protein 1 (OSBP), which regulates PI4P and sterol levels between the ER and Golgi and ultimately enhances DAG and PKD levels at the TGN by synergizing with CERT [12]. The phosphorylation by PKD of phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type II (PI5P4K), an enzyme that converts phosphatidylinositol 5-phosphate (PI5P) into phosphatidylinositol 4,5

diphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>), itself converted to DAG and IP<sub>3</sub> by phospholipase C [1, 13] further leads to an upturn of DAG at the TGN with concomitant increases in PKD. Altogether, this promotes an amplification loop (fig. 7, step 3) that results in a substantial accumulation of DAG and PKD at the TGN [14].

Vesicle budding (fig. 7, step 4) at the TGN initiates with DAG's contribution to membrane curvature [15]. When DAG reaches a sufficient concentration at the nascent bud [16], PKD phosphorylates Arfaptin1 and releases its inhibitory action [9]. Arf1 then activates phospholipase D (PLD), which catalytically converts phosphatidylcholine (PC) into phosphatidic acid (PA) [17]. DAG can additionally be converted into PA by DAG kinase or from phosphocholine in a multi-step process that is negatively regulated by Pyk2 N-terminal domain-interacting receptor 2 (Nir2) but whose inactivation prevents VSV G transport to the cell surface [18]. In addition, Nir2 is yet another lipid transport protein that shuttles PA (a by-product of DAG) and PI (the precursor of PI4P) between the cell surface and the ER, so it also acts on cellular lipids as do CERT, OSBP and FAPP2 [19, 20]. In all cases, the phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) can transform the PA into lyso-PA (LPA), a conic shaped lipid that is presumed to induce strong curvature and promote vesicle fission (fig. 7, step 5) [21].

Transport of cargo incorporated into TGN-derived vesicles is complex and not completely resolved as several parallel pathways co-exist [22]. Generally speaking, these transport routes depend on adaptor proteins that help select the cargo and recruit proteins that ultimately coat the nascent vesicles. Arf1 is again a central player here and, depending on the final destination of the cargo, can interact with one of several adaptor proteins (AP1 to 4) or Golgi-localizing  $\gamma$ -adaptin ear homology domain Arf-binding proteins (GGA1 to 3) [22]. For proteins destined to the plasma membrane, these adaptors may then recruit the aforementioned FAPP2, utilize the recently described "carriers of the TGN to the cell surface" (CARTS) or perhaps use yet to be defined molecular coats [10, 22-24]. Ultimately, the budding machinery is turned off via the PKD-mediated phosphorylation of FAPP2, CERT and OSBP, rendering them inapt to bind PI4P [25]. This sets in motion a negative feedback loop (fig. 7, step 6) that impairs DAG production and recycles PKD and its modulators to the cytoplasm [14].

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is an enveloped DNA virus that replicates in the nucleus, where it duplicates its genome and assembles new viral particles [26, 27]. This poses a

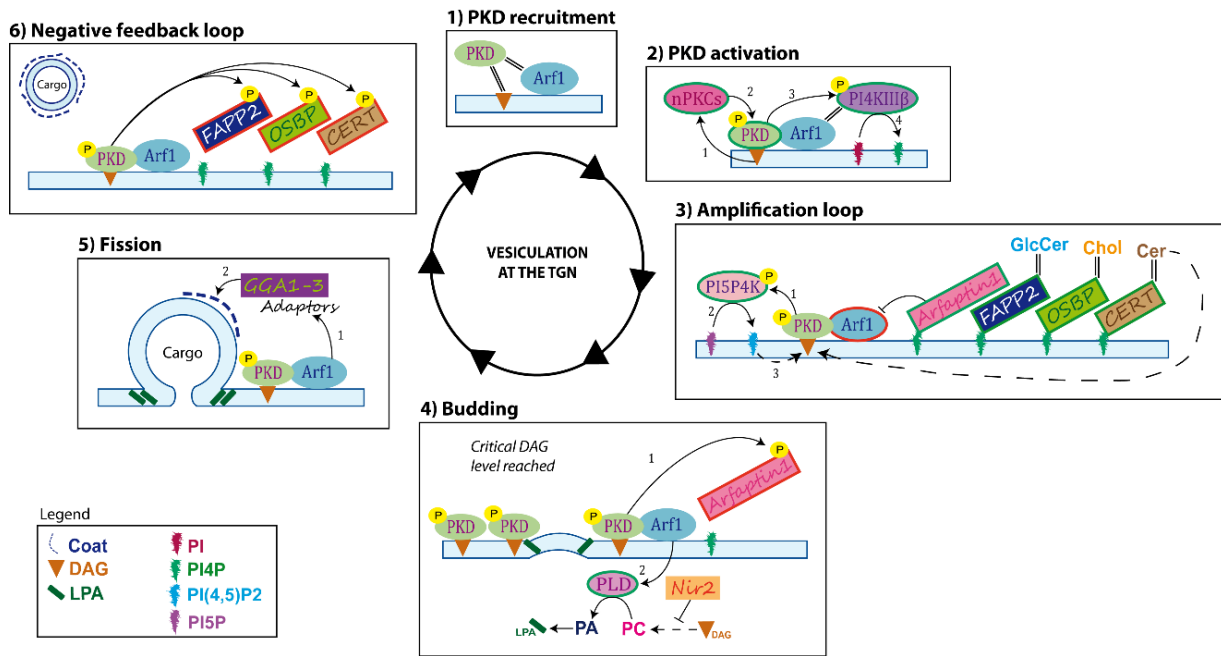
physical challenge to the virus as the newly made capsids are too large to exit through the nuclear pores [28, 29]. It therefore employs a clever means to escape by first budding through the inner nuclear membrane, acquiring an envelope in the process. These enveloped particles subsequently fuse with the outer nuclear membrane to release naked capsids into the cytoplasm [28, 30], a process reminiscent of the one reported for the nuclear release of the large hnRNP particles [31]. While poorly understood, viral nuclear egress across the two nuclear envelopes minimally depends on the U<sub>L</sub>31, U<sub>L</sub>34 and U<sub>S</sub>3 viral proteins and possibly the host protein kinase C [32-37]. However, other regulators are anticipated, as U<sub>L</sub>31 and U<sub>L</sub>34 are sufficient to generate nuclear-derived vesicles in an unregulated fashion [38-41]. It therefore remains to be seen which complete machinery drives the virus out of the nucleus.

Once in the cytosol, HSV-1 acquires its final envelope from an intracellular compartment, prior to being released into the extracellular milieu. The site of acquisition of the final viral envelope has been controversial for several decades, but the bulk of the evidence from several laboratories points towards the TGN. As recently reviewed [42], this is based on the presence in the TGN of many of the viral proteins that must be packaged in mature virions, a lipid content of the extracellular viruses similar to that of the TGN, freeze-fracture data, the copurification of the virus with that compartment and the transit of the virus at the TGN in synchronized infections. In addition, we previously reported that HSV-1 egress to the cell surface is dependent on PKD and that inactivating it with pharmacological reagents and mutants led to the accumulation of the virus in the TGN [43, 44]. Moreover, we showed that DAG is important for HSV-1 release from the TGN towards the plasma membrane [44]. Aside from PKD, myosin Va, Rab6 and ERC1 are also required downstream of the TGN for the secretion of the virus [45, 46], but it remains to be seen what other molecules intervene along this route.

As pointed out above, PKD's function at the TGN is dependent on a panoply of molecules that include DAG, CERT, OSBP, FAPP2, Nir2, Arfaptin-1 and Arf1 (fig. 1). Given the multiple roles that PKD plays throughout the cell, it is unclear whether PKD only modulates TGN to cell surface HSV-1 egress or if it also regulates other steps of viral egress. The present study explores this avenue by probing the impact of various PKD regulators during a non-synchronized infection. Using RNA interference, we found that several vesicular transport modulators modestly impacted HSV-1 extracellular yields, including Nir2, CERT, PKD but also



the GGA1 adaptor. However, the results were unexpected in that many modulators reduced viral production, unlike PKD. On closer look at overexpression studies, electron microscopy, biochemical measurements and pharmacological manipulation of DAG levels, this did not appear to be related to the levels of the lipid but rather pointed to the possible role of PKD and Nir2 on viral nuclear egress.

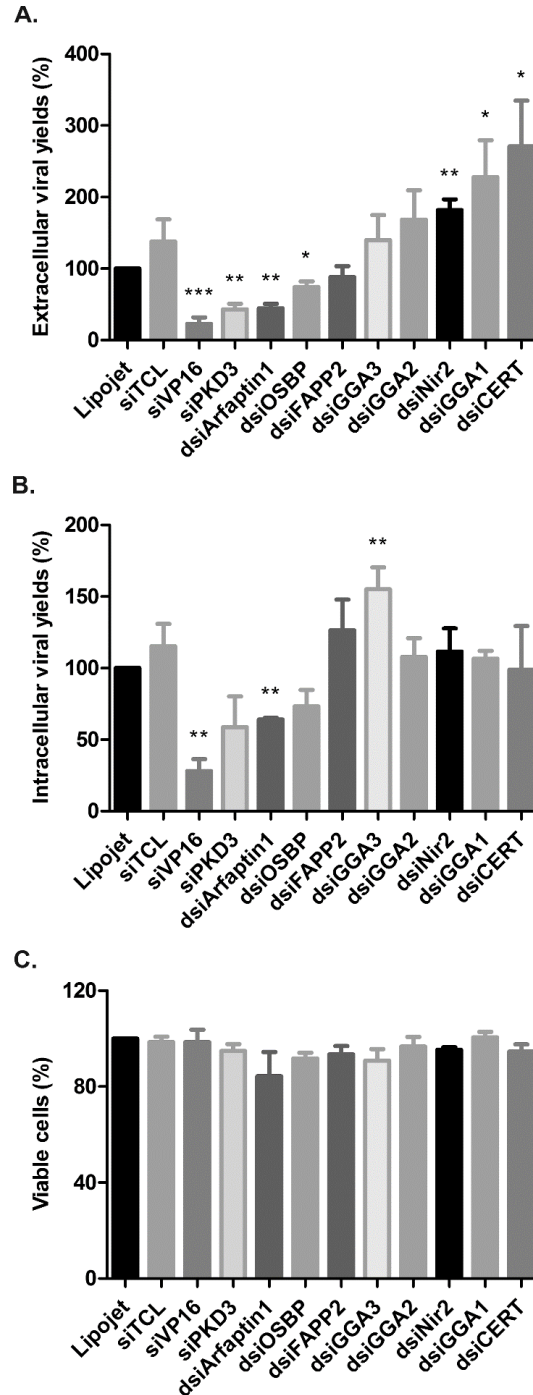


**Figure 7. Role of PKD and its modulators in vesicular cargo transport at the TGN**  
**Step 1)** Cytoplasmic PKD is recruited to the TGN by DAG and Arf1. **Step 2)** DAG activates nPKCs that in turn activate PKD by phosphorylation. Active PKD then phosphorylates PI4KIIIβ, which has been recruited beforehand to the TGN by Arf1. This enables the conversion by PI4KIIIβ of PI to PI4P. **Step 3)** PI4P acts as a scaffold and recruits to the TGN multiple proteins, including Arfaptin1 whose role is to inhibit Arf1 and prevent premature fission. PI4P also recruits FAPP2, OSBP and CERT. These modulators regulate respectively the transport of glucosylceramide between the TGN and PM, of cholesterol between the ER and Golgi/TGN and of ceramide between the ER and TGN. PKD additionally activates PI5P4K, which converts PI5P to PI(4,5)P2. All this ultimately leads to an accumulation of DAG and PKD at the nascent vesicle. **Step 4)** When the optimal local concentration of DAG is reached, PKD phosphorylates Arfaptin1, leading to its detachment from the TGN and activation of Arf1. The later then activates PLD, which metabolizes DAG into PA, which is subsequently converted into LPA by other enzymes. Nir2 negatively regulates the DAG conversion into LPA. **Step 5)** The accumulation of LPA at the neck of the vesicle induces strong curvature of the membrane and ultimately fission from the TGN. Concomitantly, Arf1 recruits adaptor proteins such as GGA1-3 to help the formation of the vesicle, cargo selection and the coating of the vesicles. **Step 6)** PKD phosphorylates FAPP2, OSBP and CERT, thereby promoting their detachment from the TGN, leading to a decrease in DAG concentration and ultimately the release of PKD from the

TGN. Green boundaries: Activation. Red boundaries: Inactivation. See text for details and abbreviations.

## Results

**Impact of PKD modulators on HSV-1 egress.** To probe the implication of the vesicular transport machinery on the overall HSV-1 egress pathway, various PKD modulators were targeted by RNA interference in a non-synchronized infection. The selected modulators included Arfaptin1, Nir2, CERT, FAPP2, OSBP and PKD itself as well as GGA adaptors (fig. 1). For these experiments, we relied on 143B cells. Although these cells could only be transfected with 70% efficiency (data not shown), they are optimal for our studies since their intracellular compartments better resist HSV-1 disruption and because they only express PKD3, one of the three human PKD isoforms [44, 47, 48]. As controls, we also included siRNA targeting the HSV-1 VP16 (siVP16) viral protein and a non-targeting siRNA (siCTL) previously used in the laboratory [49]. An incubation time of the cells with the RNAi for 48 hours was chosen given the predicted half lives of the target proteins ranging from 4 to 30 hours (ProtParam; <https://web.expasy.org/protparam/>) and the 80% reduction in PKD3 protein levels (data not shown). Thus, following the 2 days incubation with the RNAi, the cells were infected for 24 hours with wild type HSV-1 and the amount of virus released in the extracellular milieu measured by plaque assays. Figure 2A shows that while the non-targeting siCTL has no impact, VP16 inhibition significantly reduced viral yield as expected, since VP16 is essential to activate the expression of other viral genes [50, 51]. Inhibition of PKD3 also substantially reduced viral yields in agreement with our past findings that it is required for HSV-1 propagation [44]. Similarly, inhibition of Arfaptin1 and, to a minor extent, OSBP reduced viral yields. In contrast, inhibition of FAPP2, GGA2 and GGA3 had no detectable effect on HSV-1 release. Meanwhile, down regulation of Nir2, GGA1 and CERT reproducibly and statistically increasingly stimulated virus production, by up to 270% in the case of CERT (fig. 8A). While modest, these impacts were consistently noted and reached statistically significant levels. Interestingly, except for Arfaptin1 and GGA3, none of these molecules impaired the presence of intracellular infectious particles, suggesting they specifically impacted the final stage of viral egress (fig. 8B). Most importantly, they did not indirectly alter viral production by decreasing cell viability (fig. 8C).

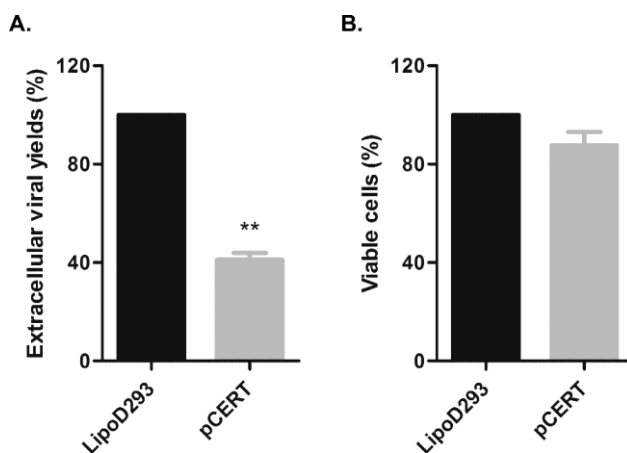


**Figure 8. Impact of PKD modulators on HSV-1 yields**

143B cells were transfected for 48h with the Lipojet reagent alone or with different siRNAs and dsRNAs before being infected for 24h. The (A) supernatants and (B) cell fractions were then harvested and the virus produced quantified in plaque assays. (C) The viability of 143B cells treated in parallel as above was measured using AlamarBlue. The means and SEM of five independent experiments each performed in duplicate are shown in all panels. The data are normalized to the average obtained with samples transfected with Lipojet alone. Significant

differences between treated and Lipojet alone were analyzed with Grubbs and Student's bilateral tests (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

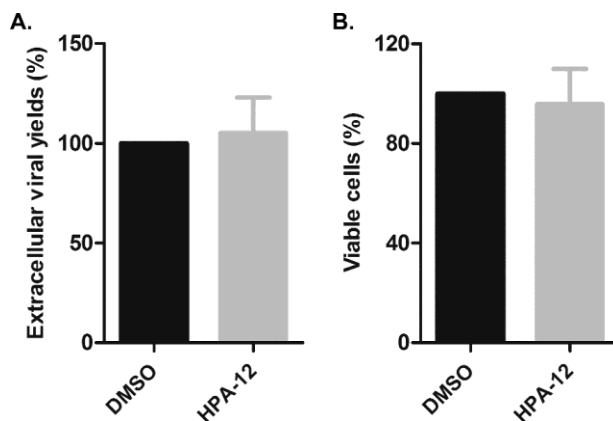
**CERT modulates HSV-1 propagation in a ceramide independent fashion.** The above results indicated that among the PKD modulators tested, CERT and Nir2 may modulate HSV-1 egress. This is relevant given CERT and Nir2 control DAG intracellular levels and hence PKD membrane recruitment. To confirm these observations and ensure that the results were not off target effects of the RNAi reagents, we focused on CERT owing to the availability of defined drugs and biochemical assays. As anticipated from the above results whereby CERT down expression favored viral propagation, overexpression of CERT conversely inhibited viral release into the extracellular milieu without affecting cell viability (fig. 9). To ascertain whether the lipid modulating activity of CERT was necessary, we next employed HPA-12, a synthetic ceramide analog that prevents CERT-mediated ceramide transfer from the ER to the Golgi [52, 53]. Incubation of the cells with the drug throughout the infection had no impact on HSV-1 extracellular yields (fig. 10A) with, once again, no general effect of cell viability under the conditions used (fig. 10B). This suggested that CERT acted by a ceramide-independent mechanism.



**Figure 9. CERT overexpression hinders viral production**

143B cells were transfected for 24h with the LipoD293 reagent alone or plasmid expressing HA-tagged CERT WT (pCERT). (A) Cells transfected for 24h were subsequently infected for 24h and the supernatants harvested for plaque assays. The means and SEM are derived from two independent experiments each performed in duplicate. (B) Cells treated in parallel in 96 well plates were monitored for their viability using AlamarBlue. In this case, the means and error bars show the SEM of three independent experiments each performed in triplicate. In all

cases, the data are normalized to the average obtained with samples transfected with LipoD293 alone. Student's bilateral tests showed the significant differences between treated and LipoD293 alone (\*\*:  $p < 0.01$ ).

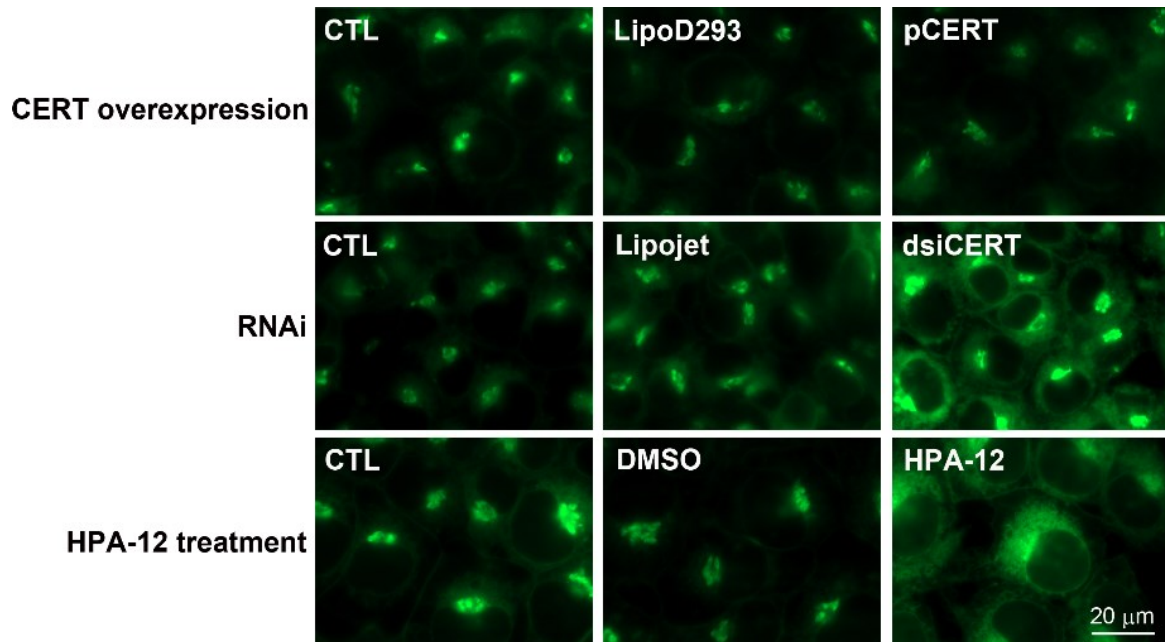


**Figure 10. Inhibition of CERT with the HPA-12 drug does not affect the egress of the virus**

**(A)** 143B cells were infected in the presence of DMSO or 2.5  $\mu\text{M}$  of HPA-12 for 16h. The supernatants were then harvested and used for plaque assays. The means and SEM of three independent experiments performed in duplicate are shown. **(B)** 143B cells were treated in parallel with 2.5  $\mu\text{M}$  of HPA-12 for 16h and their viability measured using AlamarBlue. Error bars show the SEM of three independent experiments performed in triplicate. In both panels, the data are normalized to the average obtained with samples treated with DMSO alone. Student's bilateral tests did not hint at any significant differences between HPA-12 and DMSO alone.

In principle, CERT down regulation or inhibition by HPA-12 should both reduce ceramide transport to the Golgi/TGN and subsequently DAG levels at the TGN while CERT over expression should have the opposite phenotype. To validate that these reagents were working appropriately, we followed by microscopy a fluorescent analog of ceramide, namely C5-DMB-Cer, a commonly used marker for intracellular ceramide [52, 54-56]. Uninfected cells transfected with the CERT plasmid or treated with HPA-12 or dsiCERT were metabolically labeled at 4°C for 30 minutes with the fluorescent probe and chased for 30 minutes, which is typically sufficient to label the Golgi apparatus [52]. In control untreated cells, the probe did indeed efficiently target the Golgi (fig. 11 – left column). Similarly, overexpression of CERT also labeled the Golgi, hinting at the functionality of the protein (fig. 11 – top row). As expected, this Golgi labeling was much reduced in the presence of the dsiCERT or the HPA-12 drug with an obvious ER-like distribution indicative of reduced transport of the lipid (fig. 11 – middle and

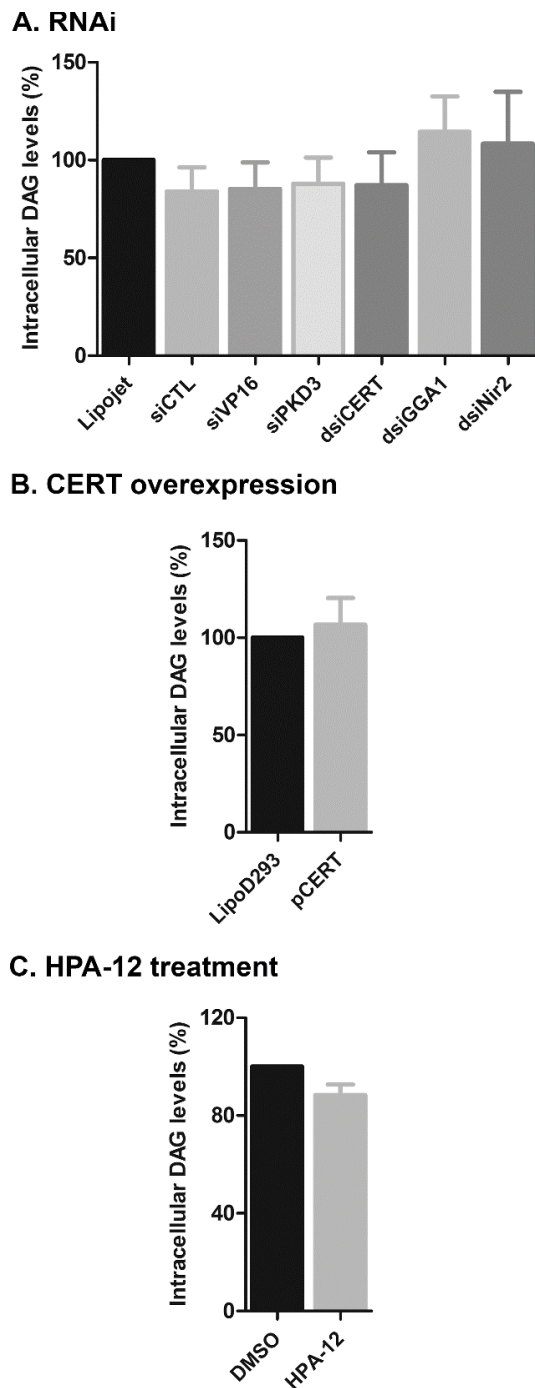
bottom rows). We conclude that the reagents worked as expected and that CERT exerted its phenotype on HSV-1 propagation by a seemingly ceramide independent route.



**Figure 11. CERT reagents function as expected**

143B cells were treated with pCERT, dsicERT or HPA-12 and the localization of the fluorescent ceramide analog BODIPY™ FL C5-Ceramide monitored under a fluorescent microscope. The panels show representative cells for each condition out of three independent experiments. The indicated scale bar of 20  $\mu\text{m}$  applies for all images.

**Overall DAG levels are not altered by the CERT mutant or HPA-12 drug.** The finding that the perturbation of ceramide transport from the ER to the Golgi did not influence the propagation of HSV-1 was puzzling given it should alter the intracellular levels of DAG. Given the importance of DAG at the TGN on viral egress from that compartment to the cell surface [44], the total DAG cellular levels were measured by ELISA using a commercially available kit. The data indicated that none of the conditions tested altered the amounts of intracellular DAG. These conditions included various RNAi used in this study (fig. 12A), CERT overexpression (fig. 12B) or the HPA-12 drug (fig. 12C). These results confirmed the above findings (fig. 10A) that CERT operated on HSV-1 by a ceramide - and possibly DAG - independent route.



**Figure 12. Total intracellular DAG levels are not affected by the RNAi, CERT overexpression or HPA-12 drug**

143B cells were (A) transfected for 48h with the Lipojet reagent alone or with different siRNAs and dsRNAs, (B) transfected for 24h with the Lipod293 reagent alone or with pCERT or (C) treated for 16h with DMSO alone or 2.5  $\mu$ M of HPA-12. The cell fractions were collected, and the total DAG levels were measured using an ELISA kit. Data are normalized to the average obtained with samples treated with their respective control. The means and SEM of three

independent experiments performed in duplicate are depicted. No statistically significant differences between treated and control samples were noted.

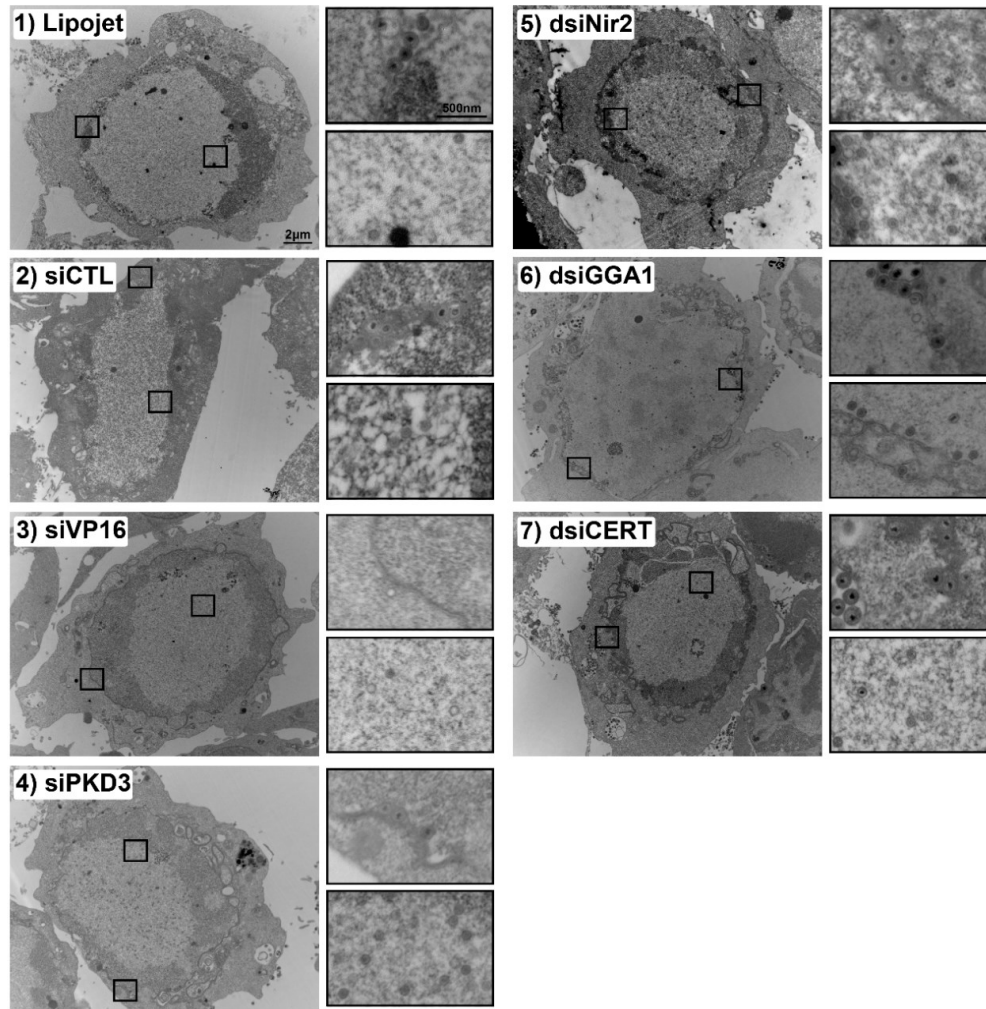
**PKD modulators act along the HSV-1 egress pathway.** Thus far, the results confirmed that PKD and its molecular partners can influence the HSV-1 life cycle. For instance, PKD inhibition reduced viral propagation in line with previous findings [44]. Similarly, our findings made sense for Nir2 and Arfaptin1, which inhibit the conversion of DAG into strong curvature inducing lipids and block Arf1 respectively (see introduction). In contrast, the data were not intuitive for other PKD modulators. To explore where in the viral life cycle, these molecules might act, an electron microscopy approach was undertaken. Cells were therefore pretreated with RNAi targeting PKD3, CERT, GGA1 and Nir2, i.e. the molecules that altered viral production the most (fig. 8). As control, siVP16 was also included since the protein is required for viral gene expression and consequently indirectly regulates capsid assembly [57-59]. Since VP16 has additionally been implicated in nuclear viral egress and capsid re-envelopment in the cytoplasm [57], we also wanted to see if we could detect those activities. To enable sufficient viral particles to be made, 143B cells were infected for 24 hours, as these cells propagate the virus more slowly than Vero or BHK cells [47].

In control cells, viral particles were routinely found in the nucleus, perinuclear space, cytoplasm and cell surface (fig. 7A-1 & 2). As expected, RNAi targeting VP16 significantly reduced the overall number of viral particles in agreement with its role on viral gene expression (73% fewer particles than the control - fig. 13A-3 and quantification in fig. 13B). However, inhibition of VP16 also perturbed the distribution of these particles throughout the cell. First, there was a four-fold accumulation of nuclear capsids and much reduced levels of perinuclear virions (in line with the aforementioned implication of that viral protein on nuclear egress [57]). Second, there was an additional increase in the level of cytoplasmic viral particles concomitant with lower quantities of extracellular virus. As previously reported by the Smiley laboratory [57], the cytoplasmic viral particles were predominantly naked capsids (97% naked versus 3% enveloped; data not shown). The approach consequently proved sensitive enough to detect multiple roles for VP16.



Unlike VP16, PKD down regulation had no bearing on the total viral particle counts (fig. 13A-4, fig. 13B). Surprisingly, the main phenotype under these non-synchronized conditions was a four-fold accumulation of viral capsids in the nucleus, albeit with no noticeable impact on extracellular viral particles. It should be pointed out that the plaques assays (fig. 8) and EM (fig. 13) do not quite measure the same thing. In the former, we quantify the number of infectious viral particles that are released by the cell. By EM, we measured the number of total cell-associated particles (viable or not) that are present on the extracellular face of the cells, but which are not released in the milieu. On the other hand, inhibition of CERT and Nir2 both substantially increased the release of extracellular virions (fig. 13A-5 & 7; fig. 13B), supporting the notion that these molecules hamper the last step of viral egress. CERT also seemed to act on the egress of perinuclear viral particles while Nir2 and GGA1 inhibition also resulted in an accumulation of nuclear capsids, hinting these molecules may additionally facilitate the exit of the virus from that compartment (fig. 13A-5 to 7; fig. 13B). Altogether, this suggested a scenario whereby PKD and its modulators can modulate multiple steps of viral transport, including nuclear and the late stages of viral egress.

### A. EM images



### B. EM counting

Cell type	Intracellular distribution				Total particles n (% lipojet)
	Nuclear n (% total)	Perinuclear n (% total)	Cytoplasmic n (% total)	Extracellular n (% total)	
Lipojet	10 (11%)	48 (48%)	31 (31%)	10 (9%)	98 (100%)
siCTL	20 (21%)	31 (30%)	33 (33%)	10 (16%)	94 (96%)
siVP16	13 (43%) ***	0 (1%) ***	13 (53%) *	0 (3%) *	27 (27%) ***
siPKD3	44 (41%) **	20 (21%) *	23 (26%)	11 (13%)	98 (100%)
dsiNir2	64 (46%) ***	45 (22%) **	24 (16%)	26 (16%)	158 (161%) *
dsiGGA1	30 (30%) *	34 (31%)	25 (29%)	9 (9%)	98 (100%)
dsiCERT	29 (18%)	44 (28%) *	56 (31%)	26 (23%) *	155 (157%) *

**Figure 13. The PKD pathway can modulate distinct steps along the viral egress pathway**

**A) Differential impact of PKD modulators on viral egress.** 143B cells were transfected for 48h with the Lipojet reagent alone or with different siRNAs and dsRNAs before being infected

for 24h. The cells were then fixed, embedded and prepared for electron microscopy. The panels show representative cells for each condition. The boxed areas are enlarged to the right of each panel. The top zoom represents a perinuclear section and the bottom one a nuclear section. The indicated scale bars of 2  $\mu\text{m}$  for the entire cell and 500 nm for the enlarged section apply for all images. **B) Counting of viral particles.** Values representing the average numbers and percentages of viral particles counted from 8 to 12 different cells randomly selected per condition. Grubbs and Student's bilateral tests detected some significant differences between treated and Lipojet alone (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

## Discussion

PKD phosphorylates numerous substrates and regulates several intracellular processes. Along the vesicular transport route, PKD activity is modulated by several proteins, lipids and possibly cargo. It was previously shown that PKD affects the transport of HSV-1 particles from the TGN to the cell surface and that it enables the scission of transport carriers containing viral particles [43, 44]. However, until now, it was not clear whether the many molecules that functionally interact with the PKD pathway are also implicated in HSV-1 egress. We therefore explored the implication of a number of key players including PKD effectors and upstream regulators as well as GGA molecules, which also regulate TGN to plasma membrane cargo transport. An initial screen by RNA interference revealed that PKD inhibition did reduce viral yields. Similarly, the stimulatory effect of dsiNir2 on extracellular virion production was equally expected, since it normally hampers cargo transport out of the TGN [18]. However, the stimulation of viral release by dsiRNA targeting other PKD interactors was surprising (fig. 8). These findings were corroborated by overexpressing CERT, which had the opposite effect of dsiCERT and hampered viral extracellular yields (fig. 9). This suggested that the PKD modulators acted on HSV-1 propagation by other mechanisms.

CERT is a lipid transport protein that shuttles ceramide to the Golgi for ultimate conversion in DAG, which should therefore recruit more PKD to membranes and promote cargo transport [4, 5]. Yet two lines of evidence suggested that the implication of CERT in viral egress was not necessarily connected to its lipid transfer properties. First, the CERT inhibitor HPA-12 had no impact on viral release (fig. 10), despite clearly affecting ceramide transport to the Golgi (fig. 11). Second, dsiCERT, CERT overexpression or HPA-12 treatments all failed to alter total cellular DAG levels (fig. 12). The data consequently pointed to a scenario whereby the

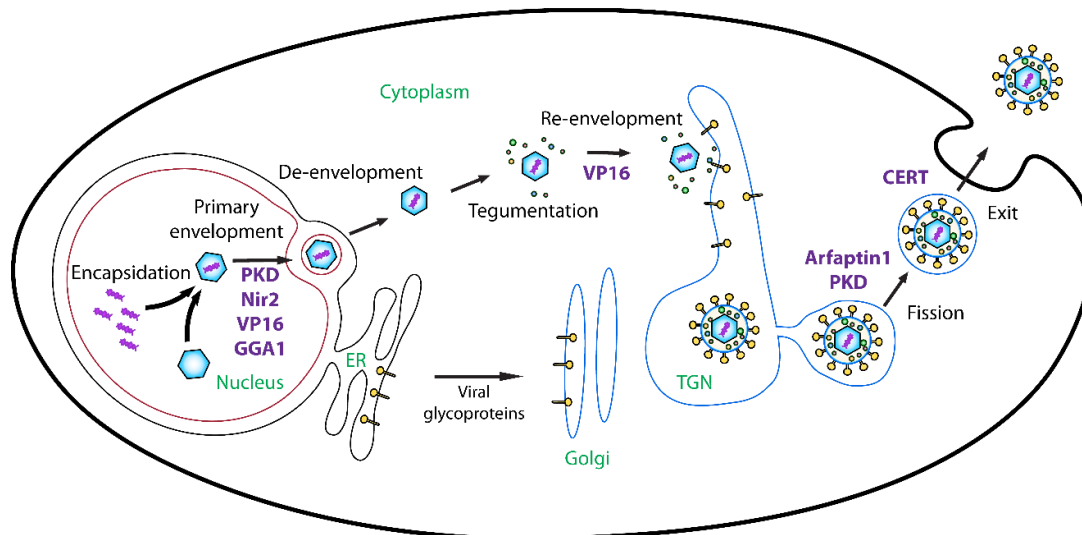
intracellular levels of DAG were perhaps not critical. This contrasted with our previous report suggesting that DAG, along with PKD, co-modulate HSV-1 egress to the cell surface [44]. In that report, we specifically explored the molecular machinery driving the virus out of the TGN using a synchronized infection. To this end, we used the thermosensitive V701 viral strain that traps it in the nucleus at the non-permissive temperature [47, 60, 61] or a 20°C block that typically prevents cargo release from the TGN [47, 62-64]. In the present report, we rather opted to monitor viral egress along the entire viral egress route, which takes place from the site of capsid assembly in the nucleus all the way to the cell surface. This was relevant given the multiple sites of action of PKD throughout the cell, including the nucleus and TGN [2]. Given the apparent independence of this transport route to DAG levels, we suspect that while the levels of DAG are locally critical at the TGN, its overall abundance in the cell may less be so. This would be in line with the normal VSV G trafficking in primary mouse embryonic fibroblasts deficient for CERT [65]. To resolve this, it would therefore be necessary to monitor and quantify the intracellular distribution of the lipid among different compartments, but no commercial tool exists to this end.

To sort out how PKD and its modulators might influence HSV-1 egress, we examined infected cells by electron microscopy. Most importantly, the assay was sufficiently sensitive to confirm the multiple implications of VP16 on total viral yields, in viral nuclear egress and cytoplasmic envelopment [57] (fig. 13). With respect to PKD modulators, the results were rather surprising since down regulation of many of the molecules impacted viral transport prior to the last step of egress (fig. 13). For instance, knocking down PKD resulted in the accumulation of nuclear viral particles, suggesting it may be implicated in nuclear egress. Given this step takes place before re-envelopment at the TGN, it was perhaps unsurprising that we did not detect an accumulation of viral particles at the downstream TGN, but by analogy to VP16 inhibition, it implied that PKD's role on viral nuclear egress was dominant over its effect on TGN viral release. Alternatively, it could be that the PKD machinery is more rate limiting than VP16.

Upon examination of PKD modulators by electron microscopy, down regulation of Nir2 led to an increase of unenveloped nuclear capsids in addition to promoting the release of more capsids. While counterintuitive at first, it may be that Nir2 is needed for nuclear egress but prevents scission at the TGN. On the other hand, knocking down CERT altered the distribution

of the perinuclear viral intermediates and affected viral release in absolute numbers. Thus, CERT also appear to modulate viral egress aside from the last stage of the infection. Similarly, knocking down GGA1, the isoform with the most impact on extracellular yields (fig. 8), once again caused a shift on the intracellular distribution of the virus (fig. 13). It should be noted that the implication of GGA1 in HSV-1 egress from the TGN to the cell surface was not necessarily anticipated as this family of proteins usually targets the endocytic pathway rather than the cell surface. It does however fit its reported impact on the release of hepatitis C virus [66]. Whether the virus might hijack this route is of interest, as is the unique functional interaction of the virus with only one of the three GGA isoforms.

As recapitulated in figure 14, the data overall suggest that PKD and its machinery does not only act at the TGN but also modulate other steps of viral egress. While modest, the results were reproducible with similar effects among experiments, between assays (plaque assays, overexpression and EM) and reached statistically significant levels. However, these low impacts suggest the PKD modulators are not strictly essential for the HSV-1 life cycle but rather minor players. In contrast, one should note that it is possible that alternative pathways are operating, as built-in redundancy is expected to insure cell viability. The sole presence of up to three different PKD isoforms in some cell types, with otherwise similar substrate specificity, is a good example. How this may operate therefore remains a mystery at this point. While a direct involvement of PKD on nuclear egress is possible, one should consider the indirect consequence of perturbing the intracellular transport of individual viral or host proteins. A global proteomics view would likely be warranted to decipher the impact of each RNAi in the context of an infection. Moreover, given that PKD regulates intracellular transport and other cellular functions such as transcription in the nucleus and stress response in mitochondria [2], it may also modulate aspects of the viral life cycle beyond transport of its assembled capsids. It is interesting to note that the PKD apparatus has been reported to alter different stages of life cycles of Epstein-Barr virus [67] as well as human rhinovirus, poliovirus and foot-and-mouth disease virus [68]. More work is required to sort out exactly how the PKD machinery act on HSV-1.



**Figure 14. Implication of PKD modulators on HSV-1 egress**

The main steps of viral egress are depicted and include the primary envelopment step through the inner nuclear membrane, the de-envelopment via the fusion of the perinuclear virions with the outer nuclear membrane, the main tegumentation step (mostly taking place in the cytoplasm, albeit some already occurs in the nucleus), the re-envelopment of the naked cytoplasmic particles, fission of HSV-1-laden transport carriers from the TGN and finally the release of the virus at the cell surface by fusion. The diagram also depicts at which step the PKD modulators might promote or interfere in viral egress.

## Materials and Methods

**Cells and viruses.** Vero (African green monkey kidney) and 143B TK<sup>-</sup> (human osteosarcoma tumor) cells, purchased from ATCC, were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma Aldrich) supplemented with 5% bovine growth serum (HyClone) and 2 mM L-glutamine (Invitrogen). 143B cells were also supplemented with 15 mg/ml 5-bromo-2 deoxyuridine (Sigma Aldrich) except prior to transfection and infection. All cell lines were tested for the absence of mycoplasma contaminants. The 143B cell line was particularly useful as these cells solely express PKD3 among the three human isoforms [44] and the morphology of the TGN stays intact upon infection [47].

Wild type HSV-1 17<sup>+</sup> virus, provided by Beate Sodeik, was expanded on BHK cells and titrated on Vero cells. When indicated, 143B cells were mock treated or infected at a multiplicity of infection (MOI) of 5 for 24h as before [47]. Viral yields were monitored by plaque assays on

Vero cells. After 3 days, these Vero cells were fixed with cold methanol and stained with 0.1% crystal violet to reveal plaques.

**RNAi screen.** Using LipoJet (SignaGen) according to the manufacturer's instructions, 143B cells were transfected for 48h with the transfection reagent only, siRNA targeting the viral protein VP16 [69] or the human protein PKD3 [44]. As negative non-targeting control, a scramble version the siVP16 (siCTL) was used [49]. For all other targets, Dicer-substrate RNAs (dsiRNAs) were used given these chemically synthesized 27 nucleotides long RNA duplexes have an increased potency when compared to conventional siRNAs [70]. For the present study, these targeted the human proteins FAPP2 (dsiFAPP2), OSBP (dsiOSBP), CERT (dsiCERT), Nir2 (dsiNir2), Arfaptin1 (dsiArfaptin1), GGA1 (dsiGGA1), GGA2 (dsiGGA2) and GGA3 (dsiGGA3) (Integrated DNA Technologies). The cells were then directly harvested or, when indicated, mock treated or infected at a MOI of 5 for 24h. Cell fractions and supernatants were harvested for plaque assays or electron microscopy.

**CERT overexpression.** Using the manufacturer's protocol, 143B cells were transfected for 24h with the LipoD293 reagent only (SignaGen) or a plasmid encoding wild type CERT (pcDNA3.1/HA-hCERT or pCERT for short). This construct was kindly given by Kentaro Hanada [53]. The cells were then directly harvested following this transfection or, when indicated, infected and viral yields evaluated as described above.

**HPA-12 treatment.** DMEM without serum supplemented with DMSO or 2.5  $\mu$ g of *N*-3-Hydroxy-1-hydroxymethyl-3-phenylpropyl dodecanamide (HPA-12; TCI America) was added to the cells and incubated for 15 min at 4°C followed by 16h at 37°C [52]. Cell fractions were harvested for total cell associated DAG measurements (see below). For plaque assays, the virus was adsorbed to 143B cells for 1h (MOI of 5). Then, DMEM without serum supplemented with DMSO or 2.5  $\mu$ M of HPA-12 was added to the cells and further incubated for 16h at 37°C. Supernatants were harvested for plaque assays as detailed above.

**Viability assays.** Viability assays were carried out in 96 well plates in parallel experiments where uninfected 143B cells were treated with RNAi, CERT plasmid or exposed to the HPA-12 drug. Three hours before the end of the treatments, AlamarBlue (AbD Serotec)

was added to the cells according to the manufacturer's instructions. The cells were further incubated at 37°C for three hours before cell viability was measured by spectrofluorometry.

**DAG and ceramide monitoring.** For total cellular DAG estimates, 6 well plates were prepared in parallel for RNAi, CERT overexpression or HPA-12 experiments. At the end of the treatments, cell lysates were prepared and DAG levels evaluated using the “All species Diacylglycerol ELISA Kit” (LifeSpan BioSciences) according to the manufacturer's protocol. When monitoring ceramide by fluorescence microscopy, 143B cells grown on coverslips and treated with RNAi, CERT overexpression or HPA-12 were incubated at 4°C for 30 minutes in serum-free DMEM containing 2.5 µM of the fluorescent ceramide analog BODIPY™ FL C5-Ceramide complexed to BSA (Invitrogen). The cells were then washed with fresh serum-free DMEM and further incubated for 30 minutes at 37°C. Afterward, the cells were washed in PBS, fixed in paraformaldehyde 3% and examined under a fluorescent microscope using 450-490 nm (excitation) and 500-550 nm (emission) filters.

**Electron microscopy.** 143B cells were transfected for 48 hours and infected for 24 hours in 100 mm dishes before being processed for electron microscopy as described previously [71]. This included fixing, Epon embedding, preparation of ultrathin sections of the cells, uranyl contrasting and analysis on a Philips CM100 transmission electron microscope. For each condition, quantification of the viral particles was done from randomly selected fields.

**Statistical analysis.** All data were expressed as the mean ± standard deviation of the means (SEM). Statistical analyses were performed using bilateral Student's T tests (Excel Software) and Grubbs test (GraphPad Prism) when mentioned.

## **Acknowledgments**

We are indebted to Beate Sodeik and Kentaro Hanada for supplying wild type virus, CERT expressing plasmids and HPA-12 expertise. We are also thankful to Diane Gingras and Nathalie Buron for their electron microscopy expertise and help. This work was supported by a grant to RL from the Canadian Institutes of Health Research (grant # MOP 82921). ER received studentships from the Fonds de Recherche Santé du Québec and from the Canadian Institutes of Health Research. The authors have no conflict of interest to declare.



## References

1. Fu, Y. and C.S. Rubin, *Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology*. EMBO Rep, 2011. **12**(8): p. 785-96.
2. Roy, A., et al., *Protein kinase D signaling in cancer: A friend or foe?* Biochim Biophys Acta, 2017. **1868**(1): p. 283-294.
3. Malhotra, V. and F. Campelo, *PKD regulates membrane fission to generate TGN to cell surface transport carriers*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(2).
4. Valverde, A.M., et al., *Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(18): p. 8572-6.
5. Maeda, Y., et al., *Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain*. Embo J, 2001. **20**(21): p. 5982-90.
6. Pusapati, G.V., et al., *Role of the second cysteine-rich domain and Pro275 in protein kinase D2 interaction with ADP-ribosylation factor 1, trans-Golgi network recruitment, and protein transport*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(6): p. 1011-22.
7. Diaz Anel, A.M. and V. Malhotra, *PKCeta is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus*. J Cell Biol, 2005. **169**(1): p. 83-91.
8. Hausser, A., et al., *Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(9): p. 880-6.
9. Gehart, H., et al., *The BAR domain protein Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network*. Dev Cell, 2012. **23**(4): p. 756-68.
10. Godi, A., et al., *FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(5): p. 393-404.
11. Kumagai, K., et al., *CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6488-95.
12. Graham, T.R. and C.G. Burd, *Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(2): p. 113-21.

13. Hinchliffe, K.A. and R.F. Irvine, *Regulation of type II PIP kinase by PKD phosphorylation*. Cell Signal, 2006. **18**(11): p. 1906-13.
14. Olayioye, M.A. and A. Hausser, *Integration of non-vesicular and vesicular transport processes at the Golgi complex by the PKD-CERT network*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(8): p. 1096-103.
15. Bard, F. and V. Malhotra, *The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 439-55.
16. Szule, J.A., N.L. Fuller, and R.P. Rand, *The effects of acyl chain length and saturation of diacylglycerols and phosphatidylcholines on membrane monolayer curvature*. Biophys J, 2002. **83**(2): p. 977-84.
17. Riebeling, C., A.J. Morris, and D. Shields, *Phospholipase D in the Golgi apparatus*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(9): p. 876-80.
18. Litvak, V., et al., *Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(3): p. 225-34.
19. Kim, Y.J., et al., *Phosphatidylinositol-Phosphatidic Acid Exchange by Nir2 at ER-PM Contact Sites Maintains Phosphoinositide Signaling Competence*. Dev Cell, 2015. **33**(5): p. 549-61.
20. Chang, C.L. and J. Liou, *Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Homeostasis Regulated by Nir2 and Nir3 Proteins at Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions*. J Biol Chem, 2015. **290**(23): p. 14289-301.
21. San Pietro, E., et al., *Group IV phospholipase A(2)alpha controls the formation of inter-cisternal continuities involved in intra-Golgi transport*. PLoS Biol, 2009. **7**(9): p. e1000194.
22. Spang, A., *The Road not Taken: Less Traveled Roads from the TGN to the Plasma Membrane*. Membranes (Basel), 2015. **5**(1): p. 84-98.
23. Roth, M., *New candidates for vesicle coat proteins*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(5): p. 384-5.
24. Wakana, Y., et al., *CARTS biogenesis requires VAP-lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum-Golgi interface*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(25): p. 4686-99.

25. Fugmann, T., et al., *Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein*. J Cell Biol, 2007. **178**(1): p. 15-22.
26. Rajcani, J., V. Andrea, and R. Ingeborg, *Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview*. Virus Genes, 2004. **28**(3): p. 293-310.
27. Roizman, B. and A.E. Sears, *Herpes Simplex Viruses and Their Replication*, in *The Human Herpesviruses*, B. Roizman, R.J. Whitley, and C. Lopez, Editors. 1993, Raven Press: New York. p. 11-68.
28. Johnson, D.C. and J.D. Baines, *Herpesviruses remodel host membranes for virus egress*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 382-94.
29. Hofemeister, H. and P. O'Hare, *Nuclear pore composition and gating in herpes simplex virus-infected cells*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8392-9.
30. 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.
31. Speese, S.D., et al., *Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling*. Cell, 2012. **149**(4): p. 832-46.
32. Reynolds, A.E., et al., *U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids*. J Virol, 2001. **75**(18): p. 8803-17.
33. Roller, R.J., et al., *Herpes simplex virus type 1 U(L)34 gene product is required for viral envelopment*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 117-29.
34. Simpson-Holley, M., et al., *Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 12840-51.
35. 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.
36. Bjerke, S.L. and R.J. Roller, *Roles for herpes simplex virus type 1 U(L)34 and U(S)3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress*. Virology, 2006. **347**(2): p. 261-76.

37. Park, R. and J.D. Baines, *Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B*. J Virol, 2006. **80**(1): p. 494-504.
38. 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.
39. Bigalke, J.M., et al., *Membrane deformation and scission by the HSV-1 nuclear egress complex*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4131.
40. 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.
41. Lorenz, M., et al., *A single herpesvirus protein can mediate vesicle formation in the nuclear envelope*. J Biol Chem, 2015. **290**(11): p. 6962-74.
42. Henaff, D., K. Radtke, and R. Lippé, *Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment*. Traffic, 2012. **13**(11): p. 1443-9.
43. Rémillard-Labrosse, G. and R. Lippé, *Meeting of conventional and unconventional pathways at the TGN*. Commun Integr Biol, 2009. **2**(5): p. 434-6.
44. Rémillard-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.
45. Roberts, K.L. and J.D. Baines, *Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9889-96.
46. Johns, H.L., et al., *Rab6 Dependent Post-Golgi Trafficking of HSV1 Envelope Proteins to Sites of Virus Envelopment*. Traffic, 2014. **15**(2): p. 157-78.
47. Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippé, *Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 8847-60.
48. Campadelli, G., et al., *Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2798-802.

49. Stegen, C., et al., *Analysis of virion-incorporated host proteins required for herpes simplex virus type 1 infection through a RNA interference screen*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53276.
50. Campbell, M.E., J.W. Palfreyman, and C.M. Preston, *Identification of herpes simplex virus DNA sequences which encode a trans-acting polypeptide responsible for stimulation of immediate early transcription*. J Mol Biol, 1984. **180**(1): p. 1-19.
51. Pellett, P.E., et al., *Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of a protein encoded in a small herpes simplex virus DNA fragment capable of trans- inducing alpha genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(17): p. 5870-4.
52. Yasuda, S., et al., *A novel inhibitor of ceramide trafficking from the endoplasmic reticulum to the site of sphingomyelin synthesis*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43994-4002.
53. Kudo, N., et al., *Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer*. J Mol Biol, 2010. **396**(2): p. 245-51.
54. Pagano, R.E., et al., *A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor*. J Cell Biol, 1991. **113**(6): p. 1267-79.
55. Ktistakis, N.T., et al., *A fluorescent lipid analogue can be used to monitor secretory activity and for isolation of mammalian secretion mutants*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(2): p. 135-50.
56. Capasso, S., et al., *Sphingolipid metabolic flow controls phosphoinositide turnover at the trans-Golgi network*. Embo j, 2017. **36**(12): p. 1736-1754.
57. 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.
58. Ace, C.I., et al., *Construction and characterization of a herpes simplex virus type 1 mutant unable to transinduce immediate-early gene expression*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 2260-9.
59. Weinheimer, S.P., et al., *Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1992. **66**(1): p. 258-69.

60. Register, R.B. and J.A. Shafer, *A facile system for construction of HSV-1 variants: site directed mutation of the UL26 protease gene in HSV-1*. J Virol Methods, 1996. **57**(2): p. 181-93.
61. Church, G.A. and D.W. Wilson, *Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 3603-12.
62. Matlin, K.S. and K. Simons, *Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation*. Cell, 1983. **34**(1): p. 233-43.
63. Saraste, J. and E. Kuismanen, *Pre- and post-Golgi vacuoles operate in the transport of Semliki Forest virus membrane glycoproteins to the cell surface*. Cell, 1984. **38**(2): p. 535-49.
64. Griffiths, G., et al., *Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane*. J Cell Biol, 1985. **101**(3): p. 949-64.
65. Rao, R.P., et al., *Ceramide transfer protein deficiency compromises organelle function and leads to senescence in primary cells*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92142.
66. Mankouri, J., et al., *Release of Infectious Hepatitis C Virus from Huh7 Cells Occurs via a trans-Golgi Network-to-Endosome Pathway Independent of Very-Low-Density Lipoprotein Secretion*. J Virol, 2016. **90**(16): p. 7159-70.
67. Bhende, P.M., et al., *X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D*. J Virol, 2007. **81**(14): p. 7363-70.
68. Guedan, A., et al., *Investigation of the Role of Protein Kinase D in Human Rhinovirus Replication*. J Virol, 2017. **91**(9).
69. Zhang, Y.Q., et al., *Inhibition of herpes simplex virus type 1 by small interfering RNA*. Clin Exp Dermatol, 2008. **33**(1): p. 56-61.
70. Kim, D.H., et al., *Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(2): p. 222-6.
71. El Kasmi, I., et al., *Extended synaptotagmin 1 interacts with the Herpes simplex virus type 1 glycoprotein M and negatively modulates virus-induced membrane fusion*. submitted, 2017.

## 3 Discussion

### 3.1 Les modulateurs de la PKD agissent comme antiviraux

Dans le but de mieux comprendre l'implication de la machinerie vésiculaire médiée par la PKD dans la propagation du VHS-1 au travers de la cellule hôte, la PKD et ses modulateurs ont tout d'abord été ciblés par ARNi. Tel qu'attendu, la protéine virale VP16 et la PKD régulent positivement la relâche extracellulaire du virus. Toutefois, certains modulateurs tels que CERT, GGA1 et Nir2 agiraient comme antiviraux en régulant négativement la sortie virale (**voir Figure 8A**). Ces résultats sont pertinents, puisqu'il est connu que les protéines CERT et Nir2 régulent toutes deux les niveaux de DAG au TGN, alors que GGA1 est impliquée dans le recrutement de molécules adaptatrices sur le manteau des vésicules. Comme la surexpression de CERT a entraîné une diminution de la relâche virale (**voir Figure 9A**), que la localisation de la céramide est affectée par le dsiCERT (**voir Figure 11**) et que la viabilité des cellules n'est affectée dans aucun de ses traitements (**voir Figures 8B et 9B**), la spécificité des *Dicer-substrate RNA* (dsiRNAs) a pu être confirmée.

Une certaine variation peut être observée dans les résultats du criblage (**voir Figure 8A**), mais celle-ci est attendue, car la réponse cellulaire varie à l'intérieure même d'une cellule, d'une cellule à l'autre, selon la stabilité de la protéine ciblée, la redondance fonctionnelle, la toxicité associée au traitement et même le moment où la récolte des échantillons a lieu [183-185]. Dans cette optique, tous les protocoles ont été optimisés de façon à réduire les sources de variation. Tel que discuté, des analyses de viabilité ont permis de déterminer la concentration des réactifs et la durée des traitements à respecter pour minimiser la cytotoxicité, car un métabolisme cellulaire fortement affecté ou ralenti aurait assurément influencé la production virale. Ensuite, comme les résultats peuvent également varier selon l'efficacité de transfection, des dsiRNAs, soient des duplex d'ARN de 27 nucléotides générés chimiquement, ont été utilisés, car ils ont une efficacité jusqu'à 100 fois plus grande que les siRNAs classiques de 21 nucléotides pour interférer avec l'expression d'un gène spécifique en dégradant les transcrits endogènes homologues. En effet, les dsiRNAs sont clivés par Dicer en plusieurs ARNs double brins de 21 nucléotides différents, de sorte qu'ils peuvent cibler davantage de régions sur les ARNs

messagers (ARNm) cibles [186-188]. Les dsiRNAs sont également synthétisés de façon à ce que leur séquence cible évite les sites de polymorphisme nucléotidique, d'épissage alternatif ou impliqués dans la formation de structures secondaires qui empêcheraient la liaison adéquate du dsiRNAs à l'ARNm, minimisant ainsi les faux négatifs. De plus, la séquence des dsiRNAs est générée de façon à minimiser les faux positifs, c'est-à-dire qu'un « blast » de ces séquences a été effectué pour éviter des hybridations potentielles avec d'autres séquences non spécifiques [189]. Sinon, comme les effets non spécifiques augmentent avec la concentration des ARNi, cette dernière a été optimisée expérimentalement suite à 48h de traitement (**données non montrées**), ce temps ayant été choisi entre autres en fonction de la demi-vie estimée des protéines (**voir Tableau III**). Finalement, le taux de transfection déterminé expérimentalement par microscopie à fluorescence est de 70% (**données non montrées**). Ainsi, les dsiRNAs demeurent des outils efficaces pour inhiber l'expression d'un gène cible.

**Tableau III. Demi-vie estimée des protéines ciblées dans l'étude\***

<b>Protéine</b>	<b>Demi-vie</b>
Arfaptin1	4,4h
CERT	30h
FAPP2	30h
GGA1	30h
GGA2	30h
GGA3	30h
NIR2	30h
OBSP	4,4h
PKD3	30h
VP16	30h

\* Information tirée de <https://web.expasy.org/protparam/>

Pour aller plus loin et s'assurer de la spécificité des dsiRNAs, une expérience de récupération pourrait tout de même être réalisée en inhibant l'expression du gène cible par ARNi avant de transfecter les cellules avec un plasmide exprimant ce même gène. Le retour de l'expression de la protéine pourrait ensuite être observée par Western Blot. Évidemment, le plasmide devra être résistant au dsiRNA, notamment via des mutations silencieuses dans sa séquence de liaison à l'ARNi. Sinon, pour améliorer le taux de transfection et obtenir une analyse des résultats plus juste où les phénotypes sont encore plus marqués, des lignées



cellulaires stables pourraient être utilisées. L'obtention de celles-ci demande cependant beaucoup de temps et d'optimisation. Dans le même ordre d'idées, il pourrait être avantageux de développer un système qui permet de sélectionner uniquement les cellules transfectées. Par exemple, les dsRNA pourraient être transfectés via des vecteurs de sélection incluant la séquence du dsRNA de même qu'une séquence complémentaire pour un gène viral essentiel à la réplication. Ainsi, suite à une infection avec un virus mutant pour ce même gène, le virus ne pourrait se répliquer que dans les cellules transfectées adéquatement. Le système CRISPR/Cas9 pourrait également être utilisé, ce dernier entraînant une inhibition encore plus efficace et spécifique d'un gène donné [190].

Afin de réduire la variation observée lors des essais de plaque, malgré le fait que ces dernières soient une technique bien établie et reconnue dans le domaine de la virologie [191], d'autres techniques pourraient être utilisées. Suite à l'utilisation d'un virus fluorescent, la fluorométrie peut s'avérer une technique rapide pour mesurer les titres viraux. Or, elle est peu sensible et rend la détection de différences entre les différentes conditions plus difficile (**données non montrées**). La méthode du *In Cell Western* de LI-COR permet de quantifier l'immunofluorescence des protéines virales dans les cellules infectées. Cette méthode automatisée détectant l'intensité de la fluorescence permet d'évaluer le titre viral de façon similaire aux essais de plaque, mais plus rapidement et facilement tout en évitant les biais [191]. Elle pourrait donc être envisagée pour des travaux futurs.

### **3.2 CERT régule la sortie virale indépendamment du transport des lipides**

Étant donné la pertinence de CERT comme transporteur de lipides au TGN et la disponibilité des réactifs, des expériences subséquentes ont été réalisées dans le but d'en apprendre davantage sur son rôle dans la propagation virale. Suite à l'utilisation de la drogue HPA-12 inhibant le transport de la céramide du RE au TGN, il semble que CERT régule la sortie virale indépendamment de son rôle de transporteur de céramide (**voir Figure 10A**). De façon plus globale, il semble que la PKD et ses modulateurs régulent également la sortie virale indépendamment des niveaux intracellulaires totaux de DAG (**voir Figure 12**). Or, il a précédemment été démontré que les niveaux locaux de DAG au TGN jouent un rôle avec la

PKD dans la régulation de la relâche virale extracellulaire [115]. Ainsi, il serait pertinent de mesurer les niveaux locaux de DAG au TGN dans cette étude, notamment via l'utilisation de protéines fluorescentes interagissant avec le DAG pour mieux visualiser sa régulation spatio-temporelle par les différents acteurs de la voie médiée par la PKD [192, 193]. Étant donné le rôle de plusieurs autres lipides dans la vésiculation, notamment le PI4P, le cholestérol ou encore le LPA, ces derniers pourraient également être monitorés afin de mieux comprendre leur implication dans le cycle viral.

### **3.3 Les modulateurs de la PKD agissent à plusieurs étapes du cycle viral**

Pour tenter de comprendre de façon plus globale comment les différents modulateurs de la PKD affectent la propagation virale, l'accumulation des particules virales dans les différents compartiments cellulaires a été quantifiée par microscopie électronique. Les résultats suggèrent que les protéines PKD, Nir2 et GGA1 n'agissent pas seulement au niveau du TGN, mais également plus tôt dans le cycle viral en jouant un rôle dans la sortie nucléaire alors que CERT pourrait jouer un rôle dans la relâche au niveau de l'espace périnucléaire (**voir Figure 13**). La validité de ces données est confirmée par l'accumulation de capsides non enveloppées dans le noyau et le cytoplasme avec siVP16, en accord avec ses fonctions précédemment rapportées [101, 194, 195], ou encore par la concordance des données avec les essais de plaque sur la fraction intracellulaire (**voir Figure 8B**). Des études plus poussées doivent cependant être entreprises pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action, entre autres via des expériences de RT-qPCR et de Western Blot pour voir si la PKD et ses modulateurs affectent l'expression des gènes ou des protéines nécessaires au processus de bourgeonnement dans l'espace périnucléaire ou encore de qPCR pour voir si la réplication du génome est affectée.

Bref, cette étude réalisée dans des conditions non synchronisées a permis de mettre en évidence l'implication de la machinerie vésiculaire médiée par la PKD tout au long du transport du VHS-1 au travers de la cellule hôte. Néanmoins, plusieurs questions demeurent, notamment le mécanisme d'action via lequel les différents modulateurs agissent, que ce soit directement avec les facteurs viraux ou indirectement via la perturbation de processus cellulaires exploités

par le virus. Une approche protéomique permettrait d'en apprendre certainement plus sur les molécules impliquées.

### **3.4 Analyse des différents isoformes de la PKD**

Tel que mentionné précédemment, la PKD existe sous plusieurs formes, trois isoformes étant retrouvés chez les mammifères. L'utilisation des cellules 143B dans les différentes expériences a permis de simplifier l'étude, car ces dernières n'expriment qu'un seul isoforme de la PKD, soit la PKD3, et que ses structures intracellulaires comme le TGN résistent mieux à l'infection par le VHS-1 [46, 115, 196]. Il serait toutefois intéressant d'étudier la redondance ou la complémentarité des différents isoformes de la PKD dans la relâche virale et leurs interactions avec différents modulateurs. Par exemple, afin de déterminer s'ils jouent des rôles distincts, les cellules Hela exprimant les isoformes PKD2 et PKD3 pourraient notamment être utilisées et la relâche virale quantifiée suite à l'inhibition d'un seul isoforme à la fois ou des deux en même temps. Pour étudier leurs interactions avec d'autres protéines ou entre eux, des expériences d'immunoprécipitation pourraient également être réalisées.

### **3.5 Rôle de la PKD et de ses modulateurs...**

#### **3.5.1 ...Dans les cellules polarisées**

Les cellules 143B utilisées dans le cadre de cette étude sont non polarisées en culture cellulaire. Or, comme la PKD est impliquée dans la relâche basolatérale au TGN [197], il serait intéressant de déterminer l'impact de l'utilisation de cellules polarisées sur la relâche du virus. Tout porte à croire que la PKD y jouerait encore un rôle clé, car le virus priorise le transport basolatéral chez les cellules polarisées de façon à promouvoir la propagation rapide du virus via les jonctions intercellulaires [119]. Sinon, le rôle de la PKD pourrait également être étudié dans les cellules neuronales, hôte naturel du VHS-1. Encore une fois, elle pourrait réguler la relâche virale, car il a été démontré qu'elle est impliquée dans la maintenance de la polarité des cellules neuronales [198, 199]. Dans tous ces types cellulaires, le rôle des différents modulateurs pourrait évidemment aussi être étudié.

### 3.5.2 ...Dans le transport des gros cargos cellulaires

Les signaux de triage qui dictent l'incorporation de certains cargos dans les vésicules générées par la PKD sont encore inconnus. Ces signaux pourraient être spécifiques ou partagés entre les différents cargos. Ainsi, l'utilisation de la voie de la PKD par le VHS-1 pour quitter le TGN pourrait aussi s'appliquer aux larges cargos de plus de 100 nm tels que le procollagène et les chylomicrons [200, 201]. Dans tous les cas, il n'est également pas clair si les cargos cellulaires et viraux utilisant la voie de la PKD partagent la machinerie ou entrent en compétition pour celle-ci. Pour répondre à cette question, le contenu des vésicules pourrait être visualisé par microscopie électronique suite à l'immunomarquage de divers cargos. La microscopie à fluorescence pourrait aussi être réalisée pour déterminer s'il y a colocalisation entre différents cargos. Étant donné qu'il a été démontré que le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV G) voyage du TGN vers la membrane plasmique en utilisant la voie de plusieurs autres protéines de l'hôte, celui-ci représente un marqueur idéal pour cette voie. Une étude démontre d'ailleurs que le procollagène colocalise avec le VSV G [202] alors que des résultats préliminaires suggèrent une colocalisation entre le VSV G et le TGN lors de l'inhibition de la PKD3 dans les cellules 143B (**données non montrées**). Cela pourrait suggérer que la voie de la PKD est partagée par les virus et les protéines cellulaires. Ceci est particulièrement intéressant, puisque les virus détournent souvent les systèmes cellulaires de l'hôte pour leur propre bénéfice [134].

### 3.5.3 ...Chez d'autres virus

L'implication de la voie médiée par la PKD a aussi été démontrée chez d'autres virus, renforçant la pertinence de cette voie chez le VHS-1 et donnant quelques pistes à explorer pour tenter d'expliquer le rôle de la PKD et de ses modulateurs aux différentes étapes du cycle viral du VHS-1.

#### 3.5.3.1 Virus Epstein-Barr (EBV)

Il a été démontré que la combinaison du facteur de transcription de l'hôte *X-box binding protein 1* avec la PKD permet l'activation du promoteur IE BZLF1 chez EBV [203]. Pour ce faire, la PKD agirait comme inhibiteur des histones désacétylases et renverserait l'effet inhibiteur du facteur MEF2D du promoteur BZLF1 [203, 204]. Comme les promoteurs IE sont

impliqués dans l'activation de la cascade d'expression des gènes lytiques, ces deux facteurs cellulaires seraient impliqués dans la réactivation du virus de la phase de latence, permettant le cycle de réplication lytique dans les cellules plasmatiques [205, 206]. Cet exemple démontré chez un virus de la famille des *Herpesviridae* renforce l'idée que la PKD peut jouer un rôle à plusieurs étapes du cycle viral du VHS-1, notamment au niveau du noyau en régulant l'expression des gènes.

### **3.5.3.2 Virus de l'hépatite C (HCV)**

Il a été démontré que les adaptateurs présents au TGN tels que les GGAs jouent un rôle dans l'assemblage et la relâche du HCV [207]. Plus précisément, les GGAs pourraient agir via une stabilisation du virus, la sécrétion du virus ou encore son assemblage, puisque GGA1 réduit les niveaux intracellulaires du virus tandis que GGA2 réduit la relâche virale et GGA3 agit au niveau des deux [207]. Cette régulation différentielle par les différentes formes de GGA se rapproche des résultats observés dans cette étude où GGA1 semble être l'isoforme affectant le plus le cycle viral du VHS-1. Des études subséquentes devront cependant être réalisées pour tenter de comprendre leurs rôles respectifs. Dans tous les cas, la voie de la PKD pourrait également jouer un rôle chez le HCV.

### **3.5.3.3 Virus Varicella-Zoster (VZV)**

Il a été démontré que l'infection par le VZV est abolie lorsque le transport des récepteurs mannose 6-phosphate (MPRs), qui se retrouvent à la surface de vésicules fusionnant avec les endosomes tardifs pour libérer leur contenu provenant de la MP, est inhibé par l'agent chloroquine [208]. En effet, le VZV possède au moins quatre glycoprotéines (gB, gE, gH et gI) ayant un complexe d'oligosaccharides composé d'un mannose 6-phosphate se liant au MPR et rendant ainsi l'entrée du VZV dépendante de ce récepteur [208]. La glycoprotéine gD du VHS-1 possède également un mannose 6-phosphate [209], ce qui faciliterait l'entrée du VHS-1 dans les cellules cibles, même si cette implication est minime par rapport au VZV [105, 210]. Comme il est connu que les GGAs régulent la localisation des récepteurs de triage tels que le MPR, ces derniers pourraient également jouer un rôle chez le VHS-1 [169, 171].

### 3.5.3.4 Picornavirus

Il a été démontré que le Rhinovirus (HRV) induit la phosphorylation de la PKD et que l'utilisation d'inhibiteurs de celle-ci réduit la réplication virale chez HRV, mais aussi le Poliovirus et le *foot-and-mouth disease virus* dans une variété de cellules [211]. Le mécanisme par lequel la PKD agit est encore inconnu, mais il serait indépendant de la réponse à l'interféron ou encore de la voie d'endocytose médiée par les clathrines [211]. Sinon, OSBP, PI4KIII $\beta$  et Arf1 ont aussi été identifiés comme acteurs cellulaires impliqués dans le complexe de réplication entéroviral. En effet, leur suppression entraîne l'inhibition de la réplication virale des Picornavirus [212-221]. Cela démontre bien l'interaction entre le virus et sa cellule hôte, qui encore une fois donne des pistes à explorer pour mieux comprendre l'implication de la voie de la PKD chez le VHS-1.

Bref, tous ces exemples démontrent que plusieurs virus utilisent les facteurs cellulaires, dont la machinerie de la PKD, à différentes étapes de leur cycle de vie. Mieux comprendre l'implication de ces facteurs et la découverte d'une machinerie commune pourrait permettre de cibler plusieurs pathogènes en même temps.

### 3.5.4 ...Dans le développement d'un traitement

Le rôle de la PKD a surtout été étudié *in vitro* et peu d'études se sont penchées sur son implication *in vivo* [137]. Pourtant, comme la PKD est impliquée dans plusieurs fonctions telles que la prolifération et l'apoptose, elle représente une bonne cible pour le traitement des cancers. Certaines études semblent d'ailleurs prometteuses [137, 138, 222-225]. Par exemple, des inhibiteurs de la PKD ont été utilisés comme agent thérapeutique afin de traiter de façon efficace les cancers de la prostate et du pancréas chez la souris. Or, cette inhibition systémique a aussi engendré d'autres problèmes tels qu'une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules *bêta* du pancréas, entraînant le développement du diabète [226]. L'étude du rôle physiologique de la PKD dans un organisme entier pose donc un défi de taille. En effet, comme la PKD est retrouvée à plusieurs endroits dans la cellule et qu'elle est impliquée dans plusieurs processus [138, 139, 144], il faudrait générer des modèles de souris *knockout* pour les différents isoformes de la PKD, et ce, dans des tissus spécifiques [137, 139]. Or, cela ne semble pas une tâche facile étant donné que le recrutement sélectif de la PKD à différents endroits n'est toujours pas bien

compris. Il serait notamment important d'identifier la localisation et la contribution des différents générateurs de DAG pour mieux comprendre son rôle dans l'activation de la PKD [139]. Sinon, pour pallier à ce problème, il serait avantageux de cibler les modulateurs de la PKD qui ne sont pas retrouvés à plusieurs endroits dans la cellule et qui pourraient donc représenter une meilleure option pour le développement d'un traitement.

### **3.6 Aspect novateur et contribution à l'avancement des connaissances**

Les résultats démontrent pour la première fois l'implication des modulateurs de la PKD dans la propagation virale du VHS-1 en plus d'apporter davantage d'informations sur le rôle de la PKD. Étant donné que certaines protéines agissant au TGN ont un impact sur la production virale, les résultats appuient également le TGN comme étant un site de passage pour le virus. De plus, comme la machinerie de la PKD peut être utilisée autant chez les gros cargos cellulaires que plusieurs virus, les nouvelles connaissances acquises s'appliquent à plus d'un champ de recherche et peuvent contribuer au développement de traitements.

## 4 Conclusion

Pour conclure, différents modulateurs de la PKD ont été ciblés dans cette étude et ont permis d'en apprendre davantage sur le rôle des facteurs cellulaires présents au TGN dans la propagation virale. Les résultats obtenus démontrent que plusieurs de ces modulateurs dont CERT, Nir2 et GGA1 agissent comme antiviraux en régulant négativement la relâche extracellulaire du VHS-1 et que ces effets seraient indépendants des niveaux intracellulaires totaux de diacylglycérol. La microscopie électronique suggère également que certaines protéines cellulaires comme la PKD, Nir2, GGA1 et CERT affectent plusieurs étapes de la propagation virale, notamment la sortie nucléaire. Tous ces résultats contribuent à une meilleure compréhension du processus complexe de maturation du VHS-1 et à l'identification de nouvelles interactions hôte-pathogène. En plus de leur pertinence dans le domaine de la virologie, les découvertes issues de ce projet apportent également de nouveaux détails au niveau du transport intracellulaire ce qui pourrait mener au développement de nouveaux traitements. Somme toute, même si ce projet de maîtrise a permis de contribuer à l'avancement des connaissances, il soulève tout autant de questions qui peuvent donner lieu à de nouveaux projets de recherche.



## Bibliographie

1. Chiron, J.-P., *Virus herpès : 2000 ans d'histoire : François Chast,...* [et al], *<i>Virus</i> Herpes <i>et pensée médicale de l'empirisme au prix Nobel</i>. Revue d'Histoire de la Pharmacie, 1998: p. 218-222.*
2. Pellett, P.E. and B. Roizman, *Fields Virology*, in *5th Edition*. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106 USA.
3. Lecoq, H., [*Discovery of the first virus, the tobacco mosaic virus: 1892 or 1898?*]. C R Acad Sci III, 2001. **324**(10): p. 929-33.
4. Lwoff, A., *The concept of virus*. J Gen Microbiol, 1957. **17**(2): p. 239-53.
5. Goncalves, M.A. and A.A. de Vries, *Adenovirus: from foe to friend*. Rev Med Virol, 2006. **16**(3): p. 167-86.
6. Carlton, J.G. and J. Martin-Serrano, *Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery*. Science, 2007. **316**(5833): p. 1908-12.
7. Heinlein, M., *The spread of tobacco mosaic virus infection: insights into the cellular mechanism of RNA transport*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(1): p. 58-82.
8. Friedman, G.K., et al., *Herpes Simplex Virus Oncolytic Therapy for Pediatric Malignancies*. Mol Ther, 2009. **17**(7): p. 1125-1135.
9. Kotterman, M.A., T.W. Chalberg, and D.V. Schaffer, *Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook*. Annu Rev Biomed Eng, 2015. **17**: p. 63-89.
10. Lim, F., et al., *Biosafety of gene therapy vectors derived from herpes simplex virus type 1*. Curr Gene Ther, 2013. **13**(6): p. 478-91.
11. Jensen, H.L., *Herpes simplex virus type 1 morphogenesis and virus-cell interactions: significance of cytoskeleton and methodological aspects*. APMIS Suppl, 2006(119): p. 7-55.
12. Davison, A., et al., *The order Herpesvirales*. Archives of Virology, 2009. **154**(1): p. 171-177.
13. Looker, K.J. and G.P. Garnett, *A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2*. Sex Transm Infect, 2005. **81**(2): p. 103-7.

14. 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 University Press: Cambridge.
15. Fatahzadeh, M. and R.A. Schwartz, *Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management*. *J Am Acad Dermatol*, 2007. **57**(5): p. 737-63; quiz 764-6.
16. Lachmann, R., *Herpes simplex virus latency*. *Expert Rev Mol Med*, 2003. **5**(29): p. 1-14.
17. Stock, C., et al., *Risk factors of herpes simplex type 1 (HSV-1) infection and lifestyle factors associated with HSV-1 manifestations*. *Eur J Epidemiol*, 2001. **17**(9): p. 885-90.
18. Spruance, S.L., *Pathogenesis of herpes simplex labialis: experimental induction of lesions with UV light*. *J Clin Microbiol*, 1985. **22**(3): p. 366-8.
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. Murakami, S., et al., *Bell palsy and herpes simplex virus: identification of viral DNA in endoneurial fluid and muscle*. *Ann Intern Med*, 1996. **124**(1 Pt 1): p. 27-30.
21. Furuta, Y., et al., *Reactivation of herpes simplex virus type 1 in patients with Bell's palsy*. *J Med Virol*, 1998. **54**(3): p. 162-6.
22. Carter, C.J., *Interactions between the products of the Herpes simplex genome and Alzheimer's disease susceptibility genes: relevance to pathological-signalling cascades*. *Neurochem Int*, 2008. **52**(6): p. 920-34.
23. Carter, C.J., *APP, APOE, complement receptor 1, clusterin and PICALM and their involvement in the herpes simplex life cycle*. *Neurosci Lett*, 2010. **483**(2): p. 96-100.
24. Federoff, H.J., *An infectious conspiracy: the case for HSV-1 and APOE[epsilon]4 in Alzheimer's disease*. *Neurobiology of Aging*, 1999. **20**(4): p. 467-468.
25. Wilson, S.S., E. Fakioglu, and B.C. Herold, *Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009. **7**(5): p. 559-68.
26. Naesens, L. and E. De Clercq, *Recent developments in herpesvirus therapy*. *Herpes*, 2001. **8**(1): p. 12-6.
27. Crute, J.J., et al., *Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease*. *Nat Med*, 2002. **8**(4): p. 386-91.

28. Kleymann, G., et al., *New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 392-8.
29. Pope, L.E., et al., *The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process*. Antiviral Res, 1998. **40**(1-2): p. 85-94.
30. Furman, P.A., et al., *Acyclovir-resistant mutants of herpes simplex virus type 1 express altered DNA polymerase or reduced acyclovir phosphorylating activities*. J Virol, 1981. **40**(3): p. 936-41.
31. Lolis, M.S., et al., *Drug-resistant herpes simplex virus in HIV infected patients*. Acta Dermatovenerol Croat, 2008. **16**(4): p. 204-8.
32. Furman, P.A., M.H. St Clair, and T. Spector, *Acyclovir triphosphate is a suicide inactivator of the herpes simplex virus DNA polymerase*. J Biol Chem, 1984. **259**(15): p. 9575-9.
33. Greco, A., et al., *S-adenosyl methionine decarboxylase activity is required for the outcome of herpes simplex virus type 1 infection and represents a new potential therapeutic target*. FASEB J, 2005. **19**(9): p. 1128-30.
34. 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.
35. Taylor, T.J., et al., *Herpes simplex virus*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d752-64.
36. Nishiyama, Y., *Herpes simplex virus gene products: the accessories reflect her lifestyle well*. Rev Med Virol, 2004. **14**(1): p. 33-46.
37. Rajcani, J., V. Andrea, and R. Ingeborg, *Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview*. Virus Genes, 2004. **28**(3): p. 293-310.
38. Zhou, Z.H., et al., *Protein subunit structures in the herpes simplex virus A-capsid determined from 400 kV spot-scan electron cryomicroscopy*. J Mol Biol, 1994. **242**(4): p. 456-69.
39. Newcomb, W.W. and J.C. Brown, *Time-dependent transformation of the herpesvirus tegument*. J Virol, 2009. **83**(16): p. 8082-9.
40. Loret, S., G. Guay, and R. Lippé, *Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8605-18.
41. Kelly, B.J., et al., *Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1*. Virus Res, 2009. **145**(2): p. 173-86.

42. Lee, J.H., et al., *Identification of structural protein-protein interactions of herpes simplex virus type 1*. *Virology*, 2008. **378**(2): p. 347-54.
43. Johnson, D.C. and J.D. Baines, *Herpesviruses remodel host membranes for virus egress*. *Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(5): p. 382-94.
44. Vittone, V., et al., *Determination of Interactions between Tegument Proteins of Herpes Simplex Virus Type 1*. *J Virol*, 2005. **79**(15): p. 9566-71.
45. 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.
46. Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippé, *Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress*. *J Virol*, 2005. **79**(14): p. 8847-60.
47. 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.
48. Reske, A., et al., *Understanding HSV-1 entry glycoproteins*. *Rev Med Virol*, 2007. **17**(3): p. 205-15.
49. Wisner, T.W., et al., *Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase*. *J Virol*, 2009. **83**(7): p. 3115-26.
50. 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.
51. Harley, C.A., A. Dasgupta, and D.W. Wilson, *Characterization of Herpes Simplex Virus-Containing Organelles by Subcellular Fractionation: Role for Organelle Acidification in Assembly of Infectious Particles*. *J Virol*, 2001. **75**(3): p. 1236-1251.
52. Foster, J.W., Slonczewski, Joan L., *Microbiology: An Evolving Science*. Fourth ed. 2017: W.W. Norton and Company, Inc. 1376.
53. Wittels, M. and P.G. Spear, *Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway*. *Virus Res*, 1991. **18**(2-3): p. 271-90.
54. 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.

55. Nicola, A.V., et al., *Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway.* J Virol, 2005. **79**(12): p. 7609-16.
56. Herold, B.C., et al., *Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity.* J Virol, 1991. **65**(3): p. 1090-8.
57. Laquerre, S., et al., *Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread.* J Virol, 1998. **72**(7): p. 6119-30.
58. Shukla, D., et al., *A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry.* Cell, 1999. **99**(1): p. 13-22.
59. Shieh, M.T., et al., *Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans.* J Cell Biol, 1992. **116**(5): p. 1273-81.
60. Turner, A., et al., *Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system.* J Virol, 1998. **72**(1): p. 873-5.
61. Pertel, P.E., et al., *Cell Fusion Induced by Herpes Simplex Virus Glycoproteins gB, gD, and gH-gL Requires a gD Receptor but Not Necessarily Heparan Sulfate.* Virology, 2001. **279**(1): p. 313-324.
62. Krummenacher, C., et al., *Entry of herpesviruses into cells: the enigma variations.* Adv Exp Med Biol, 2013. **790**: p. 178-95.
63. Dohner, K., et al., *Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(8): p. 2795-809.
64. Wolfstein, A., et al., *The inner tegument promotes herpes simplex virus capsid motility along microtubules in vitro.* Traffic, 2006. **7**(2): p. 227-37.
65. 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.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4922-31.
66. 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.
67. Wysocka, J. and W. Herr, *The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch.* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(6): p. 294-304.

68. Gruffat, H., R. Marchione, and E. Manet, *Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 869.
69. Batterson, W. and B. Roizman, *Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes*. J Virol, 1983. **46**(2): p. 371-7.
70. Honess, R.W. and B. Roizman, *Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins*. J Virol, 1974. **14**(1): p. 8-19.
71. Gao, M. and D.M. Knipe, *Potential role for herpes simplex virus ICP8 DNA replication protein in stimulation of late gene expression*. J Virol, 1991. **65**(5): p. 2666-75.
72. Everett, R.D. and J. Murray, *ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 5078-89.
73. Maul, G.G., *Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication*. Bioessays, 1998. **20**(8): p. 660-7.
74. 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. 857-68.
75. Gu, H., Y. Zheng, and B. Roizman, *Interaction of herpes simplex virus ICP0 with ND10 bodies: a sequential process of adhesion, fusion, and retention*. J Virol, 2013. **87**(18): p. 10244-54.
76. Burkham, J., et al., *Interactions of herpes simplex virus type 1 with ND10 and recruitment of PML to replication compartments*. J Virol, 2001. **75**(5): p. 2353-67.
77. Poffenberger, K.L. and B. Roizman, *A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection*. J Virol, 1985. **53**(2): p. 587-95.
78. Weller, S.K. and D.M. Coen, *Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a013011.
79. 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.

80. Sheaffer, A.K., et al., *Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 687-98.
81. 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.
82. Trus, B.L., et al., *The herpes simplex virus procapsid: structure, conformational changes upon maturation, and roles of the triplex proteins VP19c and VP23 in assembly*. J Mol Biol, 1996. **263**(3): p. 447-62.
83. Cheng, N., et al., *Handedness of the herpes simplex virus capsid and procapsid*. J Virol, 2002. **76**(15): p. 7855-9.
84. Roos, W.H., et al., *Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9673-8.
85. Beilstein, F., M.R. Higgs, and N.D. Stow, *Mutational analysis of the herpes simplex virus type 1 DNA packaging protein UL33*. J Virol, 2009.
86. Wills, E., L. Scholtes, and J.D. Baines, *Herpes simplex virus 1 DNA packaging proteins encoded by UL6, UL15, UL17, UL28, and UL33 are located on the external surface of the viral capsid*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10894-9.
87. Gibson, W. and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2*. J Virol, 1972. **10**(5): p. 1044-52.
88. Desai, P., et al., *Mutations in herpes simplex virus type 1 genes encoding VP5 and VP23 abrogate capsid formation and cleavage of replicated DNA*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1357-64.
89. Heilingloh, C.S. and A. Krawczyk, *Role of L-Particles during Herpes Simplex Virus Infection*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2565.
90. 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.
91. Hofemeister, H. and P. O'Hare, *Nuclear pore composition and gating in herpes simplex virus-infected cells*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8392-9.
92. Smith, J.D., *An additional role for the outer nuclear membrane in the morphogenesis of herpes simplex virus*. Intervirology, 1980. **13**(5): p. 312-6.

93. Dechat, T., et al., *Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin*. Genes Dev, 2008. **22**(7): p. 832-53.
94. Park, R. and J.D. Baines, *Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B*. J Virol, 2006. **80**(1): p. 494-504.
95. Leach, N.R. and R.J. Roller, *Significance of host cell kinases in herpes simplex virus type 1 egress and lamin-associated protein disassembly from the nuclear lamina*. Virology, 2010. **406**(1): p. 127-37.
96. Reynolds, A.E., L. Liang, and J.D. Baines, *Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5564-75.
97. Thurlow, J.K., et al., *Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids*. J Virol, 2006. **80**(5): p. 2118-26.
98. Trus, B.L., et al., *Allosteric signaling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-Filled HSV-1 capsids*. Mol Cell, 2007. **26**(4): p. 479-89.
99. 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.
100. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: an update*. Virus Res, 2009. **143**(2): p. 222-34.
101. 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.
102. Nozawa, N., et al., *Herpes simplex virus type 1 UL51 protein is involved in maturation and egress of virus particles*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6947-56.
103. 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.
104. Roffman, E., et al., *Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument*. J Virol, 1990. **64**(12): p. 6308-13.
105. Brunetti, C.R., et al., *Herpes simplex virus gD and virions accumulate in endosomes by mannose 6-phosphate-dependent and -independent mechanisms*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3330-9.



106. Homman-Loudiyi, M., et al., *Envelopment of human cytomegalovirus occurs by budding into Golgi-derived vacuole compartments positive for gB, Rab 3, trans-golgi network 46, and mannosidase II*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 3191-203.
107. Nozawa, N., et al., *Formation of aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role in virus assembly*. Exp Cell Res, 2004. **299**(2): p. 486-97.
108. Gershon, A.A., et al., *Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6372-90.
109. Granzow, H., et al., *Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study*. J Virol, 2001. **75**(8): p. 3675-84.
110. Whealy, M.E., et al., *Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress*. J Virol, 1991. **65**(3): p. 1066-81.
111. Whiteley, A., et al., *Effects of targeting herpes simplex virus type 1 gD to the endoplasmic reticulum and trans-Golgi network*. J Virol, 1999. **73**(11): p. 9515-20.
112. Gleeson, P.A., et al., *Domains of the TGN: coats, tethers and G proteins*. Traffic, 2004. **5**(5): p. 315-26.
113. Malhotra, V. and F. Campelo, *PKD regulates membrane fission to generate TGN to cell surface transport carriers*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(2).
114. Liljedahl, M., et al., *Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network*. Cell, 2001. **104**(3): p. 409-20.
115. Rémillard-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.
116. Kreitzer, G., et al., *Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 125-7.
117. Roberts, K.L. and J.D. Baines, *Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9889-96.
118. Johns, H.L., et al., *Rab6 Dependent Post-Golgi Trafficking of HSV1 Envelope Proteins to Sites of Virus Envelopment*. Traffic, 2014. **15**(2): p. 157-78.

119. Johnson, D.C., et al., *Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 821-33.
120. Corey, L. and P.G. Spear, *Infections with herpes simplex viruses (1)*. N Engl J Med, 1986. **314**(11): p. 686-91.
121. Negatsch, A., et al., *Ultrastructural analysis of virion formation and intraaxonal transport of herpes simplex virus type 1 in primary rat neurons*. J Virol, 2010. **84**(24): p. 13031-5.
122. Wisner, T.W., et al., *Anterograde transport of herpes simplex virus capsids in neurons by both separate and married mechanisms*. J Virol, 2011. **85**(12): p. 5919-28.
123. Penfold, M.E., P. Armati, and A.L. Cunningham, *Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6529-33.
124. Snyder, A., T.W. Wisner, and D.C. Johnson, *Herpes simplex virus capsids are transported in neuronal axons without an envelope containing the viral glycoproteins*. J Virol, 2006. **80**(22): p. 11165-77.
125. Antinone, S.E., et al., *The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5494-8.
126. Enquist, L.W., et al., *Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system*. Vet Microbiol, 2002. **86**(1-2): p. 5-16.
127. Aranda, A.M. and A.L. Epstein, *[Herpes simplex virus type 1 latency and reactivation: an update]*. Med Sci (Paris), 2015. **31**(5): p. 506-14.
128. Wilson, A.C. and I. Mohr, *A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons*. Trends Microbiol, 2012. **20**(12): p. 604-11.
129. Knipe, D.M. and A. Cliffe, *Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(3): p. 211-21.
130. Kubat, N.J., et al., *The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription*. J Virol, 2004. **78**(22): p. 12508-18.
131. Thompson, R.L. and N.M. Sawtell, *HSV latency-associated transcript and neuronal apoptosis*. Science, 2000. **289**(5485): p. 1651.

132. Thompson, R.L. and N.M. Sawtell, *Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene promotes neuronal survival*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6660-75.
133. Kim, J.Y., et al., *Transient reversal of episome silencing precedes VP16-dependent transcription during reactivation of latent HSV-1 in neurons*. PLoS Pathog, 2012. **8**(2): p. e1002540.
134. Cantin, R., S. Methot, and M.J. Tremblay, *Plunder and Stowaways: Incorporation of Cellular Proteins by Enveloped Viruses*. J. Virol., 2005. **79**(11): p. 6577-6587.
135. Stegen, C., et al., *Analysis of virion-incorporated host proteins required for herpes simplex virus type 1 infection through a RNA interference screen*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53276.
136. Bossard, C., et al., *Dimeric PKD regulates membrane fission to form transport carriers at the TGN*. J Cell Biol, 2007. **179**(6): p. 1123-31.
137. Ellwanger, K. and A. Hausser, *Physiological functions of protein kinase D in vivo*. IUBMB Life, 2013. **65**(2): p. 98-107.
138. Roy, A., et al., *Protein kinase D signaling in cancer: A friend or foe?* Biochim Biophys Acta, 2017. **1868**(1): p. 283-294.
139. Fu, Y. and C.S. Rubin, *Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology*. EMBO Rep, 2011. **12**(8): p. 785-96.
140. Sanchez-Ruiloba, L., et al., *Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif*. J Biol Chem, 2006. **281**(27): p. 18888-900.
141. Auer, A., et al., *Role of the regulatory domain of protein kinase D2 in phorbol ester binding, catalytic activity, and nucleocytoplasmic shuttling*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 4375-85.
142. Rozengurt, E., O. Rey, and R.T. Waldron, *Protein kinase D signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13205-8.
143. Kunkel, M.T., et al., *The protein scaffold NHERF-1 controls the amplitude and duration of localized protein kinase D activity*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24653-61.
144. Olayioye, M.A., S. Barisic, and A. Hausser, *Multi-level control of actin dynamics by protein kinase D*. Cell Signal, 2013. **25**(9): p. 1739-47.

145. Maeda, Y., et al., *Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain*. *Embo J*, 2001. **20**(21): p. 5982-90.
146. Baron, C.L. and V. Malhotra, *Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane*. *Science*, 2002. **295**(5553): p. 325-8.
147. Pusapati, G.V., et al., *Role of the second cysteine-rich domain and Pro275 in protein kinase D2 interaction with ADP-ribosylation factor 1, trans-Golgi network recruitment, and protein transport*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(6): p. 1011-22.
148. Kunkel, M.T. and A.C. Newton, *Calcium transduces plasma membrane receptor signals to produce diacylglycerol at Golgi membranes*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(30): p. 22748-52.
149. Diaz Anel, A.M. and V. Malhotra, *PKC $\epsilon$  is required for beta1gamma2/beta3gamma2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus*. *J Cell Biol*, 2005. **169**(1): p. 83-91.
150. Hinchliffe, K.A. and R.F. Irvine, *Regulation of type II PIP kinase by PKD phosphorylation*. *Cell Signal*, 2006. **18**(11): p. 1906-13.
151. Hausser, A., et al., *Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(9): p. 880-6.
152. Hausser, A., et al., *Phospho-specific binding of 14-3-3 proteins to phosphatidylinositol 4-kinase III beta protects from dephosphorylation and stabilizes lipid kinase activity*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 17): p. 3613-21.
153. Graham, T.R. and C.G. Burd, *Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases*. *Trends Cell Biol*, 2011. **21**(2): p. 113-21.
154. Lenoir, M., et al., *Structural basis of wedging the Golgi membrane by FAPP pleckstrin homology domains*. *EMBO Rep*, 2010. **11**(4): p. 279-84.
155. Godi, A., et al., *FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P*. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(5): p. 393-404.
156. D'Angelo, G., L.R. Rega, and M.A. De Matteis, *Connecting vesicular transport with lipid synthesis: FAPP2*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1821**(8): p. 1089-95.
157. Kumagai, K., et al., *CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(8): p. 6488-95.

158. Litvak, V., et al., *Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(3): p. 225-34.
159. Herdman, C. and T. Moss, *Extended-Synaptotagmins (E-Syts); the extended story*. Pharmacol Res, 2016. **107**: p. 48-56.
160. Fugmann, T., et al., *Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein*. J Cell Biol, 2007. **178**(1): p. 15-22.
161. McMahon, H.T. and J.L. Gallop, *Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 590-6.
162. Gehart, H., et al., *The BAR domain protein Arfaptin-1 controls secretory granule biogenesis at the trans-Golgi network*. Dev Cell, 2012. **23**(4): p. 756-68.
163. Brown, H.A., et al., *ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1137-44.
164. Riebeling, C., A.J. Morris, and D. Shields, *Phospholipase D in the Golgi apparatus*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(9): p. 876-80.
165. San Pietro, E., et al., *Group IV phospholipase A(2)alpha controls the formation of inter-cisternal continuities involved in intra-Golgi transport*. PLoS Biol, 2009. **7**(9): p. e1000194.
166. Kozlovsky, Y. and M.M. Kozlov, *Membrane fission: model for intermediate structures*. Biophys J, 2003. **85**(1): p. 85-96.
167. D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier, *ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 347-58.
168. Lundmark, R., et al., *Arf family GTP loading is activated by, and generates, positive membrane curvature*. Biochem J, 2008. **414**(2): p. 189-94.
169. Puertollano, R., et al., *The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN*. Cell, 2001. **105**(1): p. 93-102.
170. Daboussi, L., et al., *Conserved role for Gga proteins in phosphatidylinositol 4-kinase localization to the trans-Golgi network*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(13): p. 3433-3438.
171. Takatsu, H., et al., *Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences*

- within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains.* J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28541-5.
172. Mattera, R., et al., *Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex.* EMBO J, 2003. **22**(1): p. 78-88.
173. Wang, P.Y., J. Weng, and R.G. Anderson, *OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation.* Science, 2005. **307**(5714): p. 1472-6.
174. Vieira, O.V., et al., *FAPP2, cilium formation, and compartmentalization of the apical membrane in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18556-61.
175. Tritz, R., et al., *FAPP2 gene downregulation increases tumor cell sensitivity to Fas-induced apoptosis.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. **383**(2): p. 167-71.
176. Kim, S., et al., *The phosphatidylinositol-transfer protein Nir2 binds phosphatidic acid and positively regulates phosphoinositide signalling.* EMBO Rep, 2013. **14**(10): p. 891-9.
177. Amarilio, R., et al., *Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction.* J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5934-44.
178. Chang, C.L., et al., *Feedback regulation of receptor-induced Ca<sup>2+</sup> signaling mediated by E-Syt1 and Nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions.* Cell Rep, 2013. **5**(3): p. 813-25.
179. Tian, D., et al., *Nir2, a novel regulator of cell morphogenesis.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(8): p. 2650-62.
180. Register, R.B. and J.A. Shafer, *A facile system for construction of HSV-1 variants: site directed mutation of the UL26 protease gene in HSV-1.* J Virol Methods, 1996. **57**(2): p. 181-93.
181. Church, G.A. and D.W. Wilson, *Study of herpes simplex virus maturation during a synchronous wave of assembly.* J Virol, 1997. **71**(5): p. 3603-12.
182. Rémillard-Labrosse, G. and R. Lippé, *Meeting of conventional and unconventional pathways at the TGN.* Commun Integr Biol, 2009. **2**(5): p. 434-6.
183. Huppi, K., S.E. Martin, and N.J. Caplen, *Defining and assaying RNAi in mammalian cells.* Mol Cell, 2005. **17**(1): p. 1-10.

184. Pei, Y. and T. Tuschl, *On the art of identifying effective and specific siRNAs*. Nat Methods, 2006. **3**(9): p. 670-6.
185. Cherry, S., *What have RNAi screens taught us about viral-host interactions?* Current Opinion in Microbiology, 2009. **12**(4): p. 446-452.
186. Castanotto, D. and J.J. Rossi, *The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 426-33.
187. Hefner, E., et al., *Increased potency and longevity of gene silencing using validated Dicer substrates*. J Biomol Tech, 2008. **19**(4): p. 231-7.
188. Kim, D.H., et al., *Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(2): p. 222-6.
189. Marques, J.T., et al., *A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(5): p. 559-65.
190. Brooks, A.K. and T. Gaj, *Innovations in CRISPR technology*. Curr Opin Biotechnol, 2018. **52**: p. 95-101.
191. Fabiani, M., et al., *A Novel Method to Titrate Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) Using Laser-Based Scanning of Near-Infrared Fluorophores Conjugated Antibodies*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 1085.
192. Sato, M., Y. Ueda, and Y. Umezawa, *Imaging diacylglycerol dynamics at organelle membranes*. Nat Methods, 2006. **3**(10): p. 797-9.
193. Tewson, P., et al., *Simultaneous detection of Ca<sup>2+</sup> and diacylglycerol signaling in living cells*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42791.
194. Ace, C.I., et al., *Construction and characterization of a herpes simplex virus type 1 mutant unable to transinduce immediate-early gene expression*. J Virol, 1989. **63**(5): p. 2260-9.
195. Weinheimer, S.P., et al., *Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1992. **66**(1): p. 258-69.
196. Campadelli, G., et al., *Fragmentation and dispersal of Golgi proteins and redistribution of glycoproteins and glycolipids processed through the Golgi apparatus after infection with herpes simplex virus 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2798-802.
197. Yeaman, C., et al., *Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(2): p. 106-12.

198. Yin, D.M., et al., *Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus.* J Neurosci, 2008. **28**(35): p. 8832-43.
199. Bisbal, M., et al., *Protein kinase d regulates trafficking of dendritic membrane proteins in developing neurons.* J Neurosci, 2008. **28**(37): p. 9297-308.
200. Sabesin, S.M. and S. Frase, *Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine.* J Lipid Res, 1977. **18**(4): p. 496-511.
201. Canty, E.G. and K.E. Kadler, *Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 7): p. 1341-53.
202. Polishchuk, E.V., et al., *Mechanism of constitutive export from the golgi: bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains.* Mol Biol Cell, 2003. **14**(11): p. 4470-85.
203. Bhende, P.M., et al., *X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D.* J Virol, 2007. **81**(14): p. 7363-70.
204. Matthews, S.A., et al., *Essential role for protein kinase D family kinases in the regulation of class II histone deacetylases in B lymphocytes.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(4): p. 1569-77.
205. Grogan, E., et al., *Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(5): p. 1332-6.
206. Takada, K., et al., *trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment.* J Virol, 1986. **57**(3): p. 1016-22.
207. Mankouri, J., et al., *Release of Infectious Hepatitis C Virus from Huh7 Cells Occurs via a trans-Golgi Network-to-Endosome Pathway Independent of Very-Low-Density Lipoprotein Secretion.* J Virol, 2016. **90**(16): p. 7159-70.
208. Gabel, C.A., et al., *Varicella-zoster virus glycoprotein oligosaccharides are phosphorylated during posttranslational maturation.* J Virol, 1989. **63**(10): p. 4264-76.
209. Brunetti, C.R., et al., *Herpes simplex virus glycoprotein D acquires mannose 6-phosphate residues and binds to mannose 6-phosphate receptors.* J Biol Chem, 1994. **269**(25): p. 17067-74.



210. Brunetti, C.R., et al., *Role of mannose-6-phosphate receptors in herpes simplex virus entry into cells and cell-to-cell transmission*. J Virol, 1995. **69**(6): p. 3517-28.
211. Guedan, A., et al., *Investigation of the Role of Protein Kinase D in Human Rhinovirus Replication*. J Virol, 2017. **91**(9).
212. Arita, M., et al., *Oxysterol-binding protein family I is the target of minor enviroxime-like compounds*. J Virol, 2013. **87**(8): p. 4252-60.
213. Arita, M., *Phosphatidylinositol-4 kinase III beta and oxysterol-binding protein accumulate unesterified cholesterol on poliovirus-induced membrane structure*. Microbiol Immunol, 2014. **58**(4): p. 239-56.
214. Albulescu, L., et al., *Broad-range inhibition of enterovirus replication by OSW-1, a natural compound targeting OSBP*. Antiviral Res, 2015. **117**: p. 110-4.
215. Strating, J.R., et al., *Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein*. Cell Rep, 2015. **10**(4): p. 600-15.
216. Arita, M., T. Wakita, and H. Shimizu, *Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infectivity*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 10): p. 2518-30.
217. Arita, M., T. Wakita, and H. Shimizu, *Cellular kinase inhibitors that suppress enterovirus replication have a conserved target in viral protein 3A similar to that of enviroxime*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 8): p. 1869-79.
218. Spickler, C., et al., *Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is essential for replication of human rhinovirus and its inhibition causes a lethal phenotype in vivo*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(7): p. 3358-68.
219. van der Schaar, H.M., et al., *A novel, broad-spectrum inhibitor of enterovirus replication that targets host cell factor phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta*. Antimicrob Agents Chemother, 2013. **57**(10): p. 4971-81.
220. Belov, G.A., et al., *Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA*. J Virol, 2007. **81**(2): p. 558-67.
221. Dorobantu, C.M., et al., *GBF1- and ACBD3-independent recruitment of PI4KIIIbeta to replication sites by rhinovirus 3A proteins*. J Virol, 2015. **89**(3): p. 1913-8.
222. Van Lint, J., et al., *Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(4): p. 193-200.

223. Harikumar, K.B., et al., *A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(5): p. 1136-46.
224. Ochi, N., et al., *Protein kinase DI promotes anchorage-independent growth, invasion, and angiogenesis by human pancreatic cancer cells*. *J Cell Physiol*, 2011. **226**(4): p. 1074-81.
225. Borges, S., et al., *Effective Targeting of Estrogen Receptor-Negative Breast Cancers with the Protein Kinase D Inhibitor CRT0066101*. *Mol Cancer Ther*, 2015. **14**(6): p. 1306-16.
226. LaValle, C.R., et al., *Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1806**(2): p. 183-92.

## Annexe 1 : Génome du VHS-1

Tableau IV. Liste des gènes du VHS-1 et leurs principales caractéristiques

Gène	Protéine	Cinétique d'expression	Localisation dans le virion extracellulaire	Fonctions	Gène conservé chez les <i>Herpesviridae</i>
<b>RL1</b>	ICP34.5	$\gamma 1$	Tégument	Module la synthèse des protéines en se liant à la phosphatase 1 $\alpha$	Non
<b>RL2</b>	ICP0	$\alpha$	Tégument	Transactivateur de proximité avec des domaines d'ubiquitine ligase E3	Non
<b>UL1 *</b>	gL	$\gamma$	Enveloppe	Glycoprotéine; forme un complexe avec gH; impliquée dans l'entrée, la sortie et la propagation d'une cellule à l'autre	Oui
<b>UL2</b>	Uracil-DNA glycosylase (UNG)	$\beta$	Absent	Métabolisme des acides nucléiques	Oui
<b>UL3</b>	pUL3	$\gamma 2$	Absent	Phosphoprotéine nucléaire	Non
<b>UL4</b>	pUL4	$\gamma 2$	Absent	Protéine nucléaire; colocalise avec UL3 et ICP22	Non
<b>UL5 *</b>	DNA helicase-primase (HP1)	$\beta$	Absent	Réplication de l'ADN; membre du complexe hélicase/primase	Oui
<b>UL6 *</b>	Portal (PORT)	$\gamma$	Capside	Encapsidation de l'ADN; sous-unité du complexe portal	Oui
<b>UL7</b>	EEP	$\gamma 1$	Tégument	Encapsidation de l'ADN?	Oui
<b>UL8 *</b>	DNA helicase primase (HP3)	$\beta$	Absent	Réplication de l'ADN; membre du complexe hélicase/primase	Oui
<b>UL9 *</b>	ORI-B	$\beta$	Absent	Protéine de liaison à l'origine de réplication de l'ADN	Non
<b>UL10</b>	gM	$\gamma 2$	Enveloppe	Glycoprotéine; propagation d'une cellule à l'autre	Oui

<b>UL11</b>	CETP	$\gamma 1$	Tégument/enveloppe ?	Protéine myristoylée; sortie du virus	Oui
<b>UL12</b>	Deoxyribonuclease (NUC)	$\beta$	Absent	Métabolisme des acides nucléiques; exonucléase d'ADN; nucléase alcaline	Oui
<b>UL13</b>	Tegument serine/threonine protein kinase (VPK)	$\gamma$	Tégument	Activité kinase	Oui
<b>UL14</b>	ECP	$\gamma 2$	Tégument	Molécule chaperone	Oui
<b>UL15 *</b>	DNA packaging terminase subunit 1 (TER1)	$\gamma$	Capside	Encapsidation de l'ADN; sous-unité du complexe portal	Oui
<b>UL16</b>	CETPbp	$\gamma 1$	Tégument	Encapsidation de l'ADN?	Oui
<b>UL17 *</b>	CTTP	$\gamma$	Capside	Encapsidation de l'ADN; associée aux capsides B et C	Oui
<b>UL18 *</b>	VP23	$\gamma 1$	Capside	Assemblage de la capside; forme un triplex avec VP19C	Oui
<b>UL19 *</b>	VP5, ICP5, Major capsid protein (MCP)	$\gamma 1$	Capside	Assemblage de la capside	Oui
<b>UL20</b>	pUL20	$\gamma 1$	Enveloppe	Sortie du virus	Non
<b>UL21</b>	CEF2	$\gamma 1$	Tégument	Associée aux microtubules	Non
<b>UL22 *</b>	gH	$\gamma 2$	Enveloppe	Glycoprotéine; forme un complexe avec gL; impliquée dans l'entrée, la sortie et la propagation d'une cellule à l'autre	Oui
<b>UL23</b>	Thymidine kinase (TK)	$\beta$	Tégument	Activation sélective de l'acyclovir et du ganciclovir	Non
<b>UL24</b>	pUL24	$\gamma 1$	?	Protéine non glycosylée associée à la membrane	Oui
<b>UL25*</b>	PCP	$\gamma 2$	Capside	Encapsidation de l'ADN	Oui
<b>UL26 *</b>	VP21 et VP24	$\gamma$	Absent (VP21); Capside (VP24)	Assemblage de la capside; protéase sérine (son propre clivage résulte en les protéases VP24 et VP21)	Oui
<b>UL26.5 *</b>	VP22a, ICP35	$\gamma$	Absent	Assemblage de la capside; protéine	Oui

				d'échafaudage; clivé de la capsid après l'encapsidation de l'ADN	
<b>UL27 *</b>	gB, VP7	$\gamma 1$	Enveloppe	Glycoprotéine; forme un dimère; essentielle pour l'entrée	Oui
<b>UL28 *</b>	ICP18.5, DNA packaging terminase subunit 2 (TER2)	$\gamma$	Capsid	Encapsidation de l'ADN; liaison à l'ADN spécifique au pac-motif	Oui
<b>UL29 *</b>	ICP8, Single- stranded DNA- binding protein (SSB)	$\beta$	?	Réplication de l'ADN	Oui
<b>UL30 *</b>	DNA polymerase (POL)	$\beta$	?	Réplication de l'ADN; sous-unité catalytique de l'ADN polymérase	Oui
<b>UL31</b>	Nuclear egress lamina protein (NELP)	$\gamma 2$	Tégument	Interagit avec UL34; protéine de liaison à la matrice nucléaire; sortie du noyau	Oui
<b>UL32 *</b>	CTNP	$\gamma 2$	?	Encapsidation de l'ADN	Oui
<b>UL33 *</b>	TERbp	?	Capsid	Encapsidation de l'ADN	Oui
<b>UL34</b>	Nuclear egress membrane protein (NEMP)	$\gamma 1$	Enveloppe	Protéine membranaire de type II; associée avec la membrane nucléaire interne; sortie du noyau	Oui
<b>UL35</b>	VP26, Small capsid protein (SCP)	$\gamma 2$	Capsid	Assemblage de la capsid; placée sur les pointes des hexons de la capsid	Oui
<b>UL36 *</b>	ICP1/2, VP1/2, Large tegument protein (LTP)	$\gamma 2$	Tégument	Plus grande protéine du tégument; impliquée dans la sortie du virus	Oui
<b>UL37 *</b>	ICP32, LTPbp	$\gamma 1$	Tégument	Possède un signal d'exportation nucléaire; impliquée dans la sortie	Oui
<b>UL38 *</b>	VP19C	$\gamma 2$	Capsid	Assemblage de la capsid; membre du	Oui

				triplex intercapsomérique	
<b>UL39</b>	ICP6, Ribonucleotide reductase subunit 1 (RR1)	$\beta$	?	Métabolisme des acides nucléiques; grande sous-unité de la ribonucleotide réductase; activité kinase	Oui
<b>UL40</b>	Ribonucleotide reductase subunit 2 (RR2)	$\beta$	?	Petite sous-unité de la ribonucleotide réductase	Non
<b>UL41</b>	Virion host shutoff protein (VHS)	$\gamma 1$	Tégument	Dégradation de l'ARNm	Non
<b>UL42 *</b>	DNA polymerase processivity subunit (PPS)	$\beta$	?	Réplication de l'ADN; sous-unité accessoire de l'ADN polymérase	Oui
<b>UL43</b>	pUL43, NEMP	$\gamma 1$	Enveloppe	Protéine associée à la membrane	Non
<b>UL44 *</b>	gC, VP8	$\gamma 2$	Enveloppe	Participe à l'adsorption; attachement à la cellule	Non
<b>UL45</b>	pUL45	$\gamma 2$	Enveloppe	Protéine membranaire de type II	Non
<b>UL46</b>	VP11/12	$\gamma 1$	Tégument	Régule/Intéragit avec UL48	Non
<b>UL47</b>	VP13/14	$\gamma 2$	Tégument	Stimule l'expression des gènes précoces immédiats; lie l'ARN	Non
<b>UL48 *</b>	VP16, $\alpha$ TIF	$\gamma 1$	Tégument	Stimule l'expression des gènes précoces immédiats	Non
<b>UL49</b>	VP22	$\gamma 1$	Tégument	Impliquée dans le trafic intercellulaire	Non
<b>UL49.5</b>	gN	$\gamma 2$	Enveloppe	Petite protéine associée à la membrane; forme un complexe avec gM; stimule la fusion de la membrane	Oui
<b>UL50</b>	Deoxyuridine triphosphatase (dUTPase)	$\beta$	Tégument ?	Métabolisme des acides nucléiques	Oui
<b>UL51</b>	CEF1	$\gamma 1$	Tégument	Protéine palmitoylée; associée avec le Golgi	Oui

<b>UL52 *</b>	DNA helicase-primase (HP2)	$\beta$	?	Réplication de l'ADN; membre du complexe hélicase-primase	Oui
<b>UL53</b>	gK	$\gamma 1$	Enveloppe	Sortie du virus; formation de syncytium	Non
<b>UL54 *</b>	ICP27, MRE	$\alpha$	Enveloppe	Régulation de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel; inhibe l'épissage de l'ARNm	Oui
<b>UL55</b>	pUL55	$\gamma 2$	Tégument	Protéine liant la matrice nucléaire	Non
<b>UL56</b>	pUL56	$\gamma 2$	Enveloppe	Protéine membranaire de type II; associée avec le Golgi et les endosomes précoces	Non
<b>RS1 *</b>	ICP4	$\alpha$	Tégument	Régulation des gènes; protéine régulatrice majeure	Non
<b>US1</b>	ICP22	$\alpha$	?	Régulation des gènes; stimule l'expression des gènes tardifs	Non
<b>US2</b>	pUS2	$\gamma 2$	Tégument	Interagit avec la cytokératine	Non
<b>US3</b>	US3 PK	$\beta$	Tégument	Protéine kinase avec activité anti-apoptotique	Non
<b>US4</b>	gG	$\gamma 1$	Enveloppe	Impliquée dans l'entrée et la sortie du virus	Non
<b>US5</b>	gJ	$\gamma$	Absent	Glycoprotéine; impliquée dans la protection contre l'apoptose induite par Fas	Non
<b>US6 *</b>	gD	$\gamma 1$	Enveloppe	Nécessaire à l'entrée; se lie au médiateur d'entrée des <i>Herpesvirus</i>	Non
<b>US7</b>	gI	$\gamma$	Enveloppe	Forme un complexe avec gE; propagation d'une cellule à une autre	Non
<b>US8</b>	gE	$\gamma 2$	Enveloppe	Forme un complexe avec gI; activité du récepteur Fc;	Non

				propagation d'une cellule à une autre	
<b>US9</b>	pUS9	$\gamma$	Enveloppe	Protéine membranaire de type II; transport antérograde de la glycoprotéine d'enveloppe?	Non
<b>US10</b>	pUS10	$\gamma 1$	Tégument	Étroitement associée aux capsides	Non
<b>US11</b>	pUS11	$\gamma 2$	Tégument	Activité de liaison à l'ARN; activité de trafic intercellulaire	Non
<b>US12</b>	ICP47, TAP transporter inhibitor (TAPbp)	$\alpha$	?	Contrôle la réponse immunitaire; protéine de liaison au TAP; impliquée dans la régulation négative du CMH de classe I	Non

$\alpha$ : gène précoce immédiat.  $\beta$ : gène précoce.  $\gamma 1$ : gène tardif fuyant.  $\gamma 2$ : gène vrai tardif. (\*): Ces gènes sont nécessaires à la réplication du virus *in vitro*. (?): Inconnu ou incertain. Adapté de [36, 40] et [http://people.virginia.edu/~jcb2g/background\\_genome.html](http://people.virginia.edu/~jcb2g/background_genome.html).