Université de Montréal

Rôle du complexe LINC dans la propagation du virus de l'herpès simplex de type 1

Par

Kendra Cruz Palomar

Département de Microbiologie, immunologie et infectiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)

en Microbiologie et immunologie

Octobre 2020

© Kendra Cruz Palomar, 2020

Université de Montréal

Unité académique : Département de Microbiologie, immunologie et infectiologie, Faculté de Médecine

---

Ce mémoire intitulé

Rôle du complexe LINC dans la propagation du virus de l'herpès simplex de type 1

Présenté par

Kendra Cruz Palomar

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Guy Lemay
Président-rapporteur

Roger Lippé
Directeur de recherche

Sébastien Carréno
Membre du jury

Résumé

Le VHS-1 est un modèle très utilisé pour l'étude du cycle viral et des interactions hôte-pathogène des *Herpesvirdidae*, en partie dû à sa capacité de se répliquer de façon rapide dans plusieurs types cellulaires. La transcription, réplication de l'ADN et la formation des capsides de ce virus se produisent dans le noyau cellulaire. Une fois les capsides formées, elles doivent sortir du noyau pour continuer le cycle. Cependant, les capsides sont trop grandes (125 nm) pour passer à travers les pores nucléaires, dont la taille d'exclusion est de 40 nm, et elles entament alors un processus d'enveloppement dé-enveloppement à travers les deux membranes nucléaires. Le complexe LINC (de l'anglais Linker of the Nucleoskeleton and Cytoskeleton) est un complexe qui se retrouve dans les membranes nucléaires et l'espace périnucléaire. Il sert de liaison entre le noyau et le cytoplasme et, parmi ses fonctions on retrouve le maintien d'un espace périnucléaire constant, le positionnement du noyau et la transmission de forces entre le noyau et le cytoplasme. Le complexe LINC est composé par les protéines de la famille SUN et par les protéines de la famille KASH, qui interagissent physiquement l'une avec l'autre. L'implication du complexe LINC dans la propagation du virus de la pseudo-rage (PrV) a déjà été démontrée. Étant donné que le PrV fait partie de la même famille de virus que le VHS-1, notre hypothèse est que le complexe LINC joue aussi un rôle dans la propagation du VHS-1. Mes travaux démontrent que la surexpression d'une forme négative dominante de SUN2 ou sa déplétion montre un effet proviral sur la propagation du VHS-1. Ce résultat diffère de ce qui a été précédemment constaté pour le PrV en ce sens que SUN2 est antiviral pour le PrV. Ceci confirme notre hypothèse, mais démontre un scénario plus complexe qu'anticipé.

Mots-clés : VHS-1, enveloppe nucléaire, SUN, KASH, surexpression et déplétion des protéines, propagation virale.

Abstract

HSV-1 is widely used to study viral cycles and host-pathogen interactions of *Herpesvirdidae*, because it replicates quickly and efficiently in many cells types. The transcription, replication and capsid assembly of HSV-1 take place in the nucleus of the infected cell. The assembled HSV-1 capsid must exit the nucleus to continue the viral cycle. The nuclear membranes constitute a barrier for the nuclear egress of nucleocapsids (125 nm) given the exclusion size of the nuclear pores is approximately 40 nm. The nucleocapsids therefore pass through the nuclear membranes by an envelopement-deenvelopement process. The capsids acquire an envelope from the inner nuclear membrane when they are released into the perinuclear space. This primary viral envelope then fuses with the outer nuclear membrane, enabling the capsid to reach the cytoplasm. Situated between the two nuclear membranes is the linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex. It is involved in the maintenance of the perinuclear space, nuclear positioning and force transmission between the nucleus and the cytoplasm. The LINC complex is composed of two families of proteins, SUN and KASH proteins. SUN proteins are found in the inner nuclear membrane, their N-terminal interacts with the nucleoskeleton and the C-terminal includes a conserved domain, the SUN domain, which interacts in the perinuclear space with the conserved domain of KASH proteins. The implication of the LINC complex in the propagation of the pseudorabies virus (PrV), a member of the alphaherpesviruses, has already been demonstrated. Since PrV is part of the same family as HSV-1, we hypothesized it may also play a role in HSV-1 propagation. My work shows that overexpression of a dominant negative form of SUN2 or its depletion shows a proviral effect on HSV-1 propagation. This result differs to what has been previously found for PrV, where SUN2 displays an antiviral phenotype. This work confirms our hypothesis but reveals a more complex scenario than anticipated.

Keywords : HSV-1, nuclear envelope, SUN, KASH, protein overexpression and depletion, viral propagation.

Table des matières

Résumé 3

Abstract 4

Table des matières 5

Liste des tableaux 9

Liste des figures 10

Liste des sigles et abréviations 11

Remerciements 15

Chapitre 1 – Introduction 16

1.1 Le virus de l'herpès simplex de type 1 16

1.1.1 Caractéristiques biologiques des Herpesviridae 16

1.1.1.1 Sous-familles 17

1.1.2 Épidémiologie et pathogénicité du VHS-1 19

1.1.2.1 Traitement 20

1.1.3 La structure du virion VHS-1 23

1.1.3.1 L'organisation génomique 23

1.1.3.2 La capside 25

1.1.3.3 Le tégument 25

1.1.3.4 L'enveloppe 26

1.1.4 Le cycle viral du VHS-1 26

1.1.4.1 L'attachement et l'entrée 27

1.1.4.2 L'expression des gènes viraux et la réplication du génome 29

1.1.4.3 L'assemblage des nucléocapsides 31

1.1.4.4 La sortie du noyau 33

1.1.4.4.1 L'enveloppement primaire 33

1.1.4.4.2 Le déenvelopement 34

1.1.4.5 L'acquisition du tégument, l'enveloppement secondaire et la propagation du virus 35

1.2 L'enveloppe nucléaire 38

1.2.1.1 Protéines de l'enveloppe nucléaire 38

1.2.1.2 Maintien de l'enveloppe nucléaire et connexions noyau-cytoplasme 40

1.2.2 Le complexe LINC 41

1.2.2.1 Protéines KASH 42

1.2.2.1.1 Nesprine-1 et nesprine-2 43

1.2.2.1.2 Nesprine-3, Nesprine 4, KASH5 et Jaw1 43

1.2.2.2 Protéines SUN 44

1.2.2.2.1 SUN3, SUN4 et SUN5 46

1.2.2.2.2 SUN1 et SUN2 47

1.2.2.3 Structure et interaction des domaines SUN-KASH 48

1.2.2.4 Fonctions du complexe LINC 51

1.2.2.4.1 Morphologie nucléaire et maintien de l'espace périnucléaire 52

1.2.2.4.2 Positionnement nucléaire 52

1.2.2.4.3 Mécanotransduction, transport nucléaire et organisation et morphologie cellulaires 53

1.2.2.4.4 Réparation des dommages à l'ADN et division cellulaire 54

1.2.2.4.5 Fonctions propres à SUN1 54

1.2.2.4.6 Fonctions propres à SUN2 55

1.2.2.5 Le complexe LINC et les maladies humaines 55

1.2.2.6 Le complexe LINC et les virus.....56

Chapitre 2 – Hypothèse et objectif 58

Chapitre 3 – Matériel et méthodes.....59

3.1 Plasmides.....59

3.2 Transfection transitoire.....60

3.3 Sélection clonale 60

3.4 Lignées cellulaires.....60

3.4.1 RK 13 WT, GFP-luSUN1 et RK 13 GFP-luSUN2.....60

3.4.2 Établissement des lignées 143B GFP-luSUN1, 143B GFP-luSUN2 et 143B mCherry61

3.5 Traitement aux dsiARN.....63

3.6 RT-qPCR 63

3.7 Virus et infections.....64

3.8 FACS.....64

3.9 Immunofluorescence 65

3.10 Immunobuvardage 65

3.11 Anticorps 66

3.12 Essais de plaque 66

3.13 Immuno-précipitation 67

3.14 Statistiques 67

3.15 Remerciements 68

Chapitre 4 – Résultats 69

4.1. Surexpression des protéines GFP-luSUN1 et GFP-luSUN2.....69

4.2. L'induction de l'expression de GFP-luSUN1 ou SUN2 dans des cellules 143B n'affecte pas la propagation du virus 70

4.3. Le complexe LINC est impliqué dans la propagation du VHS-1 dans la lignée RK 13 75

4.4. Une faible expression des mutants dominants négatifs ne produit pas d'impact sur le VHS-1.....79

4.5. La déplétion de SUN2 a une tendance provirale 81

Chapitre 5 – Discussion 84

Chapitre 6 – Conclusion.....88

Références bibliographiques.....89

Annexes 112

Liste des tableaux

Tableau 1. – Les neuf herpèsvirus humains 19

Tableau 2. – Amorces pour assemblage de Gibson 62

Tableau 3. – Amorces pour qPCR 64

Annexe 1. – Protéines du virion du VHS-1 114

Liste des figures

Figure 1. – Structure du virion du VHS-1 23
Figure 2. – Organisation du génome du VHS-1 24
Figure 3. – Cycle viral du VHS-1 27
Figure 4. – Adhésion et entrée du VHS-1 dans les cellules 29
Figure 5. – Produits dérivés des protéines d'échafaudage 32
Figure 6. – Formation et types de capsides VHS-1 33
Figure 7. – Enveloppement – déenveloppement du VHS-1 à l'EN 35
Figure 8. – Parcours du VHS-1 jusqu'à son relâchement 37
Figure 9. – Modèles de transport des protéines à la MNI 40
Figure 10. – Les protéines SUN et KASH à l'EN 42
Figure 11. – Les protéines KASH à l'EN 44
Figure 12. – Les protéines de la famille SUN dans l'enveloppe nucléaire 45
Figure 13. – Le complexe hexamérique SUN-KASH 50
Figure 14. – Les protéines SUN s'assemblent sous forme de trimère pour donner leur forme active 51
Figure 15. – Schéma des protéines GFP-luSUN1 et GFP-luSUN2 59
Figure 16. – Schéma de l'établissement des lignées 143B par transduction lentiviral 62
Figure 17. – Lignées inductibles GFP-luSUN1 et GFP-luSUN2 72
Figure 18. – Les lignées cellulaires stables sont sensibles à l'infection par le VHS-1 75
Figure 19. – Lignées cellulaires RK 13 stables 76
Figure 20. – Les lignées cellulaires stables RK 13 sont susceptibles à l'infection par le VHS-1 79
Figure 21. – Lignées 143B à fort et à faible taux d'expression 80
Figure 22. – Déplétion des protéines endogènes SUN1 ou SUN2 82

Liste des sigles et abréviations

BGS : de l'anglais *bovine growth serum*

CC : de l'anglais *Coiled Coil*

CCID50 : dose infectieuse 50 en culture cellulaire

CMV : cytomégalovirus

CRCHUSJ : Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine

CVSC : de l'anglais *capsid vertex-specific component*

DMED : Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss

DMEM : de l'anglais *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DPI : de l'anglais *days post infection*

dsiARN : de l'anglais *Dicer-substrate short interfering RNA*

ECP : effet cytopathogène

EN : enveloppe nucléaire

EPN : espace périnucléaire

ESCRT : de l'anglais *endosomal sorting complexes required for transport*

FBS : de l'anglais *fetal bovine serum*

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HCF-1 : facteur 1 de la cellule hôte

HPI : de l'anglais *hours post infection*

HVEM : de l'anglais *herpesvirus entry mediator*

ICP : de l'anglais *infected cell protein*

IE : de l'anglais *immediate-early*

IF : immunofluorescence

INM-SM : de l'anglais *Inner Nuclear Membrane-Sorting Motif*

IRIC : Institut de recherche en immunologie et en cancérologie

KASH : Klarsicht, ANC-1, Syne homology

LAP : de l'anglais *lamina-associated proteins*

LBR : de l'anglais *lamin B receptor*

LECA : de l'anglais *last eukaryote common ancestor*

LINC : de l'anglais *Linker of the Nucleoskeleton and Cytoskeleton*

LRMP : de l'anglais *Lymphoid-restricted membrane protein*

MAG : de l'anglais *Myelin-associated glycoprotein*

MNE : membrane nucléaire externe

MNI : membrane nucléaire interne

NAE : de l'anglais *nucleus associated endosomes*

NEC : de l'anglais *nuclear egress complex*

Nesprine : de l'anglais *nuclear envelope spectrin repeat protein*

NI : non infecté

NMHC-IIA : de l'anglais *Non-muscle myosin heavy chain IIA*

Oct-1 : de l'anglais *octamer-binding protein 1*

ORF : de l'anglais *open reading frame*

PILR : de l'anglais *immunoglobulin-like type 2 receptor alpha*

PrV : virus de la pseudorage

RE : réticulum endoplasmique

SEM : de l'anglais *standard error of the mean* (erreur type de la moyenne)

SLN : signal de localisation nucléaire

SUN : Sad1, UNC-84

TAN : de l'anglais *Transmembrane actin-associated nuclear*

TGN : de l'anglais *trans Golgi network*

TK : thymidine kinase

UFP : unités formatrices de plages

VHS : virus de l'herpès simplex

VHS-1 : virus de l'herpès simplex de type 1

VHS-2 : virus de l'herpès simplex de type 2

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VIS : virus de l'immunodéficience simienne

VLM : virus de la leucémie murine

VP : de l'anglais *virion protein*

VVZ : virus varicelle-zona

A mi abuelo

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Roger Lippé, pour son grand soutien dans les moments difficiles, son infinie patience lorsqu'il semblait que les cellules ne pousseraient jamais, et surtout pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir donné une occasion unique de réaliser mes rêves. Je remercie aussi infiniment tous mes partenaires de laboratoire pour le merveilleux environnement de travail. Mackenzie et Catherine, nous avons commencé ensemble une maîtrise qui a été une course d'obstacles du début à la fin, mais les rires avec les moments de mime et de télépathie pour me faire comprendre en anglais et les merveilleux dessins du mois aident à surmonter toute éventualité. Un grand merci aussi à Bita, Hugo et Mayerline, qui ont répondu à mes mille et une questions, et bien sûr à Josiane, qui remplit toujours le laboratoire de vitalité. Johanne et Marie Josée, je ne sais même pas par où commencer, sans votre aide précieuse, je serais encore perdue. Merci beaucoup pour toute votre aide et vos encouragements, merci pour chaque petit détail. Merci également au personnel du CRCHUSJ, qui a toujours été gentil avec moi et m'a encouragé en me voyant travailler sans relâche.

Je tiens également à remercier ma famille, qui a toujours cru en moi et qui, malgré la distance, a toujours été là pour me soutenir, me faisant sentir qu'elle est toujours à mes côtés. Merci aussi à mes amies, qui m'ont montré que ma maison sera toujours avec elles, peu importe le temps que je passe éloignée d'elle.

Last but not least, merci à tous ceux qui m'ont accompagné durant mon voyage. Merci au meilleur coloc que je n’aurai jamais, à mon pilote préféré, à mon chez-moi au Québec, à ma psychologue personnelle, mille mercis à vous tous de vivre cette aventure à mes côtés.

Chapitre 1 – Introduction

1.1 Le virus de l'herpès simplex de type 1

Historiquement, l'appartenance des virus à la famille des Herpesviridae est basée sur sa structure ; ils possèdent tous une capside icosaédrique contenant le matériel génétique, une couche de tégument et une membrane lipidique (1-3). La taille des capsides varie peu entre les différents virus de cette famille, ce qui suggère qu'elle a évolué pour contenir le génome (ADN linéaire double brin) du plus grand virus de la famille. La membrane lipidique semble avoir pour origine des membranes cellulaires modifiées et l'on y trouve diverses glycoprotéines, qui varient entre les différents membres de la famille, allant jusqu'à 12 glycoprotéines dans le cas du virus de l'herpès simplex (VHS) (2-5).

1.1.1 Caractéristiques biologiques des Herpesviridae

Outre les éléments structuraux communs aux Herpesviridae, cette famille de virus partagent aussi plusieurs propriétés biologiques, notamment (2, 3) :

→ L'utilisation d'une ample variété d'enzymes impliquées dans le métabolisme des acides nucléiques, la synthèse de l'ADN et la maturation des protéines, ce qui varie d'un virus à l'autre.

→ La synthèse de l'ADN et l'assemblage des capsides ont lieu au noyau.

→ La libération de la nouvelle progénie virale se solde par la destruction de la cellule infectée.

→ Ils sont capables d'établir une latence dans leurs hôtes, de façon à ce que les cellules qui portent le virus latent présentent le génome viral sous forme de molécule circulaire. Lorsqu'il est en état de latence, le virus exprime principalement des miARN, alors qu'un faible niveau de certaines protéines est détectable (6, 7). Le mécanisme de réactivation n'est pas encore complètement compris et il pourrait différer d'un virus à l'autre.

Malgré ces ressemblances, il y a nombreuses propriétés biologiques sur lesquelles les membres de cette famille diffèrent. En effet, certains virus de la famille ont un éventail d'hôtes très large, pendant que d'autres sont beaucoup plus restreints. La rapidité du cycle lytique est aussi très

variable et, malgré la capacité de tous ces virus à rester en latence, les cellules où ils l'établissent ne sont pas les mêmes (3).

1.1.1.1 Sous-familles

Génétiquement, les Herpesviridae sont divisés en trois groupes faiblement apparentés entre eux : les virus des mammifères, oiseaux et reptiles, les virus des poissons et le virus infectant les bivalves. Ceci a mené à une actualisation de la taxonomie de l'ancienne famille des Herpesviriade, maintenant devenue l'ordre des Herpesvirales. La nouvelle famille des Herpesviridae conserve les virus des mammifères, oiseaux et reptiles et se divise en trois sous-familles (**Tableau 1**) (4, 8):

1. Alphaherpesvirinae. Ils ont une gamme d'hôtes diverse et sont caractérisés par une infection rapide et efficiente, avec un cycle relativement court. Ils progressent rapidement en culture, détruisant rapidement les cellules infectées. La latence est établie principalement, mais non exclusivement, dans les neurones des ganglions sensitifs. Ici s'incluent, entre autres, les genres simplexvirus et varicellovirus.
2. Betaherpesvirinae. La gamme d'hôtes de cette sous-famille est limitée. Son cycle est long et ils progressent lentement en culture, avec un élargissement des cellules infectées. La latence est établie normalement dans les glandes sécrétoires, les cellules lymphoréticulaires ou les reins.
3. Gammaherpesvirinae. Expérimentalement, ces virus sont limités aux hôtes qu'ils infectent de façon naturelle, étant spécifiques des lymphocytes T ou B. La latence est établie dans le tissu lymphoïde.

Nom courant	Abréviation couramment utilisée	Nomenclature internationale approuvée	Sous-famille	Manifestations fréquentes lors d'une primo-infection	Sites de latence	Exemples de manifestations lors de la réactivation
Virus de l'herpès simplex de type 1	VHS-1	HHV-1	α	Lésions mucocutanées (principalement orofaciales)	Ganglions sensoriels	Lésions mucocutanées récurrentes (principalement

						orofaciales), encéphalite
Virus de l'herpès simplex de type 2	VHS-2	HHV-2	α	Lésions mucocutanées (principalement génitales)	Ganglions sensoriels	Lésions mucocutanées récurrentes (principalement génitales), méningites récurrentes
virus varicelle-zona	VVZ	HHV-3	α	Varicelle	Ganglions sensoriels	Varicelle chez l'enfant ; zona chez l'adulte
Cytomegalovirus	CMV	HHV-5	β	Asymptomatique, syndrome infectieux de type mononucléose, infection congénitale du fœtus	Cellules mononucléaires, cellules épithéliales	Syndrome CMV non spécifique, rétinite, œsophagite, colite, hépatite, pneumonie
Herpèsvirus humain 6A	HVH-6A	HHV-6A	β	Roseola infantum (exanthème subitum)	Cellules T	Encéphalite
Herpèsvirus humain 6B	HVH-6B	HHV-6B	β			
Herpèsvirus humain 7	HVH-7	HHV-7	β	Semblable au HHV-6?, pityriasis rosea ?	Cellules T	?
Virus d'Epstein Barr	VEB	HHV-4	γ	Mononucléose infectieuse asymptomatique (fièvre glandulaire)	Cellules B	Lymphomes, syndrome lymphoprolifératif post-greffe, carcinome nasopharyngien, leucoplasie chevelue buccale

Herpès-virus lié au sarcome de Kaposi	HVSK	HHV-8	γ	Asymptomatique	Lymphocytes	Sarcome de Kaposi, lymphome primaire d'effusion, maladie multicentrique de Castleman

Tableau 1. – Les neuf herpèsvirus humains. Adapté de (9).

1.1.2 Épidémiologie et pathogénicité du VHS-1

Les herpèsvirus remontent à des centaines de millions d'années et sont le parfait exemple de co-divergence virale. Dans le cas spécifique du VHS-1, une divergence de son ancêtre de la sous-famille des Alphaherpesvirinae s'est produite quand les humains ont divergé de son ancêtre commun avec les chimpanzés, il y a 6 millions d'années (10). Comme tous les herpèsvirus, le VHS-1 provoque rarement une maladie grave chez les hôtes immunocompétents (11). L'affection causée par le VHS est décrite depuis la Grèce antique et l'on retrouve des mentions tout au long de l'histoire, notamment dans le roman de Shakespeare Roméo et Juliette (12, 13). Cependant, ce n'est qu'en 1920 que le VHS-1 et le VHS-2 ont été considérés comme des agents pathogènes différents, grâce aux hypothèses du médecin allemand Lipschutz (14). Des données validant cette hypothèse ont été obtenues en 1962 quand Schneweiss a découvert de grandes différences antigéniques entre le VHS-1 et le VHS-2 (15). En 1967, Nahmias et Dowdle ont identifié le VHS-1 comme l'agent causal des infections non-génitales (2, 16-18). Le VHS-1 atteint typiquement le visage, la bouche et les yeux, mais les localisations du VHS-2 et du VHS-1 peuvent se chevaucher, de sorte que certaines infections génitales sont causées par le VHS-1 et vice versa (19). Le VHS-1 est parmi les virus les plus abondants, il est distribué dans tous les continents, son taux d'infection étant similaire chez les hommes et les femmes (20).

La primo-infection du VHS-1 est généralement asymptomatique ou elle produit des symptômes bénins et elle est limitée au site d'infection (21). La transmission se produit normalement par contact direct avec des porteurs, symptomatiques ou pas, qui libèrent des particules virales à travers des lésions actives ou des sécrétions, principalement la salive, car la survie de ce virus sur

les surfaces est limitée (22, 23). La dose infectieuse pour qu'une transmission soit productive n'est pas encore connue, bien que certaines études ont établi qu'elle pourrait être autour de 10^4 $CCID_{50}$ (dose infectieuse 50 en culture cellulaire ou dilution virale avec action cytopathogène sur la moitié des cellules en culture) (17, 18, 22, 24-26). Comme pour tous les herpèsvirus, l'infection par le VHS-1 est une infection à vie (27). La transition d'une infection latente à une infection productive peut être due, entre autres causes, à l'exposition aux rayons ultraviolets, à la fièvre ou au stress psychologique (28, 29). L'infection de la muqueuse orofaciale est caractérisée par la destruction des cellules épithéliales, avec la formation de vésicules qui se brisent rapidement et donnent lieu à des lésions rougeâtres et douloureuses qui persistent pendant une moyenne de 12 jours (feux sauvages) (18, 22, 24). Quant aux infections oculaires, les plus communes sont les infections épithéliales de la cornée (30). Les infections cornéennes récurrentes provoquent la kératite herpétique, qui est la cause la plus fréquente de la cécité cornéenne (31, 32). Si la charge virale est trop élevée et/ou la personne infectée est immunodéprimée, le VHS-1 peut produire des complications dans le système nerveux central, telles que la paralysie de Bell, la perte soudaine d'audition et la névrite vestibulaire, ou le développement de l'encéphalite herpétique, sans toutefois qu'il soit encore établi si cette dernière est causée lors d'une infection primaire ou récurrente par le VHS-1 (22, 33-36). L'encéphalite herpétique est une maladie rare, qui affecte seulement 3 ou 4 individus par million d'habitants, quoique son taux de mortalité atteigne presque 20%. Elle touche généralement les personnes âgées de 50 à 70 ans avec des pathologies préexistantes telles que les maladies pulmonaires chroniques ou cérébrovasculaires (22, 37, 38). L'encéphalite herpétique est la cause la plus habituelle d'encéphalite virale chez les nourrissons et les enfants et, qu'elle soit traitée ou non, elle peut être associée à une mortalité notable (39). Chez les personnes dont la capacité immunitaire est compromise, des complications lors des réactivations fréquentes du virus peuvent survenir. Des exemples de ces complications sont la pneumonie ou l'œsophagite herpétique, l'érythème multiforme, l'eczéma herpétique ou l'hépatite (18, 19, 22, 24).

1.1.2.1 Traitement

La principale cible des traitements antiherpétiques est l'infection productive, et non pas, généralement, la prévention des récurrences (25, 40). La plupart de médicaments utilisés pour le

traitement du VHS-1 sont des analogues de nucléosides. Le premier, développé en 1960, était un analogue de la pyrimidine, l'idoxuridine, utilisée pour le traitement des kératites (41, 42). Dans les décennies suivantes, d'autres médicaments tels que la trifluorothymidine, la vidarabine et la brivudine, qui sont aussi des analogues de nucléosides, ont été approuvés (43-45). Cependant, ces derniers médicaments avaient une toxicité assez forte et une faible sélectivité (25). L'antiviral à faible toxicité et avec une sélectivité élevée qui est encore aujourd'hui l'antiviral de référence pour le traitement du VHS-1 et la recherche des médicaments antiherpétiques est l'acyclovir. Il est un analogue de la guanosine qui a été introduit en 1977 et a mérité à l'auteure de son développement, Gertrude Elion, le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1988 (25, 46, 47). Il est efficace contre le VHS-1, le VHS-2 et le virus varicelle-zona (VVZ) et, pour qu'il soit actif, il faut qu'il soit d'abord phosphorylé par la thymidine kinase virale (48-51). Ensuite, l'acyclovir monophosphate est phosphorylé par les kinases cellulaires pour donner sa forme active, triphosphate, qui est introduit dans l'ADN viral par l'ADN polymérase virale au lieu de la guanosine, causant la terminaison du brin et l'inhibition de la réplication virale (52-54). L'acyclovir est le principal médicament utilisé pour traiter le VHS vu son faible coût, sa tolérance et sa sécurité (55). Administré par voie orale, il a été démontré qu'il atténue les manifestations des infections labiales, mais seulement s'il est administré peu de temps après l'apparition des symptômes, réduisant ainsi la durée de la guérison de deux jours en moyenne (56). Alternativement, les infections actives de VHS peuvent également être traitées avec une application topique d'acyclovir, ce qui réduit le temps de récupération et la taille des lésions (57). L'administration intraveineuse de l'acyclovir utilisée dans les cas graves constitue le traitement initial de l'encéphalite herpétique (58-60). Cependant, ce médicament présente certains inconvénients, puisque sa solubilité dans l'eau est limitée, sa demi-vie dans le flux sanguin est courte et il a une faible biodisponibilité (61-64). Le valacyclovir, employé comme traitement à court terme pour les herpès labiaux ou génitaux, a été synthétisé pour augmenter cette biodisponibilité (25, 65). Parmi d'autres exemples de médicaments utilisés dans le traitement du VHS, on retrouve le famciclovir, qui est le promédicament du penciclovir, et la trifluridine, qui sont tous également des analogues nucléosidiques (66, 67). Le doconasol, un alcool gras saturé, est utilisé pour le traitement topique de l'herpès labial récurrent. Le mode d'action proposé pour

ce médicament est la prévention de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte (68).

L'administration des médicaments sur le court terme contre le VHS-1 n'induit pas l'apparition de résistances. La prévalence des résistances chez les personnes immunocompétentes varie entre le 0.3 et le 0.7% (69). En revanche, chez les personnes immunocompromises chez qui des traitements de long terme sont nécessaires, cette prévalence varie entre le 2.5 et le 25% (65). Les mécanismes de résistance les plus communs sont les mutations dans le gène qui code pour la kinase virale, *UL23*, ou, moins fréquemment, les mutations dans l'ADN polymérase virale (19, 65). Lors de l'apparition des résistances, une des alternatives est l'utilisation du foscarnet, un médicament employé pour le traitement du cytomégalovirus, qui est aussi efficace contre le VHS-1 et le VVZ (70). Parallèlement au développement de nouveaux médicaments, d'autres fronts de recherche visant la réduction de la prévalence du VHS dans la population sont ouverts. Plusieurs candidats de vaccins montrent des résultats prometteurs dans les modèles animaux, bien que jusqu'à présent il n'existe aucun vaccin préventif ni thérapeutique pour le VHS-1 ou 2 (71, 72). Le vaccin thérapeutique contribuerait grandement à limiter la propagation, car il ciblerait les personnes déjà infectées, réduisant non seulement la sévérité ou la fréquence des récurrences, mais aussi préviendrait ou réduirait la propagation virale lors des récurrences, avec ou sans symptômes (73). En plus, l'obtention d'un vaccin contribuerait grandement à réduire la transmission du virus des mères à leurs nouveau-nés, évitant ainsi de nombreuses infections mortelles (74). Un autre domaine prometteur est l'édition génétique. Le ciblage du génome des herpèsvirus avec des systèmes tels que, par exemple, CRISPR/Cas9, pourrait mener au clivage spécifique ou à l'induction d'une mutation létale dans l'ADN latent du virus, ce qui éviterait les infections récurrentes et mènerait, pour la première fois, à la guérison des patients atteints d'une infection au VHS (18, 19). Ainsi, dans le cadre d'une étude menée par Aubert *et coll.* (75) faisant appel à la modification génétique par les méga-nucléases (un type de nucléases dirigées, capables de couper spécifiquement le double brin d'ADN à un endroit préalablement défini) (76), des résultats encourageants en termes d'élimination du virus latent ont été obtenus chez la souris.

1.1.3 La structure du virion VHS-1

Les virions du VSH-1 ont un diamètre moyen compris entre 150 et 200 nm (bien que ces chiffres puissent varier selon les études), considérant les glycoprotéines qui dépassent de l'enveloppe (**Figure 1**) (25, 77-79). La nucléocapside occupe une position excentrique, d'un côté près du tégument et de l'autre à environ 30 nm de distance, et ne représente qu'un tiers du volume des virions, le tégument couvrant les deux tiers restants (77). Les virions comprennent près de cinquante protéines virales, qui contrôlent toutes les étapes du cycle viral (attachement, entrée, propagation et sortie) (**Annexe 1**) (80).

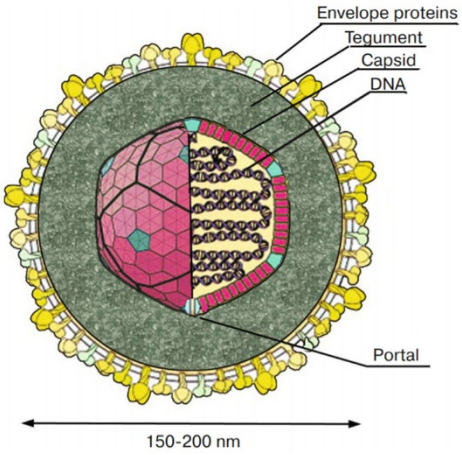

Figure 1. – Structure du virion du VHS-1. Les virions du VHS-1 comprennent une capside icosaédrique renfermant l'ADN linéaire double brin, une couche tégumentaire et une enveloppe virale ornée de glycoprotéines. Le diamètre de l'ensemble de ces composants est variable. Adaptée de (25).

1.1.3.1 L'organisation génomique

Le génome du VHS-1 consiste en un ADN double brin principalement linéaire de 152 kb, ayant au moins 80 phases ouvertes de lecture (*Open reading frame*, ORF), bien qu'une nouvelle étude ait identifié jusqu'à 284 ORF (81). Le contenu en G + C du génome du VHS-1 est de 68,3 %, et il est organisé en deux sections liées par des liaisons covalentes, l'une longue (L) qui représente 82% du génome et l'autre courte (S) qui représente le 18% restant (82). Ces sections comprennent chacune une séquence unique, UL (*Unique long*) et US (*Unique short*) flanquées de séquences de répétitions inversées, b et c selon le cas, identifiées comme TR (*Terminal repeat*) ou IR (*Internal repeat*) en fonction de leur position par rapport à la séquence unique (83, 84). Ces blocs sont

délimités par les répétitions inversées a, la structure résultante étant ab-U_L-b'a'c'-U_S-ca (**Figure 2**) (83, 85-87). Pour les gènes, la dénomination est liée à leur position. Ainsi, les gènes situés dans UL correspondent aux gènes *UL1* à *UL56*, ceux situés dans US aux gènes *US1* à *US12* et les gènes pour les séquences répétitives sont nommés *RL1*, *RL2* et *RS1*. La désignation des gènes identifiés après cette définition originale se fait, pour la plupart, par un nombre fractionnaire, par exemple *UL12.5* (88). Le génome viral comprend trois origines de réplication (*ori*), une dans UL entre les gènes *UL29* et *UL30*, appelée ori_L et deux dans US dans la séquence c, appelées ori_s (82, 84).

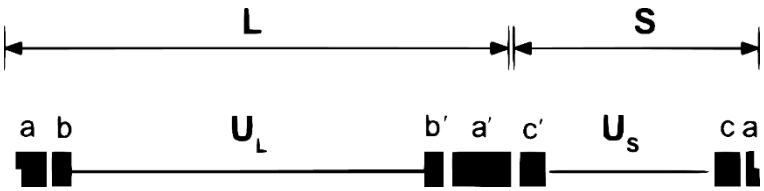

Figure 2. – Organisation du génome du VHS-1. Le génome du VHS-1 est divisé en deux séquences uniques, une séquence longue (L) et une séquence courte (S). Chaque séquence unique (U_L et U_S respectivement) est flanquée de séquences répétées inversées, b et b' dans le cas d'U_L et c et c' dans le cas d'U_S, qui sont délimitées par les répétitions inversées a. Adaptée de (25).

Les protéines du VHS-1 sont synthétisées de manière séquentielle, les gènes qui les codent ont été classés en trois classes : α ou très précoce (*immediate-early*, IE), β ou précoce et γ ou tardifs (89). Le VHS-1 code pour cinq protéines IE : ICP0, ICP27, ICP4, ICP22 et ICP47, dont les gènes ont été nommés respectivement α (*α0*, *α27*, *α4*, *α22* et *α47*) ou IE (*IE1*, *IE2*, *IE3*, *IE4* et *IE5*) en plus de leur identification systématique (*RL2*, *UL54*, *RS1*, *US1* et *US12*) (84, 88, 90). La nomenclature des protéines est encore plus complexe que celle des gènes. Le nom de certaines d'entre elles est basé sur leur fonction (par exemple *UL23* = thymidine kinase, tk), leur nature (glycoprotéines, telles que gM = glycoprotéine M) ou directement sur le nom du gène qui les code (par exemple *UL56* = pUL56). Les protéines infectieuses cellulaires (*infected cell polypeptides*, ICPs), allant de ICP0 à ICP47, et les protéines identifiées comme composants de la particule virale (*virion protein*, VP), telles que VP5, tirent leur nom de leurs caractéristiques générales (c.-à-d. les protéines VP sont présentes dans les particules virales et les ICP dans les cellules infectées) (91). Tous deux,

ICPs et VPs, ont été nommés majoritairement par ordre croissant de mobilité dans un gel (80, 84, 87, 88).

1.1.3.2 La capside

La protection du génome viral est assurée par la capside, une structure icosaédrique bien définie de 125 nm de diamètre (92). La capside intervient également dans d'autres processus tels que le relâchement du génome viral dans le noyau de la cellule infectée ou dans la sortie du noyau des capsides nouvellement formées (93). VP5 est la protéine majeure de la capside et est présente en 955 copies, formant des structures pentamériques et hexamériques contenant respectivement 5 et 6 monomères de VP5 (94). Les hexamères composent les faces et les arêtes de l'icosaèdre, et 11 des 12 sommets sont formées par les pentamères de VP5 (95). Le douzième sommet s'agit du complexe portail, dans lequel on trouve un dodécaèdre de pUL6 en anneau (95-98). En total, la capside est constituée de 162 sous-unités ou capsomères (92, 99), qui sont reliées par 320 triplex composés des protéines VP23 et VP19C avec un ratio 2:1 (deux copies de VP23 et une de VP19C) (100). La protéine VP26 orne l'extrémité de chaque VP5 dans les 150 hexamères, et, associé à chaque pentamètre, on retrouve cinq copies de l'hétérodimère pUL17 et pUL25, constituant la composante spécifique de l'apex de la capside (*Capsid vertex-specific component*, CVSC) (94, 101-103). Chez les capsides matures, on retrouve aussi la protéine VP24, une protéase essentielle lors de l'encapsidation de l'ADN (104, 105).

1.1.3.3 Le tégument

Le tégument se présente comme une couche semi-ordonnée de protéines d'une largeur d'environ 23 nm reliant la nucléocapside à l'enveloppe virale (79). Sa composition inclut autour de 24 protéines virales, et des études de spectrométrie de masse ont permis de caractériser 49 protéines cellulaires qui sont incorporées, sans que l'on sache clairement si, ou lesquelles, sont essentielles pour sa structure (5). L'étude de l'organisation du tégument est compliquée dû à l'asymétrie de sa structure. Le tégument a été divisé, suite à des études biochimiques basées sur la susceptibilité aux sels, en tégument interne (les protéines les plus proches de la capside) et externe (celles les plus proches de l'enveloppe virale) (106-108). Cependant, ces études ne fournissent pas exactement d'informations sur l'organisation du tégument, car elles étudient

l'association des protéines du tégument avec les nucléocapsides lorsqu'il se produit une augmentation de la concentration en sels après avoir solubilisé l'enveloppe virale par un traitement aux détergents (90, 108, 109). En plus, cette dichotomie ne se révèle pas tout à fait exacte, car plusieurs protéines, par exemple pUL47, contribuent aussi bien à la couche interne qu'à la couche externe du tégument (5, 110, 111). Un petit nombre de protéines tégumentaires sont essentielles à l'assemblage du virus, comme pUL36 (la plus grande protéine du VHS-1, qui dépasse les 300 kDa), pUL37 et VP16 (112, 113). De plus, quelques-unes des protéines tégumentaires sont impliquées dans la suppression de la réponse cellulaire à l'infection, comme la protéine ICP0 (114, 115).

1.1.3.4 L'enveloppe

L'enveloppe virale est une bicouche lipidique provenant des membranes cellulaires au sein de laquelle sont intégrées 15 protéines virales transmembranaires, dont 12 glycoprotéines, soit gL, gC, gM, gN, gK, gH, gG, gJ, gB, gD, gI et gE (116). Elle est enrichie en sphyngomyéline et phosphatidylsérine, et la présence de cholestérol dans l'enveloppe virale faciliterait sa fusion avec la membrane plasmique et contribuerait à la stabilité du virion (117, 118). Le compartiment cellulaire dont dérive l'enveloppe finale n'est pas connu avec certitude. Si plusieurs laboratoires affirment qu'il s'agit du "réseau trans-Golgi" (*trans Golgi network,* TGN), il a également été suggéré qu'il pourrait provenir des endosomes (119-123). Le fait de bloquer la fonction des GTPases Rab spécifiques liés au trafic endosomal, telles que Rab1a/b, Rab43, Rab6, Rab5 ou Rab11, empêche l'assemblage du VHS-1 (121, 124, 125). Par exemple, la co-déplétion de Rab5 et Rab11, ainsi que la déplétion de Rab6 affectent profondément la production virale, la réduisant de jusqu'à 99% (121, 124). L'enveloppement secondaire pourrait être aussi un hybride de plusieurs membranes cellulaires, dont le TGN et les endosomes. En revanche, il est clair que l'enveloppe virale provient des compartiments de la voie de sécrétion tardive et non des voies de sécrétion précoce telles que le réticulum endoplasmique (RE) ou l'appareil de Golgi (90, 125).

1.1.4 Le cycle viral du VHS-1

Le VHS-1 présente un tropisme pour différents types cellulaires *in vivo* (cellules de la muqueuse buccale, kératinocytes péribuccaux et neurones). Chez certains d'entre eux, il complète un cycle

lytique (**Figure 3**), décrit ci-dessous, et chez d'autres, il entre en latence (neurones). *In vitro*, le VHS-1 est capable d'infecter une grande variété de cellules provenant de différents tissus, et même de différentes espèces (126, 127). C'est pourquoi le VHS-1 est souvent utilisé comme modèle d'étude des herpèsvirus (18, 88). Son cycle lytique est caractérisé par la production d'une série de changements cellulaires en réponse à l'infection productive, qui constituent l'effet cytopathogène (ECP). Ces changements comprennent, entre autres, l'élargissement du nucléole, la marginalisation de la chromatine, l'arrondissement et le détachement des cellules causé par la perte de protéines membranaires et la fragmentation de l'appareil de Golgi en vésicules. L'ECP résulte ultimement dans la mort cellulaire par apoptose (128-130).

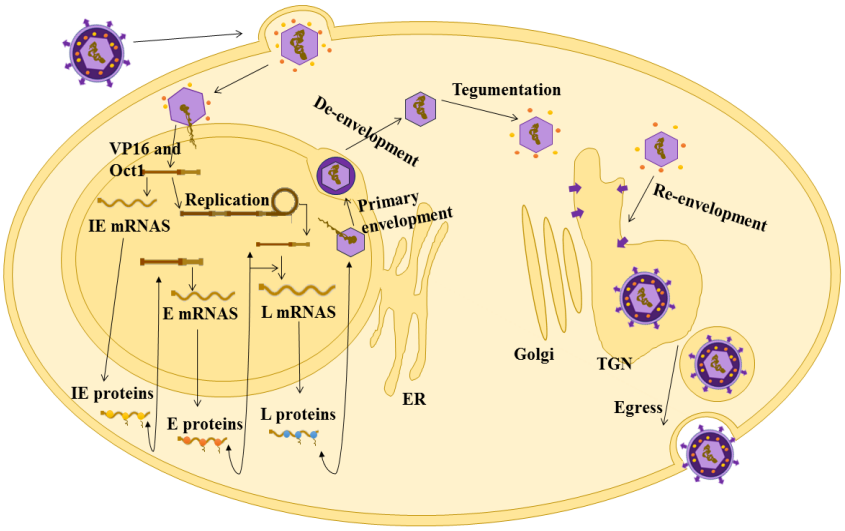

Figure 3. – Cycle viral du VHS-1. La première étape du cycle du VHS-1 est l'attachement à la cellule à infecter, suivie par l'entrée et le relâchement des capsides dans le cytoplasme. Les capsides seront transloquées vers le noyau de la cellule, où auront lieu la transcription séquentielle des gènes très précoces (IE), précoces (E) et tardifs (L), la réplication du génome et la formation de nouvelles capsides. Ces capsides devront quitter le noyau à travers l'EN, en suivant un processus d'enveloppement/dé-enveloppement. Une fois dans le cytoplasme, elles acquièrent le tégument et son enveloppe secondaire et sont finalement libérées par exocytose. D'après (131).

1.1.4.1 L'attachement et l'entrée

La première étape du cycle viral du VHS-1 est l'attachement aux cellules par le biais des glycoprotéines logées dans l'enveloppe virale, après quoi le VHS-1 entre soit par endocytose et fusion ultérieure de l'enveloppe virale avec l'endosome, soit par fusion avec la membrane plasmique, selon le type cellulaire (132, 133). Par exemple, il entre par endocytose chez les

cellules Hela (col utérin) ou les CHO (ovaire du hamster chinois) et par fusion à la surface des cellules Vero (rein de singe vert africain) ou les neurones (134-136). Quelle que soit la méthode adoptée pour entrer dans la cellule, les protéines impliquées sont les mêmes (132). Quatre des douze glycoprotéines de l'enveloppe virale sont essentielles pour l'entrée : gB, gD, gH et gL (137-139). Ce sont les quatre glycoprotéines qui forment le centre de la machinerie de liaison des récepteurs et des fusogènes (116, 137). Dans un premier temps, gB ou gC (une glycoprotéine non essentielle pour l'entrée), adhèrent aux glycosaminoglycanes à la surface de la cellule, suivie de l'interaction de gD avec l'un de plusieurs récepteurs (140-142). Trois récepteurs peuvent être utilisés pour gD : les nectines 1 ou 2, le médiateur d'entrée des herpès virus (*herpesvirus entry mediator,* HVEM) et l'héparane 3-O sulfaté (143-145). La présence de ces récepteurs dans des cellules appartenant à une grande variété de tissus explique la diversité des cellules qui sont infectées par le VSH-1. La conformation de gD subit une modification par l'interaction de cette glycoprotéine avec l'un de ses récepteurs, lui permettant d'interagir avec gH/gL (146, 147). Ceci produit l'activation de l'activité fusogénique de gB (148). Le relâchement de la nucléocapside virale dans le cytoplasme exige de plus la liaison de la gB à l'un de ses récepteurs, le récepteur alpha immunoglobuline de type 2 (PILRα), NMHC-IIA (*non-muscle myosin heavy chain IIA*) ou MAG (*myelin-associated glycoprotein*) (**Figure 4**) (80, 149). Une fois l'entrée du VHS-1 complétée, la nucléocapside, recouverte par certaines protéines tégumentaires telles que pUL36 ou pUL37, devra être acheminée jusqu'aux pores nucléaires, en faisant appel aux microtubules (109, 150). L'ADN viral est introduit dans le noyau par les pores nucléaires à travers le complexe portail, ne nécessitant pas la désintégration des capsides, pouvant rester, vides, associées à l'enveloppe nucléaire (EN) (151, 152).

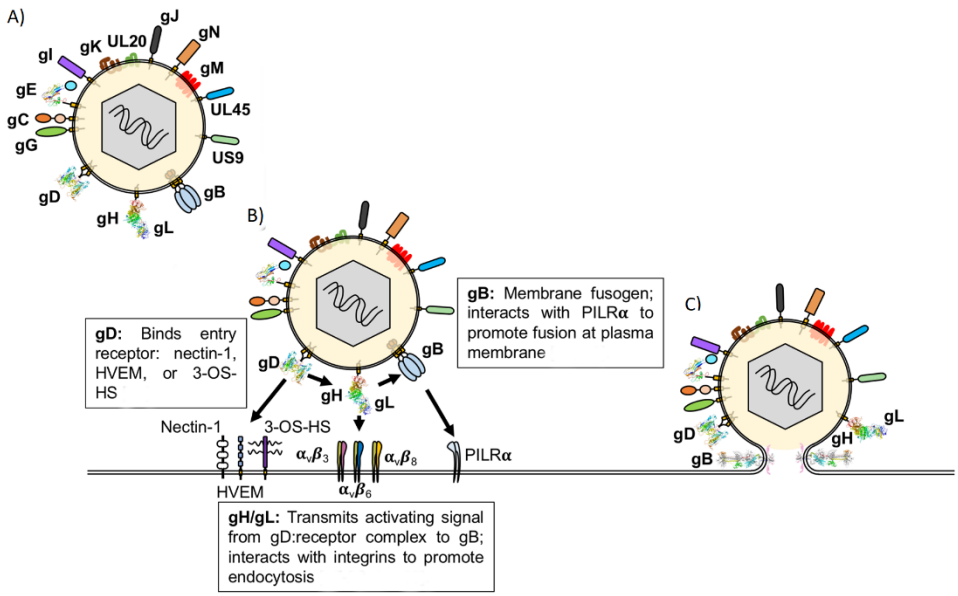

Figure 4. – Attachement et entrée du VHS-1 dans les cellules. A) Les virions du VHS-1 comportent 12 glycoprotéines et 3 protéines transmembranaires non glycosylées. B) La liaison de gD à ses récepteurs provoque des changements de conformation dans le complexe gH/gL et l'activation du fusogène gB. C) La fusion des membranes permet de relâcher les capsides virales dans le cytoplasme. Adaptée de (116).

1.1.4.2 L'expression des gènes viraux et la réplication du génome

Le génome viral est transcrit dans le noyau par l'ARN polymérase II. Les premiers gènes à être exprimés sont les gènes α qui codent pour l'expression des protéines IE (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 et ICP47). Ceux-ci nécessitent le complexe formé par VP16 (protéine tégumentaire qui est transloquée au noyau), Oct-1 (*octamer-binding protein* 1) et le facteur 1 de la cellule hôte (*host cell factor 1*, HCF-1). Ce complexe recrute les facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes α (80, 153, 154). Les protéines IE stimulent ensuite la transcription des gènes β (protéines précoces) et γ (protéines tardives ; divisés en γ1 ou *leaky late* et γ2 ou *true late*). L'expression des gènes β et γ1 se superpose dans le temps, tandis que l'expression des gènes γ2 nécessite obligatoirement l'amplification de l'ADN viral (88, 155). On sait qu'au moins trois des protéines IE ont un rôle important dans cette stimulation, ICP0, ICP4 et ICP27, les deux dernières étant indispensables pour une infection productive (156-158). ICP0 stimule le recrutement des différents facteurs dans le compartiment de réplication et intervient dans la dé-répression des gènes post-α (159, 160). Toutefois, en présence d'une forte multiplicité d'infection (MOI) (plus

que 5 unités formatrices de plages (pfu) par cellule), ICP0 n'est pas essentielle (80, 161). À une faible multiplicité d'infection, cependant, la délétion de l'ICP0 ralentit la prolifération du virus. Ce phénotype est principalement observable dans le cas des fibroblastes humains, étant moins accusé dans d'autres types de cellules (80, 162). ICP4 est un activateur de la transcription virale capable d'interagir avec l'ADN viral et des facteurs de transcription cellulaire. En fonction du promoteur, l'ICP4 peut également agir en tant que répresseur (163, 164). ICP4 est responsable du recrutement de l'ARN polymérase II aux promoteurs des gènes post-α (80). ICP27 favorise la transcription des gènes tardifs et est capable d'interagir avec l'ARN polymérase II. En outre, elle intervient dans le transport de l'ARNm vers le cytoplasme et stimule la liaison des facteurs de traduction à l'ARNm, processus indispensable, car, comme tous les virus, le VHS-1 se sert de la machinerie cellulaire pour synthétiser ses protéines (80, 165, 166).

La réplication de l'ADN viral se produit dans le compartiment de réplication (de grandes zones globulaires constituant des centres de réplication de l'ADN viral), et démarre une fois que la transcription des gènes précoces a commencé (88, 167). Le compartiment de réplication est associé au domaine nucléaire 10 (ND10), impliqué dans des processus cellulaires tels que l'apoptose ou la réparation de l'ADN (168-172). ND10 a aussi un rôle de répression des gènes viraux, cependant, le VHS-1 est capable de contourner ce mécanisme de défense grâce à l'activité ubiquitine ligase E3 d'ICP0 (173). L'ADN du VHS-1 a trois origines de réplication et code pour toutes les protéines nécessaires à sa réplication, y compris des protéines impliquées dans le métabolisme des nucléotides (88, 159). Dans un premier temps, la protéine pUL9 sera associée à l'une des origines de la réplication de l'ADN viral pour former un ADN simple brin, permettant la liaison de l'ICP8 à l'ADN (174). L'ICP8 recrute plusieurs facteurs, entre autres l'hétérotrimère hélicase-primase (formé par pUL5, pUL8, et pUL52) et le complexe ADN polymérase (pUL30 et pUL42), ce qui permet la réplication de l'ADN viral (175-177). Le processus de réplication est très efficace et peut produire plusieurs centaines, voire des milliers, de copies du génome viral (88). Le modèle accepté pour la réplication de l'ADN viral depuis de nombreuses années propose que l'ADN viral se circularise à son entrée dans le noyau et soit ensuite répliqué par un mécanisme de cercle roulant entraînant la formation de concatémères (178). Selon d'autres propositions, la réplication de l'ADN viral est plus complexe et ces concatémères sont le produit d'événements de

recombinaison (175, 177). Quoi qu'il en soit, la production des concatémèmes est essentielle, car la machinerie d'encapsidation de l'ADN viral dans les capsides reconnaît les concatémères plus longs qu'une unité du génome viral lors de l'encapsidation (88, 175, 177).

1.1.4.3 L'assemblage des nucléocapsides

La formation des capsides nécessite dans un premier temps de les assembler sous forme de procapsides autour d'une structure d'échafaudage, composé à 90% de pUL26.5 (préVP22a) et à 10% de pUL26 (179). L'assemblage des capsides commence par la formation du complexe portail, associé aux protéines d'échafaudage (180, 181). Les deux protéines de la structure d'échafaudage ont un C-terminal identique (ils partagent partiellement le même ORF) (**Figure 5**) via lequel elles interagissent avec la protéine majeure de la capside, VP5 (105, 182, 183), qui est par la suite recrutée, conjointement avec le triplex préformé VP23/VP19C, pour former une procapside sphérique (179, 184, 185). L'ADN viral concatémérique s'introduit dans la procapside via le complexe portal. Ce processus nécessite le complexe pUL15-pUL28-pUL33, le complexe terminase, permettant de couper l'ADN viral pour libérer une seule longueur du génome de l'ADN encapsidé du reste du concatémère (186, 187). Lorsque l'ADN viral est incorporé dans la procapside, le domaine N-terminal de pUL26, qui a une activité protéase, est activé et libéré dans un processus autocatalytique, pour devenir VP24 et VP21, plus un fragment carboxyterminal de 25 acides aminés (90). VP24 coupe aussi pUL26.5 pour générer VP22a et le même fragment carboxyl terminal de 25 acides aminés (**Figure 5**) (86). Les produits dérivés des protéines d'échafaudage après l'activité de VP24 sont en majorité libérés de la capside, bien qu'une partie de VP24 reste à l'intérieur (105, 188).

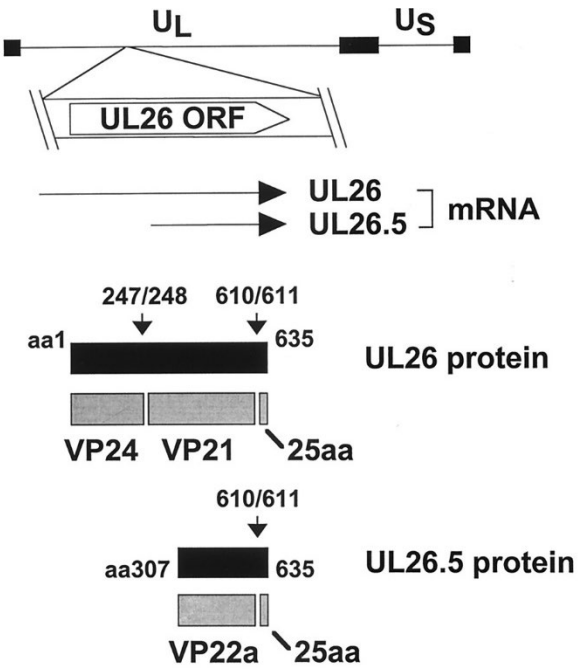

Figure 5. – Produits dérivés des protéines d'échafaudage. En haut : représentation du génome du VHS-1 avec la localisation du ORF de *UL26* et *UL26.5* et leurs transcriptions d'ARNm correspondantes. En bas : Produits primaires de la traduction pUL26 ou pUL26.5 (noir) et produits dérivés de la protéolyse (gris) avec les sites de protéolyse (flèches). Les chiffres représentent les extrémités N- ou C-terminal, les zones où se produit la protéolyse ou le nombre d'acides aminés des fragments résultants de la protéolyse. Adaptée de (105).

Lors d'une infection productive par le VHS-1, on distingue trois types de capsides qui se forment à partir de procapsides sphériques : les capsides A, B et C (189). Structurellement, les trois types de capsides sont similaires, mais ce sont les capsides C qui vont de préférence poursuivre leur voyage vers le cytoplasme, tandis que les capsides A et B s'accumulent dans le noyau des cellules infectées (190). Les capsides B retiennent jusqu'à 50% des protéines de l'échafaudage, tandis que les capsules A et C en expulsent la majeure partie. Ni les capsides A, ni les capsides B ne contiennent le génome viral. Par conséquent, ce sont les capsides C, avec le génome viral et une plus petite proportion de protéines d'échafaudage, qui deviendront des virions infectieux (**Figure 6**) (189, 190).

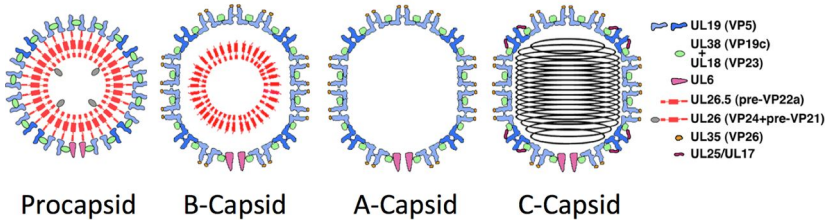

Figure 6. – Formation et types de capsides VHS-1. La structure d'échafaudage formée par pUL26 et le pUL26.5 est la base des procapsides sphériques. Ces deux protéines lient à leur extrémité C-terminal à la protéine majeure de la capside VP5. Trois types de capsides sont formés : les capsides B, qui conservent encore les protéines d'échafaudage; les capsides A, qui sont libérées de la plupart des protéines d'échafaudage et les capsides C. Les capsides C sont les capsides matures, les seules qui contiennent le génome et qui seront préférentiellement exportées vers le cytoplasme. D'après (189).

1.1.4.4 La sortie du noyau

La sortie du noyau des capsides se fait à travers les membranes nucléaires, du fait de la taille d'exclusion des pores nucléaires, qui est de 40 nm, et que la taille des capsides nouvellement assemblées excède largement cette valeur. Pour continuer leur chemin vers le cytoplasme, les capsides subissent un processus d'enveloppement primaire qui les amène dans l'espace périnucléaire (EPN) sous la forme de virions périnucléaires, et finalement de déenvelopement avant d'arriver dans le cytoplasme (**Figures 3 et 7**) (122).

1.1.4.4.1 L'enveloppement primaire

Les phases de l'enveloppement primaire comprennent le désassemblage de la lamina nucléaire, le recrutement des capsides à la membrane interne nucléaire (MNI) et l'enveloppement de la capside à la MNI. La lamina nucléaire (qui sera décrite plus en détail dans la section de l'enveloppe nucléaire) est un réseau de filaments (lamines) situé entre la MNI et la chromatine, constituant une barrière pour la sortie des capsides du noyau qui doit pourtant être désassemblée pour permettre à la capside d'établir un contact avec la MNI (191). Le désassemblage de la lamina requiert la phosphorylation des lamines (192). Pour ce faire, le VHS-1 recrute des kinases cellulaires et virales via le complexe de sortie nucléaire (*Nuclear Egress Complex,* NEC) (193-197). Le NEC consiste en deux protéines essentielles pour la sortie du noyau, pUL31, et pUL34 (cette dernière est ancrée à la MNI), pouvant former des oligomères hexamériques (**Figure 7**) (198-201). Le NEC recrute la kinase virale pUS3, capable de phosphoryler l'émerine, une protéine de la MNI

qui ancre la lamina nucléaire à cette membrane, et les lamines A/C (196, 202, 203). En ce qui concerne les kinases cellulaires, pUL31 et pUL34 recrutent PKCα et PKCδ, deux kinases de la famille de la protéine kinase C (PKC), qui phosphorylent les lamines B (204, 205). Le recrutement des capsides à la MNI se produit probablement par l'interaction de pUL31 avec le complexe pUL25-pUL17 (CVSC) ou avec VP5 (206, 207). Ce sont les capsides C celles qui ont une plus grande teneur en CVSC, ce qui pourrait constituer une des raisons de son export préférentiel du noyau par rapport aux capsides A ou B (206, 208). La liaison de la nucléocapside à la MNI se fait par l'oligomérisation de la NEC, qui forme un échafaudage hexagonal dans la MNI, de sorte qu'elle recouvre la face interne de la membrane bourgeonnante (**Figure 7**) (201, 209). L'activité du NEC est d'ailleurs suffisante *in vitro* pour produire la déformation de la membrane nécessaire pour former l'enveloppe primaire et l'excision de cette enveloppe de la MNI (210).

L'excision de l'enveloppe primaire de l'INM entraîne la production de virions périnucléaires. La composition exacte de ces virions n'est pas encore totalement définie (90). En microscopie cryoélectronique, il a été observé que l'espace entre la capside et l'enveloppe primaire est limitée, ce qui suggère que la plupart des protéines tégumentaires sont acquises dans le cytoplasme, car il est peu probable que ces protéines soient incorporées en grande quantité lors de la sortie du noyau (211). Certaines des protéines tégumentaires qui ont été identifiées dans les virions périnucléaires comprennent pUS3, VP16, pUL36, pUL37, pUL49, VP22, ICP0 ou ICP4 (90, 107, 108, 212-215).

1.1.4.4.2 Le déenvelopement

Les virions périnucléaires sont désormais amenés à fusionner leur membrane avec la membrane nucléaire externe (MNE) suivant un parcours qui n'est pas encore totalement élucidé. Ce sont à la fois des facteurs cellulaires et viraux qui sont impliqués dans ce processus. Ainsi, les glycoprotéines virales gB et gH de même que certains facteurs cellulaires tels que p32, l'intégrine β1 ou la chaîne lourde de l'antigène CD98 sont impliqués dans ce processus (216-218). De plus, l'intégrité du complexe LINC, qui s'étend entre les deux membranes nucléaires, pourrait faciliter la fusion des virions périnucléaires avec la MNE (216-219). De toute évidence, il doit y avoir davantage de facteurs, cellulaires ou viraux, impliqués dans la fusion des membranes lors de la sortie du noyau, car par exemple dans le cas des protéines gB et gH, si les deux sont manquantes,

la sortie du noyau est bloquée ; cependant, la délétion de chacune d'elles individuellement a peu d'effet sur le cycle viral (216). Plus encore, il est surprenant que le besoin en gB et gH ne puisse être extrapolé à tous les herpèsvirus, dès lors que, par exemple, le virus de la pseudorage (PrV), qui est étroitement apparenté au VHS-1, est dépourvu de ces glycoprotéines dans les virions périnucléaires (220). Par la suite, la protéine virale pUS3, présente dans les virions périnucléaires, est responsable de la phosphorylation de la pUL31 à son extrémité N-terminal, ce qui provoque le désassemblage du NEC, qui se dissocie de la capside avant de son arrivée au cytoplasme (**Figure 7**) (211, 212, 221). Après avoir été relâchées dans le cytoplasme, les nucléocapsides poursuivent leur voyage vers l'enveloppement secondaire.

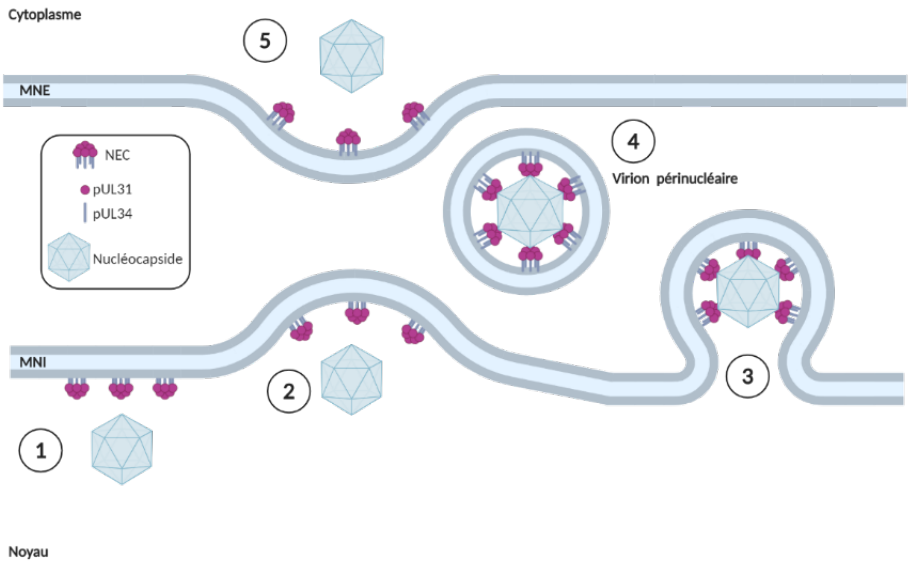

Figure 7. – Enveloppement – déenveloppement du VHS-1 à l'EN. 1) La formation de nouvelles nucléocapsides se produit dans le noyau. 2) Les nucléocapsides ainsi formées sont recrutées à la MNI. 3) Le NEC sert de médiateur pour l'enveloppement primaire des nucléocapsides. 4) Les virions enveloppés sont libérés dans l'EPN et sont appelés virions périnucléaires. 5) La fusion de la membrane des virions périnucléaires avec la MNE permet leur transit vers le cytoplasme. Réalisée avec BioRender.com, adaptée de (201) et (210).

1.1.4.5 L'acquisition du tégument, l'enveloppement secondaire et la propagation du virus

La tégumentation nécessite l'interaction des protéines tégumentaires entre elles, avec la capside et avec l'enveloppe virale, mais le moment où ce processus commence est encore incertain (90). Les protéines tégumentaires pUL36, pUL37 et pUS3 seraient parmi les premières à être

incorporées (107). En faveur de l'incorporation précoce de pUL36, cette protéine contribue à la liaison du complexe CVSC à la capside (222). Parmi les autres protéines tégumentaires qui interagissent avec pUL36, on compte pUL37 et VP16, toutes trois nécessaires à l'assemblage du VHS-1 (223-225). Bien que certaines protéines tégumentaires pourraient être incorporées au noyau, puisque, comme indiqué précédemment, on retrouve chez les virions périnucléaires des protéines tégumentaires, la majorité du tégument est acquis pendant le séjour des capsides dans le cytoplasme (90, 107, 211, 213, 215). On retrouve ainsi plusieurs protéines du tégument dans l'un des endroits où l'enveloppement secondaire pourrait se produire, le TGN (226, 227). De plus, il existe un réseau complexe d'interactions entre diverses protéines tégumentaires et les protéines de l'enveloppe virale, par exemple VP16 est capable d'interagir avec gB, gD ou gH (106, 228).

Après l'acquisition du tégument, on procède à la dernière étape du cycle du VHS-1, précédant sa sortie de la cellule, soit l'enveloppement secondaire (**Figure 8**). L'enveloppe secondaire ou finale est dérivée de la membrane des compartiments cellulaires tels que le TGN ou les endosomes. Les protéines qui feront partie de cette enveloppe doivent donc être situées dans les compartiments cellulaires appropriés afin d'être incorporées (5, 119, 122, 229). Ce sont les glycoprotéines de l'enveloppe qui, par des interactions avec les protéines tégumentaires, servent de médiateurs à la formation des particules enveloppées, à tel point que l'enveloppement peut être produit même en l'absence de capsides, ce qui donne lieu à la production de particules L (230). Les particules dites L (*Light particles*), ce sont des particules enveloppées qui ne contiennent pas de capsides ou de génome, elles contiennent simplement la majorité du tégument et des glycoprotéines virales, et sont même éventuellement relâchées des cellules (231). Pour l'enveloppement secondaire, gK et pUL20 forment un complexe qui semble être crucial, car l'absence de l'un ou l'autre entraîne des défauts dans ce processus (120, 232, 233). Le complexe gK-pUL20 pourrait jouer un rôle dans la mise en place des interactions avec le tégument et l'organisation des protéines virales dans l'enveloppe, puisque son interaction avec pUL37 et son implication dans la localisation de diverses glycoprotéines, telles que gL/gH et gD, ont en effet été constatées (234, 235). En outre, gD, gE et gM interagissent avec VP22 et pUL11, des protéines tégumentaires, ce qui peut favoriser l'enveloppement secondaire (236-238). En vue de compléter cet enveloppement, une excision

des membranes cellulaires est nécessaire. Les complexes de tri endosomique requis pour le transport (ESCRT) sont recrutés à cette fin (239).

Le dernier stade du cycle viral concerne la sortie des cellules des particules virales avec leur enveloppe définitive (**Figure 8**). Pour ce faire, on a recours au transport vésiculaire vers la périphérie de la cellule et à l'exocytose subséquente des particules virales enveloppées (240). La sortie de la progénie virale nécessite la collaboration de facteurs viraux et cellulaires, par exemple la protéine kinase D (PKD) est impliquée dans le transport des particules virales du TGN vers la périphérie des cellules (241). En outre, il a été démontré que le PKD et certains de ses régulateurs, tels que CERT (protéine impliquée dans le transport des lipides), jouent un rôle dans la sortie du VHS-1 (242, 243). Parmi les autres facteurs qui peuvent être impliqués dans la sortie du virus, on peut citer les protéines des familles Rab ou SNARE, ou la myosine Va (240, 244, 245). Cependant, le mécanisme exact de sortie des particules virales reste encore à caractériser.

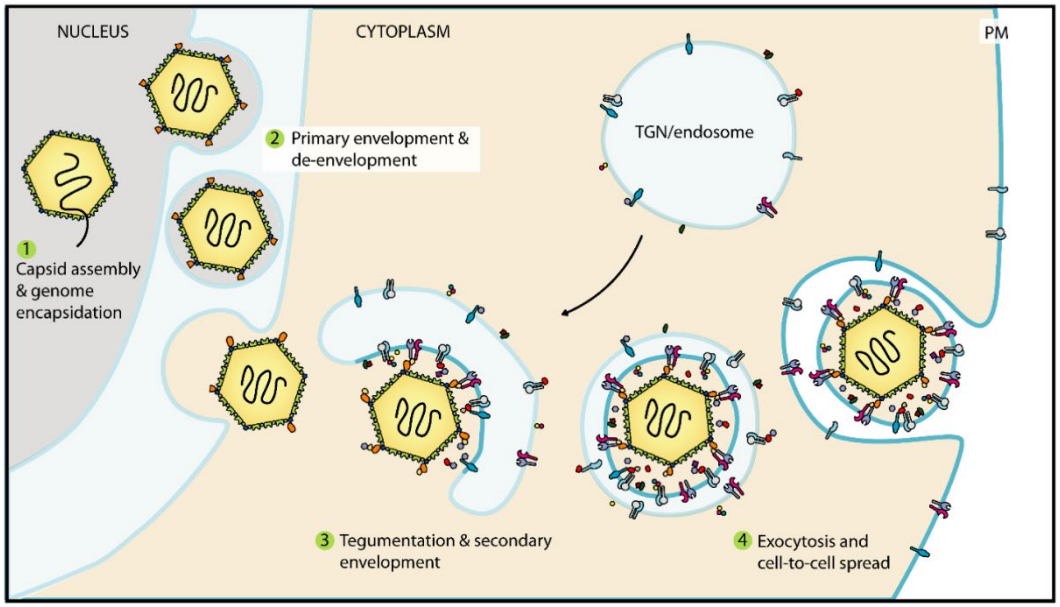

Figure 8. – Parcours du VHS-1 jusqu'à sa sortie. 1) Formation des capsides et encapsidation du génome au noyau cellulaire. 2) Sortie du noyau à travers les membranes nucléaires. 3) Acquisition du tégument et de l'enveloppe secondaire dans le cytoplasme. 4) Sortie des particules virales par exocytose. D'après (106).

Une fois que le cycle viral du VHS-1 est expliqué et qu'il est clair à quel point les événements qui se produisent dans l'EN sont importants et favorisent la propagation du virus, dans le cadre de ce projet, on se focalise sur des protéines localisées à la MNI qui pourraient jouer un rôle au niveau

du passage des nucléocapsides à travers l'EN. C'est pourquoi, dans la section suivante, nous examinerons plus en détail le noyau de la cellule et son enveloppe.

1.2 L'enveloppe nucléaire

Le contenu du noyau est protégé par l'EN. L'EN se comporte comme un bouclier qui protège le génome du reste des éléments cytoplasmiques, sachant qu'une rupture de cette barrière entraînerait l'exposition de la chromatine à ces éléments, ce qui provoquerait une instabilité génomique et menacerait la survie des cellules. En même temps, elle apporte un soutien au cytosquelette et à la chromatine (246). L'EN est une structure composée de deux bicouches lipidiques, les membranes nucléaires (247, 248), séparées par une distance d'entre 30 et 50 nm, qui délimitent l'EPN (248, 249). Ce système de membranes se poursuit avec la membrane du RE (250), de sorte que la MNE est biochimiquement similaire à la membrane de ce compartiment (251). Toutefois, et en dépit de la continuité et ressemblance entre les membranes de l'EN et du RE, la MNE et la MNI, retiennent des protéines qui ne sont pas enrichies dans la membrane du RE (252).

1.2.1.1 Protéines de l'enveloppe nucléaire

Un premier groupe de protéines ciblées à l'EN sont les nucléoporines, elles forment les pores nucléaires, à travers lesquels se produit l'échange bidirectionnel de protéines, d'ARN et de complexes ribonucléoprotéiques entre le noyau et le cytoplasme (253, 254). Plusieurs copies d'environ 30 nucléoporines différentes organisées avec une symétrie rotationnelle octuple composent un pore nucléaire. La structure d'un pore nucléaire comprend un pore central où les deux membranes se fusionnent et forment deux anneaux, dont un anneau cytoplasmique, et un anneau nucléaire, un panier nucléaire et des filaments cytoplasmiques (255, 256). En plus, la structure des pores nucléaires comporte aussi des canaux périphériques. La microscopie électronique a permis d'identifier ces canaux périphériques et de définir leur largeur à environ 10 nm (256). Par la suite, leur implication dans le passage des protéines membranaires de la MNE à la MNI a été confirmée (257). Les ions et les petites molécules de 30 nm ou moins sont capables de traverser les pores nucléaires librement par diffusion jusqu'à un maximum de 40 nm. Par

contre, les molécules plus grosses nécessitent des récepteurs de transport nucléaire, dits aussi importines et exportines (255, 258, 259). La localisation des protéines de l'EN n'est jamais complètement binaire, car leur synthèse se produit au RE ; il est donc très important de permettre aux protéines de la MNI d'entrer dans le noyau et trouver son partenaire de liaison tout en empêchant aux protéines de la MNE d'y pénétrer (248). Bien que le transport noyau-cytoplasme (et vice-versa) des protéines solubles à travers les pores nucléaires (les seules ouvertures de l'EN) soit assez bien défini, le ciblage des protéines membranaires à la MNI reste ouvert au débat. À cet effet, différents mécanismes dépendants ou non des pores nucléaires ont été proposés (**Figure 9**), dont le plus répandu est le modèle de rétention-diffusion. Conformément à ce modèle, les protéines de la MNI diffusent librement, étant donné la contiguïté de leurs membranes, du RE à la MNE puis à la MNI, traversant les pores nucléaires. Le domaine transmembranaire des protéines de la MNI devant demeurer intégré dans la membrane de manière à ce que le processus reste énergétiquement favorable, le transit à travers les pores nucléaires de ce domaine passe par les canaux périphériques. Arrivées à destination, ces protéines seraient retenues par le biais d'interactions avec des partenaires de liaison ou des éléments peu mobiles du noyau, tels que la chromatine et la lamina (**Figure 9 A**) (246, 260, 261). Cette voie est bien illustrée, par exemple, par le récepteur de la lamine B (*Lamin-B receptor,* LBR). Le transport médié par des facteurs de transport (importines) (**Figure 9 B**) représente un autre des modèles proposés. Ce modèle implique un transport actif médié par les importines via un signal de localisation nucléaire (SLN) présent dans les protéines (262, 263). Le modèle de motif de tri (**Figure 9 C**) indique que les protéines membranaires de la MNI peuvent contenir une région transmembranaire hydrophobe et une région adjacente riche en acides aminés chargés positivement, désignés motifs de tri de la MNI (INM-SM, de l'anglais *Inner Nuclear Membrane-Sorting Motif*). À en juger par leur présence dans diverses protéines humaines telles que nurim et LBR ou la protéine à domaine SUN UNC-84 de *Caenorhabditis elegans*, ces motifs sont susceptibles de jouer un rôle important pour diriger les protéines vers la MNI. Les INM-SM sont reconnus par l'importine-α-16, qui sert de médiateur pour leur transport (261, 264, 265). On peut citer pour terminer le modèle de médiation vésiculaire (**Figure 9 D**), qui propose un mécanisme indépendant des pores nucléaires étudié chez

la drosophile. D'après ce modèle, les protéines seraient contenues dans des vésicules formées à partir de la MNE qui atteignent l'espace périnucléaire, puis se fusionnent avec la MNI (258, 261).

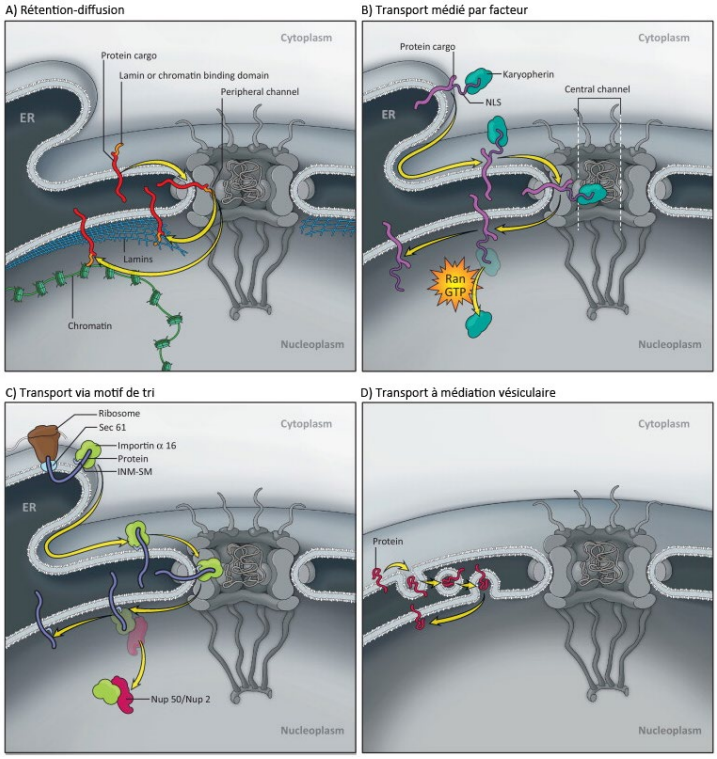

Figure 9. – Modèles de transport des protéines à la MNI. A) Modèle de rétention-diffusion, les protéines traversent l'EN à travers les pores nucléaires par des canaux périphériques. B) Modèle de transport médié par facteur de transport, les importines agissent comme intermédiaire dans le transport des cargos à travers les pores nucléaires. C) Modèle de transport via un motif de tri à la MNI reconnu par l'importine-α-16. D) Modèle à médiation vésiculaire, les protéines sont comprises dans des invaginations de la MNE qui se fusionnent à la MNI. Adaptée de (261).

1.2.1.2 Maintien de l'enveloppe nucléaire et connexions noyau-cytoplasme

Chez les métazoaires et certains organismes unicellulaires, le support mécanique de l'EN est assuré par la lamina nucléaire. Les principales protéines structurelles de la lamina nucléaire sont des filaments intermédiaires de type V, appelés les lamines (266). Chez les mammifères, les lamines sont codées dans deux gènes différents, ce qui produit, par épissage alternatif, quatre types de lamines, regroupées en deux groupes : les lamines de type A, qui inclut la lamine A et C et les lamines de type B, qui inclut les lamines B1 et B2 (191, 267). La lamine B est associée en permanence à la MNI, fournissant un support fondamental au noyau (268). En plus d'apporter de

la rigidité au noyau, les lamines A/C ont d'autres fonctions telles que le positionnement des pores nucléaires, l'interaction avec certains facteurs de transcription ou l'organisation de la chromatine (269, 270). La lamina nucléaire interagit avec les protéines de la MNI, agissant comme un lien entre l'intérieur et l'extérieur du noyau (271, 272). On retrouve ainsi des protéines transmembranaires ancrées à la MNI, dont, certaines, à travers leurs interactions avec la lamina nucléaire et la chromatine jouent un rôle dans son organisation, le métabolisme de l'ADN (qui comprend à la fois les réactions de synthèse et dégradation impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN) et l'expression génique. Des exemples de ces protéines sont le LBR, l'émerine, le polypeptide associé à la lamine (LAP) 1 et LAP2 et MAN1 (273). Du côté cytoplasmique, de nombreuses protéines de la MNE sont connectées aux trois principaux systèmes du cytosquelette, à savoir le réseau de microtubules, l'actine est les filaments intermédiaires. Leurs rôles peuvent aller de la migration cellulaire et nucléaire (un processus dépendant des microtubules, crucial pour le développement des eucaryotes et nécessaire, par exemple, pour la réunion des pronucléus masculin et féminin dans un zygote nouvellement fécondé) (274, 275) à la connexion du reste de la cellule au génome, en passant par la régulation génomique (248). Le complexe LINC (de l'anglais *Linker of the Nucleoskeleton and Cytoskeleton*), ayant des composants de l'un et de l'autre côté de l'EN, assure la connexion entre le noyau et le cytoplasme. De ce fait, les fonctions du complexe LINC dans son ensemble comprennent celles mentionnées pour les protéines de la MNI et de la MNE. Il est fondamental pour la régulation du génome, la stabilité mécanique nucléaire et fournit les liens mécaniques nécessaires à la migration nucléaire et cellulaire, parmi d'autres fonctions plus détaillées ultérieurement (**Figure 10**) (276). Pourtant, tant les protéines de la MNI que celles de la MNE assurent le soutien de leurs membranes respectives et ont des fonctions spécifiques en lien avec leur localisation.

1.2.2 Le complexe LINC

L'interaction entre le noyau, le cytoplasme et les intégrines est connue depuis plus d'une vingtaine d'années. Le cytoplasme établit un lien entre le noyau et la membrane plasmique, qui à son tour est intégrée au noyau par le biais du complexe LINC (277, 278). Ce complexe a fort probablement joué un rôle dans la formation de l'EN avant le dernier ancêtre commun eucaryote, LECA (*last eukaryote common ancestor*) (279), car ils sont conservés chez tous ces organismes.

Néanmoins, les protéines qui interagissent avec le complexe, et même les protéines qui en font partie, varient d'un type de cellule à l'autre (280, 281). Le complexe LINC est toujours composé de deux types de protéines : les protéines à domaine KASH et les protéines à domaine SUN (**Figure 10**), et en tant que mammifères, nous disposons de cinq protéines SUN (SUN1 à SUN5) et de six protéines KASH : les Nesprines (*nuclear envelope spectrin repeat proteins*) 1 à 4, KASH 5 et la protéine limitée à la membrane des lymphocytes (LRMP) (277, 282).

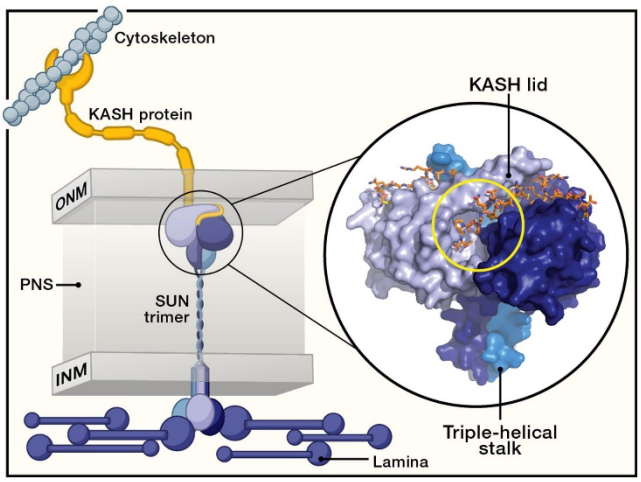

Figure 10. – Les protéines SUN et KASH à l'EN. Les protéines à domaine KASH sont intégrées dans la MNE, interagissant par son domaine N-terminal cytoplasmique avec le cytosquelette et avec leur domaine KASH (en orange) en C-terminal avec le domaine SUN. Les protéines à domaine SUN sont ancrées à la MNI et interagissent par son extrémité C-terminal, qui comprend le domaine conservé, avec les protéines KASH et avec la lamina nucléaire de son côté nucléoplasmique en N-terminal. Le cercle montre une vue plus détaillée de l'interaction SUN-KASH dans l'EPN (voir section1.2.2.3). D'après (283).

1.2.2.1 Protéines KASH

Les membres fondateurs de la famille KASH sont Klarsicht de la Drosophile, ANC-1 du *Caenorhabditis elegans* et SYNE-1 et -2 des mammifères. De ces protéines en découle le nom du domaine conservé, étant KASH l'acronyme de l'anglais Klarsicht, ANC-1, Syne homology (284). La famille KASH comporte des protéines transmembranaires de type II, ancrées à la MNE dont la structure typique inclut un domaine N-terminal d'interaction avec des composants du cytosquelette et le domaine KASH, une séquence d'environ 50 acides aminés qui comprend une région transmembranaire hydrophobe intégrée dans la membrane nucléaire externe d'approximativement 20 acides aminés et une région dans l'espace périnucléaire d'entre 6 et 30

acides aminés. Le domaine KASH constitue l'extrémité C-terminal de la protéine ; ce domaine est nécessaire et suffisant pour cibler une protéine à l'EN (**Figure 10**). Les deux extrémités des protéines de la famille KASH sont séparées par un nombre variable de répétitions de spectrine (282, 285, 286). Toutefois, mis à part le domaine KASH, les protéines appartenant à cette famille partagent peu ou pas de caractéristiques (282, 285, 287, 288). Il existe, néanmoins, des isoformes de la plupart des protéines de cette famille, si ce n'est que de toutes, qui ne possèdent pas le domaine KASH, ce qui signifie qu'elles se retrouvent dans d'autres compartiments cellulaires autres que le noyau pour les relier au cytosquelette. Par exemple KLNes1g, l'isoforme sans domaine KASH de la Nesprine 1 trouvée dans le cervelet peut être localisée dans le cytoplasme (288, 289).

1.2.2.1.1 Nesprine-1 et nesprine-2

Les premières protéines de la famille KASH décrites chez les mammifères sont les nesprines 1 et 2. Elles comprennent des nombreuses isoformes, dont les plus grandes sont connues comme isoformes géantes, atteignant 1MDa dans le cas de la Nesprine 1 et 800kDa pour la Nesprine 2. Les différentes isoformes peuvent ne pas partager des fonctions, partenaires de liaison, tissus dans lesquels sont exprimées et localisation cellulaire (290). En général, les nesprines sont trop grandes pour traverser les pores nucléaires à travers les canaux périphériques et elles sont retenues à la MNE via l'interaction du domaine KASH avec le domaine SUN dans l'EPN. Cependant, de petites isoformes des nesprines 1 et 2 (d'environ 53 et 48kDa respectivement) sont susceptibles de se loger dans l'une ou l'autre des membranes, incluant la MNI où elles interagissent avec l'émerine, la lamina et SUN1 (290-292). Des partenaires de liaison dans la face cytoplasmique des Nesprines 1 et 2 incluent l'actine, la Nesprine 3, la torsinA et les microtubules (293).

1.2.2.1.2 Nesprine-3, Nesprine 4, KASH5 et Jaw1

La Nesprine 3 est, comme toutes les protéines de sa famille, une protéine transmembranaire de type II, mais plus petite que les protéines décrites précédemment. Elle est localisée à la MNE par l'interaction avec SUN1 et SUN2 et interagit avec le les filaments intermédiaires par le biais de la plectine, qui est capable de former des oligomères étendus. C'est pourquoi il a été proposé que

la Nesprine 3 relie le noyau à la membrane plasmique (290). L'expression de la Nesprine 4 est principalement restreinte à l'épithélium sécrétoire et les cellules de la cochlée. Elle comprend une seule répétition de spectrine et lie les microtubules à travers la kinésine (291, 293). KASH5 est la protéine KASH la plus récemment décrite. Elle est spécifique aux cellules germinales, où elle lie le complexe dynéine-dynactine et forme des complexes LINC avec SUN1 (290). Contrairement au reste de protéines de la famille, Jaw1, aussi appelée LRMP, se retrouve dans la membrane du RE et ne lie pas le cytosquelette, mais le récepteur inositol triphosphate des cellules du système immunitaire et certaines cellules réceptrices du goût (290, 293).

En définitive, les interactions des protéines KASH avec le cystosquelette peuvent être récapitulées ainsi (**Figure 11**) : les Nesprines 1 et 2 interagissent directement avec l'actine ; la Nesprine 3 interagit avec les filaments intermédiaires par l'intermédiaire de la plectine ; les Nesprine 1, 2 et 4 interagissent avec les microtubules à travers la kinésine ; et KASH5 interagit avec le complexe dynéine-dynactine dans les cellules germinales. C'est de cette façon que le complexe LINC lie les trois principaux systèmes de filaments qui conforment le cytosquelette (286, 290, 291, 294).

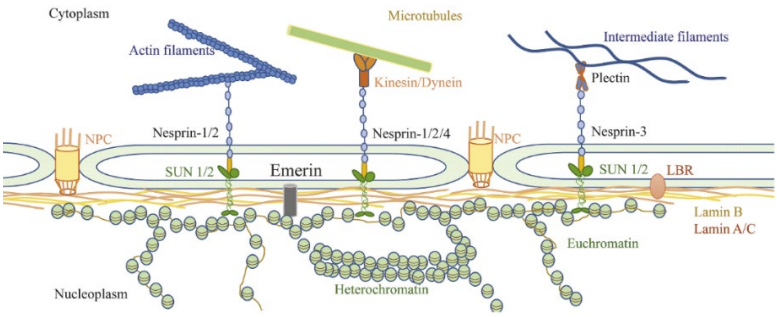

Figure 11. – Les protéines KASH à l'EN. Les Nesprines sont un lien physique entre le noyau et trois composants du cytosquelette (filaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires). Adaptée de (295).

1.2.2.2 Protéines SUN

UNC-84 de *C. elegans* a été la première protéine de la famille SUN, car c'est avec l'étude de Malone *et coll.* (296), en 1999 que le domaine de cette famille conservé a été défini. UNC-84 possède des régions d'homologie dans son C-terminal d'approximativement 175 acides aminés avec la protéine Sad1 de *Schizosaccharomyces pombe* et avec les protéines prédites, SUN1 et SUN2 humaines (296). UNC-84 et Sad1 ont donné le nom au domaine conservé dans toutes les

protéines de cette famille, soit le domaine SUN (Sad1/UNC-84) (282). Les protéines à domaine SUN sont présentes chez tous les eucaryotes, certains d'entre eux possédant plusieurs de ces protéines, qui sont exprimées à différents moments de leur développement (276, 284). Ce sont des protéines transmembranaires de type II, situées à la MNI, permettant d'ancrer le pont qui constitue le complexe LINC à la lamina nucléaire (282). La structure des protéines SUN comporte au moins un domaine transmembranaire (297), une région en bobine (coiled coil, CC) dont la longueur dépend de la protéine SUN concernée (**Figure 12**) et qui favorise la multimérisation dans l'EPN et le domaine SUN en C-terminal (276, 298). L'extrémité N-terminal de ces protéines est nucléoplasmique et elle n'est pas conservée, bien qu'elle contienne les signaux nécessaires pour le ciblage à l'EN et que beaucoup de ces protéines interagissent avec la lamina nucléaire (282, 284). Chez les humains, on retrouve cinq protéines à domaine SUN, codées par les gènes *SUN1*, *SUN2*, *SUN3*, *SUN4*, aussi appelée *SPAG4* (*Sperm-associated antigen 4 protein*) et *SUN5*. Seulement les deux premières, SUN1 et SUN2 sont exprimées de façon ubiquitaire, tandis que l'expression de SUN3, SUN4 et SUN5 semble être limitée aux testicules (291).

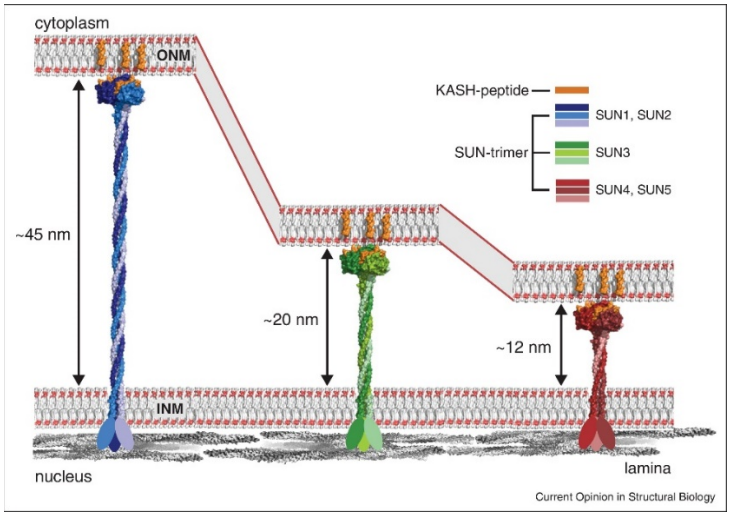

Figure 12. – Les protéines de la famille SUN dans l'enveloppe nucléaire. On estime que les protéines SUN plus courtes (SUN3 à SUN5 chez l'humain) ont des domaines luminaux plus courts, ce qui entraînerait des espaces périnucléaires plus étroits. D'après (298).

1.2.2.2.1 SUN3, SUN4 et SUN5

SUN3 est capable d'interagir spécifiquement avec Nesprin 1 dans la lignée germinale masculine post-méiotique, de manière à produire un complexe LINC impliqué dans la formation de la tête du spermatozoïde, un processus qui implique un important niveau de polarisation à la fois de la cellule et du noyau. La restructuration nucléaire au cours de ce processus requiert le déplacement du noyau et la condensation de la chromatine, en accord avec l'assemblage des structures cytosquelettiques propres au spermatozoïde. Ce stade est critique, car l'une des principales causes de l'infertilité masculine est le mauvais déroulement de la formation de la tête des spermatozoïdes (299-301). Plus récemment, il a été observé que SUN4 interagit avec SUN3 *in vivo*, étant impliqué dans sa localisation, tout en constatant que les niveaux de SUN3 jouent un rôle clé dans le maintien des niveaux de SUN4. Bien que SUN3 et SUN4 se soient révélées indispensables pour la spermatogenèse, les mutations des protéines KASH ne conduisent pas à l'infertilité, à l'exception de KASH5, qui semble être la seule à être essentielle pour ce processus (300, 302). SUN3 est recrutée à sa position au pôle postérieur de la membrane nucléaire grâce à son association avec SUN4. Les protéines SUN sont généralement assemblées en homotrimères pour interagir avec les protéines KASH, cependant, la capacité de SUN4 à s'associer avec SUN3 et la Nesprin 1 lui permet de former des homo ou hétéro-trimères, qui vont se coupler à la Nesprin 1 dans l'espace périnucléaire, liant l'EN au réseau de microtubules. L'activité de SUN4 est certes importante pour le maintien de l'intégrité nucléaire, mais cette protéine n'est pas essentielle pour la polarisation qui se produit dans la tête du spermatozoïde (299, 303, 304). Contrairement aux cellules somatiques, les complexes LINC ne sont pas distribués de manière homogène dans le cas des spermatides, qui, comme mentionné précédemment, sont polarisées. Le complexe SUN3/4/Nesprine 1 est situé dans le pôle postérieur du noyau, tandis que le complexe SUN1η/Nesprine 3 est positionné dans le pôle antérieur (299, 305). La protéine SUN5 fut décrite comme une protéine SUN spécifique aux testicules, située au niveau de la région apicale des spermatides rondes, vis-à-vis de la vésicule de l'acrosome (306), bien que des données contradictoires aient été publiées concernant son emplacement dans les spermatozoïdes, soutenant que cette protéine a un emplacement qui englobe celui de SUN1 et SUN3 chez ces cellules (307). Ce qui semble clair, c'est son rôle dans la liaison de la tête et la queue du

spermatozoïde, les mutations de cette protéine aboutissant dans la production de spermatozoïdes décapités, ce qui entraîne la stérilité (308, 309).

1.2.2.2.2 SUN1 et SUN2

Les seules protéines SUN exprimées de manière ubiquitaire sont, en effet, SUN1 et SUN2, et c'est sur ces protéines auxquelles se consacre désormais notre attention. L'étude de Dreger *et coll.* (310) sur la protéomique de l'EN a conduit à la première description de la protéine SUN1. Elle a été identifiée comme une protéine transmembranaire d'approximativement 100 kDa qui présente une région d'homologie avec la protéine UNC-84 de *C. elegans* et qui interagit très probablement avec la lamina nucléaire. Ultérieurement, elle a été confirmée comme appartenant au complexe LINC, démontrant son interaction avec la Nesprine-2 à l'EN (276, 311). Par la suite, il a été démontré qu'elle interagit avec au moins cinq des six protéines KASH (297, 310). Chez les mammifères, SUN1 est la plus grande protéine de sa famille (**Figure 12**). Son domaine nucléoplasmique en N-terminal compte entre 350 et 400 acides aminés (276). Plusieurs isoformes de SUN1 ont été décrites, dont la fonction, pour la plupart, reste à définir (290). L'ensemble de ces isoformes est le fruit d'un épissage alternatif qui modifie le domaine nucléoplasmique (312). Gob *et coll*. (313) révèlent l'existence d'au moins 7 isoformes de SUN1, désignées de SUN1α à SUN1η, classées par ordre de taille, de la plus grande à la plus petite. Dans cette étude, ils ont constaté une expression différentielle des isoformes en fonction du tissu, qui répond probablement à une adéquation du complexe LINC pour combler les besoins de chaque type de cellule. À titre d'exemple, l'expression de la plus petite, SUN1η semble être limitée aux testicules, où est impliquée dans la formation de la tête du spermatozoïde conjointement avec SUN3 (299, 313).

SUN1 et SUN2 sont toutes les deux liées dans leur région nucléoplasmique à la lamine A, bien que SUN1 interagisse de façon préférentielle avec la prélamine A (forme sous laquelle la lamine A est au départ exprimée et qui subit des modifications post-traductionnelles pour aboutir à la lamine A mature). De plus, SUN1 et SUN2 sont à même d'interagir directement avec la chromatine chez les cellules de mammifères (276, 314-317). Mis à part leurs partenaires d'interaction communs de SUN1 et SUN2 chez les protéines à domaine KASH (nesprines 1- 3 et KASH5), ils existent d'autres partenaires d'interaction communs, tel que l'émerine (276, 302, 305, 316). De telles

interactions contribuent à expliquer leurs rôles partiellement redondants, ce dont fait preuve la létalité du double knockout SUN1/SUN2 chez la souris, mais la non-létalité des knockouts simples (318). Cependant, des interactions exclusives au SUN1 ont été observées, notamment avec les pores nucléaires, en étant directement associées à la nucléoporine Nup153 (258, 312).

La première mention de protéines SUN1 et SUN2 chez les mammifères découle d'une étude qui a isolé leur ADNc (296). La caractérisation de SUN2 s'est faite grâce à l'obtention de sérum anti-SUN2, et ne s'est concrétisée qu'avec l'étude de Hodzic *et coll.* (314). SUN2 est composé de 717 acides aminés, avec un poids moléculaire de 85 kDa. Faisant partie de sa famille, SUN2 se trouve en interaction à son extrémité N-terminal avec la lamina nucléaire et détient à son extrémité C-terminal le domaine SUN conservé (314, 319). Cela dit, l'interaction entre la lamina nucléaire et SUN2 n'est pas cruciale pour la localisation de cette dernière sur la MNI ni pour l'accomplissement de ses fonctions. Le rôle fondamental joué par SUN2 dans la formation des lignes TAN, illustre ce point. Les « lignes nucléaires transmembranaires associées à l'actine » ou lignes TAN, de l'anglais "*Transmembrane actin-associated nuclear* (TAN) *lines*", constituent des structures linéaires présentes dans les cellules adhérentes servant à établir la polarisation cellulaire en amenant le noyau à l'arrière de la cellule lors de la migration (320-324). SUN2 est la principale protéine de sa famille qui fait partie de ces lignes TAN, étant associée à la Nesprine 2G, une des isoformes qui fait office de pont entre le complexe LINC et le cytosquelette d'actine. La lamine A/C stabilise les lignes TAN par ses interactions avec le complexe LINC, mais il n'est pas un élément déterminant dans leur formation, SUN2 étant responsable de la liaison de la Nesprine 2G dans cette structure (320, 325, 326). Fait surprenant, SUN2 aurait un rôle hors du noyau, car il a été identifié comme un partenaire d'interaction de Rab5, une molécule clé pour l'endocytose. La liaison entre SUN2 et Rab5 ne requiert pas le domaine SUN, bien que ce domaine soit essentiel pour la translocation de SUN2 vers les vésicules cytoplasmiques. Les mutants de SUN2 dont le domaine SUN n'est pas présent co-immunoprécipitent avec Rab5, mais ne sont pas localisés aux endosomes. (327).

1.2.2.3 Structure et interaction des domaines SUN-KASH

La première évidence d'interaction entre les protéines SUN et KASH dans l'espace périnucléaire fut apportée par Padmakumar *et coll.* (311). Le recrutement des protéines SUN à la MNI constitue la première étape de la formation de ce lien. Comme mentionné précédemment, différentes voies

d'acheminement des protéines vers la MNI sont possibles, bien que l'on ne sache pas encore si l'une d'entre elles prime sur les autres ou leur importance relative (261). Au sein de la famille SUN, plusieurs caractéristiques rendent ces protéines susceptibles d'emprunter plusieurs de ces voies. De ce point de vue, en faveur du modèle de diffusion-rétention, SUN1 et SUN2 possèdent de petits domaines extraluminaux, qui leur permettraient de traverser les canaux périphériques des pores nucléaires. En outre, les mutations de SUN2 qui ajoutent plus d'une molécule de GFP à son domaine extraluminal entraînent des défauts dans sa localisation, peut-être en raison de sa taille accrue, ce qui suggère l'importance de la diffusion-rétention (321). Néanmoins, ce n'est peut-être pas le seul mécanisme utilisé par les protéines SUN, car certains membres de cette famille, comme UNC-84, possèdent un domaine extraluminal plus large. Le modèle du motif de tri pourrait lui aussi participer à la localisation des protéines de cette famille. Ainsi, la mutation de l'INM-SM de UNC-84 conduit à une diminution du nombre de ces protéines dans la MNI, bien qu'une certaine proportion réussisse à l'atteindre (264). De même, le modèle de transport médié par des importines est impliqué dans le transport des protéines SUN, par exemple SUN2 comprend un SLN classique dans son extrémité N-terminal, qui est reconnu par le complexe hétérodimérique importine α – importine β (321). SUN1, pour sa part, possède un SLN propre des protéines SUN, dénommé SLN-SUN, dont le partenaire d'interaction n'a pas encore été identifié. Le domaine SUN à l'extrémité C-terminal renforce le positionnement des protéines de cette famille positionnement dans l'EN (258, 264, 321, 328, 329).

Tel que mentionné auparavant, le domaine KASH est suffisant pour cibler une protéine dans l'EN, mais cela nécessite l'intervention des lamines de type A et des protéines SUN (330). Le domaine KASH se situe toujours à l'extrémité C-terminal de la protéine, car la reconnaissance par le domaine SUN se fait par le groupe carboxyle du résidu terminal de la protéine KASH. La co-cristallisation de SUN et de KASH par Sosa *et coll*. (331) montre la formation d'homotrimères de SUN, ce qui permet de créer un espace dans lequel est logé le domaine KASH, le « *KASH-lid* », qui ne pourrait pas interagir autrement (283, 298, 331, 332). Les domaines conservés des protéines SUN sont organisés en protomères, dont la structure principale consiste en deux ensembles de feuillets β antiparallèles. À cette structure s'ajoute une extension hélicoïdale, une boucle qui entoure et coordonne un cation relié par cinq groupes carbonyle (appelée boucle cationique) et

le *KASH lid*, un feuillet β antiparallèle émergeant de la structure principale (**Figure 14 A**). Puisque les protéines SUN sont organisées en trimères, elles abritent trois sites de liaison indépendants pour KASH, rendant ainsi le complexe global hexamérique. Trois domaines KASH sont reliés respectivement à trois sillons profonds, créés par deux protomères SUN voisins (**Figure 13 B**). La liaison entre SUN et KASH s'établit par le biais d'un pont disulfure, ce qui explique sa résistance aux forces auxquelles elle est soumise pendant le déroulement de certaines de ses fonctions, notamment la migration nucléaire ou le réarrangement chromosomique (282, 331-335).

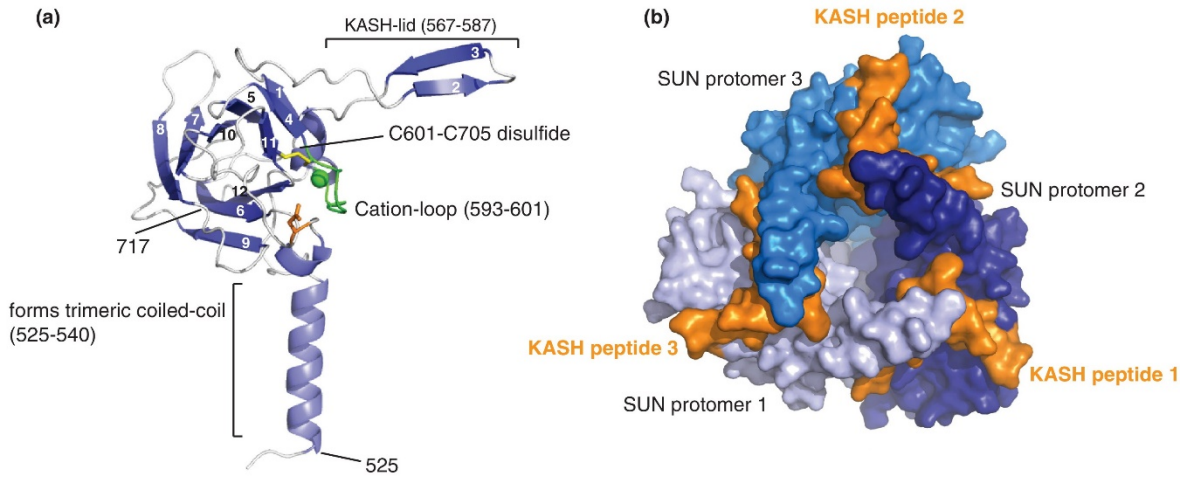

Figure 13. – Le complexe hexamérique SUN-KASH. Les protéines SUN forment des homotrimères pour héberger trois protéines KASH. A) Les domaines SUN sont organisés en protomères comprenant une structure principale de feuillets β, une boucle cationique, un domaine en bobine et le *KASH lid*. B) Le domaine KASH (en orange) est montré niché entre le *KASH-lid* et un sandwich β de protomères SUN voisins. Adaptée de (298).

La forme monomérique des protéines SUN est incapable de lier les protéines KASH, mais, à lui seul, le domaine SUN n'est pas suffisant pour la trimérisation. Ce sont les domaines en bobine (CC) luminales précédant le domaine SUN qui permettent de réguler leur trimérisation. De ce fait, selon les estimations, les protéines à domaine SUN devraient contenir au moins deux domaines CC (CC1 et CC2) qui précèdent le domaine SUN conservé (334). Ces régions CC jouent respectivement le rôle de région activatrice ou inhibitrice pour ce qui est de la capacité de liaison au domaine KASH. La compétition entre CC1, une bobine trimérique qui induit des changements de conformation dans le monomère compact qu'est CC2, et CC2, qui se divise en un faisceau à

trois hélices qui maintient le domaine SUN inactif (**Figure 14**), régule l'équilibre dynamique entre les formes monomère et trimère des protéines SUN (332, 336).

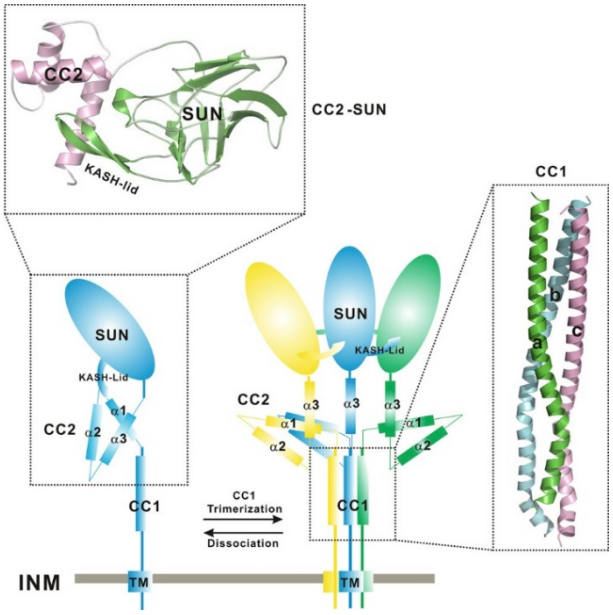

Figure 14. – Les protéines SUN s'assemblent sous forme de trimère pour donner leur forme active. CC2 forme un faisceau à trois hélices (α1-α3), partiellement ouvert qui pourrait interagir avec le domaine SUN (CC2-SUN) et le maintenir dans un état inactif**.** CC1 permet la trimérisation, formant une bobine trimérique allongée (αCC1a-αCC1c) et induisant probablement des changements de conformation du faisceau de trois hélices CC2 pour libérer le domaine SUN. D'après (337).

1.2.2.4 Fonctions du complexe LINC

Les multiples interactions du complexe LINC, y compris la liaison entre les protéines SUN et la lamina nucléaire et les protéines KASH et le cytosquelette, font en sorte que ce complexe remplit des fonctions cruciales pour la viabilité cellulaire (330). Parmi celles-ci, on compte des fonctions pour SUN1 et SUN2 dont les rôles sont redondants, notamment l'ancrage des protéines KASH, ou partiellement redondants, et d'autres dans lesquelles ces protéines jouent des rôles spécifiques. Ce dernier est très probablement dû à leurs différents partenaires d'interaction. En effet, SUN1, mais pas SUN2, est capable de s'associer aux lamines de type B et aux pores nucléaires, pendant que seulement SUN2 semble être un partenaire de liaison pour certaines protéines telles que TMEM43 (258, 338).

1.2.2.4.1 Morphologie nucléaire et maintien de l'espace périnucléaire

La morphologie nucléaire est principalement déterminée par la lamina nucléaire, la chromatine et les protéines de l'EN. À ce titre, le complexe LINC est impliqué dans ce processus (297). On peut citer comme exemple les cellules musculaires cardiaques, où la dynamique des filaments intermédiaires et des microtubules avec leurs partenaires de liaison du complexe LINC est fondamentale pour ce processus. Si cette dernière est altérée, la membrane nucléaire est alors déformée vers l'intérieur, ce qui finit par entraîner un effondrement du noyau. La détermination de la taille du noyau est aussi liée au complexe LINC à travers le réseau d'interactions des nesprines (339, 340). Dans l'optique du complexe LINC comme l'un des éléments responsables du modelage du noyau, il s'avère que le domaine périnucléaire des protéines SUN joue également un rôle dans le maintien d'un EPN constant. La longueur de la triple hélice formée par les domaines périnucléaires de SUN1 et SUN2 coïncide avec la largeur normale de l'EPN. En outre, en cas de déplétion de ces protéines, la distance entre les deux membranes nucléaires augmente au point de doubler (276, 298).

1.2.2.4.2 Positionnement nucléaire

Le positionnement du noyau est généralement asymétrique et varie en fonction du type de cellule, du stade du cycle cellulaire et de l'état de migration et de différenciation (341). Ce positionnement influence donc plusieurs processus, notamment la division cellulaire, la polarité, la migration et la différenciation. Certains troubles, comme la dystrophie musculaire, la cardiomyopathie et la lysencéphalie, sont associés à une altération de la position normale du noyau (341). Au nombre des facteurs intervenant dans le positionnement du noyau figurent des éléments du cytosquelette et des protéines de l'EN. Le complexe LINC est responsable de la liaison du noyau avec les filaments d'actine et les microtubules, intervenant tant dans la migration nucléaire comme dans le maintien du correct positionnement statique (341, 342). Il est intéressant de noter que les protéines SUN1 et SUN2, qui sont les plus largement exprimées de leur famille, ne jouent pas de rôle complètement redondant dans cette fonction. Alors que les deux sont impliquées dans le positionnement du noyau par leur liaison à la Nesprine 2G, SUN1 est impliqué dans le mouvement antérograde médié par les microtubules et SUN2 dans le mouvement rétrograde médié par l'actine. Dès lors, la Nesprine 2G est capable de lier ces deux

composants du cytosquelette, bien que le mécanisme qui lui permet de choisir SUN1 ou SUN2 comme partenaire de liaison en fonction des contraintes ne soit pas encore élucidé (342).

1.2.2.4.3 Mécanotransduction, transport nucléaire et organisation et morphologie cellulaires

La mécanotransduction a lieu dans toutes les cellules eucaryotes. Grâce à ce processus, des stimuli mécaniques sont capables de générer des réponses de signalisation cellulaire. Cela signifie que la mécanotransduction régule des événements essentiels tels que la division, la différenciation et la migration cellulaires (343). Le complexe LINC contribue à la transmission des signaux mécaniques vers et depuis le noyau. Tant SUN1 comme SUN2 participent à la mécanotransduction, en jouant des rôles partiellement redondants (344, 345). Par exemple, la co-déplétion de SUN1 et SUN2 perturbe la réponse des cellules souches mésenchymateuses aux signaux vibratoires (346). Leur rôle semble tout aussi redondant en ce qui concerne la translocation des récepteurs membranaires ou d'autres protéines au noyau via le modèle de transport médié par endosomes associés à l'EN (*nucleus associated endosomes,* NAE), qui constituent un groupe de vésicules formées dans la membrane plasmique suite à l'endocytose qui se rendent au noyau (347). Cette voie de translocation implique le transport, l'accouplement et la fusion des NAE avec la MNE et leur translocation ultérieure au noyau par les pores nucléaires est fortement affectée par la déplétion de SUN1 ou SUN2 (347, 348).

Le complexe LINC non seulement définit la forme du noyau, mais a également un impact sur la forme globale de la cellule. Les interactions des Nesprines avec le cytosquelette servent à réguler l'organisation de celui-ci, influant ainsi sur la morphologie cellulaire (349, 350). Aussi, il a été constaté que les protéines SUN sont impliquées dans l'organisation des microtubules et dans la formation du cytosquelette d'actine (351, 352). Ce dernier scénario attribue aux protéines SUN1 et SUN2 des rôles antagonistes. L'assemblage de fibres de stress via la RhoA est activé par les complexes LINC formés par SUN2, tandis que SUN1 joue un rôle inhibiteur dans ce processus (352). Conformément à ses fonctions liées au cytosquelette, le complexe LINC participe également à la polarité des cellules, à l'organisation des organelles et à la formation des cils (325, 353, 354).

1.2.2.4.4 Réparation des dommages à l'ADN et division cellulaire

Tout comme la partie cytoplasmique des complexes LINC suggère sa participation à l'organisation du cytosquelette et de la cellule en général, il n'est pas surprenant de constater que sa partie nucléaire joue un rôle dans l'organisation génomique. Cette dernière est aussi capable de réguler la réponse génomique aux stimuli mécaniques et au regard de la connexion qu'il établit entre l'EN et le cytoplasme, deux éléments impliqués dans la division cellulaire. Par exemple, le complexe LINC intervient activement à la fois dans la mitose et la méiose (355, 356). En plus, outre leur rôle dans la fixation des télomères à la membrane nucléaire et dans le mouvement et l'accouplement des chromosomes lors de la méiose, les protéines SUN sont impliquées dans la réparation des dommages causés à l'ADN (357-359). La déplétion de SUN1 et SUN2 provoque une instabilité génomique, l'arrêt de la division à la phase S du cycle et l'augmentation de l'apoptose, des dommages à l'ADN et la susceptibilité des cellules aux agents de réticulation (*cross-linking agents*), qui provoquent des dommages à l'ADN en liant de manière covalente deux résidus nucléotidiques du même brin d'ADN (360). En ce qui concerne le rôle du complexe LINC dans la réparation des dommages causés à l'ADN, certains des modèles proposés reposent sur son interaction avec la protéine kinase dépendante de l'ADN et à ses interactions avec les microtubules et le nucléosquelette (359, 361-363).

1.2.2.4.5 Fonctions propres à SUN1

Bien qu'elles partagent certains partenaires de liaison et qu'elles aient certes des fonctions redondantes, les protéines SUN remplissent également des rôles différents. On peut distinguer, parmi les fonctions qui différencient les protéines SUN, celles qui sont exclusives à SUN1. À cet égard, il est intéressant de noter son rôle au niveau des pores nucléaires. SUN1, mais pas SUN2, colocalise avec les pores nucléaires, influençant sa distribution dans l'EN, dans un processus indépendant des interactions avec les protéines KASH (11, 62, 111). En raison du rôle des pores nucléaires dans le transport de l'ARNm et de leur interaction avec SUN1, la possibilité que cette protéine soit impliquée dans ce processus a été envisagée. Effectivement, SUN1 recrute l'ARNm à l'EN et va le transférer à la nucléoporine Nup153, qui se charge de le faire traverser le pore nucléaire (112). À noter aussi la participation de SUN1 à la formation des nucléoles et à la méiose, étant indispensable à la dynamique des télomères (113-115).

1.2.2.4.6 Fonctions propres à SUN2

Au regard des fonctions propres à SUN2, sa participation aux lignes TAN, déjà mentionné auparavant, mérite d'être soulignée. Luxton *et coll.* (322) ont décrit ces structures chez les fibroblastes et ont identifié leurs membres. Ce faisant, ils ont établi la relation entre les lignes TAN et le complexe LINC. Notamment, SUN2 constitue la seule protéine de sa famille à être impliquée (322, 323, 364). Par ailleurs, le knock-down de SUN2 perturbe l'endocytose médiée par récepteur, ce qui peut s'expliquer par l'interaction de cette protéine avec la petite GTPase Rab5. Cette interaction de Rab5 et SUN2 suggère son rôle au-delà de ses fonctions dans la MNI, ce qui souligne son importance dans la dynamique membranaire et l'endocytose (327).

1.2.2.5 Le complexe LINC et les maladies humaines

Les maladies causées par des mutations des protéines de L'EN constituent des enveloppathies nucléaires. Ces conditions, bien que causées par des mutations touchant des protéines exprimées de manière omniprésente, ont une incidence sur des tissus spécifiques, ce qui provoque généralement des problèmes au niveau musculaire (365, 366). Les protéines SUN n'ont pas été associées comme étant les causes directes de ce type de pathologie, toutefois elles interagissent avec au moins quatre protéines de l'EN impliquées dans des affections musculaires connues (366, 367). Le couplage aberrant noyau-cytosquelette serait à l'origine de dystrophies musculaires, à titre d'exemple, et la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (DMED), une affection variable à la fois génétiquement et phénotypiquement. La mutation de six gènes, dont cinq (*EMD*, *LMNA*, *SYNE1*, *SYNE2*, *LUMA*) codent pour des protéines qui font partie ou sont associées au complexe LINC, soit l'émerine, les lamines de type A, les nesprines 1 et 2 et TMEM43 respectivement, a été attribuée comme cause de la DMED, bien que près de la moitié des cas sont causés par des mutations dans *EMD* et *LMNA* (338, 368-371). L'ensemble de ces protéines interagissent entre elles et participent à la coordination noyau-cytosquelette (338, 367, 372). On constate une hétérogénéité dans le développement de la DMED, et cela même au sein des familles porteuses de la même mutation. Ceci suggère que d'autres facteurs sont impliqués. Une corrélation existe entre la présence de variantes de SUN1 ou SUN2 et une aggravation de la maladie chez les patients atteints de la DMED portant des mutations dans d'autres gènes, ce qui permet d'identifier SUN1 et SUN2 comme des agents modificateurs du phénotype de la maladie (366,

367, 372, 373). Des liens entre SUN2 et l'initiation et la progression de différents types de cancer ont aussi été observés, avec une activité inhibitrice de SUN2 sur la prolifération des cellules cancéreuses (374, 375). Dans le cas du cancer du sein, les niveaux de SUN2 sont diminués dans les régions cancéreuses et une expression accrue de SUN2 est associée à une augmentation de la survie pour le cancer du poumon (374, 376).

1.2.2.6 Le complexe LINC et les virus

Le complexe LINC fait aussi l'objet d'études en relation avec les infections virales. Plus particulièrement, la surexpression de SUN2 entraîne une inhibition de la propagation des virus de l'immunodéficience humaine de types 1 et 2 (VIH-1 et 2) entre les étapes de transcription inverse et d'import nucléaire (377). Ce blocage semble être dépendant du domaine N-terminal, la forme mutante de SUN2 dénuée de cette partie n'empêchant pas l'infection. Ni le virus de la leucémie murine (VLM) ni du chikungunya, d'autres virus à ARN, ne sont toutefois affectés par la surexpression de SUN2 (377). Tout comme SUN2, la surexpression de SUN1 entraîne un blocage de l'infection par le VIH, où l'ampleur de celui-ci est nettement plus importante que pour la surexpression de SUN2 (378). Aussi bien que pour la surexpression de SUN2, cet effet inhibiteur n'a pas affecté d'autres virus tels que le VLM ou le virus d'immunodéficience simienne (VIS), laissant entendre que l'inhibition de l'infection n'est pas causée par une possible cytotoxicité de la surexpression et que cet effet est spécifique au VIH (378, 379). En revanche, l'établissement de lignées cellulaires knockout pour SUN1 ou SUN2 n'a montré aucun effet sur l'infection dans le cas de SUN1, tandis qu'une légère inhibition de l'infection a été observée dans le cas de SUN2 (378). Fait intéressant, Donahue *et coll.* montrent que la déplétion de cette protéine n'influence pas le taux d'infection pour le VIH chez certaines lignées cellulaires (377), alors que les données obtenues par Lahaye *et coll.* chez les lymphocytes primaires de T CD4+ et de cellules dendritiques dérivées de monocytes suggèrent que cette déplétion se traduit par une diminution de l'infection (380). Les mécanismes sous-jacents au blocage de l'infection par surexpression et par déplétion de SUN2 semblent être différents, sachant que la mutation d'un seul nucléotide de la capside, qui confère une résistance à l'inhibition par surexpression, ne le fait pas pour la déplétion de SUN2. Cela dit, il est possible que les effets observés sur les lymphocytes T CD4+ découlent des conséquences de la diminution des niveaux de SUN2 sur ces cellules (381).

L'étude du rôle du complexe LINC dans le contexte d'infections a été menée, outre les virus déjà mentionnés, en relation avec les virus de la famille des Herpesviridae, en particulier le virus de la pseudorage (PrV), appartenant à la sous-famille des Alphaherpesvirinae. L'équipe du laboratoire du Dr Thomas Mettenleiter a ainsi démontré l'importance du complexe LINC en générant des lignées cellulaires stables qui surexpriment des formes tronquées de SUN1 ou SUN2 agissant ainsi sous forme de mutants dominants négatifs (219). Suite à l'infection par le PrV, les lignées exprimant la forme mutée de SUN2 produisent des titres viraux significativement plus faibles que les lignées mutantes pour SUN1 ou les cellules sauvages. Ce fait, ajouté à l'accumulation de capsides virales décelées dans l'EPN qui est élargi en raison de la mutation du complexe LINC, suggère un rôle de ce complexe dans la sortie du noyau des capsides virales (219).

Chapitre 2 – Hypothèse et objectif

L'objectif du présent projet de recherche est de déterminer l'impact du complexe LINC sur la propagation du VHS-1. Au regard de son implication dans le cycle d'autres virus, dont notamment le virus PrV, apparenté au VHS-1, notre hypothèse est que l'intégrité de ce complexe est impliquée dans la sortie du noyau des capsides virales du VHS-1. Pour atteindre cet objectif, des lignées cellulaires exprimant des formes mutantes dominantes négatives de SUN1 et SUN2 seront établies. En contrepartie, des déplétions de SUN1 et SUN2 seront également effectués. La propagation virale sera déterminée en effectuant des essais de plaques.

Chapitre 3 – Matériel et méthodes

3.1 Plasmides

Les plasmides pGFP-luSUN1 et pGFP-luSUN2 (**Figure 15**) ont été gracieusement offerts par le laboratoire du Dr Mettenleiter (Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald, Allemagne) (219), ils ont été produits au laboratoire par une souche transformée d'*E. coli* DH5α et isolés avec des kits NucleoBond Xtra midi (Macherey-Nagel). Pour confirmer qu'il n'y avait pas de mutations non désirées, les deux plasmides ont été séquencés. L'expression des protéines a été confirmée par FACS, immunofluorescence (IF) et immunobuvardage.

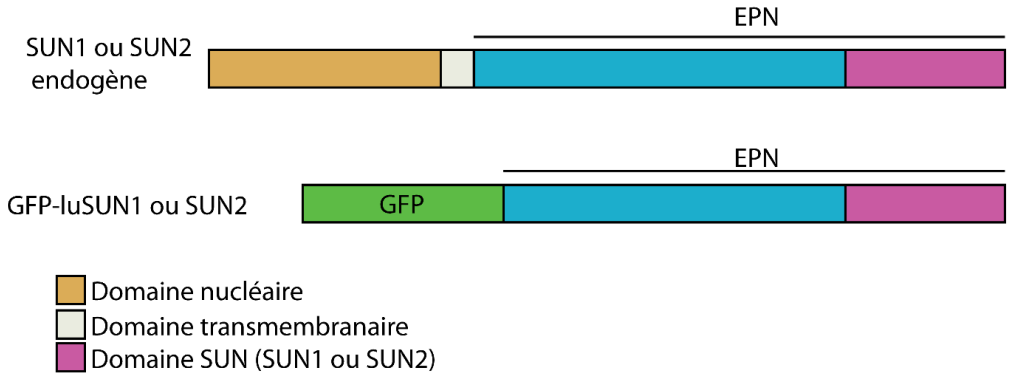

Figure 15. – Schéma des protéines GFP-luSUN1 et GFP-luSUN2. Les protéines mutées GFP-luSUN1 ou GFP-luSUN2 comprennent la portion luminal des protéines endogènes (EPN = espace périnucléaire), y compris le domaine SUN (Sad1/UNC-84) à l'extrémité C-terminal. Les protéines mutantes sont couplées à leur extrémité N-terminal avec la GFP, de sorte qu'elles sont exprimées 1:1 (luSUN1 ou luSUN2 : GFP).

Les plasmides pMD2-pRRE, pRSV-REV et pMD2-VSVg font partie du système de transduction lentiviral de troisième génération (382, 383). Ces plasmides ont été utilisés pour la génération de lignées 143B (voir plus bas) en collaboration avec le laboratoire du Dr Étienne Gagnon (Institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada). Le plasmide pCW-MCS a été gracieusement offert par le Dr Gagnon, il contient un promoteur TRETigh de type TET-ON (384).

3.2 Transfection transitoire

L'agent de transfection utilisé dans les expériences de transfection transitoire est la Lipofectamine 3000. Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules 143B TK- (ostéosarcome humain, thymidine kinase négative) (ATCC CRL-8303) ont été ensemencées dans des plaques à 6 puits pour obtenir une confluence de 60 à 70 %. Comme décrit dans le protocole du fabricant, la quantité appropriée d'ADN (pGFP-luSUN1 ou pGFP-luSUN2) et de Lipofectamine 3000 a été diluée dans de l'Opti-MEM. Le complexe ADN-Lipofectamine a été ajouté au milieu de culture contenant et les cellules 143B ont été incubées pendant 24 heures.

3.3 Sélection clonale

Pour la sélection clonale, les cellules 143B ont été transfectées comme indiqué ci-dessus. Vingt-quatre heures après la transfection, elles ont été récoltées pour être triées au FACS pour la fluorescence de la GFP (voir plus bas). Les cellules positives à la GFP ont été récupérées dans une plaque de 96 puits et mises en culture.

3.4 Lignées cellulaires

3.4.1 RK 13 WT, GFP-luSUN1 et RK 13 GFP-luSUN2

Les cellules RK 13 WT, RK 13 GFP-luSUN1 et RK 13 GFP-luSUN2 (rein de lapin) (ATCC CCL-37) ont été gracieusement offertes par le laboratoire du Dr Mettenleiter (219). Dès leur réception, les lignées RK 13 ont été maintenues en culture dans le milieu essentiel modifié d'Eagle (EMEM, Wisent Bioproducts) complété avec 5 % de sérum de croissance bovin (BGS) 1% de L-glutamine, et 0,5 µg/ml de G418. Les cellules ont été maintenues à 37°C avec 5% de CO_2 et passées à 90% de confluence et ont été analysées pour vérifier l'absence de mycoplasmes contaminants. Les lignées cellulaires RK 13 GFP-luSUN1 et SUN2 ont été triées par FACS pour la fluorescence de la GFP, puis analysées par FACS, immunobuvardage et IF (voir plus bas).

3.4.2 Établissement des lignées 143B GFP-luSUN1, 143B GFP-luSUN2 et 143B mCherry

En utilisant l'assemblage de Gibson (385), GFP-lu.SUN1 et GFP-lu-SUN2 ont clonés dans le plasmide pCW-MCS. GFP-luSUN1 et GFP-luSUN2 ont été amplifiés à partir des plasmides pGFP-luSUN1 et pGFP-luSUN2 décrits plus haut respectivement avec les amorces spécifiées dans le tableau 2. Le plasmide pCW-MCS a été linéarisé en utilisant l'enzyme de restriction DNP-1 et mélangé avec le produit PCR GFP-luSUN1 ou GFP-luSUN2 à un rapport molaire de 1:3 et mélangé avec le réactif de Gibson 2x tel que décrit dans (385). La réaction a été incubée à 50 °C pendant une heure, après quoi elle a été diluée à 1:5 et 5 µl ont été ajoutés à 50 µl de cellules *E. coli* JM109 chimiquement compétentes. Les colonies positives ont été cultivées pendant la nuit dans un incubateur à 37°C en agitation et le plasmide fut extrait à l'aide du kit Nucleobond Midi Prep selon les instructions du fabricant. La veille de la transfection, des cellules HEK 293T/17 (ATCC CRL-11268), provenant du laboratoire du Dr Gagnon, ont été ensemencées dans une plaque à six puits. Le jour suivant, 1,25 µg de pCW-MCS-GFP-luSUN1, pCW-MCS-GFP-luSUN2 ou pHAGE-mCherry ont été mélangés avec 0,3125 µg de pMD2-pRRE, 0,3125 µg de pRSV-REV et 0,625 µg de pMD2-VSVg dans 375 µl de RPMI. La solution plasmidique a été mélangée et 7,5 µl de TransIT ont été ajoutés. Le mélange de transfection a été incubé à température ambiante pendant 15 minutes avant d'être ajouté goutte à goutte aux cellules qui ont ensuite été maintenues à 37°C pendant 12 heures. Le surnageant a été retiré des cellules et 4,5 ml de DMEM complétés par 15 % de FBS et 25 mM de HEPES ont été ajoutés. Après 36 heures, le surnageant a été récolté et utilisé immédiatement pour être utilisé pour la transduction (383). Le virus collecté a été centrifugé à 2000 x g pendant 5 min pour éliminer tout débris cellulaire et le virus a été dilué 1:3 dans du milieu modifié de Dulbeco Eagle (DMEM) et ajouté à un puits d'une plaque 6 puits avec des cellules 143B. Les cellules 143B qui ont subi la transduction ont été incubées à 37°C dans le milieu viral pendant 12 heures, après quoi le milieu a été retiré et placé dans le milieu standard DMEM. Les cellules ont été conservées en culture pendant une semaine avant d'être utilisées pour des expériences. Les cellules 143B GFP-luSUN1 et SUN2 ont été sélectionnées par la puromycine (0,5 µg/ml) et ensuite sélectionnées par FACS pour la fluorescence de la GFP après 24 heures

d'induction avec 1 µg/ml de doxycycline (DOX). Les cellules 143B mCherry ont été sélectionnées par la FACS pour la fluorescence mCherry (**Figure 16**).

Gène	Amorce Forward (5' → 3')	Amorce Reverse (5' → 3')
GFP-luSUN1	GTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAATTGGCTAGCG GATCCATGCTGCTATCCGTGCCGTT	TACAGTCGACTCTAGAATTCTGCAGTTAACC GGTGGATCCTCACAGTTCGTCCTTGCTAG
GFP-luSUN2	GTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGAATTGGCTAGCG GATCCATGTGCTATCCGTGCCGTT	TACAGTCGACTCTAGAATTCTGCAGTTAACC GGTGGATCCTCACAGTTCGTCCTTGCTAG

Tableau 2. – Amorces pour assemblage de Gibson

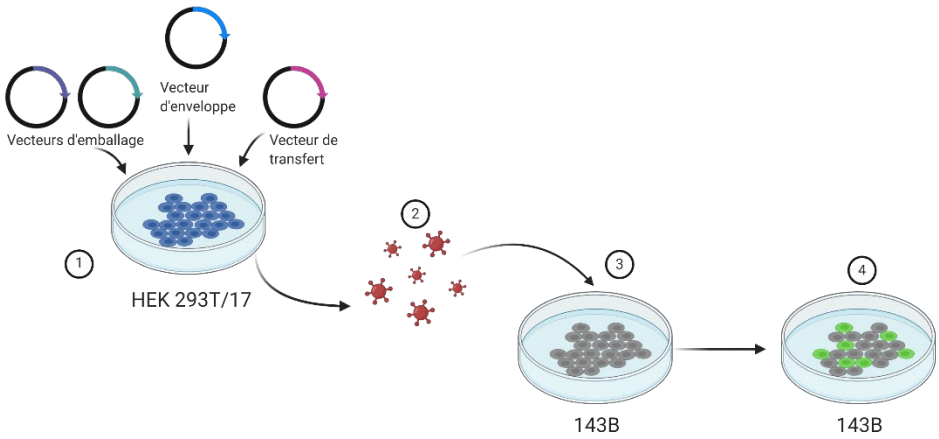

Figure 16. – Schéma de l'établissement des lignées 143B par transduction lentiviral. 1) Co-transfection des cellules HEK 293T/17 avec les vecteurs d'emballage (pMD2-pRRE et pRSV-REV), le vecteur d'enveloppe (pMD2-VSVg) et le vecteur de transfert correspondant (pCW-MCS-GFP-luSUN1 ou SUN2, ou pHAGE-mCherry). 2) Récolte du surnageant contenant les virus produits et centrifugation à 2000 x g pendant 5 min. 3) Ajout des virus aux cellules 143B après dilution 1:3 dans du DMEM. 4) Sélection par puromycine et/ou FACS des cellules ayant subi la transduction pour l'obtention de lignées stables. Figure réalisée avec BioRender.com

Toutes les lignées 143B TK- (ostéosarcome humain, thymidine kinase négative) (ATCC CRL-8303) ont été maintenues en culture dans du DMEM (Wisent Bioproducts) complété avec 5% de sérum de croissance bovin (BGS) 1% de L-glutamine, et 15 µg/ml 5-bromo-2 désoxyuridine (BUdR, Sigma-Aldrich). Les cellules ont été conservées dans du DMEM sans BUdR 24 heures avant les

transfections et les infections. Les cellules ont été maintenues à 37°C avec 5% de CO_2 et passées à 90% de confluence et ont été analysées pour vérifier l'absence de mycoplasmes contaminants.

3.5 Traitement aux dsiARN

Des dsiARN (l'anglais *Dicer-substrate short interfering RNA*) ont été utilisés car ils sont considérés plus efficaces que les siRNAs classiques (386, 387). Les cellules 143B ont été ensemencées dans des plaques à 6 puits 24 heures avant la transfection dans un milieu sans BUdR. Les cellules ont été transfectées pendant 48 heures avec l'agent de transfection LipoJet (laboratoires SignaGen, SL100468) selon les instructions du fabricant avec le dsiARN contre SUN1 ou SUN2 à 100 nM. Pour déterminer la concentration des dsiARN à ajouter aux cellules 143B, la transfection a été optimisée pour des concentrations de 25, 50 ou 100 nM, car selon le type de cellules, la concentration requise pour produire un effet sur l'expression de SUN1 et SUN2 peut varier (374, 388, 389). En suivant les recommandations du fabricant, il a été utilisé comme contrôle négatif le dsiNC1, un dsiARN non spécifique, qui a été vérifié par bio-informatique de manière qu'il n'ait aucun effet sur les cellules humaines. Le dsiARN non spécifique a été ajouté aux cellules dans la même concentration que les deux autres dsiARN. Les cellules ont par la suite été récoltées pour être analysées par RT-qPCR ou infectées pendant 12 heures.

3.6 RT-qPCR

Après l'inhibition de l'expression des protéines SUN1 et SUN2 (voir ci-dessus), l'ARN total a été extrait à l'aide du kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Z3100). L'ARN a été rétrotranscrit en ADNc avec une transcriptase inverse d'ADNc de haute capacité (Applied Biosystems) conformément aux instructions du fabricant. L'ADN a été analysé par PCR quantitative à l'aide du LightCycler 96 (Roche). Les résultats ont été normalisés avec le contrôle endogène (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH)). Toutes les qPCR ont été effectuées en utilisant le SYBR Green (sondes moléculaires) avec les amorces indiquées dans le tableau 3.

Gène	**Amorce Forward (5' → 3')**	**Amorce Reverse (5' → 3')**
SUN1	GGTCATCCAGCCTGACATTT	CTCCCCATCCTGATCATACG

SUN2	AGACATTCCACCCTGCTTTG	GCCAGTTGGAGGAAAATTCA
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG

Tableau 3. – Amorces pour qPCR.

3.7 Virus et infections

Le virus VHS-1 17+ WT a été fourni par le laboratoire du Dr Sodeik. Il s'agit d'une souche 17+ qui possède le génome viral du type sauvage. Préalablement à l'infection, les cellules 143B ou RK 13 ont été mises en culture dans des plaques à 6 puits pendant 24 heures à 37°C avec 5% de CO2. Pour l'analyse par IF, les cellules ont été ensemencées également dans des plaques à 6 puits mais avec trois lamelles (Fisherbrand, 1254580) par puits. Dans le cas des lignées inductibles 143B au moment de l'ensemencement sur les plaques à 6 puits, elles ont été induites ou non avec de la DOX à une concentration de 1 µg/ml. Le jour de l'infection, les cellules ont été comptées pour déterminer la quantité appropriée de virus correspondant à une multiplicité d'infection (MOI) de 2. Le stock viral a été dilué dans un milieu du *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) contenant 0,1% de l'albumine de sérum bovin (BSA), puis ajouté aux cellules. Après une heure d'absorption à 37°C et 5% de CO2, du DMEM 1X a été ajouté. Douze heures après l'infection (*hours post infection,* HPI), le surnageant a été récupéré en prélevant le milieu et en le centrifugeant à 500 x g pendant 5 minutes à 4°C, pour ensuite le conserver à -80°C pour une analyse ultérieure. Dans le cas des lignées inductibles 143B, pour certaines expériences (voir plus bas dans le chapitre résultats) les cellules ont également été récoltées après douze heures d'infection pour être triées par FACS comme indiqué ci-dessous.

3.8 FACS

Vingt-quatre heures avant l'analyse ou le tri, les lignées inductibles 143B ont été induites ou non avec de la DOX à une concentration de 1 µg/ml. Les lignées inductibles 143B ou les lignées RK 13 ont été lavées deux fois avec du PBS froid, trypsinisées et centrifugées à 500 x g pendant 5 minutes à 4°C.

Pour le tri, le culot a été lavé deux fois avec du PBS froid et remis en suspension dans le tampon de tri (PBS 1x, EDTA Mm, HEPES pH 7.0 25mM, 1% FBS). Les cellules remises en suspension ont

été filtrées avec un filtre de 0,2 mm. Les cellules ont été triées à la plateforme de cytométrie du Centre de recherche du centre hospitalier universitaire Sainte-Justine (CRCHUSJ) ou du Département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal pour la fluorescence de la GFP ou mCherry et utilisées dans des expériences ultérieures ou remises en culture.

Pour l'analyse par FACS, le culot a été lavé deux fois avec du PBS froid et remis en suspension dans du PBS 1% FBS. La collecte des données a été effectuée dans le FACS Canto II ou LSR Fortessa à la plateforme de cytométrie du CRCHUSJ et les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo version 10.6.1. Dans les graphiques (voir section résultats), l'intensité de la fluorescence est représentée sur l'axe X. Sur l'axe Y il est représenté le pourcentage de cellules ayant l'intensité correspondante.

3.9 Immunofluorescence

Les cellules 143B ou RK 13 ensemencées sur des lamelles et ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 3 % pendant 20 min à 4°C et perméabilisées avec du triton 0,1% pendant 4 min à température pièce. Les lamelles ont été par la suite incubées à température pièce pendant 30 minutes dans une solution de blocage contenant 10% de sérum fœtal bovin (FBS) dans du PBS 1x, puis incubées pendant 1 heure avec l'anticorps primaire (anti-ICP4 ; 1:200) dilué dans la même solution de blocage. Après trois lavages avec PBS 1x, les cellules ont été incubées pendant 45 min avec l'anticorps secondaire, chèvre-anti-souris Alexa 568 (1:1000) dilué dans du PBS. Les lamelles ont été montées avec Hoechst-Dako sur une lame de microscope. Les images des cellules ont été saisies avec un microscope à fluorescence à grand champ inversé Leica DMi8 de la plateforme de microscopie du CRCHUSJ et analysées avec le logiciel LAS X version 3.7.0.20979.

3.10 Immunobuvardage

Les cellules 143B ou RK 13 ont été collectées avec le Ripa Buffer (20% SDS, 1% NP-40, 1% acide deoxycholic, 150 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.4, complété fraîchement avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases). La concentration des échantillons a été quantifiée grâce au Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) et mesurée avec le lecteur de plaque ClarioStar

de la plateforme de biologie moléculaire du CRCHUSJ. Cinquante ou quinze microgrammes de protéines de lysat cellulaire de chaque échantillon ont été mélangés avec le tampon d'échantillon 1x et 2% de β-mercaptoéthanol. Ils ont ensuite été chauffés à 95°C pendant 10 minutes et migrés dans un gel SDS-PAGE 8% à 130 V. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane PVDF (Bio-Rad) et les membranes bloquées pendant une heure dans une solution de lait à 5 % et 0,1 % Tween20 (Sigma) dans du PBS. L'anticorps primaire anti-GFP (Roche, 1:1000) ou l'anti-gamma tubuline (Sigma, 1:5000), a été ajouté à la membrane pour une incubation pendant toute la nuit à 4°C. La membrane a ensuite été lavée trois fois avec une solution 0,1% Tween20 dans du PBS pendant 5 minutes, puis incubée avec l'anticorps secondaire, chèvre-anti-souris (Jackson ImmunoResearch, 1:10000) conjugué à l'enzyme peroxydase de raifort (HRP), pendant 1 heure à température pièce. Les protéines ont été révélées à l'aide du système ChemiDoc (Bio-Rad) après ajout du substrat ECL (Bio-Rad).

3.11 Anticorps

Les anticorps primaires pour l'immunobuvardage et IF ont été achetés commercialement : l'anti-GFP monoclonal (immunobuvardage, 1:1000, Sigma, 11-814-460-001), l'anti-gamma tubuline monoclonale (immunobuvardage, 1:10000, Sigma, T6557) anti-ICP4 monoclonale (IF 1 :200, Abcam ab6514) et l'anti SUN2 monoclonal (immunobuvardage, 1 : 500, IP 4 µg Abcam ab124916). Tous les anticorps secondaires utilisés pour l'IF ont été commandés chez Molecular Probes et ceux pour l'immunobuvardage ont été commandés chez Jackson ImmunoResearch.

3.12 Essais de plaque

Les titres viraux du surnageant ont été déterminés par essais de plaques. Vingt-quatre heures avant le titrage, les cellules Vero ont été ensemencées dans des plaques à 6 puits pour obtenir une monocouche de cellules confluentes. Les échantillons contenant une quantité inconnue de virus ont été dilués avec la quantité appropriée de RPMI-0,1% BSA et ajoutés à la monocouche de cellules Vero. Une heure après l'absorption, du DMEM 2x (10% BGS, 2% pénicilline/streptomycine, 2% L-glutamine) mélangé à l'agarose 2% dans un rapport de 1:1 ont été ajoutés à la monocouche infectée. Les cellules infectées ont été incubées à 37°C et trois jours après l'infection (*days post infection* dpi), le milieu d'agarose DMEM a été retiré de la

monocouche et les cellules ont été fixées à l'aide de 100% méthanol -20°C. Le méthanol a été retiré et une solution de cristal violet à 0,1 % a ensuite été ajoutée aux cellules fixées pour les colorer. En tenant compte de la dilution et le volume employé, le titre viral initial a été calculé en utilisant le nombre d'unités formatrices de plages (UFP) produites par le virus dans chaque échantillon selon l'équation suivante :

$$Titre\ viral\ (UFP) = (nombre\ de\ plages\ /\ volume\ utilisé\ (ml)) * dilution$$

3.13 Immuno-précipitation

Les cellules 143B ont été cultivées sur des pétris de 10 cm et transfectées avec le dsiARN non spécifique ou contre SUN2. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules ont été lysées pendant 30 minutes à 4°C avec rotation avec un tampon de lyse (1% de Triton, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, complété fraîchement avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases). Les échantillons ont été centrifugés à 14 000 × g, 20 min, 4°C et les surnageants ont été incubés avec du sérum préimmun de lapin pendant 1 h. Ces lysats ont ensuite été incubés avec de l'agarose couplée à la protéine A (Roche) pendant 1 h à 4°C avec rotation. Après centrifugation à 2 000 × g pendant 5 min pour éliminer ces billes, les lysats ont été incubés pendant une nuit à 4°C avec 4 µg de l'anti-SUN2 de lapin. Des billes fraîches d'agarose couplées à la protéine A ont été incubées pendant 2 heures, et les complexes immuns ont été lavés trois fois avec du tampon de lyse pour éliminer les protéines non liées. Le matériel lié aux billes a été élué en ajoutant 60 µl de tampon d'échantillon SDS 2x et 2% de β-mercaptoéthanol et chauffé à 95°C pendant 5 min. Après centrifugation à 2000 x g pendant 5 min à 4°C, le surnageant a été récupéré. Les lysats totaux et le matériel élué des billes ont été analysés par immunobuvardage, 30 et 50 µl respectivement ont été chargés dans un gel SDS-PAGE 8%.

3.14 Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide d'une ANOVA unidirectionnelle pour déterminer la signification des données. Brièvement, chaque valeur moyenne a été comparée à la condition de contrôle ou aux autres conditions et la valeur de probabilité (p) a été calculée par

le logiciel Prism de GraphPad version 8.2.1. La différence entre la condition de contrôle et la condition expérimentale a été considérée comme statistiquement significative lorsque la valeur p était inférieure ou égale à 0,05.

3.15 Remerciements

Les tris au FACS furent réalisés par Armelle Le Campion (Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada) et Ines Boufaied (CRCHUSJ, Montréal, Canada). La construction du plasmide pHAGE-mCherry et les transductions lentivirales et furent réalisées par Jordan Quenneville (étudiant au doctorat au laboratoire du Dr Étienne Gagnon, IRIC, Université de Montréal, Montréal, Canada).

Chapitre 4 – Résultats

4.1. Surexpression des protéines GFP-luSUN1 et GFP-luSUN2

Comme il a été mentionné précédemment, le complexe LINC est impliqué dans le cycle cellulaire d'un parent proche du VHS-1, le PrV (219). Nous cherchons donc à déterminer si ce complexe est également impliqué dans le cycle du VHS-1. À cette fin, le laboratoire du Dr Mettenleiter nous a gracieusement fourni les plasmides pGFP-luSUN1 et pGFP-luSUN2. Ces plasmides codent pour les protéines mutantes dominantes négatives GFP-luSUN1 et GFP-luSUN2, afin d'exprimer la partie luminale des protéines SUN1 ou SUN2 dans un rapport 1:1 avec la GFP, ce qui se traduit par une disruption du complexe LINC (219). Initialement, on a envisagé la transfection transitoire des cellules 143B avec ces plasmides. Plusieurs tentatives ont été effectuées, mais les résultats préliminaires ont montré une impossibilité d'obtenir une population de cellules à la fois transfectées et infectées pour produire des résultats concluants. Pour cette raison, cette stratégie a été écartée et des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer l'origine de cet obstacle. L'une des causes possibles est le stress produit dans les cellules par la transfection, ce qui empêcherait leur infection ultérieure. Il est envisageable que cela déclenche la production de granules de stress. Les granules de stress sont des structures cytoplasmiques composées d'un grand nombre d'ARNm et de protéines (390). Leur formation a été observée dans toutes les cellules de mammifères examinées, bien que la réponse au stress qui provoque leur formation soit différente pour chaque type de cellule. Certaines des causes peuvent être l'hypoxie, la chaleur ou l'infection virale (390, 391). Elles peuvent également être causées par une transfection, car la surexpression des protéines liées à ces granules peut provoquer leur apparition (391). En outre, il a été prouvé que le vecteur et l'agent de transfection peuvent tous deux avoir une influence sur la formation de granules de stress (391). Il a été aussi observé que plusieurs virus, dont le VHS-1, inhibent l'assemblage des granules de stress afin d'assurer une réplication efficace (392-394).

Pour contourner l'obstacle de l'infection après une transfection transitoire, l'établissement de lignées cellulaires stables a été exploré. Pour ce faire, la transfection avec les plasmides pGFP-luSUN1 ou pGFP-luSUN2 et le tri ultérieur des cellules par FACS a été utilisé dans la perspective

d'obtenir une population de cellules qui conservent l'expression du plasmide. Cette approche s'est avouée inefficace, car les cellules provenant d'une même colonie perdent l'expression des protéines mutantes au cours des passages, perdant plus rapidement l'expression les lignées cellulaires GFP-luSUN2 (données non montrées). Cela empêche d'avoir une population de cellules suffisamment dense pour être infectée avant de perdre l'expression. La tendance des cellules à expulser les plasmides nous amène à penser que la surexpression de ces formes mutantes pourrait être toxique pour les cellules.

4.2. L'induction de l'expression de GFP-luSUN1 ou SUN2 dans des cellules 143B n'affecte pas la propagation du virus

En raison de la toxicité présumée de la surexpression des protéines SUN mutées pour les cellules, on a soulevé la possibilité d'établir des lignées cellulaires inductibles afin d'exposer les cellules de manière ponctuelle à la surexpression de protéines SUN mutantes. En collaboration avec le laboratoire du Dr Gagnon, les lignées cellulaires 143B GFP-luSUN1 et 143B GFP-luSUN2 inductibles par DOX de même que la lignée de contrôle constitutive 143B mCherry ont été établies par transduction lentivirale. Les cellules ont été sélectionnées pour leur résistance à la puromycine, puis triées au FACS après induction par la DOX (**Figure 17 A**). Ces cellules présentent un niveau basal de fluorescence pour la GFP plus élevé que les cellules non traitées (143B WT, qui n'ont pas été transduites). De ce fait, les mêmes lignées cellulaires sans l'ajout de la DOX ont été considérées comme négatives dans chaque cas pour le tri au FACS. Les cellules positives pour la fluorescence mCherry récupérées ont été mises en culture et analysées par FACS ultérieurement pour vérifier leur expression, qui est très stable (**Figure 17 B**). Une fois les lignées cellulaires établies, on a procédé à l'infection par le VHS-1 17+ WT. Le taux d'infection a été analysé par IF en marquant l'une des protéines précoces du virus (ICP4), montrant que les lignées inductibles en présence et en absence de la DOX sont susceptibles d'être infectés par le VHS-1 et ont un taux d'infection similaire entre les lignées inductibles, WT et mCherry (**Figure 18**). ICP4 est un facteur de transcription virale qui contribue à augmenter les taux de transcription des gènes viraux au cours de l'infection, étant nécessaire pour assurer une transcription efficace des gènes précoces et tardifs (154, 395). L'induction de GFP-luSUN1 ou SUN2 se produit aussi bien en présence qu'en

l'absence d'infection et les cellules conservent la capacité à être induites au cours des passages (**Figure 17 B, figure 18**). Cependant, lorsque les cellules sont infectées par le VHS-1, on observe une légère augmentation inattendue du niveau d'expression de la GFP-luSUN1 ou SUN2, produisant même un faible niveau d'expression dans les cellules qui n'ont pas été exposées à la DOX, comme le montre le décalage des courbes de fluorescence des cellules induites et infectées ou le profil des cellules induites non infectées (**Figure 17 B, figure 18**). Cet effet n'est pas observé dans le cas des cellules de contrôle 143B mCherry (**Figure 17 B**). Cependant, cette lignée cellulaire ne contient pas le système inductible utilisé dans la construction des autres lignées cellulaires, ce qui aurait été plus pertinent comme contrôle dans ce cas de façon à vérifier si cet effet est lié aux protéines mutantes ou est une conséquence du système inductible. La localisation cellulaire de GFP-luSUN1 ou SUN2 est à la fois nucléaire et cytoplasmique, formant un anneau autour du noyau et s'accumulant dans le cytoplasme dans un compartiment qui s'apparente au RE (**Figure 17 C et D**), tel que rapporté dans d'autres études lorsque ces protéines sont surexprimées (219, 314, 321, 377). Pour déterminer si la perturbation du complexe LINC a un effet sur la propagation virale, les résultats des titres viraux obtenus après infection par essai de plaques ont été recueillis (**Figure 17 E**). Aucun effet sur le titre viral n'a été constaté après induction de la surexpression des formes mutantes dominantes négatives de SUN1 ou SUN2 (**Figure 17 E**). Comme cela sera expliqué ultérieurement, notre hypothèse est un trop faible niveau d'expression des protéines mutantes avec le système inductible pour observer un effet.

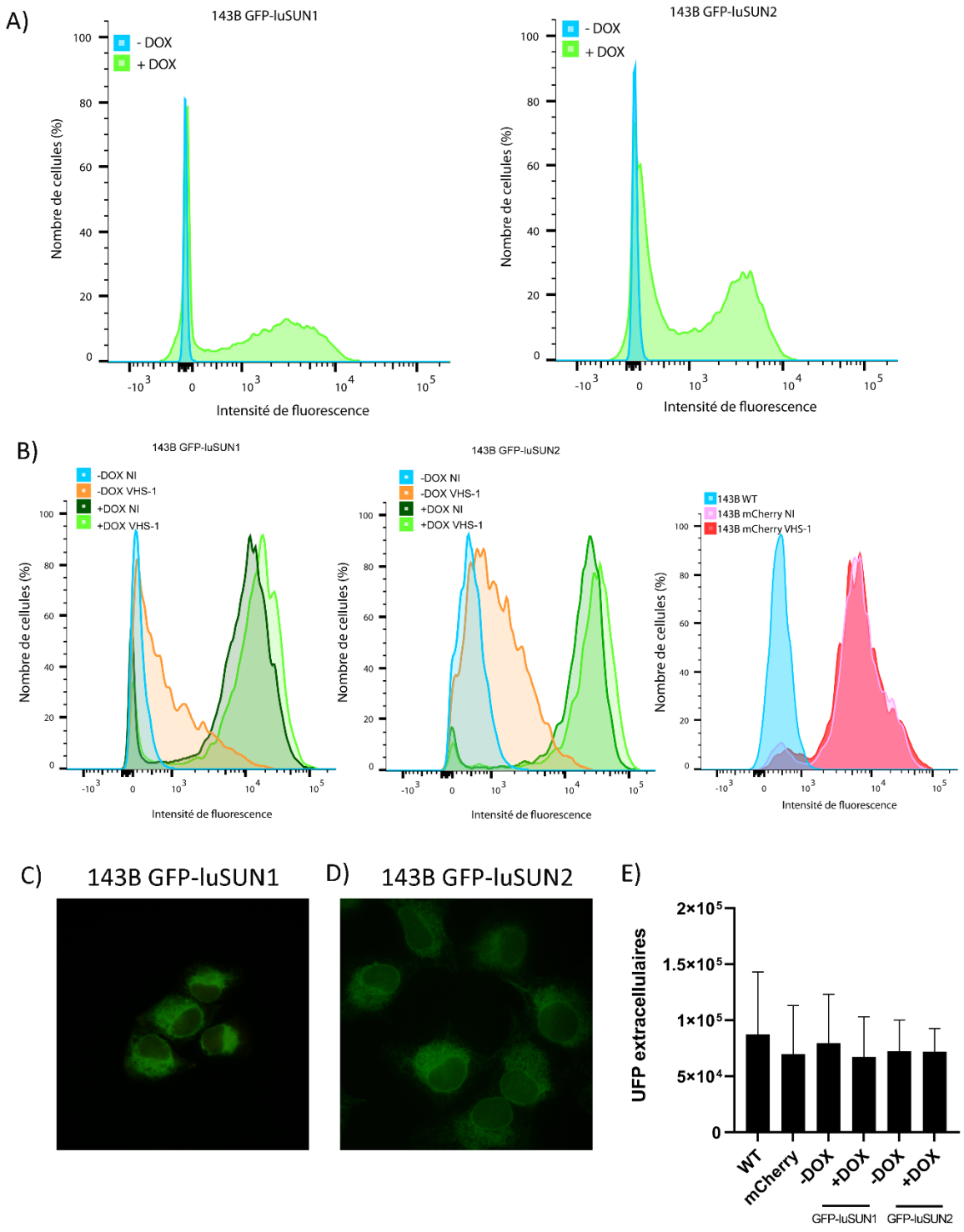

Figure 17. – Lignées inductibles GFP-luSUN1 et GFP-luSUN2. A) Après l'établissement, les lignes 143B GFP-luSUN1 (gauche) ou SUN2 (droite) ont été induites pendant 24 heures avec 1 µg/ml DOX et triées au FACS. Les cellules positives pour la GFP ont été récupérées et mises en culture. B) Les lignées ont été exposées (+DOX) ou non (-

DOX) à la doxycycline comme au panneau A, mais ont ensuite été infectés (VHS-1) ou non (NI = non infecté) pendant 12 heures supplémentaires et récoltées pour analyse par FACS (voir matériel et méthodes). C et D) Les lignées GFP-luSUN1 ou SUN2 ont été ensemencées sur des lamelles et exposées à la DOX. Vingt-quatre heures plus tard, elles ont été fixées avec du PFA et visualisées par microscopie (voir matériel et méthodes). E) Les lignées cellulaires ont été traitées comme décrit au panneau B), puis le surnageant a été récolté et utilisé pour effectuer un essai de plaques (voir matériel et méthodes). Les barres d'erreur représentent l'erreur type de la moyenne (SEM). L'analyse avec ANOVA unidirectionnelle ne montre aucune différence significative entre les échantillons. Deux expériences indépendantes sont représentées.

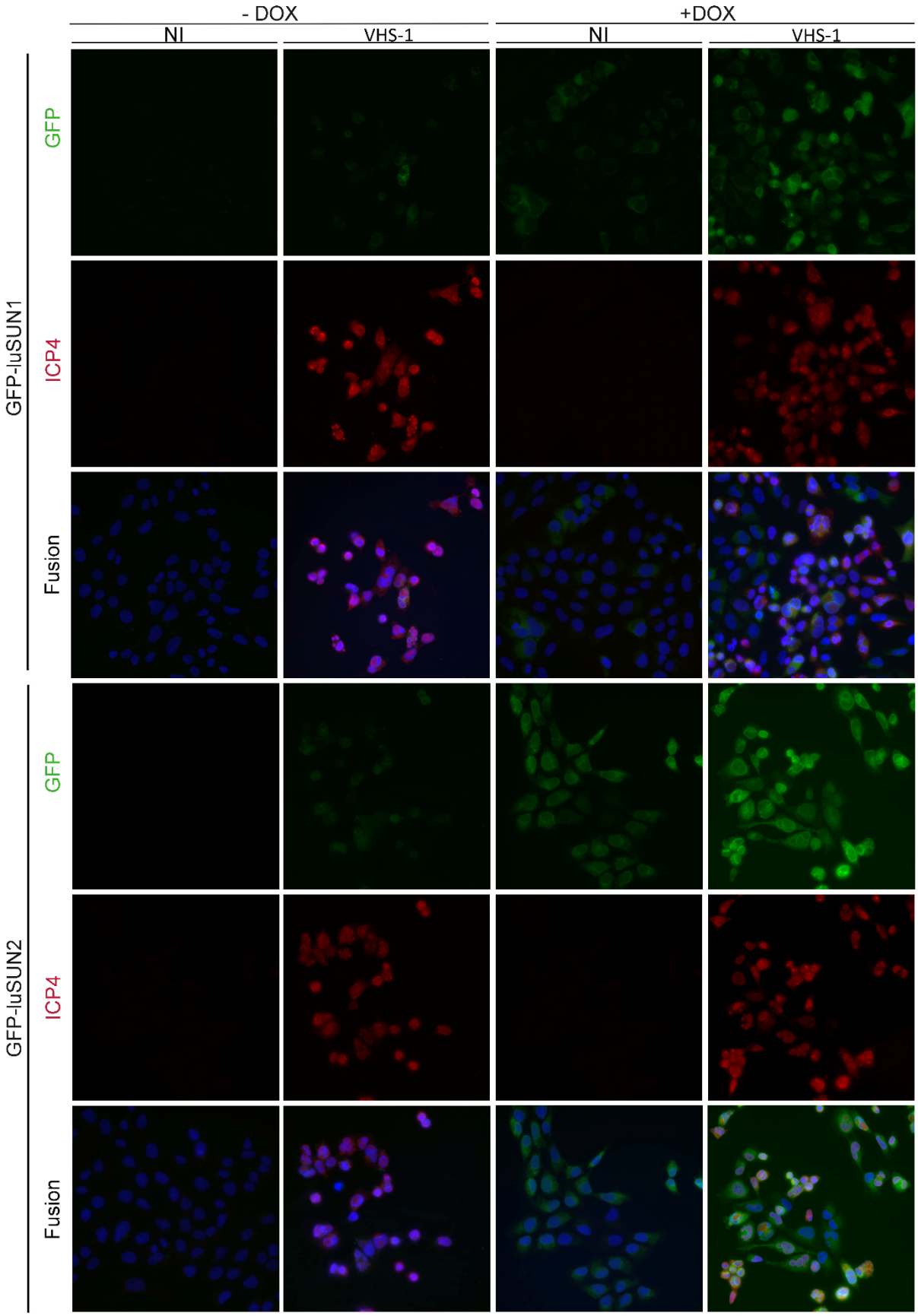
- DOX
+DOX
NI
VHS-1
NI
VHS-1
GFP-luSUN1
GFP-luSUN2
GFP
ICP4
Fusion
GFP
ICP4
Fusion

Figure 18. – Les lignées cellulaires stables sont sensibles à l'infection par le VHS-1. Les lignées cellulaires induites ont été ensemencées dans des plaques à six puits avec des lamelles et exposées ou non au DOX pendant 24 heures. Ensuite, elles ont été infectées ou pas (NI) par le VHS-1 avec un MOI = 2 pendant 12 heures, après quoi ils ont été fixés avec du PFA 3 %. Les cellules ont été perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-ICP4 et visualisées par microscopie (matériel et méthodes). Les images sont représentatives de deux expériences indépendantes.

4.3. Le complexe LINC est impliqué dans la propagation du VHS-1 dans la lignée RK 13

Afin de valider les données du laboratoire du Dr Mettenleiter sur l'impact de SUN sur la propagation virale, les lignées cellulaires RK 13 GFP-luSUN1, RK 13 GFP-luSUN2 et RK13 WT ont été évaluées. Ces lignées cellulaires ont été mises en culture et analysées et triées par FACS (**Figure 19 A**). À l'instar de notre expérience avec l'établissement de lignées stables constitutives par sélection clonale, on constate, en observant le profil obtenu par FACS des lignées reçues (**Figure 19 A**), que la construction GFP-luSUN2 a tendance à être expulsée des cellules. Dans le cas de la lignée RK GFP-luSUN1, cependant, la grande majorité de la population conserve l'expression. Cela nous oblige donc, spécialement dans le cas de la cellule RK GFP-luSUN2, à travailler avec des cellules qui n'ont pas subi beaucoup de passages après le tri. Une fois que les lignées cellulaires exprimant les constructions ont été collectées, elles ont donc rapidement été infectées par le VHS-1 17+ de manière similaire à celle des lignées 143B inductibles. Tout en étant des cellules de lapin, les cellules RK 13 sont susceptibles à l'infection par le VHS-1 (396, 397) et la surexpression de la GFP-luSUN1 ou SUN2 n'affecte pas leur capacité à être infectées (**Figure 20**). On observe également que la localisation cellulaire des protéines mutantes est similaire à celle observée pour les cellules 143B inductibles et celle rapportée par Klupp *et coll.* (219) (**Figure 19 C et D**). L'analyse de l'expression des protéines mutantes par FACS montre qu'il ne se produit aucun effet sur le profil de fluorescence lors de l'infection (**Figure 19 B**). Conformément aux données précédemment rapportées pour le PrV (219), la surexpression de la protéine dominante mutante négative SUN1 n'a eu aucun un effet sur le VHS-1. En revanche, curieusement, en cas de surexpression de GFP-luSUN2, on constate un effet proviral, contrairement à celui observé pour le PrV (219) (**Figure 19 E**).

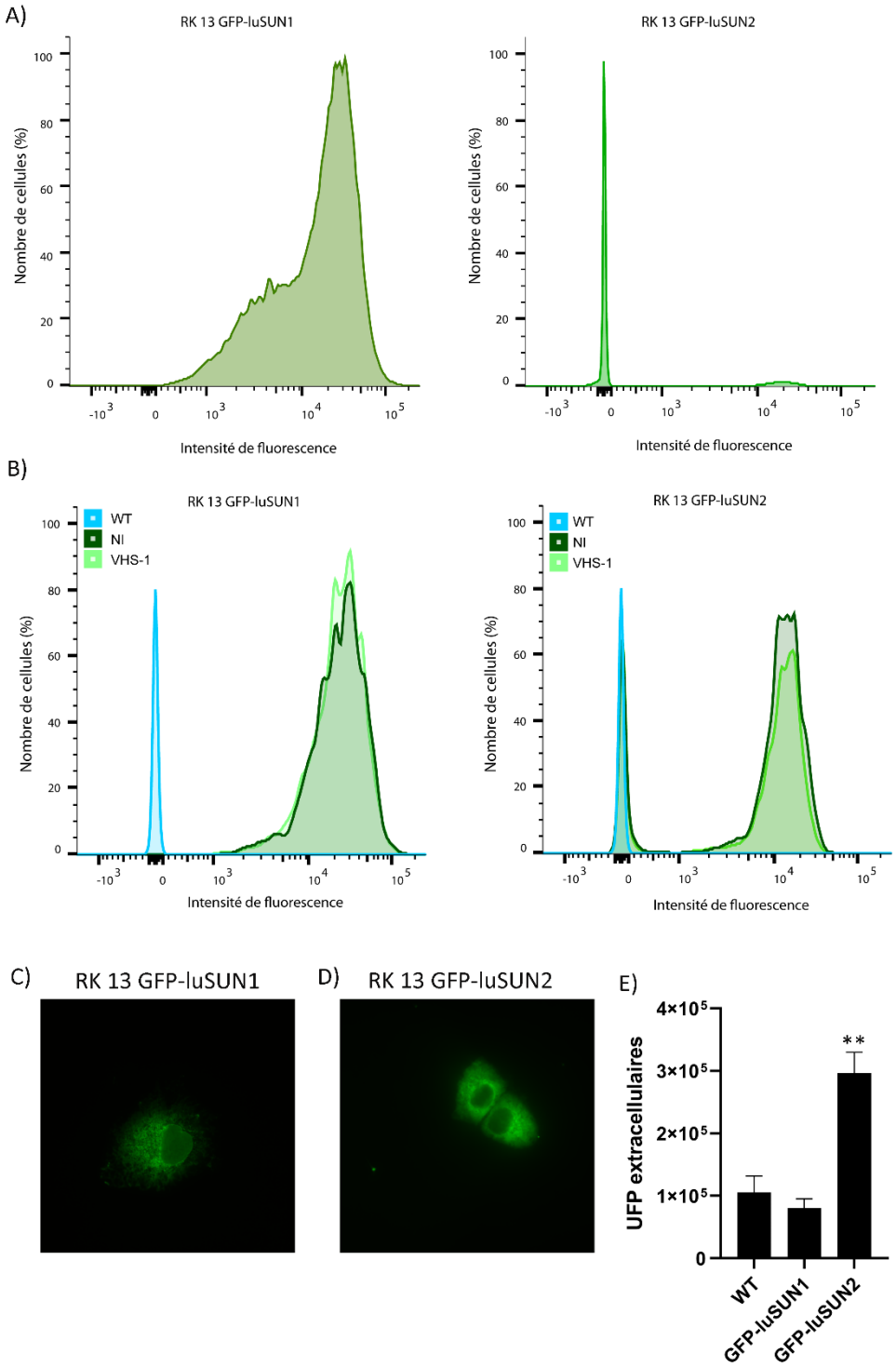

Figure 19. – Lignées cellulaires RK 13 stables. A) Les lignées RK 13 GFP-luSUN1 ou SUN2 ont été triées par FACS dès leur réception et les cellules positives pour la GFP ont été mises en culture pendant quelques passages et utilisées pour les expériences ultérieures. Veuillez noter la perte de SUN2 avec le temps. B) Les trois lignées cellulaires RK 13 ont été infectées par le VHS-1 ou non (NI) avec MOI = 2 pendant 12 heures et ont été collectées

pour être analysées par FACS (matériel et méthodes). C et D) Les cellules RK 13 ont été ensemencées sur des lames et fixées avec du PFA 3% pour une visualisation microscopique. E) Après l'infection décrite au point B), le surnageant a été récolté et titré par essai de plaque (matériel et méthodes), n=4 les barres d'erreur représentent le SEM, analyse statistique par ANOVA unidirectionnelle où les valeurs p sont ≤ 0,05 ; *, ≤ 0,01 ; ** et ≤ 0,001 ; ***

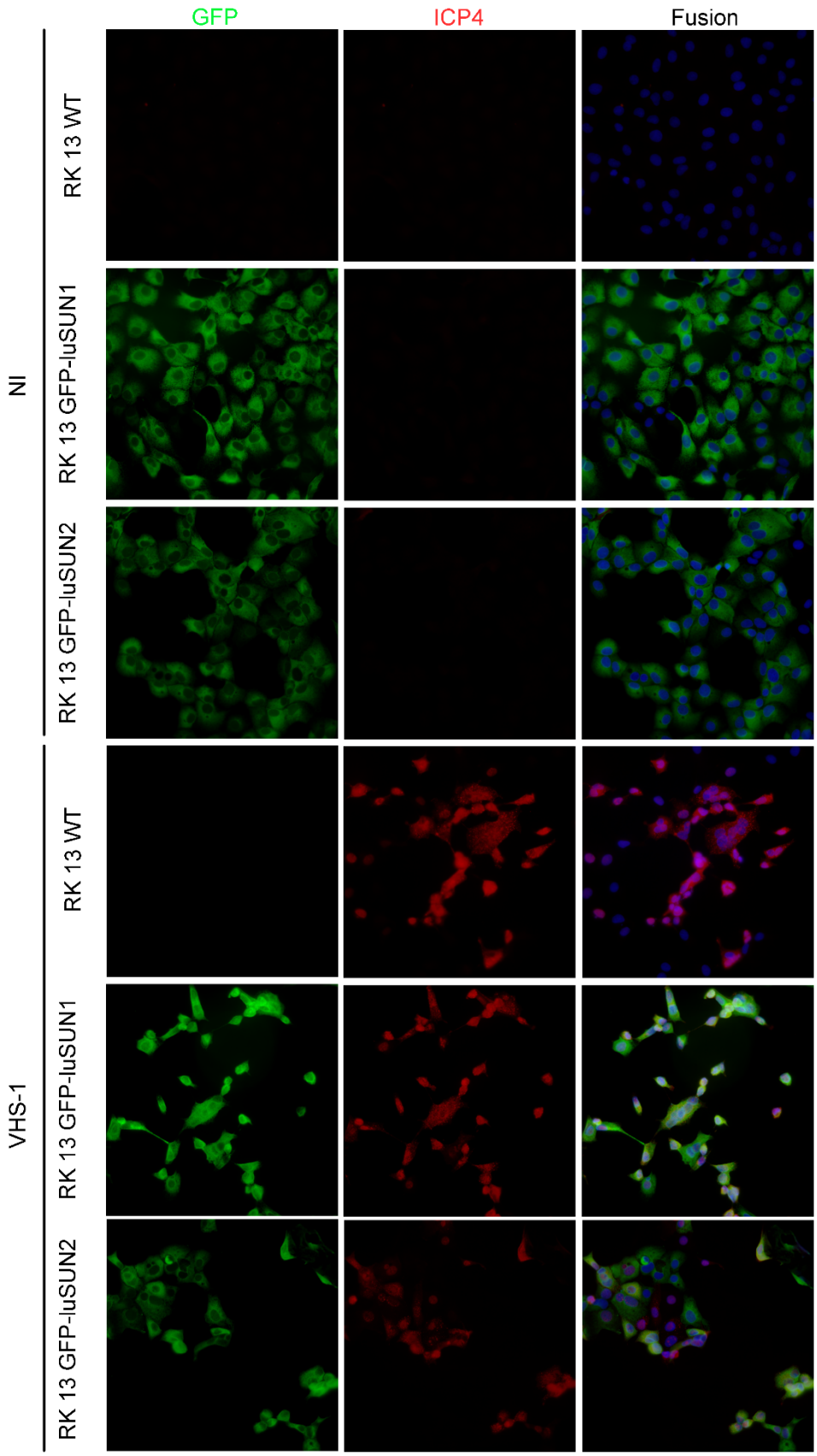
GFP
ICP4
Fusion
NI
VHS-1
RK 13 WT
RK 13 GFP-luSUN1
RK 13 GFP-luSUN2
RK 13 WT
RK 13 GFP-luSUN1
RK 13 GFP-luSUN2

Figure 20. – Les lignées cellulaires stables RK 13 sont susceptibles à l'infection par le VHS-1. La lignée cellulaire RK 13 et ses dérivées ont été ensemencées dans des plaques à six puits avec des lamelles, puis infectées ou pas (NI) par le VHS-1 avec un MOI = 2 pendant 12 heures, après quoi elles ont été fixées avec du PFA. Les cellules ont été perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-ICP4 et visualisées par microscopie (voir matériel et méthodes). Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes.

4.4. Une faible expression des mutants dominants négatifs ne produit pas d'impact sur le VHS-1

Suite aux observations microscopiques, une différence de niveau d'expression entre les lignées inductibles 143B et les RK 13 constitutives a été suspectée. Pour évaluer ceci, l'immunobuvardage a été réalisé afin de visualiser s'il existe des différences dans l'expression des protéines mutantes entre les lignées cellulaires inductibles et les constitutives (**Figure 21 A**). En effet, une grande différence a été trouvée entre les lignées cellulaires, ce qui a ouvert la possibilité que l'absence d'impact sur le VHS-1 dans la lignée 143B soit due à l'expression plus faible des formes dominantes négatives des protéines SUN. Afin d'effectuer une comparaison au sein de la même lignée cellulaire entre un niveau d'expression plus élevé et plus faible, les lignées 143B induites ont été triées selon leur niveau d'expression de SUN1 ou 2 (**Figure 21 B**). Les lignées cellulaires ont été induites ou non avec la DOX pendant 24 heures avant l'infection et infectées pour 12 HPI avant le tri par FACS. Comme indiqué précédemment, l'infection est capable d'induire un niveau d'expression basal dans le système, par conséquent, les cellules non exposées à la DOX mais infectées ont été considérées comme négatives pour le tri. Après sélection, l'essai de plaques de la fraction cellulaire des cellules récupérées fut effectué, vu l'impossibilité de récupérer le surnageant des populations triées (voir protocole de tri, matériel et méthodes). Toutefois, comme dans le cas du pool cellulaire, aucun impact sur la propagation du virus n'a été observé, on constate même qu'il n'y a pas de différence sur le titre viral entre les lignées 143B GFP-luSUN1 ou SUN2 non induites et induites par la DOX (**Figure 21 C**). Cela nous a conduits à évaluer si le niveau d'expression des cellules à forte expression peut être comparable à celui des cellules RK 13. Au fait, même la population à forte expression est loin derrière le niveau des RK 13 (**Figure 21 D**), de sorte que l'expression des protéines mutantes dans les cellules 143B peut ne pas être

suffisamment élevée pour produire un effet. Il est bien entendu possible que le type de cellule, 143B ou RK 13, ait aussi un impact sur l'interaction du virus avec SUN (la lignée 143B est d'origine humaine alors que les RK 13 sont des cellules de lapin ; les constructions SUN sont humaines).

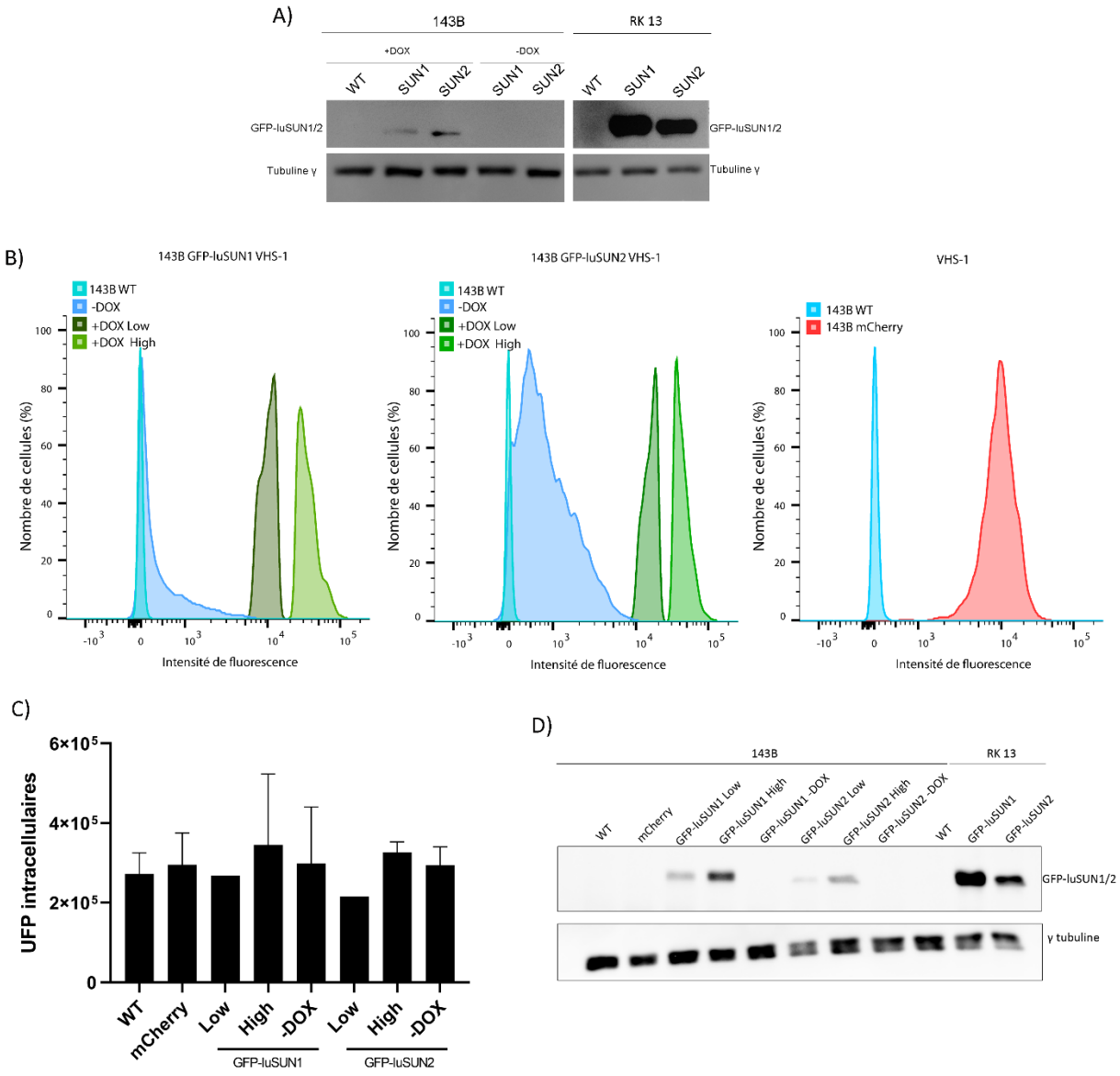

Figure 21. – Lignées 143B à fort et à faible taux d'expression. A) Les cellules 143B ont été exposées ou non au DOX pendant 24 heures et collectées avec les lignes RK 13 avec du tampon RIPA. Cinquante microgrammes de protéines de chaque condition ont été chargés dans un gel SDS-PAGE et transférés sur une membrane PVDF. Les protéines d'intérêt ont été détectées à l'aide de l'anticorps anti-GFP ou anti-gamma tubuline. B) Les lignées 143B ont été induites (+DOX) ou non (-DOX) et infectées avec le VHS-1 à un MOI = 2. Après 12 heures d'infection, les

cellules ont été collectées pour être triées par FACS (voir matériel et méthodes). Des cellules positives à la GFP ont été récupérées dans deux sous-populations, à fort (High) et à faible (Low) niveau d'expression. Les cellules 143B wt et mCherry ont suivi le même traitement, mais n'ont pas été divisées en deux populations. Cent quinze mille cellules ont été récupérées dans chaque cas. C) Les cellules récupérées en B) ont été titrées par essai de plaques, n=2, les barres d'erreur représentent le SEM. L'analyse avec ANOVA unidirectionnelle ne montre aucune différence significative entre les échantillons. D) Les cellules triées en B) ont été remises en suspension dans le tampon RIPA. Quinze microgrammes de protéines de chaque condition ont été chargés dans un gel SDS-PAGE et transférés sur une membrane PVDF. Les protéines d'intérêt ont été détectées à l'aide de l'anticorps anti-GFP ou anti-gamma tubuline.

4.5. La déplétion de SUN2 a une tendance provirale

Vu que la perturbation du complexe LINC a des effets proviraux sur le VHS-1, comme le démontre la surexpression de la forme luminale de SUN2, on s'est par la suite demandé quel effet aurait la déplétion des protéines SUN1 ou SUN2 sur la propagation du virus. La suppression des protéines endogènes SUN1 ou SUN2 chez les cellules 143B a donc été effectuée. Le niveau d'expression après la transfection du dsiARN a été analysé par RT-qPCR, montrant une inhibition de l'expression de 70% en moyenne (**Figure 22 A**). Ces inhibitions étaient spécifiques puisque la déplétion d'une protéine SUN n'a pas affecté le niveau d'ARNm de l'autre (**Figure 22 B**), tel qu'anticipé (342). Après une transfection de dsiARN non spécifique (dsiCTL) ou contre SUN1 ou SUN2 pendant 48 heures, les cellules ont été infectées par le VHS-1 et les titres viraux ont été déterminés par essai de plaques. Les résultats montrent une tendance provirale de la déplétion de SUN2, tel qu'observé pour les cellules RK 13 GFP-luSUN2, bien que l'effet soit faible (**Figure 22 C**). Il est probable que cela soit dû au fait que, bien qu'il y ait eu une diminution significative de l'ARN des deux protéines à domaine SUN, cela ne se reflète peut-être pas autant au niveau des protéines. L'immunobuvardage serait nécessaire pour vérifier le niveau de protéine dans les cellules, cependant, l'impossibilité de détecter la protéine endogène probablement due à son faible niveau basal nous a empêchés de réaliser cette expérience. Pour résoudre ce problème, une immunoprécipitation à la suite de la transfection avec le dsi non spécifique ou contre SUN2 a été effectuée. Étant donné que cette protéine est enrichie dans les échantillons, l'immunobuvardage révèle qu'il y a effectivement une forte réduction de la protéine (**Figure 22 D**).

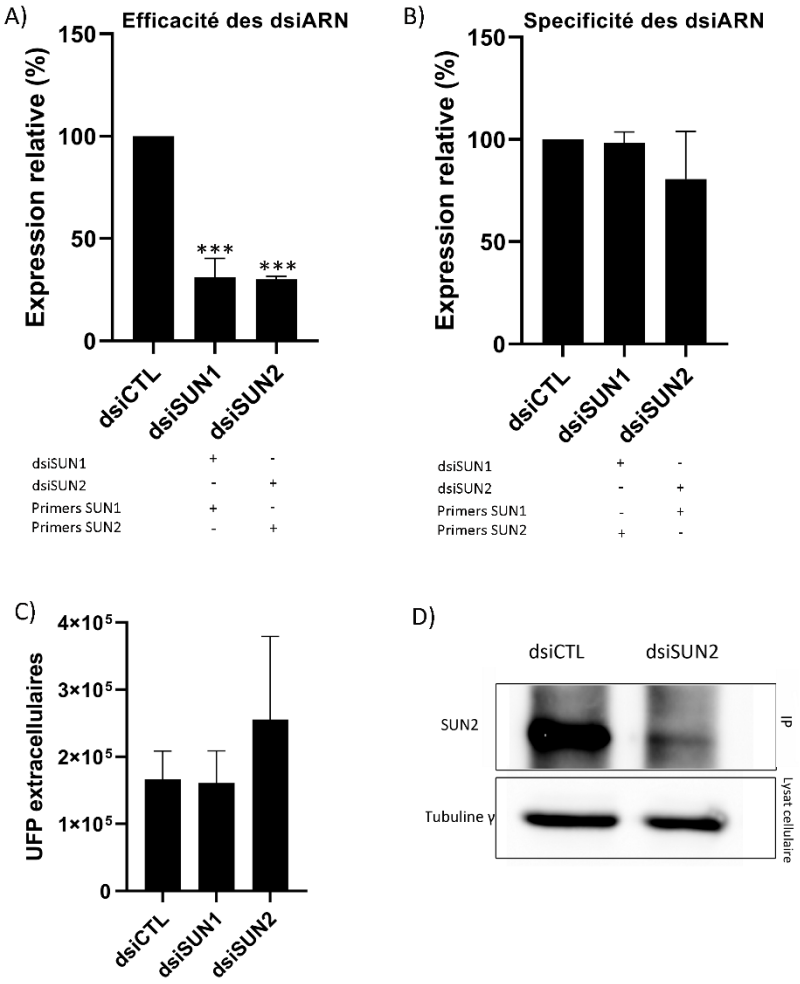

Figure 22. – Déplétion des protéines endogènes SUN1 ou SUN2. Les cellules 143B ont été transfectées avec les dsiRNA dirigés contre leur cible pendant 48 h avec le LipoJet. A) Efficacité des dsiARN. Quantification relative par RT-qPCR de l'expression de SUN1 o SUN2 après transfection avec dsiSUN1 ou dsiSUN2 respectivement par rapport aux cellules traitées avec le dsiARN non spécifique. Les barres d'erreur représentent la SEM. Les différences significatives entre les conditions traitées et le dsiARN non spécifique (dsiCTL) ont été analysées avec ANOVA unidirectionnelle (*, P<0,05 ; **, P<0.01; ***, P<0.001; **** P<0.0001). B) Spécificité des dsiARN. L'expression des gènes SUN1 dans les cellules 143B traitées par dsiSUN2 et des gènes SUN2 dans les cellules traitées par dsiSUN1 a été analysée par RT-qPCR. Les barres d'erreur représentent la SEM. Aucune différence significative n'a été constatée par rapport au dsiCTL. C) Après le traitement avec les dsiARN, les cellules 143B ont été infectées pendant 12 heures à un MOI = 2. Le surnageant a été collecté et titré par essai de plaques. Les données de trois expériences indépendantes sont représentées. Les barres d'erreur représentent la SEM. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée. D) Après traitement par dsiRNA, les cellules ont été récoltées avec le tampon de lyse pour IP (matériel et méthodes). Cinquante (IP) ou trente (lysat cellulaire) microlitres de protéines de chaque condition ont été chargés dans un gel SDS-PAGE 8% et transférés sur une

membrane PVDF. Les protéines d'intérêt ont été détectées à l'aide de l'anticorps anti-SUN2 ou anti-gamma tubuline (voir matériel et méthodes).

Chapitre 5 – Discussion

L'implication du complexe LINC dans le contexte des infections virales par des virus appartenant ou non aux herpèsvirus a été démontrée précédemment (219, 377-381, 398-400). La structure de base de ce complexe est formée par deux types de protéines, les protéines SUN, ancrées à la MNI et les protéines KASH, ancrées à la MNE, interagissant entre elles dans l'EPN (276). L'objectif du présent projet était de déterminer l'impact du complexe LINC sur la propagation du VHS-1. En particulier, deux des protéines de la famille SUN, SUN1 et SUN2, d'expression ubiquitaire, ont été étudiées. Notre hypothèse était que l'intégrité du complexe LINC est impliquée dans le processus menant à la libération des capsides virales du VHS-1 du noyau. Cette hypothèse est basée sur les observations faites par Klupp *et coll.* (219) concernant le virus PrV, un proche parent du VHS-1. L'étude de Klupp *et coll*. suggère une implication du complexe LINC, en particulier SUN2, dans la fusion des virions périnucléaires avec la MNE. Le passage du noyau au cytoplasme est également une étape clé du cycle du VHS-1 et, bien que le processus de l'enveloppement primaire soit assez bien caractérisé, le processus par lequel la fusion de cette enveloppe avec la MNE survient et, en conséquence, le relâchement des nucléocapsides dans le cytoplasme, n'est pas encore complètement élucidé. Les résultats de notre projet montrent que, contrairement à ce qui a été constaté pour le PrV, la perturbation du complexe LINC par le biais de l'expression d'un mutant dominant de SUN2 a un effet proviral sur le VHS-1.

Pour atteindre l'objectif de notre projet, la même stratégie que Klupp *et coll.* pour la perturbation du complexe LINC a été utilisée, soit la surexpression des mutants dominants négatifs de SUN1 ou SUN2. L'impossibilité d'obtenir un taux élevé de surexpression transitoire et d'infection nous a conduits à établir des lignées cellulaires stables qui ne conservant pas la réponse au stress produite par la transfection d'ADN, puisqu'il est possible que cette réponse soit ce qui empêche une infection ultérieure, comme détaillée dans la section des résultats. Cependant, plusieurs tentatives de génération de lignées stables constitutives avec des cellules humaines ont échoué, car l'expression de l'ADN introduit disparaissait le long des passages, rendant impossible l'obtention de populations cellulaires suffisamment nombreuses pour être infectées. Ce fait a soulevé l'hypothèse d'une possible toxicité pour les cellules de la surexpression des formes

mutantes de SUN1 ou SUN2, qui a été renforcée après la réception des cellules constitutives stables utilisées dans l'étude de la propagation du PrV, étant donné qu'il a été nécessaire de sélectionner la population GFP-positive par FACS en raison de sa tendance à expulser les constructions (**Figure 19 A**). Ce problème de toxicité cellulaire a été résolu en établissant des lignées cellulaires avec un système TET-on (384) (**Figure 17**). En même temps, il a été possible de comparer les données obtenues à partir des cellules humaines inductibles à celles obtenues à partir des cellules établies par Klupp *et coll*. Bien que les cellules reçues ne soient pas des cellules humaines, en principe le seul hôte du VHS-1, les cellules de lapin ont été utilisées dans plusieurs études sur le VHS-1 (396, 397) et se sont révélées susceptibles d'être infectées dans notre étude (**Figure 20**). Malgré le fait que les cellules humaines inductibles surexpriment les formes dominantes négatives de SUN1 ou SUN2 après induction et se montrent sensibles à l'infection par le VHS-1 (**Figures 17 B et 18**), on ne constate aucun impact sur la propagation virale (**Figure 17 E**). Cependant, dans le cas des cellules de lapin, un effet proviral marqué a été observé en cas de surexpression du mutant dominant négatif SUN2, contrairement à ce qui a été rapporté pour le PrV. Cette différence dans l'influence sur le VHS-1 nous a conduits à comparer le niveau d'expression des constructions entre ces deux types de cellules, ce qui a permis de mettre en évidence le faible niveau d'expression des cellules humaines inductibles par rapport aux cellules de lapin (**Figure 21 A**). Néanmoins, après avoir mesuré l'impact sur le virus des cellules humaines exprimant des niveaux plus élevés de SUN1 ou SUN2 mutants, aucune différence n'est observée avec les cellules n'exprimant pas les constructions (**Figure 21 C**), bien que cela puisse être dû au fait qu'il existe encore une grande différence avec le niveau d'expression des cellules constitutives ou que ce soit lié au type cellulaire. La suppression des protéines SUN aurait en principe le même effet que la surexpression des formes négatives dominantes, la perturbation du complexe LINC. Pour vérifier cela, on a déterminé l'impact sur la production virale après suppression de ces protéines dans les cellules humaines (**Figure 22**). Bien qu'aucun effet significatif n'ait été observé, on note une tendance provirale et reproductible de la délétion de SUN2.

Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour éclairer les processus qui sous-tendent cette divergence de résultats entre le PrV et le VHS. Des analyses par microscopie électronique comparant les cellules constitutives de lapin aux cellules inductibles humaines et

aux cellules dans lesquelles la suppression du SUN2 s'est produite pourraient apporter un éclairage sur les effets produits au niveau de l'EPN dans ces trois conditions. L'observation ou non de différences dans la largeur de l'EPN pourrait être l'une des explications possibles de la diversité des impacts sur la propagation du VHS-1 rencontrés. En appui de l'importance de la largeur de l'EPN, au cours de son cycle viral, le cytomégalovirus (CMV), un autre membre des herpèsvirus humains, provoque des déformations de l'EN, en particulier à proximité de son compartiment d'assemblage, une structure cytoplasmique formée par des éléments de l'appareil de Golgi, le TGN et les endosomes, où il acquiert son tégument (401). Buchkovich *et coll.* (400) ont observé que pendant l'infection par le CMV, il est nécessaire de découpler les membranes nucléaires, et à cette fin il survient une diminution des protéines SUN, à la fois SUN1 et SUN2, bien que la diminution de SUN2 se produise quelques heures avant celle de SUN1. Cela pourrait être une explication possible de l'effet proviral de la déplétion ou de la mutation de SUN2, puisque, au moins dans le cas du CMV, les niveaux de cette protéine sont diminués dans le cours normal de l'infection. Buchkovich *et coll.* suggèrent que la séparation entre les deux membranes nucléaires produite par le manque de protéines SUN aiderait le virus dans son passage à travers l'EPN. La réalisation d'infections ponctuelles et l'analyse des niveaux de SUN1 ou de SUN2 par immunobuvardage tout au long de l'infection par le VHS-1 pourraient nous donner un indice sur l'importance des protéines SUN au niveau de l'EPN. En plus du possible impact de largeur de l'EPN sur le VHS-1, il est possible que les effets produits par le SUN2 sur le VHS-1 soient dus aux interactions qui se produisent dans la MNI. Le fait qu'uniquement SUN2 et non SUN1 ait un effet proviral sur le VHS-1 suggère que les partenaires d'interaction exclusifs du SUN2 sur les INM sont impliqués. Parmi eux, TMEM43B, une protéine impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'EN, a récemment été identifiée comme un partenaire d'interaction gM, bien que le rôle de cette interaction n'ait pas encore été déterminé (338, 402).

Toutefois, il est possible que le rôle de SUN2 sur le VHS-1 ne se produise pas uniquement au noyau. En effet, comme décrit dans la littérature, SUN2 a également un rôle en dehors du noyau (327). Le fait que l'impact sur le cycle viral se produise par étapes après la sortie des nucléocapsides du noyau dans le cas du VHS-1 est une possibilité à prendre en compte, d'autant plus lorsque SUN1, dont aucun rôle en dehors de l'EN n'a été décrit, n'a pas d'effet sur le VHS-1.

Par exemple, SUN2, mais pas SUN1, peut interagir avec Rab5, qui est lié au trafic endosomal et à la fusion des membranes (403). La maturation des particules virales du VHS-1 a été liée au TGN et aux endosomes, et l'implication de Rab5 dans la propagation du virus a été démontrée (121). En outre, des études récentes sur la levure identifient le TGN comme un point critique pour réguler la progression de la voie du trafic endosomal (403). Bien entendues, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'implication de SUN2 en collaboration avec Rab5 sur la propagation de la VHS-1. La co-immunoprécipitation et la co-localisation par IF de la forme mutante dominante négative de SUN2 avec Rab5 nous donneraient des indices sur l'interaction de ces deux protéines, car, comme mentionné auparavant, le domaine SUN n'est pas requis pour la co-immunoprécipitation avec Rab5, mais il est important pour la localisation de SUN2 aux endosomes (327).

Les résultats obtenus dans ce projet n'excluent pas que l'effet du complexe LINC sur le VHS-1 soit lié au type de cellule. Cette situation ne serait pas inhabituelle, car des exigences distinctes ont été démontrées pour différents types de cellules. Par exemple, le mutant du VHS-1 avec une délétion du gène codant pour pUL20 n'est pas capable de former des plages dans les cellules Vero et la microscopie électronique montre une stagnation des capsides à l'EN, alors que de petites plages se forment dans le cas des cellules 143B. Cela peut s'expliquer par le fait que, selon le type de cellule, des facteurs cellulaires peuvent compenser l'absence de pUL20 (404). En outre, d'autres études ont également montré des différences dans la relation entre pUS3 et pUL34 au moment du processus d'enveloppement – déenveloppement, pUS3 étant une kinase capable de phosphoryler pUL34 et de modifier sa fonction, selon le type cellulaire (405). Dans ce cas, la délétion de pUS3 a une influence différente sur les cellules HEp-2 (cellules épithéliales humaines) et les cellules Vero, ce qui suggère qu'en l'absence de pUL3, des facteurs cellulaires peuvent remplacer la fonction de pUS3 dans le cas des cellules Vero (405).

Chapitre 6 – Conclusion

Sur la base des résultats obtenus dans le cadre de ce projet, nous pouvons conclure que le complexe LINC joue un rôle important dans la propagation du VHS-1. Toutefois, ce rôle est susceptible d'être déterminé par le type de cellulaire. Des expériences supplémentaires visant à déterminer la localisation subcellulaire dans laquelle l'influence de SUN2 est exercée sur le cycle du VHS-1, ainsi que l'utilisation d'une plus grande diversité de lignées cellulaires nous permettrait d’avoir une perspective plus large des effets du complexe LINC sur le VHS-1.

Références bibliographiques

1. Malraux A, Poccident L. The family Herpesviridae: an update. Arch Virol. 1992;123:425-49.
2. Roizman BJFv. The family Herpesviridae: a brief introduction. In: Fields BN, M. P, Howley M, E. D, Griffin PD, A. R, et al., editors. Fields - Virology. 2. 4th ed: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2001.
3. Roizman B, Baines J. The diversity and unity of Herpesviridae. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1991;14(2):63-79.
4. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, et al. The order Herpesvirales. Arch Virol. 2009;154(1):171-7.
5. Loret S, Guay G, Lippé R. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. J Virol. 2008;82(17):8605-18.
6. Lei X, Bai Z, Ye F, Huang Y, Gao SJ. Regulation of herpesvirus lifecycle by viral microRNAs. Virulence. 2010;1(5):433-5.
7. Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. J Oral Microbiol. 2013;5.
8. Davison AJ. Herpesvirus systematics. Vet Microbiol. 2010;143(1):52-69.
9. Riddell A, Jeffery-Smith A, Tong CYW. Herpesviruses. Medicine. 2017;45(12):767-71.
10. Wertheim JO, Smith MD, Smith DM, Scheffler K, Kosakovsky Pond SL. Evolutionary origins of human herpes simplex viruses 1 and 2. Mol Biol Evol. 2014;31(9):2356-64.
11. Sehrawat S, Kumar D, Rouse BT. Herpesviruses: Harmonious Pathogens but Relevant Cofactors in Other Diseases? Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:177.
12. Roizman B, Whitley RJ. The nine ages of herpes simplex virus. Herpes. 2001;8(1):23-7.
13. Shakespeare W. Romeo and Juliet1597-1599.
14. Lipschutz B. Untersuchungen über die Ätiologie der Krankheit der Herpesgruppe (Herpes zoster, Herpes genitalis, Herpes frebrilis). Arch Dem Syph. 1921;136:428-82.
15. Schneweis vK-E. Serologische untersuchungen zur typendifferenzierung des herpesvirus hominis. Zeitschrift fur Immunitatsforschung und experimentelle therapie. 1962;124(1):24-+.
16. Dowdle WR, Nahmias AJ, Harwell RW, Pauls FP. Association of antigenic type of Herpesvirus hominis with site of viral recovery. J Immunol. 1967;99(5):974-80.
17. Buchman TG, Simpson T, Nosal C, Roizman B, Nahmias AJ. The structure of herpes simplex virus DNA and its application to molecular epidemiology. Ann N Y Acad Sci. 1980;354(1):279-90.
18. Strauss EG, Strauss JH. Viruses and human disease: Elsevier; 2007.
19. Whitley R, Baines J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future. F1000Res. 2018;7.
20. Wald A, Corey L. Persistence in the population: epidemiology, transmission. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
21. Whitley R, Kimberlin DW, Prober CG. Pathogenesis and disease. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.

22. Petti S, Lodi G. The controversial natural history of oral herpes simplex virus type 1 infection. Oral Dis. 2019;25(8):1850-65.
23. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect Dis. 2006;6:130.
24. Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, et al. Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis: Cambridge University Press; 2007.
25. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. Biochemistry (Mosc). 2014;79(13):1635-52.
26. Fan S, Cai H, Xu X, Feng M, Wang L, Liao Y, et al. The Characteristics of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Rhesus Macaques and the Associated Pathological Features. Viruses. 2017;9(2).
27. Thellman NM, Triezenberg SJ. Herpes Simplex Virus Establishment, Maintenance, and Reactivation: In Vitro Modeling of Latency. Pathogens. 2017;6(3).
28. Spruance SL. Pathogenesis of herpes simplex labialis: experimental induction of lesions with UV light. J Clin Microbiol. 1985;22(3):366-8.
29. Stock C, Guillen-Grima F, de Mendoza JH, Marin-Fernandez B, Aguinaga-Ontoso I, Kramer A. Risk factors of herpes simplex type 1 (HSV-1) infection and lifestyle factors associated with HSV-1 manifestations. Eur J Epidemiol. 2001;17(9):885-90.
30. Tabbara KF, Al Balushi N. Topical ganciclovir in the treatment of acute herpetic keratitis. Clin Ophthalmol. 2010;4:905-12.
31. Wilhelmus KR. The treatment of herpes simplex virus epithelial keratitis. Trans Am Ophthalmol Soc. 2000;98:505-32.
32. Ahmad B, Patel BC. Herpes Simplex Keratitis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
33. Duarte LF, Farias MA, Alvarez DM, Bueno SM, Riedel CA, Gonzalez PA. Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of the Central Nervous System: Insights Into Proposed Interrelationships With Neurodegenerative Disorders. Front Cell Neurosci. 2019;13:46.
34. Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. Lancet Neurol. 2007;6(11):1015-28.
35. Kennedy PG. Herpes simplex virus type 1 and Bell's palsy-a current assessment of the controversy. J Neurovirol. 2010;16(1):1-5.
36. Arbusow V, Schulz P, Strupp M, Dieterich M, von Reinhardstoettner A, Rauch E, et al. Distribution of herpes simplex virus type 1 in human geniculate and vestibular ganglia: implications for vestibular neuritis. Ann Neurol. 1999;46(3):416-9.
37. Boucher A, Herrmann JL, Morand P, Buzele R, Crabol Y, Stahl JP, et al. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016. Med Mal Infect. 2017;47(3):221-35.
38. Jorgensen LK, Dalgaard LS, Ostergaard LJ, Norgaard M, Mogensen TH. Incidence and mortality of herpes simplex encephalitis in Denmark: A nationwide registry-based cohort study. J Infect. 2017;74(1):42-9.
39. Le Doare K, Menson E, Patel D, Lim M, Lyall H, Herberg J. Fifteen minute consultation: managing neonatal and childhood herpes encephalitis. Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2015;100(2):58-63.
40. Koelle DM, Wald A. Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding. J Antimicrob Chemother. 2000;45 Suppl T3:1-8.

41. Kaufman HE. Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2-deoxyuridine. Proc Soc Exp Biol Med. 1962;109:251-2.
42. Tommila V. Treatment of Dendritic Keratitis with Interferon. Acta Ophthalmol (Copenh). 1963;41:478-82.
43. Carmine AA, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Trifluridine: a review of its antiviral activity and therapeutic use in the topical treatment of viral eye infections. Drugs. 1982;23(5):329-53.
44. Ch'ien LT, Cannon NJ, Charamella LJ, Dismukes WE, Whitley RJ, Buchanan RA, et al. Effect of adenine arabinoside on severe Herpesvirus hominis infections in man. J Infect Dis. 1973;128(5):658-63.
45. De Clercq E, Descamps J, De Somer P, Barr PJ, Jones AS, Walker RT. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(6):2947-51.
46. Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, de Miranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(12):5716-20.
47. Elion GB. Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. J Med Virol. 1993;Suppl 1(S1):2-6.
48. Schaeffer HJ, Beauchamp L, de Miranda P, Elion GB, Bauer DJ, Collins P. 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. Nature. 1978;272(5654):583-5.
49. Corey L, Fife KH, Benedetti JK, Winter CA, Fahnlander A, Connor JD, et al. Intravenous acyclovir for the treatment of primary genital herpes. Ann Intern Med. 1983;98(6):914-21.
50. Serota FT, Starr SE, Bryan CK, Koch PA, Plotkin SA, August CS. Acyclovir treatment of herpes zoster infections. Use in children undergoing bone marrow transplantation. JAMA. 1982;247(15):2132-5.
51. Razonable RR, editor Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. Mayo Clinic Proceedings; 2011: Elsevier.
52. Miller WH, Miller RL. Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. J Biol Chem. 1980;255(15):7204-7.
53. Miller WH, Miller RL. Phosphorylation of acyclovir diphosphate by cellular enzymes. Biochem Pharmacol. 1982;31(23):3879-84.
54. McGuirt PV, Furman PA. Acyclovir inhibition of viral DNA chain elongation in herpes simplex virus-infected cells. Am J Med. 1982;73(1A):67-71.
55. Hassan ST, Masarcikova R, Berchova K. Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. J Pharm Pharmacol. 2015;67(10):1325-36.
56. Spruance SL, Stewart JC, Rowe NH, McKeough MB, Wenerstrom G, Freeman DJ. Treatment of recurrent herpes simplex labialis with oral acyclovir. J Infect Dis. 1990;161(2):185-90.
57. Evans TG, Bernstein DI, Raborn GW, Harmenberg J, Kowalski J, Spruance SL. Double-blind, randomized, placebo-controlled study of topical 5% acyclovir-1% hydrocortisone cream (ME-609) for treatment of UV radiation-induced herpes labialis. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(6):1870-4.
58. Mindel A, Adler MW, Sutherland S, Fiddian AP. Intravenous acyclovir treatment for primary genital herpes. Lancet. 1982;1(8274):697-700.

59. Mantero V, Cossu M, Rigamonti A, Fiumani A, Basilico P, Tassi L, et al. HSV-1 encephalitis relapse after epilepsy surgery: a case report and review of the literature. J Neurovirol. 2020;26(1):138-41.
60. De Clercq E. Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. J Antimicrob Chemother. 1993;32 Suppl A:121-32.
61. Colla L, De Clercq E, Busson R, Vanderhaeghe H. Synthesis and antiviral activity of water-soluble esters of acyclovir [9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]guanine]. J Med Chem. 1983;26(4):602-4.
62. Weller S, Blum MR, Doucette M, Burnette T, Cederberg DM, de Miranda P, et al. Pharmacokinetics of the acyclovir pro-drug valaciclovir after escalating single- and multiple-dose administration to normal volunteers. Clin Pharmacol Ther. 1993;54(6):595-605.
63. De Clercq E, Field HJ. Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. Br J Pharmacol. 2006;147(1):1-11.
64. de Miranda P, Blum MR. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. J Antimicrob Chemother. 1983;12 Suppl B:29-37.
65. Birkmann A, Zimmermann H. HSV antivirals - current and future treatment options. Curr Opin Virol. 2016;18:9-13.
66. Hodge RAV. Famciclovir and Penciclovir. The Mode of Action of Famciclovir Including Its Conversion to Penciclovir. Antiviral Chemistry and Chemotherapy. 1993;4(2):67-84.
67. Wilhelmus KR. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. Cochrane Database Syst Rev. 2015;1:CD002898.
68. Treister NS, Woo SB. Topical n-docosanol for management of recurrent herpes labialis. Expert Opin Pharmacother. 2010;11(5):853-60.
69. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(2):459-72.
70. Garikapati S, Nguyen M. Foscarnet. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
71. Veselenak RL, Shlapobersky M, Pyles RB, Wei Q, Sullivan SM, Bourne N. A Vaxfectin((R))-adjuvanted HSV-2 plasmid DNA vaccine is effective for prophylactic and therapeutic use in the guinea pig model of genital herpes. Vaccine. 2012;30(49):7046-51.
72. Bernstein DI, Flechtner JB, McNeil LK, Heineman T, Oliphant T, Tasker S, et al. Therapeutic HSV-2 vaccine decreases recurrent virus shedding and recurrent genital herpes disease. Vaccine. 2019;37(26):3443-50.
73. Mertz GJ. Asymptomatic shedding of herpes simplex virus 1 and 2: implications for prevention of transmission. J Infect Dis. 2008;198(8):1098-100.
74. James SH, Sheffield JS, Kimberlin DW. Mother-to-Child Transmission of Herpes Simplex Virus. J Pediatric Infect Dis Soc. 2014;3 Suppl 1(Suppl 1):S19-23.
75. Aubert M, Strongin DE, Roychoudhury P, Loprieno MA, Haick AK, Klouser LM, et al. Gene editing and elimination of latent herpes simplex virus in vivo. Nat Commun. 2020;11(1):4148.
76. Podevin N, Davies HV, Hartung F, Nogue F, Casacuberta JM. Site-directed nucleases: a paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. Trends Biotechnol. 2013;31(6):375-83.

77. Grunewald K, Desai P, Winkler DC, Heymann JB, Belnap DM, Baumeister W, et al. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. Science. 2003;302(5649):1396-8.
78. Bello-Morales R, Lopez-Guerrero JA. Isolation/Analysis of Extracellular Microvesicles from HSV-1-Infected Cells. Methods Mol Biol. 2020;2060:305-17.
79. Laine RF, Albecka A, van de Linde S, Rees EJ, Crump CM, Kaminski CF. Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging. Nat Commun. 2015;6:5980.
80. Roizman B, Knipe D, Whitley R. Herpes simplex viruses. In: Williams L, editor. Fields virology. 2. 6 ed. Philadelphia, PA2013. p. 1823–97.
81. Whisnant AW, Jurges CS, Hennig T, Wyler E, Prusty B, Rutkowski AJ, et al. Integrative functional genomics decodes herpes simplex virus 1. Nat Commun. 2020;11(1):2038.
82. Boehmer PE, Lehman IR. Herpes simplex virus DNA replication. Annu Rev Biochem. 1997;66:347-84.
83. Wadsworth S, Jacob RJ, Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. J Virol. 1975;15(6):1487-97.
84. Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM. Herpes simplex virus. Front Biosci. 2002;7:d752-64.
85. Mahiet C, Ergani A, Huot N, Alende N, Azough A, Salvaire F, et al. Structural variability of the herpes simplex virus 1 genome in vitro and in vivo. J Virol. 2012;86(16):8592-601.
86. Heming JD, Conway JF, Homa FL. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2017;223:119-42.
87. Ward PL, Roizman B. Herpes simplex genes: the blueprint of a successful human pathogen. Trends Genet. 1994;10(8):267-74.
88. Everett RD. HSV-1 Biology and Life Cycle. In: Diefenbach RJ, Fraefel C, editors. Herpes Simplex Virus: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 1-17.
89. Honess RW, Roizman B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. J Virol. 1974;14(1):8-19.
90. Crump C. Virus Assembly and Egress of HSV. In: Kawaguchi Y, Mori Y, Kimura H, editors. Human Herpesviruses. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 23-44.
91. Honess RW, Roizman B. Proteins specified by herpes simplex virus. XI. Identification and relative molar rates of synthesis of structural and nonstructural herpes virus polypeptides in the infected cell. J Virol. 1973;12(6):1347-65.
92. Wildy P, Russell WC, Horne RW. The morphology of herpes virus. Virology. 1960;12:204-22.
93. Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A. 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):4922-31.
94. Wang J, Yuan S, Zhu D, Tang H, Wang N, Chen W, et al. Structure of the herpes simplex virus type 2 C-capsid with capsid-vertex-specific component. Nat Commun. 2018;9(1):3668.
95. Newcomb WW, Trus BL, Booy FP, Steven AC, Wall JS, Brown JC. Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. J Mol Biol. 1993;232(2):499-511.
96. Schrag JD, Prasad BV, Rixon FJ, Chiu W. Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid. Cell. 1989;56(4):651-60.

97. Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK, et al. The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. J Virol. 2001;75(22):10923-32.
98. McElwee M, Vijayakrishnan S, Rixon F, Bhella D. Structure of the herpes simplex virus portal-vertex. PLoS Biol. 2018;16(6):e2006191.
99. Lwoff A, Anderson TF, Jacob F. [Remarks on the characteristics of the infectious viral particle]. Ann Inst Pasteur (Paris). 1959;97:281-9.
100. Spencer JV, Newcomb WW, Thomsen DR, Homa FL, Brown JC. Assembly of the herpes simplex virus capsid: preformed triplexes bind to the nascent capsid. J Virol. 1998;72(5):3944-51.
101. Toropova K, Huffman JB, Homa FL, Conway JF. The herpes simplex virus 1 UL17 protein is the second constituent of the capsid vertex-specific component required for DNA packaging and retention. J Virol. 2011;85(15):7513-22.
102. Dai X, Zhou ZH. Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes. Science. 2018;360(6384).
103. Desai P, DeLuca NA, Person S. Herpes simplex virus type 1 VP26 is not essential for replication in cell culture but influences production of infectious virus in the nervous system of infected mice. Virology. 1998;247(1):115-24.
104. Stevenson AJ, Morrison EE, Chaudhari R, Yang CC, Meredith DM. Processing and intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 proteinase. J Gen Virol. 1997;78 (Pt 3):671-5.
105. Sheaffer AK, Newcomb WW, Brown JC, Gao M, Weller SK, Tenney DJ. Evidence for controlled incorporation of herpes simplex virus type 1 UL26 protease into capsids. J Virol. 2000;74(15):6838-48.
106. Owen DJ, Crump CM, Graham SC. Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. Viruses. 2015;7(9):5084-114.
107. Henaff D, Remillard-Labrosse G, Loret S, Lippe R. Analysis of the early steps of herpes simplex virus 1 capsid tegumentation. J Virol. 2013;87(9):4895-906.
108. Loret S, Lippe R. Biochemical analysis of infected cell polypeptide (ICP)0, ICP4, UL7 and UL23 incorporated into extracellular herpes simplex virus type 1 virions. J Gen Virol. 2012;93(Pt 3):624-34.
109. Radtke K, Kieneke D, Wolfstein A, Michael K, Steffen W, Scholz T, et al. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. PLoS Pathog. 2010;6(7):e1000991.
110. Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. Virus Res. 2004;106(2):167-80.
111. Bohannon KP, Jun Y, Gross SP, Smith GA. Differential protein partitioning within the herpesvirus tegument and envelope underlies a complex and variable virion architecture. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(17):E1613-20.
112. Cardone G, Newcomb WW, Cheng N, Wingfield PT, Trus BL, Brown JC, et al. The UL36 tegument protein of herpes simplex virus 1 has a composite binding site at the capsid vertices. J Virol. 2012;86(8):4058-64.
113. Weinheimer SP, Boyd BA, Durham SK, Resnick JL, O'Boyle DR, 2nd. Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1. J Virol. 1992;66(1):258-69.

114. Roberts AP, Abaitua F, O'Hare P, McNab D, Rixon FJ, Pasdeloup D. Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1. J Virol. 2009;83(1):105-16.
115. Boutell C, Everett RD. Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins. J Gen Virol. 2013;94(Pt 3):465-81.
116. Hilterbrand AT, Heldwein EE. Go go gadget glycoprotein!: HSV-1 draws on its sizeable glycoprotein tool kit to customize its diverse entry routes. PLoS Pathog. 2019;15(5):e1007660.
117. van Genderen IL, Brandimarti R, Torrisi MR, Campadelli G, van Meer G. The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. Virology. 1994;200(2):831-6.
118. Wudiri GA, Schneider SM, Nicola AV. Herpes Simplex Virus 1 Envelope Cholesterol Facilitates Membrane Fusion. Front Microbiol. 2017;8:2383.
119. Beitia Ortiz de Zarate I, Kaelin K, Rozenberg F. Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. J Virol. 2004;78(3):1540-51.
120. Foster TP, Melancon JM, Olivier TL, Kousoulas KG. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K and the UL20 protein are interdependent for intracellular trafficking and trans-Golgi network localization. J Virol. 2004;78(23):13262-77.
121. Hollinshead M, Johns HL, Sayers CL, Gonzalez-Lopez C, Smith GL, Elliott G. Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus. EMBO J. 2012;31(21):4204-20.
122. Johnson DC, Baines JD. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. Nat Rev Microbiol. 2011;9(5):382-94.
123. Turcotte S, Letellier J, Lippe R. 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):8847-60.
124. Johns HL, Gonzalez-Lopez C, Sayers CL, Hollinshead M, Elliott G. Rab6 dependent post-Golgi trafficking of HSV1 envelope proteins to sites of virus envelopment. Traffic. 2014;15(2):157-78.
125. Zenner HL, Yoshimura S, Barr FA, Crump CM. Analysis of Rab GTPase-activating proteins indicates that Rab1a/b and Rab43 are important for herpes simplex virus 1 secondary envelopment. J Virol. 2011;85(16):8012-21.
126. Schelhaas M, Jansen M, Haase I, Knebel-Morsdorf D. Herpes simplex virus type 1 exhibits a tropism for basal entry in polarized epithelial cells. J Gen Virol. 2003;84(Pt 9):2473-84.
127. Karasneh GA, Shukla D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. Virol J. 2011;8:481.
128. Motamedifar M, Noorafshan A. Cytopathic effect of the herpes simplex virus type 1 appears stereologically as early as 4 h after infection of Vero cells. Micron. 2008;39(8):1331-4.
129. Aubert M, Blaho JA. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. J Virol. 1999;73(4):2803-13.
130. Cotter CR, Blaho JA. Detection of herpes simplex virus dependent apoptosis. Methods Mol Biol. 2009;559:371-87.
131. Khadivjam B. Impact of ATP-dependent RNA Helicase DDX3X on Herpes Simplex Type 1 (HSV-1) Replication. Montréal: Université de Montréal; 2016.

132. Arii J, Kawaguchi Y. The Role of HSV Glycoproteins in Mediating Cell Entry. Adv Exp Med Biol. 2018;1045:3-21.
133. Nicola AV. Herpesvirus Entry into Host Cells Mediated by Endosomal Low pH. Traffic. 2016;17(9):965-75.
134. Nicola AV, McEvoy AM, Straus SE. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. J Virol. 2003;77(9):5324-32.
135. Lycke E, Hamark B, Johansson M, Krotochwil A, Lycke J, Svennerholm B. Herpes simplex virus infection of the human sensory neuron. An electron microscopy study. Arch Virol. 1988;101(1-2):87-104.
136. Wittels M, Spear PG. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. Virus Res. 1991;18(2-3):271-90.
137. Turner A, Bruun B, Minson T, Browne H. 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):873-5.
138. Nicola AV, Straus SE. Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. J Virol. 2004;78(14):7508-17.
139. Komala Sari T, Pritchard SM, Cunha CW, Wudiri GA, Laws EI, Aguilar HC, et al. Contributions of herpes simplex virus 1 envelope proteins to entry by endocytosis. J Virol. 2013;87(24):13922-6.
140. Herold BC, Visalli RJ, Susmarski N, Brandt CR, Spear PG. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. J Gen Virol. 1994;75 (Pt 6):1211-22.
141. Shieh MT, WuDunn D, Montgomery RI, Esko JD, Spear PG. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. J Cell Biol. 1992;116(5):1273-81.
142. Herold BC, WuDunn D, Soltys N, Spear PG. 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):1090-8.
143. Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. Virology. 2000;275(1):1-8.
144. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. Cell. 1996;87(3):427-36.
145. Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, et al. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. Cell. 1999;99(1):13-22.
146. Fan Q, Longnecker R, Connolly SA. Substitution of herpes simplex virus 1 entry glycoproteins with those of saimiriine herpesvirus 1 reveals a gD-gH/gL functional interaction and a region within the gD profusion domain that is critical for fusion. J Virol. 2014;88(11):6470-82.
147. Gallagher JR, Saw WT, Atanasiu D, Lou H, Eisenberg RJ, Cohen GH. Displacement of the C terminus of herpes simplex virus gD is sufficient to expose the fusion-activating interfaces on gD. J Virol. 2013;87(23):12656-66.
148. Atanasiu D, Cairns TM, Whitbeck JC, Saw WT, Rao S, Eisenberg RJ, et al. Regulation of herpes simplex virus gB-induced cell-cell fusion by mutant forms of gH/gL in the absence of gD and cellular receptors. mBio. 2013;4(2).
149. Agelidis AM, Shukla D. Cell entry mechanisms of HSV: what we have learned in recent years. Future Virol. 2015;10(10):1145-54.

150. Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. J Cell Biol. 1997;136(5):1007-21.
151. Morgan C, Rose HM, Mednis B. Electron microscopy of herpes simplex virus. I. Entry. J Virol. 1968;2(5):507-16.
152. Miyamoto K, Morgan C. Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. XI. Entry and uncoating of herpes simplex virus. J Virol. 1971;8(6):910-8.
153. Triezenberg SJ, Kingsbury RC, McKnight SL. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. Genes Dev. 1988;2(6):718-29.
154. Sampath P, Deluca NA. Binding of ICP4, TATA-binding protein, and RNA polymerase II to herpes simplex virus type 1 immediate-early, early, and late promoters in virus-infected cells. J Virol. 2008;82(5):2339-49.
155. Gruffat H, Marchione R, Manet E. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. Front Microbiol. 2016;7:869.
156. Sekulovich RE, Leary K, Sandri-Goldin RM. The herpes simplex virus type 1 alpha protein ICP27 can act as a trans-repressor or a trans-activator in combination with ICP4 and ICP0. J Virol. 1988;62(12):4510-22.
157. McCarthy AM, McMahan L, Schaffer PA. Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient. J Virol. 1989;63(1):18-27.
158. Panagiotidis CA, Lium EK, Silverstein SJ. Physical and functional interactions between herpes simplex virus immediate-early proteins ICP4 and ICP27. J Virol. 1997;71(2):1547-57.
159. Quinlan MP, Chen LB, Knipe DM. The intranuclear location of a herpes simplex virus DNA-binding protein is determined by the status of viral DNA replication. Cell. 1984;36(4):857-68.
160. Kalamvoki M, Roizman B. ICP0 enables and monitors the function of D cyclins in herpes simplex virus 1 infected cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(34):14576-80.
161. Gu H, Roizman B. The two functions of herpes simplex virus 1 ICP0, inhibition of silencing by the CoREST/REST/HDAC complex and degradation of PML, are executed in tandem. J Virol. 2009;83(1):181-7.
162. Everett RD, Boutell C, Orr A. Phenotype of a herpes simplex virus type 1 mutant that fails to express immediate-early regulatory protein ICP0. J Virol. 2004;78(4):1763-74.
163. Gu B, Rivera-Gonzalez R, Smith CA, DeLuca NA. Herpes simplex virus infected cell polypeptide 4 preferentially represses Sp1-activated over basal transcription from its own promoter. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(20):9528-32.
164. Rivera-Gonzalez R, Imbalzano AN, Gu B, Deluca NA. The role of ICP4 repressor activity in temporal expression of the IE-3 and latency-associated transcript promoters during HSV-1 infection. Virology. 1994;202(2):550-64.
165. Sandri-Goldin RM. ICP27 mediates HSV RNA export by shuttling through a leucine-rich nuclear export signal and binding viral intronless RNAs through an RGG motif. Genes Dev. 1998;12(6):868-79.
166. Fontaine-Rodriguez EC, Knipe DM. Herpes simplex virus ICP27 increases translation of a subset of viral late mRNAs. J Virol. 2008;82(7):3538-45.
167. Lang FC, Li X, Vladmirova O, Li ZR, Chen GJ, Xiao Y, et al. Selective recruitment of host factors by HSV-1 replication centers. Dongwuxue Yanjiu. 2015;36(3):142-51.
168. Lukonis CJ, Weller SK. Formation of herpes simplex virus type 1 replication compartments by transfection: requirements and localization to nuclear domain 10. J Virol. 1997;71(3):2390-9.

169. Zhong L, Hayward GS. Assembly of complete, functionally active herpes simplex virus DNA replication compartments and recruitment of associated viral and cellular proteins in transient cotransfection assays. J Virol. 1997;71(4):3146-60.
170. Carbone R, Pearson M, Minucci S, Pelicci PG. PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. Oncogene. 2002;21(11):1633-40.
171. Bernardi R, Pandolfi PP. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. Oncogene. 2003;22(56):9048-57.
172. Everett RD, Murray J. ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection. J Virol. 2005;79(8):5078-89.
173. Gu H, Zheng Y. Role of ND10 nuclear bodies in the chromatin repression of HSV-1. Virol J. 2016;13:62.
174. Elias P, O'Donnell ME, Mocarski ES, Lehman IR. A DNA binding protein specific for an origin of replication of herpes simplex virus type 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(17):6322-6.
175. Wilkinson DE, Weller SK. The role of DNA recombination in herpes simplex virus DNA replication. IUBMB Life. 2003;55(8):451-8.
176. Crute JJ, Lehman IR. Herpes simplex-1 DNA polymerase. Identification of an intrinsic 5'----3' exonuclease with ribonuclease H activity. J Biol Chem. 1989;264(32):19266-70.
177. Weller SK, Coen DM. Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(9):a013011.
178. Strang BL, Stow ND. Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. J Virol. 2005;79(19):12487-94.
179. Aksyuk AA, Newcomb WW, Cheng N, Winkler DC, Fontana J, Heymann JB, et al. Subassemblies and asymmetry in assembly of herpes simplex virus procapsid. mBio. 2015;6(5):e01525-15.
180. Newcomb WW, Thomsen DR, Homa FL, Brown JC. Assembly of the herpes simplex virus capsid: identification of soluble scaffold-portal complexes and their role in formation of portal-containing capsids. J Virol. 2003;77(18):9862-71.
181. Brown JC, Newcomb WW. Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis. Curr Opin Virol. 2011;1(2):142-9.
182. Huang E, Perkins EM, Desai P. Structural features of the scaffold interaction domain at the N terminus of the major capsid protein (VP5) of herpes simplex virus type 1. J Virol. 2007;81(17):9396-407.
183. Maier O, Sollars PJ, Pickard GE, Smith GA. Visualizing Herpesvirus Procapsids in Living Cells. J Virol. 2016;90(22):10182-92.
184. Newcomb WW, Homa FL, Brown JC. Involvement of the portal at an early step in herpes simplex virus capsid assembly. J Virol. 2005;79(16):10540-6.
185. Newcomb WW, Homa FL, Thomsen DR, Booy FP, Trus BL, Steven AC, et al. Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. J Mol Biol. 1996;263(3):432-46.
186. Heming JD, Huffman JB, Jones LM, Homa FL. Isolation and characterization of the herpes simplex virus 1 terminase complex. J Virol. 2014;88(1):225-36.
187. Tong L, Stow ND. Analysis of herpes simplex virus type 1 DNA packaging signal mutations in the context of the viral genome. J Virol. 2010;84(1):321-9.

188. McClelland DA, Aitken JD, Bhella D, McNab D, Mitchell J, Kelly SM, et al. pH reduction as a trigger for dissociation of herpes simplex virus type 1 scaffolds. J Virol. 2002;76(15):7407-17.
189. Wu W, Newcomb WW, Cheng N, Aksyuk A, Winkler DC, Steven AC. Internal Proteins of the Procapsid and Mature Capsids of Herpes Simplex Virus 1 Mapped by Bubblegram Imaging. J Virol. 2016;90(10):5176-86.
190. Tandon R, Mocarski ES, Conway JF. The A, B, Cs of herpesvirus capsids. Viruses. 2015;7(3):899-914.
191. Cibulka J, Fraiberk M, Forstova J. Nuclear actin and lamins in viral infections. Viruses. 2012;4(3):325-47.
192. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. Curr Opin Microbiol. 2006;9(4):423-9.
193. Reynolds AE, Liang L, Baines JD. 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):5564-75.
194. Bjerke SL, Roller RJ. Roles for herpes simplex virus type 1 UL34 and US3 proteins in disrupting the nuclear lamina during herpes simplex virus type 1 egress. Virology. 2006;347(2):261-76.
195. Leach NR, Roller RJ. 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):127-37.
196. Leach N, Bjerke SL, Christensen DK, Bouchard JM, Mou F, Park R, et al. Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both UL34 and US3. J Virol. 2007;81(19):10792-803.
197. Simpson-Holley M, Baines J, Roller R, Knipe DM. Herpes simplex virus 1 U(L)31 and U(L)34 gene products promote the late maturation of viral replication compartments to the nuclear periphery. J Virol. 2004;78(11):5591-600.
198. Bigalke JM, Heldwein EE. Nuclear Exodus: Herpesviruses Lead the Way. Annu Rev Virol. 2016;3(1):387-409.
199. Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Osterrieder N, Mettenleiter TC. The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. J Virol. 2002;76(1):364-78.
200. Reynolds AE, Ryckman BJ, Baines JD, Zhou Y, Liang L, Roller RJ. 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):8803-17.
201. Draganova EB, Zhang J, Zhou ZH, Heldwein EE. Structural basis for capsid recruitment and coat formation during HSV-1 nuclear egress. Elife. 2020;9.
202. Morris JB, Hofemeister H, O'Hare P. Herpes simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein. J Virol. 2007;81(9):4429-37.
203. Mou F, Forest T, Baines JD. US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. J Virol. 2007;81(12):6459-70.
204. Park R, Baines JD. 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):494-504.

205. Webb BL, Hirst SJ, Giembycz MA. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. Br J Pharmacol. 2000;130(7):1433-52.
206. Yang K, Baines JD. Selection of HSV capsids for envelopment involves interaction between capsid surface components pUL31, pUL17, and pUL25. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(34):14276-81.
207. Funk C, Ott M, Raschbichler V, Nagel CH, Binz A, Sodeik B, et al. The Herpes Simplex Virus Protein pUL31 Escorts Nucleocapsids to Sites of Nuclear Egress, a Process Coordinated by Its N-Terminal Domain. PLoS Pathog. 2015;11(6):e1004957.
208. Newcomb WW, Homa FL, Brown JC. Herpes simplex virus capsid structure: DNA packaging protein UL25 is located on the external surface of the capsid near the vertices. J Virol. 2006;80(13):6286-94.
209. Bigalke JM, Heldwein EE. Have NEC Coat, Will Travel: Structural Basis of Membrane Budding During Nuclear Egress in Herpesviruses. Adv Virus Res. 2017;97:107-41.
210. Hagen C, Dent KC, Zeev-Ben-Mordehai T, Grange M, Bosse JB, Whittle C, et al. Structural Basis of Vesicle Formation at the Inner Nuclear Membrane. Cell. 2015;163(7):1692-701.
211. Newcomb WW, Fontana J, Winkler DC, Cheng N, Heymann JB, Steven AC. The Primary Enveloped Virion of Herpes Simplex Virus 1: Its Role in Nuclear Egress. mBio. 2017;8(3).
212. Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ, Baines JD. 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):8939-52.
213. Naldinho-Souto R, Browne H, Minson T. Herpes simplex virus tegument protein VP16 is a component of primary enveloped virions. J Virol. 2006;80(5):2582-4.
214. Padula ME, Sydnor ML, Wilson DW. Isolation and preliminary characterization of herpes simplex virus 1 primary enveloped virions from the perinuclear space. J Virol. 2009;83(10):4757-65.
215. Bucks MA, O'Regan KJ, Murphy MA, Wills JW, Courtney RJ. Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids. Virology. 2007;361(2):316-24.
216. Farnsworth A, Wisner TW, Webb M, Roller R, Cohen G, Eisenberg R, 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):10187-92.
217. Liu Z, Kato A, Oyama M, Kozuka-Hata H, Arii J, Kawaguchi Y. Role of Host Cell p32 in Herpes Simplex Virus 1 De-Envelopment during Viral Nuclear Egress. J Virol. 2015;89(17):8982-98.
218. Hirohata Y, Arii J, Liu Z, Shindo K, Oyama M, Kozuka-Hata H, et al. Herpes Simplex Virus 1 Recruits CD98 Heavy Chain and beta1 Integrin to the Nuclear Membrane for Viral De-Envelopment. J Virol. 2015;89(15):7799-812.
219. Klupp BG, Hellberg T, Granzow H, Franzke K, Dominguez Gonzalez B, Goodchild RE, et al. Integrity of the Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton Is Required for Efficient Herpesvirus Nuclear Egress. J Virol. 2017;91(19).
220. Klupp B, Altenschmidt J, Granzow H, Fuchs W, Mettenleiter TC. Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus. J Virol. 2008;82(13):6299-309.

221. Mou F, Wills E, Baines JD. Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. J Virol. 2009;83(10):5181-91.
222. Fan WH, Roberts AP, McElwee M, Bhella D, Rixon FJ, Lauder R. The large tegument protein pUL36 is essential for formation of the capsid vertex-specific component at the capsid-tegument interface of herpes simplex virus 1. J Virol. 2015;89(3):1502-11.
223. Desai PJ. A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. J Virol. 2000;74(24):11608-18.
224. Desai P, Sexton GL, McCaffery JM, Person S. A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation. J Virol. 2001;75(21):10259-71.
225. Mijatov B, Cunningham AL, Diefenbach RJ. Residues F593 and E596 of HSV-1 tegument protein pUL36 (VP1/2) mediate binding of tegument protein pUL37. Virology. 2007;368(1):26-31.
226. Henaff D, Radtke K, Lippe R. Herpesviruses exploit several host compartments for envelopment. Traffic. 2012;13(11):1443-9.
227. Sugimoto K, Uema M, Sagara H, Tanaka M, Sata T, Hashimoto Y, et al. Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. J Virol. 2008;82(11):5198-211.
228. Zhu Q, Courtney RJ. Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. Virology. 1994;204(2):590-9.
229. Harley CA, Dasgupta A, Wilson DW. Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. J Virol. 2001;75(3):1236-51.
230. Rixon FJ, Addison C, McLauchlan J. Assembly of enveloped tegument structures (L particles) can occur independently of virion maturation in herpes simplex virus type 1-infected cells. J Gen Virol. 1992;73 (Pt 2):277-84.
231. McLauchlan J, Rixon FJ. Characterization of enveloped tegument structures (L particles) produced by alphaherpesviruses: integrity of the tegument does not depend on the presence of capsid or envelope. J Gen Virol. 1992;73 (Pt 2):269-76.
232. Jayachandra S, Baghian A, Kousoulas KG. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K is not essential for infectious virus production in actively replicating cells but is required for efficient envelopment and translocation of infectious virions from the cytoplasm to the extracellular space. J Virol. 1997;71(7):5012-24.
233. Melancon JM, Foster TP, Kousoulas KG. Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. J Virol. 2004;78(14):7329-43.
234. Jambunathan N, Chouljenko D, Desai P, Charles AS, Subramanian R, Chouljenko VN, et al. Herpes simplex virus 1 protein UL37 interacts with viral glycoprotein gK and membrane protein UL20 and functions in cytoplasmic virion envelopment. J Virol. 2014;88(11):5927-35.
235. Lau SY, Crump CM. HSV-1 gM and the gK/pUL20 complex are important for the localization of gD and gH/L to viral assembly sites. Viruses. 2015;7(3):915-38.

236. Farnsworth A, Goldsmith K, Johnson DC. Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm. J Virol. 2003;77(15):8481-94.
237. Farnsworth A, Wisner TW, Johnson DC. Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD. J Virol. 2007;81(1):319-31.
238. Stylianou J, Maringer K, Cook R, Bernard E, Elliott G. Virion incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 occurs via glycoprotein E-specific recruitment to the late secretory pathway. J Virol. 2009;83(10):5204-18.
239. Pawliczek T, Crump CM. Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression. J Virol. 2009;83(21):11254-64.
240. Miranda-Saksena M, Boadle RA, Aggarwal A, Tijono B, Rixon FJ, Diefenbach RJ, et al. Herpes simplex virus utilizes the large secretory vesicle pathway for anterograde transport of tegument and envelope proteins and for viral exocytosis from growth cones of human fetal axons. J Virol. 2009;83(7):3187-99.
241. Remillard-Labrosse G, Mihai C, Duron J, Guay G, Lippe R. Protein kinase D-dependent trafficking of the large Herpes simplex virus type 1 capsids from the TGN to plasma membrane. Traffic. 2009;10(8):1074-83.
242. Roussel E, Lippe R. Cellular Protein Kinase D Modulators Play a Role during Multiple Steps of Herpes Simplex Virus 1 Egress. J Virol. 2018;92(23).
243. Fugmann T, Hausser A, Schoffler P, Schmid S, Pfizenmaier K, Olayioye MA. Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. J Cell Biol. 2007;178(1):15-22.
244. Hogue IB, Bosse JB, Hu JR, Thiberge SY, Enquist LW. Cellular mechanisms of alpha herpesvirus egress: live cell fluorescence microscopy of pseudorabies virus exocytosis. PLoS Pathog. 2014;10(12):e1004535.
245. Roberts KL, Baines JD. Myosin Va enhances secretion of herpes simplex virus 1 virions and cell surface expression of viral glycoproteins. J Virol. 2010;84(19):9889-96.
246. De Magistris P, Antonin W. The Dynamic Nature of the Nuclear Envelope. Curr Biol. 2018;28(8):R487-R97.
247. Kite G. THE RELATIVE PERMEABILITY OF THE SURFACE AND INTERIOR PORTIONS OF THE CYTOPLASM OF ANIMAL AND PLANT CELLS: (A PRELIMINARY PAPER.). The Biological Bulletin. 1913;25(1):1-7.
248. Tingey M, Mudumbi KC, Schirmer EC, Yang W. Casting a Wider Net: Differentiating between Inner Nuclear Envelope and Outer Nuclear Envelope Transmembrane Proteins. Int J Mol Sci. 2019;20(21):5248.
249. Voeltz GK, Prinz WA. Sheets, ribbons and tubules - how organelles get their shape. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(3):258-64.
250. Watson ML. The nuclear envelope; its structure and relation to cytoplasmic membranes. J Biophys Biochem Cytol. 1955;1(3):257-70.
251. Schirmer EC, Gerace L. Organellar proteomics: the prizes and pitfalls of opening the nuclear envelope. Genome Biol. 2002;3(4):REVIEWS1008.

252. Hetzer MW, Walther TC, Mattaj IW. Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:347-80.
253. Beck M, Forster F, Ecke M, Plitzko JM, Melchior F, Gerisch G, et al. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. Science. 2004;306(5700):1387-90.
254. Hampoelz B, Andres-Pons A, Kastritis P, Beck M. Structure and Assembly of the Nuclear Pore Complex. Annu Rev Biophys. 2019;48:515-36.
255. Beck M, Hurt E. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017;18(2):73-89.
256. Hinshaw JE, Carragher BO, Milligan RA. Architecture and design of the nuclear pore complex. Cell. 1992;69(7):1133-41.
257. Mudumbi KC, Czapiewski R, Ruba A, Junod SL, Li Y, Luo W, et al. Nucleoplasmic signals promote directed transmembrane protein import simultaneously via multiple channels of nuclear pores. Nat Commun. 2020;11(1):2184.
258. Jahed Z, Soheilypour M, Peyro M, Mofrad MR. The LINC and NPC relationship - it's complicated! J Cell Sci. 2016;129(17):3219-29.
259. Lusk CP, King MC. The nucleus: keeping it together by keeping it apart. Curr Opin Cell Biol. 2017;44:44-50.
260. Ungricht R, Klann M, Horvath P, Kutay U. Diffusion and retention are major determinants of protein targeting to the inner nuclear membrane. J Cell Biol. 2015;209(5):687-703.
261. Katta SS, Smoyer CJ, Jaspersen SL. Destination: inner nuclear membrane. Trends Cell Biol. 2014;24(4):221-9.
262. King MC, Lusk CP, Blobel G. Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. Nature. 2006;442(7106):1003-7.
263. Lusk CP, Blobel G, King MC. Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(5):414-20.
264. Tapley EC, Ly N, Starr DA. Multiple mechanisms actively target the SUN protein UNC-84 to the inner nuclear membrane. Mol Biol Cell. 2011;22(10):1739-52.
265. Saksena S, Summers MD, Burks JK, Johnson AE, Braunagel SC. Importin-alpha-16 is a translocon-associated protein involved in sorting membrane proteins to the nuclear envelope. Nat Struct Mol Biol. 2006;13(6):500-8.
266. Almendariz-Palacios C, Gillespie ZE, Janzen M, Martinez V, Bridger JM, Harkness TAA, et al. The Nuclear Lamina: Protein Accumulation and Disease. Biomedicines. 2020;8(7).
267. de Leeuw R, Gruenbaum Y, Medalia O. Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. Trends Cell Biol. 2018;28(1):34-45.
268. Goldberg MW, Fiserova J, Huttenlauch I, Stick R. A new model for nuclear lamina organization. Biochem Soc Trans. 2008;36(Pt 6):1339-43.
269. Margalit A, Segura-Totten M, Gruenbaum Y, Wilson KL. Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(9):3290-5.
270. Margalit A, Brachner A, Gotzmann J, Foisner R, Gruenbaum Y. Barrier-to-autointegration factor--a BAFfling little protein. Trends Cell Biol. 2007;17(4):202-8.
271. Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. Physiol Rev. 2006;86(3):967-1008.

272. Prokocimer M, Davidovich M, Nissim-Rafinia M, Wiesel-Motiuk N, Bar DZ, Barkan R, et al. Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. J Cell Mol Med. 2009;13(6):1059-85.
273. Hetzer MW. The nuclear envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(3):a000539.
274. Morris NR. Nuclear migration. From fungi to the mammalian brain. J Cell Biol. 2000;148(6):1097-101.
275. Bone CR, Starr DA. Nuclear migration events throughout development. J Cell Sci. 2016;129(10):1951-61.
276. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. J Cell Biol. 2006;172(1):41-53.
277. Hieda M. Signal Transduction across the Nuclear Envelope: Role of the LINC Complex in Bidirectional Signaling. Cells. 2019;8(2):124.
278. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(3):849-54.
279. Koonin EV. The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. Genome Biol. 2010;11(5):209.
280. Baum DA, Baum B. An inside-out origin for the eukaryotic cell. BMC Biol. 2014;12(1):76.
281. Janota CS, Calero-Cuenca FJ, Gomes ER. The role of the cell nucleus in mechanotransduction. Curr Opin Cell Biol. 2020;63:204-11.
282. Starr DA, Fridolfsson HN. Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. Annu Rev Cell Dev Biol. 2010;26(1):421-44.
283. Burke B. It takes KASH to hitch to the SUN. Cell. 2012;149(5):961-3.
284. Starr DA. KASH and SUN proteins. Curr Biol. 2011;21(11):R414-5.
285. Meier I. LINCing the eukaryotic tree of life - towards a broad evolutionary comparison of nucleocytoplasmic bridging complexes. J Cell Sci. 2016;129(19):3523-31.
286. Mellad JA, Warren DT, Shanahan CM. Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol. 2011;23(1):47-54.
287. Luxton GW, Starr DA. KASHing up with the nucleus: novel functional roles of KASH proteins at the cytoplasmic surface of the nucleus. Curr Opin Cell Biol. 2014;28:69-75.
288. Starr DA, Fischer JA. KASH 'n Karry: the KASH domain family of cargo-specific cytoskeletal adaptor proteins. Bioessays. 2005;27(11):1136-46.
289. Razafsky D, Hodzic D. A variant of Nesprin1 giant devoid of KASH domain underlies the molecular etiology of autosomal recessive cerebellar ataxia type I. Neurobiol Dis. 2015;78:57-67.
290. Horn HF. LINC complex proteins in development and disease. In: Stewart CL, editor. Current topics in developmental biology. 109: Elsevier; 2014. p. 287-321.
291. Meinke P, Schirmer EC. LINC'ing form and function at the nuclear envelope. FEBS Lett. 2015;589(19 Pt A):2514-21.
292. Rajgor D, Shanahan CM. Nesprins: from the nuclear envelope and beyond. Expert Rev Mol Med. 2013;15:e5.
293. Kim DI, Birendra KC, Roux KJ. Making the LINC: SUN and KASH protein interactions. Biol Chem. 2015;396(4):295-310.

294. Wilhelmsen K, Litjens SH, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, et al. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. J Cell Biol. 2005;171(5):799-810.
295. Liu L, Luo Q, Sun J, Song G. Nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in 3D cell migration. Exp Cell Res. 2016;348(1):56-65.
296. Malone CJ, Fixsen WD, Horvitz HR, Han M. UNC-84 localizes to the nuclear envelope and is required for nuclear migration and anchoring during C. elegans development. Development. 1999;126(14):3171-81.
297. Rothballer A, Kutay U. The diverse functional LINCs of the nuclear envelope to the cytoskeleton and chromatin. Chromosoma. 2013;122(5):415-29.
298. Sosa BA, Kutay U, Schwartz TU. Structural insights into LINC complexes. Curr Opin Struct Biol. 2013;23(2):285-91.
299. Gob E, Schmitt J, Benavente R, Alsheimer M. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. PLoS One. 2010;5(8):e12072.
300. Gao Q, Khan R, Yu C, Alsheimer M, Jiang X, Ma H, et al. The testis-specific LINC component SUN3 is essential for sperm head shaping during mouse spermiogenesis. J Biol Chem. 2020;295(19):6289-98.
301. Nolte W, Thaller G, Kuehn C. Selection signatures in four German warmblood horse breeds: Tracing breeding history in the modern sport horse. PLoS One. 2019;14(4):e0215913.
302. Morimoto A, Shibuya H, Zhu X, Kim J, Ishiguro K, Han M, et al. A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. J Cell Biol. 2012;198(2):165-72.
303. Pasch E, Link J, Beck C, Scheuerle S, Alsheimer M. The LINC complex component Sun4 plays a crucial role in sperm head formation and fertility. Biol Open. 2015;4(12):1792-802.
304. Calvi A, Wong AS, Wright G, Wong ES, Loo TH, Stewart CL, et al. SUN4 is essential for nuclear remodeling during mammalian spermiogenesis. Dev Biol. 2015;407(2):321-30.
305. Kracklauer MP, Link J, Alsheimer M. LINCing the nuclear envelope to gametogenesis. Current topics in developmental biology. 102: Elsevier; 2013. p. 127-57.
306. Frohnert C, Schweizer S, Hoyer-Fender S. SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. Mol Hum Reprod. 2011;17(4):207-18.
307. Yassine S, Escoffier J, Abi Nahed R, Pierre V, Karaouzene T, Ray PF, et al. Dynamics of Sun5 localization during spermatogenesis in wild type and Dpy19l2 knock-out mice indicates that Sun5 is not involved in acrosome attachment to the nuclear envelope. PLoS One. 2015;10(3):e0118698.
308. Elkhatib RA, Paci M, Longepied G, Saias-Magnan J, Courbiere B, Guichaoua MR, et al. Homozygous deletion of SUN5 in three men with decapitated spermatozoa. Hum Mol Genet. 2017;26(16):3167-71.
309. Shang Y, Zhu F, Wang L, Ouyang YC, Dong MZ, Liu C, et al. Essential role for SUN5 in anchoring sperm head to the tail. Elife. 2017;6:e28199.
310. Dreger M, Bengtsson L, Schoneberg T, Otto H, Hucho F. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(21):11943-8.

311. Padmakumar VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA, et al. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. J Cell Sci. 2005;118(Pt 15):3419-30.
312. Liu Q, Pante N, Misteli T, Elsagga M, Crisp M, Hodzic D, et al. Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes. J Cell Biol. 2007;178(5):785-98.
313. Gob E, Meyer-Natus E, Benavente R, Alsheimer M. Expression of individual mammalian Sun1 isoforms depends on the cell type. Commun Integr Biol. 2011;4(4):440-2.
314. Hodzic DM, Yeater DB, Bengtsson L, Otto H, Stahl PD. Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. J Biol Chem. 2004;279(24):25805-12.
315. Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM, et al. SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. Mol Cell Biol. 2006;26(10):3738-51.
316. Haque F, Mazzeo D, Patel JT, Smallwood DT, Ellis JA, Shanahan CM, et al. Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. J Biol Chem. 2010;285(5):3487-98.
317. Casasola A, Scalzo D, Nandakumar V, Halow J, Recillas-Targa F, Groudine M, et al. Prelamin A processing, accumulation and distribution in normal cells and laminopathy disorders. Nucleus. 2016;7(1):84-102.
318. Lei K, Zhang X, Ding X, Guo X, Chen M, Zhu B, et al. SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(25):10207-12.
319. Schirmer EC, Florens L, Guan T, Yates JR, 3rd, Gerace L. Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. Science. 2003;301(5638):1380-2.
320. Folker ES, Östlund C, Luxton GWG, Worman HJ, Gundersen GG. Lamin A variants that cause striated muscle disease are defective in anchoring transmembrane actin-associated nuclear lines for nuclear movement. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011;108(1):131-6.
321. Turgay Y, Ungricht R, Rothballer A, Kiss A, Csucs G, Horvath P, et al. A classical NLS and the SUN domain contribute to the targeting of SUN2 to the inner nuclear membrane. EMBO J. 2010;29(14):2262-75.
322. Luxton GW, Gomes ER, Folker ES, Vintinner E, Gundersen GG. Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. Science. 2010;329(5994):956-9.
323. Chang W, Antoku S, Ostlund C, Worman HJ, Gundersen GG. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes in migrating myoblasts. Nucleus. 2015;6(1):77-88.
324. Starr DA. Cell biology. Nuclei get TAN lines. Science. 2010;329(5994):909-10.
325. Obino D, Farina F, Malbec O, Saez PJ, Maurin M, Gaillard J, et al. Actin nucleation at the centrosome controls lymphocyte polarity. Nat Commun. 2016;7(1):10969.
326. Arsenovic PT, Ramachandran I, Bathula K, Zhu R, Narang JD, Noll NA, et al. Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension. Biophys J. 2016;110(1):34-43.
327. Liang Y, Chiu PH, Yip KY, Chan SY. Subcellular localization of SUN2 is regulated by lamin A and Rab5. PLoS One. 2011;6(5):e20507.

328. Zuleger N, Kelly DA, Richardson AC, Kerr AR, Goldberg MW, Goryachev AB, et al. System analysis shows distinct mechanisms and common principles of nuclear envelope protein dynamics. J Cell Biol. 2011;193(1):109-23.
329. Tapley EC, Starr DA. Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN-KASH bridges across the nuclear envelope. Curr Opin Cell Biol. 2013;25(1):57-62.
330. Hieda M. Implications for Diverse Functions of the LINC Complexes Based on the Structure. Cells. 2017;6(1).
331. Sosa BA, Rothballer A, Kutay U, Schwartz TU. LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. Cell. 2012;149(5):1035-47.
332. Jahed Z, Fadavi D, Vu UT, Asgari E, Luxton GWG, Mofrad MRK. Molecular Insights into the Mechanisms of SUN1 Oligomerization in the Nuclear Envelope. Biophys J. 2018;114(5):1190-203.
333. Demircioglu FE, Cruz VE, Schwartz TU. Purification and structural analysis of SUN and KASH domain proteins. Methods in enzymology. 569: Elsevier; 2016. p. 63-78.
334. Jahed Z, Vu UT, Fadavi D, Ke H, Rathish A, Kim SCJ, et al. A molecular model for LINC complex regulation: activation of SUN2 for KASH binding. Mol Biol Cell. 2018;29(16):2012-23.
335. Cain NE, Jahed Z, Schoenhofen A, Valdez VA, Elkin B, Hao H, et al. Conserved SUN-KASH Interfaces Mediate LINC Complex-Dependent Nuclear Movement and Positioning. Curr Biol. 2018;28(19):3086-97 e4.
336. Wang W, Shi Z, Jiao S, Chen C, Wang H, Liu G, et al. Structural insights into SUN-KASH complexes across the nuclear envelope. Cell Res. 2012;22(10):1440-52.
337. Nie S, Ke H, Gao F, Ren J, Wang M, Huo L, et al. Coiled-Coil Domains of SUN Proteins as Intrinsic Dynamic Regulators. Structure. 2016;24(1):80-91.
338. Liang WC, Mitsuhashi H, Keduka E, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I, et al. TMEM43 mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy-related myopathy. Ann Neurol. 2011;69(6):1005-13.
339. Heffler J, Shah PP, Robison P, Phyo S, Veliz K, Uchida K, et al. A Balance Between Intermediate Filaments and Microtubules Maintains Nuclear Architecture in the Cardiomyocyte. Circ Res. 2020;126(3):e10-e26.
340. Lu W, Schneider M, Neumann S, Jaeger VM, Taranum S, Munck M, et al. Nesprin interchain associations control nuclear size. Cell Mol Life Sci. 2012;69(20):3493-509.
341. Gundersen GG, Worman HJ. Nuclear positioning. Cell. 2013;152(6):1376-89.
342. Zhu R, Antoku S, Gundersen GG. Centrifugal Displacement of Nuclei Reveals Multiple LINC Complex Mechanisms for Homeostatic Nuclear Positioning. Curr Biol. 2017;27(20):3097-110 e5.
343. Jansen KA, Atherton P, Ballestrem C. Mechanotransduction at the cell-matrix interface. Semin Cell Dev Biol. 2017;71:75-83.
344. Cohen-Fix O, Kutay U. Editorial overview: The cell nucleus: Plastic, elastic and fantastic. Curr Opin Cell Biol. 2016;40:iv-v.
345. Guilluy C, Osborne LD, Van Landeghem L, Sharek L, Superfine R, Garcia-Mata R, et al. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. Nat Cell Biol. 2014;16(4):376-81.
346. Uzer G, Thompson WR, Sen B, Xie Z, Yen SS, Miller S, et al. Cell Mechanosensitivity to Extremely Low-Magnitude Signals Is Enabled by a LINCed Nucleus. Stem Cells. 2015;33(6):2063-76.

347. Shah P, Chaumet A, Royle SJ, Bard FA. The NAE Pathway: Autobahn to the Nucleus for Cell Surface Receptors. Cells. 2019;8(8).
348. Chaumet A, Wright GD, Seet SH, Tham KM, Gounko NV, Bard F. Nuclear envelope-associated endosomes deliver surface proteins to the nucleus. Nat Commun. 2015;6(1):8218.
349. Morgan JT, Pfeiffer ER, Thirkill TL, Kumar P, Peng G, Fridolfsson HN, et al. Nesprin-3 regulates endothelial cell morphology, perinuclear cytoskeletal architecture, and flow-induced polarization. Mol Biol Cell. 2011;22(22):4324-34.
350. Schneider M, Lu W, Neumann S, Brachner A, Gotzmann J, Noegel AA, et al. Molecular mechanisms of centrosome and cytoskeleton anchorage at the nuclear envelope. Cell Mol Life Sci. 2011;68(9):1593-610.
351. Stewart RM, Zubek AE, Rosowski KA, Schreiner SM, Horsley V, King MC. Nuclear-cytoskeletal linkages facilitate cross talk between the nucleus and intercellular adhesions. J Cell Biol. 2015;209(3):403-18.
352. Thakar K, May CK, Rogers A, Carroll CW. Opposing roles for distinct LINC complexes in regulation of the small GTPase RhoA. Mol Biol Cell. 2017;28(1):182-91.
353. Elhanany-Tamir H, Yu YV, Shnayder M, Jain A, Welte M, Volk T. Organelle positioning in muscles requires cooperation between two KASH proteins and microtubules. J Cell Biol. 2012;198(5):833-46.
354. Dawe HR, Adams M, Wheway G, Szymanska K, Logan CV, Noegel AA, et al. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. J Cell Sci. 2009;122(Pt 15):2716-26.
355. Mejat A, Misteli T. LINC complexes in health and disease. Nucleus. 2010;1(1):40-52.
356. Piccus R, Brayson D. The nuclear envelope: LINCing tissue mechanics to genome regulation in cardiac and skeletal muscle. Biol Lett. 2020;16(7):20200302.
357. Ebrahimi H, Cooper JP. Finding a place in the SUN: telomere maintenance in a diverse nuclear landscape. Curr Opin Cell Biol. 2016;40:145-52.
358. Christophorou N, Rubin T, Bonnet I, Piolot T, Arnaud M, Huynh JR. Microtubule-driven nuclear rotations promote meiotic chromosome dynamics. Nat Cell Biol. 2015;17(11):1388-400.
359. Lawrence KS, Tapley EC, Cruz VE, Li Q, Aung K, Hart KC, et al. LINC complexes promote homologous recombination in part through inhibition of nonhomologous end joining. J Cell Biol. 2016;215(6):801-21.
360. Huang Y, Li L. DNA crosslinking damage and cancer - a tale of friend and foe. Transl Cancer Res. 2013;2(3):144-54.
361. Lei K, Zhu X, Xu R, Shao C, Xu T, Zhuang Y, et al. Inner nuclear envelope proteins SUN1 and SUN2 play a prominent role in the DNA damage response. Curr Biol. 2012;22(17):1609-15.
362. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. Mol Cell. 2010;40(2):179-204.
363. Lottersberger F, Karssemeijer RA, Dimitrova N, de Lange T. 53BP1 and the LINC Complex Promote Microtubule-Dependent DSB Mobility and DNA Repair. Cell. 2015;163(4):880-93.
364. Luxton GW, Gomes ER, Folker ES, Worman HJ, Gundersen GG. TAN lines: a novel nuclear envelope structure involved in nuclear positioning. Nucleus. 2011;2(3):173-81.
365. Janin A, Bauer D, Ratti F, Millat G, Mejat A. Nuclear envelopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology. Orphanet J Rare Dis. 2017;12(1):147.
366. Calvi A, Burke B. LINC Complexes and Their Role in Human Disease. eLS2015. p. 1-8.

367. Meinke P, Mattioli E, Haque F, Antoku S, Columbaro M, Straatman KR, et al. Muscular dystrophy-associated SUN1 and SUN2 variants disrupt nuclear-cytoskeletal connections and myonuclear organization. PLoS Genet. 2014;10(9):e1004605.
368. Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, et al. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Nat Genet. 1994;8(4):323-7.
369. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Nat Genet. 1999;21(3):285-8.
370. Meinke P, Nguyen TD, Wehnert MS. The LINC complex and human disease. Biochem Soc Trans. 2011;39(6):1693-7.
371. Dai X, Zheng C, Chen X, Tang Y, Zhang H, Yan C, et al. Targeted next-generation sequencing identified a known EMD mutation in a Chinese patient with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Hum Genome Var. 2019;6:42.
372. Wheeler MA, Davies JD, Zhang Q, Emerson LJ, Hunt J, Shanahan CM, et al. Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Exp Cell Res. 2007;313(13):2845-57.
373. Li P, Meinke P, Huong le TT, Wehnert M, Noegel AA. Contribution of SUN1 mutations to the pathomechanism in muscular dystrophies. Hum Mutat. 2014;35(4):452-61.
374. Lv XB, Liu L, Cheng C, Yu B, Xiong L, Hu K, et al. SUN2 exerts tumor suppressor functions by suppressing the Warburg effect in lung cancer. Sci Rep. 2015;5:17940.
375. Chen X, Chen Y, Huang HM, Li HD, Bu FT, Pan XY, et al. SUN2: A potential therapeutic target in cancer. Oncol Lett. 2019;17(2):1401-8.
376. Matsumoto A, Hieda M, Yokoyama Y, Nishioka Y, Yoshidome K, Tsujimoto M, et al. Global loss of a nuclear lamina component, lamin A/C, and LINC complex components SUN1, SUN2, and nesprin-2 in breast cancer. Cancer Med. 2015;4(10):1547-57.
377. Donahue DA, Amraoui S, di Nunzio F, Kieffer C, Porrot F, Opp S, et al. SUN2 Overexpression Deforms Nuclear Shape and Inhibits HIV. J Virol. 2016;90(8):4199-214.
378. Schaller T, Bulli L, Pollpeter D, Betancor G, Kutzner J, Apolonia L, et al. Effects of Inner Nuclear Membrane Proteins SUN1/UNC-84A and SUN2/UNC-84B on the Early Steps of HIV-1 Infection. J Virol. 2017;91(19).
379. Luo X, Yang W, Gao G. SUN1 Regulates HIV-1 Nuclear Import in a Manner Dependent on the Interaction between the Viral Capsid and Cellular Cyclophilin A. J Virol. 2018;92(13).
380. Lahaye X, Satoh T, Gentili M, Cerboni S, Silvin A, Conrad C, et al. Nuclear Envelope Protein SUN2 Promotes Cyclophilin-A-Dependent Steps of HIV Replication. Cell Rep. 2016;15(4):879-92.
381. Donahue DA, Porrot F, Couespel N, Schwartz O. SUN2 Silencing Impairs CD4 T Cell Proliferation and Alters Sensitivity to HIV-1 Infection Independently of Cyclophilin A. J Virol. 2017;91(6).
382. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. J Virol. 1998;72(11):8463-71.
383. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. Biochem J. 2012;443(3):603-18.
384. Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. Curr Gene Ther. 2016;16(3):156-67.

385. Gibson DG. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. Methods Enzymol. 2011;498:349-61.
386. Foster DJ, Barros S, Duncan R, Shaikh S, Cantley W, Dell A, et al. Comprehensive evaluation of canonical versus Dicer-substrate siRNA in vitro and in vivo. RNA. 2012;18(3):557-68.
387. Kubo T, Zhelev Z, Ohba H, Bakalova R. Modified 27-nt dsRNAs with dramatically enhanced stability in serum and long-term RNAi activity. Oligonucleotides. 2007;17(4):445-64.
388. Turgay Y, Champion L, Balazs C, Held M, Toso A, Gerlich DW, et al. SUN proteins facilitate the removal of membranes from chromatin during nuclear envelope breakdown. J Cell Biol. 2014;204(7):1099-109.
389. Li P, Noegel AA. Inner nuclear envelope protein SUN1 plays a prominent role in mammalian mRNA export. Nucleic Acids Res. 2015;43(20):9874-88.
390. Onomoto K, Yoneyama M, Fung G, Kato H, Fujita T. Antiviral innate immunity and stress granule responses. Trends Immunol. 2014;35(9):420-8.
391. Kedersha N, Anderson P. Mammalian stress granules and processing bodies. Methods Enzymol. 2007;431:61-81.
392. Esclatine A, Taddeo B, Roizman B. Herpes simplex virus 1 induces cytoplasmic accumulation of TIA-1/TIAR and both synthesis and cytoplasmic accumulation of tristetraprolin, two cellular proteins that bind and destabilize AU-rich RNAs. J Virol. 2004;78(16):8582-92.
393. Valiente-Echeverria F, Melnychuk L, Mouland AJ. Viral modulation of stress granules. Virus Res. 2012;169(2):430-7.
394. McCormick C, Khaperskyy DA. Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. Nat Rev Immunol. 2017;17(10):647-60.
395. Grondin B, DeLuca N. Herpes simplex virus type 1 ICP4 promotes transcription preinitiation complex formation by enhancing the binding of TFIID to DNA. J Virol. 2000;74(24):11504-10.
396. Leege T, Fuchs W, Granzow H, Kopp M, Klupp BG, Mettenleiter TC. Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1. J Virol. 2009;83(2):896-907.
397. Nabavinia MS, Rostami S, Ghasemi F, Meshkat Z. Application of McCoy Cell Line for Propagation of Herpes Simplex Virus Type 1. Iran J Med Sci. 2015;40(3):268-71.
398. Bhargava A, Lahaye X, Manel N. Let me in: Control of HIV nuclear entry at the nuclear envelope. Cytokine Growth Factor Rev. 2018;40:59-67.
399. Sun WW, Jiao S, Sun L, Zhou Z, Jin X, Wang JH. SUN2 Modulates HIV-1 Infection and Latency through Association with Lamin A/C To Maintain the Repressive Chromatin. mBio. 2018;9(3).
400. Buchkovich NJ, Maguire TG, Alwine JC. Role of the endoplasmic reticulum chaperone BiP, SUN domain proteins, and dynein in altering nuclear morphology during human cytomegalovirus infection. J Virol. 2010;84(14):7005-17.
401. Das S, Vasanji A, Pellett PE. Three-dimensional structure of the human cytomegalovirus cytoplasmic virion assembly complex includes a reoriented secretory apparatus. J Virol. 2007;81(21):11861-9.
402. Boruchowicz H, Hawkins J, Cruz-Palomar K, Lippe R. The XPO6 exportin mediates HSV-1 gM nuclear release late in infection. J Virol. 2020.
403. Nagano M, Toshima JY, Siekhaus DE, Toshima J. Rab5-mediated endosome formation is regulated at the trans-Golgi network. Commun Biol. 2019;2:419.

404. Baines JD, Ward PL, Campadelli-Fiume G, Roizman B. The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. J Virol. 1991;65(12):6414-24.
405. Ryckman BJ, Roller RJ. Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. J Virol. 2004;78(1):399-412.

Annexes

	Gène	Nom de la protéine	Acides aminés	Masse (kDa)	Description
Capside	*UL6*	pUL6	676	74.1	Protéine portail
	UL17	pUL17	703	74.6	Protéine CVSC
	UL18	VP23	318	34.3	Protéine triplex
	UL19	VP5	1374	149.1	Protéine majeure de la capside, hexon et penton
	UL25	pUL25	580	62.7	Protéine CVSC
	UL26	VP24	247	26.6	Protéase (domaine N-terminal de pUL26)
	UL35	VP26	112	12.1	Lie la pointe VP5 de l'hexagone
	UL38	VP19C	465	50.3	Protéine triplex
Tegument	*RL1*	ICP34.5	248	26.2	Facteur de neurovirulence
	RL2	IPC0	775	78.5	Ubiquitine ligase E3
	RS1	ICP4	1298	132.8	Gène essentiel ; facteur de transcription virale
	UL7	pUL7	296	33.1	
	UL11	pUL11	96	10.5	Myristoylé et palmitoylé
	UL13	pUL13	518	57.2	Sérine/thréonine-protéine kinase
	UL14	pUL14	219	23.9	
	UL16	pUL16	373	40.4	
	UL21	pUL21	535	57.6	
	UL23	TK	376	41.0	Thymidine kinase
	UL36	VP1/2	3112	333.6	Gène essentiel
	UL37	pUL37	1123	120.6	Gène essentiel
	UL41	Vhs	489	54.9	Endoribonuclease

	UL46	VP11/12	718	78.2	
	UL47	VP13/14	693	73.8	
	UL48	VP16	490	54.3	Gène essentiel ; activateur transcriptionnel des gènes IE
	UL49	VP22	301	32.3	
	UL50	dUTPase	371	39.1	Désoxyuridine 5'-triphosphate nucléohydrolase
	UL51	pUL51	244	25.5	Palmitoylé
	UL55	pUL55	186	20.5	
	US2	pUS2	291	32.5	
	US3	pUS3	481	52.8	Sérine/thréonine-protéine kinase
	US10	pUS10	306	33.5	
	US11	pUS11	161	17.8	
	UL1	gL	224	24.9	Hétérodimère avec gH ; essentiel pour l'entrée
	UL10	gM	473	51.4	Domaines transmembranaires multiples ; forme complexes avec gN
	UL20	pUL20	222	24.2	Domaines transmembranaires multiples ; forme complexes avec gK
	UL22	gH	838	90.4	Hétérodimère avec gL ; essentiel pour l'entrée
	UL27	gB	904	1000.3	Essentiel pour l'entrée

Enveloppe	*UL43*	pUL43	417	42.9	Domaines transmembranaires multiples
	UL44	gC	511	55.0	Liaison au sulfate d'héparine
	UL45	pUL45	172	18.2	
	UL49.5	gN	91	9.2	forme complexes avec gM
	UL53	gK	338	37.6	Domaines transmembranaires multiples ; forme complexes avec pUL10
	UL56	pUL56	197	21.2	
	US4	gG	238	25.2	Protéine de liaison aux chimiokines
	US5	gJ	92	9.6	
	US6	gD	394	43.3	Essentiel pour l'entrée
	US7	gI	390	41.4	Forme un complexe avec le gE ; récepteur Fc
	US8	gE	550	59.1	Forme un complexe avec le gI ; récepteur Fc
	US9	pUS9	90	10.0	

Annexe 1. – Protéines du virion du VHS-1. Adapté de (90)